

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 794 644**

51 Int. Cl.:

C12N 9/20 (2006.01)

C07K 14/37 (2006.01)

C11D 3/386 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.01.2013 E 17158945 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.03.2020 EP 3211074**

54 Título: **Variantes de lipasa y polinucleótidos que las codifican**

30 Prioridad:

03.02.2012 EP 12153817

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

18.11.2020

73 Titular/es:

NOVOZYMES A/S (100.0%)

Krogshøjvej 36

2880 Bagsvaerd, DK

72 Inventor/es:

ERLANDSEN, LUISE;

HANSEN, CARSEN HOERSLEV;

VIND, JESPER;

SVENDSEN, ALLAN y

SÖNKSEN, CARSTEN PETER

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 794 644 T3

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 lipasa y polinucleótidos que las codifican

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Campo de la invención

10 [0001] La presente invención se refiere a variantes de lipasa, polinucleótidos que codifican las variantes, métodos para producir las variantes y métodos para usar las variantes. La presente invención proporciona variantes de lipasa con propiedades mejoradas en comparación con la lipasa progenitora. En particular, las variantes son más estables en presencia de catalizadores orgánicos tales como derivados de iones dipolares de sulfatos de 3,4-dihidroisoquinolina.

15 Descripción de la técnica relacionada

[0002] En el deseo de generar composiciones de limpieza eficientes, las lipasas se encuentran entre otros componentes empleados en la formulación de tales composiciones. Sin embargo, la actividad de las lipasas puede verse afectada por la presencia de los otros componentes incluidos. En particular, se ha demostrado que la introducción de algunos catalizadores de blanqueo inactiva ciertas enzimas. Este problema de compatibilidad constituye un desafío que no siempre se puede resolver satisfactoriamente solo con la formulación.

25 [0003] En WO 2007/087242 se describe una composición que comprende variantes de lipasa de *Thermomyces lanuginosus*, incluidas dos que comprenden una sustitución G91A, y catalizadores de blanqueo tales como derivados de 3,4-dihidro-isoquinolina.

[0004] WO 07/001262 se refiere a composiciones de limpieza que comprenden catalizadores orgánicos con compatibilidad enzimática mejorada y procesos para fabricar y usar tales composiciones, en donde dichos catalizadores son derivados de iones dipolares de sulfato de 3,4-dihidroisoquinolina. Se muestra que los catalizadores tienen una compatibilidad con amilasa mejorada pero no tienen compatibilidad con lipasa.

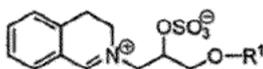
[0005] En consecuencia, existe la necesidad de lipasas con una compatibilidad mejorada con catalizadores orgánicos tales como derivados de sulfato de iones dipolares de 3,4-dihidroisoquinolina y métodos para fabricarlas.

35 RESUMEN DE LA INVENCION

[0006] La presente invención se refiere a un método para obtener una variante de lipasa, que comprende introducir en una lipasa progenitora sustituciones correspondientes a:

- 40 a) G91A + D96G + T231R + N233R;
 b) T37R + N39R + G91A + D96G + T231R + N233R;
 c) G91A + D96G + G225R + T231R + N233R; o
 d) G91A + D96G + A150G + T231 R + N233R del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2, en donde la variante es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 90% de identidad, pero menos del 100% con el polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2, tiene actividad lipasa y, en comparación con la lipasa progenitora, tiene un rendimiento mejorado en presencia de un catalizador orgánico seleccionado del grupo que consiste en catalizadores orgánicos que tienen las siguientes fórmulas:

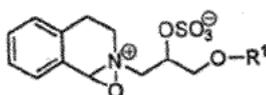
a)



Fórmula 1;

50

b)



Fórmula 2; o

c) mezclas de los mismos,

en donde cada R1 es independientemente un grupo alquilo ramificado que contiene de 3 a 24 carbonos o un grupo alquilo lineal que contiene de 1 a 24 carbonos; y recuperar la variante.

[0007] La presente invención también se refiere a variantes de lipasa que comprenden sustituciones en las posiciones correspondientes a

- a) T37R + N39R + G91A + D96G + T231R + N233R;
- b) G91A + D96G + T231R + N233R;
- c) G91A + D96G + G225R + T231R + N233R; o
- d) G91A + D96G + A150G + T231R + N233R del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2, en donde la variante tiene actividad lipasa; y en donde el polipéptido tiene al menos 90%, pero menos del 100% de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2.

[0008] La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados que codifican las variantes; construcciones de ácido nucleico, vectores y células hospedadoras que comprenden los polinucleótidos; y métodos para producir las variantes.

Definiciones

[0009]

Lipasa: el término "lipasa" o "enzima lipolítica" o "esterasa lipídica" es una enzima en la clase EC 3.1.1 tal y como se define en la Nomenclatura de enzimas. Puede tener actividad lipasa (triacilglicerol lipasa, EC 3.1.1.3), actividad cutinasa (EC 3.1.1.74), actividad estero esterasa (EC 3.1.1.13) y/o actividad hidrolasa de éster ceroso (EC 3.1.1.50). Para los fines de la presente invención, la actividad lipasa se determina según el procedimiento descrito en los ejemplos. En un aspecto, las variantes de la presente invención tienen al menos el 20 %, por ejemplo, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 35 %, al menos el 40 %, al menos el 45 %, al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, o al menos el 100 % de la actividad lipasa del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2.

Variante alélica: el término "variante alélica" significa cualquiera de dos o formas más alternativas de un gen que ocupa el mismo locus cromosómico. La variación alélica surge de manera natural a través de la mutación, y puede resultar en polimorfismo dentro de las poblaciones. Las mutaciones genéticas pueden ser silenciosas (sin cambio en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos alteradas. Una variante alélica de un polipéptido es un polipéptido codificado por una variante alélica de un gen.

ADNc: el término "ADNc" significa una molécula de ADN que se puede preparar por transcripción inversa a partir de una molécula de ARNm empalmado maduro obtenida a partir de una célula eucariótica o procariótica. El ADNc carece de secuencias de intrones que pueden estar presentes en el ADN genómico correspondiente. El transcrito de ARN primario inicial es un precursor del ARNm que se procesa a través de una serie de pasos, que incluyen empalme, antes de aparecer como ARNm empalmado maduro.

Secuencia codificante: el término "secuencia codificante" significa un polinucleótido que especifica directamente la secuencia de aminoácidos de una variante. Los límites de la secuencia codificante se determinan generalmente por un marco de lectura abierto, que empieza con un codón de inicio tal como ATG, GTG o TTG y termina con un codón de terminación tal como TAA, TAG o TGA. La secuencia codificante puede ser un ADN genómico, ADNc, ADN sintético, o una combinación de los mismos.

Secuencias de control: el término "secuencias de control" significa secuencias de ácido nucleico necesarias para la expresión de un polinucleótido que codifica una variante de la presente invención. Cada secuencia de control puede ser nativa (es decir, del mismo gen) o exógena (es decir, de un gen diferente) respecto del polinucleótido que codifica la variante o nativa o exógena entre ellas. Tales secuencias de control incluyen, pero de forma no limitativa, un líder, una secuencia de poliadenilación, una secuencia de propéptidos, un promotor, una secuencia de péptido señal y un terminador de la transcripción. Como mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor, y señales de parada transcripcional y traduccional. Las secuencias de control pueden estar provistas de enlazadores con el fin de introducir sitios de restricción específicos que faciliten el ligamiento de las secuencias de control con la región de codificación del polinucleótido que codifica una variante.

Expresión: el término "expresión" incluye cualquier paso implicado en la producción de una variante entre los que se incluyen, pero de forma no limitativa, transcripción, modificación postranscripcional, traducción, modificación postraduccional y secreción.

Vector de expresión: el término "vector de expresión" significa una molécula de ADN lineal o circular que comprende un polinucleótido que codifica una variante y está operativamente unido a secuencias de control que permiten su expresión.

Fragmento: el término "fragmento" significa un polipéptido que tiene uno o más (por ejemplo, varios) aminoácidos ausentes del terminal amino y/o carboxilo de un polipéptido maduro; donde el fragmento tiene actividad lipasa. En un aspecto, un fragmento contiene al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 % y al menos el 95 % del número de aminoácidos del polipéptido maduro.

Célula hospedadora: El término "célula hospedadora" significa cualquier tipo de célula que sea susceptible de transformación, transfección, transducción o similar con una construcción de ácido nucleico o vector de expresión que comprende un polinucleótido de la presente invención. El término "célula hospedadora" abarca cualquier progenie de una célula progenitora que no sea idéntica a la célula progenitora debido a mutaciones que ocurren durante la replicación.

Aislado: El término "aislado" significa una sustancia en una forma o ambiente que no se da en la naturaleza. Los ejemplos no limitantes de sustancias aisladas incluyen (1) cualquier sustancia que no se produzca de forma natural, (2) cualquier sustancia que incluya, pero sin limitarse a, cualquier enzima, variante, ácido nucleico, proteína, péptido o cofactor, que se elimine al menos parcialmente de uno o más o todos los constituyentes naturales con los que está asociada en la naturaleza; (3) cualquier sustancia modificada por la mano del hombre en relación con esa sustancia encontrada en la naturaleza; o (4) cualquier sustancia modificada mediante el aumento de la cantidad de la sustancia en relación con otros componentes con los que está asociada naturalmente (por ejemplo, copias múltiples de un gen que codifica la sustancia; uso de un promotor más fuerte que el promotor naturalmente asociado con la codificación del gen la sustancia). Una sustancia aislada puede estar presente en una muestra de caldo de fermentación.

Polipéptido maduro: El término "polipéptido maduro" significa un polipéptido en su forma final después de la traducción y cualquier modificación postraducciona, como procesamiento N-terminal, truncamiento C-terminal, glicosilación, fosforilación, etc. En un aspecto, el polipéptido maduro son los aminoácidos 1 a 269 de la SEQ ID NO: 2.

Secuencia codificante del polipéptido maduro: El término "secuencia codificante del polipéptido maduro" significa un polinucleótido que codifica un polipéptido maduro que tiene actividad lipasa. En un aspecto, la secuencia codificante del polipéptido maduro son los nucleótidos 67 a 873 de la SEQ ID NO: 1.

Mutante: El término "mutante" significa un polinucleótido que codifica una variante.

Construcción de ácido nucleico: El término "construcción de ácido nucleico" significa una molécula de ácido nucleico, monocatenaria o bicatenaria, que se aísla de un gen natural o se modifica para que contenga segmentos de ácidos nucleicos de una manera que de otra manera no existiría en la naturaleza o que es sintética, que comprende una o más secuencias de control.

Operativamente unido: El término "operativamente unido" significa una configuración en la que una secuencia de control se coloca en una posición apropiada con respecto a la secuencia de codificación de un polinucleótido de tal manera que la secuencia de control dirige la expresión de la secuencia de codificación.

Progenitor o lipasa progenitora: El término "progenitor" o "lipasa progenitora" significa una lipasa a la que se hace una alteración para producir las variantes enzimáticas de la presente invención. El progenitor puede ser un polipéptido natural (de tipo salvaje) o una variante o fragmento del mismo.

Identidad de secuencia: La relación entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos se describe mediante el parámetro "identidad de secuencia". Para los fines de la presente invención, la identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos se determina usando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) implementado en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice y cols., 2000, Trends Genet. 16: 276-277), preferiblemente la versión 5.0.0 o posterior. Los parámetros utilizados son la penalización por apertura de hueco de 10, la penalización por extensión de hueco de 0,5 y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (versión EMBOSS de BLOSUM62). El resultado de Needle etiquetado como "identidad más larga" (obtenido usando la opción -nobrief) se usa como porcentaje de identidad y se calcula de la siguiente manera:

$$\text{Identidad de secuencia} = \frac{(\text{Residuos idénticos} \times 100)}{(\text{Longitud del alineamiento} - \text{Número total de huecos en el alineamiento})}$$

Para los fines de la presente invención, la identidad de secuencia entre dos secuencias de desoxirribonucleótidos se determina usando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, *supra*) tal como se implementa en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice y cols., 2000, *supra*), preferiblemente la versión 5.0.0 o posterior.

Los parámetros utilizados son la penalización por apertura de hueco de 10, la penalización por extensión de hueco de 0,5 y la matriz de sustitución EDNAFULL (versión EMBOSS de NCBI NUC4.4). El resultado de Needle etiquetado como "identidad más larga" (obtenido usando la opción -nobrief) se usa como porcentaje de identidad y se calcula de la siguiente manera:

5
 (Desoxirribonucleótidos idénticos x 100) / (Longitud del alineamiento – Número total de huecos en el alineamiento)

10
Subsecuencia: El término "subsecuencia" significa un polinucleótido que tiene uno o más (por ejemplo, varios) nucleótidos ausentes del extremo 5' y/o 3' de una secuencia codificante de polipéptido maduro; en donde la subsecuencia codifica un fragmento que tiene actividad lipasa. En un aspecto, una subsecuencia contiene al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90 %, y al menos el 95% del número de nucleótidos de la secuencia codificante del polipéptido maduro.

15
Variante: El término "variante" significa un polipéptido que tiene actividad lipasa que comprende una sustitución en una o más (por ejemplo, varias) posiciones. Una sustitución significa el reemplazo del aminoácido que ocupa una posición con un aminoácido diferente. Las variantes de la presente invención tienen al menos 20%, por ejemplo, al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, a al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 100% de la actividad de la lipasa del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2.

20
Lipasa de tipo salvaje: El término "lipasa de tipo salvaje" significa una lipasa expresada por un microorganismo natural, como una bacteria, levadura u hongo filamentoso que se encuentra en la naturaleza.

25
 Convenciones para la designación de variantes

30
 [0010] Para los fines de la presente invención, el polipéptido maduro descrito en la SEQ ID NO: 2 se usa para determinar el residuo de aminoácido correspondiente en otra lipasa. La secuencia de aminoácidos de otra lipasa se alinea con el polipéptido maduro descrito en la SEQ ID NO: 2 y, en función de la alineación, el número de posición de aminoácido correspondiente a cualquier residuo de aminoácido en el polipéptido maduro descrito en la SEQ ID NO: 2 se determina usando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) implementado en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice y cols., 2000, Trends Genet. 16: 276-277), preferiblemente la versión 5.0.0 o posterior. Los parámetros utilizados son la penalización por apertura de hueco de 10, la penalización por extensión de hueco de 0,5 y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (versión EMBOSS de BLOSUM62).

