



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 241 180**

51 Int. Cl.:

C12N 15/57 (2006.01)

C12N 9/54 (2006.01)

C11D 3/386 (2006.01)

A23K 1/165 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA

T5

96 Número de solicitud europea: **98956181 .6**

96 Fecha de presentación : **23.10.1998**

97 Número de publicación de la solicitud: **1025241**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.08.2000**

54 Título: **Variantes de proteasas con múltiples sustituciones.**

30 Prioridad: **23.10.1997 US 956323**
23.10.1997 US 956324
23.10.1997 US 956564

45 Fecha de publicación de la mención y de la traducción de patente europea: **16.10.2005**

45 Fecha de la publicación de la mención de la patente europea modificada BOPI: **26.03.2010**

45 Fecha de publicación de la traducción de patente europea modificada: **26.03.2010**

73 Titular/es: **GENENCOR INTERNATIONAL, Inc.**
925 Page Mill Road
Palo Alto, California 94304, US
THE PROCTER & GAMBLE COMPANY

72 Inventor/es: **Schellenberger, Volker;**
Kellis, James, T., Jr.;
Paech, Christian;
Nadherny, Joanne;
Naki, Donald, P.;
Poulose, Ayrookaran, J.;
Collier, Katherine, D.;
Caldwell, Robert, M. y
Baeck, André, C.

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 241 180 T5

DESCRIPCIÓN

Variantes de proteasas con múltiples sustituciones.

5 Antecedentes de la invención

Las serina-proteasas son un subgrupo de carbonil-hidrolasas. Las mismas comprenden una clase diversa de enzimas que tienen una extensa gama de especificidades y funciones biológicas. Stroud, R. *Sci. Amer.*, **131**: 74-88. A pesar de su diversidad funcional, la maquinaria catalítica de las serina-proteasas ha sido abordada por al menos dos familias de enzimas genéticamente distintas: 1) las subtilisinas y 2) las serina-proteasas de mamífero afines a la quimotripsina y serina-proteasas bacterianas homólogas (v.g., tripsina y *S. gresius* tripsina). Estas dos familias de serina-proteasas exhiben mecanismos de catálisis notablemente similares. Kraut, J. (1977), *Annu. Rev. Biochem.*, **46**: 331-358. Adicionalmente, aunque la estructura primaria no está emparentada, la estructura terciaria de estas dos familias de enzimas reúne una tríada catalítica conservada de aminoácidos constituida por serina, histidina y aspartato.

Las subtilisinas son serina-proteasas (PM aprox. 27.500) que son secretadas en grandes cantidades por una gran diversidad de especies de *Bacillus* y otros microorganismos. La secuencia proteínica de la subtilisina ha sido determinada a partir de al menos nueve especies diferentes de *Bacillus*. Markland, F.S., *et al.* (1983), *Hoppe-Seyler's Z., Physiol. Chem.*, **364**: 1537-1540. La estructura cristalográfica tri-dimensional de las subtilisinas de *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis* y varias variantes naturales de *B. lentus* ha sido consignada. Estos estudios indican que aunque la subtilisina no está emparentada genéticamente con las serina-proteasas de mamífero, tiene una estructura de sitio activo similar. Las estructuras cristalinas de rayos X de inhibidores peptídicos unidos covalentemente que contienen subtilisina (Robertus, J.D., *et al.* (1972), *Biochemistry*, **11**: 2439-2449) o complejos de productos (Robertus, J.D., *et al.* (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**: 1097-1103) han proporcionado también información concerniente al sitio activo y a la hendidura supuesta de unión al sustrato de la subtilisina. Adicionalmente, se ha llevado a cabo un gran número de mutagénesis cinéticas y químicas (*Biol. Chem.*, **244**: 5333-5338) y orientadas extensas (Wells y Estell (1988) *TIBS* **13**: 291-297).

30 Sumario de la Invención

La invención proporciona una variante de proteasa que comprende una sustitución de aminoácido relativa a una proteasa precursora en una posición de residuo correspondiente a la posición 103 y una sustitución de aminoácido relativa a la proteasa precursora en una posición de residuo correspondiente a la posición 245 de la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* y una o más sustituciones de aminoácidos relativas a la proteasa precursora en las posiciones de residuos seleccionadas del grupo que consiste en las posiciones de residuos correspondientes a las posiciones 1, 12, 61, 62, 68, 76, 97, 98, 101, 102, 104, 109, 130, 131, 159, 170, 183, 185, 205, 209, 210, 211, 212, 213, 215, 217, 222, 230, 232, 248, 252, 257, 260, 261, 270 y 275 de la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* gracias a lo cual la variante de proteasa ha mejorado su eficiencia de lavado comparada con la de proteasa precursora.

