

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 824 482**

51 Int. Cl.:

C12N 9/54 (2006.01)

C11D 3/386 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.03.2017 PCT/EP2017/055276**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.09.2017 WO17162428**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.03.2017 E 17709421 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.09.2020 EP 3433359**

54 Título: **Poder de limpieza mejorado en suciedad sensible a proteínas**

30 Prioridad:

23.03.2016 DE 102016204814

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

12.05.2021

73 Titular/es:

HENKEL AG & CO. KGAA (100.0%)

Henkelstrasse 67

40589 Düsseldorf, DE

72 Inventor/es:

MUSSMANN, NINA;

O'CONNELL, TIMOTHY;

HERBST, DANIELA;

PRÜSER, INKEN;

DEGERING, CHRISTIAN;

GRIEMERT, SABINE;

EGGERT, THORSTEN y

LEGGEWIE, CHRISTIAN

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 824 482 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

Poder de limpieza mejorado en suciedad sensible a proteínas

5 La invención se encuentra en el campo de la tecnología de las enzimas. La invención se refiere a las proteasas del *Bacillus pumilus* cuya secuencia de aminoácidos ha sido modificada, en particular, en lo que se refiere a su utilización en detergentes y agentes de limpieza a fin de darles un mejor rendimiento de limpieza, y a los ácidos nucleicos que codifican para ellos y su producción. La invención además se refiere a los usos de estas proteasas y a los procedimientos en los que se utilizan, así como con los agentes que las contienen, en particular, los agentes de lavado y limpieza.

10 Las proteasas pertenecen a las enzimas técnicamente más importantes de todas. Son las enzimas más antiguas para los detergentes y agentes de limpieza y están contenidas en prácticamente todos los detergentes y agentes de limpieza modernos y de alto rendimiento. Causan la degradación de la suciedad que contiene proteínas en el producto de limpieza. Entre ellas, son especialmente importantes las proteasas de tipo subtilisina (subtilasas, subtilopeptidasas, EC 3.4.21.62), que son proteasas de serina debido a sus aminoácidos catalíticamente activos. Actúan como endopeptidasas inespecíficas e hidrolizan los enlaces de amida ácida que se encuentran en el interior de los péptidos o las proteínas. Su pH óptimo suele estar en el intervalo claramente alcalino. Se ofrece una visión general de esta familia, por ejemplo, en el artículo "Subtilases: Subtilisin-like Proteases" de R. Siezen, páginas 75 a 95 en "Subtilisin enzymes", editado por R. Bott y C. Betzel, Nueva York, 1996 Las subtilasas están formadas naturalmente por microorganismos. Entre ellas, las subtilisinas formadas y secretadas por las especies de *Bacillus* son el grupo más importante dentro de las subtilasas.

25 Ejemplos de las proteasas de tipo subtilisina utilizadas preferentemente en detergentes y agentes de limpieza son las subtilisinas BPN' y Carlsberg, la proteasa PB92, las subtilisinas 147 y 309, la proteasa del *Bacillus lentus*, en particular, del *Bacillus lentus* DSM 5483, subtilisina DY y las enzimas termitasa, proteinasa K y las proteasas TW3 y TW7 que se asignarán a las subtilisinas pero ya no a las subtilisinas en sentido estricto, así como las variantes de dichas proteasas que tienen una secuencia de aminoácidos diferente de la de la proteasa madre. Las proteasas se modifican de manera selectiva o aleatoria utilizando procedimientos conocidos del estado de la técnica y, por lo tanto, se optimizan para su uso en detergentes y agentes de limpieza, por ejemplo. Esto incluye la mutagénesis puntual, la mutagénesis por delección o inserción o la fusión con otras proteínas o partes de proteínas. Para la mayoría de las proteasas conocidas del estado del arte, se conocen variantes correspondientemente optimizadas. Por ejemplo, se conocen varias variantes de BPN' y savinasa de los documentos W09530010, WO2011014278, WO2011036263, WO2014207228, W02003054127 y W02003006602.

35 Se conocen otras subtilisinas, por ejemplo, de los documentos WO9628566, CN1258745 y W02003062380. En el documento DE102006022224 se revela una proteasa alcalina del *Bacillus pumilus*.

40 La solicitud de patente europea EP 2016175 A1, por ejemplo, revela una proteasa del *Bacillus pumilus* destinada a detergentes y agentes de limpieza. En general, sólo algunas proteasas seleccionadas son aptas para su uso en preparados líquidos que contienen tensioactivos. Muchas proteasas no muestran un rendimiento catalítico suficiente en tales preparados. Por consiguiente, para la aplicación de proteasas en los detergentes, es particularmente deseable una alta actividad catalítica en condiciones como las que se encuentran durante un ciclo de lavado.

45 En consecuencia, las formulaciones líquidas de última generación que contienen proteasas y tensioactivos presentan la desventaja de que las proteasas que contienen no muestran una actividad proteolítica satisfactoria en condiciones de lavado estándar y, por lo tanto, las formulaciones no muestran un rendimiento de limpieza óptimo en suciedad sensible a la proteasa.

50 Sorprendentemente, ahora se ha determinado que una proteasa del *Bacillus pumilus* o una proteasa de suficiente similitud con este (con respecto a la identidad de la secuencia), que muestra una sustitución de aminoácidos en al menos una de las posiciones P9, Q10, Q62, L82, P86, N130, T141, N187, S236 o T253, en cada caso con respecto a la numeración según la SEQ ID NO: 1, presenta una mejoría en lo que respecta a la actividad proteolítica en condiciones normales de lavado en comparación con la forma de tipo salvaje y, por lo tanto, es particularmente adecuado para su uso en detergentes o agentes de limpieza.

60 El objeto de la invención es, por tanto, en un primer aspecto una proteasa que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:1 en toda su longitud y una sustitución de aminoácidos en al menos una de las posiciones P9, Q10, Q62, L82, P86, N130, T141, N187, S236 o T253, en cada caso basada en la numeración según SEQ ID NO: 1: 1, en el que se selecciona al menos una sustitución de aminoácidos del grupo formado por P9H, Q10E, Q62E, L82F, P86S, P86A, N130D, T141K, N187H, S236A o T253S, cada uno basado en la numeración de acuerdo con la SEQ ID NO:1.

65 Otro objeto de la invención es un procedimiento para la producción de una proteasa que comprende la sustitución de un aminoácido en al menos una posición correspondiente a las posiciones de posición 9, 10, 62, 82, 86, 130, 141, 187 o 236 en SEQ ID NO:1 en una proteasa de partida que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la

secuencia de aminoácidos dada en SEQ ID NO:1 en toda su longitud, preferentemente de manera que la proteasa contenga al menos una de las sustituciones de aminoácidos P9H, Q10E, Q62E, L82F, P86S, P86A, N130D, T141K, N187H, S236A o T253S.

5 Por lo tanto, una proteasa en el sentido de la presente solicitud de patente comprende tanto la proteasa como tal como también una proteasa producida por un procedimiento de acuerdo con la invención. Por consiguiente, todas las declaraciones sobre la proteasa se refieren tanto a la proteasa como tal como a las proteasas producidas mediante un procedimiento correspondiente.

10 Otros aspectos de la invención se refieren a los ácidos nucleicos que codifican estas proteasas, a las células huésped no humanas que contienen proteasas o ácidos nucleicos de acuerdo con la invención, así como a los agentes que comprenden las proteasas de acuerdo con la invención, en particular, los detergentes, los agentes de lavado y limpieza, los procesos de lavado y limpieza, y los usos de las proteasas de la invención en los agentes de lavado o limpieza para eliminar la suciedad grasa.

15 "Al menos una", tal como se usa aquí, significa una o varias, es decir, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o más.

20 La presente invención se basa en el sorprendente hallazgo de los autores de la invención de que no es posible una sustitución de aminoácidos en al menos una de las posiciones 9, 10, 62, 82, 86, 130, 141, 187 o 236 de la proteasa del *Bacillus pumilus* según la SEQ ID NO:1, en una proteasa que tenga una sustitución de aminoácidos correspondiente a la que se muestra en la SEQ ID NO:1: 1, en una proteasa que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO: 1, de manera que los aminoácidos 9H, 10E, 62E, 82F, 86S, 86A, 130D, 141K, 187H, 236A o 253S están presentes por lo menos en una de las posiciones correspondientes, produzca una actividad catalítica mejorada de esta proteasa modificada en los agentes de lavado y limpieza. Esto es particularmente sorprendente en el sentido de que ninguna de las sustituciones de aminoácidos mencionadas anteriormente se ha asociado anteriormente con una mayor actividad catalítica de la proteasa.

30 Las proteasas de acuerdo con la invención tienen una mayor actividad catalítica en los detergentes. En varias formas, las proteasas de acuerdo con la invención tienen una actividad proteolítica que, basada en la variante de tipo salvaje de la proteasa (SEQ ID NO:1), es de al menos 110 %, al menos 115 %, al menos 120 %, al menos 125 %, al menos 130 %, al menos 135 %, al menos 140 %, al menos 145 %, al menos 150 %, al menos 155 % o al menos 160 %. Estas proteasas de mayor rendimiento permiten mejorar los resultados de lavado en suciedades sensibles a la protección en un amplio intervalo de temperaturas.

35 Las proteasas de acuerdo con la invención presentan actividad enzimática, es decir, son capaces de hidrolizar péptidos y proteínas, en particular, en un detergente o agente de limpieza. Una proteasa de acuerdo con la invención es, por lo tanto, una enzima que cataliza la hidrólisis de los enlaces amida/péptido en los sustratos de proteína/péptido y es, por lo tanto, capaz de dividir las proteínas o los péptidos. Además, una proteasa de acuerdo con la invención es preferentemente una proteasa madura, es decir, la molécula catalíticamente activa sin señal y/o propéptido(s). A menos que se indique lo contrario, las secuencias dadas también se refieren a las enzimas maduras (procesadas).

40 En diferentes realizaciones, la proteasa de acuerdo con la invención contiene al menos una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo formado por P9H, Q10E, Q62E, L82F, P86S, P86A, N130D, T141K, N187H, S236A o T253S, en cada caso basado en la numeración según la SEQ ID NO:1. En otras formas preferidas, la proteasa de acuerdo con la invención contiene una de las siguientes variantes de sustitución de aminoácidos: i) P86S y S236A; ii) Q62E; iii) Q62E y L82F; iv) Q10E; v) N130D, T141K y T253S; vi) P86A; vii) P9H, Q62E y L82F; viii) Q62E, L82F y N187H; ix) Q62E y N130D; o x) P86S, N187H y S236A, en los que la numeración está relacionada con la numeración de los números de identificación de la SEQ: 1.

50 En otra realización más de la invención, la proteasa comprende una secuencia de aminoácidos que corresponde a la secuencia establecida en SEQ ID NO: 1, siendo que a lo largo de su longitud total es al menos 90%, 90,5%, 91%, 91,5%, 92%, 92,5%, 93%, 93,5%, 94%, 94,5%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5% y 98,8% idéntica a la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 1, y que es idéntica al menos a una de las posiciones 9, 10, 62, 82, 86, 130, 141, 187 o 236 en el conteo según SEQ ID NO: 1: 1, una o más de las sustituciones de aminoácidos 9H, 10E, 62E, 82F, 86S, 86A, 130D, 141K, 187H, 236A o 253S. En el contexto de la presente invención, la característica de que una proteasa tiene las sustituciones indicadas significa que contiene al menos uno de los aminoácidos correspondientes en las posiciones correspondientes, es decir, no todas las 10 posiciones son de otra manera mutadas o suprimidas, por ejemplo, por fragmentación de la proteasa. Las secuencias de aminoácidos de tales proteasas preferentes de acuerdo con la invención se dan en las SEQ ID Nos: 2-11.

