(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 752 449**

(51) Int. CI.:

C12N 9/54 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.10.2012 PCT/EP2012/070721**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **02.05.2013 WO13060621**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.10.2012 E 12772990 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2019 EP 2771459**

(54) Título: **Variantes de proteasa con desempeño mejorado y estables a la temperatura**

(30) Prioridad:

28.10.2011 DE 102011118021

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.04.2020

(73) Titular/es:

HENKEL AG & CO. KGAA (100.0%)
Henkelstrasse 67
40589 Düsseldorf, DE

(72) Inventor/es:

HELLMUTH, HENDRIK;
MERKEL, MARION;
LAUFS, BRIAN;
WIELAND, SUSANNE;
O'CONNELL, TIMOTHY;
TONDERA, SUSANNE y
WEBER, THOMAS

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Variantes de proteasa con desempeño mejorado y estables a la temperatura

La invención está en el campo de la tecnología de las enzimas. La invención se refiere en particular a proteasas así como su preparación, cuya secuencia de aminoácidos fue cambiada en particular respecto al uso en detergentes y agentes de limpieza, todas las proteasas suficientemente similares con una correspondiente modificación y para los ácidos nucleicos que las codifican. La invención se refiere además a procedimientos y usos de estas proteasas así como agentes que las contienen, en particular detergentes y agentes de limpieza.

Las proteasas pertenecen principalmente a las enzimas más importantes técnicamente. Para detergentes y agentes de limpieza son las enzimas establecidas por más largo tiempo y presentes en prácticamente todos los detergentes y agentes de limpieza modernos y efectivos. Causan la degradación de suciedades que tienen proteína en el elemento para limpieza. Entre ellas a su vez son particularmente importantes las proteasas del tipo de la subtilisina (subtilasas, subtilopeptidasas, EC 3.4.21.62), que debido a los aminoácidos con eficacia catalítica son serina-proteasas. Actúan como endopeptidasas e hidrolizan cualquier enlace de amida grasa que está en el interior de péptidos o proteínas. Su pH óptimo está usualmente en el intervalo claramente alcalino. Por ejemplo el artículo "Subtilases: Subtilisin-like proteases" de R. Siezen, páginas 75-95 en "Subtilisin enzymes", editado por R. Bott y C. Betzel, Nueva York, 1996 ofrece un vistazo sobre esta familia. Las subtilasas se forman de manera natural de microorganismos. Entre ellos se mencionan en particular las formadas de especies de *Bacillus* y subtilisinas secretadas, como el grupo más importante dentro de las subtilasas.

Ejemplos de las proteasas del tipo de la subtilisina usadas preferiblemente en detergentes y agentes de limpieza son las subtilisinas BPN' y Carlsberg, la proteasa PB92, las subtilisinas 147 y 309, la proteasa de *Bacillus lentus*, en particular de *Bacillus lentus* DSM 5483, subtilisina DY y las enzimas termitasa, proteinasa K y las proteasas TW3 y TW7 que van a ser asignadas en sentido estricto a las subtilasas, aunque ya no a las subtilisinas, así como variantes de las proteasas mencionadas, que exhiben una secuencia de aminoácidos modificada respecto a la proteasa de partida. Las proteasas son modificadas de manera focalizada o fortuita mediante procedimientos conocidos a partir del estado de la técnica y así optimizadas por ejemplo para el uso en detergentes y agentes de limpieza. A ellos pertenecen la mutagénesis puntual, mutagénesis de eliminación o de inserción, o fusión con otras proteínas o partes de proteínas. De este modo, para la mayoría de las proteasas conocidas a partir del estado de la técnica, se conocen de modo correspondiente variantes optimizadas.

En los documentos internacionales WO 95/23221 y WO 92/21760 se divulgan variantes de las proteasas de *Bacillus lentus* DSM 5483, que son adecuadas para su uso en detergentes o agente limpiadores. Además, en el documento internacional WO 2011/032988 se divulgan detergentes y agentes de limpieza, que contienen así mismo variantes de la proteasa de *Bacillus lentus* DSM 5483. Las variantes de proteasa divulgadas en estos documentos, aparte de otras posiciones, están modificadas en las posiciones 3, 4, 99 y 199 en el sistema de numeración de la proteasa alcalina de *Bacillus lentus* DSM 5483 y por ejemplo en las posiciones mencionadas exhiben los aminoácidos 3T, 4I, 99D, 99E o 199I. De estos documentos no surgen sin embargo combinaciones de estas modificaciones, como se describen a continuación.

De modo sorprendente se ha establecido que una proteasa del tipo de la proteasa alcalina de *Bacillus lentus* DSM 5483 o una proteasa suficientemente similar a ella (respecto a la identidad de secuencia), que exhibe varias de estas modificaciones en combinación, es adecuada y ventajosamente mejorada para su uso en detergentes o agentes limpiadores, en particular respecto al poder de lavado y/o la estabilidad.

Es objetivo de la invención una proteasa que comprende una secuencia de aminoácidos, que es idéntica en por lo menos 98% a la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO. 1 en la totalidad de su longitud y en la numeración de acuerdo con SEQ ID NO. 1 la sustitución de aminoácidos R99E o R99D en combinación con las sustituciones de aminoácido S3T, V4I y V199I, en las que la proteasa en detergentes y agentes de limpieza exhibe un desempeño mejorado de limpieza sobre por lo menos una suciedad sensible a la proteasa, en comparación con una proteasa de acuerdo con SEQ ID NO. 1.

Otro objetivo de la invención es un procedimiento para la preparación de una proteasa, que comprende la incorporación de una sustitución de aminoácidos R99E o R99D en combinación con las sustituciones de aminoácido S3T, V4I y V199I, en la numeración de acuerdo con SEQ ID NO. 1, en una proteasa de partida, que es idéntica en por lo menos 98% a la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO. 1 sobre la totalidad de su longitud, en la que la proteasa en detergentes y agentes de limpieza exhibe, en comparación con una proteasa de acuerdo con SEQ ID NO. 1, un desempeño de limpieza mejorado sobre por lo menos una suciedad sensible a la proteasa.

Por ello, una proteasa en el sentido del presente documento comprende tanto la proteasa como tal, como también una proteasa preparada con un procedimiento de acuerdo con la invención. Por ello todas las formas de realización para la proteasa se refieren tanto a la proteasa como sustancia, como también al procedimiento correspondiente, en particular el procedimiento de preparación de la proteasa. Como otros objetivos de acuerdo con la invención, con las proteasas de acuerdo con la invención o los procedimientos de preparación para proteasas de acuerdo con la

invención, están asociados ácidos nucleicos que codifican para estas proteasas, células anfitrión no humanas que contienen proteasas de acuerdo con la invención o ácidos nucleicos así como agentes que comprenden proteasas de acuerdo con la invención, en particular detergentes y agentes de limpieza, procedimientos de lavado y limpieza y aplicaciones definidas sobre las proteasa de acuerdo con la invención

Una modificación de acuerdo con la invención de la posición 99, es decir una modificación R99E o R99D, en unión con modificaciones en las posiciones 3, 4 y 199, es decir S3T, V4I y V199I, en una proteasa que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica en por lo menos 98 % a la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO. 1, causa preferiblemente un desempeño de limpieza mejorado de esta proteasa modificada, en detergentes y agentes de limpieza, sobre por lo menos una suciedad sensible a la proteasa. Las proteasas de acuerdo con la invención hacen posible en consecuencia una eliminación mejorada de por lo menos una, preferiblemente de varias suciedades sensibles a la proteasa sobre textiles y/o superficies duras, por ejemplo vajillas. Los desempeños de limpieza particularmente ventajosos muestran formas de realización preferidas de proteasas de acuerdo con la invención sobre suciedades que tienen sangre, por ejemplo sobre las suciedades de sangre sobre algodón: producto Nr. 111 obtenible de la compañía Eidgenössische Material- y Prüfanstalt (EMPA) Testmaterialien AG, St. Gallen, Suiza; suciedad de leche sobre algodón (wfk - Cleaning Technology Institute e.V., Krefeld, Alemania); sangre-leche/tinta china sobre algodón: producto Nr. C-05 obtenible de CFT (Center For Testmaterials) B.V. Vlaardingen, Países Bajos.

En consecuencia, mediante formas preferidas de realización de la presente invención, se suministran proteasas específicas para la suciedad, cuyo desempeño de limpieza focalizado respecto a una suciedad o a varias suciedades de tipo similar, es ventajoso. En consecuencia, mejora el foco de mancha de formas preferidas de realización de proteasas de acuerdo con la invención, respecto a suciedades que tienen sangre.

Las formas preferidas de realización de proteasas de acuerdo con la invención alcanzan tales desempeños ventajosos de limpieza también ya a bajas temperaturas entre 10°C y 60°C, entre 15°C y 50°C y entre 20°C y 40°C. Otras formas preferidas de realización de proteasas de acuerdo con la invención alcanzan tales desempeños ventajosos de limpieza en un amplio intervalo de temperatura, por ejemplo entre 15°C y 90°C, preferiblemente entre 20°C y 60°C.

Además, las formas preferidas de realización de proteasas de acuerdo con la invención disponen de una estabilidad particular en detergentes o agentes limpiadores, por ejemplo frente a tensioactivos y/o agentes de blanqueo y/o frente a influencias de la temperatura, en particular frente a temperaturas elevadas, por ejemplo entre 50 y 65°C, en particular 60°C, y/o frente a condiciones ácidas o alcalinas y/o frente a modificaciones en el valor de pH y/o frente a agentes desnaturalizantes u oxidantes y/o frente a la degradación proteolítica y/o frente a un cambio de las relaciones redox. Con formas de realización preferidas particularmente preferidas de la invención se suministran en consecuencia variantes de proteasa con desempeño mejorado y/o más estables frente a la temperatura. Con otras formas de realización preferidas de modo muy particular de la invención, se suministran variantes de proteasa con desempeño mejorado y más estables frente a la temperatura. Tales formas ventajosas de realización de proteasas de acuerdo con la invención hacen posible en consecuencia resultados mejorados de lavado en suciedades sensibles a la proteasa, en un intervalo más amplio de temperatura.

Respecto a los documentos internacionales WO 95/23221, WO 92/21760 y WO 2011/032988 mencionados en la introducción, en la presente invención se trata al respecto por ello de una elección particularmente ventajosa de combinaciones de cambios de secuencia, que conduce a la obtención de una variante de proteasa con particular eficiencia y/o estabilidad frente a la temperatura, para detergentes o agentes limpiadores.