La invención también proporciona una variante de proteasa que comprende una sustitución de aminoácido relativa a una proteasa precursora en una posición de residuo correspondiente a la posición 103 y una sustitución de aminoácido relativa a la proteasa precursora en una posición de residuo correspondiente a la posición 236 y una sustitución de aminoácido relativa a la proteasa precursora en una posición de residuo correspondiente a la posición 245 de la subtilina de *Bacillus amyloliquefaciens* y una o más sustituciones de aminoácidos relativas a la proteasa precursora en posiciones de residuo seleccionadas del grupo que consiste en las posiciones de residuo correspondientes a las posiciones 1, 12, 61, 62, 68, 76, 97, 98, 101, 102, 104, 109, 130, 131, 159, 183, 185, 205, 209, 210, 211, 212, 213, 215, 217, 230, 232, 243, 248, 252, 257, 260, 270 y 275 de la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* gracias a lo cual la variante de proteasa ha mejorado su eficiencia de lavado comparada con la de proteasa precursora.

Las Tablas 1 y 2 describen series de sustituciones en posiciones correspondientes a posiciones en la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* que corresponden a variantes de proteasa generadas en los Ejemplos.

TABLA 1

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

ES 2 241 180 T5

19	76	103	104
13	76	103	104
19	76	103	104
76	103	104	184
76	103	104	252
76	103	104	259
76	103	104	251
76	86	103	104
72	76	103	104 185.
76	103	104	237 274
76	103	104	160
76	103	104	228
55	76	103	104 240
76	103	104	254
76	103	104	204
76	103	104	204
43	76	103	104
76	103	104	159
10	76	103	104 177
58	76	103	104
76	103	104	270

76	103	104	185
27	76	103	104
76	103	104	262
76	78	103	104
24	76	103	104
76	103	104	166
17	76	103	104
76	103	104	130
76	103	104	109
76	99	103	104
76	103	104	181
12	76	103	104
76	103	104	212
76	103	104	252
76	103	104	242
76	103	104	271
12	76	103	104
43	76	103	104
76	103	104	258
76	103	104	271
61	76	103	104

38	76	103	104	182	263
76	103	104	182	272	
76	103	104	109	246	
76	87	103	104	206	265
76	103	104	137	238	271
103	104	228			
76	103	104	182	198	
21	76	103	104	182	
76	103	104	119	137	
76	103	104	137	248	
13	76	103	104	206	
76	103	104	206		
76	103	104	212	258	
58	76	103	104	271	
76	103	104	206	261	
4	76	103	104	206	
76	77	103	104	206	
76	103	104	158		
76	103	104	206		
4	76	103	104	159	251
4	76	103	104	159	252

[illegible]

[illegible]

[illegible]

68	76	103	104	159	213	232	236	245	260		
12	76	103	104	222	244	245					
12	76	103	222	210	245						
12	76	103	104	130	222	245					
22	68	76	103	104							
68	76	103	104	184							
68	103	104	159	232	236	245	248	252			
68	103	104	159	232	236	245					
68	103	104	140	159	232	236	245	252			
43	68	103	104	159	232	236	245	252			
43	68	103	104	159	232	236	245				
43	68	103	104	159	232	236	245	252			
68	87	103	104	159	232	236	245	252	275		
12	76	103	104	130	222	245	248	262			
12	76	103	104	130	215	222	245				
12	76	103	104	130	222	227	245	262			
12	76	103	104	130	222	245	261				
76	103	104	130	222	245						
12	76	103	104	130	218	222	245	262	269		
12	57	76	103	104	130	222	245	251			
12	76	103	104	130	170	185	222	243	245		