60 La identidad de las secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos se determina mediante la comparación de secuencias. Esta comparación de secuencias se basa en el algoritmo BLAST, establecido en el estado de la técnica y de uso común (véase por ejemplo, Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) "Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215:403- 410, y Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Hheng Zhang, Webb Miller, y David J. Lipman (1997): "Gapped BLAST y PSI-BLAST: una nueva generación de programas de búsqueda de bases de proteínas"; Nucleic Acids Res., 25, p.3389-3402) y se realiza en principio mediante el emparejamiento de secuencias similares de nucleótidos o aminoácidos en las

secuencias de ácido nucleico o aminoácidos. Una asignación tabular de las posiciones relevantes se llama alineación. Otro algoritmo disponible en el estado del arte es el algoritmo FASTA. Las comparaciones de secuencias (alineaciones), en particular, las comparaciones de secuencias múltiples, se crean con programas informáticos. La serie Clustal, por ejemplo, se utiliza con frecuencia (véase, por ejemplo, Chenna et al. (2003): Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acid Research* 31,3497-3500), T-Coffee (ver por ejemplo, Notredame et al. (2000): T-Coffee: A novel method for multiple sequence alignments. *J. Mol. Biol.* 302, 205-217) o programas basados en estos programas o algoritmos. Además, también son posibles las comparaciones de secuencias (alineaciones) con el programa informático Vector NTI® Suite 10.3 (Invitrogen Corporation, 1600 Faraday Avenue, Carlsbad, California, EE.UU.) con los parámetros estándar dados, cuyo módulo AlignX para comparaciones de secuencias está basado en ClustalW. A menos que se especifique lo contrario, la identidad de la secuencia especificada aquí se determina usando el algoritmo BLAST.

Esa comparación también permite afirmar la similitud de las secuencias comparadas entre sí. Suele expresarse como una identidad porcentual, es decir, la proporción de nucleótidos o residuos de aminoácidos idénticos en las mismas posiciones o en una alineación correspondiente a cada uno. En el caso de las secuencias de aminoácidos, el concepto más amplio de homología incluye los intercambios de aminoácidos conservados, es decir, los aminoácidos con actividad química similar, ya que normalmente tienen actividades químicas similares dentro de la proteína. Por consiguiente, la similitud de las secuencias comparadas también puede expresarse como homología porcentual o similitud porcentual. La información de identidad y/o homología puede darse para polipéptidos o genes enteros o sólo para regiones individuales. Los homólogos o regiones idénticas de diferentes secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos se definen, por lo tanto, por coincidencias en las secuencias. Esas regiones suelen tener funciones idénticas. Pueden ser pequeños y comprender sólo unos pocos nucleótidos o aminoácidos. A menudo esas pequeñas áreas desempeñan funciones esenciales para la actividad general de la proteína. Por lo tanto, puede ser útil relacionar las coincidencias de secuencias sólo con áreas individuales, posiblemente pequeñas. Sin embargo, a menos que se indique lo contrario, la información de identidad u homología en la presente solicitud se refiere a la longitud total de la secuencia de ácidos nucleicos o aminoácidos indicada.

En el contexto de la presente invención, la afirmación de que un reposicionamiento de aminoácidos corresponde a una posición numéricamente designada en la SEQ ID NO:1 significa, por lo tanto, que la posición correspondiente se asigna a la posición numéricamente designada en la SEQ ID NO:1 en una alineación como se definió anteriormente.

En una realización ulterior de la invención, la proteasa se caracteriza porque su rendimiento de purificación no se reduce significativamente en comparación con el de una proteasa que comprende una secuencia de aminoácidos que corresponde a la secuencia de aminoácidos dada en la SEQ ID NO:1, es decir, tiene al menos el 80 % del rendimiento de lavado de referencia, preferentemente al menos el 100%, más preferentemente al menos el 110 % o más. La eficacia de la limpieza puede determinarse en un sistema de lavado que contenga un detergente en una dosis de entre 4,5 y 7,0 gramos por litro de líquido de lavado y la proteasa, en el que las proteasas que se comparan se utilizan en la misma concentración (basada en la proteína activa) y la eficacia de la limpieza contra la suciedad del algodón se determine midiendo el grado de limpieza de los textiles lavados. Por ejemplo, el proceso de lavado puede realizarse durante 60 minutos a una temperatura de 40°C y el agua tiene una dureza de entre 15,5 y 16,5° (dureza alemana). La concentración de proteasa en el detergente destinado a este sistema de lavado es de 0,001-0,1 % en peso, preferentemente de 0,01 a 0,06 % en peso, basado en una proteína activa y purificada.

Un detergente líquido de referencia para tal sistema de lavado puede estar compuesto de la siguiente manera (todas las cifras se expresan como porcentaje en peso) 4,4 % de ácido alquilbencensulfónico, 5,6 % de otros tensioactivos aniónicos, 2,4 % de sales de ácidos grasos (jabones) C12-C18 Na, 4,4 % de tensioactivos no iónicos, 0,2 % de fosfonatos, 1,4 % de ácido cítrico, 0,95 % de NaOH, 0,01% de antiespumante, 2 % de glicerol, 0,08 % de conservantes, 1 % de etanol y el resto de agua desmineralizada. La dosis preferente del detergente líquido es entre 4,5 y 6,0 gramos por litro de líquido de lavado, por ejemplo, 4,7, 4,9 o 5,9 gramos por litro de líquido de lavado. Preferentemente, el lavado se hace en un rango de pH entre pH 8 y pH 10.5, preferentemente entre pH 8 y pH 9.

En el contexto de la invención, la determinación del rendimiento de la limpieza se lleva a cabo, por ejemplo, a 40°C utilizando un detergente líquido como se ha indicado anteriormente, por lo que el proceso de lavado se lleva a cabo preferentemente durante 60 minutos a 600 rpm.

El grado de blancura, es decir, el aclaramiento de la suciedad, como medida del rendimiento de la limpieza se determina por métodos de medición óptica, preferentemente en forma fotométrica. Un instrumento adecuado para este propósito es, por ejemplo, el espectrómetro CM508d de Minolta. Normalmente los dispositivos utilizados para la medición se calibran de antemano con un patrón blanco, preferentemente un patrón blanco suministrado con el dispositivo.

El uso similar a la actividad de la respectiva proteasa asegura que, incluso si la proporción de sustancia activa en relación con la proteína total (los valores de la actividad específica) difiere, se comparan las respectivas propiedades enzimáticas, por ejemplo, el rendimiento de limpieza en determinados suelos. En general, una actividad específica baja puede compensarse añadiendo una cantidad mayor de proteína.

Por lo demás, los procedimientos para la determinación de la actividad de la proteasa son conocidos por los expertos en el campo de la tecnología de las enzimas y son utilizados habitualmente por ellos. Por ejemplo, esos métodos se revelan en *Tenside*, volumen 7 (1970), págs. 125 a 132. Alternativamente, la actividad de la proteasa puede determinarse mediante la liberación del cromóforo para-nitroanilina (pNA) del sustrato suc-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-phe-p-nitroanilida (AAPF). La proteasa escinde el sustrato y libera el ADN. La liberación del pNA causa un aumento de la absorbancia a 410 nm, cuyo curso temporal es una medida de la actividad enzimática (cf. Del Mar et al., 1979). La medición se realiza a una temperatura de 25°C, a un pH de 8,6 y a una longitud de onda de 410 nm. El tiempo de medición es de 5 min. y el intervalo de medición de 20 a 60 min. La actividad de la proteasa suele expresarse en unidades de proteasa (PE). Las actividades de la proteasa adecuadas son, por ejemplo, 2,25, 5 o 10 PE por ml de líquido de lavado. Sin embargo, la actividad de la proteasa no es nula.

Una prueba alternativa para determinar la actividad proteolítica de las proteasas de acuerdo con la invención es un método de medición óptica, preferentemente un método fotométrico. La prueba adecuada para este propósito comprende la división dependiente de la proteasa del sustrato de la proteína caseína. La proteasa lo divide en una multitud de productos parciales más pequeños. Todos estos productos parciales muestran una mayor absorción a 290 nm en comparación con la caseína no escindida. Este aumento de la absorción puede determinarse mediante un fotómetro y, por lo tanto, se puede llegar a una conclusión sobre la actividad enzimática de la proteasa.

La concentración de proteínas puede determinarse mediante métodos conocidos, por ejemplo, el método BCA (ácido bicinconínico; ácido 2,2'-biquinolil-4,4'-dicarboxílico) o el método del biuret (A. G. Gornall, C. S. Bardawill y M.M. David, J. Biol. Chem., 177 (1948), págs. 751 a 766). La determinación de la concentración de proteína activa puede llevarse a cabo mediante la titulación de los centros activos utilizando un inhibidor irreversible adecuado y la determinación de la actividad residual (véase M. Gornall, C. S. Bardawill y M. M. David, J. Biol. Chem. 233 (1966), pp. 5890-5913).

Además de las modificaciones de aminoácidos explicadas anteriormente, las proteasas de acuerdo con la invención pueden tener otras modificaciones de aminoácidos, en particular, sustituciones, inserciones o supresiones de aminoácidos. Esas proteasas, por ejemplo, se desarrollan posteriormente mediante una modificación genética específica, es decir, mediante métodos de mutagénesis, y se optimizan para fines concretos o con respecto a propiedades específicas (por ejemplo, con respecto a su actividad catalítica, estabilidad, etc.). Además, los ácidos nucleicos que son objeto de la invención pueden introducirse en los enfoques de recombinación y utilizarse así para producir tipos completamente nuevos de proteasas u otros polipéptidos.

El objetivo es introducir mutaciones específicas como sustituciones, inserciones o supresiones en las moléculas conocidas, por ejemplo, para mejorar el rendimiento de purificación de las enzimas de la invención. Para ello, en particular, se pueden modificar las cargas superficiales y/o el punto isoeléctrico de las moléculas y, por tanto, su interacción con el sustrato. Así, por ejemplo, la carga neta de las enzimas puede modificarse a fin de influir en la unión del sustrato, especialmente para su uso en detergentes y agentes de limpieza. Alternativamente o, además, la estabilidad o la actividad catalítica de la proteasa puede aumentarse mediante una o más mutaciones correspondientes, mejorando así su rendimiento de limpieza. Las propiedades ventajosas de las mutaciones individuales, por ejemplo, las sustituciones individuales, pueden complementarse entre sí. Una proteasa que ya ha sido optimizada con respecto a ciertas propiedades, por ejemplo, con respecto a su estabilidad durante el almacenamiento, puede, por lo tanto, desarrollarse adicionalmente en el ámbito de la invención.