En el marco de la invención, se entiende por desempeño de limpieza el poder de blanqueo sobre una o varias suciedades, en particular sobre ropa para lavar o vajillas. En el marco de la invención, tanto el detergente o agente limpiador, que comprende la proteasa o el licor de lavado o de limpieza formado por éste agente, como también la proteasa en sí misma, exhiben un respectivo poder de limpieza. El poder de limpieza de la enzima contribuye con ello al desempeño de limpieza del agente o del licor de lavado o limpieza formado por el agente. El desempeño de limpieza es determinado preferiblemente como se indica posteriormente.

Una proteasa de acuerdo con la invención exhibe una actividad proteolítica, es decir tiene la capacidad de hidrolizar enlaces péptido de un polipéptido o proteína, en particular en un detergente o agente limpiador. Por ello, una proteasa de acuerdo con la invención es una enzima que cataliza la hidrólisis de enlaces péptido y por ello está en capacidad de escindir péptidos o proteínas. Además, una proteasa de acuerdo con la invención es preferiblemente una proteasa madura (*mature*), es decir es la molécula catalíticamente activa sin péptido(s) de señal y/o propéptido(s). En tanto no se indique de otro modo, también las secuencias indicadas se refieren en cada caso a la enzima madura.

En otra forma de realización de la invención, la proteasa comprende una secuencia de aminoácidos, que es idéntica en por lo menos 98%, 98,5% y 98,8% a la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO. 1 sobre la totalidad de su longitud, y en la numeración de acuerdo con SEQ ID NO. 1 exhibe la sustitución de aminoácidos R99E en

combinación con las sustituciones de aminoácido S3T, V4I y V199I. Una proteasa así está indicada en la SEQ ID NO. 2.

En otra forma de realización de la invención, la proteasa comprende una secuencia de aminoácidos, que es idéntica en por lo menos 98%, 98,5% y 98,8% a la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO. 1 sobre la totalidad de su longitud, y en la numeración de acuerdo con SEQ ID NO. 1 exhibe la sustitución de aminoácidos R99D en combinación con las sustituciones de aminoácidos S3T, V4I y V199I. En SEQ ID NO. 3 se indica una proteasa de este tipo.

Otras proteasas preferidas son proteasas como se describió previamente, que además en la posición 211 en la numeración de acuerdo con SEQ ID NO. 1 exhiben el aminoácido leucina (L).

La determinación de la identidad de las secuencias de ácidos nucleicos o de aminoácidos ocurre mediante una comparación de secuencias. Esta comparación de secuencias se basa en el algoritmo BLAST establecido y comúnmente usado en el estado de la técnica (véase por ejemplo Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) "Basic local alignment search tool." J. Mol. Biol. 215:403-410, y Altschul, Stephan F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Hheng Zhang, Webb Miller, y David J. Lipman (1997): "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs"; Nucleic Acids Res., 25, S.3389-3402) y ocurre principalmente mediante asignación mutua de sucesiones similares de nucleótidos o aminoácidos en las secuencias de ácidos nucleicos o de aminoácidos. Una asignación tabular de las posiciones en cuestión es denominada una alineación. Otro algoritmo disponible en el estado de la técnica es el algoritmo FASTA. Las comparaciones de secuencia (alineaciones), en particular comparaciones de secuencia múltiple, son preparadas con programas de computador. Frecuentemente se usan por ejemplo la serie Clustal (véase por ejemplo Chenna et al. (2003): Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. Nucleic Acid Research 31, 3497-3500), T-Coffee (véase por ejemplo Notredame et al. (2000): T-Coffee: A novel method for multiple sequence alignments. J. Mol. Biol. 302, 205-217) o programas que se basan en estos programas o algoritmos. En el presente documento todas las secuencias de comparación (alineaciones) fueron preparadas con el programa de computador Vector NTI® Suite 10.3 (Invitrogen Corporation, 1600 Faraday Avenue, Carlsbad, California, EEUU) con los parámetros estándar dados previamente, cuyo módulo AlignX se basa en la comparación de secuencias en ClustalW.

Tal comparación permite también una declaración sobre la similitud de las secuencias comparadas mutuamente. Ella es dada usualmente en porcentaje de identidad, es decir la fracción de los nucleótidos o radicales aminoácido idénticos en las mismas posiciones o posiciones correspondientes mutuamente en una alineación. El concepto más incluyente de la homología comprende en la consideración, para secuencias de aminoácidos, intercambios de aminoácidos conservados, por consiguiente aminoácidos con actividad química similar, puesto que dentro de la proteína usualmente estos ejercen actividades químicas similares. Por ello, la similitud de las secuencias comparadas puede ser indicada como Homología Porcentual o Similitud Porcentual. Los datos de identidad y/u homología pueden cubrir la totalidad del polipéptido o gen o sólo intervalos individuales. Por ello los intervalos homólogos o idénticos de diferentes secuencias de ácidos nucleicos o de aminoácidos son definidos mediante coincidencias en las secuencias. Tales intervalos exhiben frecuentemente funciones idénticas. Pueden ser pequeños y comprender sólo pocos nucleótidos o aminoácidos. Frecuentemente tales intervalos pequeños ejercen funciones esenciales para la totalidad de la actividad de la proteína. Por ello, puede ser sensato obtener coincidencias de secuencias sólo sobre intervalos individuales, dado el caso pequeños. En tanto no se indique de otro modo, en el presente documento los datos de identidad u homología se refieren sin embargo a la totalidad de la longitud de la secuencia de ácido nucleico o aminoácido indicada en cada caso.

En otra forma de realización de la invención, la proteasa se caracteriza porque su desempeño de limpieza corresponde por lo menos al de una proteasa, que comprende una secuencia de aminoácidos que corresponde a la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO. 2, y/o corresponde por lo menos a la de una proteasa, que comprende una secuencia de aminoácidos que corresponde a la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO. 3, en la que se determina el desempeño de limpieza en un sistema de lavado que contiene un detergente en una dosificación entre 4,5 y 7,0 gramos por litro de licor de lavado así como la proteasa, en el que las proteasas que van a ser comparadas son usadas en la misma concentración (referida a la proteína activa) y se determina el desempeño de limpieza frente a una suciedad de sangre sobre algodón, en particular frente a la suciedad de sangre sobre algodón: producto Nr. 111 obtenible de la compañía Eidgenössische Material- und Prüfanstalt (EMPA) Testmaterialien AG, St. Gallen, Suiza, mediante medición del grado de blancura de los textiles lavados, el procedimiento de lavado ocurre por 70 minutos a una temperatura de 40°C y el agua exhibe una dureza entre 15,5 y 16,5° (dureza alemana). La concentración de la proteasa en el detergente determinado para este sistema de lavado es de 0,001-0,1 % en peso, preferiblemente de 0,01 a 0,06 % en peso, referido a la proteína activa.

Un detergente líquido preferido para un sistema de lavado tal está compuesto como sigue (todos los datos en porcentaje en peso): 0,3-0,5% de xantano, 0,2-0,4% de antiespumante, 6-7% de glicerina, 0,3-0,5% de etanol, 4-7% de FAEOS (éter sulfato de alcohol graso), 24-28% de tensioactivo no iónico, 1% de ácido bórico, 1-2% de citrato de sodio (dihidrato), 2-4% de sosa, 14-16% de ácidos grasos de coco, 0,5% de HEDP (ácido 1-hidroxietano-(1,1-difosfónico)), 0-0,4% de PVP (polivinilpirrolidona), 0-0,05% de aclarador óptico, 0-0,001% de colorante, el resto de agua desmineralizada. Preferiblemente la dosificación del detergente líquido está entre 4,5 y 6,0 gramos por litro de

licor de lavado, por ejemplo 4,7, 4,9 o 5,9 gramos por litro de licor de lavado. Preferiblemente se lava en un intervalo de valor de pH entre pH 8 y pH 10,5, preferiblemente entre pH 8 y pH 9.

Un detergente en polvo preferido para un sistema tal de lavado, está compuesto como sigue (todos los datos en porcentaje en peso): 10% de alquilbenceno sulfonato lineal (sal de sodio), 1,5% de sulfato de alcohol graso C12-C18 (sal de sodio), 2,0% de alcohol graso C12-C18 con 7 EO, 20% de carbonato de sodio, 6,5% de hidrogenocarbonato de sodio, 4,0% de disilicato de sodio amorfo, 17% peroxohidrato de carbonato de sodio, 4,0% de TAED, 3,0% de poliacrilato, 1,0% de carboximetilcelulosa, 1,0% de fosfonato, 27% de sulfato de sodio, resto: inhibidores de espuma, aclarador óptico, perfumes. Preferiblemente la dosificación del detergente en forma de polvo está entre 4,5 y 7,0 gramos por litro de licor de lavado, por ejemplo y preferido de modo particular 4,7 gramos por litro de licor de lavado, o 5,5, 5,9 o 6,7 gramos por litro de licor de lavado. Preferiblemente se lava en un intervalo de valor de pH entre pH 9 y pH 11.

En el marco de la invención, la determinación del desempeño de limpieza ocurre a 40°C usando un detergente líquido como se indicó previamente, en el que el procedimiento de lavado ocurre preferiblemente por 70 minutos.

El grado de blancura es decir el aclaramiento de las suciedades, como medida del desempeño de limpieza es determinado preferiblemente con procedimientos ópticos de medición, preferiblemente de modo fotométrico. Un aparato adecuado para ello es por ejemplo el espectrómetro Minolta CM508d. Usualmente los aparatos usados para la medición son calibrados previamente con un estándar blanco, preferiblemente un estándar blanco incluido.

Los procedimientos para la determinación de la actividad de proteasa son familiares para el experto en el campo de la tecnología de las enzimas, y él los aplica de manera rutinaria. Por ejemplo tales procedimientos son divulgados en Tenside, volumen 7 (1970), pp. 125-132. De modo alternativo puede determinarse la actividad de proteasa mediante la liberación del cromóforo para-nitroanilina (pNA) a partir del sustrato suc-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Phe-p-nitroanilida (AAPF). La proteasa escinde el sustrato y libera pNA. La liberación del pNA causa un aumento de la extinción a 410 nm, cuyo curso a lo largo del tiempo es una medida de la actividad enzimática (véase del Mar et al., 1979). La medición ocurre a una temperatura de 25°C, a pH 8,6, y una longitud de onda de 410 nm. El tiempo de medición es de 5 min y el intervalo de medición es de 20s a 60s. La actividad de proteasa es indicada usualmente en unidades de proteasa (PE). Las actividades adecuadas de proteasa son por ejemplo 2,25, 5 o 10 PE por ml de licor de lavado. Sin embargo, la actividad de proteasa no es igual a cero.

