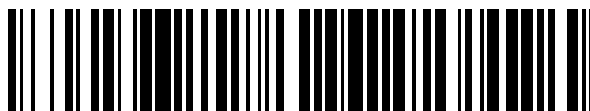


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 763 235**

51 Int. Cl.:

C12N 9/52 (2006.01)

C11D 3/386 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2015 E 18177901 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.10.2019 EP 3399031**

54 Título: **Composición detergente que comprende variantes de subtilasa**

30 Prioridad:

15.12.2014 EP 14198025

15.12.2014 EP 14198027

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

27.05.2020

73 Titular/es:

HENKEL AG & CO. KGAA (100.0%)

Henkelstrasse 67

40589 Düsseldorf, DE

72 Inventor/es:

O'CONNELL, TIMOTHY;

TONDERA, SUSANNE;

HELLMUTH, HENDRIK;

WEBER, THOMAS;

LENHARD, ROLF THOMAS;

LARSEN, SIGNE ESKILDSSEN;

PEREIRA TOSCANO, MIGUEL DUARTE

GUILHERME;

FRIIS, ESBEN PETER;

MUNCH, ASTRID;

BAUER, MIKAEL y

LUE, BENA-MARIE

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 763 235 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

Composición detergente que comprende variantes de subtilasa

5 Referencia a un listado de secuencias

Esta solicitud contiene un Listado de Secuencias en forma legible por ordenador, que se incorpora aquí como referencia.

10 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

15 La presente invención se refiere a una composición detergente que comprende nuevas variantes de subtilasa que exhiben una mayor estabilidad y/o un rendimiento en lavado mejorado en composiciones detergentes líquidas. Además, la presente invención se refiere a métodos para producir dichas composiciones detergentes y al uso de dichas composiciones detergentes en aplicaciones de limpieza.

20 Descripción de la técnica relacionada

En la industria de los detergentes, las enzimas se han implementado durante muchas décadas en formulaciones de lavado. Las enzimas utilizadas en tales formulaciones comprenden proteasas, lipasas, amilasas, celulasas, manosidasas, así como otras enzimas o mezclas de las mismas. Comercialmente las enzimas más importantes son las proteasas.

25 Una subtilasa de tipo salvaje que se ha usado en lavado es la proteasa BLAP descrita en el documento WO91/02792. Un número cada vez mayor de proteasas usadas comercialmente son variantes manipuladas de proteínas proteasas salvajes de origen natural Everlase®, Relase®, Ovozyme®, Polarzyme®, Liquease®, Liquease Ultra® y Kannase® (Novozymes a/s), Purafast®, Purafect OXP®, FN3®, FN4® y Excellase® (Genencor International, Inc.). Además, se describen una serie de variantes en la técnica, como en el documento WO2004/041979 (NOVOZYMES A/S) que describe variantes de subtilasa que exhiben alteraciones en relación con la subtilasa original en, por ejemplo, Rendimiento en lavado, estabilidad térmica, estabilidad durante el lavado o actividad catalítica. Las variantes son adecuadas para su uso en, por ejemplo, composiciones de limpieza o detergentes. Se han descrito variantes de la proteasa BLAP y adecuadas para su uso en composiciones de limpieza o detergentes, por ejemplo, EP701605, DE 102012215642 A2, WO 03/038082 A2, WO 2012/080202 A1, WO 2012/080201 A2 y DE 102009029513 A1. Del documento WO 2011/072117 A1 se conocen variantes BPN', del documento WO 2011/140316 A1 y del documento WO 2010/056653 GG36 se conocen variantes y del documento WO 95/30011 A2 se conocen variantes de savinasa.

40 El documento WO99/57155 describe enzimas detergentes tales como proteasas modificadas mediante la unión de un dominio de unión a celulosa a las enzimas. Se sugiere que la unión de las enzimas detergentes, como la proteasa, a textiles que contienen celulosa mejoraría el rendimiento del lavado.

45 Sin embargo, diversos factores hacen que la mejora adicional de las proteasas sea ventajosa. En particular, las composiciones detergentes líquidas siguen siendo un desafío para muchas proteasas detergentes y la pérdida de actividad durante el almacenamiento sigue siendo un problema para muchas buenas proteasas detergentes. Por lo tanto, a pesar de la intensa investigación en el desarrollo de proteasas, sigue existiendo la necesidad de proteasas nuevas y mejoradas que tengan un rendimiento en lavado satisfactorio y una mayor estabilidad en las composiciones detergentes.

50 Resumen de la invención

La invención se refiere a una composición detergente que comprende una variante de subtilasa que tiene una estabilidad mejorada y/o un rendimiento en lavado mejorado en detergentes líquidos en comparación con la subtilasa original.

55 La invención se refiere a una composición detergente que comprende una variante de subtilasa que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3, preferiblemente al menos un 95% de identidad de secuencia, preferiblemente al menos un 96% de identidad de secuencia, preferiblemente al menos un 97% de identidad de secuencia, preferiblemente al menos un 98% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3, en donde la variante tiene un residuo de ácido glutámico (E) en la posición 101, y en donde la variante de subtilasa comprende además una o más sustituciones seleccionadas de L262E, N, Q, D y S156D, donde la variante ha aumentado la estabilidad en una

composición detergente líquida en comparación con la subtilasa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, y en donde las posiciones corresponden a las posiciones de SEQ ID NO: 1. La subtilasa comprende además una sustitución seleccionada entre Q137H, S3T, R45E, D, Q, P55N, T58W, Y, L, Q59D, M, N, T, G61D, R, S87E, G97S, A98D, E, R, S106A, W, N117E, H120V, D, K, N, S124M, P129D, E136Q, S143W, S161T, S163A, G, Y171L, A172S, N185Q, V199M, Y209W, M222Q, N238H, V244T, N261T, D.

La invención se refiere además al uso de las composiciones detergentes de la invención para lavar ropa o limpiar superficies duras, tales como lavavajillas, por ejemplo, lavavajillas automático.

La presente invención se refiere además a un método para producir una composición detergente que comprende la etapa de añadir una subtilasa variante obtenida por un método para obtener dicha subtilasa variante según la presente invención, y recuperar la variante. La invención también se refiere a composiciones detergentes obtenidas por dicho método.

Definiciones

Variante alélica: El término "variante alélica" significa cualquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupa el mismo locus cromosómico. La variación alélica surge naturalmente a través de la mutación, y puede dar lugar a polimorfismo dentro de las poblaciones. Las mutaciones genéticas pueden ser silenciosas (sin cambios 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 madura, unida, obtenida de una célula eucariota o procariota. 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, incluido el empalme, antes de aparecer como ARNm unido maduro.

Secuencia de codificación: El término "secuencia de codificación" significa un polinucleótido, que especifica directamente la secuencia de aminoácidos de una variante. Los límites de la secuencia de codificación generalmente están determinados por un marco de lectura abierto, que comienza con un codón de inicio como ATG, GTG o TTG y termina con un codón de detención como TAA, TAG o TGA. La secuencia de codificación 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 extraña (es decir, de un gen diferente) al polinucleótido que codifica la variante o nativa o extraña entre sí. Dichas secuencias de control incluyen, pero no se limitan a, una secuencia guía de poliadenilación, secuencia de propéptido, promotor, secuencia de péptido de señalización y terminador de transcripción. Como mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor y señales de detención de transcripción y de traducción. Las secuencias de control pueden proporcionarse con enlazadores con el fin de introducir sitios de restricción específicos que faciliten la unión de las secuencias de control con la región codificante del polinucleótido que codifica una variante.

Composición detergente: El término "composición detergente" incluye, a menos que se indique lo contrario, agentes de lavado granulares o en polvo para todo uso o de uso intensivo, especialmente detergentes de limpieza; agentes de lavado líquidos para todo uso, en gel o en forma de pasta, especialmente los denominados tipos de líquidos de alta resistencia (HDL); detergentes líquidos para tejidos finos; agentes para lavar platos a mano o agentes para lavar platos ligeros, especialmente aquellos del tipo de alta espuma; agentes para lavavajillas, incluidos los diversos tipos de tabletas, granulares, líquidos y abrillantadores para uso doméstico e institucional; agentes de limpieza y desinfección líquidos, incluidos los tipos antibacterianos de lavado de manos, barras de limpieza, barras de jabón, enjuagues bucales, limpiadores para dentaduras postizas, champús para automóviles o alfombras, limpiadores de baño; champús y enjuagues capilares; geles de ducha, baños de espuma; limpiadores de metales; así como auxiliares de limpieza, tales como aditivos de blanqueador y "antimanchas" o tipos de tratamiento previo. Los términos "composición detergente" y "formulación detergente" se usan en referencia a mezclas que están destinadas a usarse en un medio de lavado para la limpieza de objetos sucios. En algunas realizaciones, el término se usa en referencia al lavado de telas y/o prendas (por ejemplo, "detergentes para la ropa"). En realizaciones alternativas, el término se refiere a otros detergentes, tales como los utilizados para limpiar platos, cubiertos, etc. (por ejemplo, "detergentes para lavar platos"). No se pretende que la presente invención se limite a ninguna formulación o composición detergente particular. El término "composición detergente" no pretende limitarse a composiciones que contienen tensioactivos. Se pretende que, además de las variantes de acuerdo con la invención, el término abarque detergentes que pueden contener, por

ejemplo, tensioactivos, potenciadores, quelantes o agentes quelantes, sistema de blanqueo o componentes de blanqueo, polímeros, acondicionadores de tela, reforzadores de espuma, supresores de espuma, colorantes, perfumes, inhibidores del bronceado, abrillantadores ópticos, bactericidas, fungicidas, agentes de suspensión de la suciedad, agentes anticorrosivos, inhibidores o estabilizadores enzimáticos, activadores enzimáticos, transferasa(s), enzimas hidrolíticas, oxidorreductasas, agentes azulantes y colorantes fluorescentes, antioxidantes y solubilizantes .

Además de contener una variante de subtilasa como se describe en el presente documento, la formulación detergente puede contener una o más enzimas adicionales (tales como proteasas, amilasas, lipasas, cutinasas, celulasas, endoglucanasas, xiloglucanasas, pectinasas, pectinasa liasas, xantanasa, peroxidanas, haloperoxigenasas, catalasas y mananasas, o cualquier mezcla de las mismas), y/o componentes tales como tensioactivos, potenciadores, quelantes o agentes quelantes, sistema de blanqueo o componentes de blanqueo, polímeros, acondicionadores de telas, reforzadores de espuma, supresores de espuma, colorantes, perfumes, inhibidores de bronceado, abrillantadores ópticos, bactericidas, fungicidas, agentes de suspensión del suelo, agentes anticorrosivos, inhibidores o estabilizadores enzimáticos, activadores enzimáticos, transferasa(s), enzimas hidrolíticas, oxidorreductasas, agentes azulantes y colorantes fluorescentes, antioxidantes y solubilizantes.

Lavado de platos: El término "lavado de platos" se refiere a todas las formas de lavar platos, por ejemplo, a mano o lavavajillas automático. Lavar los platos incluye, entre otros, la limpieza de todas las formas de vajilla, como platos, tazas, vasos, tazones, todos los cubiertos, como cucharas, cuchillos, tenedores y utensilios para servir, así como cerámica, plásticos como la melamina, metales, porcelana, vidrio y acrílicos.

Composición para lavar platos: el término "composición para lavar platos" se refiere a todas las formas de composiciones para limpiar superficies duras. La presente invención no está restringida a ningún tipo particular de composición para lavar platos o cualquier detergente particular.

Expresión: El término "expresión" incluye cualquier paso implicado en la producción de una variante que incluye, pero no se limita a, transcripción, modificación postranscripcional, traducción, modificación postraducción 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 unida a secuencias de control que proporcionan su expresión.

Limpieza de superficies duras: El término "limpieza de superficies duras" se define aquí como la limpieza de superficies duras en las que las superficies duras pueden incluir pisos, mesas, paredes, techos, etc., así como superficies de objetos duros tales como automóviles (lavado de autos) y platos (lavado de platos). El lavado de platos incluye, entre otros, la limpieza de platos, tazas, vasos, cuencos y cubiertos como cucharas, cuchillos, tenedores, utensilios para servir, cerámica, plásticos como melamina, metales, porcelana, vidrio y acrílicos.

Célula huésped: El término "célula huésped" 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 huésped" abarca cualquier progenie de una célula madre que no sea idéntica a la célula madre debido a mutaciones que ocurren durante la replicación.

Rendimiento en lavado mejorado: El término "Rendimiento en lavado mejorado" se define aquí como una variante de subtilasa que muestra una alteración del rendimiento en lavado en relación con la subtilasa original (es decir, en relación con una subtilasa que tiene la secuencia de aminoácidos idéntica de dicha variante pero excluyendo las alteraciones en dicha variante), como en relación con el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 2, por ejemplo por mayor eliminación de manchas. El término "Rendimiento en lavado" incluye el rendimiento en lavado en lavavajillas, pero también en lavandería. El rendimiento del lavado puede determinarse calculando el llamado valor de intensidad (Int) como se define en el Ensayo Automático de Estrés Mecánico (AMSA) para el Lavado Automático de Platos en la sección de Materiales y Métodos en este documento.

Aislado: El término "aislado" significa una sustancia en una forma o entorno que no se produce en la naturaleza. Ejemplos no limitantes de sustancias aisladas incluyen (1) cualquier sustancia que no se produce de forma natural, (2) cualquier sustancia que incluya, entre otros, 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 asociado 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 aumentando la cantidad de la sustancia en relación con otros componentes con los que está naturalmente asociada (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.

Lavado: El término "lavado" se refiere tanto al lavado doméstico como al lavado industrial y significa el proceso de tratamiento de textiles y/o tejidos con una solución que contiene una composición detergente de la presente invención. El proceso de lavado puede llevarse a cabo, por ejemplo, utilizando, por ejemplo, una lavadora doméstica o industrial o puede realizarse a mano.

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

Progenitor: El término "progenitor" significa una proteasa a la que se hace una alteración para producir las variantes enzimáticas de la presente invención. Por lo tanto, el progenitor es una proteasa que tiene la secuencia de aminoácidos idéntica de dicha variante pero que no tiene las alteraciones en una o más, por ejemplo, dos o más de dichas posiciones especificadas. Se entenderá que en el presente contexto la expresión "que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica" se refiere al 100% de identidad de secuencia. El progenitor puede ser un polipéptido natural (de tipo salvaje) o una variante del mismo. En una realización particular, el progenitor es una proteasa con al menos 60% de identidad, tal como al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 81%, al menos 82%, al menos 83%, al menos 84%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o 100% de identidad con un polipéptido con el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 2.

Proteasa: El término "proteasa" se define aquí como una enzima que hidroliza enlaces peptídicos. Incluye cualquier enzima perteneciente al grupo enzimático EC 3.4 (incluyendo cada una de las trece subclases del mismo). El número de la EC se refiere a la Nomenclatura de Enzimas 1992 de NC-IUBMB, Academic Press, San Diego, California, incluidos los suplementos 1-5 publicados en Eur. J. Biochem. 1994, 223, 1-5; Eur. J. Biochem. 1995, 232, 1-6; Eur. J. Biochem. 1996, 237, 1-5; Eur. J. Biochem. 1997, 250, 1-6; y Eur. J. Biochem. 1999, 264, 610-650; respectivamente.

Actividad de proteasa: El término "actividad de proteasa" significa una actividad proteolítica (EC 3.4). Las proteasas de la invención son endopeptidasas (EC 3.4.21). Hay varios tipos de actividad de proteasa: los tres tipos de actividad principales son: tipo tripsina donde hay escisión de sustratos de amida después de Arg o Lys en P1, tipo quimotripsina donde se produce la escisión después de uno de los aminoácidos hidrófobos en P1 y tipo elastasa tal como con escisión después de una Ala en P1. Para los fines de la presente invención, la actividad de la proteasa se determina de acuerdo con el procedimiento descrito en "Materiales y métodos" a continuación. Las variantes de subtilasa de la presente invención tienen al menos 20%, por ejemplo, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, y al menos el 100% de la actividad de proteasa del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2.

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 Needleman-Wunsch (Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) tal como se implementa en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277), preferiblemente la versión 5.0.0 o posterior. Los parámetros utilizados son la penalización de apertura de brecha de 10, la penalización de extensión de brecha de 0.5 y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (versión EMBOSS de BLOSUM62). La salida de Needle etiquetada como "identidad más larga" (obtenida usando la opción no breve) se usa como porcentaje de identidad y se calcula de la siguiente manera:

$$\text{(Residuos Idénticos x 100)} / (\text{Longitud de alineamiento} - \text{Número Total de Brechas en Alineamiento})$$

Para los fines de la presente invención, la identidad de secuencia entre dos secuencias de desoxirribonucleótidos se determina usando el algoritmo Needleman-Wunsch (Needleman and Wunsch, 1970, supra) como se implementa en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, supra), preferiblemente versión 5.0.0 o posterior. Los parámetros utilizados son la penalización de apertura de brecha de 10, la penalización de extensión de brecha de 0.5 y la matriz de sustitución EDNAFULL (versión EMBOSS de NCBI NUC4.4). La salida de Needle etiquetada como "identidad más larga" (obtenida usando la opción no breve) se usa como porcentaje de identidad y se calcula de la siguiente manera:

$$\text{Desoxirribonucleótidos Idénticos x 100} / (\text{Longitud de alineamiento} - \text{Número Total de Brechas en Alineamiento})$$

Estabilidad: El término "estabilidad" incluye estabilidad de almacenamiento y estabilidad durante el uso, por ejemplo, durante un proceso de lavado (en estabilidad de lavado) y refleja la estabilidad de la variante de subtilasa según la invención en función del tiempo, por ejemplo, cuánta actividad se retiene cuando la proteasa se mantiene en solución, en particular en una solución detergente. La estabilidad está influenciada por muchos factores, por ejemplo, pH,

temperatura, composición detergente, por ejemplo, cantidades de potenciador, tensioactivos, etc. La estabilidad de la proteasa se puede medir usando el 'ensayo de estabilidad' como se describe en la sección de Materiales y Métodos en este documento. El término "estabilidad mejorada" o "estabilidad aumentada" se define en el presente documento como una proteasa variante que muestra una estabilidad aumentada en soluciones, en relación con la estabilidad de la proteasa progenitora. Los términos "estabilidad mejorada" y "estabilidad aumentada" incluyen "estabilidad química mejorada", "estabilidad detergente" o "estabilidad detergente mejorada".

El término "estabilidad química mejorada" se define en el presente documento como una enzima variante que muestra la retención de la actividad enzimática después de un período de incubación en presencia de una sustancia química o sustancias químicas, naturales o sintéticas, que reduce la actividad enzimática del progenitor enzima. La estabilidad química mejorada también puede dar como resultado que las variantes sean más capaces de catalizar una reacción en presencia de tales productos químicos. En un aspecto particular de la invención, la estabilidad química mejorada es una estabilidad mejorada en un detergente, en particular en un detergente líquido. El término "estabilidad detergente" o "estabilidad detergente mejorada" es en particular una estabilidad mejorada de la actividad de proteasa cuando una variante proteasa de la presente invención se mezcla en una formulación detergente líquida, especialmente en una formulación detergente líquida según la Tabla 1 y luego se almacena en temperaturas entre 15 y 50°C, por ejemplo, 20°C, 30°C o 40°C.

El término "actividad térmica mejorada" significa una variante que muestra un perfil de actividad dependiente de la temperatura alterado a una temperatura específica en relación con el perfil de actividad dependiente de la temperatura del progenitor o en relación con una proteasa con SEQ ID NO: 3. El valor de la actividad térmica proporciona una medida de la eficiencia de la variante para mejorar la catálisis de una reacción de hidrólisis en un rango de temperaturas. Una variante más termoactiva conducirá a un aumento en el aumento de la velocidad de hidrólisis de un sustrato por una composición enzimática, disminuyendo así el tiempo requerido y/o disminuyendo la concentración de enzima requerida para la actividad. Alternativamente, una variante con una actividad térmica reducida potenciará una reacción enzimática a una temperatura inferior a la temperatura óptima del progenitor definida por el perfil de actividad dependiente de la temperatura del progenitor.

Condiciones de restricción: Las diferentes condiciones de restricción se definen como sigue.

El término "condiciones de muy baja restricción" significa para sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42°C en 5X SSPE, SDS al 0.3%, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y 35% de formamida, siguiendo los procedimientos estándar de inmunotransferencia Southern durante 12 a 24 horas. El material de soporte finalmente se lava tres veces cada uno durante 15 minutos usando 2X SSC, SDS al 0.2% a 60°C.

El término "condiciones de baja restricción" significa para sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42°C en 5X SSPE, 0.3% SDS, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y 35% formamida, siguiendo los procedimientos estándar de inmunotransferencia Southern durante 12 a 24 horas. El material de soporte finalmente se lava tres veces cada uno durante 15 minutos usando 1X SSC, SDS al 0.2% a 60°C.

El término "condiciones de restricción media" significa para sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42°C en SSPE 5X, SDS al 0.3%, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y 35% formamida, siguiendo los procedimientos estándar de inmunotransferencia Southern durante 12 a 24 horas. El material de soporte finalmente se lava tres veces cada uno durante 15 minutos usando 1x SSC, SDS al 0.2% a 65°C.

El término "condiciones de restricción media-alta" significa para sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42°C en 5X SSPE, SDS al 0.3%, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y 35% de formamida, siguiendo los procedimientos estándar de inmunotransferencia Southern durante 12 a 24 horas. El material portador finalmente se lava tres veces cada uno durante 15 minutos usando 0.5X SSC, 0.2% SDS a 65°C.

El término "condiciones de alta restricción" significa para sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42°C en 5X SSPE, 0.3% SDS, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y 35% formamida, siguiendo los procedimientos estándar de inmunotransferencia Southern durante 12 a 24 horas. El material portador finalmente se lava tres veces cada uno durante 15 minutos usando 0.3X SSC, 0.2% SDS a 65°C.

El término "condiciones de muy alta restricción" significa para sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42°C en 5X SSPE, SDS al 0.3%, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y 35 % de formamida, siguiendo los procedimientos estándar de inmunotransferencia Southern durante 12 a 24 horas. El material de soporte finalmente se lava tres veces cada uno durante 15 minutos usando 0.15X SSC, 0.2% SDS a 65°C.

Variante sustancialmente pura: El término "variante sustancialmente pura" significa una preparación que contiene como máximo 10%, como máximo 8%, como máximo 6%, como máximo 5%, como máximo 4%, como máximo 3%, como mínimo como máximo 2%, como máximo 1% y como máximo 0.5% en peso de otro material polipeptídico con el que está asociado de forma nativa o recombinante. Preferiblemente, la variante es al menos 92% pura, por ejemplo, al menos 94% pura, al menos 95% pura, al menos 96% pura, al menos 97% pura, al menos 98% pura, al menos 99%, al menos 99.5% puro y 100% puro en peso del material polipeptídico total presente en la preparación. Las variantes de la presente invención están preferiblemente en una forma sustancialmente pura. Esto se puede lograr, por ejemplo, preparando la variante por métodos recombinantes bien conocidos o por métodos de purificación clásicos.