ES 2 241 180 T5

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

12	76	103	104	130	222	245	268						
12	76	103	104	130	222	210	245						
68	103	104	159	232	236	245	257						
68	103	104	116	159	232	236	245						
68	103	104	159	232	236	245	248						
10	68	103	104	159	232	236	245						
68	103	104	159	203	232	236	245						
68	103	104	159	232	236	237	245						
68	76	79	103	104	159	232	236	245					
68	103	104	159	183	232	236	245						
68	103	104	159	174	206	232	236	245					
68	103	104	159	188	232	236	245						
68	103	104	159	230	232	236	245						
68	98	103	104	159	232	236	245						
68	103	104	159	215	232	236	245						
68	103	104	159	232	236	245	248						
68	76	103	104	159	232	236	245						
68	76	103	104	159	210	232	236	245					
68	76	103	104	159	232	236	245	257					
76	103	104	232	236	245	257							
68	103	104	159	232	236	245	257						

[illegible]

ES 2 241 180 T5

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

27	68	76	103	104	159	232	236	245			
68	76	103	104	116	159	170	185	232	236	245	
61	68	103	104	159	232	236	245	248	252		
43	68	103	104	159	232	236	245	248	252		
68	103	104	159	212	232	236	245	248	252		
68	103	104	99	159	184	232	236	245	248	252	
103	104	159	232	236	245	248	252				
68	103	104	159	209	232	236	245	248	252		
68	103	104	109	159	232	236	245	248	252		
20	68	103	104	159	232	236	245	248	252		
68	103	104	159	209	232	236	245	248	252		
68	103	104	159	232	236	245	248	252	261		
68	103	104	159	185	232	236	245	248	252		
68	103	104	159	210	232	236	245	248	252		
68	103	104	159	185	210	232	236	245	248	252	
68	103	104	159	212	232	236	245	248	252		
68	103	104	159	213	232	236	245	248	252		
68	103	104	213	232	236	245	248	252			
68	103	104	159	215	232	236	245	248	252		
68	103	104	159	216	232	236	245	248	252		
20	68	103	104	159	232	236	245	248	252		

68	103	104	159	173	232	236	245	248	252		
68	103	104	159	232	236	245	248	251	252		
68	103	104	159	206	232	236	245	248	252		
68	103	104	159	232	236	245	248	252			
55	68	103	104	159	232	236	245	248	252		
68	103	104	159	232	236	245	248	252	255		
68	103	104	159	232	236	245	248	252	256		
68	103	104	159	232	236	245	248	252	260		
68	103	104	159	232	236	245	248	252	257		
68	103	104	159	232	236	245	248	252	258		
8	68	103	104	359	232	236	245	248	252	269	
68	103	104	116	159	232	236	245	248	252	260	
68	103	104	159	232	236	245	248	252	261		
68	103	104	159	232	236	245	248	252	261		
68	76	103	104	159	232	236	245	248	252		
68	103	104	232	236	245	248	252				
103	104	159	232	236	245	248	252				
68	103	104	159	232	236	245	248	252			
18	68	103	104	159	232	236	245	248	252		
68	103	104	159	232	236	245	248	252			
68	76	101	103	104	159	213	218	232	236	245	260

ES 2 241 180 T5

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

68	103	104	159	228	232	236	245	248	252		
33	68	76	103	104	159	232	236	245	248	252	
68	76	89	103	104	159	210	213	232	236	245	260
61	68	76	103	104	159	232	236	245	248	252	
103	104	159	205	210	232	236	245				
61	68	103	104	130	159	232	236	245	248	252	
61	68	103	104	133	137	159	232	236	245	248	252
61	103	104	133	159	232	236	245	248	252		
68	103	104	159	232	236	245	248	252			
68	103	104	159	218	232	236	245	248	252		
61	68	103	104	459	160	232	236	245	248	252	
3	61	68	76	103	104	232	236	245	248	252	
61	68	103	104	159	167	232	236	245	248	252	
97	103	104	159	232	236	245	248	252			
98	103	104	159	232	236	245	248	252			
99	103	104	159	232	236	245	248	252			
101	103	104	159	232	236	245	248	252			
102	103	104	159	232	236	245	248	252			
103	104	106	159	232	236	245	248	252			
103	104	109	159	232	236	245	248	252			
103	104	159	232	236	245	248	252	261			