Para la descripción de sustituciones que afectan exactamente a una posición de aminoácidos (intercambios de aminoácidos), se aplica la siguiente convención: primero se designa el aminoácido naturalmente existente en forma de código de una letra utilizado internacionalmente, luego sigue la posición de la secuencia correspondiente y finalmente el aminoácido insertado. Múltiples intercambios dentro de la misma cadena de polipéptidos están separados por barras. Para las inserciones, los aminoácidos adicionales se nombran según la posición de la secuencia. En el caso de las supresiones, el aminoácido que falta se sustituye por un símbolo, por ejemplo, un asterisco o una línea, o se da una A antes de la posición correspondiente. Por ejemplo, P9H describe la sustitución de la prolina en la posición 9 por la histidina, P9HT describe la inserción de treonina después del aminoácido histidina en la posición 9 y P9* o AP9 describe la supresión de la prolina en la posición 9. Esta nomenclatura es conocida por el experto en el campo de la tecnología de las enzimas.

Un objeto más lejano de la invención es por lo tanto una proteasa que se caracteriza en que es obtenible de una proteasa como se describió anteriormente como una molécula de partida por sustitución de aminoácidos conservadora única o múltiple, en la que la proteasa todavía tiene al menos una de las sustituciones de aminoácidos según SEQ ID NO:1 en las posiciones correspondientes a las posiciones 9, 10, 62, 82, 86, 130, 141, 187 y 236 en SEQ ID NO:1, como se describió anteriormente. Por "sustitución conservadora de aminoácidos" se entiende el intercambio (sustitución) de un residuo de aminoácido por otro residuo de aminoácido, cuyo intercambio no da lugar a un cambio de polaridad o de carga en la posición del aminoácido intercambiado, por ejemplo, el intercambio de un residuo de aminoácido no polar por otro residuo de aminoácido no polar. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos dentro del ámbito de la invención incluyen, por ejemplo: G=A=S, I=V=L=M, D=E, N=Q, K=R, Y=F, S=T, G=A=I=V=L=M=Y=F=W=P=S=T.

De forma alternativa o adicional, la proteasa se caracteriza porque puede obtenerse de una proteasa de la invención como molécula de partida por fragmentación, supresión, inserción o sustitución mutagénesis y comprende una secuencia de aminoácidos que, a lo largo de una longitud de al menos 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270 o 275 aminoácidos contiguos es lo mismo que la molécula de partida, en la que la(s) sustitución(es) de aminoácidos
5 contenida(s) en la molécula de partida situada(s) en una o más de las posiciones, que corresponden a las posiciones 9, 10, 62, 82, 86, 130, 141, 187 y 236 en el ID NO SEQ: 1, aún continúa presente.

Así es posible, por ejemplo, eliminar aminoácidos individuales en los extremos o en los bucles de la enzima sin perder o reducir la actividad proteolítica. Además, esa fragmentación, supresión, inserción o mutagénesis de sustitución
10 también puede reducir la alergenicidad de las enzimas y mejorar así su aplicabilidad general. Es ventajoso que las enzimas conserven su actividad proteolítica incluso después de la mutagénesis, es decir, que su actividad proteolítica corresponda al menos a la de enzima inicial, es decir, en una forma preferida, la actividad proteolítica es al menos 80, preferentemente al menos el 90 % de la actividad de la enzima inicial. Otras sustituciones también pueden tener efectos beneficiosos. Tanto los aminoácidos simples como los relacionados pueden ser reemplazados por otros
15 aminoácidos.

De forma alternativa o adicional, la proteasa se caracteriza porque puede obtenerse de una proteasa de la invención como molécula de partida por sustitución de aminoácidos conservadores única o múltiple, en el que la proteasa contiene al menos una de las sustituciones de aminoácidos P9H, Q10E, Q62E, L82F, P86S, P86A, N130D, T141K,
20 N187H, S236A o T253S en las posiciones correspondientes a las posiciones 9, 10, 62, 82, 86, 130, 141, 187 y 236 según la SEQ ID NO: 1, de acuerdo con la identificación SEQ NO: 1.

En otras realizaciones, la proteasa se caracteriza porque puede obtenerse de una proteasa de acuerdo con la invención como molécula de partida por fragmentación, supresión, inserción o sustitución mutagénesis y comprende
25 una secuencia de aminoácidos que tiene una longitud de al menos 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270 o 275 aminoácidos contiguos es idéntica a la molécula inicial, en la que la proteasa contiene al menos una de las sustituciones de aminoácidos P9H, Q10E, Q62E, L82F, P86S, P86A, N130D, T141K, N187H, S236A o T253S en las posiciones correspondientes a las posiciones 9, 10, 62, 82, 86, 130, 141, 187 y 236 del número de identificación SEQ: 1 de acuerdo con la SEQ ID NO:1.
30

Las otras posiciones de los aminoácidos se definen por una alineación de la secuencia de aminoácidos de una proteasa de acuerdo con la invención con la secuencia de aminoácidos de la proteasa del *Bacillus pumilus* como se da en la SEQ ID NOM. Además, la asignación de las posiciones depende de la proteína madura. Esta asignación también se utilizará en particular, si la secuencia de aminoácidos de una proteasa de acuerdo con la invención comprende un
35 número mayor de residuos de aminoácidos que la proteasa del *Bacillus pumilus* según la SEQ ID NOM. A partir de dichas posiciones en la secuencia de aminoácidos de la proteasa del *Bacillus pumilus*, las posiciones de alteración en una proteasa de acuerdo con la invención son las que se asignan a estas mismas posiciones en una alineación.

Las posiciones ventajosas para los cambios de secuencia, en particular, las sustituciones, de la proteasa del *Bacillus pumilus*, que son de importancia preferente cuando se transfieren a posiciones homólogas de las proteasas de acuerdo con la invención y que dan a la proteasa propiedades funcionales ventajosas, son por lo tanto las posiciones que corresponden en una alineación a las posiciones 9, 10, 62, 82, 86, 130, 141, 187 y 236 en SEQ ID NOM, es decir, en el recuento según SEQ ID NOM. En la molécula del tipo salvaje de la proteasa del *Bacillus pumilus* se encuentran los siguientes residuos de aminoácidos en las posiciones mencionadas: P9, Q10, Q62, L82, P86, N130, T141, N187,
45 S236 y T253.

Una confirmación adicional de la correcta asignación de los aminoácidos que deben modificarse, es decir, en particular, su correspondencia funcional, puede proporcionarse mediante ensayos comparativos, según los cuales las dos posiciones asignadas entre sí sobre la base de una alineación se modifican de la misma manera en ambas proteasas en comparación con cada una de ellas y se observa si la actividad enzimática se modifica de la misma manera en ambas. Si, por ejemplo, un intercambio de aminoácidos en una posición específica de la proteasa del *Bacillus pumilus* según la SEQ ID NO:1 va acompañado de un cambio en un parámetro enzimático, por ejemplo, un aumento del valor de KM, y si se observa un cambio correspondiente en el parámetro enzimático, es decir, también un aumento del valor de KM, en una variante de la proteasa de acuerdo con la invención, cuyo intercambio de
50 aminoácidos fue logrado por el mismo aminoácido introducido, esto debe considerarse como una confirmación de la asignación correcta.
55

Todos los hechos mencionados anteriormente son también aplicables a los procesos para la producción de una proteasa de acuerdo con la invención. Por consiguiente, un procedimiento de acuerdo con la invención comprende además uno o más de los siguientes pasos de proceso:
60

a) introducir una sustitución conservadora de aminoácidos única o múltiple, en la que la proteasa comprende al menos una de las sustituciones de aminoácidos P9H, Q10E, Q62E, L82F, P86S, P86A, N130D, T141K, N187H, S236A o T253S en las posiciones correspondientes a las posiciones 9, 10, 62, 82, 86, 130, 141, 187 y 236 de acuerdo con la SEQ ID NO:1;
65

b) modificar la secuencia de aminoácidos por mutagénesis de fragmentación, supresión, inserción o sustitución, de manera que la proteasa comprenda una secuencia de aminoácidos de una longitud mínima de 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270 o 275 aminoácidos contiguos es idéntica a la molécula inicial, en la que la proteasa contiene al menos una de las sustituciones de aminoácidos P9H, Q10E, Q62E, L82F, P86S, P86A, N130D, T141K, N187H, S236A o T253S en las posiciones correspondientes a las posiciones 9, 10, 62, 82, 86, 130, 141, 187 y 236 de la SEQ ID NO: 1 de acuerdo con la SEQ ID NO:1.

Todas las explicaciones también rigen para los procedimientos de acuerdo con la invención.

10 En otras conformaciones de la invención, la proteasa, o bien la proteasa producida con un procedimiento de acuerdo con la invención aún es idéntica en al menos un 90 %, 90,5 %, 91 %, 91,5 %, 92 %, 92,5 %, 93 %, 93,5 %, 94 %, 94,5 %, 95 %, 95,5 %, 96 %, 96,5 %, 97 %, 97,5 %, 98 %, 98,5 %, o 98,8 % en su longitud total con la secuencia de aminoácido indicada en la SEQ ID NO:1. Alternativamente, la proteasa, o bien la proteasa producida con un procedimiento de acuerdo con la invención aún es idéntica en al menos un 90 %, 90,5 %, 91 %, 91,5 %, 92 %, 92,5 %, 93 %, 93,5 %, 94 %, 94,5 %, 95 %, 95,5 %, 96 %, 96,5 %, 97 %, 97,5 %, o 98 % en su longitud total con una de las secuencias de aminoácidos indicadas en las SEQ ID Nos:2-11. La proteasa o bien la proteasa producida mediante un procedimiento de acuerdo con la invención presenta una sustitución de aminoácidos en al menos una de las posiciones P9, Q10, Q62, L82, P86, N130, T141, N187, S236 o T253, en cada caso basada en la numeración según SEQ ID NOM. En las formas más preferentes, la sustitución de aminoácidos es al menos una seleccionada del grupo formado por P9H, Q10E, Q62E, L82F, P86S, P86A, N130D, T141K, N187H, S236A y T253S, cada uno de ellos basado en la numeración según la SEQ ID NOM. En otras formas preferentes, la proteasa comprende una de las siguientes variantes de sustitución de aminoácidos: i) P86S y S236A; ii) Q62E; iii) Q62E y L82F; iv) Q10E; v) N130D, T141K y T253S; vi) P86A; vii) P9H, Q62E y L82F; viii) Q62E, L82F y N187H; ix) Q62E y N130D; o x) P86S, N187H y S236A.

25 Otro objeto de la invención es una proteasa descrita antes que además es estabilizada, en particular, por una o más mutaciones, por ejemplo, sustituciones, o por acoplamiento a un polímero. El aumento de la estabilidad durante el almacenamiento y/o durante el uso, por ejemplo, durante el proceso de lavado, produce que la actividad enzimática dure más tiempo y, por lo tanto, mejora el rendimiento de la limpieza. Básicamente, se consideran todas las opciones de estabilización descritas y/o apropiadas en el estado de la técnica. Se da preferencia a las estabilizaciones que se logran mediante mutaciones de la propia enzima, ya que esas estabilizaciones no requieren ningún otro paso de procesamiento después de la extracción de la enzima. Más arriba se indican ejemplos de modificaciones de secuencia adecuadas. Otras modificaciones de secuencia adecuadas se conocen por el estado de la técnica.