Variante: El término "variante" significa un polipéptido que tiene actividad de proteasa que comprende una alteración, es decir, una sustitución, inserción y/o eliminación, en una o más (por ejemplo, varias) posiciones. Una sustitución significa el reemplazo del aminoácido que ocupa una posición con un aminoácido diferente; una eliminación significa la eliminación del aminoácido que ocupa una posición; y una inserción significa agregar uno o más (por ejemplo, varios) aminoácidos, por ejemplo 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos adyacentes e inmediatamente posteriores al aminoácido que ocupa una posición.

Rendimiento en lavado: El término "Rendimiento en lavado" se usa como la capacidad de una enzima para eliminar las manchas presentes en el objeto por limpiar durante, por ejemplo, lavar, como lavar ropa o limpiar superficies duras. La mejora en el rendimiento del lavado puede cuantificarse calculando el llamado valor de intensidad (Int) definido en el ensayo AMSA, como se describe en la sección Materiales y Métodos.

Subtilasa de tipo salvaje: El término "subtilasa de tipo salvaje" significa una proteasa expresada por un organismo natural, tal como una bacteria, archaea, levaduras, hongos, plantas o animales que se encuentran en la naturaleza. Un ejemplo de una subtilasa de tipo salvaje es BLAP, es decir, la subtilasa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

Convenciones para la designación de variantes

Para los fines de la presente invención, el polipéptido maduro BPN' descrito en la SEQ ID NO: 1 se usa para determinar el residuo de aminoácido correspondiente en otra proteasa. La secuencia de aminoácidos de otra proteasa está alineada con el polipéptido maduro descrito en SEQ ID NO: 1, y con base en la alineación, el número de posición de aminoácido correspondiente a cualquier residuo de aminoácido en el polipéptido maduro descrito en SEQ ID NO: 1 es determinado usando el algoritmo Needleman-Wunsch implementado en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: European Molecular Biology Open Software Suite), preferiblemente la versión 5.0.0 o posterior. Los parámetros utilizados son la penalización de apertura de brecha de 10, la penalización de extensión de brecha de 0.5 y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (versión EMBOSS de BLOSUM62).

La identificación del residuo de aminoácido correspondiente en otra proteasa se puede determinar mediante una alineación de múltiples secuencias de polipéptidos usando varios programas informáticos que incluyen, pero no se limitan a, MUSCLE (comparación de secuencias múltiples por log-expectativa; versión 3.5 o posterior), MAFFT (versión 6.857 o posterior), y EMBOSS EMMA que emplea ClustalW (1.83 o posterior), utilizando sus respectivos parámetros predeterminados.

Cuando la otra enzima se ha separado del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 1 de modo que la comparación tradicional basada en la secuencia no puede detectar su relación, se pueden usar otros algoritmos de comparación de secuencia por pares. Se puede lograr una mayor sensibilidad en la búsqueda basada en secuencias utilizando programas de búsqueda que utilizan representaciones probabilísticas de familias de polipéptidos (perfiles) para buscar bases de datos. Por ejemplo, el programa PSI-BLAST genera perfiles a través de un proceso iterativo de búsqueda en la base de datos y es capaz de detectar homólogos remotos. Se puede lograr una sensibilidad aún mayor si la familia o superfamilia del polipéptido tiene uno o más representantes en las bases de datos de la estructura de la proteína. Programas como GenTHREADER utilizan información de una variedad de fuentes (PSI-BLAST, predicción de estructura secundaria, perfiles de alineación estructural y potenciales de solvatación) como entrada a una red neuronal que predice el pliegue estructural para una secuencia de consulta. De manera similar, el método de Gough et al., 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. Estas alineaciones a su vez se pueden usar para

generar modelos de homología para el polipéptido, y se puede evaluar la precisión de dichos modelos utilizando una variedad de herramientas desarrolladas para ese propósito.

5 Para las proteínas de estructura conocida, hay varias herramientas y recursos disponibles para recuperar y generar alineamientos estructurales. Por ejemplo, las superfamilias de proteínas SCOP se han alineado estructuralmente, y esas alineaciones son accesibles y descargables. Se pueden alinear dos o más estructuras de proteínas utilizando una variedad de algoritmos, como la matriz de alineación de distancia o la extensión combinatoria, y la implementación de estos algoritmos se puede utilizar adicionalmente para consultar bases de datos de estructura con una estructura de interés para descubrir posibles homólogos estructurales.

10 Al describir las variantes de la presente invención, la nomenclatura descrita a continuación está adaptada para facilitar la referencia. Se utiliza la abreviatura aceptada de aminoácidos de una letra o tres letras de IUPAC.

15 Sustituciones: Para una sustitución de aminoácidos, se usa la siguiente nomenclatura: Aminoácido original, posición, aminoácido sustituyente. Por consiguiente, la sustitución de treonina en la posición 226 con alanina se designa como "Thr226Ala" o "T226A". Las mutaciones múltiples están separadas por marcas de adición ("+"), por ejemplo, "Gly205Arg + Ser411Phe" o "G205R + S411F", que representan sustituciones en las posiciones 205 y 411 de glicina (G) con arginina (R) y serina (S) con fenilalanina (F), respectivamente.

20 Eliminaciones: Para una eliminación de aminoácidos, se usa la siguiente nomenclatura: Aminoácido original, posición, *. En consecuencia, la eliminación de glicina en la posición 195 se designa como "Gly195*" o "G195*". Las eliminaciones múltiples están separadas por marcas de adición ("+"), por ejemplo, "Gly195* + Ser411*" o "G195* + S411*".

25 Inserciones: La inserción de un residuo de aminoácido adicional tal como, por ejemplo, una lisina después de G195 puede estar indicada por: Gly195GlyLys o G195GK. Alternativamente, la inserción de un residuo de aminoácido adicional tal como lisina después de G195 puede indicarse mediante: *195aL. Cuando se inserta más de un residuo de aminoácido, como, por ejemplo, a Lys y Ala después de G195 esto puede indicarse como: Gly195GlyLysAla o G195GKA. En tales casos, los residuos de aminoácidos insertados también pueden numerarse mediante la adición de letras minúsculas al número de posición del residuo de aminoácidos que precede a los residuos de aminoácidos insertados, en este ejemplo: *195aK *195bA. En el ejemplo anterior, las secuencias 194 a 196 serían así:

	194 195 196
Savinasa	A - G - L
	194 195 195a 195b 196
Variante	A - G - K - A - L

35 En los casos en que se produce una sustitución y una inserción en la misma posición, esto puede indicarse como S99SD+S99A o, en resumen, S99AD. La misma modificación también puede indicarse como S99A + *99aD.

40 En los casos en que se inserta un residuo de aminoácido idéntico al residuo de aminoácido existente, está claro que surge la degeneración en la nomenclatura. Si, por ejemplo, se inserta una glicina después de la glicina en el ejemplo anterior, esto se indicaría con G195GG o *195aGbG. El mismo cambio real podría indicarse como A194AG o *194aG para el cambio de:

	194 195 196
Savinasa	A - G - L
a:	
	194 195 195a 196
Variante	A - G - G - L
	194 194a 195 196

Tales casos serán evidentes para la persona experta y la indicación G195GG y las indicaciones correspondientes para este tipo de inserciones están destinadas a comprender tales indicaciones equivalentes degeneradas.

45 Alteraciones múltiples: Las variantes que comprenden múltiples alteraciones están separadas por marcas de adición ("+"), 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. Alternativamente, las alteraciones múltiples pueden estar separadas por espacio o una coma, por ejemplo, A170Y G195E o A170Y, G195E respectivamente.

5 Diferentes alteraciones: Cuando se pueden introducir diferentes alteraciones en una posición, las diferentes alteraciones están separadas por una coma, por ejemplo, "Arg170Tyr, Glu" representa una sustitución de arginina en la posición 170 con tirosina o ácido glutámico. Por lo tanto, "Tyr167Gly,Ala + Arg170Gly,Ala" designa las siguientes variantes: "Tyr167Gly + Arg170Gly", "Tyr167Gly + Arg170Ala", "Tyr167Ala + Arg170Gly" y "Tyr167Ala + Arg170Ala".

10 Como alternativa, se pueden indicar diferentes corchetes o sustituciones opcionales entre paréntesis, por ejemplo, Arg170[Tyr,Glu] o Arg170{Tyr,Glu} o en resumen R170[Y,E] o R170{Y,E}.

15 Numeración de posiciones/residuos de aminoácidos: Si no se menciona nada más, la numeración de aminoácidos utilizada en el presente documento corresponde a la de la secuencia de subtilasa BPN' (BASBPN). Para obtener una descripción más detallada de la secuencia de BPN', consulte la SEQ ID NO: 1 o Siezen et al., Protein Eng. 4 (1991) 719-737.

Descripción detallada de la invención

20 La invención se refiere a composiciones detergentes que comprenden variantes de subtilasa que tienen una estabilidad mejorada y/o un rendimiento en lavado mejorado en detergentes líquidos. Preferiblemente, la variante de subtilasa también tiene un buen Rendimiento en lavado, más preferiblemente la variante tiene un rendimiento en lavado mejorado en comparación con la subtilasa original, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3. Siempre que los términos "variante(s)" o "variante(s) de subtilasa" se mencionan más adelante, se refieren a composiciones detergentes que
25 comprenden dicha(s) variante(s) de proteasa.

La subtilasa original puede ser, en principio, cualquier subtilasa natural o puede ser una subtilasa modificada generada por métodos conocidos en la técnica, como la preparación de híbridos o dos o más subtilasas individuales o mediante la sustitución, eliminación o inserción de uno o más residuos de aminoácidos en una subtilasa dada.

30 Muchas subtilasas tienen un historial comprobado o un buen Rendimiento en lavado y hay una gran cantidad de publicaciones que describen tales subtilasas y su uso en los procesos de lavado o limpieza, sin embargo, para su uso en detergente también es importante que las subtilasas tengan una estabilidad satisfactoria en composiciones detergentes, como en detergente líquido. Se prefiere usar una subtilasa original que tenga un buen Rendimiento en lavado para proporcionar variantes de tales subtilasas que tengan una estabilidad mejorada en el detergente líquido.

Una subtilasa progenitora preferida comprendida en la composición detergente de la invención es la proteasa BLAP que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, o una subtilasa que tiene al menos 60%, por ejemplo, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o 100% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2. La subtilasa progenitora preferida puede ser una subtilasa que tenga la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, en donde 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 aminoácidos se han modificado en comparación con la SEQ ID NO: 2, y en donde cada modificación es independientemente una sustitución de un residuo de aminoácido con otro residuo de aminoácido, una eliminación de un residuo de aminoácido o una inserción de un residuo de aminoácido.

45 En otro aspecto, el progenitor comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. En otro aspecto, el progenitor comprende o consiste en el polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2. En otro aspecto, el progenitor comprende o consiste en los aminoácidos 1 a 269 de la SEQ ID NO: 2. En otra realización, el progenitor es una variante alélica del polipéptido maduro de SEQ ID NO: 2.

Una subtilasa progenitora preferida comprendida en la composición detergente de la invención es la subtilasa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 con una sustitución del residuo de arginina en la posición 101 por un residuo de ácido glutámico (R101E). La secuencia de esta subtilasa preferida se muestra en SEQ ID NO: 3.

55 Otra subtilasa progenitora preferida comprendida en la composición detergente de acuerdo con la invención es la proteasa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, o una subtilasa que tiene al menos 60%, por ejemplo, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o 100% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3. En otro aspecto, el progenitor comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3. En otro aspecto, el progenitor comprende o consiste en el polipéptido
60

maduro de la SEQ ID NO: 3. En otro aspecto, el progenitor comprende o consiste en los aminoácidos 1 a 269 de la SEQ ID NO: 3. En otra realización, el progenitor es una variante alélica del polipéptido maduro de SEQ ID NO: 3.

5 La subtilasa progenitora preferida puede ser una subtilasa que tenga la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, en donde 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 aminoácidos han sido modificados en comparación con la SEQ ID NO: 3, y en donde cada modificación es independientemente una sustitución de un residuo de aminoácido con otro residuo de aminoácido, una eliminación de un aminoácido residuo ácido o una inserción de un residuo aminoácido.

10 Las composiciones detergentes adicionales de acuerdo con la invención incluyen variantes de subtilasa que tienen al menos un 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3, cuya variante tiene un residuo de ácido glutámico (E) en la posición 101, y en donde la variante de subtilasa comprende además una o más de las sustituciones seleccionadas de L262E,N,Q,D y S156D, en donde las posiciones están numeradas de acuerdo con la SEQ ID NO 1.

15 En ciertas realizaciones preferidas, la proteasa comprendida en una composición detergente según la invención comprende además una o más de las sustituciones seleccionadas de Q137H; S3T; R45E,D,Q; P55N; T58W,Y,L; Q59D,M,N,T; G61D,R; S87E; G97S; A98D,E,R; S106A,W; N117E; H120V,D,K,N; S124M; P129D; E136Q; S143W; S161T; S163A,G; Y171L; A172S; N185Q; V199M; Y209W; M222Q; N238H; V244T; N261T,D, en donde las posiciones están numeradas de acuerdo con la SEQ ID NO 1, además de una o más sustituciones seleccionadas de L262E,N,Q,D y S156D.

20

En una realización preferida, las composiciones detergentes según la invención comprenden variantes de subtilasa que tienen tanto estabilidad mejorada en detergente líquido como rendimiento en lavado mejorado en comparación con la subtilasa que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 3. Ejemplos de tales subtilasas preferidas de esta realización incluyen variantes de subtilasa que tienen al menos un 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3 y que comprenden una o más de las sustituciones S156D; L262E,Q,N,D.

25

Las variantes pueden tener otras sustituciones, por ejemplo, sustituciones conocidas en la técnica para impartir una propiedad beneficiosa particular a las variantes de subtilasa. Existe una abundancia de sustituciones en subtilasas conocidas en la técnica y se contempla que tales sustituciones conocidas se puedan usar en la presente invención para impartir tales efectos beneficiosos conocidos a las variantes comprendidas en las composiciones detergentes de la presente invención. Las variantes de subtilasa de la invención pueden comprender una o más sustituciones adicionales que pueden usarse en la presente invención para impartir efectos beneficiosos adicionales y/o mejorar un efecto existente tal como estabilidad y rendimiento en lavado.

30

35 Las mutaciones adicionales preferidas incluyen una o más de las siguientes sustituciones V4I, N76D, V104T, N128Q, S141H, R145H, A194P, G195E, V205I, N218Q, A228V, N238E o S265H, R45E,D,Q; Q59D; T58L; G61D; S87E; G97S; A98E; S106A; N117E; H120D,K,V; P129D; E136Q; Q137H; S161T; S163A,G; V199M; M222Q; N261T.

40 Ejemplos particularmente preferidos de composiciones detergentes según la invención comprenden variantes de subtilasa que tienen una estabilidad mejorada y/o un rendimiento en lavado mejorado en detergente líquido en comparación con la subtilasa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 incluyen variantes que comprenden las secuencias de aminoácidos:

45 SEQ ID NO:3 + L262N,Q,D,E

SEQ ID NO:3 + S156D + L262E

SEQ ID NO:3 + N238E + L262E

50 SEQ ID NO:3 + S3T + N76D + S156D + Y209W

SEQ ID NO:3 + S163G + N128Q + N238E + L262E

55 SEQ ID NO:3 + V104T + H120D + S156D + L262E

SEQ ID NO:3 + N76D + A228V + L262E

SEQ ID NO:3 + Q137H + S141H + R145H + N238E + L262E

60 SEQ ID NO:3 + S3T + N76D + Q137H + S141H + R145H+ S156D + Y209W

- SEQ ID NO:3 + S3T + N76D + S156D
- 5 SEQ ID NO:3 + S3T + N76D + S156D + Y209W
- SEQ ID NO:3 + N76D + A228V + L262E
- SEQ ID NO:3 + N261D + L262E
- 10 SEQ ID NO:3 + S87E + L262E
- SEQ ID NO:3 + Q59D + L262E
- SEQ ID NO:3 + K27Q + L262E
- 15 SEQ ID NO:3 + H120D + L262E
- SEQ ID NO:3 + K27Q + S156D
- 20 SEQ ID NO:3 + H120D + S163G + L262E
- SEQ ID NO:3 + S156D + S163G
- SEQ ID NO:3 + T58L + S156D
- 25 SEQ ID NO:3 + S3T + N76D + S156D
- SEQ ID NO:3 + N76D + S156D
- 30 SEQ ID NO:3 + H120D + S156D
- SEQ ID NO:3 + R45E + L262E
- SEQ ID NO:3 + S87E + L262E
- 35 SEQ ID NO:3 + G61D + L262E
- SEQ ID NO:3 + Q59D + L262E
- 40 SEQ ID NO:3 + Q59D + S156D
- SEQ ID NO:3 + S156D + L262E
- SEQ ID NO:3 + S163G + N238E + L262E
- 45 SEQ ID NO:3 + S87E + S163G + L262E
- SEQ ID NO:3 + S156D + S163G + L262E
- 50 SEQ ID NO:3 + S156D + S163G + L262E
- SEQ ID NO:3 + S3T + N76D + Y209W + N261D + L262E

55 Las variantes de subtilasa comprendidas en las composiciones detergentes de la presente invención tienen una estabilidad mejorada en el detergente líquido en comparación con la enzima original, preferiblemente las variantes tienen una estabilidad mejorada en el detergente líquido en comparación con la proteasa que tiene SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3.

60 Como ejemplos de variantes preferidas que tienen una estabilidad mejorada en detergente líquido y un rendimiento en lavado mejorado en comparación con la enzima original se pueden mencionar:

SEQ ID NO:3 + S156D,

SEQ ID NO:3 + L262E,Q,N.

5 Estas variantes preferidas tienen una estabilidad mejorada tal como la estabilidad del detergente y/o un rendimiento mejorado o de lavado a la par en comparación con la subtilasa original. A este respecto, el rendimiento en lavado mejorado pretende significar que el rendimiento en lavado de la variante es mayor en al menos una mancha que el rendimiento en lavado de la subtilasa original donde el rendimiento en lavado se determina usando un ensayo de Rendimiento en lavado adecuado en una composición detergente dada bajo condiciones.

10 En una realización preferida, el rendimiento en lavado mejorado se mide usando la prueba AMSA, por ejemplo, como se describe en la sección Métodos y Materiales de esta solicitud.

15 El Rendimiento en lavado de la variante es preferiblemente al menos 1 unidad más alto que el rendimiento en lavado de la subtilasa original, preferiblemente al menos 2 unidades más, tal como al menos 3 unidades más, tal como al menos 4 unidades más, tal como al menos 5 unidades más, como al menos 6 unidades más, como al menos 7 unidades más, como al menos 8 unidades más, como al menos 9 unidades más.

20 Las variantes de subtilasa pueden comprender además una o más alteraciones adicionales en una o más (por ejemplo, varias) otras posiciones, seleccionadas del grupo que consiste en posiciones: 3, 4, 9, 12, 14, 15, 40, 43, 68, 72, 79, 86, 88, 92, 98, 99, 101, 120, 146, 183, 184, 188, 194, 216, 218, 224, 228, 236, 245, 255, 261, 267 y 270, preferiblemente posiciones 9, 15, 68 y/o 120 (numeración de acuerdo con SEQ ID NO: 2). Para el técnico experto estará claro que, si una posición ya ha sido alterada una vez, entonces no se alterará una segunda vez. En una realización preferida, la alteración en cualquiera de las posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 3, 4, 9, 12, 25 14, 15, 40, 43, 68, 72, 79, 86, 88, 92, 98, 99, 101, 120, 146, 183, 184, 188, 194, 216, 218, 224, 228, 236, 245, 255, 261, 267 y 270 es una sustitución. En una realización más preferida, la variante de subtilasa comprende además una o más sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en 3{D,E,L}, 4I, 9{H,K,R,G}, 12{D,E}, 14T, 15{G,M,S,T}, 40{A,G,M,S,T}, 43{D,E}, 63G, 68{A,G,I,L,M,S,T}, 72{V,L}, N76{D,E}, 79T, 86H, 88V, 92S, 98T, 99{E,T,A,G,M,D}, 101L, 120{I,N}, 146S, 183{E,D}, 184{E,D}, 188G, 194P, 216{D,E}, 218{E,D}, 224{S,A,T,G,M}, 228T, 236D, 245{H,K,R}, 30 255{D,E}, 261{D,E}, 267{I,L,V} y/o 270{G,M,S,T} (numeración según SEQ ID NO: 2). En una realización aún más preferida, la variante de subtilasa comprende además una o más sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en S3{D,E,L}, V4I, S9{H,K,R,G}, Q12{D,E}, P14T, A15{G,M,S,T}, P40{A,G,M,S,T}, N43{D,E}, V68{A,G,I,L,M,S,T}, I72{V,L}, N76{D,E}, I79T, P86H, A88V, A92S, A98T, S99{E,T,A,G,M,D}, S101L, H120{I,N}, G146S, N183{E,D}, N184{E,D}, S188G, A194P, S216{D,E}, N218{E,D}, T224{S,A,T,G,M}, A228T, S236D, Q245{H,K,R}, T255{D,E}, 35 N261{D,E}, L267{I,L,V} y/o A270{G,M,S,T} en el polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 3, o un polipéptido que tiene al menos 60%, preferiblemente al menos 70%, preferiblemente al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, preferiblemente al menos 95% de identidad de secuencia, en donde cada posición corresponde a la posición correspondiente el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 1.

40 Los cambios de aminoácidos pueden ser de naturaleza menor, es decir, sustituciones o inserciones conservadoras de aminoácidos que no afectan significativamente al plegamiento y/o actividad de la proteína; pequeñas eliminaciones, típicamente de 1 a 30 aminoácidos; pequeñas extensiones amino o carboxilo terminales, como un residuo de metionina amino terminal; un péptido conector pequeño de hasta 20-25 residuos; o una pequeña extensión que facilita la purificación cambiando la carga neta u otra función, como un tracto de polihistidina, un epítipo antigénico o un dominio 45 de unión.

Ejemplos de sustituciones conservadoras están dentro de los grupos de 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 50 aminoácidos pequeños (glicina, alanina, serina, treonina y metionina). Las sustituciones de aminoácidos que generalmente no alteran la actividad específica son conocidas en la técnica y están descritas, por ejemplo, por H. Neurath and R.L. Hill, 1979, In, The Proteins, Academic Press, Nueva York. Las sustituciones comunes son Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu y Asp/Gly.

55 Como alternativa, los cambios de aminoácidos son de tal naturaleza que se alteran las propiedades fisicoquímicas de los polipéptidos. Por ejemplo, los cambios de aminoácidos pueden mejorar la estabilidad térmica del polipéptido, alterar la especificidad del sustrato, cambiar el pH óptimo y similares.