35
 [0011] La identificación del residuo de aminoácidos correspondiente en otra lipasa se puede determinar mediante un alineamiento de múltiples secuencias polipeptídicas usando diferentes programas informáticos que incluyen, pero de forma no limitativa, MUSCLE (Multiple Sequence Comparison By Log-Expectation; versión 3,5 o posterior; Edgar, 2004, Nucleic Acids Research 32 32: 1792-1797), MAFFT (versión 6.857 o posterior; Katoh y Kuma, 2002, Nucleic Acids Research 30: 3059-3066; Katoh y cols., 2005, Nucleic Acids Research 33: 511-518; Katoh y Toh, 2007, Bioinformatics 23: 372-374; Katoh y cols., 2009, Methods in Molecular Biology 537: 39-64; Katoh y Toh, 2010, Bioinformatics 26: 1899-1900), y EMBOSS EMMA utilizando ClustalW (1.83 o posterior; Thompson y cols., 1994, Nucleic Acids Research 22: 4673-4680), usando sus respectivos parámetros por defecto.

40
 [0012] Cuando la otra enzima ha divergido del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2 de manera que la comparación tradicional basada en secuencias no detecta su relación (Lindahl y Elofsson, 2000, J. Mol. Biol. 295: 613-615), se pueden usar otros algoritmos de comparación de secuencia por pares. Se puede alcanzar mayor sensibilidad en la búsqueda basada en secuencias utilizando programas de búsqueda que utilizan representaciones probabilísticas de (perfiles de) familias de polipéptidos para buscar en las bases de datos. Por ejemplo, el programa BLAST genera perfiles a través de un proceso de búsqueda de base de datos reiterativa y es capaz de detectar homólogos remotos (Atschul y cols., 1997, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402). Se puede conseguir una sensibilidad incluso superior si la familia o superfamilia del polipéptido tiene uno o más representantes en las bases de datos de estructuras de proteínas. Los programas tales como GenTHREADER (Jones, 1999, J. Mol. Biol. 287: 797-815; McGuffin y Jones, 2003, Bioinformatics 19: 874-881) utilizan información de una variedad de fuentes (PSI-BLAST, predicción de estructuras secundarias, perfiles de alineamiento estructural, y potenciales de disolución) como entrada a una red neuronal que predice el pliegue estructural para una secuencia de consulta. De forma similar, el método de Gough y cols., 2000, J. Mol. Biol. 313: 903-919, se puede utilizar para alinear una secuencia de estructura desconocida con los modelos de superfamilia presentes en la base de datos SCOP. Estos alineamientos se pueden usar a su vez para generar modelos de homología para el polipéptido, y tales modelos se pueden evaluar para exactitud utilizando una variedad de herramientas desarrolladas para ese fin.

5 [0013] Para proteínas de estructura conocida, diversas herramientas y recursos están disponibles para recuperar y generar alineamientos estructurales. Por ejemplo, las superfamilias de proteínas de SCOP se han alineado estructuralmente, y esos alineamientos son accesibles y descargables. Dos o más estructuras de proteínas se pueden alinear utilizando una variedad de algoritmos como la matriz de alineamiento de distancias (Holm y Sander, 1998, Proteins 33: 88-96) o extensión combinatoria (Shindyalov y Bourne, 1998, Protein Engineering 11: 739-747), y la implementación de estos algoritmos se puede utilizar adicionalmente para consultar bases de datos de estructuras con una estructura de interés para descubrir posibles homólogos estructurales (por ejemplo, Holm and Park, 2000, Bioinformatics 16: 566-567).

10 [0014] Al describir las variantes de la presente invención, la nomenclatura descrita más adelante se adapta para facilidad de referencia. Se emplean la abreviatura de una única letra o de tres letras de aminoácidos aceptadas por la IUPAC.

15 [0015] Sustituciones. Para una sustitución de aminoácidos, se usa la nomenclatura siguiente: aminoácido progenitor, posición, aminoácido sustituido. Por consiguiente, la sustitución de treonina en la posición 226 con alanina se designa como "Thr226Ala" o "T226A". Las mutaciones múltiples se separan por signos de suma ("+"), por ejemplo, "Gly205Arg+Ser411Phe" o "G205R+S411F", que representa sustituciones en las posiciones 205 y 411 de glicina (G) con arginina (R) y de serina (S) con fenilalanina (F), respectivamente.

20 [0016] Sustituciones múltiples. Las variantes que comprenden sustituciones múltiples se separan por signos de suma ("+"), por ejemplo, "Arg170Tyr+Gly195Glu" o "R170Y+G195E", que representan una sustitución de arginina y glicina en las posiciones 170 y 195 con tirosina y ácido glutámico, respectivamente.

25 [0017] Sustituciones diferentes. Donde se puedan introducir alteraciones diferentes en una posición, las alteraciones diferentes se separan por una coma, por ejemplo, "Arg170Tyr,Glu" o "R170Y,E" representa una sustitución de arginina en la posición 170 con tirosina o ácido glutámico. Así, "Tyr167Gly,Ala+Arg170Gly,Ala" designa las variantes siguientes: "Tyr167Gly+Arg170Gly", "Tyr167Gly+Arg170Ala", "Tyr167Ala+Arg170Gly" y "Tyr167Ala+Arg170Ala".

30 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Variantes

35 [0018] La presente invención se refiere a variantes de lipasa aisladas, que comprenden sustituciones en posiciones correspondientes a

- 40 a) T37R + N39R + G91A + D96G + T231R + N233R;
 b) G91A + D96G + T231R + N233R;
 c) G91A + D96G + G225R + T231R + N233R; o
 d) G91A + D96G + A150G + T231R + N233R del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2,

en donde la variante tiene actividad lipasa; y en donde el polipéptido tiene al menos 90%, pero menos del 100% de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2.

45 [0019] En otra forma de realización, la variante tiene al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, tal como al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99%, pero menos del 100%, de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2.

50 [0020] En un aspecto, el número de sustituciones en las variantes de la presente invención es de 1-20, por ejemplo, 1-10 y 1-5, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 sustituciones.

[0021] Las variantes pueden comprender además una o más sustituciones adicionales en una o más (por ejemplo, varias) otras posiciones.

55 [0022] Los cambios de aminoácidos pueden ser de una naturaleza menor, es decir, sustituciones de aminoácidos conservadoras o inserciones que no afectan significativamente al plegado y/o a la actividad de la proteína; deleciones pequeñas, típicamente de 1-30 aminoácidos; pequeñas extensiones del terminal amino o carboxilo, tales como un residuo de metionina aminoterminal; un pequeño péptido de unión de hasta 20-25 residuos; o una pequeña extensión que facilita la purificación mediante el cambio de carga de red u otra función, tal como un tracto de polihistidina, un epítipo antigénico o un dominio de unión.

60

[0023] Algunos ejemplos de sustituciones conservadoras se encuentran en los grupos aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), aminoácidos ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), aminoácidos polares (glutamina y asparagina), aminoácidos hidrofóbicos (leucina, isoleucina y valina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina), y pequeños aminoácidos (glicina, alanina, serina, treonina y metionina).

65

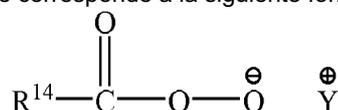
[0024] Alternativamente, los cambios de aminoácidos son de tal naturaleza que las propiedades fisicoquímicas de los polipéptidos se alteran. Por ejemplo, los cambios de aminoácidos pueden mejorar la termoestabilidad del polipéptido, alterar la especificidad del sustrato, cambiar el pH óptimo, y similares.

5 [0025] Los aminoácidos esenciales de un polipéptido se pueden identificar según procedimientos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida o mutagénesis por barrido de alanina (Cunningham y Wells, 1989, Science 244: 1081-1085). En la técnica anterior, se introducen mutaciones de alanina únicas en cada residuo en la molécula, y las moléculas mutantes resultantes se evalúan para detectar actividad lipasa para identificar los
10 residuos de aminoácidos que son críticos para la actividad de la molécula. Véase también, Hilton y *co/s.*, 1996, J. Biol. Chem. 271: 4699-4708. El sitio activo de la enzima u otra interacción biológica también se pueden determinar mediante análisis físico de la estructura, como se determina por técnicas tales como resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción electrónica, o marcaje por fotoafinidad, conjuntamente con la mutación de los aminoácidos del sitio de contacto putativo. Véase, por ejemplo, de Vos y *co/s.*, 1992, Science 255: 306-312; Smith y *co/s.*, 1992, J. Mol. Biol. 224: 899-904; Wlodaver y *co/s.*, 1992, FEBS Lett. 309: 59-64. La identidad de los aminoácidos
15 esenciales también se puede inferir a partir de un alineamiento con un polipéptido relacionado.

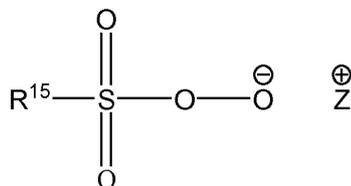
[0026] Las variantes pueden consistir en al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, y al menos el 95% del número de aminoácidos del polipéptido maduro.

[0027] En una forma de realización, la variante tiene un rendimiento mejorado en presencia de un o una mezcla de más de un componente blanqueador. Los componentes blanqueadores adecuados incluyen catalizadores de blanqueo, fotoblanqueadores, activadores de blanqueo, peróxido de hidrógeno, fuentes de peróxido de hidrógeno, perácidos preformados y mezclas de los mismos. En general, el componente blanqueador puede estar presente, de aproximadamente 0,00001 a 90% en peso, preferiblemente de 0,0001% a aproximadamente 50% o incluso de aproximadamente 0,001% a aproximadamente 25% de componente blanqueador en peso de una composición de limpieza. Los ejemplos de componentes blanqueadores adecuados incluyen:

(1) Perácidos preformados: los perácidos preformados adecuados incluyen, pero no se limitan a, compuestos seleccionados del grupo que consiste en peroxiácidos preformados o sales de los mismos, típicamente un ácido peroxicarboxílico o una sal del mismo, o un ácido peroxisulfónico o una sal del mismo. El peroxiácido preformado o la sal del mismo es preferiblemente un ácido peroxicarboxílico o una sal del mismo, que tiene típicamente una estructura química que corresponde a la siguiente fórmula química:



en donde: R¹⁴ se selecciona de grupos alquilo, aralquilo, cicloalquilo, arilo o heterocíclico; El grupo R¹⁴ puede ser lineal o ramificado, sustituido o no sustituido; e Y es cualquier contraión apropiado que logre la neutralidad de la carga eléctrica, preferiblemente Y se selecciona de hidrógeno, sodio o potasio. Preferiblemente, R¹⁴ es un alquilo C₆₋₉ lineal o ramificado, sustituido o no sustituido. Preferiblemente, el peroxiácido o la sal del mismo se selecciona de entre ácido peroxihexanoico, ácido peroxiheptanoico, ácido peroxioctanoico, ácido peroxinonanoico, ácido peroxidecanoico, cualquier sal del mismo, o cualquier combinación de los mismos. Los peroxiácidos particularmente preferidos son los ácidos ftalimido-peroxi-alcanoicos, en particular el ácido ε-ftahiimido peroxi-hexanoico (PAP). Preferiblemente, el peroxiácido o la sal del mismo tiene un punto de fusión en el intervalo de 30 ° C a 60 ° C. El peroxiácido preformado o una sal del mismo también puede ser un ácido peroxisulfónico o una sal del mismo, que tiene típicamente una estructura química que corresponde a la siguiente fórmula química:



en donde: R¹⁵ se selecciona de grupos alquilo, aralquilo, cicloalquilo, arilo o heterocíclico; El grupo R¹⁵ puede ser lineal o ramificado, sustituido o no sustituido; y Z es cualquier contraión apropiado que logre la neutralidad de la carga eléctrica, preferiblemente Z se selecciona de hidrógeno, sodio o potasio. Preferiblemente R¹⁵ es un alquilo C₆₋₉ lineal o ramificado, sustituido o no sustituido. Preferiblemente, tales componentes blanqueadores pueden estar presentes en una composición en una cantidad de 0,01 a 50%, de la manera más preferible de 0,1% a 20%.

(2) Las fuentes de peróxido de hidrógeno incluyen, por ejemplo, sales de perhidrato inorgánico, incluidas sales de metales alcalinos tales como sales de sodio de perborato (generalmente monohidrato o tetrahidrato), percarbonato, persulfato, perfosfato, sales de persilicato y mezclas de las mismas. En un aspecto de la

invención, las sales de perhidrato inorgánicas tales como las seleccionadas del grupo que consiste en sales de sodio de perborato, percarbonato y sus mezclas. Cuando se emplean, las sales de perhidrato inorgánico están típicamente presentes en cantidades de 0,05 a 40% en peso, o de 1 a 30% en peso de la composición global y se incorporan típicamente en tales composiciones como un sólido cristalino que puede estar recubierto. Los recubrimientos adecuados incluyen sales inorgánicas tales como silicato de metal alcalino, sales de carbonato o borato o mezclas de los mismos, o materiales orgánicos tales como polímeros solubles o dispersables en agua, ceras, aceites o jabones grasos. Preferiblemente, tales componentes blanqueadores pueden estar presentes en una composición en una cantidad de 0,01 a 50%, de la manera más preferible de 0,1% a 20%.

(3) Los activadores de blanqueo adecuados son aquellos que tienen R-(C=O)-L, donde R es un grupo alquilo, opcionalmente ramificado, que tiene, cuando el activador de blanqueo es hidrófobo, de 6 a 14 átomos de carbono, o de 8 a 12 átomos de carbono y, cuando el activador de blanqueo es hidrófilo, menos de 6 átomos de carbono o incluso menos de 4 átomos de carbono; y L es el grupo saliente. Algunos ejemplos de grupos salientes adecuados son el ácido benzoico y sus derivados, especialmente el benenosulfonato. Los activadores de blanqueo adecuados incluyen dodecanoil oxibencen sulfonato, decanoil oxibencen sulfonato, ácido decanoil oxibenzoico o sus sales, 3,5,5-trimetil hexanoiloxibencen sulfonato, tetraacetil etilendiamina (TAED) y nonanoiloxibencen sulfonato (NOBS). Los activadores de blanqueo adecuados también se describen en WO98/17767. Si bien se puede emplear cualquier activador de blanqueo adecuado, en un aspecto de la invención, la composición de limpieza en cuestión puede comprender NOBS, TAED o mezclas de los mismos. Cuando está presente, el perácido y/o activador de blanqueo está generalmente presente en el producto de consumo en una cantidad de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 60% en peso, de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 40% en peso o incluso de aproximadamente 0,6 a aproximadamente 10% en peso basado en la tela y el producto para el cuidado del hogar. Se pueden usar uno o más perácidos hidrófobos o precursores de los mismos en combinación con uno o más perácidos hidrófilos o precursores de los mismos. Preferiblemente, tales componentes blanqueadores pueden estar presentes en una composición en una cantidad de 0,01 a 50%, de la manera más preferible de 0,1% a 20%. Las cantidades de fuente de peróxido de hidrógeno y perácido o activador del blanqueo pueden seleccionarse de modo que la relación molar de oxígeno disponible (de la fuente de peróxido) a perácido sea de 1:1 a 35:1, o incluso 2:1 a 10:1.