35 Otras posibilidades de estabilización son, por ejemplo:

- modificación de la unión de los iones metálicos, en particular, de los sitios de unión del calcio, por ejemplo, mediante el intercambio de uno o más de los aminoácidos implicados en la unión del calcio por uno o más aminoácidos cargados negativamente y/o mediante la introducción de modificaciones de secuencia en al menos una de las secuencias de los dos aminoácidos arginina/glicina;
- protección contra la influencia de agentes desnaturalizantes, como los tensioactivos, por mutaciones que provocan un cambio en la secuencia de aminoácidos en la superficie de la proteína;
- sustitución de los aminoácidos cercanos al N-terminal, por aquellos que presumiblemente entran en contacto con el resto de la molécula a través de interacciones no covalentes, contribuyendo así al mantenimiento de la estructura globular.

Las realizaciones preferentes son aquellas en las que la enzima se estabiliza de varias maneras, ya que varias mutaciones estabilizadoras actúan de manera aditiva o sinérgica.

50 Otro objeto de la invención es una proteasa como la descrita anteriormente, que se caracteriza porque presenta al menos una modificación química. Una proteasa con tal modificación se considera un derivado, es decir, la proteasa está derivada.

55 A los efectos de la presente solicitud, los derivados son, por lo tanto, proteínas cuya cadena de aminoácidos puros ha sido modificada químicamente. Tales derivaciones pueden ser llevadas a cabo *in vivo* por la célula anfitriona que expresa la proteína. A este respecto, cabe destacar los acoplamientos de compuestos de bajo peso molecular como los lípidos u oligosacáridos. Las derivaciones también pueden realizarse *in vitro*, por ejemplo, mediante la conversión química de una cadena lateral de un aminoácido o mediante la unión covalente de otro compuesto a la proteína. Por ejemplo, es posible el acoplamiento de aminas a grupos carboxilo de una enzima para cambiar el punto isoeléctrico. Este otro compuesto puede ser también otra proteína que se une a una proteína según la invención, por ejemplo, a través de compuestos químicos bifuncionales. Análogamente, se entiende por derivación la unión covalente a un portador macromolecular, o la inclusión no covalente en estructuras macromoleculares adecuadas de jaula. La derivación puede, por ejemplo, influir en la especificidad del sustrato o en la fuerza de unión al sustrato o causar un bloqueo temporal de la actividad enzimática si la sustancia acoplada es un inhibidor. Esto puede ser útil, por ejemplo, para el período de almacenamiento. Esas modificaciones también pueden afectar a la estabilidad o a la actividad enzimática. También pueden servir para reducir la alergenicidad y/o inmunogenicidad de la proteína y así, por ejemplo,

aumentar su tolerancia cutánea. Por ejemplo, los acoplamiento con compuestos macromoleculares, como el polietilenglicol, pueden mejorar la estabilidad y/o la compatibilidad cutánea de la proteína.

5 En el sentido más amplio, los derivados de una proteína según la invención también pueden entenderse como preparaciones de estas proteínas. Según la extracción, la elaboración o la preparación, una proteína puede combinarse con otras sustancias diversas, por ejemplo, del cultivo de los microorganismos productores. Una proteína también puede haber sido mezclada específicamente con otras sustancias, por ejemplo, para aumentar su estabilidad de almacenamiento. Por lo tanto, de acuerdo con la invención, todas las preparaciones son también una proteína de acuerdo con la invención. Esto también es independiente de si realmente desarrolla o no esta actividad enzimática en una preparación particular. Esto se debe a que se puede desear que no tenga ninguna o sólo una baja actividad durante el almacenamiento y que sólo desarrolle su función enzimática en el momento de su utilización. Esto puede controlarse, por ejemplo, mediante sustancias acompañantes adecuadas. En particular, es posible la preparación conjunta de proteasas con inhibidores específicos a este respecto.

15 Entre todas las proteasas o variantes de proteasa y/o derivados descritos anteriormente, aquellos cuya actividad catalítica corresponde a al menos una de las proteasas según las SEQ ID Nos: 2-11 y/o cuyo rendimiento de purificación corresponde a al menos una de las proteasas según las SEQ ID Nos: 2-11 son particularmente preferidos en el contexto de la presente invención, determinándose el rendimiento de purificación en un sistema de lavado como se describió anteriormente.

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

25 En este caso puede tratarse de moléculas de ADN o ARN. Pueden estar presentes como una sola hebra, como una sola hebra complementaria a esta sola hebra, o como una doble hebra. Especialmente en el caso de las moléculas de ADN, las secuencias de ambas cadenas complementarias deben ser consideradas en los tres marcos de lectura posibles. También hay que tener en cuenta que diferentes codones, es decir, trillizos de base, pueden codificar para los mismos aminoácidos, de manera que una secuencia de aminoácidos particular, puede ser codificada por varios ácidos nucleicos diferentes. Debido a esta degeneración del código genético, todas las secuencias de ácido nucleico que pueden codificar para una de las proteasas descritas anteriormente están incluidas en este objeto de la invención. El experto es capaz de determinar estas secuencias de ácidos nucleicos sin ninguna duda, ya que, a pesar de la degeneración del código genético, los aminoácidos definidos pueden asignarse a los codones individuales. Por lo tanto, el experto puede determinar fácilmente los ácidos nucleicos que codifican esta secuencia de aminoácidos a partir de una secuencia de aminoácidos. Además, en los ácidos nucleicos según la invención, uno o más codones pueden ser reemplazados por codones sinónimos. Este aspecto se refiere en particular, a la expresión heteróloga de las enzimas de acuerdo con la invención. Así, cada organismo, por ejemplo, una célula huésped de una cepa de producción, tiene un uso específico del codón. El uso del codón significa la traducción del código genético en aminoácidos por el organismo respectivo. Los cuellos de botella en la biosíntesis de las proteínas pueden producirse cuando los codones situados en el ácido nucleico se enfrentan a un número comparativamente pequeño de moléculas de ARNt cargadas en el organismo. Aunque codifica para el mismo aminoácido, esto lleva a que un codón en el organismo se traduzca de manera menos eficiente que un codón sinónimo que codifica para el mismo aminoácido. Debido a la presencia de un mayor número de moléculas de ARNt para el codón sinónimo, se puede traducir más eficientemente en el organismo.

45 Utilizando los métodos generalmente conocidos hoy en día, como la síntesis química o la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en combinación con los métodos estándar de biología molecular y/o química de las proteínas, es posible que un especialista produzca los ácidos nucleicos correspondientes hasta completar los genes utilizando secuencias conocidas de ADN y/o aminoácidos. Tales métodos son conocidos, por ejemplo, por Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. 2001 Molecular cloning: a Laboratory manual, 3ª edición Cold Spring Laboratory Press.

50 Para los fines de esta invención, los vectores se definen como elementos que consisten en ácidos nucleicos que contienen un ácido nucleico de acuerdo con la invención como la región de ácido nucleico característica. Son capaces de establecer este ácido nucleico como un elemento genético estable en una especie o línea celular a lo largo de varias generaciones o divisiones celulares. Los vectores, especialmente cuando se usan en bacterias, son plásmidos especiales, es decir, elementos genéticos circulares. En el contexto de la presente invención, un ácido nucleico de acuerdo con la invención es clonado en un vector. Los vectores incluyen, por ejemplo, aquellos cuyo origen son plásmidos bacterianos, virus o bacteriófagos, o vectores o plásmidos predominantemente sintéticos con elementos de diversos orígenes. Con los demás elementos genéticos presentes en cada caso, los vectores son capaces de establecerse como unidades estables en las células huéspedes en cuestión a lo largo de varias generaciones. Pueden estar presentes extra cromosómicamente como unidades separadas o integradas en un cromosoma o en el ADN cromosómico.

65 Los vectores de expresión comprenden secuencias de ácido nucleico que les permiten replicarse en las células huésped que los contienen, preferentemente microorganismos, especialmente preferentemente bacterias, y expresar allí un ácido nucleico. La expresión está particularmente influenciada por el promotor o promotores que regulan la transcripción. En principio, la expresión puede ser llevada a cabo por el promotor natural localizado originalmente

delante del ácido nucleico que se va a expresar, pero también por un promotor de la célula huésped proporcionado en el vector de expresión o por un promotor modificado o completamente diferente de otro organismo o célula huésped. En el presente caso, al menos un promotor está previsto para la expresión de un ácido nucleico de acuerdo con la invención y se utiliza para su expresión. Los vectores de expresión también pueden regularse, por ejemplo, modificando las condiciones de cultivo o cuando se alcanza una determinada densidad celular de las células huéspedes que contienen o añadiendo determinadas sustancias, en particular, activadores de la expresión genética. Un ejemplo de esta sustancia es el derivado de la galactosa isopropil-β-D-tiogalactopiranosida (IPTG), que se utiliza como activador de la lactosa operón bacteriana (lac-operon). A diferencia de los vectores de expresión, el ácido nucleico contenido no se expresa en los vectores de clonación.

Otro objeto de la invención es una célula huésped no humana que contiene un ácido nucleico o vector de la invención o que contiene una proteasa de la invención, en particular, una que segrega la proteasa en el medio que rodea a la célula huésped. Preferentemente, un ácido nucleico o vector de la invención se transforma en un microorganismo, que es entonces una célula huésped de la invención. Alternativamente, los componentes individuales, es decir, las partes o fragmentos de un ácido nucleico de acuerdo con la invención, pueden introducirse en una célula anfitriona de tal manera que la célula anfitriona resultante contenga un ácido nucleico o un vector de acuerdo con la invención. Este procedimiento es particularmente adecuado si la célula anfitriona ya contiene uno o más componentes de un ácido nucleico o un vector de acuerdo con la invención y los demás componentes se complementan en consecuencia. Los métodos de transformación de las células están establecidos en el estado de la técnica y son suficientemente conocidos por el experto. En principio, todas las células son adecuadas como células huésped, es decir, células procariotas o eucariotas. Se da preferencia a las células huéspedes que pueden manipularse de manera genéticamente ventajosa, por ejemplo, en lo que respecta a la transformación con el ácido nucleico o el vector y su establecimiento estable, como los hongos unicelulares o las bacterias. Además, las células huéspedes preferidas se caracterizan por su buena manejabilidad microbiológica y biotecnológica. Esto se aplica, por ejemplo, a la facilidad de cultivo, las altas tasas de crecimiento, los bajos requisitos de medios de fermentación y las buenas tasas de producción y secreción de proteínas extrañas. Las células huésped preferidas de acuerdo con la invención secretan la proteína expresada (transgénica) en el medio que rodea a las células huésped. Además, las proteasas pueden ser modificadas por las células que las producen después de su producción, por ejemplo, mediante la unión de moléculas de azúcar, formilaciones, aminaciones, etc. Tales modificaciones post-traducción pueden influir funcionalmente en la proteasa.

Otras formas preferidas de realización son las células huésped cuya actividad puede ser regulada por elementos reguladores genéticos, que se proporcionan en el vector, por ejemplo, pero que también pueden estar presentes en esas células desde el principio. Por ejemplo, la adición controlada de compuestos químicos que sirven de activadores, cambiando las condiciones de cultivo o alcanzando una cierta densidad celular, puede estimular la expresión. Esto permite una producción económica de las proteínas de acuerdo con la invención. Un ejemplo de este tipo de compuesto es la IPTG, como se ha descrito anteriormente.

Las células huésped preferidas son las células procariotas o bacterianas. Las bacterias se caracterizan por sus cortos tiempos de generación y sus bajas exigencias a las condiciones de cultivo. Esto permite establecer métodos de cultivo o procedimientos de producción rentables. Además, el experto tiene una gran experiencia con las bacterias en la tecnología de la fermentación. Las bacterias gram negativas o gram positivas pueden ser adecuadas para una producción específica por una amplia variedad de razones que pueden determinarse experimentalmente en casos individuales, como las fuentes de nutrientes, la tasa de formación del producto, los requisitos de tiempo, etc.