60 Los aminoácidos esenciales en un polipéptido pueden identificarse de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis de exploración de alanina. En la última técnica, se

introducen mutaciones de alanina individuales en cada residuo de la molécula, y las moléculas mutantes resultantes se prueban para determinar la actividad de la proteasa para identificar los residuos de aminoácidos que son críticos para la actividad de la molécula. El sitio activo de la enzima u otra interacción biológica también se puede determinar mediante el análisis físico de la estructura, según lo determinado por técnicas tales como resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción de electrones o etiquetado de fotoafinidad, junto con la mutación de los supuestos aminoácidos del sitio de contacto. Para BPN' (SEQ ID NO: 1), la tríada catalítica que comprende los aminoácidos S221, H64 y D32 es esencial para la actividad de proteasa de la enzima.

Las variantes de subtilasa pueden consistir en 150 a 350, por ejemplo, 175 a 330, 200 a 310, 220 a 300, 240 a 290, 260 a 280 o 269, 270, 271, 272, 273, 274 o 275 aminoácidos.

Según una realización y/o según cualquiera de las realizaciones anteriores, la invención se refiere a una composición detergente que comprende una variante de subtilasa que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3, en donde la variante tiene un residuo de ácido glutámico (E) en la posición 101, en donde la variante de subtilasa comprende además una o más sustituciones seleccionadas de L262E,N,Q,D y S156D, en donde las posiciones corresponden a las posiciones de SEQ ID NO: 1, y donde la variante tiene unión de celulosa reducida en comparación con la subtilasa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3. Una realización se refiere a una composición detergente que comprende una variante de subtilasa que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3, en donde la variante tiene un residuo de ácido glutámico (E) en la posición 101, en donde la variante de subtilasa comprende además una o más sustituciones seleccionadas de L262E,N,Q,D y S156D, en donde las posiciones corresponden a las posiciones de SEQ ID NO: 1, y donde la variante ha reducido la unión a la celulosa en comparación con la subtilasa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y en donde la variante comprende una sustitución de un residuo de aminoácido cargado positivamente en la superficie de la proteasa con un residuo neutro o cargado negativamente; o un residuo neutro en la superficie de la proteasa se sustituye con un residuo cargado negativamente. De acuerdo con una realización o cualquiera de las realizaciones anteriores, la invención se refiere a una composición detergente que comprende una variante de subtilasa que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3, en donde la variante tiene un residuo de ácido glutámico (E) en la posición 101, en donde la variante de subtilasa comprende además una o más sustituciones seleccionadas de L262E,N,Q,D y S156D, en donde las posiciones corresponden a las posiciones de SEQ ID NO: 1, y donde la variante tiene unión de celulosa reducida en comparación con la subtilasa que tiene el amino secuencia ácida de SEQ ID NO: 3 y/o en donde la variante comprende una sustitución de un residuo de aminoácido cargado positivamente en la superficie de la proteasa con un residuo neutro o cargado negativamente; o un residuo neutro en la superficie de la proteasa se sustituye con un residuo cargado negativamente en el que la variante de subtilasa comprende una sustitución seleccionada del grupo que consiste en V4D,E,I, R10N,Q,D,E,S, H17D, K27S,N,Q,E,D, N43E, I44V, R45E,D,Q,N, G46D, S49N,D, P52E, G53D,E, Q59D, G61D, N62D, L75D, N76D, I79D, S87E, G97D, A98E, *103aE, I104T, N117E, H120D, E136K,Q, R170E,Q,N,D,S N185D, G195E, N218A, K235L,W,N,Q,E,S, K237N,Q,D,E,S, N238D,E, V244D, R246Q,E,D, R247S,E,Q,D, K251S,D,Q,E,N, N261D, and S265H, preferiblemente las sustituciones se seleccionan entre N117E, N238E, N261D y preferiblemente la variante además comprenden una sustitución seleccionada entre: S3T, N128Q, Q137H, S141H, R145H, S163G, A194P, V199M, V205I, N218Q o A228V. Según una realización y/o según cualquiera de las realizaciones anteriores, la invención se refiere a una composición detergente que comprende una variante de subtilasa que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3, en donde la variante tiene un residuo de ácido glutámico (E) en posición correspondiente a la posición 101 de SEQ ID NO: 1, donde la variante ha reducido la unión a la celulosa en comparación con la subtilasa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y en donde la variante de subtilasa comprende además sustituciones seleccionadas entre S156D + S3T, L262E + S3T, S156D + N128Q, L262E + N128Q, S156D + Q137H, L262E + Q137H, S156D + S141H, L262E + S141H, S156D + R145H, L262E + R145H, S156D + S163G, L262E + S163G, S156D + A194P, L262E + A194P, S156D + V199M, L262E + V199M, S156D + V205I, L262E + V205I, S156D + N218Q, L262E + N218Q, S156D + A228V, L262E + A228V. Según una realización y/o según cualquiera de las realizaciones anteriores, la invención se refiere a una composición detergente que comprende una variante de subtilasa que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3, en donde la variante tiene un residuo de ácido glutámico (E) en posición correspondiente a la posición 101 de SEQ ID NO: 1, donde la variante ha reducido la unión a la celulosa en comparación con la subtilasa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y en donde la variante de subtilasa comprende además sustituciones seleccionadas entre:

SEQ ID NO.3 + S156D,

SEQ ID NO:3 + L262D,E

SEQ ID NO:3 + S156D + L262E

SEQ ID NO:3 + N238E + L262E

SEQ ID NO:3 + S3T + N76D + S156D + Y209W

SEQ ID NO:3 + V104T + H120D + S156D + L262E

5

SEQ ID NO:3 + V104T + S156D + L262E

SEQ ID NO:3 + Q137H + S141H + R145H + N238E + L262E

10

SEQ ID NO:3 + N76D + S101E + A228V + L262E;

SEQ ID NO:3 + S3T + N76D + Q137H + S141H + R145H + S156D + Y209W.

Preferiblemente, las variantes se seleccionan del grupo que consiste en:

15

SEQ ID NO:3 + N238E + L262E

SEQ ID NO:3 + S156D + L262E

20

SEQ ID NO:3 + S3T + N76D + S156D + Y209W

SEQ ID NO:3 + Q137H + S141H + R145H + N238E + L262E

SEQ ID NO:3 + Q137H + S141H + R145H + S156D + L262E

25

SEQ ID NO:3 + S3T + N76D + Q137H + S141H + R145H + S156D + Y209W,

en donde las posiciones corresponden a las posiciones en SEQ ID NO: 1 y en donde la variante de subtilasa tiene al menos 60%, tal como al menos 70%, tal como al menos 80%, tal como al menos 90%, tal como al menos el 95%, tal como al menos el 98% o tal como al menos el 99% de identidad de secuencia a la SEQ ID NO: 3.

30

En una realización, la variante de subtilasa tiene un rendimiento en lavado mejorado. En otra realización, la variante de subtilasa tiene una estabilidad mejorada, preferiblemente una estabilidad mejorada durante el lavado.

35

En una realización, la variante de subtilasa tiene una estabilidad mejorada en el detergente líquido en comparación con la enzima original en donde la estabilidad se mide usando el "ensayo de estabilidad" como se describe en el ejemplo 4 de la sección Materiales y Métodos en el presente documento. En una realización, la variante de subtilasa tiene una estabilidad mejorada en comparación con el polipéptido de la SEQ ID NO: 2 en donde la estabilidad se mide usando el 'ensayo de estabilidad' como se describe en el ejemplo 4 de la sección de Materiales y Métodos en el presente documento. En una realización, la variante de subtilasa tiene una estabilidad mejorada en comparación con el polipéptido de la SEQ ID NO: 3 en donde la estabilidad se mide usando el 'ensayo de estabilidad' como se describe en el ejemplo 4 de la sección de Materiales y Métodos en el presente documento.

40

En una realización, la variante de subtilasa ha mejorado el rendimiento en lavado en comparación con la enzima original en donde el rendimiento en lavado se mide usando el Ensayo Automático de Estrés Mecánico (AMSA) para lavavajillas automático como se describe en el ejemplo 7 de la sección Materiales y Métodos de este documento. En una realización, la variante de subtilasa tiene un rendimiento en lavado mejorado en comparación con el polipéptido de SEQ ID NO: 2, en el que el rendimiento en lavado se mide usando el Ensayo Automático de Estrés Mecánico (AMSA) para lavavajillas automático como se describe en el ejemplo 7 de los Materiales y Métodos sección de este documento. En una realización, la variante de subtilasa tiene un rendimiento en lavado mejorado en comparación con el polipéptido de SEQ ID NO: 3 en el que el rendimiento en lavado se mide usando el Ensayo Automático de Estrés Mecánico (AMSA) para lavavajillas automático como se describe en el ejemplo 7 de la sección de Materiales y Métodos en este documento.

50

55

Proteasa progenitora

Las enzimas que escinden los enlaces amida en sustratos proteicos se clasifican como proteasas o (intercambiamente) peptidasas.

60

Serina proteasas: Una serina proteasa es una enzima que cataliza la hidrólisis de los enlaces peptídicos y en donde hay un residuo de serina esencial en el sitio activo. Las serina proteasas bacterianas tienen pesos moleculares en el

rango de 20.000 a 45.000 Dalton. Son inhibidos por el diisopropilfluorofosfato. Hidrolizan ésteres terminales simples y tienen una actividad similar a la quimotripsina eucariota, también una serina proteasa. Un término más limitado, la proteasa alcalina, que cubre un subgrupo, refleja el alto pH óptimo de algunas de las serina proteasas, desde pH 9.0 a 11.0.

5 Subtilasas: Siezen et al han propuesto un subgrupo de las serina proteasas tentativamente designadas subtilasas (1991), Protein Eng. 4: 719-737 and Siezen et al. (1997), Protein Science 6: 501-523. Se definen por análisis de homología de más de 170 secuencias de aminoácidos de serina proteasas anteriormente denominadas proteasas de tipo subtilisina. Una subtilisina se definía anteriormente como una serina proteasa producida por bacterias u hongos Gram-positivos, y de acuerdo con Siezen et al., ahora es un subgrupo de las subtilasas. Se ha identificado una amplia variedad de subtilasas y se ha determinado la secuencia de aminoácidos de varias subtilasas. Para una descripción más detallada de tales subtilasas y sus secuencias de aminoácidos, se hace referencia a Siezen et al. (1997).

15 Subtilisinas: Un subgrupo de las subtilasas son las subtilisinas que son serina proteasas de la familia S8, en particular de la subfamilia S8A, tal como se define en la base de datos MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/famsum?family=S8>). BPN' y Savinasa tienen los números MEROPS S08.034 y S08.003, respectivamente.

Subtilasa progenitora

20 El término "subtilasa progenitora" describe una subtilasa definida de acuerdo con Siezen et al. (1997), Protein Science 6: 501-523. Para más detalles véase la descripción de "Subtilasas" arriba. Una subtilasa progenitora también puede ser una subtilasa aislada de una fuente natural, en donde las modificaciones posteriores (tales como reemplazo(s) de la(s) cadena(s) lateral(es) de aminoácidos, sustitución(es), eliminación (es) y/o inserción(s) se han hecho conservando la característica de una subtilasa. Además, una subtilasa original puede ser una subtilasa que se ha preparado mediante la técnica de mezcla aleatoria de ADN.

25 Como alternativa, el término "subtilasa progenitora" puede denominarse "subtilasa de tipo salvaje". La subtilasa original es preferiblemente de los subgrupos de subtilisina. Un subgrupo de las subtilasas, I-S1 o subtilisinas "verdaderas", comprende las subtilisinas "clásicas", como la subtilisina 168 (BSS168), la subtilisina BPN', la subtilisina Carlsberg (ALCALASE®, NOVOZYMES A/S) y la subtilisina DY (BSSDY).

30 Siezen et al., reconocen un subgrupo adicional de las subtilasas, I-S2 o subtilisinas altamente alcalinas. (supra). Las proteasas del subgrupo I-S2 se describen como subtilisinas altamente alcalinas y comprenden enzimas como la subtilisina PB92 (BAALKP) (MAXACAL®, Genencor International Inc.), la subtilisina 309 (SAVINASE®, NOVOZYMES A/S), la subtilisina 147 (BLS147) (ESPERASE®, NOVOZYMES A/S) y elastasa alcalina YaB (BSEYAB). BPN' es subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* BPN' tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO 1.

35 Como referencia, la Tabla 1 a continuación da una lista de algunos acrónimos para diversas subtilasas mencionadas aquí. Para más acrónimos, véase Siezen et al. (1991 y 1997).

40

Tabla 1: Acrónimos de diversas subtilasas.

Organismo	Enzima	Acrónimo
Bacillus subtilis 168	subtilisin I168, apr	BSS168
Bacillus amyloliquefaciens	subtilisina BPN' (NOVO)	BASBPN
Bacillus subtilis DY	subtilisina DY	BSSDY
Bacillus licheniformis	subtilisina Carlsberg	BLSCAR
Bacillus lentus	subtilisina 309	BLSAVI
Bacillus lentus	subtilisina 147	BLS147
Bacillus alcalophilus PB92	subtilisina PB92	BAPB92
Bacillus YaB	elastasa alcalina YaB	BYSYAB
Bacillus sp. NKS-21	subtilisina ALP I	BSAPRQ
Bacillus sp. G-825-6	subtilisina Sendai	BSAPRS
Thermoactinomyces vulgaris	termitasa	TVTHER

Secuencias homólogas de subtilasa

5 La homología entre dos secuencias de aminoácidos se describe en este contexto mediante el parámetro "identidad" para los fines de la presente invención, el grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina usando el algoritmo Needleman-Wunsch como se describió anteriormente. El resultado de la rutina es, además de la alineación de aminoácidos, el cálculo del "porcentaje de identidad" entre las dos secuencias.

Con base en esta descripción, es una rutina para un experto en la técnica identificar subtilasas homólogas adecuadas, que pueden modificarse de acuerdo con la invención.

10 Las variantes de subtilisina progenitora sustancialmente homólogas pueden tener una o más (varias) sustituciones, eliminaciones y/o inserciones de aminoácidos, en el presente contexto el término "uno o más" se usa indistintamente con el término "varios". Estos cambios son preferiblemente de naturaleza menor, es decir, sustituciones conservadoras de aminoácidos como se describió anteriormente y otras sustituciones que no afectan significativamente el plegamiento tridimensional o la actividad de la proteína o polipéptido; pequeñas eliminaciones, típicamente de uno a 15 aproximadamente 30 aminoácidos; y pequeñas extensiones amino o carboxilo terminales, como un residuo de metionina amino terminal, un péptido conector pequeño de hasta aproximadamente 20-25 residuos, o una pequeña extensión que facilita la purificación (una etiqueta de afinidad), como un tracto de poli-histidina o proteína.

20 Aunque los cambios descritos anteriormente son preferiblemente de naturaleza menor, dichos cambios también pueden ser de naturaleza sustantiva, como la fusión de polipéptidos más grandes de hasta 300 aminoácidos o más, tanto como extensiones amino o carboxilo terminales.

25 El polipéptido de SEQ ID NO: 3 o un fragmento del mismo, puede usarse para diseñar sondas de ácido nucleico para identificar y clonar ADN que codifica un progenitor de cepas de diferentes géneros o especies de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. En particular, tales sondas pueden usarse para la hibridación con el ADN genómico o el ADNc de una célula de interés, siguiendo los procedimientos de inmunotransferencia Southern convencionales, para identificar y aislar el gen correspondiente en el mismo. Dichas sondas pueden ser considerablemente más cortas que la secuencia completa, pero deben tener al menos 15, por ejemplo, al menos 25, al menos 35 o al menos 70 nucleótidos de longitud. Preferiblemente, la sonda de ácido nucleico tiene una longitud de al menos 100 nucleótidos, 30 por ejemplo, al menos 200 nucleótidos, al menos 300 nucleótidos, al menos 400 nucleótidos, al menos 500 nucleótidos, al menos 600 nucleótidos, al menos 700 nucleótidos, al menos 800 nucleótidos, o al menos 900 nucleótidos de longitud. Se pueden usar sondas de ADN y ARN. Las sondas están típicamente marcadas para detectar el gen correspondiente (por ejemplo, con ³²P, ³H, ³⁵S, biotina o avidina). Dichas sondas están abarcadas por la presente invención.

35 Una biblioteca de ADN genómico o ADNc predeterminada a partir de tales otras cepas puede seleccionarse para ADN que hibrida con las sondas descritas anteriormente y codifica un progenitor. El ADN genómico u otro de tales otras cepas puede separarse mediante electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida, u otras técnicas de separación. El ADN de las bibliotecas o el ADN separado se puede transferir e inmovilizar en nitrocelulosa u otro material portador adecuado.

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

45 El progenitor puede ser un polipéptido de fusión o un polipéptido de fusión escindible en el que otro polipéptido se fusiona en el extremo N- o el terminal C- del polipéptido de la presente invención. Un polipéptido de fusión se produce fusionando un polinucleótido que codifica otro polipéptido a un polinucleótido de la presente invención. Las técnicas para producir polipéptidos de fusión son conocidas en la técnica, e incluyen ligar las secuencias de codificación que codifican los polipéptidos de modo que estén en marco y que la expresión del polipéptido de fusión esté bajo el control 50 del mismo promotor(es) y terminador. Los polipéptidos de fusión también pueden construirse usando tecnología de inteína en donde los polipéptidos de fusión se crean después de la traducción.

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 liberando los dos polipéptidos.

55 El progenitor puede obtenerse de microorganismos de cualquier género. Para los fines de la presente invención, el término "obtenido de" como se usa en el presente documento en relación con una fuente dada significará que el progenitor codificado por un polinucleótido es producido por la fuente o por una cepa en donde se ha insertado el polinucleótido de la fuente. En un aspecto, el progenitor se secreta extracelularmente.

60

5 El progenitor puede ser una proteasa bacteriana. Por ejemplo, el progenitor puede ser un polipéptido bacteriano Gram-positivo tal como un *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Geobacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Oceanobacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, o *Streptomyces protease*, o un polipéptido de bacterias Gram-negativas como *Campylobacter*, *E. coli*, *Flavobacterium*, *Fusobacterium*, *Helicobacter*, *Ilyobacter*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Salmonella* o *Ureaplasma protease*.

10 En un aspecto, el progenitor es una proteasa 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*.

En un aspecto, el progenitor es una proteasa de *Bacillus amyloliquefaciens*, por ejemplo, la proteasa de SEQ ID NO: 1 o el polipéptido maduro de la misma.

15 En otro aspecto, el progenitor es una proteasa de *Bacillus lentus*, por ejemplo, la proteasa de SEQ ID NO: 2 o el polipéptido maduro de la misma.

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

25 El progenitor puede identificarse y obtenerse de otras fuentes, incluidos microorganismos aislados de la naturaleza (por ejemplo, tierra, compost, agua, etc.) o muestras de ADN obtenidas directamente de materiales naturales (por ejemplo, tierra, compost, agua, etc.) utilizando las sondas mencionadas anteriormente. Las técnicas para aislar microorganismos y ADN directamente de hábitats naturales son bien conocidas en la técnica. Entonces se puede obtener un polinucleótido que codifica un progenitor cribando de manera similar una biblioteca de ADN genómico o ADNc de otro microorganismo o muestra de ADN mixta. Una vez que se ha detectado un polinucleótido que codifica un progenitor con la(s) sonda(s), el polinucleótido se puede aislar o clonar utilizando técnicas que son conocidas por los expertos en la técnica.

Preparación de variantes

35 La presente invención también se refiere a métodos para obtener una variante de subtilasa que tiene actividad de proteasa.

40 Las variantes se pueden preparar usando cualquier procedimiento de mutagénesis conocido en la técnica, tal como mutagénesis dirigida al sitio, construcción de genes sintéticos, construcción de genes semisintéticos, mutagénesis aleatoria, combinación, etc.

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

45 La mutagénesis dirigida al sitio se puede lograr in vitro mediante PCR que implica el uso de cebadores oligonucleotídicos que contienen la mutación deseada. La mutagénesis dirigida al sitio también se puede realizar in vitro mediante mutagénesis en casete 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, permitiendo que los extremos adhesivos del plásmido y el inserto se unan entre sí.

50 La mutagénesis dirigida al sitio también se puede lograr in vivo por métodos conocidos en la técnica.

55 Cualquier procedimiento de mutagénesis dirigida al sitio puede usarse en la presente invención. Hay muchos kits comerciales disponibles que pueden usarse para preparar variantes.

60 La construcción de genes sintéticos implica la síntesis in vitro de una molécula de polinucleótido 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 y tecnologías similares en las que los oligonucleótidos se sintetizan y ensamblan en chips para microfluidos fotoprogramables.

Las sustituciones, eliminaciones y/o inserciones de aminoácidos simples o múltiples se pueden realizar y probar usando métodos conocidos de mutagénesis, recombinación y/o combinación aleatoria, seguidos de un procedimiento de selección relevante. Otros métodos que pueden usarse incluyen PCR propensa a errores, presentación de fagos y mutagénesis dirigida a la región.

5 Los métodos de mutagénesis/combinación pueden combinarse con métodos de cribado automatizados de alto rendimiento para detectar la actividad de polipéptidos mutagenizados clonados expresados por células huésped. Las moléculas de ADN mutagenizadas que codifican polipéptidos activos pueden recuperarse de las células huésped 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.

15 La construcción de genes semisintéticos se logra combinando aspectos de la construcción de genes sintéticos, y/o mutagénesis dirigida al sitio, y/o mutagénesis aleatoria, y/o mezcla aleatoria. La construcción semisintética se caracteriza por un proceso que utiliza fragmentos de polinucleótidos que se sintetizan, en combinación con técnicas de PCR. Por lo tanto, las regiones definidas de genes pueden sintetizarse de novo, mientras que otras regiones pueden amplificarse usando cebadores mutagénicos específicos del sitio, mientras que otras regiones pueden someterse a PCR propensa a errores o amplificación de PCR no propensa a errores. Las subsecuencias de polinucleótidos pueden entonces barajarse.

20 Polinucleótidos

La presente invención también se refiere a polinucleótidos que codifican una variante de la presente invención.

Constructos de ácidos nucleicos

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

30 El polinucleótido se puede manipular 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 que utilizan métodos de ADN recombinante son bien conocidas en la técnica.

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

45 Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de los constructos de ácidos nucleicos de la presente invención en una célula huésped bacteriana son los promotores obtenidos del gen de la alfa-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* (amyQ), el gen de la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (amyL), gen de la penicilinas de *Bacillus licheniformis* (penP), gen de la amilasa maltogénica de *Bacillus stearothermophilus* (amyM), gen de *Bacillus subtilis* levansucrasa (sacB), genes de *Bacillus subtilis* xylA y xylB, gen de *Bacillus thuringiensis* cryIIIA, lac operón de *E. coli*, promoter trc de *E. coli*, gen agarasa de *Streptomyces coelicolor* (dagA) y gen procariota beta-lactamasa, así como el promotor tac.

50 La secuencia de control también puede ser un terminador de transcripción, que es reconocido por una célula huésped 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 huésped.