(4) Peróxidos de diacilo - las especies de blanqueo de peróxido de diacilo preferidas incluyen las seleccionadas de peróxidos de diacilo de fórmula general:



en donde R¹ representa un grupo alquilo C₆-C₁₈, preferiblemente un grupo alquilo C₆-C₁₂ que contiene una cadena lineal de al menos 5 átomos de carbono y que opcionalmente contiene uno o más sustituyentes (por ejemplo, -N⁺(CH₃)₃, -COOH o -CN) y/o uno o más restos de interrupción (por ejemplo, -CONH- o -CH=CH-) interpolados entre átomos de carbono adyacentes del radical alquilo, y R² representa un grupo alifático compatible con un resto de peróxido, de manera que R¹ y R² juntos contienen un total de 8 a 30 átomos de carbono. En un aspecto preferido, R¹ y R² son cadenas de alquilo C₆-C₁₂ lineales no sustituidas, de la manera más preferible R¹ y R² son idénticos. Los peróxidos de diacilo, en los que tanto R¹ como R² son grupos alquilo C₆-C₁₂, son particularmente preferidos. Preferiblemente, al menos uno de, más preferiblemente solo uno de, los grupos R (R¹ o R²), no contiene anillos ramificados o laterales en la posición alfa, o preferiblemente ni en las posiciones alfa ni beta o, de la manera más preferible, en ninguna de las posiciones alfa o beta o gamma. En una forma de realización preferida adicional, el DAP puede ser asimétrico, de modo que preferiblemente la hidrólisis del grupo acilo R¹ genera perácidos rápidamente, pero la hidrólisis del grupo acilo R² es lenta. La especie blanqueadora de peróxido de tetraacilo se selecciona preferiblemente de peróxidos de tetraacilo de fórmula general:

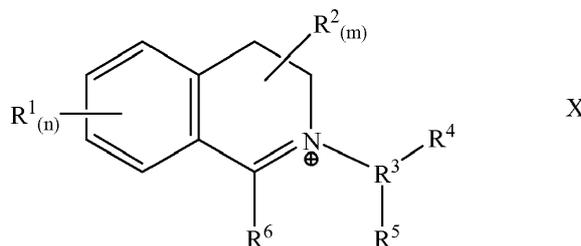


en donde R³ representa un grupo alquilo C₁-C₉, preferiblemente C₃-C₇, y n representa un número entero de 2 a 12, preferiblemente de 4 a 10 inclusive. Preferiblemente, las especies blanqueadoras de peróxido de diacilo y/o tetraacilo están presentes en una cantidad suficiente para proporcionar al menos 0,5 ppm, más preferiblemente al menos 10 ppm, y aún más preferiblemente al menos 50 ppm en peso de la solución de lavado. En una forma de realización preferida, la especie blanqueadora está presente en una cantidad suficiente para proporcionar de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 300 ppm, más preferiblemente de aproximadamente 30 a aproximadamente 150 ppm en peso de la solución de lavado. Preferiblemente, el componente blanqueador comprende un catalizador de blanqueo (5 y 6).

(5) Se prefieren los catalizadores de blanqueo orgánicos (no metálicos) que incluyen catalizador de blanqueo capaz de aceptar un átomo de oxígeno de un peroxiacido y/o una sal del mismo, y transferir el átomo de oxígeno a un sustrato oxidable. Los catalizadores de blanqueo adecuados incluyen, pero no se limitan a: cationes de iminio y poliiones; iones dipolares de iminio; aminas modificadas; óxidos de aminas modificadas; N-sulfonil iminas; N-fosfonil iminas; N-acil iminas; dióxidos de tiadiazol; perfluoroiminas; cetonas de azúcar cíclicas y sus mezclas.

- 5 [0028] Los cationes y poliones de iminio adecuados incluyen, pero no se limitan a, tetrafluoroborato de N-metil-3,4-dihidroisoquinolinio, preparado como se describe en Tetrahedron (1992), 49 (2), 423-38 (véase, por ejemplo, el compuesto 4, p. 433); p-toluen sulfonato de N-metil-3,4-dihidroisoquinolinio, preparado como se describe en US5360569 (véase, por ejemplo, Columna 11, Ejemplo 1); y p-toluen sulfonato de N-octil-3,4-dihidroisoquinolinio, preparado como se describe en US5360568 (véase, por ejemplo, Columna 10, Ejemplo 3).
- 10 [0029] Los iones dipolares de iminio adecuados incluyen, pero no se limitan a, N-(3-sulfopropil)-3,4-dihidroisoquinolinio, sal interna, preparada como se describe en US5576282 (véase, por ejemplo, Columna 31, Ejemplo II); N-[2-(sulfooxi) dodecil]-3,4-dihidroisoquinolinio, sal interna, preparada como se describe en US5817614 (véase, por ejemplo, Columna 32, Ejemplo V); 2-[3-[(2-etilhexil)oxi]-2-(sulfooxi)propil]-3,4-dihidroisoquinolinio, sal interna, preparada como se describe en WO05/047264 (véase, por ejemplo, página 18, Ejemplo 8), y 2-[3-[(2-butiloxil)oxi]-2-(sulfooxi)propil]-3,4-dihidroisoquinolinio, sal interna.
- 15 [0030] Los catalizadores de transferencia de oxígeno de aminas modificadas adecuados incluyen, pero no se limitan a, 1,2,3,4-tetrahidro-2-metil-1-isoquinolinol, que se puede preparar según los procedimientos descritos en Tetrahedron Letters (1987), 28 (48), 6061-6064. Los catalizadores de transferencia de oxígeno de óxido de aminas modificadas adecuados incluyen, pero no se limitan a, 1-hidroxi-N-oxi-N-[2-(sulfooxi)decil]-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina de sodio.
- 20 [0031] Los catalizadores de transferencia de oxígeno de N-sulfonil iminas adecuados incluyen, pero no se limitan a, 1,1-dióxido de 3-metil-1,2-benzisotiazol, preparado de acuerdo con el procedimiento descrito en Journal of Organic Chemistry (1990), 55 (4), 1254-61.
- 25 [0032] Los catalizadores de transferencia de oxígeno de N-fosfonil iminas adecuados incluyen, pero no se limitan a, [R-(E)]-N-[(2-cloro-5-nitrofenil)metilén]-P-fenil-P-(2,4, 6-trimetilfenil)-amida fosfínica, que se puede preparar de acuerdo con los procedimientos descritos en Journal of the Chemical Society, Chemical Communications (1994), (22), 2569-70.
- 30 [0033] Los catalizadores de transferencia de oxígeno de N-acil iminas adecuados incluyen, pero no se limitan a, [N(E)]-N-(fenilmetilén)acetamida, que se puede preparar de acuerdo con los procedimientos descritos en Polish Journal of Chemistry (2003), 77 (5), 577-590.
- 35 [0034] Los catalizadores de transferencia de oxígeno de dióxidos de tiadiazol adecuados incluyen, pero no se limitan a, 1,1-dióxido de 3-metil-4-fenil-1,2,5-tiadiazol, que se puede preparar de acuerdo con los procedimientos descritos en US5753599 (Columna 9, Ejemplo 2).
- 40 [0035] Los catalizadores de transferencia de oxígeno de perfluoroiminas adecuados incluyen, pero no se limitan a, fluoruro de (Z)-2,2,3,3,4,4,4-heptafluoro-N-(nonafluorobutil) butanimidoilo, que se puede preparar de acuerdo con los procedimientos descritos en Tetrahedron Letters (1994), 35 (34), 6329-30.
- 45 [0036] Los catalizadores de transferencia de oxígeno de azúcares y cetonas adecuados incluyen, pero no se limitan a, 1,2:4,5-di-O-isopropilidén-D-eritro-2,3-hexodiuoro-2,6-piranosas como se prepara en US6649085 (Columna 12, Ejemplo 1).
- 50 [0037] Preferiblemente, el catalizador de blanqueo comprende un grupo funcional iminio y/o carbonilo y es típicamente capaz de formar un grupo funcional oxaziridinio y/o dioxirano tras la aceptación de un átomo de oxígeno, especialmente tras la aceptación de un átomo de oxígeno de un peroxiácido y/o una sal del mismo. Preferiblemente, el catalizador de blanqueo comprende un grupo funcional oxaziridinio y/o es capaz de formar un grupo funcional oxaziridinio tras la aceptación de un átomo de oxígeno, especialmente tras la aceptación de un átomo de oxígeno de un peroxiácido y/o una sal del mismo. Preferiblemente, el catalizador de blanqueo comprende un grupo funcional iminio cíclico, preferiblemente en el que el resto cíclico tiene un tamaño de anillo de cinco a ocho átomos (incluido el átomo de nitrógeno), preferiblemente de seis átomos. Preferiblemente, el catalizador de blanqueo comprende un grupo funcional ariliminio, preferiblemente un grupo funcional ariliminio bicíclico, preferiblemente un grupo funcional 3,4-dihidroisoquinolinio. Típicamente, el grupo funcional imina es un grupo funcional imina cuaternario y es típicamente capaz de formar un grupo funcional oxaziridinio cuaternario al aceptar un átomo de oxígeno, especialmente al aceptar un átomo de oxígeno de un peroxiácido y/o una sal del mismo. En otro aspecto, la composición detergente comprende un componente blanqueador que tiene un $\log P_{o/w}$ no mayor que 0, no mayor que -0,5, no mayor que -1,0, no mayor que -1,5, no mayor que -2,0, no mayor que -2,5, no mayor que -3,0, o incluso no mayor que -3,5. El método para determinar $\log P_{o/w}$ se describe con más detalle a continuación.
- 60 [0038] Típicamente, el ingrediente blanqueador es capaz de generar una especie blanqueadora que tiene una X_{SO} de 0,01 a aproximadamente 0,30, de 0,05 a aproximadamente 0,25, o incluso de aproximadamente 0,10 a 0,20. El método para determinar la X_{SO} se describe con más detalle a continuación. Por ejemplo, los ingredientes blanqueadores que tienen una estructura de isoquinolinio son capaces de generar una especie blanqueadora que tiene una estructura de oxaziridinio. En este ejemplo, la X_{SO} es la de las especies blanqueadoras de oxaziridinio.
- 65

[0039] Preferiblemente, el catalizador de blanqueo tiene una estructura química que corresponde a la siguiente fórmula química

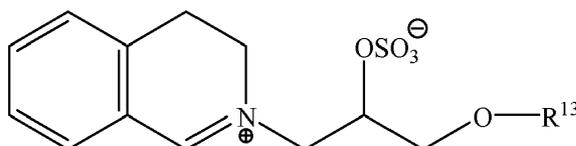


X

5
10
15
20
25
30

en donde: n y m son independientemente de 0 a 4, preferiblemente n y m son ambos 0; cada R¹ se selecciona independientemente de un radical sustituido o no sustituido seleccionado del grupo que consiste en radicales hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, arilo, arilo fusionado, anillo heterocíclico, anillo heterocíclico fusionado, nitro, halo, ciano, sulfonato, alcoxi, ceto, carboxílico y carboalcoxi; y cualesquiera dos sustituyentes R¹ vecinos pueden combinarse para formar un anillo arilo fusionado, carbocíclico fusionado o heterocíclico fusionado; cada R² se selecciona independientemente de un radical sustituido o no sustituido independientemente seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno, hidroxilo, alquilo, cicloalquilo, alcarilo, arilo, aralquilo, alquilenos, anillo heterocíclico, alcoxis, grupos arilcarbonilo, grupos carboxialquilo y grupos amida; cualquier R² puede unirse con cualquier otro de los R² formar parte de un anillo común; cualquier R² geminal puede combinarse para formar un carbonilo; y cualesquiera dos R² pueden combinarse para formar un resto insaturado fusionado sustituido o no sustituido; R³ es un alquilo C₁ a C₂₀ sustituido o no sustituido; R⁴ es hidrógeno o el resto Q_t-A, en donde: Q es un alquileno ramificado o no ramificado, t = 0 o 1 y A es un grupo aniónico seleccionado del grupo que consiste en OSO₃⁻, SO₃⁻, CO₂⁻, OCO₂⁻, OPO₃²⁻, OPO₃H y OPO₂; R⁵ es hidrógeno o el resto -CR¹¹R¹²-Y-G_b-Y_c-[(CR⁹R¹⁰)_y-O]_k-R⁸, en donde: cada Y se selecciona independientemente del grupo que consiste en O, S, N-H o N-R⁸; y cada R⁸ se selecciona independientemente del grupo que consiste en alquilo, arilo y heteroarilo, estando dichos restos sustituidos o no sustituidos, y si dichos restos sustituidos o no sustituidos tienen menos de 21 carbonos; cada G se selecciona independientemente del grupo que consiste en CO, SO₂, SO, PO y PO₂; R⁹ y R¹⁰ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H y alquilo C₁-C₄; R¹¹ y R¹² se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H y alquilo, o cuando se toman juntos pueden unirse para formar un carbonilo; b = 0 o 1; c puede = 0 o 1, pero c debe = 0 si b = 0; y es un número entero de 1 a 6; k es un entero de 0 a 20; R⁶ es H, o un resto alquilo, arilo o heteroarilo; dichos restos están sustituidos o no sustituidos; y X, si está presente, es un contraión de equilibrio de carga adecuado, preferiblemente X está presente cuando R⁴ es hidrógeno, los X adecuados incluyen pero no se limitan a: cloruro, bromuro, sulfato, metosulfato, sulfonato, p-toluensulfonato, fluoruro de boro y fosfato.