62	103	103	104	159	232	236	245	248	252				
103	104	104	159	184	232	236	245	248	252				
103	104	104	159	166	232	236	245	248	252				
103	104	104	159	217	232	236	245	248	252				
20	62	103	104	159	213	232	245	248	252				
62	103	104	159	213	232	236	245	248	252				
103	104	104	159	206	217	232	245	248	252				
62	103	104	159	206	232	236	245	248	252				
103	104	104	130	159	232	236	245	248	252				
103	104	104	131	159	232	236	245	248	252				
27	103	104	159	232	236	245	248	252	252				
38	103	104	159	232	236	245	248	252	252				
38	76	103	104	159	213	232	245	260	260				
68	76	103	104	159	213	232	245	260	271				
68	76	103	104	159	209	213	232	245	260				
68	76	103	104	159	210	213	232	245	260				
68	76	103	104	159	205	213	232	245	260				
68	76	103	104	159	210	232	245	260	260				
68	103	104	159	213	232	236	245	260	260				
76	103	104	159	213	232	236	245	260	260				
68	103	104	159	209	232	236	245	260	260				

ES 2 241 180 T5

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

68	103	104	159	210	232	236	245												
68	103	104	159	230	232	236	245												
68	103	104	159	126	232	236	245												
68	103	104	159	205	232	236	245												
68	103	104	159	210	232	236	245												
103	104	159	230	236	245														
68	103	104	159	232	236	245	260												
103	104	159	232	236	245														
68	103	104	159	174	232	236	245	257											
68	103	104	159	194	232	236	245	257											
68	103	104	159	209	232	236	245	257											
103	104	159	232	236	245	257													
68	76	103	104	159	213	232	236	245	260	261									
68	103	104	159	232	236	245	257	261											
103	104	159	213	232	236	245	260												
103	104	159	210	232	236	245	248	252											
103	104	159	209	232	236	245	257												
68	76	103	104	159	210	213	232	236	245	260									
12	103	104	159	209	213	232	236	245	260										
103	104	209	232	236	245	257													
103	104	159	205	210	213	232	236	245	260										

103	104	159	205	209	232	236	245	260				
68	103	104	159	205	209	210	232	236	245			
103	104	159	205	209	210	232	236	245	257			
103	104	159	205	209	232	236	245	257				
68	103	104	159	205	209	210	232	236	245	260		
103	104	159	205	209	210	232	236	245				
103	104	159	208	210	232	236	245					
103	104	159	205	210	232	236	245					
68	103	104	128	159	232	236	245					
48	103	104	159	230	236	245						
48	68	103	104	159	209	232	236	245				
48	68	103	104	159	232	236	245	248	252			
48	68	103	104	159	232	236	245	257	261			
102	103	104	159	212	232	236	245	248	252			
12	102	103	104	159	212	232	236	245	248	252		
101	102	103	104	159	212	232	236	245	248	252		
98	102	103	104	159	212	232	236	245	248	252		
102	103	104	159	213	232	236	245	248	252			
103	104	131	159	232	236	245	248	252				
103	104	159	184	232	236	245	248	252				
103	104	159	232	236	244	245	248	252				

ES 2 241 180 T5

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

62	103	104	159	213	232	236	245	248	252	256		
12	62	103	104	159	213	232	236	245	248	252		
101	103	104	159	185	232	236	245	248	252			
101	103	104	159	206	232	236	245	248	252			
101	103	104	159	213	232	236	245	248	252			
98	102	103	104	159	232	236	245	248	252			
101	102	103	104	159	232	236	245	248	252			
98	102	103	104	159	212	232	236	245	248	252		
98	102	103	104	159	212	232	236	248	252			
62	103	104	108	159	213	232	236	245	248	252		
62	103	104	159	212	232	236	245	248	252			
82	101	103	104	159	212	213	232	236	245	248	252	
103	104	159	232	245	248	252						
103	104	159	230	245								
62	103	104	130	159	213	232	236	245	248	252		
101	103	104	130	159	232	236	245	248	252			
101	103	104	128	159	232	236	245	248	252			
62	101	103	104	159	213	232	236	245	248	252		
62	103	104	128	159	213	232	236	245	248	252		
62	103	104	128	159	213	232	236	245	248	252		
101	103	104	159	232	236	245	248	252	260			

5
10
15
20
25
30
35
40
45

50

55

55

60

65

Breve descripción de los dibujos

Las Figs. 1 A-C representan la secuencia de DNA y de aminoácidos para la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* y un mapa de restricción parcial de este gen.

La Fig. 2 representa los residuos de aminoácidos conservados entre las subtilisinas de *Bacillus amyloliquefaciens* (BPN^{*}) y *Bacillus lentus* (tipo salvaje).