La concentración de proteína puede ser determinada con ayuda de procedimientos conocidos, por ejemplo el procedimiento BCA (ácido bicincónico; ácido 2,2'-biquinolil-4,4'-dicarboxílico) o el procedimiento de biuret (A. G. Gornall, C. S. Bardawill y M.M. David, J. Biol. Chem., 177 (1948), pp. 751-766). La determinación de la concentración de proteína activa puede ocurrir a este respecto mediante una titulación de los centros activos, usando un inhibidor irreversible adecuado (para proteasas por ejemplo fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF)) y determinación de la actividad residual (véase M. Bender et al., J. Am. Chem. Soc. 88, 24 (1966), pp. 5890-5913).

Las proteínas pueden ser agrupadas mediante la reacción con un antisuero o un determinado anticuerpo, hasta grupos de proteínas inmunológicamente relacionadas. Los miembros de un grupo tal se distinguen porque exhiben el mismo determinante antigénico reconocido por un anticuerpo. Por ello son tan estructuralmente parecidas mutuamente, que son reconocidas por un antisuero o determinado anticuerpo. Por ello, otro objetivo de la invención es formado por las proteasas que se caracterizan porque exhiben por lo menos uno y con creciente preferencia dos, tres o cuatro determinantes antigénicos coincidentes con una proteasa de acuerdo con la invención. Tales proteasas son, debido a sus coincidencias inmunológicas, tan similares estructuralmente con las proteasas de acuerdo con la invención, que también se parte de una función del mismo tipo.

Adicionalmente a las modificaciones de aminoácidos ilustradas previamente, las proteasas de acuerdo con la invención pueden exhibir otras modificaciones de aminoácidos, en particular sustituciones, inserciones o eliminaciones de aminoácidos. Tales proteasas son mejoradas por ejemplo mediante modificación genética focalizada, es decir mediante procedimientos de mutagénesis y optimizadas para determinados propósitos de uso o respecto a propiedades especiales (por ejemplo respecto a su actividad catalítica, estabilidad, etc.). Además, pueden incorporarse ácidos nucleicos de acuerdo con la invención en suplementos de recombinación y con ello pueden usarse para la generación de proteasas u otros polipéptidos de tipo completamente novedoso.

El objetivo es introducir en las moléculas conocidas, mutaciones focalizadas como sustituciones, inserciones o eliminaciones, para mejorar por ejemplo el desempeño de limpieza de enzimas de acuerdo con la invención. Para ello pueden modificarse en particular las cargas superficiales y/o el punto isoeléctrico de la molécula y mediante ello sus interacciones con el sustrato. De este modo puede modificarse por ejemplo la carga neta de la enzima, para influir mediante ello en la unión al sustrato, en particular para el uso en detergentes y agentes de limpieza. De modo alternativo o como complemento, puede elevarse la estabilidad de la proteasa mediante una o varias mutaciones correspondientes y mediante ello mejorar su desempeño de limpieza. Las propiedades ventajosas de mutaciones individuales, por ejemplo sustituciones individuales, pueden ser complementadas. Una proteasa ya optimizada respecto a determinadas propiedades, por ejemplo respecto a su estabilidad frente a los tensioactivos y/o agentes blanqueadores y/u otros componentes, puede ser por ello mejorada adicionalmente en el marco de la invención.

Para la descripción de sustituciones, que conciernen exactamente a una posición de aminoácido (intercambio de aminoácidos), se aplica la siguiente convención: primero se denomina el aminoácido presente de forma natural según el código internacional convencional de una letra, entonces sigue la posición de secuencia relacionada y finalmente el aminoácido introducido. Varios intercambios dentro de la misma cadena de polipéptido son separados uno de otro, mediante barras oblicuas. Para inserciones, los aminoácidos adicionales son nombrados de acuerdo con la posición de secuencia. Para eliminaciones, el aminoácido faltante es reemplazado por un símbolo, por ejemplo una estrella o una línea. Por ejemplo, A95G describe la sustitución de alanina por glicina en la posición 95, A95AG describe la inserción en la posición 95 de glicina después del aminoácido alanina y A95* describe la eliminación de alanina en la posición 95. Esta nomenclatura es conocida por el experto en el campo de la tecnología de enzimas.

Por ello, otro objetivo de la invención es una proteasa, que se caracteriza porque es obtenible a partir de una proteasa como molécula de partida, como se describió anteriormente, mediante una o varias sustituciones conservadoras de aminoácidos, en las que la proteasa en la numeración de acuerdo con SEQ ID NO. 1 aún exhibe la sustitución R99E o R99D de aminoácidos de acuerdo con la invención en combinación con las sustituciones de aminoácido S3T, V4I y V199I, como se describió anteriormente. El concepto "sustitución conservadora de aminoácido" significa el intercambio (sustitución) de un radical aminoácido por otro radical aminoácido, en el que este intercambio no conduce a una modificación de la polaridad o carga en la posición del aminoácido intercambiado, por ejemplo intercambio de un radical aminoácido apolar por otro radical aminoácido apolar. En el marco de la invención, las sustituciones conservadoras de aminoácido comprenden por ejemplo: G=A=S, I=V=L=M, D=E, N=Q, K=R, Y=F, S=T, G=A=I=V=L=M=Y=F=W=P=S=T.

De modo alternativo o como complemento, la proteasa se caracteriza porque es obtenible a partir de una proteasa de acuerdo con la invención como molécula de partida, mediante fragmentación, mutagénesis de eliminación, de inserción o de sustitución y comprende una secuencia de aminoácidos que sobre una longitud de por lo menos 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 265 o 266 aminoácidos contiguos, coincide con la molécula de partida, en la cual aún está presente la sustitución R99E o R99D de aminoácidos de acuerdo con la invención presente en la molécula de partida en combinación con las sustituciones de aminoácido S3T, V4I y V199I, como se describió previamente.

Así, es posible por ejemplo eliminar aminoácidos individuales en los extremos o en los bucles de la enzima, sin que por ello se pierda o se reduzca la actividad proteolítica. Además, mediante tales fragmentación, mutagénesis de eliminación, de inserción o de sustitución puede reducirse por ejemplo también el carácter alergénico de la enzima en cuestión y con ello mejorarse en total su utilidad. De manera ventajosa, también después de la mutagénesis las enzimas retienen su actividad proteolítica, es decir su actividad proteolítica corresponde por lo menos a la de la enzima de partida. También las sustituciones pueden mostrar efectos ventajosos. Tanto los aminoácidos individuales como también varios aminoácidos contiguos pueden ser intercambiados por otros aminoácidos.

De modo alternativo o como complemento, la proteasa se caracteriza porque es obtenible a partir de una proteasa de acuerdo con la invención como molécula de partida, mediante una o varias sustituciones de aminoácido en posiciones, que están asignadas en una alineación a las posiciones 36, 42, 47, 56, 61, 69, 87, 96, 101, 102, 104, 114, 118, 120, 130, 139, 141, 142, 154, 157, 188, 193, 205, 211, 224, 229, 236, 237, 242, 243, 255 y 268 de la proteasa de *Bacillus lentus* de acuerdo con la SEQ ID NO. 1, en la que la proteasa en la numeración de acuerdo con SEQ ID NO. 1 exhibe aún la sustitución R99E o R99D de aminoácidos de acuerdo con la invención, en combinación con las sustituciones de aminoácido S3T, V4I y V199I, como se describió anteriormente. Las otras posiciones de aminoácidos son definidas con ello mediante una alineación de la secuencia de aminoácidos de una proteasa de acuerdo con la invención, con la secuencia de aminoácidos de la proteasa de *Bacillus lentus*, como se indica en la SEQ ID NO. 1. Además, la asignación de las posiciones está determinada por la proteína madura (*maturen*). Esta asignación es aplicada también en particular cuando la secuencia de aminoácidos de una proteasa de acuerdo con la invención comprende un número mayor de radicales aminoácido, que la proteasa de *Bacillus lentus* de acuerdo con SEQ ID NO. 1. Partiendo de las posiciones mencionadas en la secuencia de aminoácidos de la proteasa de *Bacillus lentus*, las posiciones de modificación en una proteasa de acuerdo con la invención son las que incluso son asignadas a estas posiciones en una alineación.

Las posiciones ventajosas para modificaciones de secuencia, en particular sustituciones, de la proteasa de *Bacillus lentus*, que transfieren a posiciones homólogas de las proteasas de acuerdo con la invención, son preferiblemente relevantes e imparten a la proteasa propiedades funcionales ventajosas, de acuerdo con ello en una alineación con SEQ ID NO. 1, y con ello en la numeración de acuerdo con SEQ ID NO. 1, se asignan las posiciones 36, 42, 47, 56, 61, 69, 87, 96, 101, 102, 104, 114, 118, 120, 130, 139, 141, 142, 154, 157, 188, 193, 205, 211, 224, 229, 236, 237, 242, 243, 255 y 268. En las posiciones mencionadas en la molécula de tipo silvestre de la proteasa de *Bacillus lentus* están los siguientes radicales aminoácido: S36, N42, A47, T56, G61, T69, E87, A96, A101, I102, S104, N114, H118, A120, S130, S139, T141, S142, S154, S157, A188, V193, G205, L211, A224, K229, S236, N237, N242, H243, N255 o T268.

En particular son ventajosas por ejemplo sustituciones 61A, 154D, 154E, A188P o V193M, en tanto las posiciones homólogas correspondientes en una proteasa de acuerdo con la invención no estén ocupadas ya de manera natural por uno de estos aminoácidos preferidos.

Los ensayos de comparación pueden entregar otra confirmación de la correcta asignación de los aminoácidos que van a ser modificados, es decir en particular su correspondencia funcional, de acuerdo con lo cual las dos posiciones asignadas con base de una alineación, son modificadas del mismo modo en ambas proteasas comparadas, y se observa si en las dos se modifica la actividad enzimática del mismo modo. Si por ejemplo un intercambio de aminoácidos en una posición determinada de la proteasa de *Bacillus lentus* de acuerdo con SEQ ID NO. 1 está asociado con una modificación de un parámetro enzimático, por ejemplo con la elevación del valor KM, y se observa una modificación correspondiente del parámetro enzimático, por ejemplo así mismo entonces una elevación del valor KM, en una variante de proteasa de acuerdo con la invención cuyo intercambio de aminoácidos fue alcanzado mediante el mismo aminoácido introducido, entonces aquí se ve una confirmación de la correcta asignación.