[0040] En una forma de realización de la presente invención, el catalizador de blanqueo tiene una estructura correspondiente a la siguiente fórmula general:



35
40

en donde R¹³ es un grupo alquilo ramificado que contiene de tres a 24 átomos de carbono (incluidos los átomos de carbono ramificados) o un grupo alquilo lineal que contiene de uno a 24 átomos de carbono; preferiblemente R¹³ es un grupo alquilo ramificado que contiene de ocho a 18 átomos de carbono o un grupo alquilo lineal que contiene de ocho a dieciocho átomos de carbono; preferiblemente R¹³ se selecciona del grupo que consiste en 2-propilheptilo, 2-butiloctilo, 2-pentilnonilo, 2-hexildecilo, n-dodecilo, n-tetradecilo, n-hexadecilo, n-octadecilo, iso-nonilo, iso-decilo, iso-tridecilo e isopentadecilo; preferiblemente R¹³ se selecciona del grupo que consiste en 2-butiloctilo, 2-pentilnonilo, 2-hexildecilo, iso-tridecilo e iso-pentadecilo.

45
50

[0041] Preferiblemente, el componente blanqueador comprende una fuente de perácido además del catalizador de blanqueo, particularmente catalizador de blanqueo orgánico. La fuente de perácido se puede seleccionar de (a) perácido preformado; (b) sal de percarbonato, perborato o persulfato (fuente de peróxido de hidrógeno) preferiblemente en combinación con un activador de blanqueo; y (c) enzima perhidrolasa y un éster para formar perácido *in situ* en presencia de agua en una etapa de tratamiento de textiles o de superficies duras.

[0042] Cuando está presente, el perácido y/o activador del blanqueo está generalmente presente en una composición en una cantidad de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 60% en peso, de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 40% en peso o incluso de aproximadamente 0,6 a aproximadamente 10% en peso basado

en la composición. Se pueden usar uno o más perácidos hidrófobos o precursores de los mismos en combinación con uno o más perácidos hidrófilos o precursores de los mismos.

[0043] Las cantidades de fuente de peróxido de hidrógeno y perácido o activador del blanqueo pueden seleccionarse de modo que la relación molar de oxígeno disponible (de la fuente de peróxido) a perácido sea de 1:1 a 35:1, o incluso de 2:1 a 10:1.

(6) Catalizadores de blanqueo que contienen metales: el componente blanqueador puede ser proporcionado por un complejo metálico catalítico. Un tipo de catalizador de blanqueo que contiene metal es un sistema catalizador que comprende un catión de metal de transición de actividad catalítica de blanqueo definida, como cobre, hierro, titanio, rutenio, tungsteno, molibdeno o manganeso, un catión de metal auxiliar que tiene poca o ninguna actividad catalítica de blanqueo, tal como cationes de zinc o aluminio, y un quelante que tiene constantes de estabilidad definidas para los cationes metálicos catalíticos y auxiliares, particularmente ácido etilendiaminotetraacético, ácido etilendiaminotetra(metilenfosfónico) y sus sales solubles en agua. Dichos catalizadores se describen en US4430243. Los catalizadores preferidos se describen en WO09/839406, US6218351 y WO00/012667. Se prefieren particularmente los catalizadores o ligandos de metales de transición que, por lo tanto, son ligandos donadores de N polidentados con puentes cruzados.

Si se desea, las composiciones de la presente invención pueden catalizarse por medio de un compuesto de manganeso. Dichos compuestos y niveles de uso son ampliamente conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, los catalizadores basados en manganeso descritos en US5576282.

[0044] Los catalizadores de blanqueo de cobalto útiles en este documento son conocidos y se describen, por ejemplo, en US5597936; US5595967. Tales catalizadores de cobalto se preparan fácilmente mediante procedimientos conocidos, como los que se enseñan, por ejemplo, en US5597936 y US5595967.

[0045] Las composiciones del presente documento también pueden incluir adecuadamente un complejo de metales de transición de ligandos tales como bispidonas (US7501389) y/o ligandos rígidos macropolicíclicos, abreviados como "LRM". Como cuestión práctica, y no a modo de limitación, las composiciones y procesos de la presente memoria pueden ajustarse para proporcionar alrededor de al menos una parte por cien millones de especies activas de LRM en el medio de lavado acuoso, y típicamente proporcionarán aproximadamente de 0,005 ppm a aproximadamente 25 ppm, de aproximadamente 0,05 ppm a aproximadamente 10 ppm, o incluso de aproximadamente 0,1 ppm a aproximadamente 5 ppm, del LRM en la solución de lavado.

[0046] Los metales de transición adecuados en el catalizador de blanqueo instantáneo de metal de transición incluyen, por ejemplo, manganeso, hierro y cromo. Los LRM adecuados incluyen 5,12-dietil-1,5,8,12-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecano. Los LRM de metales de transición adecuados se preparan fácilmente mediante procedimientos conocidos, como los que se enseñan, por ejemplo, en US6225464 y WO00/32601.

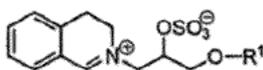
(7) Fotoblanqueadores: los fotoblanqueadores adecuados incluyen, por ejemplo, ftalocianina de zinc sulfonada, ftalocianinas de aluminio sulfonadas, tintes de xanteno y mezclas de los mismos; los componentes blanqueadores preferidos para usar en las presentes composiciones de la invención comprenden una fuente de peróxido de hidrógeno, activador de blanqueo y/o peroxiácido orgánico, opcionalmente generados *in situ* por la reacción de una fuente de peróxido de hidrógeno y un activador de blanqueo, en combinación con un catalizador de blanqueo. Los componentes blanqueadores preferidos comprenden catalizadores de blanqueo, preferiblemente catalizadores de blanqueo orgánicos, como se ha descrito anteriormente.

[0047] Los componentes blanqueadores particularmente preferidos son los catalizadores de blanqueo, en particular los catalizadores de blanqueo orgánicos.

[0048] Las composiciones pueden ser composiciones de limpieza y/o tratamiento sólidas o líquidas o una composición que tiene una forma de dosis unitaria de compartimento único o con múltiples compartimentos.

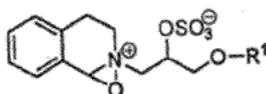
[0049] En una forma de realización, la variante tiene un rendimiento mejorado en presencia de un catalizador orgánico seleccionado del grupo que consiste en catalizadores orgánicos que tienen las siguientes fórmulas:

a)



Fórmula 1;

b)



Fórmula 2; o

c) mezclas de los mismos,

5 en donde cada R1 es independientemente un grupo alquilo ramificado que contiene de 3 a 24 carbonos o un grupo alquilo lineal que contiene de 1 a 24 carbonos.

10 [0050] En algunas formas de realización, R1 es independientemente un grupo alquilo ramificado que contiene de 8 a 18 carbonos o un grupo alquilo lineal que contiene de 8 a 18 carbonos. En algunas formas de realización, R1 se selecciona independientemente del grupo que consiste en 2-propilheptilo, 2-butiloctilo, 2-pentilnonilo, 2-hexildecilo, n-dodecilo, n-tetradecilo, n-hexadecilo, n-octadecilo, iso-nonilo, iso-decilo, iso-tridecilo e iso-pantadecilo. Preferiblemente, R1 se selecciona del grupo que consiste en 2-butiloctilo, 2-pentilnonilo, 2-hexildecilo, iso-tridecilo e iso-pantadecilo. Las variantes preferidas tienen un rendimiento mejorado en presencia de un catalizador de fórmula b) en donde R es 2-butiloctilo.

15 [0051] El catalizador orgánico se usa típicamente en una cantidad que proporciona 0,001-0,02 g de material activo por litro de solución de lavado o en una cantidad que proporciona de 0,01 a 4,5, de 0,5 a 4,0, de 1,0 a 3,5, de 1,5 a 3,0, o de 2,0 a 2,5 ppm de material activo por litro de agua de lavado.

20 [0052] En algunas formas de realización, una fuente de peroxiácidos orgánicos está presente como agente blanqueador. La fuente de peroxiácidos orgánicos puede ser un perácido preformado o un peróxido de diácilo, o puede comprender una fuente de peróxido de hidrógeno y un activador de blanqueo. Los agentes blanqueadores adecuados incluyen peróxidos de diácilo, activadores de blanqueo, peróxido de hidrógeno, fuentes de peróxido de hidrógeno, perácidos preformados y mezclas de los mismos.

25 [0053] En general, cuando se usa un agente blanqueador, las composiciones de la presente invención pueden comprender de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 50% o incluso de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 25% en peso de agente blanqueador de la composición de limpieza en cuestión. El agente blanqueador es típicamente una fuente de peroxiácidos orgánicos o una fuente de peróxígeno activado. Cuando está presente, el perácido y/o activador de blanqueo está generalmente presente en la composición en una cantidad de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 60% en peso, de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 40% en peso o incluso de aproximadamente 0,6 a aproximadamente 10% en peso basado en la composición. Se pueden usar uno o más perácidos hidrófobos o precursores de los mismos en combinación con uno o más perácidos hidrófilos o precursores de los mismos. Las cantidades de fuente de peróxido de hidrógeno y perácido o activador del blanqueo pueden seleccionarse de modo que la relación molar de oxígeno disponible (de la fuente de peróxido) a perácido sea de 1:1 a 35:1, o incluso de 2:1 a 10:1.

30 [0054] Con el fin de evaluar la estabilidad a la degradación oxidativa de la variante de lipasa, se determina el valor del rendimiento relativo (RPwash), es decir, el rendimiento de lavado (P) de la variante de lipasa que se va a evaluar, y se dividirá por el rendimiento de lavado de la lipasa de la SEQ ID NO: 2. De este modo $RP_{wash} = P$ (variante de la lipasa de la invención)/P(lipasa de la SEQ ID NO: 2). Las variantes de lipasa que tienen una estabilidad mejorada frente a la degradación oxidativa tendrán un valor de lavado RP al menos 1,01, preferiblemente al menos 1,1, o incluso al menos 1,5.

45 Lipasas progenitoras

[0055] La lipasa progenitora tiene una identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2 de al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o el 100 %, que tiene actividad lipasa. En un aspecto, la secuencia de aminoácidos del progenitor difiere en no más de 20 aminoácidos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20, del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2.

50 [0056] En otro aspecto, el progenitor comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º: 2. En otro aspecto, el progenitor comprende o consiste en el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2. En otro aspecto, el progenitor comprende o consiste en los aminoácidos 1 a 269 de la SEQ ID N.º: 2.

[0057] En otro aspecto, el progenitor es un fragmento del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2 que contiene al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al

menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, y al menos el 95 % del número de aminoácidos del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2.

[0058] En otra forma de realización, el progenitor es una variante alélica del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2.

[0059] En otra forma de realización, el progenitor se codifica por un polinucleótido que tiene una identidad de secuencia con la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 1 de al menos el 60 %, por ejemplo, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o el 100 %.

[0060] El polipéptido puede ser un polipéptido híbrido donde una región de un polipéptido se fusiona en el extremo N-terminal o el C-terminal de una región de otro polipéptido.

[0061] El progenitor puede ser un polipéptido de fusión o polipéptido de fusión escindible en el que otro polipéptido se fusiona en el N-terminal o el C-terminal del polipéptido de la presente invención. Un polipéptido de fusión se produce por fusión de un polinucleótido que codifica otro polipéptido a un polinucleótido de la presente invención. Las técnicas para producir polipéptidos de fusión se conocen en la técnica, como ligar las secuencias codificantes que codifican los polipéptidos de modo que estén en el marco y que la expresión del polipéptido de fusión esté bajo el control del mismo promotor (los mismos promotores) y terminador. Los polipéptidos de fusión también se pueden construir usando técnicas con inteína donde los polipéptidos de fusión se crean postraduccionalmente (Cooper y cols., 1993, EMBO J. 12: 2575-2583; Dawson y cols., 1994, Science 266: 776-779).

[0062] Un polipéptido de fusión puede comprender además un sitio de escisión entre los dos polipéptidos. Tras la secreción de la proteína de fusión, el sitio se escinde y libera los dos polipéptidos. Los ejemplos de sitios de escisión incluyen, pero de forma no limitativa, los sitios descritos en Martin y cols., 2003, J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 3: 568-576; Svetina y cols., 2000, J. Biotechnol. 76: 245-251; Rasmussen-Wilson y cols., 1997, Appl. Environ. Microbiol. 63: 3488-3493; Ward y cols., 1995, Biotechnology 13: 498-503; y Contreras y cols., 1991, Biotechnology 9: 378-381; Eaton y cols., 1986, Biochemistry 25: 505-512; Collins-Racie y cols., 1995, Biotechnology 13: 982-987; Carter y cols., 1989, Proteins: Structure, Function, and Genetics 6: 240-248; y Stevens, 2003, Drug Discovery World 4: 35-48.

[0063] El progenitor se puede obtener a partir de microorganismos de cualquier género. Para los fines de la presente invención, la expresión "obtener a partir de" como se utiliza en este documento en relación con una fuente dada significará que el progenitor codificado por un polinucleótido se produce por la fuente o por una cepa donde se ha insertado el polinucleótido de la fuente. En un aspecto, el progenitor se secreta extracelularmente.

[0064] El progenitor puede ser una lipasa bacteriana. Por ejemplo, el progenitor puede ser un polipéptido bacteriano grampositivo, tal como una lipasa de *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Geobacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Oceanobacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Streptomyces*, *Thermobifida fusca* alias *Thermonospora fusca* o un polipéptido bacteriano gramnegativo, tal como una lipasa de *Campylobacter*, *E. coli*, *Flavobacterium*, *Fusobacterium*, *Helicobacter*, *Ilyobacter*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, o *Ureaplasma*.

[0065] En un aspecto, el progenitor es una lipasa de *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* o *Bacillus thuringiensis*.

[0066] En otro aspecto, el progenitor es una lipasa de *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus uberis*, o *Streptococcus equi* subesp. *Zooepidemicus*.

[0067] En otro aspecto, el progenitor es una lipasa de *Streptomyces achromogenes*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces griseus*, o *Streptomyces lividans*.