Las Figs. 3A y 3B representan la secuencia de aminoácidos de cuatro subtilisinas. La línea superior representa la secuencia de aminoácidos de subtilisina de la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* (a la que se hace referencia también en ocasiones como subtilisina BPN^{*}). La segunda línea representa la secuencia de aminoácidos de la subtilisina de *Bacillus subtilis*. La tercera línea representa la secuencia de aminoácidos de subtilisina de *B. licheniformis*. La cuarta línea representa la secuencia de aminoácidos de subtilisina de *Bacillus lentus* (a la que se hace referencia también como subtilisina 309 en el documento PCT WO89/06276). El símbolo * designa la ausencia de residuos de aminoácidos específicos en comparación con la subtilisina BPN^{*}.

Descripción detallada de la invención

Las proteasas son carbonil-hidrolasas que actúan generalmente para escindir enlaces peptídicos de proteínas o péptidos. Tal como se utiliza en esta memoria, "proteasa" significa una proteasa existente naturalmente o una proteasa recombinante. Las proteasas existentes naturalmente incluyen α -aminoacilpeptido-hidrolasa, peptidilaminoácido-hidrolasa, acilamino-hidrolasa, serina-carboxi-peptidasa, metalocarboxipeptidasa, tiol-proteinasa, carboxilproteinasa y metaloproteinasa. Se incluyen serina-, metalo-, tiol- y ácido-proteasas, así como endo- y exo-proteasas.

La presente invención incluye enzimas proteasa que son variantes de carbonil-hidrolasa (variantes de proteasa) no existentes naturalmente que tienen una diferente actividad proteolítica, estabilidad, especificidad de sustrato, perfil de pH y/o eficiencia característica en comparación con la carbonil-hidrolasa precursora de la que se deriva la secuencia de aminoácidos de la variante. Específicamente, tales variantes de proteasa tienen una secuencia de aminoácidos que no se encuentra en la naturaleza, que se deriva por sustitución de una pluralidad de residuos de aminoácidos de una proteasa precursora con aminoácidos diferentes. La proteasa precursora puede ser una proteasa existente naturalmente o una proteasa recombinante.

Las variantes de proteasa útiles en esta memoria abarcan la sustitución de cualquiera de los diecinueve L-aminoácidos existentes naturalmente en las posiciones de los residuos de aminoácidos designadas. Tales sustituciones pueden hacerse en cualquier subtilisina precursora (procariota, eucariota, de mamífero, etc.). A todo lo largo de esta solicitud se hace referencia a diversos aminoácidos por medio de los códigos comunes de una y de tres letras. Dichos códigos están identificados en Dale, M.W. (1989), *Molecular Genetics of Bacteria*, John Wiley & Sons, Ltd., Apéndice B.

Las variantes de proteasa útiles en esta memoria se derivan preferiblemente de una subtilisina de *Bacillus*. Más preferiblemente, las variantes de proteasas se derivan de la subtilisina de *Bacillus lentus* y/o subtilisina 309.

Las subtilisinas son proteasas bacterianas o fúngicas que actúan generalmente para escindir enlaces peptídicos de proteínas o péptidos. Tal como se utiliza en esta memoria, "subtilisina" significa una subtilisina existente naturalmente o una subtilisina recombinante. Se conocen una serie de subtilisinas existentes naturalmente que son producidas y a menudo secretadas por diversas especies microbianas. Las secuencias de aminoácidos de los miembros de esta serie no son totalmente homólogas. Sin embargo, las subtilisinas de esta serie exhiben el mismo tipo o un tipo similar de actividad proteolítica. Esta clase de serina-proteasas comparte una secuencia de aminoácidos común que define una tríada catalítica que distingue las mismas de la clase de serina-proteasas afines a la quimotripsina. Las subtilisinas y las serina-proteasas afines a la quimotripsina tienen ambas una tríada catalítica que comprende aspartato, histidina y serina. En las proteasas afines a la subtilisina, el orden relativo a estos aminoácidos, leyendo desde el término amino al término carboxi, es aspartato-histidina-serina. En cambio, en las proteasas afines a la quimotripsina, el orden relativo es histidina-aspartato-serina. Por ello, se hace referencia en esta memoria a la subtilisina como una serina-proteasa que tiene la tríada catalítica de las proteasas afines a la subtilisina. Ejemplos incluyen, pero sin carácter limitante, las subtilisinas identificadas en la Fig. 3 de esta memoria. Generalmente y para los propósitos de la presente invención, la numeración de los aminoácidos en las proteasas corresponde a los números asignados en la secuencia de la subtilisina madura de *Bacillus amyloliquefaciens* presentada en la Fig. 1.