En las bacterias gram negativas como la *Escherichia coli*, un gran número de proteínas son secretadas en el espacio periplásmico, es decir, en el compartimento entre las dos membranas que encierran las células. Esto puede ser ventajoso para aplicaciones especiales. Además, las bacterias gram negativas también pueden diseñarse de tal manera que transfieran las proteínas expresadas no sólo al espacio periplásmico sino también al medio que rodea a la bacteria. Por el contrario, las bacterias gram positivas como los bacilos o los actinomicetos u otros representantes de los actinomicetos no tienen una membrana externa, por lo que las proteínas secretadas se liberan inmediatamente en el medio que rodea a las bacterias, generalmente el medio de cultivo, del que se pueden purificar las proteínas expresadas. Pueden ser aislados directamente del medio o procesados posteriormente. Además, las bacterias gram positivas están relacionadas o son idénticas a la mayoría de los organismos de origen de las enzimas técnicamente importantes y suelen formar ellas mismas enzimas comparables, de modo que tienen un uso similar del codón y su aparato de síntesis de proteínas está orientado naturalmente en consecuencia.

Las células huésped de la invención pueden haberse modificado con respecto a sus requisitos para las condiciones de cultivo, pueden tener otros o adicionales marcadores de selección o pueden expresar otras o adicionales proteínas. En particular, también pueden ser células huésped que expresan transgénicamente varias proteínas o enzimas.

En principio, la presente invención es aplicable a todos los microorganismos, en particular, a todos los microorganismos fermentables, de manera especialmente preferente a los del género *Bacillus*, y lleva al hecho de que las proteínas de acuerdo con la invención pueden ser producidas utilizando dichos microorganismos. Tales microorganismos representan entonces las células huéspedes en el sentido de la invención.

En una realización ulterior de la invención, la célula huésped se caracteriza por ser una bacteria, preferentemente una seleccionada del grupo de los géneros de *Escherichia*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter*, *Streptomyces*, *Stenotrophomonas* y *Pseudomonas*, más preferentemente uno de los seleccionado del grupo de *Escherichia coli*, *Klebsiella planticola*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus amyloliquefaciens*,
 5 *Bacillus subtilis*, *Bacillus alcalophilus*, *Bacillus globigii*, *Bacillus gibsonii*, *Bacillus clausii*, *Bacillus halodurans*, *Bacillus pumilus*, *Staphylococcus carnosus*, *Corynebacterium glutamicum*, *Arthrobacter oxidans*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces coelicolor* y *Stenotrophomonas maltophilia*.

Pero la célula anfitriona también puede ser una célula eucariota, que se caracteriza por tener un núcleo. Un objeto más lejano de la invención es por lo tanto una célula anfitriona que se caracteriza por tener un núcleo celular. A diferencia de las células procariontas, las células eucariotas son capaces de modificar de manera postraducciona la proteína formada. Ejemplos de ello son los hongos como los actinomicetos o las levaduras como *Saccharomyces* o *Kluyveromyces*. Esto puede ser particularmente ventajoso, por ejemplo, si las proteínas van a sufrir modificaciones específicas en relación con su síntesis que permitan tales sistemas. Las modificaciones que los sistemas eucariotas llevan a cabo, en particular, en relación con la síntesis de proteínas, incluyen la unión de compuestos de bajo peso molecular como anclas de membrana u oligosacáridos. Esas modificaciones de los oligosacáridos pueden ser deseables, por ejemplo, para reducir la alergenicidad de una proteína expresada. La coexistencia con las enzimas producidas naturalmente por esas células, como las celulasas, también puede ser beneficiosa. Además, los sistemas de expresión de hongos termófilos pueden ser particularmente adecuados para la expresión de proteínas o variantes resistentes a la temperatura.
 10
 15
 20

Las células huésped de la invención se cultivan y fermentan en sistemas convencionales, por ejemplo, en sistemas discontinuos o continuos. En el primer caso, se inocula un medio nutritivo adecuado con las células huésped y el producto se cosecha del medio después de un período de tiempo que se determinará de manera experimental. Las fermentaciones continuas se caracterizan por el logro de un estado estable en el que las células mueren parcialmente pero también vuelven a crecer durante un período de tiempo comparativamente largo y la proteína formada puede ser eliminada del medio al mismo tiempo.
 25

Las células huésped de acuerdo con la invención se utilizan preferentemente para producir proteasas de acuerdo con la invención. Un objeto adicional de la invención es, por lo tanto, un procedimiento para producir una proteasa que comprende
 30 a) cultivar una célula anfitriona de acuerdo con la invención, y
 b) aislar la proteasa del medio de cultivo o de la célula huésped.

Esto objeto de la invención comprende preferentemente procedimientos de fermentación. Los procedimientos de fermentación son conocidos por sí mismos del estado de la técnica y representan el paso real de producción a escala industrial, seguido por lo general por un método adecuado de purificación del producto obtenido, por ejemplo, las proteasas de acuerdo con la invención. Todos los procedimientos de fermentación que se basan en un procedimiento correspondiente para la producción de una proteasa de acuerdo con la invención son realizaciones de esta invención.
 35
 40

Los procedimientos de fermentación que se caracterizan por el hecho de que la fermentación se lleva a cabo utilizando una estrategia de entrada son particularmente adecuados. Aquí se suministran los componentes de los medios consumidos por el cultivo continuo. Esto puede conducir a considerables aumentos en la densidad celular, así como en la masa celular o masa seca y/o especialmente en la actividad de la proteasa de interés. Además, la fermentación también puede diseñarse de manera que los productos metabólicos no deseados sean filtrados o neutralizados adicionando tampones o contrafuertes adecuados.
 45

La proteasa producida puede ser cosechada del medio de fermentación. Este proceso de fermentación es preferente al aislamiento de la proteasa de la célula huésped, es decir, al procesamiento del producto a partir de la masa celular (masa seca), pero requiere la provisión de células huéspedes adecuadas o de uno o más marcadores o mecanismos de secreción adecuados y/o sistemas de transporte para que las células huéspedes secreten la proteasa en el medio de fermentación. Alternativamente, sin secreción, la proteasa puede aislarse de la célula huésped, es decir, purificarse de la masa celular, por ejemplo, mediante la precipitación con sulfato de amonio o etanol, o mediante la purificación cromatográfica.
 50
 55

Todas las circunstancias anteriormente indicadas pueden combinarse para formar procedimientos para la producción de la proteasa de la invención.

Otro objeto de la invención es un agente caracterizado por contener una proteasa de acuerdo con la invención tal como se ha descrito anteriormente. El agente preferentemente es un detergente o agente de limpieza.
 60

Esta invención abarca todos los tipos concebibles de agentes de lavado o limpieza, para usar ya sea concentrados o no diluidos, a escala comercial, en lavadoras o para el lavado o limpieza a mano. Esto incluye, por ejemplo, los detergentes para textiles, alfombras o fibras naturales, para los que se utiliza el término "detergente". Esto incluye también, por ejemplo, los detergentes para lavavajillas o los detergentes para lavar vajillas a mano o los limpiadores para superficies duras como metal, vidrio, porcelana, cerámica, azulejos, piedra, superficies pintadas, plásticos,
 65

madera o cuero, para los que se utiliza el término detergente, es decir, además de los detergentes para lavavajillas a mano y a máquina, también agentes limpiadores, limpiadores de vidrio, lavavajillas para WC, etc. Los agentes de lavado y limpieza dentro del ámbito de la invención también incluyen agentes auxiliares de lavado que se adicionan al agente de lavado propiamente dicho durante el lavado textil manual o a máquina para conseguir un efecto adicional.

Además, los agentes de lavado y limpieza dentro del ámbito de la invención también incluyen agentes textiles de pre- y post-tratamiento, es decir, agentes con los que se pone en contacto la prenda de ropa antes del lavado propiamente dicho, por ejemplo, para disolver la suciedad persistente, y también agentes que, en un paso aguas posterior del lavado textil, proporcionan a la prenda de ropa propiedades más deseables como una sensación agradable, resistencia al arrugado o una baja carga estática. Entre estos últimos agentes se encuentran los suavizantes.

Los detergentes o agentes de limpieza de acuerdo con la invención, que pueden estar disponibles en la forma de sólidos en polvo, en forma de partículas post-comprimidas, como soluciones homogéneas o suspensiones, pueden contener, además de una proteasa de acuerdo con la invención, todos los ingredientes conocidos y habituales en tales agentes, preferentemente al menos un ingrediente adicional que esté presente en el agente. Los agentes de acuerdo con la invención pueden contener en particular, tensioactivos, formadores (sustancias estructurales), agentes blanqueadores, como, en particular, compuestos de peróxígeno, y/o activadores de blanqueo. Además, pueden contener disolventes orgánicos miscibles en agua, otras enzimas, agentes secuestrantes, electrolitos, reguladores de pH y/o otras sustancias auxiliares como blanqueadores ópticos, inhibidores del envejecimiento, reguladores de espuma, así como tintes y fragancias y combinaciones de los mismos.

En particular, es ventajosa la combinación de una proteasa de acuerdo con la invención con uno o más constituyentes adicionales del agente, ya que dicho agente en conformaciones preferentes de la invención presenta un mejor rendimiento de purificación debido a los sinergismos resultantes. Ese sinergismo puede lograrse, en particular, combinando una proteasa de acuerdo con la invención con un agente tensioactivo y/o un formador (sustancia estructural) y/o un compuesto de peróxígeno y/o un activador de la lejía. Sin embargo, en las realizaciones preferentes, el agente de acuerdo con la invención no puede contener ácido bórico.

Los ingredientes ventajosos de las composiciones de la invención se divulgan en la solicitud internacional de patente WO2009/121725, que comienza en la página 5, penúltimo párrafo, y termina en la página 13 después del segundo párrafo. Se hace referencia expresa a esta divulgación y el contenido de la misma se incluye en la presente solicitud de patente.

Un agente de acuerdo con la invención contiene la proteasa ventajosamente en una cantidad de 2 µg a 20 mg, preferentemente de 5 µg a 17,5 mg, de manera particularmente preferente de 20 µg a 15 mg y muy preferentemente de 50 µg a 10 mg por g del agente. Además, la proteasa contenida en la composición y/u otros ingredientes de la misma pueden estar recubiertos de una sustancia que es impermeable a la enzima a temperatura ambiente o en ausencia de agua, y que se vuelve permeable a la enzima en las condiciones de uso de la composición. Tal realización de la invención de este modo esta caracterizada porque la proteasa está recubierta con una sustancia que es impermeable a la proteasa a temperatura ambiente o en ausencia de agua. Además, el agente de lavado o limpieza propiamente dicho puede también envasarse en un recipiente, preferentemente un contenedor permeable al aire, del que se libera poco antes de su utilización o durante el proceso de lavado.

En otras realizaciones de la invención, el agente está caracterizado porque

- a) está presente en forma sólida, en particular, en forma de polvo de flujo libre con una densidad aparente de 300 g/l a 1200 g/l, en particular, de 500 g/l a 900 g/l, o
- b) está presente en forma de pasta o líquido; y/o
- c) está presente en forma de gel o en bolsitas (bolsas); y/o
- d) está presente como un sistema de un solo componente; o
- e) está dividido en varios componentes.