[0068] El progenitor puede ser una lipasa fúngica. Por ejemplo, el progenitor puede ser una lipasa de levadura tal como una lipasa de *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, o *Yarrowia*; o una lipasa fúngica filamentosa tal como una lipasa de *Acremonium*, *Agaricus*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Botryosphaeria*, *Ceriporiopsis*, *Chaetomidium*, *Chrysosporium*, *Claviceps*, *Cochliobolus*, *Coprinopsis*, *Coptotermes*, *Corynascus*, *Cryphonectria*, *Cryptococcus*, *Diplodia*, *Exidia*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Holomastigotoides*, *Humicola*, *Irpex*, *Lentinula*, *Leptosphaeria*, *Magnaporthe*, *Melanocarpus*, *Meripilus*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomices*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Piromyces*, *Poitrasia*, *Pseudoplectania*, *Pseudotriconympha*, *Rhizomucor*, *Schizophyllum*, *Scytilidium*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolypocladium*, *Trichoderma*, *Trichophaea*, *Verticillium*, *Volvariella* o *Xylaria*.

[0069] En otro aspecto, el progenitor es una lipasa de *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis* o *Saccharomyces oviformis*.

5 [0070] En otro aspecto, el progenitor es una lipasa de *Acremonium cellulolyticus*, *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Chrysosporium inops*, *Chrysosporium keratinophilum*, *Chrysosporium lucknowense*, *Chrysosporium merdarium*, *Chrysosporium pannicola*, *Chrysosporium queenslandicum*, *Chrysosporium tropicum*, *Chrysosporium zonatum*, *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*,
 10 *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochroum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, *Fusarium venenatum*, *Humicola grisea*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Irpex lacteus*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium purpurogenum*, *Phanerochaete thermophilum*, *Thielavia achromatica*, *Thielavia albomyces*, *Thielavia albopilosa*, *Thielavia australeinsis*, *Thielavia fimeti*, *Thielavia microspora*, *Thielavia ovispora*, *Thielavia peruviana*, *Thielavia setosa*, *Thielavia spededonium*, *Thielavia subthermophila*, *Thielavia terrestris*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei* o *Trichoderma viride*.

20 [0071] En otro aspecto, el progenitor es una lipasa de *Humicola lanuginosa*, por ejemplo, la lipasa de la SEQ ID N.º: 2 o el polipéptido maduro de la misma.

[0072] Se entiende que, para las especies anteriormente mencionadas, la invención abarca tanto los estados perfectos como los imperfectos, y otros equivalentes taxonómicos, por ejemplo, anamorfos, independientemente del nombre de especie por el que se conocen. Expertos en la técnica reconocerán fácilmente la identidad de equivalentes apropiados.

[0073] Las cepas de estas especies son fácilmente accesibles al público en una serie de colecciones de cultivos, tales como la American Type Culture Collection (ATCC), la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), el Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS), y la Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center (NRRL).

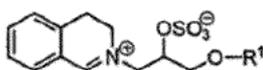
[0074] El progenitor se puede identificar y obtener a partir de otras fuentes que incluyen microorganismos aislados de la naturaleza, (por ejemplo, tierra, abonos, agua, etc.) o muestras de ADN obtenidas directamente de materiales naturales (por ejemplo, tierra, abonos, agua, etc.) utilizando las sondas anteriormente mencionadas. Las técnicas para el aislamiento de microorganismos y ADN directamente de hábitats naturales son ampliamente conocidas en la técnica. Un polinucleótido que codifica un progenitor se puede obtener entonces mediante un filtrado de forma similar de una biblioteca de ADN genómico o ADNc de otro microorganismo o muestra de ADN mezclado. Una vez que un polinucleótido que codifica un progenitor se ha detectado con la(s) sonda(s), el polinucleótido se puede aislar o clonar utilizando técnicas que son conocidas para los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook y cols., 1989, *supra*).

Preparación de variantes

45 [0075] La presente invención también se refiere a un método para obtener una variante de lipasa, que comprende introducir en una lipasa progenitora sustituciones correspondientes a:

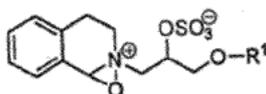
- a) G91A + D96G + T231R + N233R;
- b) T37R + N39R + G91A + D96G + T231 R + N233R;
- 50 c) G91A + D96G + G225R + T231R + N233R; o
- d) G91A + D96G + A150G + T231R + N233R del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2, en donde la variante es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 90% de identidad, pero menos del 100% con el polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2, tiene actividad lipasa y, en comparación con la lipasa progenitora, tiene un rendimiento mejorado en presencia de un catalizador orgánico seleccionado del grupo que
 55 consiste en catalizadores orgánicos que tienen las siguientes fórmulas:

a)



Fórmula 1;

b)



Fórmula 2; o

c) mezclas de los mismos,

5 en donde cada R1 es independientemente un grupo alquilo ramificado que contiene de 3 a 24 carbonos o un grupo alquilo lineal que contiene de 1 a 24 carbonos; y recuperar la variante.

10 [0076] En algunas formas de realización, la invención se refiere a un método en el que R1 es independientemente un grupo alquilo ramificado que contiene de 8 a 18 carbonos o un grupo alquilo lineal que contiene de 8 a 18 carbonos.

15 [0077] En algunas formas de realización, la invención se refiere a un método en el que R1 se selecciona independientemente del grupo que consiste en 2-propilheptilo, 2-butiloctilo, 2-pentilnonilo, 2-hexildecilo, n-dodecilo, n-tetradecilo, n-hexadecilo, n-octadecilo, iso-nonilo, iso-decilo, iso-tridecilo e iso-pantadecilo. Preferiblemente, R1 se selecciona del grupo que consiste en 2-butiloctilo, 2-pentilnonilo, 2-hexildecilo, iso-tridecilo e iso-pantadecilo.

20 [0078] El catalizador orgánico se usa típicamente en una cantidad que proporciona 0,001-0,02 g de material activo por litro de solución de lavado o en una cantidad que proporciona de 0,01 a 4,5, de 0,5 a 4,0, de 1,0 a 3,5, de 1,5 a 3,0, o de 2,0 a 2,5 ppm de material activo por litro de agua de lavado.

25 [0079] En algunas formas de realización, la invención se refiere a un método en el que una fuente de peroxiácidos orgánicos está presente como agente blanqueador. La fuente de peroxiácidos orgánicos puede ser un perácido preformado o un peróxido de diacilo, o puede comprender una fuente de peróxido de hidrógeno y un activador del blanqueo.

30 [0080] Los agentes blanqueadores adecuados incluyen peróxidos de diacilo, activadores de blanqueo, peróxido de hidrógeno, fuentes de peróxido de hidrógeno, perácidos preformados y mezclas de los mismos.

35 [0081] En general, cuando se usa un agente blanqueador, las composiciones de la presente invención pueden comprender de aproximadamente el 0,1% a aproximadamente el 50% o incluso de aproximadamente el 0,1% a aproximadamente el 25% en peso de agente blanqueador sobre el peso de la composición de limpieza en cuestión. El agente blanqueador es típicamente una fuente de peroxiácidos orgánicos o una fuente de peroxígeno activado.

40 [0082] Cuando está presente, el perácido y/o el activador del blanqueo está generalmente presente en la composición en una cantidad de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 60% en peso, de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 40% en peso o incluso de aproximadamente 0,6 a aproximadamente 10% en peso basado en la composición. Se pueden usar uno o más perácidos hidrófobos o precursores de los mismos en combinación con uno o más perácidos hidrófilos o precursores de los mismos.

45 [0083] Las cantidades de fuente de peróxido de hidrógeno y perácido o activador del blanqueo pueden seleccionarse de modo que la relación molar de oxígeno disponible (de la fuente de peróxido) a perácido sea de 1:1 a 35:1, o incluso de 2:1 a 10:1.

50 [0084] En algunas formas de realización, la invención se refiere a un método en el que la lipasa progenitora comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 60% de identidad con el polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2; consiste en la secuencia de aminoácidos del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2, o un fragmento del mismo que tiene actividad lipasa.

55 [0085] Las variantes pueden prepararse usando cualquier procedimiento de mutagénesis conocido en la técnica, tal como mutagénesis dirigida, construcción génica sintética, construcción génica semisintética, mutagénesis aleatoria, barajado, etc.

[0086] La mutagénesis dirigida es una técnica en la que se introducen una o más (por ejemplo, varias) mutaciones en uno o más sitios definidos en un polinucleótido que codifica el progenitor.

[0087] La mutagénesis dirigida se puede lograr *in vitro* por PCR con el uso de cebadores oligonucleotídicos que contienen la mutación deseada. La mutagénesis dirigida también se puede realizar *in vitro* por mutagénesis en cassette, que implica la escisión por una enzima de restricción en un sitio en el plásmido que comprende un polinucleótido que codifica el progenitor y la posterior ligadura de un oligonucleótido que contiene la mutación en

el polinucleótido. Por lo general, la enzima de restricción que digiere el plásmido y el oligonucleótido es la misma, lo que permite que los extremos adhesivos del plásmido y el inserto se unan entre sí. Véase, por ejemplo, Scherer y Davis, 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 76: 4949-4955; y Barton y cols., 1990, Nucleic Acids Res. 18: 7349-4966.

5 [0088] La mutagénesis dirigida también se puede lograr *in vivo* por métodos conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º 2004/0171154; Storici y cols., 2001, Nature Biotechnol. 19: 773-776; Kren y cols., 1998, Nat. Med. 4: 285-290; y Calissano y Macino, 1996, Fungal Genet. Newslett 43: 15-16.

10 [0089] Se puede usar cualquier procedimiento de mutagénesis dirigida en la presente invención. Hay muchos kits comerciales disponibles que se pueden usar para preparar variantes.

15 [0090] La construcción génica sintética implica la síntesis *in vitro* de una molécula polinucleotídica diseñada para codificar un polipéptido de interés. La síntesis génica se puede realizar utilizando una serie de técnicas, como la tecnología basada en microchips multiplex descrita por Tian y cols. (2004, Nature 432: 1050-1054) y tecnologías similares en las que los oligonucleótidos se sintetizan y ensamblan sobre chips microfluídicos fotoprogramables.

20 [0091] Las sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos simples o múltiples se pueden realizar y probar utilizando métodos conocidos de mutagénesis, recombinación y/o barajado, seguidos de un procedimiento de detección relevante, como los descritos por Reidhaar-Olson y Sauer, 1988, Science 241: 53-57; Bowie y Sauer, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 86: 2152-2156; WO 95/17413; o WO 95/22625. Otros métodos que pueden usarse incluyen PCR propensa a errores, visualización de fagos (por ejemplo, Lowman y cols., 1991, Biochemistry 30: 10832-10837; patente de EE. UU. n.º 5,223,409; WO 92/06204) y mutagénesis dirigida (Derbyshire y cols., 1986, Gene 46: 145; Ner y cols., 1988, DNA 7: 127).

25 [0092] Los métodos de mutagénesis/barajado se pueden combinar con métodos de cribado automatizados de alto rendimiento para detectar la actividad de polipéptidos mutagenizados clonados expresados por células hospedadoras (Ness y cols., 1999, Nature Biotechnology 17: 893-896). Las moléculas de ADN mutagenizadas que codifican polipéptidos activos pueden recuperarse de las células hospedadoras y secuenciarse rápidamente usando métodos estándar en la técnica. Estos métodos permiten la determinación rápida de la importancia de los residuos de aminoácidos individuales en un polipéptido.

30 [0093] La construcción de genes semisintéticos se logra combinando aspectos de la construcción génica sintética, y/o mutagénesis dirigida, y/o mutagénesis aleatoria, y/o barajado. La construcción semisintética se caracteriza por un proceso que utiliza fragmentos de polinucleótidos que se sintetizan, en combinación con técnicas de PCR. De este modo, se pueden sintetizar regiones definidas de genes *de novo* mientras que otras regiones pueden amplificarse usando cebadores mutagénicos específicos para el sitio, mientras que otras regiones pueden estar sujetas a amplificación por PCR propensa a errores o PCR no propensa a errores. Las subsecuencias de polinucleótidos pueden entonces someterse a barajado.

Polinucleótidos

35 [0094] La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados que codifican una variante de la presente invención.

Construcciones de ácidos nucleicos

40 [0095] La presente invención también se refiere a construcciones de ácidos nucleicos que comprenden un polinucleótido que codifica una variante de la presente invención unida operativamente a una o más secuencias de control que dirigen la expresión de la secuencia de codificación en una célula hospedadora adecuada en condiciones compatibles con las secuencias de control.

45 [0096] El polinucleótido puede manipularse de varias maneras para proporcionar la expresión de una variante. La manipulación del polinucleótido antes de su inserción en un vector puede ser deseable o necesaria dependiendo del vector de expresión. Las técnicas para modificar polinucleótidos utilizando métodos de ADN recombinante son ampliamente conocidas en la técnica.

50 [0097] La secuencia de control puede ser un promotor, un polinucleótido que es reconocido por una célula hospedadora para la expresión del polinucleótido. El promotor contiene secuencias de control transcripcional que median en la expresión de la variante. El promotor puede ser cualquier polinucleótido que muestre actividad transcripcional en la célula hospedadora, incluidos los promotores mutantes, truncados e híbridos, y puede obtenerse a partir de genes que codifican polipéptidos extracelulares o intracelulares, ya sean homólogos o heterólogos a la célula hospedadora.

55

[0098] Algunos ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de las construcciones de ácidos nucleicos de la presente invención en una célula hospedadora bacteriana son los promotores obtenidos a partir del gen de alfa-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* (*amyQ*), gen de alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (*amyL*), gen de penicilinas de *Bacillus licheniformis* (*penP*), gen de amilasa maltogénica de *Bacillus stearothermophilus* (*amyM*), gen de levansacarosa *Bacillus subtilis* (*sacB*), los genes *xylA* y *xylB* de *Bacillus subtilis*, el gen *cryIIIA* de *Bacillus thuringiensis* (Agaisse y Lereclus, 1994, Molecular Microbiology 13: 97-107), el operón *lac* de *E. coli* y el promotor *trc* de *E. coli* (Egon y cols., 1988, Gene 69: 301-315), el gen de agarasa de *Streptomyces coelicolor* (*dagA*), y el gen de beta-lactamasa procarionta (Villa-Kamaroff y cols., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 75: 3727-3731), así como el promotor *tac* (DeBoer y cols., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 80: 21-25) Otros promotores se describen en "Useful proteins from recombinant bacteria" en Gilbert y cols., 1980, Scientific American 242: 74-94; y en Sambrook y cols., 1989, *supra*. Algunos ejemplos de promotores en tándem se describen en WO 99/43835.