Las expresiones "subtilisina recombinante" o "proteasa recombinante" hacen referencia a una subtilisina o proteasa en la cual la secuencia de DNA que codifica la subtilisina o proteasa está modificada para producir una secuencia variante (o mutante) de DNA que codifica la sustitución, delección o inserción de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos existente naturalmente. Métodos adecuados para producir dicha modificación, y que pueden combinarse con los expuestos en esta memoria, incluyen los expuestos en la Patente U.S. RE 24.606; la Patente U.S. 5.204.015 y la Patente U.S. 5.185.258, la Patente U.S. 5.700.676; la Patente U.S. 5.801.038, y la Patente U.S. 5.763.257.

"Subtilisinas no humanas" y el DNA que codifica las mismas se pueden obtener a partir de muchos organismos procariotas y eucariotas. Ejemplos adecuados de organismos procariotas incluyen organismos gram-negativos tales como *E. coli* o *Pseudomonas* y bacterias gram-positivas tales como *Micrococcus* o *Bacillus*. Ejemplos de organismos

eucariotas a partir de los cuales se pueden obtener subtilisina y sus genes incluyen levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae*, y hongos tales como *Aspergillus* sp.

Una “variante de proteasa” tiene una secuencia de aminoácidos que se deriva de la secuencia de aminoácidos de una “proteasa precursora”. Las proteasas precursoras incluyen proteasas existentes naturalmente y proteasas recombinantes. La secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa se “deriva” de la secuencia de aminoácidos de la proteasa precursora por la sustitución, delección o inserción de uno o más aminoácidos de la secuencia de aminoácidos precursora. Dicha modificación es de la “secuencia de DNA precursora” que codifica la secuencia de aminoácidos de la proteasa precursora en lugar de la manipulación de la enzima proteasa precursora *per se*. Métodos adecuados para dicha manipulación de la secuencia de DNA precursora incluyen métodos descritos en esta memoria, así como métodos conocidos por los expertos en la técnica (véanse, por ejemplo, los documentos EP 0 328299, WO89/06279 y las Patentes y Solicitudes de los EE.UU. a las que ya se ha hecho referencia en esta memoria).

TABLE 2

[illegible]

ES 2 241 180 T5

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

12	68	76	103	104	159	232	236	245			
20	68	76	103	104	159	232	236	245	259		
68	76	87	103	104	159	232	236	245	260		
68	76	103	104	159	232	236	245	261			
12	48	68	76	103	104	159	232	236	245		
76	103	104	159	192	232	236	245				
76	103	104	147	159	232	236	245	248	251		
12	68	76	103	104	159	232	236	245	272		
68	76	103	104	159	183	206	232	236	245		
68	76	103	104	159	232	236	245	256			
68	76	103	104	159	206	232	236	245			
27	68	76	103	104	159	232	236	245			
68	103	104	159	212	232	236	245	248	252		
103	104	159	232	236	245	248	252				
68	103	104	159	209	232	236	245	248	252		
68	103	104	109	159	232	236	245	248	252		
20	68	103	104	159	232	236	245	248	252		
68	103	104	159	209	232	236	245	248	252		
68	103	104	159	210	232	236	245	248	252		
68	103	104	159	212	232	236	245	248	252		

Sin embargo, la alineación de más de 75% o de una proporción tan pequeña como 50% de residuos conservados es también adecuada para definir residuos equivalentes. La conservación de la tríada catalítica, Asp32/His64/Ser221 debería mantenerse. Siezen *et al.* (1991) *Protein Eng.* **4**(7): 719-737 muestra la alineación de un gran número de serina-proteasas. Siezen *et al.* hacen referencia a la agrupación como subtilasas o serina-proteasas semejantes a subtilisina.

Por ejemplo, en Fig. 3, la secuencia de aminoácidos de subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* (*carlsbergensis*) y *Bacillus lentus* están alineadas para proporcionar la cantidad máxima de homología entre las secuencias de aminoácidos. Una comparación de estas secuencias muestra que hay varios residuos conservados contenidos en cada secuencia. Estos residuos conservados (como entre BPN' y *B. lentus*) se identifican en Fig. 2.