Estas realizaciones de la presente invención comprenden todas formas de presentación sólidas, en polvo, líquidas, en gel o pastosas de agentes de acuerdo con la invención, que posiblemente también puede consistir en varias fases y podrán estar presentes en forma comprimida o no comprimida. El agente puede estar presente como un polvo de flujo libre, en particular con una densidad aparente de 300 g/l a 1200 g/l, en particular de 500 g/l a 900 g/l o de 600 g/l a 850 g/l. Las formas de dosificación sólidas del preparado también incluyen extruidos, gránulos, tabletas o bolsitas. Alternativamente, el agente también puede ser líquido, gel o pasta, por ejemplo, en forma de un detergente líquido no acuoso o una pasta no acuosa o en forma de un detergente líquido acuoso o una pasta que contenga agua. Además, el agente puede estar presente como un sistema de un solo componente. Tales agentes consisten en una fase. Alternativamente, un agente también puede constar de varias fases. Por lo tanto, ese agente se divide en varios componentes.

Los detergentes o agentes de limpieza de acuerdo con la invención sólo pueden contener una proteasa. También pueden contener otras enzimas hidrolíticas u otras enzimas en una concentración apropiada para la eficacia del producto. Una realización ulterior de la invención, por lo tanto, consiste en agentes que comprenden una o más enzimas ulteriores. Como enzimas adicionales pueden usarse preferentemente todas las enzimas que pueden desarrollar una actividad catalítica en el agente de acuerdo con la invención, en particular, una lipasa, amilasa,

- celulasa, - hemicelulasa, mananasa, taninasa, xilanasa, xantanasa, xiloglucanasa, β -glucosidasa, pectinasa, carrageninasa, perhidrolasa, oxidasa, oxidoreductasa u otra proteasa -que pueden diferenciarse de la proteasa de la invención- y sus mezclas. Otras enzimas están ventajosamente contenidas en la composición en una cantidad de 1×10^{18} a 5 % de peso cada una, basadas en la proteína activa. Cada vez más preferentemente, cada enzima adicional está contenida en la composición en una cantidad de 1×10^{17} - 3 % por peso, de 0,00001 a 1% por peso, de 0,00005 a 0,5% por peso, de 0,0001 a 0,1% por peso, y particularmente preferente de 0,0001 a 0,05 % en peso, basado en proteína activa. Las enzimas muestran un rendimiento de limpieza sinérgico particularmente preferente en relación con ciertas manchas o suciedades, es decir, las enzimas contenidas en la composición del agente se apoyan mutuamente en su rendimiento de limpieza. Tal sinergia es particularmente preferida entre la proteasa contenida en la composición de la invención y otra enzima de un agente de acuerdo con la invención, incluyendo en particular entre la mencionada proteasa y una amilasa y/o una lipasa y/o una mananasa y/o una celulasa y/o una pectinasa. Pueden producirse efectos sinérgicos no sólo entre las diferentes enzimas, sino también entre una o más enzimas y otros ingredientes del agente de la invención.
- 15 Un objeto ulterior de la invención es un procedimiento para la limpieza de textiles o superficies duras, que se caracteriza porque un agente de acuerdo con la invención se utiliza en al menos un paso del procedimiento, o que una proteasa de acuerdo con la invención se convierte en catalíticamente activa en al menos un paso del procedimiento, en particular de tal manera que la proteasa se utiliza en una cantidad de 40 μ g a 4g, preferentemente de 50 μ g a 3g, de manera particularmente preferente de 100 μ g a 2g y muy particularmente preferente de 200 μ g a 1g.
- 20 En diferentes realizaciones el procedimiento descrito anteriormente se caracteriza porque la proteasa se utiliza a una temperatura de 0-100°C, preferentemente 0-60°C, más preferentemente 20-45°C y de máxima preferencia a 40°C.
- 25 Esto incluye tanto procedimientos manuales como mecánicos, en los que se prefieren los procedimientos mecánicos. Los métodos de limpieza de los textiles generalmente están caracterizados porque en varias etapas del procedimiento se aplican diferentes sustancias activas de limpieza al material que se va a limpiar y se lavan después del tiempo de exposición, o que el material que se va a limpiar se trata de alguna otra manera con un detergente o una solución o dilución de este agente. Lo mismo se aplica a los procedimientos de limpieza de todos los materiales que no sean textiles, especialmente las superficies duras. Todos los procesos concebibles de lavado o limpieza pueden ser enriquecidos en al menos uno de los pasos del procedimiento por la aplicación de un agente de lavado o limpieza o una proteasa de acuerdo con la invención y luego constituir la realización de la presente invención. Todos los hechos, objetos y realizaciones descritos para la proteasa y los agentes que la contienen son también aplicables a esta invención. Por lo tanto, en este punto se hace referencia explícita a la divulgación en el lugar apropiado con la observación de que esta divulgación también se aplica a los procedimientos relacionados con la invención antes mencionados.
- 30 Debido a que las proteasas de acuerdo con la invención naturalmente ya poseen una actividad hidrolítica y también desarrollan esta actividad en medios que de otra manera no poseen ningún poder de limpieza, como por ejemplo en un mero tampón, un solo paso y/o el único paso en tal procedimiento puede consistir en que el único componente activo de limpieza es una proteasa de acuerdo con la invención que es puesta en contacto con la suciedad, preferentemente en una solución buffer o en el agua. Esto representa otra realización adicional de este objeto de la invención.
- 40 Las realizaciones alternativas de este objeto de invención también constituyen procedimientos para el tratamiento de materias primas textiles o para el cuidado de los textiles, en los que una proteasa de acuerdo con la invención es activada en al menos un paso del proceso. Entre ellos, se prefieren los procedimientos para materias primas textiles, fibras o textiles con componentes naturales, y especialmente para los de lana o seda.
- 45 Finalmente, la invención también comprende el uso de las proteasas descritas aquí en detergentes o agentes de limpieza, por ejemplo, como se describió anteriormente, para la eliminación (mejorada) de la suciedad que contiene proteínas, por ejemplo, de materiales textiles o de superficies duras.
- 50 Todos los hechos, objetos y realizaciones descritos para las proteasas de acuerdo con la invención y los agentes que las contienen son también aplicables a este objeto de la invención. Por lo tanto, en este punto se hace referencia explícita a la divulgación en el lugar correspondiente con la observación de que esta divulgación también se aplica al uso inventivo antes mencionado.
- 55

Ejemplos

60 **Ejemplo 1: ensayo de lavado**

Resumen de las mutaciones:

- 65 Esta invención se refiere a una proteasa alcalina de tipo subtilisina del *Bacillus pumilus*. Las variantes de esta proteasa se produjeron por mutagénesis aleatoria, que luego fueron examinadas para mejorar el rendimiento del lavado, entre otras propiedades.

Variante	Secuencia			SEQ ID NO:
Mutante 1	P86S	S236A		2
Mutante 2	Q62E			3
Mutante 3	Q62E	L82F		4
Mutante 4	Q10E			5
Mutante 5	N130D	T141K	T253S	6
Mutante 6	P86A			7
Mutante 7	P9H	Q62E	L82F	8
Mutante 8	Q62E	L82F	N187H	9
Mutante 9	Q62E	N130D		10
Mutante 10	P86S	N187H	S236A	11

Matriz de agente de lavado usada

- 5 Esta es una matriz de agente de lavado usual en el mercado, que se usó para el ensayo de lavado:

Nombre químico	% en peso de sustancia activa en la materia prima	% en peso de sustancia activa en la formulación
Agua desmineralizada	100	resto
Ácido alquilbencensulfónico	96	4,4
Tensioactivos aniónicos	70	5,6
Ácido graso C12-C18 sal de sodio	30	2,4
Tensioactivos no iónicos	100	4,4
Fosfonatos	40	0,2
Ácido cítrico	100	1,4
NaOH	50	0,95
Agente antiespumante	t. q.	0,01
Glicerina	100	2
Agente conservante	100	0,08
Etanol	93	1
Sin aclarantes ópticos, perfume, colorantes y enzimas.		

Dosificación 4,7 g/l

10 Ensayos de actividad de la proteasa

La actividad de la proteasa está determinada por la liberación del cromóforo para-nitroanilina del sustrato succinil alanina-alanina-prolina-fenilalanina-para-nitroanilida (AAPFpNA; Bachem L-1400). La liberación del pNA causa un aumento de la absorbancia a 410 nm, cuyo curso temporal es una medida de la actividad enzimática.

- 15 La medición se realizó a una temperatura de 25°C, a un pH de 8,6 y una longitud de onda de 410 nm. El tiempo de medición fue de 5 minutos con un intervalo de medición de 20 a 60 segundos.

Abordaje de medición:

- 10 µl de solución de AAPF (70 mg/mL)
 20 1000 µl de Tris/HCl (0,1 M; pH 8,6 con 0,1 % Brij 35)
 10 µl de solución de proteasa diluida
 La cinética se generó durante 5 minutos a 25°C (410 nm)

Ensayo de lavado y resultados

- 25 Ensayo de mini lavado con sobrenadantes de cultivo de *Bacillus subtilis* que contienen los mutantes de proteasa tamizados por expresión heteróloga. Los sobrenadantes se utilizan con la misma actividad que el punto de referencia = proteasa de tipo salvaje con una concentración habitual en el mercado de las proteasas de los detergentes.

Condiciones: 40°C, 16°dH de agua, 1 h

- 30 Suciedad:

1. CFT CS038 (yema de huevo con pigmento (secado) en algodón; Center for Testmaterials Cft B.V., Vlaardingen, NL)
2. CFT PC-10 (aceite de cacahuete, pigmento, leche sobre poliéster/algodón; Center for Testmaterials Cft B.V., Vlaardingen, NL)
- 35 3. WfK 10N (huevo/pigmento en el algodón, wfk - Cleaning Technology Institute e.V., Krefeld, EN)
4. CFT C-03 (cacao/ hollín sobre algodón; Center for Test Materials Cft B.V., Vlaardingen, NL)
5. EMPA 112 (cacao sobre algodón; Swissatest Testmaterialien AG, St. Gallen, CH)

ES 2 824 482 T3

6° CFT C-05 (sangre, leche, tinta en el algodón; Center for Test Materials Cft B.V., Vlaardingen, NL)

- 5 Colocar porciones de tejido cortadas con punzón (diámetro = 10 mm) en una placa de microtitulación, precalentar el líquido de lavado a 40°C, concentración final de 4,7 g/l, lejía y enzima a la suciedad, incubar durante 1 h a 40°C y 600 rpm, luego enjuagar la suciedad varias veces con agua clara, dejar secar y determinar el grado de claridad con un colorímetro. Cuanto más claro sea el tejido, mejor será el rendimiento de la limpieza. Se mide el valor L = claridad, cuanto más elevado sea más claro o brillante. Se indica la suma de las 6 manchas en % en relación con el tipo salvaje.