[0099] Algunos ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de las construcciones de ácidos nucleicos de la presente invención en una célula hospedadora filamentosa fúngica son los promotores obtenidos a partir de los genes para acetamidasa de *Aspergillus nidulans*, alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger*, alfa-amilasa estable en ácido de *Aspergillus niger*, glucoamilasa de *Aspergillus niger* o *Aspergillus awamori* (*glaA*), TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, proteasa alcalina de *Aspergillus oryzae*, triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae*, proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum* WO 96/00787), amiloglucosidasa de *Fusarium venenatum* (WO 00/56900), Daria de *Fusarium venenatum*(WO 00/56900), Quinn de *Fusarium venenatum* (WO 00/56900), lipasa de *Rhizomucor miehei*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, beta-glucosidasa de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa I de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa III de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa IV de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa V de *Trichoderma reesei*, xilanasa I de *Trichoderma reesei*, xilanasa II de *Trichoderma reesei*, beta-xilosidasa de *Trichoderma reesei*, así como el promotor NA2-tpi (un promotor modificado de un gen de alfa-amilasa neutra de *Aspergillus* en el que el líder no traducido ha sido reemplazado por un líder no traducido de un gen de triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus*; entre los ejemplos no limitantes se incluyen promotores modificados de un gen de alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger* en el que el líder no traducido ha sido reemplazado por un líder no traducido de un gen de triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus oryzae*); y promotores mutantes, truncados e híbridos de los mismos.

[0100] En un hospedador de levadura, se obtienen promotores útiles a partir de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ENO-1), galactocinasa de *Saccharomyces cerevisiae* (GAL1), alcohol deshidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ADH1, ADH2/GAP), triosa fosfato isomerasa de *Saccharomyces cerevisiae* (TPI), metalotioneína de *Saccharomyces cerevisiae* (CUP1), y 3-fosfoglicerato quinasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros promotores útiles para células hospedadoras de levadura se describen en Romanos y cols., 1992, Yeast 8: 423-488.

[0101] La secuencia de control también puede ser un terminador de transcripción, que es reconocido por una célula hospedadora para terminar la transcripción. La secuencia del terminador está operativamente unida al extremo 3' del polinucleótido que codifica la variante. Se puede usar cualquier terminador que sea funcional en la célula hospedadora.

[0102] Los terminadores preferidos para las células hospedadoras bacterianas se obtienen a partir de los genes para proteasa alcalina de *Bacillus clausii* (*aprH*), alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (*amyL*) y ARN ribosómico de *Escherichia coli* (*rnbB*).

[0103] Los terminadores preferidos para células hospedadoras de hongos filamentosos se obtienen a partir de los genes para antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger*, TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, y proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum*.

[0104] Los terminadores preferidos para células hospedadoras de levadura se obtienen a partir de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae*, citocromo C de *Saccharomyces cerevisiae* (CYC1), y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Romanos y cols., 1992, *supra* describen otros terminadores útiles para células hospedadoras de levadura.

[0105] La secuencia de control también puede ser una región estabilizadora de ARNm en dirección hacia el extremo 3' respecto de un promotor y en dirección hacia el extremo 5' respecto de la secuencia de codificación de un gen que aumenta la expresión del gen.

[0106] Se obtienen ejemplos de regiones estabilizadoras de ARNm adecuadas a partir de un gen *cryIIIA* de *Bacillus thuringiensis* (WO 94/25612) y un gen SP82 de *Bacillus subtilis* (Hue y cols., 1995, Journal of Bacteriology 177: 3465-3471).

65

[0107] La secuencia de control también puede ser un líder, una región no traducida de un ARNm que es importante para la traducción por la célula hospedadora. La secuencia líder está operativamente unida al extremo 5' del polinucleótido que codifica la variante. Se puede usar cualquier líder que sea funcional en la célula hospedadora.

5 [0108] Los líderes preferidos para células hospedadoras de hongos filamentosos se obtienen a partir de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae* y triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans*.

10 [0109] Los líderes adecuados para las células hospedadoras de levadura se obtienen a partir de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ENO-1), 3-fosfoglicerato quinasa de *Saccharomyces cerevisiae*, factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae* y alcohol deshidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ADH2/GAP).

15 [0110] La secuencia de control también puede ser una secuencia de poliadenilación, una secuencia operativamente unida al extremo 3' de la secuencia que codifica la variante y, cuando se transcribe, es reconocida por la célula hospedadora como una señal para agregar residuos de poliadenosina al ARNm transcrito. Se puede usar cualquier secuencia de poliadenilación que sea funcional en la célula hospedadora.

20 [0111] Las secuencias de poliadenilación preferidas para células hospedadoras fúngicas filamentosas se obtienen a partir de los genes para antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger*, TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, y proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum*.

25 [0112] Las secuencias de poliadenilación útiles para células hospedadoras de levadura se describen mediante Guo y Sherman, 1995, Mol. Cellular Biol. 15: 5983-5990.

30 [0113] La secuencia de control también puede ser una región de codificación de péptido señal que codifica un péptido señal unido al extremo N terminal de una variante y dirige la variante hacia la vía secretora de la célula. El extremo 5' de la secuencia de codificación del polinucleótido puede contener inherentemente una secuencia de codificación de péptido señal unida de forma natural en el marco de lectura de traducción con el segmento de la secuencia de codificación que codifica la variante. Alternativamente, el extremo 5' de la secuencia de codificación puede contener una secuencia de codificación de péptido señal que es exógena a la secuencia de codificación. Puede requerirse una secuencia codificante de péptido señal exógena cuando la secuencia codificante no contiene naturalmente una secuencia codificante de péptido señal. Alternativamente, una secuencia codificante de péptido señal exógena puede simplemente reemplazar la secuencia codificante de péptido señal natural para mejorar la secreción de la variante. Sin embargo, puede usarse cualquier secuencia de codificación de péptido señal que dirija la variante expresada hacia la ruta secretora de una célula hospedadora.

40 [0114] Las secuencias de codificación de péptidos señal eficaces para células hospedadoras bacterianas son las secuencias de codificación de péptidos señal obtenidas a partir de los genes para amilasa maltogénica de *Bacillus* NCIB 11837, subtilisina de *Bacillus licheniformis*, beta-lactamasa de *Bacillus licheniformis*, alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, proteasas neutras de *Bacillus stearothermophilus* (*nprT*, *nprS*, *nprM*) y *prsA* de *Bacillus subtilis*. Otros péptidos señal son descritos por Simonen y Palva, 1993, Microbiological Reviews 57: 109-137.

45 [0115] Las secuencias de codificación de péptidos señal efectivas para células hospedadoras fúngicas filamentosas son las secuencias de codificación de péptidos señal obtenidas a partir de los genes para amilasa neutra de *Aspergillus niger*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, celulasa de *Humicola insolens*, endoglucanasa V de *Humicola insolens*, lipasa de *Humicola lanuginosa* y proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*.

50 [0116] Los péptidos señal útiles para células hospedadoras de levadura se obtienen a partir de los genes para factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae* e invertasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otras secuencias útiles de codificación de péptidos señal se describen en Romanos y cols. 1992, *supra*.

55 [0117] La secuencia de control también puede ser una secuencia de codificación de propéptido que codifica un propéptido colocado en el extremo N terminal de una variante. El polipéptido resultante se conoce como proenzima o polipéptido (o zimógeno en algunos casos). Un propolipéptido generalmente está inactivo y puede convertirse en un polipéptido activo mediante escisión catalítica o autocatalítica del propéptido del propolipéptido. La secuencia codificante del propéptido se puede obtener a partir de los genes para proteasa alcalina de *Bacillus subtilis* (*aprE*), proteasa neutra de *Bacillus subtilis* (*nprT*), lacasa de *Myceliophthora thermophila* (WO 95/33836), proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, y factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae*.

60 [0118] Cuando están presentes tanto el péptido señal como las secuencias de propéptido, la secuencia del propéptido se coloca junto al extremo N terminal de la variante y la secuencia del péptido señal se coloca junto al extremo N terminal de la secuencia del propéptido.

65

[0119] También puede ser deseable agregar secuencias reguladoras que regulen la expresión de la variante en relación con el crecimiento de la célula hospedadora. Algunos ejemplos de sistemas reguladores son aquellos que hacen que la expresión del gen se active o desactive en respuesta a un estímulo químico o físico, incluida la presencia de un compuesto regulador. Los sistemas reguladores en los sistemas procariotas incluyen los sistemas de operón *lac*, *tac* y *trp*. En el caso de levaduras, se puede usar el sistema ADH2 o el sistema GAL1. Para hongos filamentosos, se puede usar el promotor de glucoamilasa de *Aspergillus niger*, promotor de TAKA alfa-amilasa de *Aspergillus oryzae*, y el promotor de glucoamilasa de *Aspergillus oryzae*. Otros ejemplos de secuencias reguladoras son aquellas que permiten la amplificación de genes. En los sistemas eucariotas, estas secuencias reguladoras incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa que se amplifica en presencia de metotrexato y los genes de metalotioneína que se amplifican con metales pesados. En estos casos, el polinucleótido que codifica la variante estaría operativamente unido a la secuencia reguladora.

Vectores de expresión

[0120] La presente invención también se refiere a vectores de expresión recombinantes que comprenden un polinucleótido que codifica una variante de la presente invención, un promotor y señales de parada transcripcionales y traduccionales. Las diversas secuencias de nucleótidos y de control pueden unirse para producir un vector de expresión recombinante que puede incluir uno o más sitios de restricción convenientes para permitir la inserción o sustitución del polinucleótido que codifica la variante en dichos sitios. Alternativamente, el polinucleótido puede expresarse insertando el polinucleótido o una construcción de ácido nucleico que comprende el polinucleótido en un vector apropiado para la expresión. Al crear el vector de expresión, la secuencia de codificación se ubica en el vector de modo que la secuencia de codificación se une operativamente con las secuencias de control apropiadas para la expresión.

[0121] El vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector (por ejemplo, un plásmido o virus) capaz de someterse convenientemente a procedimientos de ADN recombinante y de provocar la expresión del polinucleótido. La elección del vector dependerá típicamente de la compatibilidad del vector con la célula hospedadora en la que se va a introducir el vector. El vector puede ser un plásmido circular lineal o cerrado.

[0122] El vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido, un elemento extracromosómico, un minicromosoma o un cromosoma artificial. El vector puede contener cualquier medio para asegurar la autorreplicación. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en la célula hospedadora, se integra en el genoma y se replica junto con el/los cromosoma(s) en el/los que se ha integrado. Además, se puede usar un solo vector o plásmido o dos o más vectores o plásmidos que juntos contienen el ADN total para introducir en el genoma de la célula hospedadora, o un transposón.

[0123] El vector contiene preferiblemente uno o más marcadores seleccionables que permiten una fácil selección de células transformadas, transfectadas, transducidas o similares. Un marcador seleccionable es un gen cuyo producto proporciona resistencia a biocidas o virales, resistencia a metales pesados, prototrofia a auxótrofos y similares.

[0124] Algunos ejemplos de marcadores bacterianos seleccionables son los genes *dal* de *Bacillus licheniformis* o *Bacillus subtilis* o marcadores que confieren resistencia a los antibióticos, como por ejemplo resistencia a ampicilina, cloranfenicol, kanamicina, neomicina, espectinomina o tetraciclina. Los marcadores adecuados para las células hospedadoras de levadura incluyen, entre otros, ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1 y URA3. Los marcadores seleccionables para su uso en una célula hospedadora filamentosa fúngica incluyen, pero no se limitan a, *amdS* (acetamidasa), *argB* (ornitina carbamoiltransferasa), *bar* (fosfinotricina acetiltransferasa), *hph* (higromicina fosfotransferasa), *niaD* (nitrato reductasa), *pyrG* (orotidina-5'-fosfato descarboxilasa), *sC* (adeniltransferasa sulfato) y *trpC* (antranilato sintasa), así como sus equivalentes. Para su uso en una célula de *Aspergillus* se prefieren los genes *amdS* y *pyrG* de *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus oryzae* y un gen *bar* de *Streptomyces hygroscopicus*.

[0125] El vector contiene preferiblemente un elemento o elementos que permite(n) la integración del vector en el genoma de la célula hospedadora o la replicación autónoma del vector en la célula independiente del genoma.

[0126] Para la integración en el genoma de la célula hospedadora, el vector puede confiar en la secuencia del polinucleótido que codifica la variante o cualquier otro elemento del vector para la integración en el genoma mediante recombinación homóloga o no homóloga. Alternativamente, el vector puede contener polinucleótidos adicionales para dirigir la integración por recombinación homóloga en el genoma de la célula hospedadora en una(s) ubicación(es) precisa(s) en el/los cromosoma(s). Para aumentar la probabilidad de integración en una ubicación precisa, los elementos de integración deben contener un número suficiente de ácidos nucleicos, como de 100 a 10 000 pares de bases, de 400 a 10 000 pares de bases y de 800 a 10 000 pares de bases, que tienen un alto grado de identidad de secuencia con la secuencia de destino correspondiente para mejorar la probabilidad de recombinación homóloga. Los elementos integracionales pueden ser cualquier secuencia que sea homóloga con la secuencia de destino en el genoma de la célula hospedadora. Además, los elementos integracionales

pueden ser polinucleótidos no codificantes o codificadores. Por otro lado, el vector puede integrarse en el genoma de la célula hospedadora por recombinación no homóloga.

5 [0127] Para la replicación autónoma, el vector puede comprender además un origen de replicación que permite que el vector se replique de forma autónoma en la célula hospedadora en cuestión. El origen de replicación puede ser cualquier replicador de plásmidos que medie la replicación autónoma que funciona en una célula. El término "origen de replicación" o "replicador de plásmidos" significa un polinucleótido que permite que un plásmido o vector se replique *in vivo*.

10 [0128] Algunos ejemplos de orígenes de replicación bacterianos son los orígenes de replicación de los plásmidos pBR322, pUC19, pACYC177 y pACYC184 que permiten la replicación en *E. coli*, y pUB110, pE194, pTA1060 y pAMβ1 que permiten la replicación en *Bacillus*.

15 [0129] Algunos ejemplos de orígenes de replicación para usar en una célula hospedadora de levadura son el origen de replicación de 2 micras, ARS1, ARS4, la combinación de ARS1 y CEN3, y la combinación de ARS4 y CEN6.