55 Los terminadores preferidos para las células huésped bacterianas se obtienen de los genes para la proteasa alcalina (aprH) de *Bacillus clausii*, la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (amyL) y el ARN ribosómico de *Escherichia coli* (rrnB).

La secuencia de control también puede ser una región estabilizadora de ARNm corriente abajo de un promotor y aguas arriba de la secuencia de codificación de un gen que aumenta la expresión del gen.

60

Se obtienen ejemplos de regiones estabilizadoras de ARNm adecuadas a partir de un gen *cryIIIA* de *Bacillus thuringiensis* y un gen SP82 de *Bacillus subtilis*.

5 La secuencia de control también puede ser una región de codificación de péptido de señalización que codifica un péptido de señalización unido al extremo N 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 de señalización naturalmente unida 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 de señalización que es extraña a la secuencia de codificación. Puede requerirse una secuencia codificante de péptido de señalización extraño cuando la secuencia codificante no contiene naturalmente una secuencia codificante de péptido de señalización. Alternativamente, una secuencia codificante de péptido de señalización extraño puede simplemente reemplazar la secuencia codificante de péptido de señalización natural para mejorar la secreción de la variante. Sin embargo, puede usarse cualquier secuencia de codificación de péptido de señalización que dirija la variante expresada hacia la ruta secretora de una célula huésped.

20 Las secuencias de codificación de péptidos señal efectivas para células huésped bacterianas son las secuencias de codificación de péptidos señal obtenidas de los genes para *Bacillus* NCIB 11837 amilasa maltogénica, subtilisina de *Bacillus licheniformis*, beta-lactamasade *Bacillus licheniformis*, alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, proteasa neutral de *Bacillus stearothermophilus* (nprT, nprS, nprM) y prsA de *Bacillus subtilis*.

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

30 Cuando están presentes tanto el péptido de señalización como las secuencias de propéptido, la secuencia de propéptido se coloca al lado del extremo N de la variante y la secuencia de péptido de señal se coloca al lado del extremo N de la secuencia de propéptido.

35 También puede ser deseable agregar secuencias reguladoras que regulen la expresión de la variante en relación con el crecimiento de la célula huésped. 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 procariontes incluyen los sistemas de operador lac, tac y trp.

40 Vectores de expresión

45 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 detención transcripcionales y de traducción. 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.

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

55 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 huésped, se integra en el genoma y se replica junto con el (los) cromosoma(s) en el 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 a introducir en el genoma de la célula huésped, o un transposón.

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.

5 Ejemplos de marcadores bacterianos seleccionables son genes de *Bacillus licheniformis* o *Bacillus subtilis* del, o marcadores que confieren resistencia a antibióticos tales como ampicilina, cloranfenicol, kanamicina, neomicina, espectinomycinina o resistencia a tetraciclina.

10 El vector contiene preferiblemente un elemento(s) que permite la integración del vector en el genoma de la célula huésped o la replicación autónoma del vector en la célula independiente del genoma.

15 Para la integración en el genoma de la célula huésped, 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 huésped en una 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 100 a 10.000 pares de bases, 400 a 10.000 pares de bases y 800 a 10.000 pares de bases, que tienen un alto grado de identidad de secuencia con la secuencia objetivo correspondiente para mejorar la probabilidad de recombinación homóloga. Los elementos integracionales pueden ser cualquier secuencia que sea homóloga con la secuencia diana en el genoma de la célula huésped. Además, los elementos integracionales pueden ser polinucleótidos no codificantes o codificadores. Por otro lado, el vector puede integrarse en el genoma de la célula huésped por recombinación no homóloga.

25 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 huésped en cuestión. El origen de la replicación puede ser cualquier replicador de plásmidos que media 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.

30 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*.

35 Se puede insertar más de una copia de un polinucleótido de la presente invención en una célula huésped 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 huésped o incluyendo un gen marcador seleccionable amplificable 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.

40 Los procedimientos utilizados para ligar los elementos descritos anteriormente para construir los vectores de expresión recombinantes de la presente invención son bien conocidos por un experto en la técnica.

45 Células huésped

La presente invención también se refiere a células huésped recombinantes, que comprenden un polinucleótido que codifica una variante de la presente invención operativamente unida 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 huésped de modo que la construcción o el vector se mantenga como un integrante cromosómico o como un vector extracromosómico autorreplicante como se describió anteriormente. El término "célula huésped" abarca cualquier progenie de una célula madre que no sea idéntica a la célula madre debido a mutaciones que ocurren durante la replicación. La elección de una célula huésped dependerá en gran medida del gen que codifica la variante y su fuente.

55 La célula huésped puede ser cualquier célula útil en la producción recombinante de una variante, por ejemplo, una procariota o una eucariota.

60 La célula huésped procariota puede ser cualquier bacteria Gram-positiva o Gram-negativa. Las bacterias grampositivas incluyen, entre otras, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Geobacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Oceanobacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Streptomyces*. Las bacterias gramnegativas incluyen, entre otras,

Campylobacter, *E. coli*, *Flavobacterium*, *Fusobacterium*, *Helicobacter*, *Ilyobacter*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Salmonella* y *Ureaplasma*.

5 La célula huésped bacteriana puede ser cualquier célula de *Bacillus* incluyendo, entre otras, *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 thuringiensis*.

10 La célula huésped bacteriana también puede ser cualquier célula de *Streptococcus* que incluye, pero no se limita a, células de *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus uberis* y *Streptococcus equi subsp. Zooepidemicus*.

15 La célula huésped bacteriana también puede ser cualquier célula de *Streptomyces*, incluidas, entre otras, *Streptomyces achromogenes*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces griseus* y *Streptomyces lividans*.

20 La introducción de ADN en una célula de *Bacillus* puede efectuarse mediante transformación de protoplastos, transformación celular competente, electroporación o conjugación. La introducción de ADN en una célula de *E. coli* puede efectuarse mediante transformación de protoplastos o electroporación. La introducción de ADN en una célula de *Streptomyces* puede realizarse mediante transformación de protoplastos, electroporación, conjugación o transducción. La introducción de ADN en una célula de *Pseudomonas* puede realizarse por electroporación o conjugación. La introducción de ADN en una célula de *Streptococcus* puede realizarse por competencia natural, transformación de protoplastos, electroporación o conjugación. Sin embargo, se puede usar cualquier método conocido en la técnica para introducir ADN en una célula huésped.

25 Métodos de producción

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

35 Las células huésped se cultivan en un medio nutritivo adecuado para la producción de la variante usando 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, alimentadas o de estado sólido) en fermentadores de laboratorio o industriales realizados en un medio adecuado y bajo condiciones que permiten 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 composiciones publicadas (por ejemplo, en catálogos de la American Type Culture Collection). Si la variante se secreta en el medio nutriente, la variante se puede recuperar directamente del medio. Si la variante no se secreta, se puede recuperar de los lisados celulares.

45 La variante puede detectarse usando métodos conocidos en la técnica que son específicos para las variantes con actividad de proteasa. 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.

50 La variante se puede recuperar utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la variante puede recuperarse del medio nutriente mediante procedimientos convencionales que incluyen, pero no se limitan a, recolección, centrifugación, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación o precipitación.

55 La variante puede purificarse mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, hidrofóbico, cromatoenfoco y exclusión por tamaño), procedimientos electroforéticos (por ejemplo, enfoque isoelectrico preparativo), solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación con sulfato de amonio), SDS-PAGE o extracción para obtener variantes sustancialmente puras.

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

60 Composiciones

5 En un cierto aspecto, las variantes según la invención tienen un rendimiento en lavado mejorado en comparación con la enzima original o en comparación con una proteasa que tiene la secuencia de aminoácidos idéntica de dicha variante pero que no tiene las alteraciones en una o más de dichas posiciones especificadas o en comparación con el polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2, en el que el rendimiento del lavado se mide usando el Ensayo Automático de Estrés Mecánico (AMSA) para lavavajillas automático como se describe en la sección de Materiales y Métodos en este documento.

10 En otro cierto aspecto, las variantes según la invención tienen una estabilidad mejorada, preferiblemente una estabilidad mejorada durante el lavado, en comparación con la enzima original o en comparación con una proteasa que tiene la secuencia de aminoácidos idéntica de dicha variante pero que no tiene las alteraciones en uno o más de dichas posiciones especificadas o en comparación con el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 2, en el que la estabilidad se mide usando el 'ensayo de estabilidad en lavado' como se describe en la sección Materiales y Métodos en el presente documento.

15 Por lo tanto, en una realización preferida, la composición es una composición detergente, y un aspecto de la invención se refiere al uso de una composición detergente que comprende una variante según la invención en un proceso de limpieza tal como lavado de ropa o limpieza de superficies duras.

20 La elección de componentes adicionales está dentro de la habilidad del técnico e incluye ingredientes convencionales, que incluyen los componentes no limitativos de ejemplo expuestos a continuación. La elección de los componentes puede incluir, para el cuidado de la tela, la consideración del tipo de tela a limpiar, el tipo y/o grado de suciedad, la temperatura a la que se realizará la limpieza y la formulación del producto detergente. Aunque los componentes mencionados a continuación se clasifican por encabezado general de acuerdo con una funcionalidad particular, esto no debe interpretarse como una limitación, ya que un componente puede comprender funcionalidades adicionales como apreciará el experto en la técnica.

Enzima de la presente invención

30 En una realización de la presente invención, el polipéptido puede añadirse a una composición detergente en una cantidad correspondiente a 0.01-200 mg de proteína enzimática por litro de líquido de lavado, preferiblemente 0.05-50 mg de proteína enzimática por litro de licor de lavado, en particular 0.1-10 mg de proteína enzimática por litro de licor de lavado.

35 Una composición para usar en el lavavajillas automático (ADW), por ejemplo, puede incluir 0.0001-50%, tal como 0.001-30%, tal como 0.01-20%, tal como 0.5-15% de proteína enzimática en peso de la composición.

Una composición para usar en granulación de ropa, por ejemplo, puede incluir 0.0001-50%, tal como 0.001-20%, tal como 0.01-10%, tal como 0.05-5% de proteína enzimática en peso de la composición.

40 Una composición para usar en el líquido de lavado, por ejemplo, puede incluir 0.0001-10%, tal como 0.001-7%, tal como 0.1-5% de proteína enzimática en peso de la composición.

45 La enzima(s) de la composición detergente de la invención puede estabilizarse usando agentes estabilizantes convencionales, por ejemplo, un poliol tal como propilenglicol o glicerol, un azúcar o alcohol de azúcar, ácido láctico, ácido bórico o un derivado de ácido bórico, por ejemplo, un éster de borato aromático, o un derivado de ácido fenilborónico tal como ácido 4-formilfenil borónico, y la composición puede formularse como se describe, por ejemplo, en WO92/19709 y WO92/19708 o las variantes de acuerdo con la invención puede estabilizarse usando péptidos aldehídos o cetonas como se describe en WO2005/105826 y WO2009/118375.

50 También se puede incorporar una variante de la presente invención en las formulaciones de detergente descritas en el documento WO97/07202, que se incorpora aquí como referencia.

Tensioactivos

55 La composición detergente puede comprender uno o más tensioactivos, que pueden ser aniónicos y/o catiónicos y/o no iónicos y/o semipolares y/o zwitteriónicos, o una mezcla de los mismos. En una realización particular, la composición detergente incluye una mezcla de uno o más tensioactivos no iónicos y uno o más tensioactivos aniónicos. El (los) tensioactivo(s) está(n) típicamente presente en un nivel de aproximadamente 0.1% a 60% en peso, tal como aproximadamente 1% a aproximadamente 40%, o aproximadamente 3% a aproximadamente 20%, o aproximadamente 3% a aproximadamente 10%. Los tensioactivos se eligen en función de la aplicación de limpieza

deseada e incluyen cualquier tensioactivo convencional conocido en la técnica. Se puede utilizar cualquier tensioactivo conocido en la técnica para su uso en detergentes.

5 Cuando se incluye en el mismo, el detergente contendrá generalmente de aproximadamente 1% a aproximadamente 40% en peso, tal como de aproximadamente 5% a aproximadamente 30%, que incluye de aproximadamente 5% a aproximadamente 15%, o de aproximadamente 20% a aproximadamente 25% de un tensioactivo aniónico. Ejemplos no limitantes de tensioactivos aniónicos incluyen sulfatos y sulfonatos, en particular, alquilbencenosulfonatos lineales (LAS), isómeros de LAS, alquilbencenosulfonatos ramificados (BABS), fenilalcanosulfonatos, alfa-olefininsulfonatos (AOS), olefininsulfonatos, alquenosulfonatos, alcano-2,3-diilbis(sulfatos), hidroxialcanosulfonatos y disulfonatos, 10 alquilsulfatos (AS) tales como dodecil sulfato de sodio (SDS), sulfatos de alcohol graso (FAS), sulfatos de alcohol primario (PAS), etersulfatos de alcohol (AES o AEOS o FES, también conocidos como etoxisulfatos de alcohol o sulfatos de éter de alcohol graso), alcanosulfonatos secundarios (SAS), sulfonatos de parafina (PS), sulfonatos de éster, ésteres de glicerol de ácido graso sulfonado, ésteres de metilo de ácido graso de alfa-sulfo (alfa-SFMe o SES) incluyendo sulfonato de éster metílico (MES), ácido alquil o alqueniilsuccínico, ácido dodecenil/tetradecenil succínico (DTSA), derivados de ácidos grasos de aminoácidos, diésteres y monoésteres de ácido sulfosuccínico o jabón, y 15 combinaciones de los mismos.

20 Cuando se incluye en el mismo, el detergente contendrá habitualmente de aproximadamente 0% a aproximadamente 10% en peso de un tensioactivo catiónico. Entre los ejemplos no limitantes de tensioactivos catiónicos se incluyen quat de aldimetiletanolamina (ADMEAQ), bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), cloruro de dimetildiarilamonio (DSDMAC) y alquilbencildimetilamonio, compuestos de alquilamonio cuaternario, compuestos de amonio cuaternario alcoxilado y combinaciones de los mismos.

25 Cuando se incluye en el mismo, el detergente contendrá habitualmente de aproximadamente 0.2% a aproximadamente 40% en peso de un tensioactivo no iónico, por ejemplo, de aproximadamente 0.5% a aproximadamente 30%, en particular de aproximadamente 1% a aproximadamente 20%, de aproximadamente 3% a aproximadamente 10%, tal como de aproximadamente 3% a aproximadamente 5%, o de aproximadamente 8% a aproximadamente 12%. Ejemplos no limitantes de tensioactivos no iónicos incluyen alcohol etoxilatos (AE u AEO), alcohol propoxilatos, 30 alcoholes grasos propoxilados (PFA), ésteres alquílicos de ácidos grasos alcoxilados, tales como ésteres alquílicos de ácidos grasos etoxilados y/o propoxilados, etoxilatos de alquilfenol (APE), etoxilatos de nonilfenol (NPE), alquilpoliglicósidos (APG), aminas alcoxiladas, monoetanolamidas de ácidos grasos (FAM), dietanolamidas de ácidos grasos (FADA), monoetanolamidas de ácidos grasos etoxilados (EFAM), monoetanolamidas de ácidos grasos propoxilados (alquil PFAM), polihidroácidos grasos polihidroxilados amidas, o N-acil N-alquil derivados de glucosamina (glucamidas, GA o glucamida de ácido graso, FAGA), así como productos disponibles con los nombres comerciales 35 SPAN y TWEEN, y combinaciones de los mismos.

40 Cuando se incluye en el mismo, el detergente contendrá habitualmente de aproximadamente 0% a aproximadamente 10% en peso de un tensioactivo semipolar. Ejemplos no limitantes de tensioactivos semipolares incluyen óxidos de amina (AO) tales como óxido de alquildimetilamina, óxido de N-(cocoalquil)-N,N-dimetilamina y óxido de N-(sebo alquilo)-N,N-bis(2-hidroxietil)amina, alcanolamidas de ácidos grasos y alcanolamidas de ácidos grasos etoxilados, y combinaciones de los mismos.

45 Cuando se incluye en el mismo, el detergente contendrá habitualmente de aproximadamente 0% a aproximadamente 10% en peso de un tensioactivo zwitteriónico. Ejemplos no limitantes de tensioactivos zwitteriónico incluyen betaína, alquildimetilbetaína, sulfobetaína y combinaciones de los mismos.

Hidrótropos

50 Un hidrótopo es un compuesto que solubiliza compuestos hidrófobos en soluciones acuosas (o, por el contrario, sustancias polares en un entorno no polar). Típicamente, los hidrótopos tienen un carácter tanto hidrófilo como hidrófobo (las llamadas propiedades anfífilas conocidas por los tensioactivos); sin embargo, la estructura molecular de los hidrótopos generalmente no favorece la autoagregación espontánea. Los hidrótopos no muestran una concentración crítica por encima de la cual se produce la autoagregación como se encuentra para los tensioactivos y los lípidos que forman micelas, lamelares u otras mesofases bien definidas. En cambio, muchos hidrótopos muestran 55 un proceso de agregación de tipo continuo donde los tamaños de los agregados crecen a medida que aumenta la concentración. Sin embargo, muchos hidrótopos alteran el comportamiento de fase, la estabilidad y las propiedades coloidales de los sistemas que contienen sustancias de carácter polar y no polar, incluidas mezclas de agua, aceite, tensioactivos y polímeros. Los hidrótopos se usan de manera clásica en todas las industrias, desde la farmacéutica, el cuidado personal, los alimentos hasta las aplicaciones técnicas. El uso de hidrótopos en composiciones detergentes 60 permite, por ejemplo, formulaciones más concentradas de tensioactivos (como en el proceso de compactación de

detergentes líquidos mediante la eliminación de agua) sin inducir fenómenos no deseados, tales como separación de fases o alta viscosidad.

El detergente puede contener 0-5% en peso, tal como aproximadamente 0.5 a aproximadamente 5%, o aproximadamente 3% a aproximadamente 5%, de un hidrótripo. Se puede utilizar cualquier hidrótripo conocido en la técnica para su uso en detergentes. Ejemplos no limitantes de hidrótripos incluyen bencenosulfonato de sodio, p-toluenosulfonato de sodio (STS), xilenosulfonato de sodio (SXS), cumenosulfonato de sodio (SCS), cimenosulfonato de sodio, óxidos de amina, alcoholes y poliglicóleres, hidroxinaftoato de sodio, hidroxinaftaleno de sodio sulfonato, etilhexil sulfato de sodio y combinaciones de los mismos.

Potenciadores y copotenciadores

La composición detergente puede contener aproximadamente 0-65% en peso, tal como aproximadamente 5% a aproximadamente 45% de un potenciador o copotenciador de detergente, o una mezcla de los mismos. En un detergente para lavavajillas, el nivel de potenciador es típicamente del 40-65%, particularmente del 50-65%. El potenciador y/o copotenciador puede ser particularmente un agente quelante que forma complejos solubles en agua con Ca y Mg. Se puede utilizar cualquier potenciador y/o copotenciador conocido en la técnica para su uso en detergentes para ropa. Ejemplos no limitantes de potenciadores incluyen zeolitas, difosfatos (pirofosfatos), trifosfatos como el trifosfato de sodio (STP o STPP), carbonatos como el carbonato de sodio, silicatos solubles como el metasilicato de sodio, silicatos en capas (por ejemplo, SKS-6 de Hoechst), etanolaminas tales como 2-aminoetan-1-ol (MEA), dietanolamina (DEA, también conocida como iminodietanol), trietanolamina (TEA, también conocida como 2,2',2"-nitritotrietanol) y carboximetil inulina (CMI), y combinaciones de los mismos.

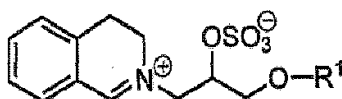
La composición detergente también puede contener 0-20% en peso, tal como aproximadamente 5% a aproximadamente 10%, de un potenciador de detergente, o una mezcla de los mismos. La composición detergente puede incluir un potenciador solo, o en combinación con un potenciador, por ejemplo, un potenciador de zeolita. Ejemplos no limitantes de copotenciadores incluyen homopolímeros de poliacrilatos o copolímeros de los mismos, tales como poli(ácido acrílico) (PAA) o copoli(ácido acrílico/ácido maleico) (PAA/PMA). Otros ejemplos no limitantes incluyen citrato, quelantes tales como aminocarboxilatos, aminopolicarboxilatos y fosfonatos, y ácido alquil o alqueniilsuccínico. Ejemplos específicos adicionales incluyen ácido 2,2',2"-nitritotriacético (NTA), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), ácido iminodisuccínico (IDS), ácido etilendiamina-N,N'-disuccínico (EDDS), ácido metilglicinacético (MGDA), ácido glutámico-N,N'-diacético (GLDA), ácido 1-hidroxietano-1,1-difosfónico (HEDP), etilendiaminotetra-(ácido metileno fosfónico) (EDTMPA), dietilentriaminapentakis-(ácido metileno fosfónico) (DTPMPA o DTMPA), ácido N-(2-hidroxietil)iminodiacético (EDG), ácido aspártico-N-monoacético (ASMA), ácido aspártico-N,N'-diacético (ASDA), ácido aspártico-N-monopropiónico (ASMP), ácido iminodisuccínico (IDA), ácido N-(2-sulfometil)-aspártico (SMAS), ácido N-(2-sulfoetil)-aspártico (SEAS), ácido N-(2-sulfometil)-glutámico (SMGL), ácido N-(2-sulfoetil)glutámico (SEGL), ácido N-metiliminodiacético (MIDA), ácido α -alanina-N,N'-diacético (α -ALDA), ácido serina-N,N'-diacético (SEDA), ácido isoserina-N,N'-diacético (ISDA), ácido fenilalanina-N,N'-diacético (PHDA), ácido antranílico-N,N'-diacético (ANDA), ácido sulfanílico-N,N'-diacético (SLDA), ácido taurina-N,N'-diacético (TUDA) y ácido sulfometil-N,N'-diacético (SMDA), N-(2-hidroxietil)-etilendiamina-N,N'-triacetato (HEDTA), dietanoglicina (DEG), dietilentriamina penta (ácido metileno fosfónico) (DTPMP), aminotris (ácido metileno fosfónico) (ATMP), y sus combinaciones y sales. Otros potenciadores y/o copotenciadores de ejemplo se describen en, por ejemplo, WO09/102854, US5977053.