Variante	Rendimiento de lavado (delta L) (respecto del rendimiento de lavado de la proteasa TS (SEQ ID NO:1))
Mutante 1	142 %
Mutante 2	146 %
Mutante 3	142 %
Mutante 4	162 %
Mutante 5	148 %
Mutante 6	167 %
Mutante 7	156 %
Mutante 8	129 %
Mutante 9	112 %
Mutante 10	121 %

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Henkel AG & Co. KGaA

<120> Poder de limpieza mejorado en suciedad sensible a proteínas

<130> PT033597PCT

5 <150> 102016204814.7

<151> 2016-03-23

<160> 11

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

10 <211> 275

<212> PRT

<213> Bacillus pumilus

<400> 1

Ala Gln Thr Val Pro Tyr Gly Ile Pro Gln Ile Lys Ala Pro Ala Val
1 5 10 15

His Ala Gln Gly Tyr Lys Gly Ala Asn Val Lys Val Ala Val Leu Asp
20 25 30

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

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

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

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

Asp Arg Asn Gly Asp Gly Gln Tyr Ser Trp Ile Ile Ser Gly Ile Glu
100 105 110

Trp Ala Val Ala Asn Asn Met Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly
115 120 125

Pro Asn Gly Ser Thr Ala Leu Lys Asn Ala Val Asp Thr Ala Asn Asn
130 135 140

Arg Gly Val Val Val Val Ala Ala Ala Gly Asn Ser Gly Ser Thr Gly
145 150 155 160

ES 2 824 482 T3

Ser Thr Ser Thr Val Gly Tyr Pro Ala Lys Tyr Asp Ser Thr Ile Ala
 165 170 175

Val Ala Asn Val Asn Ser Ser Asn Val Arg Asn Ser Ser Ser Ala
 180 185 190

Gly Pro Glu Leu Asp Val Ser Ala Pro Gly Thr Ser Ile Leu Ser Thr
 195 200 205

Val Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Thr Gly Thr Ser Met Ala Ser
 210 215 220

Pro His Val Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lys Asn Pro Asn
 225 230 235 240

Leu Ser Asn Ser Gln Val Arg Gln Arg Leu Glu Asn Thr Ala Thr Pro
 245 250 255

Leu Gly Asn Ser Phe Tyr Tyr Gly Lys Gly Leu Ile Asn Ala Gln Ala
 260 265 270

Ala Ser Asn
 275

<210> 2

<211> 275

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteasa de Bacillus pumilus con mutaciones puntuales

<400> 2

Ala Gln Thr Val Pro Tyr Gly Ile Pro Gln Ile Lys Ala Pro Ala Val
 1 5 10 15

His Ala Gln Gly Tyr Lys Gly Ala Asn Val Lys Val Ala Val Leu Asp
 20 25 30

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

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

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

Val Leu Gly Val Ala Ser Ser Ala Ser Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu

ES 2 824 482 T3

Ala Gln Thr Val Pro Tyr Gly Ile Pro Gln Ile Lys Ala Pro Ala Val
1 5 10 15

His Ala Gln Gly Tyr Lys Gly Ala Asn Val Lys Val Ala Val Leu Asp
20 25 30

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

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

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

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

Asp Arg Asn Gly Asp Gly Gln Tyr Ser Trp Ile Ile Ser Gly Ile Glu
100 105 110

Trp Ala Val Ala Asn Asn Met Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly
115 120 125

Pro Asn Gly Ser Thr Ala Leu Lys Asn Ala Val Asp Thr Ala Asn Asn
130 135 140

Arg Gly Val Val Val Val Ala Ala Ala Gly Asn Ser Gly Ser Thr Gly
145 150 155 160

Ser Thr Ser Thr Val Gly Tyr Pro Ala Lys Tyr Asp Ser Thr Ile Ala
165 170 175

Val Ala Asn Val Asn Ser Ser Asn Val Arg Asn Ser Ser Ser Ser Ala
180 185 190

Gly Pro Glu Leu Asp Val Ser Ala Pro Gly Thr Ser Ile Leu Ser Thr
195 200 205

Val Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Thr Gly Thr Ser Met Ala Ser
210 215 220

Pro His Val Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lys Asn Pro Asn
225 230 235 240

Leu Ser Asn Ser Gln Val Arg Gln Arg Leu Glu Asn Thr Ala Thr Pro
245 250 255

Leu Gly Asn Ser Phe Tyr Tyr Gly Lys Gly Leu Ile Asn Ala Gln Ala

260

265

270

Ala Ser Asn
275

<210> 4

<211> 275

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteasa de Bacillus pumilus con mutaciones puntuales

<400> 4

Ala Gln Thr Val Pro Tyr Gly Ile Pro Gln Ile Lys Ala Pro Ala Val
1 5 10 15

His Ala Gln Gly Tyr Lys Gly Ala Asn Val Lys Val Ala Val Leu Asp
20 25 30

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

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

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

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

Asp Arg Asn Gly Asp Gly Gln Tyr Ser Trp Ile Ile Ser Gly Ile Glu
100 105 110

Trp Ala Val Ala Asn Asn Met Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly
115 120 125

Pro Asn Gly Ser Thr Ala Leu Lys Asn Ala Val Asp Thr Ala Asn Asn
130 135 140

Arg Gly Val Val Val Val Ala Ala Ala Gly Asn Ser Gly Ser Thr Gly
145 150 155 160

Ser Thr Ser Thr Val Gly Tyr Pro Ala Lys Tyr Asp Ser Thr Ile Ala
165 170 175

Val Ala Asn Val Asn Ser Ser Asn Val Arg Asn Ser Ser Ser Ser Ala
180 185 190

ES 2 824 482 T3

Gly Pro Glu Leu Asp Val Ser Ala Pro Gly Thr Ser Ile Leu Ser Thr
 195 200 205

Val Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Thr Gly Thr Ser Met Ala Ser
 210 215 220

Pro His Val Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lys Asn Pro Asn
 225 230 235 240

Leu Ser Asn Ser Gln Val Arg Gln Arg Leu Glu Asn Thr Ala Thr Pro
 245 250 255

Leu Gly Asn Ser Phe Tyr Tyr Gly Lys Gly Leu Ile Asn Ala Gln Ala
 260 265 270

Ala Ser Asn
 275

<210> 5

<211> 275

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteasa de Bacillus pumilus con mutación puntual

<400> 5

Ala Gln Thr Val Pro Tyr Gly Ile Pro Glu Ile Lys Ala Pro Ala Val
 1 5 10 15

His Ala Gln Gly Tyr Lys Gly Ala Asn Val Lys Val Ala Val Leu Asp
 20 25 30

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

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

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

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

Asp Arg Asn Gly Asp Gly Gln Tyr Ser Trp Ile Ile Ser Gly Ile Glu
 100 105 110

ES 2 824 482 T3

Trp Ala Val Ala Asn Asn Met Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly
 115 120 125

Pro Asn Gly Ser Thr Ala Leu Lys Asn Ala Val Asp Thr Ala Asn Asn
 130 135 140

Arg Gly Val Val Val Val Ala Ala Ala Gly Asn Ser Gly Ser Thr Gly
 145 150 155 160

Ser Thr Ser Thr Val Gly Tyr Pro Ala Lys Tyr Asp Ser Thr Ile Ala
 165 170 175

Val Ala Asn Val Asn Ser Ser Asn Val Arg Asn Ser Ser Ser Ala
 180 185 190

Gly Pro Glu Leu Asp Val Ser Ala Pro Gly Thr Ser Ile Leu Ser Thr
 195 200 205

Val Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Thr Gly Thr Ser Met Ala Ser
 210 215 220

Pro His Val Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lys Asn Pro Asn
 225 230 235 240

Leu Ser Asn Ser Gln Val Arg Gln Arg Leu Glu Asn Thr Ala Thr Pro
 245 250 255

Leu Gly Asn Ser Phe Tyr Tyr Gly Lys Gly Leu Ile Asn Ala Gln Ala
 260 265 270

Ala Ser Asn
 275

<210> 6

<211> 275

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteasa de Bacillus pumilus con mutaciones puntuales

<400> 6

Ala Gln Thr Val Pro Tyr Gly Ile Pro Gln Ile Lys Ala Pro Ala Val
 1 5 10 15

His Ala Gln Gly Tyr Lys Gly Ala Asn Val Lys Val Ala Val Leu Asp
 20 25 30

ES 2 824 482 T3

Thr Gly Ile His Ala Ala His Pro Asp Leu Asn Val Ala Gly Gly Ala
 35 40 45
 Ser Phe Val Pro Ser Glu Pro Asn Ala Thr Gln Asp Phe Gln Ser His
 50 55 60
 Gly Thr His Val Ala Gly Thr Ile Ala Ala Leu Asp Asn Thr Ile Gly
 65 70 75 80
 Val Leu Gly Val Ala Pro Ser Ala Ser Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu
 85 90 95
 Asp Arg Asn Gly Asp Gly Gln Tyr Ser Trp Ile Ile Ser Gly Ile Glu
 100 105 110
 Trp Ala Val Ala Asn Asn Met Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly
 115 120 125
 Pro Asp Gly Ser Thr Ala Leu Lys Asn Ala Val Asp Lys Ala Asn Asn
 130 135 140
 Arg Gly Val Val Val Val Ala Ala Ala Gly Asn Ser Gly Ser Thr Gly
 145 150 155 160
 Ser Thr Ser Thr Val Gly Tyr Pro Ala Lys Tyr Asp Ser Thr Ile Ala
 165 170 175
 Val Ala Asn Val Asn Ser Ser Asn Val Arg Asn Ser Ser Ser Ala
 180 185 190
 Gly Pro Glu Leu Asp Val Ser Ala Pro Gly Thr Ser Ile Leu Ser Thr
 195 200 205
 Val Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Thr Gly Thr Ser Met Ala Ser
 210 215 220
 Pro His Val Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lys Asn Pro Asn
 225 230 235 240
 Leu Ser Asn Ser Gln Val Arg Gln Arg Leu Glu Asn Ser Ala Thr Pro
 245 250 255
 Leu Gly Asn Ser Phe Tyr Tyr Gly Lys Gly Leu Ile Asn Ala Gln Ala
 260 265 270
 Ala Ser Asn
 275

<210> 7

<211> 275

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Proteasa de Bacillus pumilus con mutación puntual

<400> 7

Ala Gln Thr Val Pro Tyr Gly Ile Pro Gln Ile Lys Ala Pro Ala Val
1 5 10 15

His Ala Gln Gly Tyr Lys Gly Ala Asn Val Lys Val Ala Val Leu Asp
20 25 30

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

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

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

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

Asp Arg Asn Gly Asp Gly Gln Tyr Ser Trp Ile Ile Ser Gly Ile Glu
100 105 110

Trp Ala Val Ala Asn Asn Met Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly
115 120 125

Pro Asn Gly Ser Thr Ala Leu Lys Asn Ala Val Asp Thr Ala Asn Asn
130 135 140

Arg Gly Val Val Val Val Ala Ala Ala Gly Asn Ser Gly Ser Thr Gly
145 150 155 160

Ser Thr Ser Thr Val Gly Tyr Pro Ala Lys Tyr Asp Ser Thr Ile Ala
165 170 175

Val Ala Asn Val Asn Ser Ser Asn Val Arg Asn Ser Ser Ser Ser Ala
180 185 190

Gly Pro Glu Leu Asp Val Ser Ala Pro Gly Thr Ser Ile Leu Ser Thr
195 200 205

Val Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Thr Gly Thr Ser Met Ala Ser
 210 215 220

Pro His Val Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lys Asn Pro Asn
 225 230 235 240

Leu Ser Asn Ser Gln Val Arg Gln Arg Leu Glu Asn Thr Ala Thr Pro
 245 250 255

Leu Gly Asn Ser Phe Tyr Tyr Gly Lys Gly Leu Ile Asn Ala Gln Ala
 260 265 270

Ala Ser Asn
 275

<210> 8

<211> 275

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteasa de Bacillus pumilus con mutaciones puntuales