20 [0130] Algunos ejemplos de orígenes de replicación útiles en una célula fúngica filamentosa son AMA1 y ANS1 (Gems y cols., 1991, Gene 98: 61-67; Cullen y cols., 1987, Nucleic Acids Res. 15: 9163-9175; WO 00/24883) El aislamiento del gen AMA1 y la construcción de plásmidos o vectores que comprenden el gen pueden realizarse de acuerdo con los métodos descritos en WO 00/24883.

25 [0131] Se puede insertar más de una copia de un polinucleótido de la presente invención en una célula hospedadora para aumentar la producción de una variante. Se puede obtener un aumento en el número de copias del polinucleótido integrando al menos una copia adicional de la secuencia en el genoma de la célula hospedadora o incluyendo un gen marcador amplificable seleccionable con el polinucleótido donde las células que contienen copias amplificadas del gen marcador seleccionable, y de este modo, se pueden seleccionar copias adicionales del polinucleótido cultivando las células en presencia del agente seleccionable apropiado.

30 [0132] Los procedimientos utilizados para ligar los elementos descritos anteriormente para construir los vectores de expresión recombinantes de la presente invención son ampliamente conocidos por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Sambrook y cols. 1989, *supra*).

Células hospedadoras

35 [0133] La presente invención también se refiere a células hospedadoras recombinantes, que comprenden un polinucleótido que codifica una variante de la presente invención unido operativamente a una o más secuencias de control que dirigen la producción de una variante de la presente invención. Una construcción o vector que comprende un polinucleótido se introduce en una célula hospedadora de modo que la construcción o el vector se mantenga como un integrante cromosómico o como un vector extracromosómico autorreplicante como se ha descrito anteriormente. El término "célula hospedadora" abarca cualquier progenie de una célula progenitora que no sea idéntica a la célula progenitora debido a mutaciones que ocurren durante la replicación. La elección de una célula hospedadora dependerá en gran medida del gen que codifica la variante y su fuente.

45 [0134] La célula hospedadora puede ser cualquier célula útil en la producción recombinante de una variante, por ejemplo, procariota o eucariota.

50 [0135] La célula hospedadora procariota puede ser cualquier bacteria grampositiva o gramnegativa. Las bacterias grampositivas incluyen, pero no se limitan a, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Geobacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Oceanobacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, y *Streptomyces* Las bacterias gramnegativas incluyen, pero no se limitan a, *Campylobacter*, *E. coli*, *Flavobacterium*, *Fusobacterium*, *Helicobacter*, *Ilyobacter*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, y *Ureaplasma*

55 [0136] La célula hospedadora bacteriana puede ser cualquier célula de *Bacillus*, incluyendo, pero sin limitarse a, células de *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus turingiensis*.

60 [0137] La célula hospedadora bacteriana también puede ser cualquier célula de *Streptococcus* incluyendo, pero sin limitarse a, células de *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus uberis*, y *Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus*.

[0138] La célula hospedadora bacteriana también puede ser cualquier célula de *Streptomyces* incluyendo, pero sin limitarse a, células de *Streptomyces achromogenes*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces griseus*, y *Streptomyces lividans*.

65

- [0139] La introducción de ADN en una célula de *Bacillus* puede verse afectada por la transformación de protoplastos (véase, por ejemplo, Chang y Cohen, 1979, Mol. Gen. Genet. 168: 111-115), transformación celular competente (véase, por ejemplo, Young y Spizizen, 1961, J. Bacteriol. 81: 823-829o Dubnau y Davidoff-Abelson, 1971, J. Mol. Biol. 56: 209-221), electroporación (véase, por ejemplo, Shigekawa y Dower, 1988, Biotechniques 6: 742-751), o conjugación (véase, por ejemplo, Koehler y Thorne, 1987, J. Bacteriol. 169: 5271-5278). La introducción de ADN en una célula de *E. coli* puede verse afectada por la transformación de protoplastos (véase, por ejemplo, Hanahan, 1983, J. Mol. Biol. 166: 557-580) o electroporación (véase, por ejemplo, Dower y cols., 1988, Nucleic Acids Res. 16: 6127-6145) La introducción de ADN en una célula de *Streptomyces* puede verse afectada por la transformación de protoplastos, electroporación (véase, por ejemplo, Gong y cols., 2004, Folia Microbiol. (Praga) 49: 399-405), conjugación (véase, por ejemplo, Mazodier y cols., 1989, J. Bacteriol. 171: 3583-3585), o transducción (véase, por ejemplo, Burke y cols., 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 98: 6289-6294) La introducción de ADN en una célula de *Pseudomonas* puede verse afectada por electroporación (véase, por ejemplo, Choi y cols., 2006, J. Microbiol. Métodos 64: 391-397), o conjugación (véase, por ejemplo, Pinedo y Smets, 2005, Appl. Reinar. Microbiol 71: 51-57) La introducción del ADN en una célula de *Streptococcus* puede verse afectada por la competencia natural (véase, por ejemplo, Perry y Kuramitsu, 1981, Infect. Immun 32: 1295-1297), transformación de protoplastos (véase, por ejemplo, Catt y Jollick, 1991, Microbios 68: 189-207), electroporación (véase, por ejemplo, Buckley y cols., 1999, Appl. Reinar. Microbiol 65: 3800-3804) o conjugación (véase, por ejemplo, Clewell, 1981, Microbiol. Rev. 45: 409-436) Sin embargo, puede usarse cualquier método conocido en la técnica para introducir ADN en una célula hospedadora.
- [0140] La célula hospedadora también puede ser una célula eucariota, como una célula de mamífero, insecto, planta u hongo.
- [0141] La célula hospedadora puede ser una célula fúngica. "Hongos", como se usa en el presente documento, incluye los filos Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota y Zygomycota, así como los Oomycota y todos los hongos mitospóricos (según lo definido por Hawksworth y cols., En, Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi, octava edición, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, Reino Unido.).
- [0142] La célula hospedadora fúngica puede ser una célula de levadura. "Levadura", como se usa en el presente documento, incluye levadura ascospórogeas (Endomycetales), levaduras basidiosporógeas y levaduras pertenecientes a los Hongos Imperfectos (Blastomycetes). Dado que la clasificación de la levadura puede cambiar en el futuro, para los fines de esta invención, la levadura se definirá como se describe en Biology and Activities of Yeast (Skinner, Passmore y Davenport, editores, Soc. App. Bacteriol. Symposium Series No. 9, 1980).
- [0143] La célula hospedadora de levadura puede ser una célula de *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, o *Yarrowia*, por ejemplo una célula de *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis*, *Saccharomyces oviformis*, o *Yarrowia lipolytica*.
- [0144] La célula hospedadora fúngica puede ser una célula fúngica filamentosa. Los "hongos filamentosos" incluyen todas las formas filamentosas de la subdivisión Eumycota y Oomycota (según lo definido por Hawksworth y cols. 1995, *supra*). Los hongos filamentosos se caracterizan generalmente por una pared micelial compuesta de quitina, celulosa, glucano, quitosano, manano y otros polisacáridos complejos. El crecimiento vegetativo es por alargamiento hifal y el catabolismo del carbono es obligatoriamente aeróbico. En contraste, el crecimiento vegetativo de levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* es por gemación de un tallo unicelular y el catabolismo del carbono puede ser fermentativo.
- [0145] La célula hospedadora fúngica filamentosa puede ser una célula de *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Bjerkandera*, *Ceriporiopsis*, *Chrysosporium*, *Coprinus*, *Coriolus*, *Cryptococcus*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Phlebia*, *Piromyces*, *Pleurotus*, *Schizophyllum*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolypocladium*, *Trametes* o *Trichoderma*.
- [0146] Por ejemplo, la célula hospedadora filamentosa fúngica puede ser una célula de *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Bjerkandera adusta*, *Ceriporiopsis aneirina*, *Ceriporiopsis caregiea*, *Ceriporiopsis gilvescens*, *Ceriporiopsis pannocinta*, *Ceriporiopsis rivulosa*, *Ceriporiopsis subrufa*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Chrysosporium inops*, *Chrysosporium keratinophilum*, *Chrysosporium lucknowense*, *Chrysosporium merdarium*, *Chrysosporium pannicola*, *Chrysosporium queenslandicum*, *Chrysosporium tropicum*, *Chrysosporium zonatum*, *Coprinus cinereus*, *Coriolus hirsutus*, *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochroum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, *Fusarium venenatum*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium purpurogenum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia radiata*, *Pleurotus eryngii*, *Thielavia*

terrestris, Trametes villosa, Trametes versicolor, Trichoderma harzianum, Trichoderma koningii, Trichoderma longibrachiatum, Trichoderma reesei o Trichoderma viride.

[0147] Las células fúngicas pueden transformarse mediante un proceso que implica la formación de protoplastos, la transformación de los protoplastos y la regeneración de la pared celular de una manera conocida de por sí. Procedimientos adecuados para la transformación de células hospedadoras de *Aspergillus* y *Trichoderma* se describen en la EP 238023, Yelton y cols., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 81: 1470-1474 y Christensen y cols., 1988, Bio/Technology 6: 1419-1422. Unos métodos adecuados para transformar especies de *Fusarium* son descritos por Malardier y cols., 1989, Gene 78: 147-156 y WO 96/00787. La levadura puede transformarse usando los procedimientos descritos por Becker y Guarente, en Abelson, J.N. y Simon, M.I., editores, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, Volumen 194, pp 182-187, Academic Press, Inc., Nueva York; Ito y cols., 1983, J. Bacteriol. 153: 163; y Hinnen y cols., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 75: 1920.

15 **Métodos de producción**

[0148] La presente invención también se refiere a métodos para producir una variante, que comprende: (a) cultivar una célula hospedadora de la presente invención en condiciones adecuadas para la expresión de la variante; y (b) recuperar la variante.

[0149] Las células hospedadoras se cultivan en un medio nutritivo adecuado para la producción de la variante utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la célula puede cultivarse mediante cultivo en matraz con agitación, o fermentación a pequeña o gran escala (incluidas fermentaciones continuas, discontinuas, discontinuas o de estado sólido) en fermentadores de laboratorio o industriales realizados en un medio adecuado y en condiciones permitiendo que la variante sea expresada y/o aislada. El cultivo se lleva a cabo en un medio nutritivo adecuado que comprende fuentes de carbono y nitrógeno y sales inorgánicas, utilizando procedimientos conocidos en la técnica. Los medios adecuados están disponibles de proveedores comerciales o pueden prepararse de acuerdo con las composiciones publicadas (por ejemplo, en catálogos de la American Type Culture Collection). Si la variante se secreta en el medio nutritivo, la variante se puede recuperar directamente del medio. Si la variante no se secreta, se puede recuperar de los lisados celulares.

[0150] La variante puede detectarse usando métodos conocidos en la técnica que son específicos para las variantes. Estos métodos de detección incluyen, entre otros, el uso de anticuerpos específicos, la formación de un producto enzimático o la desaparición de un sustrato enzimático. Por ejemplo, se puede usar un ensayo enzimático para determinar la actividad de la variante.

[0151] La variante puede recuperarse usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la variante puede recuperarse del medio nutritivo mediante procedimientos convencionales que incluyen, pero no se limitan a, recolección, centrifugación, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación o precipitación.

[0152] La variante puede purificarse mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, cromatografía (por ejemplo, de intercambio iónico, de afinidad, hidrofóbica, de cromatoenfoco y de exclusión por tamaño), procedimientos electroforéticos (por ejemplo, enfoque isoeléctrico preparativo), solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación con sulfato de amonio), SDS-PAGE, o extracción (véase, por ejemplo, Protein Purification, Janson y Ryden, editors, VCH Publishers, Nueva York, 1989) para obtener variantes sustancialmente puras.

[0153] En un aspecto alternativo, la variante no se recupera, sino que se usa como fuente de la variante una célula hospedadora de la presente invención que expresa la variante.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Ensayo de esfuerzo mecánico automático para el lavado de textiles

[0154] Con el fin de evaluar el rendimiento del lavado en textiles, se realizan experimentos de lavado, utilizando el Ensayo de esfuerzo mecánico automático (AMSA, por sus siglas en inglés). Con el AMSA, se puede examinar el rendimiento de lavado de una gran cantidad de soluciones de detergente de lipasa de pequeño volumen. La placa el AMSA tiene una serie de ranuras para soluciones de prueba y una tapa que presiona firmemente el textil manchado contra todas las aberturas de la ranura. Durante el tiempo de lavado, la placa, las soluciones de prueba, el textil y la tapa se agitan vigorosamente para poner la solución de prueba en contacto con el textil y aplicar tensión mecánica de forma periódica y oscilante. Para una descripción más detallada véase WO02/42740 especialmente el párrafo "formas de realización de métodos especiales" en la página 23-24.

Los experimentos de lavado de textiles se realizan en las condiciones experimentales que se especifican a continuación:

Dosis de detergente	4,48 g/l
---------------------	----------

Volumen de solución de prueba	160 micrólitros
pH	Aprox. 10
Tiempo de lavado	20 minutos
Temperatura	30 ° C
Dureza del agua	18 ° dH

El detergente modelo y los materiales de prueba fueron los siguientes:

Detergente modelo para ropa en polvo	Sodio-LAS 20,1% Alcohol etoxilado, C12-15 7EO 4,5% Carbonato de sodio 11,8% Zeolita A4 23,9% Citrato de sodio 11,6% TAED 5,6% Percarbonato 22,3% Catalizador de blanqueo * 0,2 ppm de material activo.
Material de la prueba	Mancha de crema - cúrcuma según WO2006125437
Lipasa/dosis variante	1 ppm
* El catalizador de blanqueo tiene una estructura química que corresponde a la fórmula química:	
en la que R ¹³ es 2-butiloctilo	

5 [0155] La dureza del agua se ajustó a 18 °dH mediante la adición de CaCl₂, MgCl₂ y NaHCO₃ (Ca²⁺: Mg²⁺ = 4:1:7,5) al sistema de prueba. Después del lavado, los textiles se lavaron con agua corriente y se secaron durante 5 minutos a 85 °C en un armario calefactor.

10 [0156] El rendimiento del lavado se mide como el brillo del color del textil lavado. El brillo también se puede expresar como la intensidad de la luz reflejada por la muestra cuando se ilumina con luz blanca. Cuando la muestra se tiñe, la intensidad de la luz reflejada es menor que la de una muestra limpia. Por lo tanto, la intensidad de la luz reflejada se puede usar para medir el rendimiento del lavado.