Sistemas de blanqueo

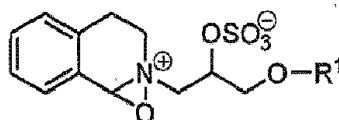
El detergente puede contener 0-50% en peso, tal como aproximadamente 0.1% a aproximadamente 25%, de un sistema de blanqueo. Se puede utilizar cualquier sistema de blanqueo conocido en la técnica para su uso en detergentes para ropa. Los componentes adecuados del sistema de blanqueo incluyen catalizadores de blanqueo, fotoblanqueo, activadores de blanqueo, fuentes de peróxido de hidrógeno tales como percarbonato de sodio y perboratos de sodio, perácidos preformados y sus mezclas. Los perácidos preformados adecuados incluyen, pero no se limitan a, ácidos y sales peroxicarboxílicos, ácidos y sales percarbónicos, ácidos y sales perimídicos, ácidos y sales peroximonosulfúricos, por ejemplo, Oxona (R), y mezclas de los mismos. Ejemplos no limitativos de sistemas de blanqueo incluyen sistemas de blanqueo a base de peróxido, que pueden comprender, por ejemplo, una sal inorgánica, que incluye sales de metales alcalinos tales como sales de sodio de perborato (generalmente monohidrato o tetrahidrato), percarbonato, persulfato, perfosfato, sales de persilicato, en combinación con un activador de blanqueo que forma perácidos. El término activador de blanqueo se entiende aquí como un compuesto que reacciona con blanqueador peroxigenado como el peróxido de hidrógeno para formar un perácido. El perácido así formado constituye el blanqueador activado. Los activadores de blanqueo adecuados para usar en el presente documento incluyen los que pertenecen a la clase de ésteres amidas, imidas o anhídridos. Ejemplos adecuados son tetracetiletilendiamina (TAED), 4-[(3,5,5-trimetilhexanoil)oxi]bencenosulfonato de sodio (ISONOBS), ácido diperoxidodecanoico, 4-(dodecanoiloxi)bencenosulfonato (LOBS), 4-(decanoiloxi)-bencenosulfonato, 4-(decanoiloxi)benzoato (DOBS), 4-

(nonanoiloxi)-bencenosulfonato (NOBS), y/o los descritos en el documento WO98/17767. Una familia particular de activadores de blanqueo de interés se describió en EP624154 y particularmente preferida en esa familia es el citrato de acetil trietilo (ATC). El ATC o un triglicérido de cadena corta como la triacetina tiene la ventaja de que es amigable con el medio ambiente ya que eventualmente se degrada en ácido cítrico y alcohol. Además, el citrato de acetil trietilo y la triacetina tienen una buena estabilidad hidrolítica en el producto tras el almacenamiento y es un activador de blanqueo eficiente. Finalmente, el ATC proporciona una buena capacidad de construcción para el aditivo de lavado. Alternativamente, el sistema de blanqueo puede comprender peroxiácidos de, por ejemplo, el tipo de amida, imida o sulfona. El sistema de blanqueo también puede comprender perácidos tales como ácido 6-(ftalimido)-peroxihexanoico (PAP). El sistema de blanqueo también puede incluir un catalizador de blanqueo. En algunas realizaciones, el componente blanqueador puede ser un catalizador orgánico seleccionado del grupo que consiste en catalizadores orgánicos que tienen las siguientes fórmulas:

(i)



(ii)



(iii) y mezclas de los mismos; en donde cada R¹ es independientemente un grupo alquilo ramificado que contiene de 9 a 24 carbonos o un grupo alquilo lineal que contiene de 11 a 24 carbonos, preferiblemente cada R¹ es independientemente un grupo alquilo ramificado que contiene de 9 a 18 carbonos o un grupo alquilo lineal que contiene de 11 a 18 carbonos, más preferiblemente cada 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. Se describen otros sistemas de blanqueo de ejemplo, por ejemplo, en WO2007/087258, WO2007/087244, WO2007/087259 y WO2007/087242. Los fotoblanqueadores adecuados pueden ser, por ejemplo, ftalocianina de zinc sulfonatada.

Polímeros

El detergente puede contener 0-10% en peso, tal como 0.5-5%, 2-5%, 0.5-2% o 0.2-1% de un polímero. Se puede utilizar cualquier polímero conocido en la técnica para su uso en detergentes. El polímero puede funcionar como copotenciador como se mencionó anteriormente, o puede proporcionar propiedades antirredeposición, protección de fibra, liberación de suciedad, inhibición de transferencia de tinte, limpieza de grasa y/o propiedades antiespumantes. Algunos polímeros pueden tener más de una de las propiedades mencionadas anteriormente y/o más de uno de los motivos mencionados a continuación. Los polímeros de ejemplo incluyen (carboximetil)celulosa (CMC), poli(alcohol vinílico) (PVA), poli(vinilpirrolidona) (PVP), poli(etilenglicol) o poli(óxido de etileno) (PEG), poli(etilenimina etoxilada), carboximetil inulina (CMI) y policarboxilatos tales como PAA, PAA/PMA, ácido poliaspártico y copolímeros de metacrilato de laurilo/ácido acrílico, CMC hidrófobamente modificado (HM-CMC) y siliconas, copolímeros de ácido tereftálico y glicoles oligoméricos, copolímeros de poli(tereftalato de etileno) y poli(tereftalato de oxieteno) (PET-POET), PVP, poli(vinilimidazol) (PVI), poli(vinilpiridina-N-óxido) (PVPO o PVPNO) y polivinilpirrolidona-vinilimidazol (PVPVI). Otros polímeros de ejemplo incluyen policarboxilatos sulfonados, óxido de polietileno y óxido de polipropileno (PEO-PPO) y etoxisulfato de dicuartenio. Otros polímeros de ejemplo se describen, por ejemplo, en WO2006/130575. También se contemplan las sales de los polímeros mencionados anteriormente.

Agentes para tintura de tela

Las composiciones detergentes de la presente invención también pueden incluir agentes colorantes de telas tales como tintes o pigmentos, que cuando se formulan en composiciones detergentes pueden depositarse sobre una tela cuando dicha tela se pone en contacto con un licor de lavado que comprende dichas composiciones detergentes y así altera el tinte de dicho tejido a través de la absorción/reflexión de la luz visible. Los agentes blanqueadores fluorescentes emiten al menos algo de luz visible. Por el contrario, los agentes de matizado de tela alteran el tinte de una superficie ya que absorben al menos una parte del espectro de luz visible. Los agentes de coloración de tejidos adecuados incluyen tintes y conjugados de tinte-arcilla, y también pueden incluir pigmentos. Los tintes adecuados incluyen tintes de moléculas pequeñas y tintes poliméricos. Los tintes de molécula pequeña adecuados incluyen tintes de molécula pequeña seleccionados del grupo que consiste en tintes que caen en las clasificaciones de índice de color (C.I.) de azul directo, rojo directo, violeta directo, azul ácido, rojo ácido, violeta ácido, azul básico, violeta básico y

básico rojo, o mezclas de los mismos, por ejemplo, como se describe en los documentos WO2005/03274, WO2005/03275, WO2005/03276 y EP1876226 (incorporados aquí como referencia). La composición detergente comprende preferiblemente de aproximadamente un 0.00003% en peso a aproximadamente un 0.2% en peso, de aproximadamente un 0.00008% en peso a aproximadamente un 0.05% en peso, o incluso de aproximadamente un 0.0001% en peso a aproximadamente un 0.04% en peso de agente de coloración de tejidos. La composición puede comprender de 0.0001% en peso a 0.2% en peso de agente de coloración de tejidos, esto puede ser especialmente preferido cuando la composición está en forma de una bolsa de dosis unitaria. Los agentes de coloración adecuados también se describen en, por ejemplo, WO2007/087257 y WO2007/087243.

10 Enzimas Adicionales

El aditivo detergente, así como la composición detergente pueden comprender una o más enzimas (adicionales) tales como una proteasa, lipasa, cutinasa, una amilasa, carbohidrasa, celulasa, pectinasa, mananasa, arabinasa, galactanasa, xilanasas, oxidasas, por ejemplo, una lacasa y/o peroxidasa.

15 En general, las propiedades de la(s) enzima(s) seleccionada(s) deben ser compatibles con el detergente seleccionado (es decir, pH óptimo, compatibilidad con otros ingredientes enzimáticos y no enzimáticos, etc.) y la(s) enzima(s) debe estar presente en cantidades efectivas.

20 Celulasas

Las celulasas adecuadas incluyen las de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen mutantes modificados químicamente o diseñados con proteínas. Las celulasas adecuadas incluyen celulasas de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Humicola*, *Fusarium*, *Thielavia*, *Acremonium*, por ejemplo, las celulasas fúngicas producidas a partir de *Humicola insolens*, *Myceliophthora thermophila* y *Fusarium oxysporum* descritas en US4435307, US5648263, US5691178, US5776757 y WO89/09259.

30 Las celulasas especialmente adecuadas son las celulasas alcalinas o neutras que tienen beneficios para el cuidado del color. Ejemplos de tales celulasas son las celulasas descritas en EP0495257, EP0531372, WO96/11262, WO96/29397, WO98/08940. Otros ejemplos son variantes de celulasa tales como las descritas en WO94/07998, EP0531315, US5457046, US5686593, US5763254, WO95/24471, WO98/12307 y PCT/K98/00299.

Ejemplo de celulasas que exhiben actividad endo-beta-1,4-glucanasa (EC 3.2.1.4) son las que se han descrito en el documento WO02/099091.

35 Otros ejemplos de celulasas incluyen la familia de 45 celulasas descritas en el documento WO96/29397, y especialmente variantes de las mismas que tienen sustitución, inserción y/o eliminación en una o más de las posiciones correspondientes a las siguientes posiciones en la SEQ ID NO: 8 de WO02/099091: 2, 4, 7, 8, 10, 13, 15, 19, 20, 21, 25, 26, 29, 32, 33, 34, 35, 37, 40, 42, 42a, 43, 44, 48, 53, 54, 55, 58, 59, 63, 64, 65, 66, 67, 70, 72, 76, 79, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 91, 93, 95, 95d, 95h, 95j, 97, 100, 101, 102, 103, 113, 114, 117, 119, 121, 133, 136, 137, 138, 139, 140a, 141, 143a, 145, 146, 147, 150e, 150j, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160c, 160e, 160k, 161, 162, 164, 165, 168, 170, 171, 172, 173, 175, 176, 178, 181, 183, 184, 185, 186, 188, 189, 191, 192, 195, 196, 200 y/o 20, preferiblemente seleccionados entre P19A, G20K, Q44K, N48E, Q119H o Q146 R.

45 Las celulasas disponibles comercialmente incluyen Celluzyme™ y Carezyme™ (Novozymes A/S), Clazinas™ y Puradax HA™ (Genencor International Inc.) y KAC-500 (B)™ (Kao Corporation).

Proteasas

50 Las proteasas adecuadas incluyen las de origen bacteriano, fúngico, vegetal, viral o animal, por ejemplo, origen vegetal o microbiano. Se prefiere el origen microbiano. Se incluyen mutantes modificados químicamente o diseñados con proteínas. Puede ser una proteasa alcalina, como una serina proteasa o una metaloproteasa. Una serina proteasa puede ser, por ejemplo, de la familia S1, como la tripsina, o la familia S8, como la subtilisina. Una proteasa de metaloproteasas puede ser, por ejemplo, una termolisina de, por ejemplo, familia M4 u otra metaloproteasa como las de las familias M5, M7 o M8.

60 El término "subtilasas" se refiere a un subgrupo de serina proteasa de acuerdo con Siezen et al., Protein Engng. 4 (1991) 719-737 y Siezen et al. Protein Science 6 (1997) 501-523. Las serina proteasas son un subgrupo de proteasas caracterizadas por tener una serina en el sitio activo, que forma un aducto covalente con el sustrato. Las subtilasas se pueden dividir en 6 subdivisiones, es decir, la familia Subtilisina, la familia Thermitasa, la familia Proteinasa K, la familia peptidasa Laptibiótica, la familia Kexina y la familia Pirolisina.

Ejemplos de subtilasas son las derivadas de *Bacillus* tales como *Bacillus lentus*, *B. alkalophilus*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus* y *Bacillus gibsonii* descritas en; US7262042 y WO99/021867, y *Subtilisina lentus*, *subtilisina Novo*, *subtilisina Carlsberg*, *Bacillus licheniformis*, *subtilisina BPN'*, *subtilisina 309*, *subtilisina 147* y *subtilisina 168* descritas en WO89/06279 y proteasa PD138 descrita en (WO93/18140). Otras proteasas útiles pueden ser las descritas en WO92/175177, WO01/016285, WO02/026024 y WO02/016547. Ejemplos de proteasas similares a la tripsina son la tripsina (por ejemplo, de origen porcino o bovino) y la *Fusarium* protease descrita en WO89/06270, WO94/25583 y WO05/040372, y las proteasas de quimotripsina derivadas de *Cellulomonas* descritas en WO05/052161 y WO05/052146.

Una proteasa preferida adicional es la proteasa alcalina de *Bacillus lentus* DSM 5483, como se describe, por ejemplo, en WO95/23221, y variantes de la misma que se describen en WO92/21760, WO95/23221, EP1921147 y EP1921148.

Ejemplos de metaloproteasas son la metaloproteasa neutra como se describe en WO07/044993 (Genencor Int.) tales como las derivadas de *Bacillus amyloliquefaciens*.

Ejemplos de proteasas útiles son las variantes descritas en: WO92/19729, WO96/034946, WO98/20115, WO98/20116, WO99/011768, WO01/44452, WO03/006602, WO04/03186, WO04/041979, WO07/006305, WO11/036263, WO11/036264, especialmente las variantes con sustituciones en una o más de las siguientes posiciones: 3, 4, 9, 15, 27, 36, 57, 68, 76, 87, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 106, 118, 120, 123, 128, 129, 130, 160, 167, 170, 194, 195, 199, 205, 206, 217, 218, 222, 224, 232, 235, 236, 245, 248, 252 y 274 utilizando la numeración BPN'. Las variantes de subtilasa más preferidas pueden comprender las mutaciones: S3T, V4I, S9R, A15T, K27R, *36D, V68A, N76D, N87S,R, *97E, A98S, S99G,D,A, S99AD, S101G,M,R S103A, V104I,Y,N, S106A, G118V,R, H120D,N, N123S, S128L, P129Q, S130A, G160D, Y167A, R170S, A194P, G195E, V199M, V205I, L217D, N218D, M222S, A232V, K235L, Q236H,, Q245R, N252K, T274A (usando la numeración BPN).

Las enzimas proteasas disponibles comercialmente adecuadas incluyen las vendidas con los nombres comerciales Alcalase®, Duralase™, Durazym™, Release®, Release® Ultra, Savinase®, Savinase® Ultra, Primase®, Polarzyme®, Kannase®, Liquanase®, Liquanase® Ultra, Ovozyme®, Coronase®, Coronase® Ultra, Neutrase®, Everlase® y Esperase® (Novozymes A/S), los que se venden con el nombre comercial Maxatase®, Maxacal®, Maxapem®, Purafect®, Purafect Prime®, Eraser®, Purafect MA®, Purafect Ox®, Purafect OxP®, Puramax®, Properase®, Ultimase®, FN2®, FN3®, FN4®, Excellase®, Opticlean® y Optimase® (Danisco/DuPont), Axapem™ (Gist-Brocades N.V.), BLAP (secuencia mostrada en la Figura 29 del documento US5352604) y sus variantes (Henkel AG) y KAP (*Bacillus alkalophilus subtilisin*) de Kao.

Lipasas y cutinasas

Las lipasas y cutinasas adecuadas incluyen las de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen enzimas mutantes modificadas químicamente o modificadas por proteínas. Ejemplos incluyen lipasa de *Thermomyces*, por ejemplo, de *T. lanuginosus* (anteriormente llamado *Humicola lanuginosa*) como se describe en EP258068 y EP305216, cutinasa de *Humicola*, por ejemplo, *H. insolens* (WO96/13580), lipasa de cepas de *Pseudomonas* (algunas de ellas ahora rebautizadas como *Burkholderia*), por ejemplo, *P. alcaligenes* o *P. pseudoalcaligenes* (EP218272), *P. cepacia* (EP331376), *P. sp. cepa* SD705 (WO95/06720 y WO96/27002), *P. wisconsinensis* (WO96/12012), *Streptomyces lipases* tipo GDSL (WO10/065455), cutinasa de *Magnaporthe grisea* (WO10/107560), cutinasa de *Pseudomonas mendocina* (US 5,389,536), lipasa de *Thermobifida fusca* (WO11/084412), lipasa de *Geobacillus stearothermophilus* (WO11/084417), lipasa de *Bacillus subtilis* (WO11/084599) y lipasa de *Streptomyces griseus* (WO11/150157) y *S. pristinaespiralis* (WO12/137147).

Otros ejemplos son variantes de lipasa tales como las descritas en EP407225, WO92/05249, WO94/01541, WO94/25578, WO95/14783, WO95/30744, WO95/35381, WO95/22615, WO96/00292, WO97/04079, WO97/07202, WO00/34450, WO00/60063, WO01/92502, WO07/87508 y WO09/109500.

Los productos comerciales preferidos de lipasa incluyen Lipolase™, Lipex™; Lipolex™ y Lipoclean™ (Novozymes A/S), Lumafast (originalmente de Genencor) y Lipomax (originalmente de Gist-Brocades).

Todavía otros ejemplos son lipasas a veces denominadas aciltransferasas o perhidrolasas, por ejemplo, aciltransferasas con homología con lipasa A *Candida antarctica* (WO10/111143), aciltransferasa de *Mycobacterium smegmatis* (WO05/56782), perhidrolasas de la familia CE 7 (WO09/67279) y variantes de la perhidrolasa de *M. smegmatis* en particular la variante S54V utilizada en particular la variante S54V en el producto comercial Gentle Power Bleach de Huntsman Textile Effects Pte Ltd (WO10/100028).

Amilasas

Las amilasas adecuadas que pueden usarse junto con variantes de subtilasa de la invención pueden ser una alfa-amilasa o una glucoamilasa y pueden ser de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen mutantes modificados químicamente o diseñados con proteínas. Las amilasas incluyen, por ejemplo, alfa-amilasas obtenidas de *Bacillus*, por ejemplo, una cepa especial de *Bacillus licheniformis*, descrita con más detalle en GB1296839.

Las amilasas adecuadas incluyen amilasas que tienen SEQ ID NO: 3 en WO95/10603 o variantes que tienen una identidad de secuencia del 90% con la SEQ ID NO: 3 de las mismas. Las variantes preferidas se describen en WO94/02597, WO94/18314, WO97/43424 y SEQ ID NO: 4 de WO99/019467, tales como variantes con sustituciones en una o más de las siguientes posiciones: 15, 23, 105, 106, 124, 128, 133, 154, 156, 178, 179, 181, 188, 190, 197, 201, 202, 207, 208, 209, 211, 243, 264, 304, 305, 391, 408 y 444.

Diferentes amilasas adecuadas incluyen amilasas que tienen SEQ ID NO: 6 en WO02/010355 o variantes de las mismas que tienen 90% de identidad de secuencia con las mismas. Las variantes preferidas son aquellas que tienen una eliminación en las posiciones 181 y 182 y una sustitución en la posición 193.

Otras amilasas que son adecuadas son alfa-amilasa híbrida que comprenden los residuos 1-33 de la alfa-amilasa derivada de *B. amyloliquefaciens* que se muestra en la SEQ ID NO: 6 del documento WO2006/066594 y los residuos 36-483 de la *B. licheniformis* alfa-amilasa mostrada en SEQ ID NO: 4 del documento WO2006/066594 o variantes que tienen 90% de identidad de secuencia del mismo. Las variantes preferidas de esta alfa-amilasa híbrida son aquellas que tienen una sustitución, una eliminación o una inserción en una de más de las siguientes posiciones: G48, T49, G107, H156, A181, N190, M197, 1201, A209 y Q264. Las variantes más preferidas de la alfa-amilasa híbrida que comprenden los residuos 1-33 de la alfa-amilasa derivada de *B. amyloliquefaciens* mostradas en la SEQ ID NO: 6 del documento WO2006/066594 y los residuos 36-483 de la SEQ ID NO: 4 del documento WO2006/066594 son los que tienen las sustituciones:

M197T;

H156Y + A181T + N190F + A209V + Q264S; o

G48A + T49I + G107A + H156Y + A181T + N190F + I201F + A209V + Q264S.

Otras amilasas que son adecuadas son las amilasas que tienen SEQ ID NO: 6 en WO99/019467 o variantes de las mismas que tienen 90% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 6. Las variantes preferidas de SEQ ID NO: 6 son aquellas que tienen una sustitución, una eliminación o una inserción en una o más de las siguientes posiciones: R181, G182, H183, G184, N195, I206, E212, E216 y K269. Las amilasas particularmente preferidas son aquellas que tienen eliminación en las posiciones R181 y G182, o las posiciones H183 y G184.

Las amilasas adicionales que se pueden usar son las que tienen SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 7 del documento WO96/023873 o variantes de las mismas que tienen una identidad de secuencia del 90% con la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 7. Las variantes preferidas de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 7 son aquellas que tienen una sustitución, una eliminación o una inserción en una o más de las siguientes posiciones: 140, 181, 182, 183, 184, 195, 206, 212, 243, 260, 269, 304 y 476. Las variantes más preferidas son aquellas que tienen una eliminación en las posiciones 181 y 182 o las posiciones 183 y 184. Las variantes de amilasa más preferidas de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 7 son aquellos que tienen una eliminación en las posiciones 183 y 184 y una sustitución en una o más de las posiciones 140, 195, 206, 243, 260, 304 y 476.

Otras amilasas que pueden usarse son las amilasas que tienen la SEQ ID NO: 2 de WO08/153815, la SEQ ID NO: 10 en WO01/66712 o variantes de las mismas que tienen una identidad de secuencia del 90% con la SEQ ID NO: 2 de WO08/153815 o identidad de secuencia del 90% con la SEQ ID NO: 10 en WO01/66712. Las variantes preferidas de SEQ ID NO: 10 en WO01/66712 son aquellas que tienen una sustitución, una eliminación o una inserción en una de más de las siguientes posiciones: 176, 177, 178, 179, 190, 201, 207, 211 y 264.

Otras amilasas adecuadas son las amilasas que tienen la SEQ ID NO: 2 de WO09/061380 o variantes que tienen una identidad de secuencia del 90% con la SEQ ID NO: 2. Las variantes preferidas de SEQ ID NO: 2 son aquellas que tienen un truncamiento del terminal C y/o una sustitución, una eliminación o una inserción en una de más de las siguientes posiciones: Q87, Q98, S125, N128, T131, T165, K178, R180, S181, T182, G183, M201, F202, N225, S243, N272, N282, Y305, R309, D319, Q320, Q359, K444 y G475. Las variantes más preferidas de SEQ ID NO: 2 son las que tienen la sustitución en una de las siguientes posiciones: Q87E,R, Q98R, S125A, N128C, T131I, T165I, K178L,

T182G, M201L, F202Y, N225E,R, N272E,R, S243Q,A,E,D, Y305R, R309A, Q320R, Q359E, K444E y G475K y/o eliminación en la posición R180 y/o S181 o de T182 y/o G183. Las variantes de amilasa más preferidas de SEQ ID NO: 2 son aquellas que tienen las sustituciones:

5 N128C + K178L + T182G + Y305R + G475K;

N128C + K178L + T182G + F202Y + Y305R + D319T + G475K;

S125A + N128C + K178L + T182G + Y305R + G475K; o

10 S125A + N128C + T131I + T165I + K178L + T182G + Y305R + G475K

en donde las variantes están truncadas en el terminal C y opcionalmente comprenden además una sustitución en la posición 243 y/o una eliminación en la posición 180 y/o la posición 181.