Todas las circunstancias mencionadas son también aplicables al procedimiento de acuerdo con la invención para la preparación de una proteasa. De acuerdo con ello, un procedimiento de acuerdo con la invención comprende además una o varias de las siguientes etapas de procedimiento:

(a) introducción de una sustitución conservadora simple o múltiple de aminoácido, en la que la proteasa en la numeración de acuerdo con SEQ ID NO. 1 exhibe la sustitución R99E o R99D de aminoácidos en combinación con las sustituciones de aminoácidos S3T, V4I y V199I;

b) modificación de la secuencia de aminoácidos mediante fragmentación, mutagénesis de eliminación, de inserción o de sustitución, de modo que la proteasa comprende una secuencia de aminoácidos que coincide con la molécula de partida en una longitud de por lo menos 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 265 o 266 aminoácidos contiguos, en lo cual no está presente la sustitución R99E o R99D de aminoácidos contenida en la molécula de partida, en combinación con las sustituciones de aminoácido de S3T, V4I y V199I;

(c) introducción de una sustitución simple o múltiple de aminoácidos en una o varias de las posiciones que están asignadas en una alineación a las posiciones 36, 42, 47, 56, 61, 69, 87, 96, 101, 102, 104, 114, 118, 120, 130, 139, 141, 142, 154, 157, 188, 193, 205, 211, 224, 229, 236, 237, 242, 243, 255 y 268 de la proteasa de *Bacillus lentus* de acuerdo con SEQ ID NO. 1, en la que la proteasa en la numeración de acuerdo con SEQ ID NO. 1 exhibe la sustitución R99E o R99D de aminoácidos en combinación con las sustituciones de aminoácidoS3T, V4I y V199I.

Las mismas realizaciones son válidas también para el procedimiento de acuerdo con la invención.

En otro acondicionamiento de la invención, la proteasa o la proteasa preparada con un procedimiento de acuerdo con la invención es aún idéntica en por lo menos 98%, 98,5%, o 98,8% a la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO.1, sobre la totalidad de su longitud. La proteasa o la proteasa preparada con un procedimiento de acuerdo con la invención exhiben la sustitución R99E o R99D de aminoácidos en combinación con las sustituciones de aminoácido S3T, V4I y V199I.

Otro objetivo de la invención es una proteasa descrita anteriormente que adicionalmente es estabilizada, en particular mediante una o varias mutaciones, por ejemplo sustituciones, o mediante acoplamiento a un polímero. Entonces una elevación de la estabilidad en el almacenamiento y/o durante el uso, por ejemplo en el procedimiento de lavado, conduce a que la actividad enzimática se detenga por más tiempo y con ello mejore el desempeño de limpieza. Básicamente entran en consideración todas las posibilidades de estabilización descritas y/o convenientes en el estado de la técnica. Se prefieren aquellas estabilizaciones que son alcanzadas mediante mutaciones de la enzima misma, puesto que aquellas estabilizaciones no requieren otra etapa de trabajo a continuación de la obtención de la enzima. Previamente se han mencionado ejemplos de cambios de secuencia adecuados para ello. Otros cambios de secuencia adecuados son conocidos a partir del estado de la técnica. De este modo pueden estabilizarse también proteasas por ejemplo mediante intercambio de uno o varios radicales de tirosina, por otros aminoácidos.

Otras posibilidades de estabilización son por ejemplo:

- Modificación de la unión de iones metálicos, en particular de las posiciones de unión con calcio, por ejemplo mediante intercambio de uno o varios de los aminoácido(s) involucrados en la unión con calcio, por uno o varios aminoácidos con carga negativa y/o mediante la introducción de cambios de secuencia en por lo menos uno de los resultados de los dos aminoácidos arginina/glicina;
- protección contra la influencia de agentes que desnaturalizan, como tensioactivos, mediante mutaciones que causan una modificación de la secuencia de aminoácidos sobre o en la superficie de la proteína;

- intercambio de aminoácidos, que están cerca al extremo N, por aquellos que presumiblemente entran en contacto mediante interacciones no covalentes con el resto de la molécula y con ello logran una contribución a la preservación de la estructura globular.

Son formas preferidas de realización aquellas en las cuales la enzima es estabilizada por varias formas, puesto que varias mutaciones estabilizantes actúan de modo aditivo o sinérgico.

Otro objetivo de la invención es una proteasa como se describió anteriormente, que se caracteriza porque exhibe por lo menos una modificación química. Una proteasa con una modificación así es denominada como derivado, es decir la proteasa es transformada en derivado.

En el sentido del presente documento, se entiende por derivados de acuerdo con ello, a aquellas proteínas cuya cadena de aminoácidos puros ha sido modificada por vía química. Tales formaciones de derivado pueden ocurrir por ejemplo *in vivo* mediante la célula anfitrión, que expresa la proteína. Respecto a esto, se enfatizan particularmente acoplamientos de compuestos de bajo peso molecular, como de lípidos u oligosacáridos. Sin embargo, las formaciones de derivados pueden ser ejecutadas también *in vitro*, por ejemplo mediante la transformación química de una cadena lateral de un aminoácido o mediante enlace covalente de otro compuesto a la proteína. Por ejemplo es posible el acoplamiento de aminas a grupos carboxilo de una enzima, mediante la modificación del punto isoeléctrico. Un otro compuesto así puede ser también otra proteína, que está unida por ejemplo mediante compuestos químicos bifuncionales a una proteína de acuerdo con la invención. Así mismo, se entiende por formación de derivado la unión covalente a un vehículo macromolecular, o también una inclusión no covalente en estructuras de jaula macromoleculares adecuadas. Las formaciones de derivado pueden influir por ejemplo en la especificidad de sustrato o la fortaleza de la unión al sustrato o precipitar un bloqueo transitorio de la actividad enzimática, cuando la sustancia acoplada es un inhibidor. Esto puede ser sensato por ejemplo para el espacio de tiempo del almacenamiento. Tales modificaciones pueden influir además en la estabilidad o la actividad enzimática. Además también pueden servir para disminuir el carácter alergénico y/o carácter inmunogénico de la proteína y con ello elevar por ejemplo su compatibilidad con la piel. Por ejemplo los acoplamientos con compuestos macromoleculares, por ejemplo polietilenglicol, pueden mejorar la proteína respecto a la estabilidad y/o compatibilidad con la piel.

En el sentido más amplio, por derivados de una proteína de acuerdo con la invención pueden entenderse también preparaciones de esta proteína. Dependiendo de la obtención, procesamiento o preparación, una proteína puede estar acompañada con diversas otras sustancias, por ejemplo del cultivo de los microorganismos productores. A una proteína pueden añadirse también, por ejemplo para elevar su estabilidad al almacenamiento, de manera focalizada otras sustancias. Por eso, también todas las preparaciones de una proteína de acuerdo con la invención, son de acuerdo con la invención. Ello es independiente de si en una preparación determinada, esta actividad enzimática es realmente desplegada o no. entonces puede ser deseable que en el almacenamiento no posea o sólo posea una baja actividad, y justo en el momento del uso despliegue su función enzimática. Esto puede ser controlado por ejemplo mediante correspondientes sustancias concomitantes. En particular, a este respecto es posible la preparación conjunta de proteasas con inhibidores de proteasa.

Respecto a todas las proteasas o variantes de proteasa y/o derivados descritas anteriormente, en el marco de la presente invención son las preferidas de modo particular, cuya actividad corresponde por lo menos a la de la proteasa de acuerdo con SEQ ID NO. 2 y/o SEQ ID NO. 3, y/o cuyo desempeño de limpieza por lo menos corresponde al de la proteasa de acuerdo con SEQ ID NO. 2 y/o SEQ ID NO. 3, en las que se determina el desempeño de limpieza en un sistema de lavado, como se describió anteriormente.

Otro objetivo de la invención es un ácido nucleico, que codifica para una proteasa de acuerdo con la invención, así como un vector que contiene un ácido nucleico tal, en particular un vector de clonación o un vector de expresión.

Para ello puede tratarse de moléculas de ADN o de ARN. Ellas pueden estar presentes como cuerda individual, como una cuerda individual complementaria a ésta cuerda individual o como cuerda doble. En particular para moléculas de ADN, en cada caso se consideran las secuencias de ambas cuerdas complementarias en todos los tres marcos de lectura posibles. Además, se considera que diferentes codones, por consiguiente tripletes de bases, pueden codificar para los mismos aminoácidos, de modo que una determinada secuencia de aminoácidos puede ser codificada por varios ácidos nucleicos diferentes. Debido a esta degeneración del código genético, todas las secuencias de ácidos nucleicos están incluidas en este objetivo de la invención, que pueden codificar una de las proteasas descritas anteriormente. El experto está en capacidad de determinar de manera inequívoca estas secuencias de ácidos nucleicos, puesto que a pesar de la degeneración del código genético, se asignan codones individuales de aminoácidos definidos. Por ello, partiendo de una secuencia de aminoácidos, el experto puede determinar sin problema ácidos nucleicos que codifican para esta secuencia de aminoácidos. Además, para ácidos nucleicos de acuerdo con la invención, puede reemplazarse uno o varios codones por codones sinónimos. Este aspecto se refiere en particular a las expresiones heterólogas de las enzimas de acuerdo con la invención. De este modo cada organismo, por ejemplo una célula anfitrión de una cepa de producción, posee una determinada aplicación de codón. Se entiende por aplicación de codón, la traducción del código genético en aminoácidos, mediante el respectivo organismo. Pueden ocurrir cuellos de botella en la biosíntesis de proteína, cuando los

codones que están sobre el ácido nucleico en el organismo confrontan un número comparativamente bajo de moléculas cargadas de tARN. Aunque codifican para el mismo aminoácido, ello conduce a que en el organismo un codón sea traducido de modo menos eficiente, que un codón sinónimo que codifica para el mismo aminoácido. Debido a la presencia de un mayor número de moléculas de tARN para el codón sinónimo, éste puede ser traducido de modo más eficiente en el organismo.

Para un experto es posible, mediante métodos en general conocidos por estos días, como por ejemplo la síntesis química o la reacción de cadena de polimerasa (PCR) en conjunto con métodos estándar de biología molecular y/o de química de proteínas, mediante secuencias conocidas de ADN y/o de aminoácidos preparar los correspondientes ácidos nucleicos hasta los genes completos. Tales métodos son conocidos por ejemplo a partir de Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, 3a edición Cold Spring Laboratory Press.