Estos residuos conservados, por tanto, pueden ser utilizados para definir los residuos de aminoácidos equivalentes correspondientes de la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* en otras subtilisinas tales como subtilisina de *Bacillus lentus* (publicación PCT No. WO89/06279 publicada el 13 de julio de 1989), la enzima precursora de proteasas preferida en esta memoria, o la subtilisina a la que se hace referencia como P892 (EP 0 328 299), que es altamente homóloga a la subtilisina preferida de *Bacillus lentus*. Las secuencias de aminoácidos de ciertas de estas subtilisinas se alinean en las Figs. 3A y 3B con la secuencia de la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* para producir la homología máxima de residuos conservados. Como se puede ver, existen varias deleciones en la secuencia de *Bacillus lentus* en comparación con la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*. Así, por ejemplo, el aminoácido equivalente para Val165 en la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* en las otras subtilisinas es isoleucina para *B. lentus* y *B. licheniformis*.

Pueden definirse también "residuos equivalentes" por determinación de homología al nivel de la estructura terciaria para una proteasa precursora cuya estructura terciaria se ha determinado por cristalografía de rayos X. Los residuos equivalentes se definen como aquéllos para los cuales las coordenadas atómicas de dos o más de los átomos de la cadena principal de un residuo de aminoácido particular de la proteasa precursora y la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* (N sobre N, CA sobre CA, C sobre C y O sobre O) están dentro de 0,13 nm y preferiblemente 0,1 nm después de la alineación. La alineación se consigue después que se ha orientado y posicionado el modelo óptimo para dar la superposición máxima de coordenadas atómicas de los átomos de las proteínas distintos de hidrógeno de la proteasa en cuestión a la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*. El modelo óptimo es el modelo cristalográfico que da el factor R mínimo para datos de difracción experimentales a la resolución más alta posible.

$$\text{Factor } R = \frac{\sum_h |F_o(h)| - |F_c(h)|}{\sum_h |F_o(h)|}$$

Los residuos equivalentes que son funcionalmente análogos a un residuo específico de la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* se definen como aquellos aminoácidos de la proteasa precursora que pueden adoptar una conformación tal que los mismos alteran, modifican o contribuyen a la estructura de la proteína, la fijación de sustrato o la catálisis de una manera definida y atribuida a un sitio específico de la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*. Adicionalmente, los mismos son aquellos residuos de la proteasa precursora (para la cual se ha obtenido una estructura terciaria por cristalografía de rayos X) que ocupan una posición análoga en tal grado que, aunque los átomos de la cadena principal del residuo dado pueden no satisfacer los criterios de equivalencia sobre la base de ocupación de una posición homóloga, las coordenadas atómicas de al menos dos de los átomos de la cadena lateral del residuo están dentro de 0,13 nm de los átomos correspondientes de la cadena lateral de la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*. Las coordenadas de la estructura tri-dimensional de la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* se exponen en la Publicación EPO No. 0 251 446 (equivalente a la Patente U.S. 5.182.204, cuya descripción se incorpora en esta memoria por referencia) y pueden utilizarse como se ha reseñado anteriormente para determinar residuos equivalentes al nivel de la estructura terciaria.

Algunos de los residuos identificados para sustitución son residuos conservados, mientras que otros no lo son. El caso de los residuos que no se conservan, la sustitución de uno o más aminoácidos está limitada a sustituciones que producen una variante que tiene una secuencia de aminoácidos que no corresponde a una encontrada en la naturaleza. En el caso de los residuos conservados, dichas sustituciones no deben dar como resultado una secuencia existente naturalmente. Las variantes de proteasa de la presente invención incluyen las formas maduras de variantes de proteasa, así como las formas pro y prepro de tales variantes de proteasa. Las formas prepro son la construcción preferida, dado que esto facilita la expresión, secreción y maduración de las variantes de proteasa.

"Prosecuencia" hace referencia a una secuencia de aminoácidos unida a la porción N-terminal de la forma madura de una proteasa que, cuando se separa, da como resultado la aparición de la forma "madura" de la proteasa. Muchas enzimas proteolíticas se encuentran en la naturaleza como productos proenzimáticos de traducción y, en ausencia de procesamiento post-traducciona, se expresan de esta manera. Una prosecuencia preferida para producción de variantes de proteasa es la prosecuencia supuesta de la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*, aunque pueden utilizarse otras prosequencias de proteasa.