15 [0157] Las mediciones de color se realizan con un escáner de superficie plana profesional (Kodak iQsmart, Kodak, Midtager 29, DK-2605 Brøndby, Dinamarca), que se utiliza para capturar una imagen del textil lavado.

[0158] Para extraer un valor para la intensidad de la luz de las imágenes escaneadas, los valores de píxeles de 24 bits de la imagen se convierten en valores para rojo, verde y azul (RGB). El valor de intensidad (Int) se calcula sumando los valores RGB juntos como vectores y luego tomando la longitud del vector resultante:

20
$$Int = \sqrt{r^2 + g^2 + b^2}$$

25 [0159] El rendimiento de lavado (P) de la variante de lipasa se calcula de acuerdo con la siguiente fórmula: $P = \Delta Int = Int(v) - Int(r)$, donde Int(v) es el valor de intensidad de luz de la superficie textil lavada con la lipasa variante, e Int(r) es el valor de intensidad de luz de la superficie textil lavada sin la variante de lipasa.

30 [0160] Cálculo de la puntuación de rendimiento relativo (RPwash): se proporciona una puntuación de rendimiento relativo como resultado del lavado de la escala completa de acuerdo con la definición: Las puntuaciones de rendimiento relativo (RPwash) proporcionan el rendimiento (P) de la variante de lipasa de la invención frente a la lipasa convencional: $RP = P$ (variante de lipasa de la invención)/P (lipasa convencional). Se considera que una formulación de lipasa muestra un rendimiento de lavado mejorado si funciona mejor que la lipasa convencional.

Ejemplo 2: variantes de G91 con rendimiento mejorado en presencia de catalizadores del blanqueo

35 [0161]

Mutaciones	RPwash
-	1,00
G91V	2,20

G91I	2,10
G91L	1,91
G91Q	1,89
G91S	1,71
G91A	1,69
G91T	1,65
G91N	1,62
G91W	1,55
G91R	1,16
G91K	1,10

Ejemplo 3: variantes de T37 con rendimiento mejorado en presencia de catalizadores del blanqueo

[0162]

5

Mutaciones	RP lavado
-	1,00
T37R	2,14

Ejemplo 4: variantes de N39 con rendimiento mejorado en presencia de catalizadores de blanqueo

[0163]

10

Mutaciones	RPwash
-	1,00
N39R	1,84
N39K	1,58

Ejemplo 5: variantes con dos o más mutaciones y con un rendimiento mejorado en presencia de catalizadores del blanqueo

[0164]

15

Mutaciones	RPwash
T231R N233R	1,00
T37R N39R G91A D96G T231R N233R	1,18
G91Q A150G E210Q T231R N233R P250R	1,49
G91Q T143A E210Q T231R N233R P250R	1,57
G91A D96G G225R T231 R N233R	1,21

LISTADO DE SECUENCIAS

20 [0165]

<110> Novozymes A/S
 Erlandsen, Luise
 Hansen, Carsten Hørslev
 Vind, Jesper
 25 Svendsen, Allan
 Sönksen, Carsten Peter

<120> Variantes de lipasa y nucleótidos que las codifican

<130> 11553-EP-ETD

<160> 2

30 <170> versión de PatentIn 3.5

<210> 1

<211> 873

ES 2 794 644 T3

<212> ADN
 <213> Thermomyces lanuginosus

<220>
 <221> CDS
 5 <222> (1)..(873)

<220>
 <221> sig_peptide
 <222> (1)..(51)

10 <220>
 <221> misc_signal
 <222> (52)..(66)

<220>
 <221> mat_peptide
 <222> (67)..(873)

15 <400> 1
 atg agg agc tcc ctt gtg ctg ttc ttt gtc tct gcg tgg acg gcc ttg 48
 Met Arg Ser Ser Leu Val Leu Phe Phe Val Ser Ala Trp Thr Ala Leu
 -20 -15 -10

gcc agt cct att cgt cga gag gtc tcg cag gat ctg ttt aac cag ttc 96
 Ala Ser Pro Ile Arg Arg Glu Val Ser Gln Asp Leu Phe Asn Gln Phe
 -5 -1 1 5 10

aat ctc ttt gca cag tat tct gca gcc gca tac tgc gga aaa aac aat 144
 Asn Leu Phe Ala Gln Tyr Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Gly Lys Asn Asn
 15 20 25

gat gcc cca gct ggt aca aac att acg tgc acg gga aat gcc tgc ccc 192
 Asp Ala Pro Ala Gly Thr Asn Ile Thr Cys Thr Gly Asn Ala Cys Pro
 30 35 40

gag gta gag aag gcg gat gca acg ttt ctc tac tcg ttt gaa gac tct 240
 Glu Val Glu Lys Ala Asp Ala Thr Phe Leu Tyr Ser Phe Glu Asp Ser
 45 50 55

gga gtg ggc gat gtc acc ggc ttc ctt gct ctc gac aac acg aac aaa 288
 Gly Val Gly Asp Val Thr Gly Phe Leu Ala Leu Asp Asn Thr Asn Lys
 60 65 70

ES 2 794 644 T3

ttg atc gtc ctc tct ttc cgt ggc tct cgt tcc ata gag aac tgg atc	336
Leu Ile Val Leu Ser Phe Arg Gly Ser Arg Ser Ile Glu Asn Trp Ile	
75 80 85 90	
ggg aat ctt aac ttc gac ttg aaa gaa ata aat gac att tgc tcc ggc	384
Gly Asn Leu Asn Phe Asp Leu Lys Glu Ile Asn Asp Ile Cys Ser Gly	
95 100 105	
tgc agg gga cat gac ggc ttc act tcg tcc tgg agg tct gta gcc gat	432
Cys Arg Gly His Asp Gly Phe Thr Ser Ser Trp Arg Ser Val Ala Asp	
110 115 120	
acg tta agg cag aag gtg gag gat gct gtg agg gag cat ccc gac tat	480
Thr Leu Arg Gln Lys Val Glu Asp Ala Val Arg Glu His Pro Asp Tyr	
125 130 135	
cgc gtg gtg ttt acc gga cat agc ttg ggt ggt gca ttg gca act gtt	528
Arg Val Val Phe Thr Gly His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Val	
140 145 150	
gcc gga gca gac ctg cgt gga aat ggg tat gat atc gac gtg ttt tca	576
Ala Gly Ala Asp Leu Arg Gly Asn Gly Tyr Asp Ile Asp Val Phe Ser	
155 160 165 170	
tat ggc gcc ccc cga gtc gga aac agg gct ttt gca gaa ttc ctg acc	624
Tyr Gly Ala Pro Arg Val Gly Asn Arg Ala Phe Ala Glu Phe Leu Thr	
175 180 185	
gta cag acc ggc gga aca ctc tac cgc att acc cac acc aat gat att	672
Val Gln Thr Gly Gly Thr Leu Tyr Arg Ile Thr His Thr Asn Asp Ile	
190 195 200	
gtc cct aga ctc ccg ccg cgc gaa ttc ggt tac agc cat tct agc cca	720
Val Pro Arg Leu Pro Pro Arg Glu Phe Gly Tyr Ser His Ser Ser Pro	
205 210 215	
gag tac tgg atc aaa tct gga acc ctt gtc ccc gtc acc cga aac gat	768
Glu Tyr Trp Ile Lys Ser Gly Thr Leu Val Pro Val Thr Arg Asn Asp	
220 225 230	
atc gtg aag ata gaa ggc atc gat gcc acc ggc ggc aat aac cag cct	816
Ile Val Lys Ile Glu Gly Ile Asp Ala Thr Gly Gly Asn Asn Gln Pro	
235 240 245 250	
aac att ccg gat atc cct gcg cac cta tgg tac ttc ggg tta att ggg	864
Asn Ile Pro Asp Ile Pro Ala His Leu Trp Tyr Phe Gly Leu Ile Gly	
255 260 265	
aca tgt ctt	873
Thr Cys Leu	

<210> 2
 <211> 291
 5 <212> PRT
 <213> Thermomyces lanuginosus

<400> 2
 Met Arg Ser Ser Leu Val Leu Phe Phe Val Ser Ala Trp Thr Ala Leu
 -20 -15 -10

ES 2 794 644 T3

Ala Ser Pro Ile Arg Arg Glu Val Ser Gln Asp Leu Phe Asn Gln Phe
 -5 -1 1 5 10

Asn Leu Phe Ala Gln Tyr Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Gly Lys Asn Asn
 15 20 25

Asp Ala Pro Ala Gly Thr Asn Ile Thr Cys Thr Gly Asn Ala Cys Pro
 30 35 40

Glu Val Glu Lys Ala Asp Ala Thr Phe Leu Tyr Ser Phe Glu Asp Ser
 45 50 55

Gly Val Gly Asp Val Thr Gly Phe Leu Ala Leu Asp Asn Thr Asn Lys
 60 65 70

Leu Ile Val Leu Ser Phe Arg Gly Ser Arg Ser Ile Glu Asn Trp Ile
 75 80 85 90

Gly Asn Leu Asn Phe Asp Leu Lys Glu Ile Asn Asp Ile Cys Ser Gly
 95 100 105

Cys Arg Gly His Asp Gly Phe Thr Ser Ser Trp Arg Ser Val Ala Asp
 110 115 120

Thr Leu Arg Gln Lys Val Glu Asp Ala Val Arg Glu His Pro Asp Tyr
 125 130 135

Arg Val Val Phe Thr Gly His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Val
 140 145 150

Ala Gly Ala Asp Leu Arg Gly Asn Gly Tyr Asp Ile Asp Val Phe Ser
 155 160 165 170

Tyr Gly Ala Pro Arg Val Gly Asn Arg Ala Phe Ala Glu Phe Leu Thr
 175 180 185

Val Gln Thr Gly Gly Thr Leu Tyr Arg Ile Thr His Thr Asn Asp Ile
 190 195 200

Val Pro Arg Leu Pro Pro Arg Glu Phe Gly Tyr Ser His Ser Ser Pro
 205 210 215

Glu Tyr Trp Ile Lys Ser Gly Thr Leu Val Pro Val Thr Arg Asn Asp
 220 225 230

Ile Val Lys Ile Glu Gly Ile Asp Ala Thr Gly Gly Asn Asn Gln Pro

ES 2 794 644 T3

235

240

245

250

Asn Ile Pro Asp Ile Pro Ala His Leu Trp Tyr Phe Gly Leu Ile Gly
255 260 265

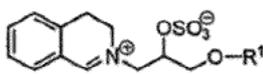
Thr Cys Leu

REIVINDICACIONES

1. Método para obtener una variante de lipasa, que comprende introducir en una lipasa progenitora sustituciones correspondientes a:

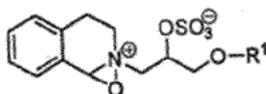
- 5 a) G91A + D96G + T231R + N233R;
 b) T37R + N39R + G91A + D96G + T231 R + N233R;
 c) G91A + D96G + G225R + T231R + N233R; o
 10 d) G91A + D96G + A150G + T231R + N233R del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2, en donde la variante es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 90% de identidad, pero menos del 100% con el polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2, tiene actividad lipasa y, en comparación con la lipasa progenitora, tiene un rendimiento mejorado en presencia de un catalizador orgánico seleccionado del grupo que consiste en catalizadores orgánicos que tienen las siguientes fórmulas:

a)



Fórmula 1;

b)



Fórmula 2; o

c) mezclas de los mismos,

20 en donde cada R1 es independientemente un grupo alquilo ramificado que contiene de 3 a 24 carbonos o un grupo alquilo lineal que contiene de 1 a 24 carbonos; y recuperar la variante.

25 2. Método de la reivindicación 1, en donde R1 se selecciona independientemente del grupo que consiste en 2-propilheptilo, 2-butilooctilo, 2-pentilnonilo, 2-hexildecilo, n-dodecilo, n-tetradecilo, n-hexadecilo, n-octadecilo, iso-nonilo, iso-decilo, iso-tridecilo e iso-pentadecilo.

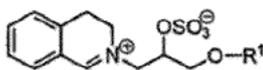
30 3. Método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la lipasa progenitora comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97 %, al menos 98%, o al menos 99%, pero menos del 100% de identidad con el polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2; o un fragmento del mismo que tiene actividad lipasa.

4. Variante de lipasa, que comprende sustituciones en posiciones correspondientes a

- 35 a) T37R + N39R + G91A + D96G + T231R + N233R;
 b) G91A + D96G + T231R + N233R;
 c) G91A + D96G + G225R + T231R + N233R; o
 40 d) G91A + D96G + A150G + T231R + N233R del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2, en donde la variante tiene actividad lipasa; y en donde el polipéptido tiene al menos 90%, pero menos del 100% de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2.

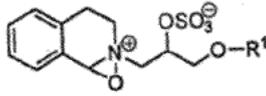
45 5. Variante de la reivindicación 4, que, en comparación con la lipasa progenitora, tiene un rendimiento mejorado en presencia de un catalizador orgánico seleccionado del grupo que consiste en catalizadores orgánicos que tienen las siguientes fórmulas:

a)



Fórmula 1;

b)



Fórmula 2; o

c) mezclas de los mismos,

- 5 en donde cada R1 es independientemente un grupo alquilo ramificado que contiene de 3 a 24 carbonos o un grupo alquilo lineal que contiene de 1 a 24 carbonos.
6. Variante de la reivindicación 5, en la que R1 se selecciona independientemente del grupo que consiste en 2-propilheptilo, 2-butiloctilo, 2-pentilnonilo, 2-hexildecilo, n-dodecilo, n-tetradecilo, n-hexadecilo, n-octadecilo, iso-nonilo, iso-decilo, iso-tridecilo e iso-pentadecilo.
- 10 7. Polinucleótido aislado que codifica la variante de cualquiera de las reivindicaciones 4-6.
8. Construcción de ácido nucleico que comprende el polinucleótido de la reivindicación 7.
- 15 9. Vector de expresión que comprende el polinucleótido de la reivindicación 7.
10. Célula hospedadora que comprende el polinucleótido de la reivindicación 7.
- 20 11. Método para producir la variante de cualquiera de las reivindicaciones 4-6, que comprende:
- a) cultivar la célula hospedadora de la reivindicación 10 en condiciones adecuadas para la expresión de la variante; y
 - b) recuperar la variante.