En el sentido de la presente invención se entiende por vectores, elementos que consisten en ácidos nucleicos, que como intervalo característico de ácido nucleico contienen un ácido nucleico de acuerdo con la invención. Ellos pueden establecer éste en una especie o una línea de células por varias generaciones o divisiones celulares, como elemento genéticamente estable. Los vectores son en particular para el uso en bacterias, plásmidos especiales, por consiguiente elementos genéticos circulares. En el marco de la presente invención, se clona un ácido nucleico de acuerdo con la invención en un vector. Entre los vectores se cuentan por ejemplo aquellos cuyo origen son plásmidos bacterianos, virus o bacteriófagos, o vectores o plásmidos predominantemente sintéticos con elementos de diferente origen. Con los otros elementos genéticos presentes en cada caso, los vectores son capaces de establecerse en las células anfitrión en cuestión por varias generaciones, como unidades estables. Pueden estar presentes de modo extracromosomal como unidades propias o integrar en un cromosoma o ADN cromosomal.

Los vectores de expresión comprenden secuencias de ácido nucleico que son capaces de replicarlos en las células anfitrión que los contienen, preferiblemente microorganismos, preferido de modo particular bacterias, y allí llevar a expresión un ácido nucleico presente. La expresión recibe influencia en particular del o de los promotores que regulan la transcripción. En principio la expresión puede ocurrir mediante el promotor localizado de modo natural, originalmente antes del ácido nucleico que va a ser expresado, pero también mediante un promotor de la célula anfitrión preparado en el vector de expresión o también mediante un promotor, modificado o completamente diferente, de otro organismo u otra célula anfitrión. En el presente caso se pone a disposición al menos un promotor para la expresión de un ácido nucleico de acuerdo con la invención y se usa para su expresión. Los vectores de expresión pueden además ser regulables, por ejemplo mediante modificación de las condiciones de cultivo o alcanzando una determinada densidad celular de las células anfitrión que los contienen o mediante adición de determinadas sustancias, en particular activadores de expresión de gen. Un ejemplo de una sustancia tal es el derivado de galactosa isopropil-β-D-tiogalactopiranósido (IPTG), que es usado como activador del operón bacteriano de lactosa (lac-Operon). En contraste con los vectores de expresión, el ácido nucleico presente en vectores de clonación, no se expresa.

Otro objetivo de la invención es una célula anfitrión no humana, que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la invención o un vector de acuerdo con la invención, o que comprende una proteasa de acuerdo con la invención, en particular una que secreta la proteasa al medio que rodea la célula anfitrión. Preferiblemente se transforma un ácido nucleico de acuerdo con la invención o un vector de acuerdo con la invención en un microorganismo, el cual representa entonces una célula anfitrión de acuerdo con la invención. De modo alternativo pueden incorporarse también componentes individuales, es decir partes o fragmentos de ácido nucleico de un ácido nucleico de acuerdo con la invención, de modo que entonces la célula anfitrión resultante contiene un ácido nucleico de acuerdo con la invención o un vector de acuerdo con la invención. Este procedimiento es adecuado en particular entonces cuando la célula anfitrión ya contiene uno o varios componentes de un ácido nucleico de acuerdo con la invención o un vector de acuerdo con la invención y entonces de modo correspondiente se complementan los otros componentes. Los procedimientos para la transformación de las células están establecidos en la técnica y son suficientemente conocidos por los expertos. Como células anfitrión son adecuadas en principio todas las células, es decir células procariotas o eucariotas. Se prefieren aquellas células anfitrión, por ejemplo mohos o bacterias unicelulares, que se dejan manipular genéticamente de manera ventajosa, lo cual concierne por ejemplo a la transformación con el ácido nucleico o el vector y su establecimiento estable. Además, las células anfitrión preferidas se distinguen por una buena facilidad de manipulación microbiológica y biotecnológica. Ello se refiere por ejemplo a facilidad para ser cultivadas, elevadas tasas de crecimiento, bajos requerimientos de medios de fermentación y buenas tasas de producción y secreción para proteínas externas. Las células anfitrión preferidas de acuerdo con la invención secretan la proteína expresada (transgénica) al medio que rodea las células anfitrión. Además, las proteasas de las células que las producen pueden ser modificadas después de su preparación, por ejemplo mediante unión a moléculas de azúcar, formilaciones, aminaciones, etc. Tales modificaciones postranslacionales pueden influir funcionalmente en la proteasa.

Otras formas de realización preferidas representan aquellas células anfitrión que debido a elementos de regulación genética, que son suministrados en el vector, pero que también pueden estar presentes de desde el principio en estas células, son regulables en su actividad. Por ejemplo mediante la adición controlada de compuestos químicos, que sirven como activadores, mediante modificación de las condiciones de cultivo o al alcanzar una determinada

densidad celular, pueden promoverse estos a la expresión. Esto hace posible una producción económica de las proteínas de acuerdo con la invención. Un ejemplo de tal compuesto es IPTG, como se describió anteriormente.

Las células anfitrión preferidas son procariotas o células bacterianas. Las bacterias se distinguen por cortos tiempos de generación y bajo requerimientos sobre las condiciones de cultivo. Mediante ello pueden establecerse procedimientos de cultivo o procedimientos de preparación convenientes en costes. Además, con bacterias en la técnica de fermentación, el experto dispone un tesoro de experiencia sustancial. Para una producción especial, por las más diversas razones que van a ser determinadas experimentalmente en el caso individual, como fuentes de nutrientes, tasa de formación de producto, tiempo requerido, etc. pueden ser adecuadas bacterias gramnegativas o grampositivas.

Para bacterias, como por ejemplo *Escherichia coli,* se secreta una multiplicidad de proteínas en el espacio periplasmático, por consiguiente en el compartimiento entre las membranas que incluyen ambas células. Esto puede ser ventajoso para aplicaciones especiales. Además, pueden acondicionarse también bacterias gramnegativas, de modo que descarguen las proteínas expresadas, no sólo en el espacio periplasmático, sino en el medio que rodea la bacteria. En contraste, las bacterias grampositivas, como por ejemplo bacillos o actinomicetos u otros representantes de los actinomicetales no poseen membrana exterior, de modo que las proteínas secretadas son emitidas inmediatamente al medio de cultivo que rodea las bacterias, por regla general el medio nutritivo, desde el cual se purifican las proteínas expresadas. Ellas pueden ser aisladas directamente del medio o procesadas adicionalmente. Además, las bacterias grampositivas están emparentadas, o son idénticas, por enzimas técnicamente importantes con la mayoría de organismos de origen, y forman usualmente en sí mismas enzimas comparables, de modo que disponen de un uso similar de codón y su aparato de síntesis de proteínas está orientado correspondientemente de modo natural.

Las células anfitrión de acuerdo con la invención pueden ser modificadas respecto a sus requerimientos de condiciones de cultivo, pueden exhibir otros o adicionales marcadores de selección o expresar aun otras o adicionales proteínas. En particular pueden ser también células anfitrión que expresan de modo transgénico varias proteínas o enzimas.

La presente invención es aplicable en principio a todos los microorganismos, en particular a todos los microorganismos que pueden fermentar, preferido de modo particular a aquellos del género Bacillus, y conduce a que mediante el uso de tales microorganismos se preparan proteínas de acuerdo con la invención. Tales microorganismos representan entonces células anfitrión en el sentido de la invención.

En otra forma de realización de la invención, la célula anfitrión se caracteriza porque es una bacteria que es elegida de entre el grupo de los géneros de Escherichia, Klebsiella, Bacillus, Staphylococcus, Corynebakterium, Arthrobacter, Streptomyces, Stenotrophomonas y Pseudomonas, más preferiblemente una que es elegida de entre el grupo de *Escherichia coli, Klebsiella planticola, Bacillus licheniformis, Bacillus lentus, Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus subtilis, Bacillus alcalophilus, Bacillus globigii, Bacillus gibsonii, Bacillus clausii, Bacillus halodurans, Bacillus pumilus, Staphylococcus carnosus, Corynebacterium glutamicum, Arthrobacter oxidans, Streptomyces lividans, Streptomyces coelicolor* y *Stenotrophomonas maltophilia*.

Sin embargo, la célula anfitrión puede ser también una célula eucariota, que se caracteriza porque posee un núcleo celular. Por ello, otro objetivo de la invención representa una célula anfitrión, que se caracteriza porque posee un núcleo celular. En contraste con las células procariotas, las células eucariotas están en capacidad de modificar de modo postranslacional la proteína formada. Son ejemplos de ello mohos como actinomicetos o levaduras como Saccharomyces o Kluyveromyces. Esto puede ser particularmente ventajoso por ejemplo entonces cuando la proteína debiera experimentar modificaciones específicas en relación con su síntesis, que hacen posible tales sistemas. A las modificaciones que ejecutan los sistemas eucariotes en particular en relación con la síntesis de proteína, pertenecen por ejemplo la unión de compuestos de bajo peso molecular como anclas de membrana u oligosacáridos. Tales modificaciones de oligosacáridos pueden ser deseadas por ejemplo para reducir el carácter alergénico de una proteína expresada. También puede ser ventajosa una coexpresión con las enzimas formadas de modo natural de tales células, como por ejemplo celulasas o lipasas. Además pueden ser adecuados por ejemplo sistemas de expresión de hongos termófilos, en particular para la expresión de proteínas o variantes resistentes a la temperatura.

Las células anfitrión de acuerdo con la invención son cultivadas y fermentadas de manera corriente, por ejemplo en sistemas discontinuos o continuos. En el primer caso, se inocula con las células anfitrión un medio de cultivo adecuado y se cosecha del medio el producto después de un periodo de tiempo que va a ser determinado experimentalmente. Las fermentaciones continuas se distinguen porque alcanzan un equilibrio dinámico, en el cual durante un periodo de tiempo comparativamente largo, las células sufren necrosis parcial, pero también crecen de nuevo y simultáneamente puede retirarse del medio la proteína formada.

Las células anfitrión de acuerdo con la invención son usadas preferiblemente para preparar proteasas de acuerdo con la invención. Por ello, otro objetivo de la invención es un procedimiento para la preparación de una proteasa, que comprende

a) cultivo de una célula anfitrión de acuerdo con la invención
b) aislamiento de la proteasa del medio de cultivo o de la célula anfitrión.

Este objetivo de la invención comprende preferiblemente procedimientos de fermentación. Los procedimientos de fermentación son conocidos a partir del estado de la técnica y representan la verdadera etapa de producción a escala industrial, seguida por regla general por un procedimiento adecuado de purificación del producto preparado, por ejemplo la proteasa de acuerdo con la invención. Todos los procedimientos de fermentación, que descansan en un procedimiento correspondiente para la preparación de una proteasa de acuerdo con la invención, representan formas de realización de este objetivo de la invención.