15 Otras amilasas adecuadas son la alfa-amilasa que tiene la SEQ ID NO: 12 en WO01/66712 o una variante que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 12. Las variantes de amilasa preferidas son aquellas que tienen una sustitución, una eliminación o una inserción en una de más de las siguientes posiciones de SEQ ID NO: 12 en WO01/66712: R28, R118, N174; R181, G182, D183, G184, G186, W189, N195, M202, Y298, N299, K302, S303, N306, R310, N314; R320, H324, E345, Y396, R400, W439, R444, N445, K446, Q449, R458, N471, N484. Las amilasas particularmente preferidas incluyen variantes que tienen una eliminación de D183 y G184 y que tienen las sustituciones R118K, N195F, R320K y R458K, y una variante que adicionalmente tiene sustituciones en una o más posiciones seleccionadas del grupo: M9, G149, G182, G186, M202, T257, Y295, N299, M323, E345 y A339, prefirieron una variante que adicionalmente tenga sustituciones en todas estas posiciones.

25 Otros ejemplos son variantes de amilasa tales como las descritas en WO2011/098531, WO2013/001078 y WO2013/001087.

30 Las amilasas disponibles comercialmente son Duramyl™, Termamyl™, Fungamyl™, Stainzyme™, Stainzyme Plus™, Natalase™, Liquozyme X y BAN™ (de Novozymes A/S) y Rapidase™, Purastar™/Effectenz™, Powerase y Preferenz S100 (de Genencor International Inc./DuPont).

Peroxidasas/Oxidasas

35 Las peroxidasas/oxidasas adecuadas incluyen las de origen vegetal, bacteriano o fúngico. Se incluyen mutantes modificados químicamente o diseñados con proteínas. Ejemplos de peroxidasas útiles incluyen peroxidasas de *Coprinus*, por ejemplo, de *C. cinereus*, y variantes de las mismas como las descritas en los documentos WO93/24618, WO95/10602 y WO98/15257.

40 Las peroxidasas disponibles comercialmente incluyen Guardzyme™ (Novozymes A/S).

45 La(s) enzima(s) detergente(s) pueden incluirse en una composición detergente agregando aditivos separados que contienen una o más enzimas, o agregando un aditivo combinado que comprende todas estas enzimas. Un aditivo detergente de la invención, es decir, un aditivo separado o un aditivo combinado, puede formularse, por ejemplo, como un granulado, líquido, suspensión, etc. Las formulaciones de aditivos detergentes preferidos son granulados, en particular granulados no líquidos, líquidos, en particular líquidos estabilizados, o lodos.

50 Se pueden producir granulados no espolvoreados, por ejemplo, como se describe en los documentos US4106991 y US4661452 y opcionalmente se pueden recubrir por métodos conocidos en la técnica. Ejemplos de materiales de recubrimiento ceroso son los productos de poli(óxido de etileno) (polietilenglicol, PEG) con pesos molares medios de 1000 a 20000; nonilfenoles etoxilados que tienen de 16 a 50 unidades de óxido de etileno; alcoholes grasos etoxilados en los que el alcohol contiene de 12 a 20 átomos de carbono y en el que hay de 15 a 80 unidades de óxido de etileno; alcoholes grasos; ácidos grasos; y mono y di y triglicéridos de ácidos grasos. En GB 1483591 se dan ejemplos de materiales de revestimiento formadores de película adecuados para la aplicación mediante técnicas de lecho fluido.

55 Las preparaciones enzimáticas líquidas pueden, por ejemplo, estabilizarse mediante la adición de un poliol tal como propilenglicol, un azúcar o alcohol de azúcar, ácido láctico o ácido bórico según los métodos establecidos. Las enzimas protegidas pueden prepararse de acuerdo con el método descrito en EP238216.

60 Materiales adjuntos: También se puede utilizar cualquier componente detergente conocido en la técnica para su uso en detergentes para ropa. Otros componentes detergentes opcionales incluyen agentes anticorrosión, agentes antirretracción, agentes de redeposición del suelo, agentes antiarrugas, bactericidas, aglutinantes, inhibidores de

corrosión, desintegrantes/agentes desintegrantes, colorantes, estabilizadores enzimáticos (incluyendo ácido bórico, boratos, CMC y/o polioles como el propilenglicol), acondicionadores de telas que incluyen arcillas, rellenos/coadyuvantes de procesamiento, agentes blanqueadores fluorescentes/abrillantadores ópticos, reforzadores de espuma, reguladores de espuma (espuma), perfumes, agentes de suspensión del suelo, suavizantes, supresores de espuma, deslustrado inhibidores y agentes absorbentes, solos o en combinación. Se puede utilizar cualquier ingrediente conocido en la técnica para su uso en detergentes para la ropa. La elección de tales ingredientes está dentro de la habilidad del técnico.

Dispersantes: Las composiciones detergentes de la presente invención también pueden contener dispersantes. En particular, los detergentes en polvo pueden comprender dispersantes. Los materiales orgánicos solubles en agua adecuados incluyen los ácidos homopoliméricos o copoliméricos o sus sales, en los que el ácido policarboxílico comprende al menos dos radicales carboxilo separados entre sí por no más de dos átomos de carbono. Los dispersantes adecuados se describen, por ejemplo, en Powdered Detergents, Surfactant science series volume 71, Marcel Dekker, Inc.

Agentes inhibidores de la transferencia de colorantes: Las composiciones detergentes de la presente invención también pueden incluir uno o más agentes inhibidores de la transferencia de colorantes. Los agentes inhibidores de la transferencia de colorantes poliméricos adecuados incluyen, entre otros, polímeros de polivinilpirrolidona, polímeros de N-óxido de poliamina, copolímeros de N-vinilpirrolidona y N-vinilimidazol, poliviniloxazolidonas y polivinilimidazoles o mezclas de los mismos. Cuando está presente en una composición objeto, los agentes inhibidores de la transferencia de colorantes pueden estar presentes en niveles de aproximadamente 0.0001% a aproximadamente 10%, de aproximadamente 0.01% a aproximadamente 5% o incluso de aproximadamente 0.1% a aproximadamente 3% en peso de la composición.

Agente blanqueador fluorescente: Las composiciones detergentes de la presente invención preferiblemente también contendrán componentes adicionales que pueden teñir los artículos que se están limpiando, tales como el agente blanqueador fluorescente o abrillantadores ópticos. Cuando está presente, el abrillantador está preferiblemente a un nivel de aproximadamente 0.01% a aproximadamente 0.5%. Cualquier agente blanqueador fluorescente adecuado para su uso en una composición de detergente para ropa se puede usar en la composición de la presente invención. Los agentes blanqueadores fluorescentes más utilizados son los que pertenecen a las clases de derivados de ácido diaminostilbenosulfónico, derivados de diarilpirazolina y derivados de bisfenil-distililo. Ejemplos del tipo derivado del ácido diaminostilbenosulfónico de agentes blanqueadores fluorescentes incluyen las sales de sodio de: 4,4'-bis-(2-dietanolamino-4-anilino-s-triazin-6-ilamino) estilbeno-2,2'-disulfonato; 4,4'-bis-(2,4-dianilino-s-triazin-6-ilamino) estilbeno -2,2'-disulfonato; 4,4'-bis-(2-anilino-4-(N-metil-N-2-hidroxi-etilamino)-s-triazin-6-ilamino) estilbeno -2,2'-disulfonato, 4,4'-bis-(4-fenil-2,1,3-triazol-2-il)- estilbeno -2,2'-disulfonato; 4,4'-bis-(2-anilino-4(1-metil-2-hidroxi-etilamino)-s-triazin-6-ilamino) estilbeno -2,2'-disulfonato y 2-(estilbil-4"-nafto-1.,2':4,5)-1,2,3-triazol-2"-sulfonato. Los agentes blanqueadores fluorescentes preferidos son Tinopal DMS y Tinopal CBS disponibles de Ciba-Geigy AG, Basilea, Suiza. Tinopal DMS es la sal disódica del disulfonato de 4,4'-bis-(2-morfolino-4 anilino-s-triazin-6-ilamino) estilbeno. Tinopal CBS es la sal disódica del 2,2'-bis-(fenil-estilil)disulfonato. También se prefieren los agentes de blanqueamiento fluorescentes Parawhite KX disponibles comercialmente, suministrados por Paramount Minerals and Chemicals, Mumbai, India. Otros fluorescentes adecuados para su uso en la invención incluyen las 1-3-diaril pirazolinas y las 7-alkuilaminocoumarinas. Los niveles adecuados de abrillantador fluorescente incluyen niveles inferiores de aproximadamente 0.01, de 0.05, de aproximadamente 0.1 o incluso de aproximadamente 0.2% en peso a niveles superiores de 0.5 o incluso 0.75% en peso.

Polímeros de liberación de suciedad: Las composiciones detergentes de la presente invención también pueden incluir uno o más polímeros de liberación de suciedad que ayudan a la eliminación de suciedad de tejidos tales como tejidos basados en algodón y poliéster, en particular la eliminación de suciedad hidrófoba de tejidos basados en poliéster. Los polímeros de liberación de suciedad pueden ser, por ejemplo, polímeros a base de tereftalato no iónico o aniónico, caprolactama de polivinilo y copolímeros relacionados, copolímeros de injerto de vinilo, poliéster poliamidas, véase, por ejemplo, el Capítulo 7 en Powdered Detergents, Surfactant science series, Volumen 71, Marcel Dekker, Inc. Otro tipo de polímeros de liberación de suciedad son polímeros de limpieza de grasa alcoxilados anfífilos que comprenden una estructura central y una pluralidad de grupos alcoxilato unidos a esa estructura central. La estructura del núcleo puede comprender una estructura de polialquilénimina o una estructura de polialcanolamina como se describe en detalle en el documento WO2009/087523 (incorporado aquí como referencia). Además, los copolímeros de injerto aleatorios son polímeros de liberación de suciedad adecuados. Los copolímeros de injerto adecuados se describen con más detalle en los documentos WO2007/138054, WO2006/108856 y WO2006/113314 (incorporados aquí como referencia). Otros polímeros de liberación de suciedad son estructuras de polisacárido sustituido, especialmente estructuras celulósicas sustituidas, tales como derivados de celulosa modificada, como los descritos en EP1867808 o WO2003/040279 (ambos se incorporan aquí como referencia). Los polímeros celulósicos adecuados incluyen celulosa, éteres de celulosa, ésteres de celulosa, amidas de celulosa y mezclas de los mismos. Los polímeros

celulósicos adecuados incluyen celulosa modificada aniónicamente, celulosa modificada no iónicamente, celulosa modificada catiónicamente, celulosa modificada con iones híbridos y mezclas de los mismos. Los polímeros celulósicos adecuados incluyen metil celulosa, carboximetil celulosa, etil celulosa, hidroxil etil celulosa, hidroxil propil metil celulosa, éster carboximetil celulosa y mezclas de los mismos.

5 Agentes antirredeposición: Las composiciones detergentes de la presente invención también pueden incluir uno o más agentes antirredeposición tales como carboximetilcelulosa (CMC), alcohol polivinílico (PVA), polivinilpirrolidona (PVP), polioxietileno y/o polietilenglicol (PEG), homopolímeros de ácido acrílico, copolímeros de ácido acrílico y ácido maleico y polietileniminas etoxiladas. Los polímeros a base de celulosa descritos anteriormente en los polímeros de liberación de suciedad también pueden funcionar como agentes antirredeposición.

10 Otros materiales adyuvantes adecuados incluyen, entre otros, agentes antiretracción, agentes antiarrugas, bactericidas, aglutinantes, vehículos, colorantes, estabilizadores enzimáticos, suavizantes de tejidos, rellenos, reguladores de espuma, hidrótrofos, perfumes, pigmentos, supresores de césped, solventes y estructurantes para detergentes líquidos y/o agentes elastizantes de estructuras.

15 **Formulación de productos detergentes**

20 La composición detergente de la invención puede estar en cualquier forma conveniente, por ejemplo, una barra, una tableta homogénea, una tableta que tiene dos o más capas, una bolsa que tiene uno o más compartimentos, un polvo regular o compacto, un gránulo, una pasta, un gel o un líquido regular, compacto o concentrado. Hay varias formas de formulación de detergente, como capas (fases iguales o diferentes), bolsas, así como formas para la unidad de dosificación de la maquina.

25 Las bolsas se pueden configurar como compartimentos individuales o múltiples. Puede ser de cualquier forma, conformación y material que sea adecuado para contener la composición, por ejemplo, sin permitir la liberación de la composición de la bolsa antes del contacto con el agua. La bolsa está hecha de una película soluble en agua que encierra un volumen interno. Dicho volumen interno se puede dividir en compartimentos de la bolsa. Las películas preferidas son materiales poliméricos, preferiblemente polímeros que se forman en una película o lámina. Los
30 polímeros, copolímeros o derivados preferidos de los mismos son poliacrilatos seleccionados y copolímeros de acrilato solubles en agua, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, dextrina sódica, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, maltodextrina, polimetacrilatos y lo más preferiblemente copolímeros de alcohol polivinílico e, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC). Preferiblemente, el nivel de polímero en la película, por ejemplo, PVA, es al menos aproximadamente 60%. El peso molecular promedio preferido será típicamente de aproximadamente 20.000 a
35 aproximadamente 150.000. Las películas también pueden ser de composiciones de mezclas que comprenden mezclas de polímeros hidrolíticamente degradables e hidrosolubles, tales como poliactida y alcohol polivinílico (conocido bajo la referencia comercial M8630 vendido por Chris Craft In. Prod. De Gary, Ind., Estados Unidos) más plastificantes como el glicerol, etilenglicerol, propilenglicol, sorbitol y sus mezclas. Las bolsas pueden comprender una composición detergente sólida para la colada o componentes parciales y/o una composición limpiadora líquida o componentes
40 parciales separados por la película soluble en agua. El compartimento para componentes líquidos puede ser diferente en composición que los compartimentos que contienen sólidos. Ref: (US2009/0011970 A1).

45 Los ingredientes detergentes pueden separarse físicamente entre sí mediante compartimentos en bolsas solubles en agua o en diferentes capas de tabletas. De este modo, se puede evitar la interacción de almacenamiento negativa entre los componentes. Los diferentes perfiles de disolución de cada uno de los compartimentos también pueden dar lugar a una disolución retardada de componentes seleccionados en la solución de lavado.

50 Un detergente líquido o en gel, que no se dosifica por unidad, puede ser acuoso, típicamente conteniendo al menos 20% en peso y hasta 95% de agua, tal como hasta aproximadamente 70% de agua, hasta aproximadamente 65% de agua, hasta aproximadamente 55% de agua, hasta aproximadamente 45% de agua, hasta aproximadamente 35% de agua. Se pueden incluir otros tipos de líquidos, incluidos, entre otros, alcanoles, aminas, dioles, éteres y polioles en un líquido o gel acuoso. Un líquido acuoso o detergente en gel puede contener de 0-30% de solvente orgánico. Un detergente líquido o en gel puede ser no acuoso.

55 **Barras de jabón para lavandería**

60 Las enzimas de la invención pueden añadirse a las pastillas de jabón para ropa y usarse para lavar a mano ropa, telas y/o textiles. El término barra de jabón de lavado incluye barras de lavado, barras de jabón, barras combinadas, barras de detergente sintético y barras de detergente. Los tipos de barra generalmente difieren en el tipo de tensioactivo que contienen, y el término barra de jabón de lavado incluye aquellos que contienen jabones de ácidos grasos y/o jabones sintéticos. La barra de jabón para ropa tiene una forma física que es sólida y no líquida, gel o en polvo a temperatura

ambiente. El término sólido se define como una forma física que no cambia significativamente con el tiempo, es decir, si un objeto sólido (por ejemplo, una pastilla de jabón) se coloca dentro de un recipiente, el objeto sólido no cambia para llenar el recipiente en el que se coloca. La barra es un sólido típicamente en forma de barra, pero puede tener otras formas sólidas, como redonda u ovalada.

5 La pastilla de jabón de lavado puede contener una o más enzimas adicionales, inhibidores de proteasa tales como aldehídos de péptidos (o aducto de hidrosulfito o aducto de hemiacetal), ácido bórico, borato, bórax y/o derivados de ácido fenilborónico tales como ácido 4-formilfenilborónico, uno o más jabones o tensioactivos sintéticos, polioles como la glicerina, compuestos que controlan el pH como ácidos grasos, ácido cítrico, ácido acético y/o ácido fórmico, y/o
10 una sal de un catión monovalente y un anión orgánico en el que el catión monovalente puede ser por ejemplo, Na⁺, K⁺ o NH₄⁺ y el anión orgánico puede ser, por ejemplo, formiato, acetato, citrato o lactato, de modo que la sal de un catión monovalente y un anión orgánico puede ser, por ejemplo, formiato de sodio.

15 La barra de jabón de lavado también puede contener agentes complejantes como EDTA y HEDP, perfumes y/o diferentes tipos de cargas, tensioactivos, por ejemplo, tensioactivos sintéticos aniónicos, potenciadores, agentes de liberación poliméricos del suelo, quelantes detergentes, agentes estabilizadores, rellenos, tintes, colorantes, inhibidores de la transferencia de colorantes, policarbonatos alcoxilados, supresores de espuma, estructurantes, aglutinantes, agentes de lixiviación, activadores de blanqueo, agentes de eliminación de suciedad de arcilla, agentes de antirredeposición, agentes dispersantes poliméricos, abrillantadores, suavizantes de telas, perfumes y/u otros
20 compuestos conocidos en la técnica.

La pastilla de jabón de lavado se puede procesar en equipos convencionales de fabricación de pastilla de jabón de lavado, tales como, pero sin limitarse a: mezcladores, pisadores, por ejemplo, un dosificador de vacío de dos etapas, extrusoras, cortadores, estampadores de logotipos, túneles de enfriamiento y envolturas. La invención no se limita a
25 preparar las pastillas de jabón de lavado por ningún método individual. La premezcla de la invención puede añadirse al jabón en diferentes etapas del proceso. Por ejemplo, se puede preparar la premezcla que contiene un jabón, una enzima, opcionalmente una o más enzimas adicionales, un inhibidor de la proteasa y una sal de un catión monovalente y un anión orgánico, y la mezcla se demora. La enzima y las enzimas adicionales opcionales se pueden agregar al mismo tiempo que el inhibidor de la proteasa, por ejemplo, en forma líquida. Además de la etapa de mezcla y la etapa
30 de formación de barras, el proceso puede comprender además las etapas de fresado, extrusión, corte, estampado, enfriamiento y/o envoltura.

Formulaciones de detergentes granulares

35 Se puede formular un detergente granular como se describe en WO09/092699, EP1705241, EP1382668, WO07/001262, US6472364, WO04/074419 o WO09/102854. Otras formulaciones de detergentes útiles se describen en WO09/124162, WO09/124163, WO09/117340, WO09/117341, WO09/117342, WO09/072069, WO09/063355, WO09/132870, WO09/121757, WO09/112296, WO09/112298, WO09/103822, WO09/087033, WO09/050026, WO09/047125, WO09/047126, WO09/047127, WO09/047128, WO09/021784, WO09/010375, WO09/000605,
40 WO09/122125, WO09/095645, WO09/040544, WO09/040545, WO09/024780, WO09/004295, WO09/004294, WO09/121725, WO09/115391, WO09/115392, WO09/074398, WO09/074403, WO09/068501, WO09/065770, WO09/021813, WO09/030632, WO09/015951, WO2011/025615, WO2011/016958, WO2011/005803, WO2011/005623, WO2011/005730, WO2011/005844, WO2011/005904, WO2011/005630, WO2011/005830, WO2011/005912, WO2011/005905, WO2011/005910, WO2011/005813, WO2010/135238, WO2010/120863,
45 WO2010/108002, WO2010/111365, WO2010/108000, WO2010/107635, WO2010/090915, WO2010/033976, WO2010/033746, WO2010/033747, WO2010/033897, WO2010/033979, WO2010/030540, WO2010/030541, WO2010/030539, WO2010/024467, WO2010/024469, WO2010/024470, WO2010/025161, WO2010/014395, WO2010/044905, WO2010/145887, WO2010/142503, WO2010/122051, WO2010/102861, WO2010/099997, WO2010/084039, WO2010/076292, WO2010/069742, WO2010/069718, WO2010/069957, WO2010/057784,
50 WO2010/054986, WO2010/018043, WO2010/003783, WO2010/003792, WO2011/023716, WO2010/142539, WO2010/118959, WO2010/115813, WO2010/105942, WO2010/105961, WO2010/105962, WO2010/094356, WO2010/084203, WO2010/078979, WO2010/072456, WO2010/069905, WO2010/076165, WO2010/072603, WO2010/066486, WO2010/066631, WO2010/066632, WO2010/063689, WO2010/060821, WO2010/049187, WO2010/031607, y WO2010/000636.

55 Usos

La presente invención también se dirige a métodos para usar las composiciones según la invención en el lavado de textiles y telas, tales como lavado de ropa doméstica y lavado de ropa industrial.

60

La invención también se dirige a métodos para usar las composiciones de acuerdo con la invención o para limpiar superficies duras tales como pisos, mesas, paredes, techos, etc., así como superficies de objetos duros tales como automóviles (lavado de autos) y platos (lavado de platos).

5 Una composición detergente de la presente invención puede formularse, por ejemplo, como una composición detergente para lavado de manos o máquinas que incluye una composición aditiva para lavado adecuada para el pretratamiento de telas manchadas y una composición suavizante de telas añadida al enjuague, o puede formularse como una composición detergente para usar en operaciones generales de limpieza de superficies duras en el hogar, o formularse para operaciones de lavado de vajilla a mano o en máquina.

10 En un aspecto específico, la presente invención proporciona un aditivo detergente que comprende un polipéptido de la presente invención como se describe en el presente documento.

15 El proceso de limpieza o el proceso de cuidado textil puede ser, por ejemplo, un proceso de lavado, un proceso de lavado de platos o la limpieza de superficies duras como azulejos de baño, pisos, tableros de mesa, desagües, fregaderos y lavabos. Los procesos de lavado pueden ser, por ejemplo, el lavado doméstico, pero también puede ser el lavado industrial. Además, la invención se refiere a un proceso para el lavado de telas y/o prendas en el que el proceso comprende tratar telas con una solución de lavado que contiene una composición detergente, y al menos una variante de proteasa de la invención. El proceso de limpieza o un proceso de cuidado textil puede realizarse, por ejemplo, en un proceso de lavado con un lavavajillas o en un proceso de lavado manual. La solución de lavado puede ser, por ejemplo, una solución de lavado acuosa que contiene una composición detergente.

25 En los últimos años ha habido un interés creciente en reemplazar componentes en detergentes, que se deriva de productos petroquímicos con componentes biológicos renovables como enzimas y polipéptidos sin comprometer el rendimiento del lavado. Cuando los componentes de las composiciones detergentes cambian nuevas actividades enzimáticas o enzimas nuevas que tienen propiedades alternativas y/o mejoradas en comparación con las enzimas detergentes usadas habitualmente, tales como proteasas, se necesitan lipasas y amilasas para lograr un rendimiento en lavado similar o mejorado en comparación con las composiciones detergentes tradicionales.