<400> 8

Ala Gln Thr Val Pro Tyr Gly Ile His Gln Ile Lys Ala Pro Ala Val
 1 5 10 15

His Ala Gln Gly Tyr Lys Gly Ala Asn Val Lys Val Ala Val Leu Asp
 20 25 30

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

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

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

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

Asp Arg Asn Gly Asp Gly Gln Tyr Ser Trp Ile Ile Ser Gly Ile Glu
 100 105 110

Trp Ala Val Ala Asn Asn Met Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly
 115 120 125

Pro Asn Gly Ser Thr Ala Leu Lys Asn Ala Val Asp Thr Ala Asn Asn

ES 2 824 482 T3

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

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

Asp Arg Asn Gly Asp Gly Gln Tyr Ser Trp Ile Ile Ser Gly Ile Glu
100 105 110

Trp Ala Val Ala Asn Asn Met Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly
115 120 125

Pro Asn Gly Ser Thr Ala Leu Lys Asn Ala Val Asp Thr Ala Asn Asn
130 135 140

Arg Gly Val Val Val Val Ala Ala Ala Gly Asn Ser Gly Ser Thr Gly
145 150 155 160

Ser Thr Ser Thr Val Gly Tyr Pro Ala Lys Tyr Asp Ser Thr Ile Ala
165 170 175

Val Ala Asn Val Asn Ser Ser Asn Val Arg His Ser Ser Ser Ser Ala
180 185 190

Gly Pro Glu Leu Asp Val Ser Ala Pro Gly Thr Ser Ile Leu Ser Thr
195 200 205

Val Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Thr Gly Thr Ser Met Ala Ser
210 215 220

Pro His Val Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lys Asn Pro Asn
225 230 235 240

Leu Ser Asn Ser Gln Val Arg Gln Arg Leu Glu Asn Thr Ala Thr Pro
245 250 255

Leu Gly Asn Ser Phe Tyr Tyr Gly Lys Gly Leu Ile Asn Ala Gln Ala
260 265 270

Ala Ser Asn
275

<210> 10

<211> 275

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 824 482 T3

<223> Proteasa de Bacillus pumilus con mutaciones puntuales

<400> 10

Ala Gln Thr Val Pro Tyr Gly Ile Pro Gln Ile Lys Ala Pro Ala Val
 1 5 10 15

His Ala Gln Gly Tyr Lys Gly Ala Asn Val Lys Val Ala Val Leu Asp
 20 25 30

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

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

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

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

Asp Arg Asn Gly Asp Gly Gln Tyr Ser Trp Ile Ile Ser Gly Ile Glu
 100 105 110

Trp Ala Val Ala Asn Asn Met Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly
 115 120 125

Pro Asp Gly Ser Thr Ala Leu Lys Asn Ala Val Asp Thr Ala Asn Asn
 130 135 140

Arg Gly Val Val Val Val Ala Ala Ala Gly Asn Ser Gly Ser Thr Gly
 145 150 155 160

Ser Thr Ser Thr Val Gly Tyr Pro Ala Lys Tyr Asp Ser Thr Ile Ala
 165 170 175

Val Ala Asn Val Asn Ser Ser Asn Val Arg Asn Ser Ser Ser Ser Ala
 180 185 190

Gly Pro Glu Leu Asp Val Ser Ala Pro Gly Thr Ser Ile Leu Ser Thr
 195 200 205

Val Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Thr Gly Thr Ser Met Ala Ser
 210 215 220

Pro His Val Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lys Asn Pro Asn
 225 230 235 240

ES 2 824 482 T3

Leu Ser Asn Ser Gln Val Arg Gln Arg Leu Glu Asn Thr Ala Thr Pro
 245 250 255

Leu Gly Asn Ser Phe Tyr Tyr Gly Lys Gly Leu Ile Asn Ala Gln Ala
 260 265 270

Ala Ser Asn
 275

<210> 11

<211> 275

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteasa de Bacillus pumilus con mutaciones puntuales

<400> 11

Ala Gln Thr Val Pro Tyr Gly Ile Pro Gln Ile Lys Ala Pro Ala Val
 1 5 10 15

His Ala Gln Gly Tyr Lys Gly Ala⁵ Asn Val Lys Val Ala Val Leu Asp
 20 25 30

Thr Gly Ile His Ala Ala His Pro Asp Leu⁵ Asn Val Ala Gly Gly Ala
 35 40 45

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

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

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

Asp Arg Asn Gly Asp Gly Gln Tyr Ser Trp Ile Ile Ser Gly Ile Glu
 100 105 110

Trp Ala Val Ala Asn Asn Met Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly
 115 120 125

Pro Asn Gly Ser Thr Ala Leu Lys Asn Ala Val Asp Thr Ala Asn Asn
 130 135 140

Arg Gly Val Val Val Val Ala Ala Ala Gly Asn Ser Gly Ser Thr Gly
 145 150 155 160

ES 2 824 482 T3

Ser Thr Ser Thr Val Gly Tyr Pro Ala Lys Tyr Asp Ser Thr Ile Ala
 165 170 175

Val Ala Asn Val Asn Ser Ser Asn Val Arg His Ser Ser Ser Ser Ala
 180 185 190

Gly Pro Glu Leu Asp Val Ser Ala Pro Gly Thr Ser Ile Leu Ser Thr
 195 200 205

Val Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Ser Tyr Thr Gly Thr Ser Met Ala Ser
 210 215 220

Pro His Val Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ile Leu Ala Lys Asn Pro Asn
 225 230 235 240

Leu Ser Asn Ser Gln Val Arg Gln Arg Leu Glu Asn Thr Ala Thr Pro
 245 250 255

Leu Gly Asn Ser Phe Tyr Tyr Gly Lys Gly Leu Ile Asn Ala Gln Ala
 260 265 270

Ala Ser Asn
 275

REIVINDICACIONES

1. Proteasa que comprende una secuencia de aminoácidos que a lo largo de su longitud total presenta al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:1 y que presenta una sustitución de aminoácidos en al menos una de las posiciones P9, Q10, Q62, L82, P86, N130, T141, N187, S236 o T253, en cada caso basada en la numeración según la SEQ ID NO: 1, en la que se selecciona al menos una sustitución de aminoácidos del grupo formado por P9H, Q10E, Q62E, L82F, P86S, P86A, N130D, T141K, N187H, S236A o T253S, cada uno de ellos basado en la numeración según la SEQ ID NO:1.
2. Proteasa de acuerdo con la reivindicación 1, siendo que la proteasa presenta una de las variantes de sustitución de aminoácidos:
 - (i) P86S y S236A;
 - (ii) Q62E;
 - (iii) Q62E y L82F;
 - (iv) Q10E;
 - (v) N130D, T141K y T253S;
 - (vi) P86A;
 - (vii) P9H, Q62E y L82F;
 - (viii) Q62E, L82F y N187H;
 - (ix) Q62E y N130D; o
 - (x) P86S, N187H y S236A.
3. Proteasa, caracterizada porque
 - a) se obtiene de una proteasa de acuerdo con la reivindicación 1-2 como molécula de partida por sustitución de aminoácidos conservadora simple o múltiple, en la que la proteasa contiene al menos una de las sustituciones de aminoácidos P9H, Q10E, Q62E, L82F, P86S, P86A, N130D, T141K, N187H, S236A o T253S en las posiciones correspondientes a las posiciones 9, 10, 62, 82, 86, 130, 141, 187 y 236 según SEQ ID NO: 1; y/o
 - b) se obtiene de una proteasa de acuerdo con la reivindicación 1-2 como molécula inicial por fragmentación, supresión, inserción o sustitución mutagénica y comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270 o 275 aminoácidos contiguos es idéntica a la molécula inicial, en la que la proteasa contiene al menos una de las sustituciones de aminoácidos P9H, Q10E, Q62E, L82F, P86S, P86A, N130D, T141K, N187H, S236A o T253S en las posiciones correspondientes a las posiciones 9, 10, 62, 82, 86, 130, 141, 187 y 236 de la SEQ ID NO: 1 de acuerdo con la ID NO: 1 de SEQ.
4. Procedimiento para la producción de una proteasa que comprende la sustitución de un aminoácido por lo menos en una de las posiciones correspondientes a las posiciones 9, 10, 62, 82, 86, 130, 141, 187 y 236 en la SEQ ID NO:1 en una proteasa inicial que tiene por lo menos el 90 % de identidad de secuencia en toda su longitud a la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO:1, de tal manera que la proteasa comprende la sustitución de aminoácidos P9H, Q10E, Q62E, L82F, P86S, P86A, N130D, T141K, N187H, S236A o T253S en al menos una posición.
5. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende además uno o ambos de los siguientes pasos del procedimiento:
 - a) sustitución de al menos un aminoácido por una sustitución conservadora simple o múltiple de aminoácidos, en la que la proteasa comprende al menos una de las sustituciones de aminoácidos P9H, Q10E, Q62E, L82F, P86S, P86A, N130D, T141K, N187H, S236A o T253S en las posiciones correspondientes a las posiciones 9, 10, 62, 82, 86, 130, 141, 187 y 236 de acuerdo con la SEQ ID NO:1;
 - b) modificación de la secuencia de aminoácidos por fragmentación, supresión, inserción o mutagénesis de sustitución de tal manera que la proteasa comprenda una secuencia de aminoácidos de una longitud mínima de 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270 o 275 aminoácidos contiguos es idéntica a la molécula inicial, en la que la proteasa tiene al menos una de las sustituciones de aminoácidos P9H, Q10E, Q62E, L82F, P86S, P86A, N130D, T141K, N187H, S236A o T253S en las posiciones correspondientes a las posiciones 9, 10, 62, 82, 86, 130, 141, 187 y 236 de la SEQ ID NO: 1 de acuerdo con SEQ ID NO: 1.
6. Ácido nucleico que codifica para una proteasa de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3 o que codifica para una proteasa que puede obtenerse por medio de un procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 4 o 5.
7. Vector que contiene un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 6, en particular un vector de clonación o un vector de expresión.
8. Célula huésped no humana que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 6 o un vector de acuerdo con la reivindicación 7, o que comprende una proteasa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, o que comprende una proteasa que puede obtenerse según un procedimiento de las reivindicaciones 4 o 5.

9. Procedimiento para producir una proteasa que comprende
a) cultivar una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 8; y
b) aislar la proteasa del medio de cultivo o de la célula huésped.
- 5 10. Agente, en particular, un agente de lavado o limpieza, caracterizado porque contiene al menos una proteasa de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-3 o una proteasa que puede obtenerse de acuerdo con un procedimiento de las reivindicaciones 4 o 5.
- 10 11. Procedimiento para la limpieza de textiles o superficies duras, caracterizado porque se usa un agente de acuerdo con la reivindicación 10 en al menos una etapa del procedimiento, o que se usa una proteasa de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3 o una proteasa que puede obtenerse mediante un procedimiento de las reivindicaciones 4 o 5 en al menos una etapa del procedimiento.
- 15 12. Uso de una proteasa de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3 o una proteasa que puede obtenerse de acuerdo con un procedimiento de las reivindicaciones 4 o 5 en un detergente o agente limpiador para eliminar la suciedad que contenga péptidos o proteínas.