Entran en consideración en particular los procedimientos de fermentación, que se caracterizan porque la fermentación es ejecutada mediante una estrategia de adición. Para ello, se suministran en forma de suplemento los componentes del medio, que son consumidos por el cultivo en el progreso. Mediante ello pueden alcanzarse elevaciones considerables tanto en la densidad celular, como también en la masa celular o la masa seca y/o en particular en la actividad de la proteasa de interés. Además, también puede acondicionarse la fermentación, de modo que se separan por filtración productos metabólicos indeseados o se neutraliza mediante adición de amortiguadores o iones contrarios pertinentes en cada caso.

La proteasa preparada puede ser cosechada del medio de fermentación. Un procedimiento de fermentación así es preferido frente a un aislamiento de la proteasa de la célula anfitrión, es decir un procesamiento de producto de la masa celular (masa seca), sin embargo requiere de suministro de células anfitrión adecuadas o de uno o varios marcadores o mecanismos adecuados de secreción y/o sistemas de transporte, con ello las células anfitrión secretan la proteasa al medio de fermentación. De modo alternativo, sin secreción, puede ocurrir el aislamiento de la proteasa de la célula anfitrión, es decir una purificación de la misma de la masa celular, por ejemplo por precipitación con sulfato de amonio o etanol o mediante purificación cromatográfica.

Todos los asuntos previamente citados pueden ser combinados en el procedimiento, para preparar proteasas de acuerdo con la invención.

Otro objetivo de la invención es un agente que se caracteriza porque contiene una proteasa de acuerdo con la invención, como se describió previamente. Preferiblemente el agente es un detergente o agente limpiador. Puesto que las proteasas de acuerdo con la invención exhiben ventajosos desempeños de limpieza, en particular sobre suciedades que tienen sangre, los agentes son adecuados y ventajosos en particular para la eliminación de tales suciedades.

En este objetivo de la invención se cuentan todos los tipos imaginables de detergentes o agentes limpiadores, que van a ser usados tanto concentrados como también no diluidos, para el uso a escala comercial, en las máquinas lavadoras o el lavado o la limpieza manual. A ellos pertenecen por ejemplo detergentes para textiles, alfombras o fibras naturales, para los cuales se usa la denominación de detergente. A ellos pertenecen por ejemplo también detergentes para vajillas para lavadoras para vajillas o detergentes para el lavado manual de vajillas o limpiadores para superficies duras, como metal, vidrio, porcelana, cerámica, azulejos, piedra, superficies lacadas, plásticos, madera o cuero, para los cuales se usa la denominación de agente limpiador, por consiguiente aparte de detergentes para lavado manual y automático de vajillas, por ejemplo también limpiadores abrasivos, detergentes para vidrio, detergentes con olor para sanitarios, etc. Entre los detergentes y agentes de limpieza en el marco de la invención se encuentran además agentes auxiliares de lavado, que son añadidos al verdadero detergente en el lavado manual o automático de textiles, para alcanzar un efecto adicional. Además entre los detergentes y agentes de limpieza en el marco de la invención se cuentan también agentes de tratamiento anterior y posterior de textiles, por consiguiente aquellos agentes con los cuales, antes del verdadero lavado, se pone en contacto la pieza que se va a lavar, por ejemplo para disolver suciedades persistentes, y también aquellos agentes que en una etapa subsiguiente al verdadero lavado de textiles, imparten al material que se va a lavar otras propiedades deseables, como sensación agradable al tacto, ausencia de arrugas o baja carga estática. Al último agente mencionado se orientan entre otros los suavizantes de telas.

Los detergentes o agentes limpiadores de acuerdo con la invención, que están presentes como sustancia sólida en forma de polvo en forma de partículas compactadas adicionalmente, como soluciones homogéneas o suspensiones pueden, aparte de una proteasa de acuerdo con la invención, contener todos los ingredientes conocidos y usuales en tales agentes, en los que preferiblemente en el agente está presente por lo menos otro ingrediente. Los agentes de acuerdo con la invención pueden contener en particular tensioactivos, agentes auxiliares de lavado (sustancias estructurales), compuesto de peroxígeno o activadores de blanqueo. Además, pueden contener solventes orgánicos miscibles con agua, otras enzimas, agentes de secuestración, electrolitos, reguladores de pH y/u otras sustancias auxiliares como aclaradores ópticos, inhibidores de engrisamiento, reguladores de espuma así como colorantes y perfumes, así como combinaciones de ellos.

En particular es ventajosa una combinación de una proteasa de acuerdo con la invención con uno o varios otros ingrediente(s) del agente, puesto que en acondicionamientos preferidos de acuerdo con la invención, un agente así

exhibe un desempeño mejorado de limpieza, mediante sinergismos que surgen. En particular, mediante la combinación de una proteasa de acuerdo con la invención con un tensioactivo y/o un agente auxiliar de lavado (sustancia estructural) y/o un compuesto de peroxígeno y/o un activador de blanqueo, puede alcanzarse un sinergismo tal.

Los ingredientes ventajosos de agentes de acuerdo con la invención son divulgados en el documento internacional WO2009/121725, comenzando allí en la página 5, penúltimo párrafo, y terminando en la página 13 después del segundo párrafo. Se hace expresa referencia a esta divulgación y el contenido allí divulgado es incluido en el presente documento.

Un agente de acuerdo con la invención contiene la proteasa de manera ventajosa en una cantidad de 2µg a 20mg, preferiblemente de 5µg a 17,5mg, preferido de modo particular de 20µg a 15mg y de modo muy particularmente preferido de 50µg a 10mg por g del agente. Además, la proteasa presente en el agente, y/u otros ingredientes del agente, están envueltos con una sustancia impermeable a la enzima a temperatura ambiente o en ausencia de agua, la cual bajo las condiciones de aplicación del agente es permeable a la enzima. Con ello, una forma tal de realización de la invención está caracterizada porque la proteasa está envuelta con una sustancia impermeable a la proteasa a temperatura ambiente o en ausencia de agua. Además, también el detergente o agente limpiador en sí mismo puede estar empacado en un recipiente, preferiblemente un recipiente permeable al aire, a partir del cual es liberado justo antes del uso o durante el procedimiento de lavado.

En otras formas de realización de la invención, el agente está caracterizado porque

(a) está presente en forma sólida, en particular como polvo que fluye con un peso a granel de 300 g/l a 1200 g/l, en particular 500 g/l a 900 g/l, o
(b) está presente en forma pastosa o líquida, y/o
(c) está presente como sistema de un componente, o
(d) está dividido en varios componentes.

Estas formas de realización de la presente invención comprenden todas las formas de administración del agente de acuerdo con la invención sólidas, en polvo, líquidas, en forma de gel o pastosas, que dado el caso pueden consistir también en varias fases así como pueden estar presentes en forma comprimida o no comprimida. El agente puede estar presente como polvo que fluye, en particular con una densidad a granel de 300 g/l a 1200 g/l, en particular 500 g/l a 900 g/l o 600 g/l a 850 g/l. Entre las formas sólidas de administración del agente se cuentan además extrudidos, granulados, comprimidos o bolsas. De modo alternativo, el agente puede ser también líquido, en forma de gel o pastoso, por ejemplo en forma de un detergente líquido no acuoso o una pasta no acuosa o en forma de un detergente líquido acuoso o una pasta que tiene agua. Además, el agente puede estar presente como sistema de un componente. Tales agentes consisten en una fase. De modo alternativo, un agente puede consistir también en varias fases. De acuerdo con ello, un agente así está dividido en varios componentes.

Los detergentes o agentes limpiadores de acuerdo con la invención pueden contener exclusivamente una proteasa. De modo alternativo pueden contener también otras enzimas hidrolíticas u otras enzimas, en una concentración conveniente para la eficacia del agente. Con ello, otra forma de realización de agentes, además comprende una o varias otras enzimas. Como otras enzimas preferiblemente utilizables están todas las enzimas que pueden desplegar una actividad catalítica en el agente de acuerdo con la invención, en particular una proteasa, amilasa, celulasa, hemicelulasa, mananasa, tanasa, xilanasa, xantanasa, xiloglucanasa, β-glucosidasa, pectinasa, carraginasa, perhidrolasa, oxidasa, oxidoreductasa o una lipasa, así como sus mezclas. Otras enzimas están presentes en el agente, de manera ventajosa en cada caso en una cantidad de 1 x 10^{-8} a 5 por ciento en peso, referido a la proteína activa. Con creciente preferencia, cada otra enzima está presente en el agente de acuerdo con la invención en una cantidad de 1 x 10^{-7}-3 % en peso, de 0,00001-1 % en peso, de 0,00005-0,5 % en peso, de 0,0001 a 0,1 % en peso y preferido de modo particular de 0,0001 a 0,05 % en peso, referida a la proteína activa. Preferido de modo particular, las enzimas muestran desempeños sinérgicos de limpieza frente a determinadas suciedades o manchas, es decir las enzimas presentes en la composición de agentes se ayudan una a otra en su desempeño de limpieza. De modo muy particularmente preferido un sinergismo tal está presente entre la proteasa presente de acuerdo con la invención y otra enzima de un agente de acuerdo con la invención, entre ellas en particular entre la mencionada proteasa y la amilasa y/o una lipasa y/o una mananasa y/o una celulasa y/o una pectinasa. Los efectos sinérgicos pueden ocurrir no sólo entre diferentes enzimas, sino también entre una o varias enzimas y otros ingredientes del agente de acuerdo con la invención.

Otro objetivo de la invención es un procedimiento para la limpieza de textiles o superficies duras, caracterizado porque en por lo menos una etapa del procedimiento se aplica un agente de acuerdo con la invención, o porque en por lo menos una etapa del procedimiento se torna catalíticamente activa una proteasa de acuerdo con la invención, en particular de modo que la proteasa es usada en una cantidad de 40µg a 4g, preferiblemente de 50µg a 3g, preferido de modo particular de 100µg a 2g y de modo muy particularmente preferido de 200µg a 1g.

Bajo ellos caen tanto procedimientos manuales como también automáticos, en los que se prefieren los procedimientos automáticos. Los procedimientos para la limpieza de textiles se distinguen en general porque en

varias etapas del procedimiento, sobre el material que va a ser lavado se aplican diferentes sustancias con actividad de limpieza y después de un tiempo de acción son enjuagados, o porque el material que va a ser limpiado es tratado de otra manera con un detergente o una solución o dilución de este agente. Lo correspondiente es válido para procedimientos para la limpieza de todos los otros materiales diferentes a los textiles, en particular de superficies duras. Todos los procedimientos de lavado o limpieza imaginables pueden ser mejorados en al menos una de las etapas del procedimiento, alrededor de la aplicación de un detergente o agente limpiador de acuerdo con la invención o una proteasa de acuerdo con la invención y representan entonces formas de realización de la presente invención. Todos los asuntos, objetivos y formas de realización que se describen para las proteasas de acuerdo con la invención y agentes que las contienen, son aplicables también en este objetivo de la invención. Por ello, en este pasaje se remite expresamente a la divulgación en los correspondientes pasajes, indicando que esta divulgación es válida también para los procedimientos de acuerdo con la invención precedentes.