30 La invención se refiere además al uso de composiciones de la invención que comprenden las variantes de subtilasa en un proceso de eliminación de manchas proteicas. Las manchas proteicas pueden ser manchas tales como manchas de alimentos, por ejemplo, alimentos para bebés, sebo, cacao, huevo, sangre, leche, tinta, hierba o una combinación de los mismos.

35 Las composiciones detergentes típicas incluyen diversos componentes además de las enzimas, estos componentes tienen diferentes efectos, algunos componentes como los tensioactivos reducen la tensión superficial en el detergente, lo que permite que la mancha que se limpia se levante y se disperse y luego se lave, otros componentes, como los sistemas de blanqueador, eliminan el color a menudo por oxidación y muchos blanqueadores también tienen fuertes propiedades bactericidas y se usan para desinfectar y esterilizar. Sin embargo, otros componentes como el potenciador y el quelante ablandan, por ejemplo, el agua de lavado al eliminar los iones metálicos del líquido.

45 En una realización particular, la invención se refiere al uso de una composición que comprende una variante de subtilasa y uno o más componentes detergentes, tales como tensioactivos, hidrótrofos, potenciadores, copotenciadores, quelantes o agentes quelantes, sistema de blanqueo o componentes de blanqueo, polímeros, agentes de tintura de telas, acondicionadores de telas, reforzadores de espuma, supresores de espuma, dispersantes, inhibidores de transferencia de colorantes, agentes blanqueadores fluorescentes, perfumes, abrillantadores ópticos, bactericidas, fungicidas, agentes de suspensión de la suciedad, polímeros de liberación de la suciedad, agentes antirredeposición, inhibidores enzimáticos o estabilizadores, activadores enzimáticos, antioxidantes y solubilizantes.

50 En una realización particular, la invención se refiere al uso de una composición de la invención que comprende una variante de subtilasa como se describe aquí y una o más enzimas adicionales seleccionadas del grupo que comprende proteasas, amilasas, lipasas, cutinasas, celulasas, endoglucanasas, xiloglucanasas, pectinasas, pectina liasas, xantanasas, peroxidadas, haloperoxigenasas, catalasas y mananasas, o cualquier mezcla de las mismas.

55 En una realización particular, la invención se refiere al uso de una composición de la invención que comprende una variante de subtilasa como se describe aquí, una o más enzimas adicionales seleccionadas del grupo que comprende proteasas, amilasas, lipasas, cutinasas, celulasas, endoglucanasas, xiloglucanasas, pectinasas, pectina liasas, xantanasas, peroxidadas, haloperoxigenasas, catalasas y mananasas, o cualquier mezcla de las mismas y uno o más componentes detergentes, tales como tensioactivos, hidrótrofos, potenciadores, copotenciadores, quelantes o agentes quelantes, sistema de blanqueo o componentes de blanqueo, polímeros, agentes matizantes de telas, acondicionadores de telas, reforzadores de espuma, supresores de espuma, dispersantes, inhibidores de

60

transferencia de colorantes, agentes blanqueadores fluorescentes, perfumes, abrillantadores ópticos, bactericidas, fungicidas, agentes de suspensión del suelo, polímeros liberadores de suciedad, agentes antirredeposición, inhibidores enzimáticos o estabilizadores, activadores enzimáticos, antioxidantes y solubilizantes.

5 Método de lavado

La presente invención se refiere a un método para limpiar una tela, una vajilla o una superficie dura con una composición detergente de la invención.

10 Una realización preferida se refiere a un método de limpieza, comprendiendo dicho método los pasos de: poner en contacto un objeto con una composición detergente de la invención en condiciones adecuadas para limpiar dicho objeto. En una realización preferida, la composición detergente se usa en un proceso de lavado o lavado de vajilla.

15 Todavía otra realización se refiere a un método para eliminar manchas de tela o vajilla que comprende poner en contacto dicha tela o vajilla con una composición de la invención en condiciones adecuadas para limpiar dicho objeto.

20 También se contemplan composiciones y métodos para tratar tejidos (por ejemplo, para cambiar el tamaño de un textil) usando una o más de las proteasas de la invención. La proteasa se puede usar en cualquier método de tratamiento de tejidos que sea bien conocido en la técnica (véase, por ejemplo, el documento US 6,077,316). Por ejemplo, en un aspecto, la sensación y la apariencia de una tela se mejora mediante un método que comprende poner en contacto la tela con una proteasa en una solución. En un aspecto, el tejido se trata con la solución bajo presión.

25 Las composiciones detergentes de la presente invención son adecuadas para su uso en aplicaciones de lavado y superficies duras, incluido el lavado de vajilla. Por consiguiente, la presente invención incluye un método para lavar una tela o lavar la vajilla. El método comprende los pasos de poner en contacto la tela/vajilla a limpiar con una solución que comprende la composición detergente según la invención. El tejido puede comprender cualquier tejido capaz de ser lavado en condiciones normales de uso del consumidor. La vajilla puede comprender cualquier vajilla como vajilla, cubtería, cerámica, plásticos como melamina, metales, porcelana, vidrio y acrílicos. La solución tiene preferiblemente un pH de aproximadamente 5.5 a aproximadamente 11.5. Las composiciones pueden emplearse a concentraciones de aproximadamente 100 ppm, preferiblemente de 500 ppm a aproximadamente 15.000 ppm en solución. Las temperaturas del agua varían típicamente de aproximadamente 5°C a aproximadamente 95°C, incluyendo aproximadamente 10°C, aproximadamente 15°C, aproximadamente 20°C, aproximadamente 25°C, aproximadamente 30°C, aproximadamente 35°C, aproximadamente 40°C, aproximadamente 45°C, aproximadamente 50°C, aproximadamente 55°C, aproximadamente 60°C, aproximadamente 65°C, aproximadamente 70°C, aproximadamente 75°C, aproximadamente 80°C, aproximadamente 85°C y aproximadamente 90°C. La relación agua/tela es típicamente de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 30:1.

35 La enzima(s) de la composición detergente de la invención puede estabilizarse usando agentes estabilizantes convencionales e inhibidores de proteasa, por ejemplo, un poliol tal como propilenglicol o glicerol, un azúcar o alcohol de azúcar, diferentes sales tales como NaCl; KCl; ácido láctico, ácido fórmico, ácido bórico o un derivado de ácido bórico, por ejemplo, un éster de borato aromático, o un derivado de ácido fenilborónico como el ácido 4-formilfenil borónico, o un péptido aldehído como los aldehídos di, tri o tetrapéptidos o análogos de aldehído (cualquiera de la forma B1-B0-R en donde, R es H, CH₃, CX₃, CHX₂ o CH₂X (X=halógeno), B0 es un residuo de aminoácido único (preferiblemente con un lado alifático o aromático opcionalmente sustituido cadena); y B₁ consiste en uno o más residuos de aminoácidos (preferiblemente uno, dos o tres), que comprende opcionalmente un grupo de protección N-terminal, o como se describe en WO09/118375, WO98/13459) o un inhibidor de la proteasa de la proteína tipo como RASI, BASI, WASI (inhibidores bifuncionales de alfa-amilasa/subtilisina de arroz, cebada y trigo) o Cl2 o SSI. La composición puede formularse como se describe en, por ejemplo, WO92/19709, WO92/19708 y US6472364. En algunas realizaciones, las enzimas empleadas en este documento se estabilizan por la presencia de fuentes solubles en agua de iones de zinc (II), calcio (II) y/o magnesio (II) en las composiciones terminadas que también proporcionan dichos iones a las enzimas. como otros iones metálicos (por ejemplo, bario (II), escandio (II), hierro (II), manganeso (II), aluminio (III), estaño (II), cobalto (II), cobre (II), níquel (II) y oxovanadio (IV)).

45 En algunas realizaciones preferidas, las composiciones detergentes proporcionadas en el presente documento se formulan típicamente de tal manera que, durante el uso en operaciones de limpieza acuosa, el agua de lavado tiene un pH de aproximadamente 5.0 a aproximadamente 11.5, o en realizaciones alternativas, incluso de aproximadamente 6.0 a aproximadamente 10.5. En algunas realizaciones preferidas, los productos de lavado granulares o líquidos están formulados para tener un pH de aproximadamente 6 a aproximadamente 8. Las técnicas para controlar el pH a los niveles de uso recomendados incluyen el uso de tampones, álcalis, ácidos, etc., y son bien conocidos por aquellos expertos en el arte.

La presente invención se describe adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención.

Ejemplos

- 5 Materiales y métodos
- Ensayo automático de estrés mecánico (AMSA) para lavado de ropa
- 10 Con el fin de evaluar el rendimiento del lavado en el lavado de ropa, se realizan experimentos, utilizando el Ensayo automático de estrés mecánico (AMSA). Con el AMSA, se puede examinar el rendimiento en lavado de una gran cantidad de soluciones detergentes enzimáticas de pequeño volumen. La placa AMSA tiene varias ranuras para soluciones de prueba y una tapa que aprieta firmemente la muestra de ropa, lavándose el tejido contra todas las aberturas de la ranura. Durante el tiempo de lavado, la placa, las soluciones de prueba, la tela y la tapa se agitan vigorosamente para poner la solución de prueba en contacto con la tela y aplicar tensión mecánica de forma periódica y oscilante. Para una descripción más detallada, véase el documento WO02/42740, especialmente el párrafo "Realizaciones especiales de método" en la página 23-24.
- 15 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 ensucia, 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.
- 20 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.
- 25 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:
- 30

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

Tabla 1: Composición de detergentes modelo y materiales de prueba

El detergente modelo y los materiales de prueba fueron los siguientes:	
Detergente líquido modelo de lavado	0.3-0.5% de goma xantana,
	0.2-0.4% de agente antiespumante,
	6-7% de glicerol,
	0.3-0.5% de etanol,
	4-7% de FAEOS (sulfato de éter de alcohol graso),
	24-28% de tensioactivos no iónicos,
	1% de ácido bórico,
	1-2% de citrato de sodio (dihidrato),
	2-4% de soda,
	14-16% de ácido graso de coco,
	0.5% HEDP (1-hidroxietano-(ácido 1,1-difosfónico)),
	0-0.4% PVP (polivinilpirrolidona),
	0-0.05% abrillantadores ópticos,
	0-0.001% de colorante,
El resto es agua desionizada.	
Material de prueba	PC-03 (Chocolate con leche/tinta sobre algodón/poliéster)
	C-05 (Sangre/leche/tinta sobre algodón)

Métodos generales de biología molecular:

5 A menos que se mencione lo contrario, las manipulaciones y transformaciones de ADN se realizaron utilizando métodos estándar de biología molecular (Sambrook et al. (1989); Ausubel et al. (1995); Harwood and Cutting (1990).

Ensayos de actividad de proteasa:

10 1) Ensayo de actividad de Suc-AAPF-pNA:

15 La actividad proteolítica se puede determinar mediante un método que emplea el sustrato de Suc-AAPF-PNA. Suc-AAPF-PNA es una abreviatura de N-succinil-alanina-alanina-prolina-fenilalanina-p-nitroanilida, y es un péptido bloqueado que puede ser escindido por endoproteasas. Después de la escisión, se libera una molécula de PNA libre y tiene un color amarillo y, por lo tanto, se puede medir por espectrofotometría visible a una longitud de onda de 405 nm. El sustrato Suc-AAPF-PNA es fabricado por Bachem (cat. No. L1400, disuelto en DMSO).

20 La muestra de proteasa para analizar se diluyó en regulador de actividad residual (Tris 100 mM pH 8.6). El ensayo se realizó transfiriendo 60 µl de muestras de enzimas diluidas a una placa de microtitulación de 96 pozos y agregando 140 µl de solución de trabajo de sustrato (0.72 mg/ml en Tris 100 mM, pH 8.6). La solución se mezcló a temperatura ambiente y la absorción se mide cada 20 segundos durante 5 minutos a DO 405 nm.

25 La pendiente (absorbancia por minuto) de la curva de absorción dependiente del tiempo es directamente proporcional a la actividad específica (actividad por mg de enzima) de la proteasa en cuestión bajo el conjunto dado de condiciones. La muestra de proteasa debe diluirse a un nivel donde la pendiente sea lineal.

Tergo-O-Tometer (TOM)

30 El Tergo-O-Tometer (TOM) es un sistema de lavado modelo a escala media que puede aplicarse para probar 12 condiciones de lavado diferentes simultáneamente. ATOM es básicamente un gran baño de agua con temperatura

controlada con hasta 12 vasos metálicos abiertos sumergidos en él. Cada vaso de precipitados constituye una pequeña lavadora de estilo de cargador superior y durante un experimento, cada uno de ellos contendrá una solución de un sistema detergente/enzima específico y las telas sucias y sin ensuciar en las que se prueba su rendimiento. La tensión mecánica se logra mediante un brazo agitador giratorio, que agita el líquido (1L) dentro de cada vaso de precipitados. Debido a que los vasos de precipitados TOM no tienen tapa, es posible extraer muestras durante un experimento TOM y analizar la información en línea durante el lavado. En un experimento TOM, se pueden variar factores como la relación de lastre a suciedad y la relación de tela a licor de lavado. Por lo tanto, el TOM proporciona el vínculo entre los experimentos a pequeña escala, como AMSA y minilavado, y los experimentos a gran escala que consumen más tiempo en máquinas lavadoras a gran escala.

Después de lavar y enjuagar, las muestras se extienden planas y se dejan secar al aire a temperatura ambiente durante la noche. Todos los lavados se evalúan el día después del lavado. Las evaluaciones de reflectancia de la luz por parte de las muestras se realizan utilizando un espectrofotómetro de reflectancia Macbeth Color Eye 7000 con gran apertura. Las mediciones se realizan sin UV en la luz incidente y se extrajo la remisión a 460 nm. Las mediciones se realizan en muestras sin lavar y lavadas. La muestra de prueba por medir se coloca encima de otra muestra del mismo tipo y color (muestra doble).

Los valores de remisión para muestras individuales se calculan restando el valor de remisión de la muestra lavada sin enzima (blanco) de la muestra lavada junto con la enzima.

El cálculo del efecto de las variantes de proteasa se realiza tomando las mediciones de muestras lavadas con enzimas y restando las mediciones de lavado sin enzima para cada mancha.

El rendimiento de las nuevas variantes de proteasa se compara con el rendimiento de Referencia (REF) = SEQ ID NO: 3 calculando el rendimiento relativo (RP):

$$RP = (R_{\text{VARIANTE-PROTEASA}} - R_{\text{BLANCO}}) / (R_{\text{REF}} - R_{\text{BLANCO}})$$

Ensayo de estabilidad en almacenamiento acelerado

La estabilidad de almacenamiento de variantes de proteasa en detergente líquido se evaluó usando un ensayo acelerado con incubación a temperaturas elevadas durante hasta 24 horas.

Todas las muestras de proteasa purificadas se diluyeron a concentraciones de 0.2 y 0.1 mg/ml basadas en la absorbancia a 280 nm y el coeficiente de extinción teórico usando Triton X-100 al 0.01%. Para cada variante se incluyeron 2 pozos con alta concentración de proteasa y 2 pozos con baja concentración. Como referencia se incluyó SEQ ID NO: 3 en cada placa de microtitulación. Se mezclaron 30 µl de muestra de proteasa con 270 µl de detergente (CNS) en el pozo de una placa de microtitulación (Nunc U96 PP 0.5 ml) usando una barra magnética (en la estación de pipeteo Zephyr (Caliper LifeSciences) durante 30 minutos). Luego se transfirieron 20 µl de esta mezcla a otra placa de microtitulación (Nunc U96 PP 0.5 ml con barras magnéticas añadidas) y se mezclaron con 150 µl de Tris 100 mM pH 8.6 (al menos 5 minutos en Zephyr). Se transfirieron 30 µl de esta dilución a un Nunc F 96-MTP, y después de la adición de 70 µl de solución de sustrato, se determinó la actividad inicial de la muestra no estresada midiendo la absorbancia a 405 nm cada 20 segundos durante 5 minutos (en un SpectraMax Plus). Después del sellado, la placa de detergente se incubó a la temperatura apropiada (47°C para CNS EDTA pH9) en un Eppendorf Thermomixer (sin agitación). Después de 1-4 y 20-25 horas de incubación, se extrajeron muestras de 20 µl y se midió la actividad residual de la muestra estresada como con la actividad inicial no estresada.

Se suponía que la disminución de la actividad durante la incubación con detergente era exponencial. Se encontraron semividas ($T_{1/2}$) a partir de la regresión lineal de Log(Actividad) versus tiempo de incubación (0, 1-4 y 20-25 horas), y los factores de mejora de la semivida ($T_{1/2}$ IF) se calcularon como la semivida de la variante de proteasa relativo a la vida media de la SEQ ID NO: 3 de referencia.

Detergente

CNS EDTA pH9	Ácido alquilbencenosulfónico	8%
	Alcohol etoxilado	4%
	Lauril éter sulfato de sodio	4%
	Trietanolamina; 2,2',2"-nitrioltri(etan-1-ol)	0.5%

(continuación)

	Citrato trisódico dihidrato	0.5%
	Hidróxido de sodio	1%
	EDTA	0.001%
	pH ajustado a 9	
	Hasta 100% con agua desmineralizada	

Ejemplo 1: Preparación y expresión de variantes

- 5 La introducción de un casete de expresión en *Bacillus subtilis* se realizó mediante la transformación de un casete de expresión adecuado utilizando la competencia natural del organismo.

A continuación se resumen las manipulaciones de ADN tales como la introducción de mutaciones y la introducción de la construcción de un casete de expresión en *Bacillus subtilis*. Todas las manipulaciones de ADN se realizaron por PCR (por ejemplo, Sambrook et al.; Molecular Cloning; Cold Spring Harbor Laboratory Press) y todas las manipulaciones de ADN y pueden ser repetidas por todos los expertos en la técnica. Se usaron constructos recombinantes de *B. subtilis* que codifican variantes de subtilasa para inocular los matraces de agitación que contienen medios ricos (por ejemplo, PS-1: 100 g/L de sacarosa (Danisco cat. No. 109-0429), 40 g/L de corteza de soja (harina de soja), 10 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ (No. de catálogo Merck 6579), reemplazo de 0.1 ml/L- Dowfax63N10 (Dow). El cultivo típicamente toma 4 días a 30°C agitando con 220 rpm.

Ejemplo 2: Fermentación de variantes

La fermentación puede realizarse mediante métodos bien conocidos en la técnica o como sigue. Una cepa de *B. subtilis* que albergaba el plásmido de expresión relevante se rayó en una placa de agar LB, y se cultivó durante la noche a 37°C. Las colonias se transfirieron a 100 ml de medio PS-1 en un matraz de agitación de 500 ml. Las células y otro material no disuelto se retiraron del caldo de fermentación mediante centrifugación a 4500 rpm durante 20-25 minutos. Posteriormente, el sobrenadante se filtró para obtener una solución transparente.

Ejemplo 3: Purificación de variantes

El caldo de cultivo se centrifugó (26000 x g, 20 min) y el sobrenadante se decantó cuidadosamente del precipitado. El sobrenadante se filtró a través de una unidad de filtración Nalgene de 0.2 µm para eliminar el resto de las células huésped de *Bacillus*. El pH en el filtrado de 0.2 µm se ajustó a pH 8 con una base Tris 3M y el filtrado ajustado al pH se aplicó a una columna MEP Hypercel (de Pall Corporation) equilibrada en Tris/HCl 20 mM, CaCl_2 1 mM, pH 8.0. Después de lavar la columna con el regulador de equilibrio, la columna se eluyó por etapas con $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{NaOH}$ 20 mM, CaCl_2 1 mM, pH 4.5. Las fracciones de la columna se analizaron para determinar la actividad de la proteasa (usando el ensayo Suc-AAPF-pNA a pH 9) y las fracciones pico se agruparon. El pH del grupo de la columna MEP Hypercel se ajustó a pH 6 con CH_3COOH al 20% (v/v) o base Tris 3M y el grupo con pH ajustado se diluyó con agua desionizada a la misma conductividad que MES/NaOH 20 mM, CaCl_2 2 mM, pH 6.0. El conjunto diluido se aplicó a una columna SP-sepharose FF (de GE Healthcare) equilibrada en MES/NaOH 20 mM, CaCl_2 2 mM, pH 6.0. Después de lavar la columna con el regulador de equilibrio, la proteasa se eluyó con un gradiente lineal de NaCl (0 --> 0.5 M) en el mismo regulador en cinco volúmenes de columna. Las fracciones de la columna se analizaron para determinar la actividad de la proteasa (usando el ensayo Suc-AAPF-pNA a pH 9) y las fracciones activas se analizaron mediante SDS-PAGE. Las fracciones, donde solo se vio una banda en el gel SDS-PAGE teñido con Coomassie, se agruparon como preparación purificada y se usaron para experimentos adicionales.

Ejemplo 4: Estabilidad de variantes de la invención.

45 Las variantes de la invención se generaron y purificaron como se describe en los ejemplos 1-3 y se probaron para determinar la estabilidad en detergente líquido a una temperatura de 47°C usando la prueba de estabilidad descrita anteriormente y la vida media calculada. El polipéptido de referencia fue la subtilasa que tiene la SEQ ID NO: 3.

50 Tabla 2: Estabilidad de variantes de SEQ ID NO: 3. La primera columna indica la sustitución en SEQ ID NO: 3. La segunda columna indica la vida media encontrada en el experimento, y en la tercera columna los datos se indican en relación con la SEQ ID NO: 3. La última columna indica la desviación estándar.

ES 2 763 235 T3

Sustituciones (relativas a la SEQ ID NO: 3)	T _{1/2} (h) (47°C, 24 h, 90% de detergente)	IF (47°C, 24h, 90% de detergente)	StDev (47°C, 24h, 90% de detergente)
Ninguno(=SEQ ID NO: 3)	23	1	0.06
L262N	50	2.4	0.5
L262Q	47	2.2	0.3

Todas las variantes habían mejorado significativamente la estabilidad en detergente líquido en estas condiciones.

Ejemplo 5. Actividad residual.

5 Las variantes de la invención se probaron para determinar la estabilidad en detergente líquido a una temperatura de 45°C usando la prueba de estabilidad descrita anteriormente y se calculó la vida media y la actividad residual después de 19 horas. El polipéptido original era la subtilasa que tenía la SEQ ID NO: 3.

10 Tabla 3: Estabilidad de variantes de SEQ ID NO: 3. La primera columna indica la sustitución en comparación con la SEQ ID NO: 3. La segunda columna indica la actividad residual calculada después de 19 horas y la última columna indica la actividad residual con desviación estándar:

Sustituciones (relativas a la SEQ ID NO: 3)	%RA (45°C, 19h, 90% de detergente)	%RA ± Desv Est. (45°C, 19h)
Ninguno (=SEQ ID NO:3)	75	75 ± 9
L262D	89	89 ± 2

15 Los datos muestran que estas variantes tenían una mayor estabilidad en las condiciones analizadas y también una mayor actividad residual después de 19 horas en comparación con la subtilasa original que tiene la SEQ ID NO: 3.