Puesto que las proteasas de acuerdo con la invención de modo natural ya poseen una actividad hidrolítica y despliegan ésta también en medios que de otro modo no poseen fuerza limpiadora, como por ejemplo en simples amortiguadores, una etapa individual y/o la única etapa de un procedimiento así puede consistir en que en caso de desearse como único componente con actividad de limpieza, se pone en contacto la proteasa de acuerdo con la invención con la suciedad, preferiblemente en una solución amortiguadora o en agua. Esto representa otra forma de realización de este objetivo de la invención.

También procedimientos para el tratamiento de materias primas textiles o para el cuidado textil, representan formas de realización alternativas de este objetivo de la invención, en las cuales en al menos una etapa del procedimiento está activa una proteasa de acuerdo con la invención. Entre ellos se prefieren procedimientos para materias primas textiles, fibras o textiles con componentes naturales, y de modo muy particular para aquellas con lana o seda.

Otro objetivo de la invención es el uso de un agente de acuerdo con la invención, para la limpieza de textiles o de superficies duras, o de una proteasa de acuerdo con la invención para la limpieza de textiles o de superficies duras, en particular de modo que la proteasa es usada en una cantidad de 40µg a 4g, preferiblemente de 50µg a 3g, preferido de modo particular de 100µg a 2g y de modo muy particularmente preferido de 200µg a 1g.

Todos los asuntos, objetivos y formas de realización, que son descritos para las proteasas de acuerdo con la invención y agentes que las contienen, son aplicables también en este objetivo de la invención. Por ello, de manera expresa en este pasaje se remite a la divulgación en los respectivos pasajes, anotando que esta divulgación también es válida para el uso precedente de acuerdo con la invención.

Ejemplos

Todas las etapas de trabajo de biología molecular siguen procedimientos estándar, como se indican por ejemplo en el manual de Fritsch, Sambrook y Maniatis "Molecular cloning: a laboratory manual", Cold Spring Harbour Laboratory Press, Nueva York, 1989, o trabajos pertinentes comparables. Se usaron enzimas y conjuntos constituyentes (kits) de acuerdo con las indicaciones del respectivo fabricante.

Ejemplo 1

Partiendo de una proteasa que exhibía una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO. 1, se preparó una variante de proteasa de acuerdo con la invención, mediante mutagénesis dirigida al sitio ("*site-directed*"), en la cual para la proteasa se prepararon ácidos nucleicos que codifican, mediante "kit de mutagénesis dirigida al sitio PHUSION" (Finnzyme, F541). Para ello se modificaron los codones para las posiciones indicadas de aminoácidos de modo que, referido a la secuencia de aminoácidos, ocurrió un intercambio de aminoácidos como se indicó. La expresión de la variante de proteasa ocurrió de modo y forma corrientes de acuerdo con el estado de la técnica, mediante transformación de *Bacillus subtilis* DB 104 (Kawamura y Doi (1984), J. Bacteriol., Band 160 (1), pp. 442-444) con un correspondiente vector de expresión y subsiguiente cultivo de los transformandos que expresan la variante de proteasa.

Variante 1 de proteasa: proteasa con una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO. 1 con las sustituciones S3T, V4I, R99E, V199I de aminoácido en la numeración de acuerdo con SEQ ID NO. 1 (SEQ ID NO. 2);

Variante 2 de proteasa: proteasa con una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO. 1 con las sustituciones S3T, V4I, R99D, V199I de aminoácido en la numeración de acuerdo con SEQ ID NO. 1 (SEQ ID NO. 3).

Ejemplo 2: Determinación del desempeño de limpieza de proteasas de acuerdo con la invención, por uso en un detergente líquido común en el mercado

Para este ejemplo se usaron textiles con suciedad estandarizada. Se usaron las siguientes suciedades:

A: sangre sobre algodón: producto Nr. 111 obtenible de la compañía Eidgenössische Material- und Prüfanstalt (EMPA) Testmaterialien AG, St. Gallen, Suiza;
B: suciedad de leche sobre algodón (wfk - Cleaning Technology Institute e.V., Krefeld, Alemania);
C: sangre-leche/tinta china sobre algodón: producto Nr. C-05 obtenible de CFT (Center For Testmaterials) B.V. Vlaardingen, Países Bajos.

Con este material de prueba se examinaron diferentes recetas de detergente, respecto a su desempeño de limpieza. Para ello se lavó la carga por 70 minutos a una temperatura de 20°C o 40°C. La dosificación estuvo en 4,7 g de detergente por litro de licor de lavado. Se lavó con agua municipal con una dureza de 16° de dureza alemana.

Como detergente de control sirvió una receta base de detergente, con la siguiente composición (todos los datos en porcentaje en peso): 0,3-0,5% de xantano, 0,2-0,4% de antiespumante, 6-7% de glicerina, 0,3-0,5% de etanol, 4-7% de FAEOS (etersulfato de alcohol graso), 24-28% de tensioactivo no iónico, 1% de ácido bórico, 1-2% de citrato de sodio (dihidrato), 2-4% de sosa, 14-16% de ácidos grasos de coco, 0,5% de HEDP (ácido 1-hidroxietano-(1,1-di-fosfónico)), 0-0,4% de PVP (polivinilpirrolidona), 0-0,05% de aclarador óptico, 0-0,001% de colorante, el resto de agua desmineralizada.

A la receta base de detergente se añadieron las proteasas con la misma actividad de proteína (0,03 % en peso de sustancia activa), para las diferentes series de ensayo. Como proteasa de acuerdo con la invención se usó la variante de proteasa 1 (carga 1) del Ejemplo 1. Como referencia se usó una proteasa, que se divulga en la figura 2 o en la SEQ ID NO.3 del documento internacional WO 03/057713 (carga 2). Esta proteasa de referencia muestra un muy buen desempeño de limpieza en detergentes y agentes de limpieza líquidos.

Después del lavado se midió el grado de blancura de los textiles lavados. La medición ocurrió en un espectrómetro Minolta CM508d (Lichtart D65, 10°). El aparato fue calibrado previamente con un estándar blanco suministrado. Los resultados obtenidos son la diferencia de las unidades de remisión obtenidas para la proteasa de acuerdo con la invención y las unidades de remisión obtenidas para la proteasa de referencia (ΔREM = unidades de remisión de carga 1 - unidades de remisión de carga 2). En consecuencia, los valores positivos indican un grado mejorado de blancura de la proteasa de acuerdo con la invención frente a la proteasa de referencia. En la siguiente tabla 1 se compilan los resultados.

Tabla 1: Resultados de lavado con un detergente líquido a 20°C y 40°C

Temperatura	Suciedad	ΔREM
20°C	A	3,7
	B	5,9
40°C	A	6,2
	C	3,3

Es claro que la proteasa de acuerdo con la invención muestra un desempeño de limpieza mejorado, en particular en suciedades que tienen sangre.

Ejemplo 3: Determinación de la estabilidad frente a la temperatura de las proteasas de acuerdo con la invención

Las proteasas indicadas a continuación fueron incubadas a una concentración de 10-20 µg/ml en amortiguador 0,1M de glicina/NaOH a 60°C y pH de 10,0. En el curso de 60 minutos se tomaron muestras regularmente, se mantuvieron en hielo y se midieron mediante una prueba de actividad, en lo cual se determinó la actividad proteolítica residual mediante la liberación del cromóforo para-nitroanilina (pNA) del sustrato. El sustrato es suc-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Phe-p-nitroanilida (suc-AAPF-pNA). La proteasa escinde el sustrato y libera pNA. La liberación de la pNA causa una elevación de la extinción a 410 nm, cuyo curso cronológico es una medida de la actividad enzimática (véase del Mar et al., 1979). Mediante las actividades residuales determinadas, ocurrió el cálculo del valor de semivida. Se obtuvieron los siguientes tiempos de semivida (t ½):

Tabla 2: Tiempos de semivida determinados

Proteasa usada	t ½ (pH 10,0; 60°C) en minutos
Proteasa de acuerdo con la figura 2 o SEQ ID NO.3 de la WO 03/057713	16
Variante de la proteasa alcalina de *Bacillus lentus* DSM 5483 de acuerdo con WO 92/21760 (modificaciones en las posiciones 3, 4 y 199)	94
Variante de acuerdo con la invención de proteasa 1 (véase ejemplo 1)	127

Es claro que una proteasa de acuerdo con la invención exhibe una estabilidad claramente mejorada frente a la temperatura.

En consecuencia las proteasas de acuerdo con la invención muestran desempeños mejorados de limpieza y son ventajosamente estables frente a la temperatura.

Ejemplo 4: determinación del desempeño de limpieza de proteasas de acuerdo con la invención en el uso en un detergente líquido común en el mercado, a una temperatura de lavado de 60°C

Para este Ejemplo se usaron textiles con suciedad estandarizada. Se usaron las siguientes suciedades:

a) suciedades de la compañía Eidgenössische Material- und Prüfanstalt (EMPA) Testmaterialien AG, St. Gallen, Suiza: EMPA 117 (sangre/leche/tinta sobre poliéster/algodón), EMPA 112 (cacao sobre algodón)
b) suciedades de la compañía wfk - Cleaning Technology Institute e.V., Krefeld, Alemania: 10EG (yema de huevo sobre algodón), 10N (huevo completo/pigmento sobre algodón)
c) suciedades de la compañía CFT (Center For Testmaterials) B.V. Vlaardingen, Países Bajos: CS-01 (sangre sobre algodón), C-05 (sangre/leche/tinta sobre algodón), CS-44 (bebida de chocolate sobre algodón), CS-37 (huevo completo con pigmento sobre algodón), C-10 (pigmento/aceite/leche sobre algodón), CS-06 (aderezos para ensalada con negro natural sobre algodón), CS-08 (Pasto sobre algodón).

Con este material de prueba se estudiaron diferentes recetas de detergente respecto a su desempeño de limpieza. La ejecución de los ensayos ocurrió como se describe en el Ejemplo 2, sin embargo se lavó a una temperatura superior, es decir 60°C. Como proteasa de acuerdo con la invención se usó la variante 1 de proteasa (en lo sucesivo carga 1) del Ejemplo 1. Como referencias sirvieron las siguientes proteasas, que ya muestran muy buenos desempeños de limpieza en detergentes y agentes de limpieza líquidos:

Carga 2: variante F49 de la proteasa alcalina de *Bacillus lentus* DSM 5483 de acuerdo con WO 95/23221;
carga 3: variante de la proteasa alcalina de *Bacillus lentus* DSM 5483 de acuerdo con WO 92/21760 (modificaciones en las posiciones 3, 4 y 199);
carga 4: proteasa con una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO. 1 con la sustitución R99E de aminoácidos en la numeración de acuerdo con SEQ ID NO. 1.

La carga 4 sirvió como estándar. Los valores indicados en la siguiente tabla 3 representan la suma de los desempeños de limpieza en todas las suciedades, como diferencia frente al estándar de acuerdo con la carga 4. Por ello, los valores negativos significan un mal desempeño de limpieza respecto al estándar, sobre todas las suciedades, los valores positivos significan un desempeño mejorado de limpieza respecto al estándar sobre todas las suciedades.

Tabla 3:

Carga	1	2	3	4
Desempeño de limpieza	+10,2	-20,9	-24,0	0

Es claro que una proteasa de acuerdo con la invención también a 60°C muestra un desempeño de limpieza claramente mejorado.

Listado de secuencias

<110> Henkel AG & Co. KGaA

<120> Variantes de proteasa con desempeño mejorado y estables frente a la temperatura

<130> PT019073 PCT

<150> DE102011118021.8
<151> 2011-10-28

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210>1
<211> 269
<212> PRT
<213> Bacillus lentus

<400> 1

```
Ala Gln Ser Val Pro Trp Gly Ile Ser Arg Val Gln Ala Pro Ala Ala
1               5                   10                  15

His Asn Arg Gly Leu Thr Gly Ser Gly Val Lys Val Ala Val Leu Asp
            20                  25                  30

Thr Gly Ile Ser Thr His Pro Asp Leu Asn Ile Arg Gly Gly Ala Ser
        35                  40                  45

Phe Val Pro Gly Glu Pro Ser Thr Gln Asp Gly Asn Gly His Gly Thr
    50                  55                  60

His Val Ala Gly Thr Ile Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly Val Leu
65                  70                  75                  80

Gly Val Ala Pro Ser Ala Glu Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Gly Ala
                85                  90                  95

Asp Gly Arg Gly Ala Ile Ser Ser Ile Ala Gln Gly Leu Glu Trp Ala
            100                 105                 110

Gly Asn Asn Gly Met His Val Ala Asn Leu Ser Leu Gly Ser Pro Ser
        115                 120                 125

Pro Ser Ala Thr Leu Glu Gln Ala Val Asn Ser Ala Thr Ser Arg Gly
    130                 135                 140

Val Leu Val Val Ala Ala Ser Gly Asn Ser Gly Ala Ser Ser Ile Ser
145                 150                 155                 160

Tyr Pro Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Met Ala Val Gly Ala Thr Asp Gln
                165                 170                 175

Asn Asn Asn Arg Ala Ser Phe Ser Gln Tyr Gly Ala Gly Leu Asp Ile
            180                 185                 190

Val Ala Pro Gly Val Asn Val Gln Ser Thr Tyr Pro Gly Ser Thr Tyr
        195                 200                 205

Ala Ser Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Ala
    210                 215                 220

Ala Ala Leu Val Lys Gln Lys Asn Pro Ser Trp Ser Asn Val Gln Ile
225                 230                 235                 240

Arg Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr Ser Leu Gly Ser Thr Asn Leu
                245                 250                 255

Tyr Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg
            260                 265
```

<210> 2
<211> 269
<212> PRT
<213> Bacillus lentus

<400> 2

```
Ala Gln Thr Ile Pro Trp Gly Ile Ser Arg Val Gln Ala Pro Ala Ala
1               5                  10                  15

His Asn Arg Gly Leu Thr Gly Ser Gly Val Lys Val Ala Val Leu Asp
            20                  25                  30

Thr Gly Ile Ser Thr His Pro Asp Leu Asn Ile Arg Gly Gly Ala Ser
        35                  40                  45

Phe Val Pro Gly Glu Pro Ser Thr Gln Asp Gly Asn Gly His Gly Thr
    50                  55                  60

His Val Ala Gly Thr Ile Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly Val Leu
65                  70                  75                  80

Gly Val Ala Pro Ser Ala Glu Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Gly Ala
                85                  90                  95

Asp Gly Glu Gly Ala Ile Ser Ser Ile Ala Gln Gly Leu Glu Trp Ala
            100                 105                 110

Gly Asn Asn Gly Met His Val Ala Asn Leu Ser Leu Gly Ser Pro Ser
```

```
        115                 120                 125

Pro Ser Ala Thr Leu Glu Gln Ala Val Asn Ser Ala Thr Ser Arg Gly
    130                 135                 140

Val Leu Val Val Ala Ala Ser Gly Asn Ser Gly Ala Ser Ser Ile Ser
145                 150                 155                 160

Tyr Pro Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Met Ala Val Gly Ala Thr Asp Gln
                165                 170                 175

Asn Asn Asn Arg Ala Ser Phe Ser Gln Tyr Gly Ala Gly Leu Asp Ile
            180                 185                 190

Val Ala Pro Gly Val Asn Ile Gln Ser Thr Tyr Pro Gly Ser Thr Tyr
        195                 200                 205

Ala Ser Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Ala
    210                 215                 220

Ala Ala Leu Val Lys Gln Lys Asn Pro Ser Trp Ser Asn Val Gln Ile
225                 230                 235                 240

Arg Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr Ser Leu Gly Ser Thr Asn Leu
                245                 250                 255

Tyr Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg
            260                 265
```

<210> 3
<211> 269
<212> PRT
<213> Bacillus lentus

<400> 3

```
Ala Gln Thr Ile Pro Trp Gly Ile Ser Arg Val Gln Ala Pro Ala Ala
1               5                   10                  15

His Asn Arg Gly Leu Thr Gly Ser Gly Val Lys Val Ala Val Leu Asp
            20                  25                  30

Thr Gly Ile Ser Thr His Pro Asp Leu Asn Ile Arg Gly Gly Ala Ser
        35                  40                  45

Phe Val Pro Gly Glu Pro Ser Thr Gln Asp Gly Asn Gly His Gly Thr
    50                  55                  60

His Val Ala Gly Thr Ile Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly Val Leu
```

65 70 75 80

Gly Val Ala Pro Ser Ala Glu Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Gly Ala
85 90 95

Asp Gly Asp Gly Ala Ile Ser Ser Ile Ala Gln Gly Leu Glu Trp Ala
100 105 110

Gly Asn Asn Gly Met His Val Ala Asn Leu Ser Leu Gly Ser Pro Ser
115 120 125

Pro Ser Ala Thr Leu Glu Gln Ala Val Asn Ser Ala Thr Ser Arg Gly
130 135 140

Val Leu Val Val Ala Ala Ser Gly Asn Ser Gly Ala Ser Ser Ile Ser
145 150 155 160

Tyr Pro Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Met Ala Val Gly Ala Thr Asp Gln
165 170 175

Asn Asn Asn Arg Ala Ser Phe Ser Gln Tyr Gly Ala Gly Leu Asp Ile
180 185 190

Val Ala Pro Gly Val Asn Ile Gln Ser Thr Tyr Pro Gly Ser Thr Tyr
195 200 205

Ala Ser Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Ala
210 215 220

Ala Ala Leu Val Lys Gln Lys Asn Pro Ser Trp Ser Asn Val Gln Ile
225 230 235 240

Arg Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr Ser Leu Gly Ser Thr Asn Leu
245 250 255

Tyr Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg
260 265

REIVINDICACIONES

1. Proteasa que comprende una secuencia de aminoácidos, que es idéntica en por lo menos 98% frente a la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO. 1, sobre la totalidad de su longitud y en la numeración de acuerdo con SEQ ID NO. 1 exhibe la sustitución R99E o R99D de aminoácidos en combinación con las sustituciones S3T, V4I y V199I de aminoácidos, en la que la proteasa en detergentes y agentes de limpieza, en comparación con una proteasa de acuerdo con SEQ ID NO. 1, exhibe un desempeño mejorado de limpieza sobre por lo menos una suciedad sensible a la proteasa.

2. Proteasa de acuerdo con la reivindicación 1, que exhibe una secuencia de aminoácidos, como se indica en SEQ ID NO. 2 o SEQ ID NO. 3.

3. Procedimiento para la preparación de una proteasa de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, que comprende la introducción de una sustitución R99E o R99D de aminoácidos en combinación con las sustituciones S3T, V4I y V199I de aminoácidos, en la numeración de acuerdo con SEQ ID NO. 1, en una proteasa de partida con la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO. 1, en la que la proteasa en detergentes y agentes de limpieza, en comparación con una proteasa de acuerdo con SEQ ID NO. 1, exhibe un desempeño mejorado de limpieza sobre por lo menos una suciedad sensible a la proteasa.

4. Acido nucleico que codifica para una proteasa de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 o que codifica para una proteasa obtenida de acuerdo con un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3.

5. Vector que contiene un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 4, en particular un vector de clonación o un vector de expresión.

6. Célula anfitrión no humana, que incluye un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 4 o un vector de acuerdo con la reivindicación 5, o que incluye una proteasa de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, o que incluye una proteasa obtenida de acuerdo con un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en particular una que secreta la proteasa en el medio que rodea la célula anfitrión.

7. Procedimiento para la preparación de una proteasa, que comprende
a) cultivo de una célula anfitrión de acuerdo con la reivindicación 6
b) aislamiento de la proteasa del medio de cultivo o de la célula anfitrión.

8. Agente, en particular un detergente o agente limpiador, caracterizado porque contiene por lo menos una proteasa de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2 o una proteasa obtenida de acuerdo con un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en particular en una cantidad de 2µg a 20mg por g del agente,
y/o porque contiene por lo menos una proteasa de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2 o una proteasa obtenida de acuerdo con un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3 y la proteasa en el agente está envuelta con una sustancia impermeable para la proteasa, a temperatura ambiente o en ausencia de agua.

9. Procedimiento para la limpieza de textiles o superficies duras, caracterizado porque en por lo menos una etapa del procedimiento se aplica un agente de acuerdo con la reivindicación 8, o porque en por lo menos una etapa del procedimiento se torna catalíticamente activa una proteasa de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2 o una proteasa obtenida de acuerdo con un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en particular de modo que la proteasa es usada en una cantidad de 40µg a 4g por aplicación.