Ejemplo 6

20 El rendimiento en lavado de variantes en detergentes se determinó usando las siguientes manchas estandarizadas:

A: yema de huevo sobre algodón: producto no. 10EG obtenible de W-Testgewebe GmbH, Christenfeld 10, 41379 Brüggen, Alemania

25 B: sangre sobre algodón: producto no. CS01 obtenible de CFT (Center for Testmaterials) B.V., Vlaardingen, Países Bajos,

C: huevo sobre algodón: producto no. C37 obtenible de CFT (Center for Testmaterials) B.V., Vlaardingen, Países Bajos,

30 D: sangre sobre algodón: producto no. 111 obtenible de Eidgenössische Material- und Prüfanstalt (EMPA) Testmaterialien AG [Agencia federal de materiales y ensayos, Testmaterials], St. Gallen, Suiza.

Las siguientes manchas E-R se pueden obtener de CFT (Center for Testmaterials) B.V., Vlaardingen, Países Bajos:

35 E: cacao sobre algodón: producto no. CH-09

F: huevo sobre algodón: producto no. C38

40 G: chocolate con leche sobre algodón: producto no. C03

H: harina de cacao y avena: producto no. C-S-54

I: chocolate con leche sobre poliéster/algodón: producto no. PC-3-009

45 J: cacao cocinado con leche sobre algodón: producto no. C-H019

K: batido sustitutivo de comidas en algodón: producto no. C-H165

L: pudín de chocolate sobre algodón: producto no. C-H118

- M: pudín de chocolate sobre algodón: producto no. C-H172
- 5 N: paté de carne Vallette: producto no. KC-H 171
- O: pudín de chocolate sobre algodón: producto no. KC-H 172
- P: helado de chocolate envejecido sobre algodón: producto no. CS-68
- 10 Q: pudín de chocolate sobre algodón: producto no. CS-69
- R: yema de huevo negro de humo envejecido: producto no. CS-38
- 15 S: huevo sobre algodón: producto no. WFK 10N obtenible de W-Testgewebe GmbH, Christenfeld 10, 41379 Brügglen, Alemania
- T: cacao sobre algodón: producto no. EMPA 112 obtenible de Eidgenössische Material- und Prüfanstalt (EMPA) Testmaterialien AG [Agencia federal de materiales y ensayos, Testmaterials], St. Gallen, Suiza.
- 20 U: leche de sangre/tinta sobre algodón: producto no.C05
- V pigmento de aceite de maní/tinta sobre algodón: producto no. C10
- 25 W: hierba sobre algodón: producto no. 164 obtenible de Eidgenössische Material- und Prüfanstalt (EMPA) Testmaterialien AG [Agencia federal de materiales y ensayos, Testmaterials], St. Gallen, Suiza.
- X: cacao cocinado con leche: producto no. C-H010
- 30 Y: sangre/leche/tinta, producto no. EMPA 117 obtenible de Eidgenössische Material- und Prüfanstalt (EMPA) Testmaterialien AG [Agencia federal de materiales y ensayos, Testmaterials], St. Gallen, Suiza.
- Z: leche con chocolate y hollín, producto no. CFT C03 obtenible de CFT (Center for Testmaterials) B.V., Vlaardingen, Países Bajos:
- 35 Se usó un agente de lavado líquido con la siguiente composición como formulación base (todos los valores en porcentaje en peso): 0-0.5% de goma de xantano, 0.2-0.4% de agente antiespumante, 0.2-8% de trietanolamina, 1-7% de glicerol, 0.3-3% de etanol, 0-12% de FAEOS (sulfato de éter de alcohol graso), 1-28% de tensioactivos no iónicos, 0.5-4% de ácido bórico, 0.5-6% de citrato de sodio (dihidrato), 1-6% de refresco, 0-16% ácidos grasos de coco, 0.5-6% HEDP (1-hidroxietano-(ácido 1,1-difosfónico)), 0-0.4% PVP (polivinilpirrolidona), 0-0.05% abrillantadores ópticos, 0-0.001% colorante, agua desionizada restante.
- 40 Con base en esta formulación base, se prepararon varios detergentes añadiendo proteasas respectivas como se indica en las Tablas 9. La referencia es la proteasa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.3, la proteasa de referencia que ya muestra un buen rendimiento en lavado, especialmente en detergentes líquidos. Las proteasas se agregaron en las mismas cantidades basadas en el contenido de proteína total (5 mg/l de solución de lavado).
- 45 La relación de dosificación del agente de lavado líquido fue de 4.7 gramos por litro de licor de lavado y el procedimiento de lavado se realizó durante 60 minutos a una temperatura de 20°C y 40°C, teniendo el agua una dureza del agua entre 15.5 y 16.5° (grados de dureza alemanes).
- 50 La blancura, es decir, el brillo de las manchas, se determinó fotométricamente como una indicación del rendimiento del lavado. Se usó un dispositivo de espectrómetro Minolta CM508d, que se calibró de antemano usando un estándar blanco provisto con la unidad.
- 55 Los resultados obtenidos son los valores de diferencia entre las unidades de remisión obtenidas con los detergentes y las unidades de remisión obtenidas con el detergente que contiene la proteasa de referencia. Por lo tanto, un valor positivo indica un rendimiento en lavado mejorado de las variantes en el detergente. Es evidente a partir de las tablas 4a (resultados a 40°C) y 4b (resultados a 20°C) que las variantes según la invención muestran un rendimiento en lavado mejorado.
- 60

ES 2 763 235 T3

Tabla 4 a y b: Rendimiento en lavado a 40°C de variantes de proteasa que tienen la misma secuencia de aminoácidos que la SEQ ID NO: 3, excepto las sustituciones según la tabla a continuación en las manchas como se indica; la referencia es la proteasa de acuerdo con la SEQ ID NO: 3.

5

Tabla a)

Variante de proteasa		A	B	C	D	E	F
N76D + A228V + L262E	Dif	1.3	1.3	9.6	nd	nd	nd
	HSD	0.5	2.2	2.4	nd	nd	nd
S156D + L262E	Dif	1.4	3.9	5.8	7.5	3.0	5.6
	HSD	0.7	1.9	2.2	3.7	1.3	3.7
N238E + L262E + Q137H + S141H + R145H	Dif	1.4	3.3	5.6	3.6	1.3	5.3
	HSD	0.7	1.9	2.2	3.7	1.2	3.7
S3T + N76D + S156D + Y209W + Q137H + S141H + R145H	Dif	1.7	3.3	5.6	4.6	1.4	4.0
	HSD	0.7	1.9	2.2	3.7	1.2	3.7

Tabla b)

Variante de proteasa	U	G	V	T	W
S156D	1.6	2.1	0.5	nd	nd

10

Tablas 4 c-e: Rendimiento en lavado a 20°C de variantes de proteasas que tienen la misma secuencia de aminoácidos que la SEQ ID NO: 3, excepto las sustituciones según la tabla a continuación en las manchas como se indica; la referencia es la proteasa de acuerdo con la SEQ ID NO: 3.

Tabla c)

Variante de proteasa		A	C	D	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T
S156D + L262E	Dif	0.9	8.0	6.1	5.1	2.3	3.1	4.2	2.6	6.1	1.3	1.9	3.2	2.6	0.6
	HSD	0.9	3.7	4.2	2.0	1.4	2.4	1.5	2.2	3.2	1.1	1.6	2.6	1.9	1.7
N238E + L262E + Q137H + S141H + R145H	Dif	1.4	5.7	5.9	3.9	1.9	1.5	3.4	1.4	5.8	0.9	1.2	3.6	2.2	0.7
	HSD	0.9	3.7	4.2	2.0	1.4	2.4	1.5	2.2	3.2	1.1	1.6	2.6	1.9	1.7
S3T + N76D + S156D + Y209W + Q137H + S141H + R145H	Dif	2.3	6.7	6.7	4.4	2.6	1.8	3.5	3.0	5.5	1.5	1.9	2.0	2.7	1.8
	HSD	0.9	3.7	4.2	2.0	1.4	2.4	1.5	2.2	3.2	1.1	1.7	2.6	1.9	1.7

15

Tabla d)

Variante de proteasa	U	G	V	T	W
S156D	1.1	1.9	nd	2.1	0.8

Tabla e)

Variante de proteasa		A	C	G	L	X	Y	Z
N238E + L262E	Dif	1.2	4.6	0.6	3.9	5.5	1.2	3.1
	HSD	0.9	2.4	2.0	2.6	2.5	3.3	2.5
S156D + L262E	Dif	1.5	5.7	0.8	3.2	5.8	2.6	4.5
	HSD	0.9	2.4	2.0	2.5	2.5	3.3	2.3

(continuación)

Variante de proteasa		A	C	G	L	X	Y	Z
N238E + L262E + Q137H + S141H + R145H	Dif	1.2	4.4	2.5	1.8	4.2	3.0	4.4
	HSD	0.9	2.4	2.0	2.5	2.5	3.5	2.3
S3T + N76D + S156D + Y209W + Q137H + S141H + R145H	Dif	1.1	3.5	1.9	1.3	3.9	3.5	4.0
	HSD	0.9	2.4	2.0	2.5	2.6	3.3	2.3

Ejemplo 7: Rendimiento en lavado de variantes de subtilisina

- 5 El rendimiento en lavado de las variantes de proteasa que tienen la misma secuencia de aminoácidos que SEQ ID NO: 3, excepto las sustituciones según la tabla a continuación en las manchas como se indica; la referencia es la proteasa de acuerdo con la SEQ ID NO: 3. El lavado se evaluó utilizando el Ensayo automático de estrés mecánico (AMSA), donde se puede examinar el rendimiento en lavado de muchas soluciones detergentes enzimáticas de pequeño volumen. La placa AMSA tiene una serie de ranuras para soluciones de prueba y una tapa que aprieta firmemente el tejido por lavar contra las aberturas de la ranura. Durante el lavado, la placa, las soluciones de prueba, la tela y la tapa se agitaron vigorosamente para poner la solución de prueba en contacto con la tela y aplicar tensión mecánica de manera regular, periódica, oscilante. Para una descripción más detallada, véase el documento WO02/42740, especialmente el párrafo "Realizaciones especiales de método en las páginas 23-24.
- 10
- 15 Los experimentos de lavado se llevaron a cabo en las condiciones experimentales especificadas en la Tabla 5.

Tabla 5:

Dosificación de detergente	2.0 g/L
Volumen de solución de prueba	160 µL (20 µL de enzima+140 µL de detergente)
pH	8.4
Tiempo de lavado	20 minutos
Temperatura	20°C
Dureza del agua	12°dH

Se usó detergente modelo como se describe en la Tabla 1.

20

Tabla 6: Composición de detergentes modelo y materiales de prueba.

Detergente	Detergente modelo para lavado de ropa (Tabla 1)
Material de prueba	C-05 (Sangre/leche/tinta sobre algodón)
	PC-03 (Chocolate con leche con negro de humo sobre poliéster/algodón, 65/35)
	CS-37 (huevo entero/pigmento sobre algodón)

Los materiales de prueba se obtuvieron de Center For Testmaterials BV, 3133 KT Vlaardingen, Países Bajos.

25

La dureza del agua se ajustó a 12°dH mediante la adición de CaCl₂, MgCl₂ y NaHCO₃ (Ca²⁺: Mg²⁺ = 2:1:4.5) al sistema de prueba. Después del lavado, los textiles se lavaron con agua corriente y se secaron.

30

El rendimiento del lavado se midió 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 mancha, 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.

35

Las mediciones de color se realizaron con un escáner plano Kodak iQsmart (Kodak, Midtager 29, DK-2605 Brøndby, Dinamarca), que se utiliza para capturar una imagen del textil lavado.

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 convirtieron en valores para rojo, verde y azul (RGB). El valor de intensidad (Int) se calculó sumando los valores RGB juntos como vectores y luego tomando la longitud del vector resultante:

5

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

Los resultados se muestran en la Tabla 12. Los resultados se proporcionan como rendimiento relativo en comparación con la SEQ ID NO: 3 a una concentración de enzima de 30 nM en tres muestras diferentes.

10

Tabla 7: Rendimiento relativo de variantes de AMSA en comparación con la SEQ ID NO 3.

Mancha	PC-03	C-05	CS-37
Mutaciones en comparación con la SEQ ID NO: 3			
S156D	0.8	0.9	1.0
L262Q	1.0	1.0	1.1
L262E	1.0	1.0	1.4
S156D + S163G	0.9	1.1	1.3
T58L + S156D	1.2	1.1	1.5
S3T + N76D + S156D	0.9	0.9	2.2

Los resultados muestran que las variantes estabilizadas de SEQ ID NO 3 muestran un rendimiento en lavado a la par o mejorado en comparación con el rendimiento en lavado de SEQ ID NO 3.

15

Ejemplo 8: Resultado del ensayo de lavado Terg-O-tometer (TOM)

El experimento de lavado TOM se lleva a cabo en las condiciones experimentales especificadas a continuación:

Tabla 8. Condiciones de lavado TOM	
Detergente	Modelo de detergente líquido para ropa (Tabla 1)
Dosis de detergente	4.66 g/L
pH	Se midió que el pH era 7.6, pero se usa "tal cual" en la solución de detergente actual y no se ajusta.
Dureza del agua	16° dH, ajustado mediante la adición de CaCl ₂ *2H ₂ O, MgCl ₂ *6H ₂ O y NaHCO ₃ (5:1:3) a agua Milli-Q.
Conc de enzima	60 nM
Volumen de solución de prueba	1000 mL
Material de prueba	2 muestras, cada una de 5x5 cm, de cada uno de los 5 tipos de textiles sucios por vaso (es decir, 10 muestras sucias por vaso): PC-03 (Chocolate con leche/tinta sobre algodón/poliéster) C-H010 (Cacao, cocinado con leche sobre algodón) C-05 (Sangre/leche/hollín sobre algodón) CS-01 (sangre envejecida sobre algodón)

(continuación)

Tabla 8. Condiciones de lavado TOM	
Detergente	Modelo de detergente líquido para ropa (Tabla 1)
	CS-37 (huevo completo/pigmento sobre algodón) Muestras de lastre de algodón (50 %:50 % WFK10A (tela de algodón estándar, sin engrasar): WFK80A (algodón), 5x5 cm (wfk Testgewebe GmbH, Christenfeld 10; D-41379 Brijgen-Bracht; Alemania) añadido para dar un peso total de 30 g de muestras textiles sucias + lastre por vaso TOM.
Temperatura	20°C
Tiempo de lavado	30 min
Tiempo de enjuague	5 min
Rotación	120 rpm

Tabla 9: Rendimiento relativo en comparación con la SEQ ID NO: 3 de las variantes de subtilasa que tienen las mutaciones indicadas en comparación con la SEQ ID NO 3.

Remisión Delta	PC-03	C-H010	C-05	CS-01	CS-37
L262E	1.3	1.1	1.1	1.2	1.9
N76D + S156D	1.3	1.0	1.0	2.9	2.1
H120D + S156D	1.3	0.9	1.0	2.9	1.6
R45E + L262E	1.4	2.2	1.0	1.5	1.2
S87E + L262E	1.2	2.7	1.1	0.7	1.2
G61D + L262E	1.4	2.3	1.0	0.9	1.3
Q59D + L262E	1.4	1.8	1.0	0.8	1.5
Q59D + S156D	1.9	0.9	1.0	1.1	1.7
S156D + L262E	1.4	1.3	1.1	1.1	1.2
S163G + N238E + L262E	1.5	1.8	0.9	0.9	1.4
S3T + N76D + S156D	1.2	1.2	1.0	1.0	1.0
S87E + S163G + L262E	1.6	1.0	1.1	0.6	1.2
S156D + S163G + L262E	1.6	2.3	1.2	1.0	1.5
S156D + S163G + L262E	1.7	1.4	1.1	0.9	1.4
S3T + N76D + Y209W + N261D + L262E	1.5	1.4	1.0	1.2	1.5

5

Ejemplo 9: Rendimiento en lavado de variantes de proteasa

Las variantes que tienen las mutaciones indicadas en la Tabla 10 en comparación con la SEQ ID NO: 3 se lavaron en diferentes condiciones, lavado AMSA con baja concentración de proteasa (30 nM), lavado AMSA con alta concentración de proteasa (300 nM), lavado TOM y lavado a gran escala (FSW). El detergente descrito en la Tabla 1 y los materiales de prueba PC-03 (Chocolate con leche/tinta sobre algodón/poliéster) se usaron para los lavados. Los resultados se compararon con el rendimiento de la proteasa de referencia que tiene SEQ ID NO: 3 y el rendimiento que se muestra en la Tabla 10 a continuación, donde el resultado para la proteasa de referencia se establece en 1.00.

10
15

Tabla 10:

Mutaciones en comparación con la SEQ ID NO: 3	AMSA (30 nM)	AMSA (300 nM)	TOM	FSW
S3T + N76D + S156D	1.02		1.23	
S3T + N76D + S156D + Y209W			1.31	1.38
N76D + A228V + L262E			1.77	1.38
N261D + L262E			1.41	
S87E + L262E			1.22	
Q59D + L262E			1.26	
K27Q + L262E			1.22	
H120D + L262E			1.28	
K27Q + S156D		1.18		
H120D + S163G + L262E		1.15		

Listado de secuencias

- 5 <110> Henkel AG & Co. KGaA
- <120> Composición detergente que comprende variantes de subtilasa
- <130> 2013P32293EP 01
- 10 <150> EP14198027.6
- <151> 2014-12-15
- 15 <150> EP14198025.0
- <151> 2014-12-15
- <160> 3
- 20 <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- 25 <211> 275
- <212> PRT
- <213> Bacillus amyloliquefaciens
- 30 <400> 1

ES 2 763 235 T3

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

His Ser Gln Gly Tyr Thr Gly Ser Asn Val Lys Val Ala Val Ile Asp
 20 25 30

Ser Gly Ile Asp Ser Ser His Pro Asp Leu Lys Val Ala Gly Gly Ala
 35 40 45

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

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

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

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

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

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

ES 2 763 235 T3

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

Val Gly Ala Val Asp Ser Ser Asn Gln Arg Ala Ser Phe Ser Ser Val
 180 185 190

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

Leu Pro Gly Asn Lys Tyr Gly Ala Tyr Asn Gly Thr Ser Met Ala Ser
 210 215 220

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

Trp Thr Asn Thr Gln Val Arg Ser Ser Leu Glu Asn Thr Thr Thr Lys
 245 250 255

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

Ala Ala Gln
 275

<210> 2

5 <211> 269

<212> PRT

<213> Bacillus lentus

10

<400> 2

ES 2 763 235 T3

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

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

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

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

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

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

ES 2 763 235 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 3

5 <211> 269

<212> PRT

<213> Artificial

10 <220>

<223> BLAP R99E

15 <400> 3

ES 2 763 235 T3

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

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

ES 2 763 235 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

REIVINDICACIONES

1. Una composición detergente que comprende una variante de subtilasa, teniendo la variante de subtilasa al menos 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3, preferiblemente al menos 95% de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 96% de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 97% de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 98% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3, en donde la variante de subtilasa tiene un residuo de ácido glutámico (E) en la posición 101, y en donde la variante de subtilasa comprende además una o más sustituciones seleccionadas de L262E,N,Q,D y S156D, en donde la variante de subtilasa tiene mayor estabilidad en una composición detergente líquida en comparación con la subtilasa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, y en donde las posiciones corresponden a las posiciones de SEQ ID NO: 1.
2. La composición detergente de la reivindicación 1, en donde la variante de subtilasa tiene además un rendimiento en lavado mejorado en comparación con la subtilasa que tiene la SEQ ID NO: 3.
3. La composición detergente de las reivindicaciones 1 o 2, en donde la variante de subtilasa comprende además una o más sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en: S3T; R45E,D,Q; P55N; T58W,Y,L; Q59D,M,N,T; G61D,R; N76D; S87E; G97S; A98D,E,R; V104T; S160A,W; N117E; H120D,K,V,N; S124M; N128Q; P129D; E136Q; Q137H; S141H; S143W; R145H; S161T; S163A,G; Y171L; A172S; N185Q; V199M; Y209W; M222Q; A228V; N238E,H; V244T y N261T,D.
4. La composición detergente de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la variante de subtilasa se selecciona del grupo que consiste en:
- SEQ ID NO:3 + L262N,Q,D,E,
- SEQ ID NO:3 + S156D + L262E
- SEQ ID NO:3 + N238E + L262E
- SEQ ID NO:3 + S3T + N76D + S156D + Y209W
- SEQ ID NO:3 + S163G + N128Q + N238E + L262E
- SEQ ID NO:3 + V104T + H120D + S156D + L262E
- SEQ ID NO:3 + N76D + A228V + L262E
- SEQ ID NO:3 + Q137H + S141H + R145H + N238E + L262E
- SEQ ID NO:3 + S3T + N76D + Q137H + S141H + R145H + S156D + Y209W
- SEQ ID NO:3 + S156D + S163G
- SEQ ID NO:3 + T58L + S156D
- SEQ ID NO:3 + S3T + N76D + S156D
- SEQ ID NO:3 + N76D + S156D
- SEQ ID NO:3 + H120D + S156D
- SEQ ID NO:3 + R45E + L262E
- SEQ ID NO:3 + S87E + L262E
- SEQ ID NO:3 + G61D + L262E
- SEQ ID NO:3 + Q59D + L262E
- SEQ ID NO:3 + Q59D + S156D
- SEQ ID NO:3 + S156D + L262E
- SEQ ID NO:3 + S163G + N238E + L262E
- SEQ ID NO:3 + S87E + S163G + L262E

SEQ ID NO:3 + S156D + S163G + L262E

SEQ ID NO:3 + S156D + S163G + L262E

5

SEQ ID NO:3 + S3T + N76D + Y209W + N261D + L262E

10

5. La composición detergente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la composición está en forma de una barra, una tableta homogénea, una tableta que tiene dos o más capas, una bolsa que tiene uno o más compartimentos, un polvo regular o compacto, un gránulo, una pasta, un gel o un líquido regular, compacto o concentrado.

15

6. La composición detergente de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además una o más enzimas adicionales seleccionadas entre proteasa, lipasa, cutinasa, amilasa, carbohidrasa, celulasa, pectinasa, mananasa, arabinasa, galactanasa, xilanasa, oxidasa, xantanasa, lacasa y/o peroxidasa.

20

7. La composición detergente de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la composición es una composición detergente para ropa o una composición para lavar platos, preferiblemente una composición para lavar platos con un lavavajillas.

8. El uso de una composición detergente según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en un proceso de limpieza.

9. El uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el proceso de limpieza es lavado de ropa.

25

10. El uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el proceso de limpieza es la limpieza de superficies duras, tales como lavavajillas.

11. Un método para eliminar una mancha de una superficie que comprende poner en contacto la superficie con una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.