Una “secuencia señal” o “presecuencia” hace referencia a cualquier secuencia de aminoácidos unida a la porción N-terminal de una proteasa o a la porción N-terminal de una proproteasa que puede participar en la secreción de las formas madura o pro de la proteasa. Esta definición de secuencia señal es una definición funcional, que pretende incluir todas aquellas secuencias de aminoácidos codificadas por la porción N-terminal del gen de proteasa que participan en la realización de la secreción de proteasa en condiciones nativas. La presente invención utiliza dichas secuencias para efectuar la secreción de las variantes de proteasa como se definen en esta memoria. Una secuencia señal posible comprende los siete primeros residuos de aminoácidos de la secuencia señal de la subtilisina de *Bacillus subtilis* condensados al resto de la secuencia señal de la subtilisina de *Bacillus lentus* (ATCC 21536).

Una forma “prepro” de una variante de proteasa está constituida por la forma madura de la proteasa que tiene una prosecuencia enlazada operativamente al término amino de la proteasa y una secuencia “pre” o “señal” enlazada operativamente al término amino de la prosecuencia.

“Vector de expresión” hace referencia a una construcción de DNA que contiene una secuencia de DNA que está enlazada operativamente a una secuencia de control adecuada capaz de efectuar la expresión de dicho DNA en un hospedador adecuado. Tales secuencias de control incluyen un promotor para efectuar la transcripción, una secuencia operadora opcional para controlar dicha transcripción, una secuencia que codifica sitios de fijación de ribosoma de mRNA adecuados y secuencias que controlan la terminación de la transcripción y la traducción. El vector puede ser un plásmido, una partícula de fago, o simplemente una inserción genómica potencial. Una vez transformado en un hospedador adecuado, el vector puede replicarse y funcionar independientemente del genoma hospedador, o puede, en algunos casos, integrarse en el genoma propiamente dicho. En la presente memoria descriptiva, “plásmido” y “vector” se utilizan en ocasiones de modo intercambiable dado que el plásmido es la forma utilizada más comúnmente de vector en la actualidad. Sin embargo, la invención tiene por objeto incluir tales otras formas de vectores de expresión que sirven para funciones equivalentes y que se conocen en la técnica, o puedan llegar a conocerse.

Las “células hospedadoras” utilizadas en la presente invención son generalmente hospedadores procariotas o eucariotas que se han manipulado preferiblemente por los métodos descritos en la Patente U.S. RE 34.606 para hacerlos incapaces de secretar endoproteasa enzimáticamente activa. Una célula hospedadora preferida para expresión de proteasa es la cepa de *Bacillus* BG2036 que es deficiente en proteasa neutra enzimáticamente activa y proteasa alcalina (subtilisina). La construcción de la cepa BG2036 se describe en detalle en la Patente U.S. 5.264.366. Otras células hospedadoras para la expresión de proteasa incluyen *Bacillus subtilis* I168 (descrito también en la Patente U.S. RE 34.606 y la Patente U.S. 5.264.366), así como cualquier cepa adecuada de *Bacillus* tal como *B. licheniformis*, *B. lentus*, etc.

Las células hospedadoras se transforman o transfectan con vectores contruidos utilizando técnicas de DNA recombinante. Tales células hospedadoras transformadas son capaces de replicar vectores que codifican las variantes de proteasa o expresar la variante de proteasa deseada. En el caso de vectores que codifican la forma pre o prepro de la variante de proteasa, dichas variantes, cuando se expresan, son secretadas típicamente por la célula hospedadora al medio de la célula hospedadora.

“Enlazado operativamente”, cuando describe la relación entre dos regiones de DNA, significa simplemente que las mismas son afines funcionalmente una a otra. Por ejemplo, una presecuencia está enlazada operativamente a un péptido si la misma funciona como una secuencia señal, participando en la secreción de la forma madura de la proteína que implica más probablemente la escisión de la secuencia señal. Un promotor está enlazado operativamente a una secuencia codificante si el mismo controla la transcripción de la secuencia; un sitio de fijación de ribosoma está enlazado operativamente a una secuencia codificante si el mismo está posicionado de tal modo que permite la traducción.

Los genes que codifican la proteasa precursora existente naturalmente se pueden obtener de acuerdo con los métodos generales conocidos por los expertos en la técnica. Los métodos comprenden generalmente la síntesis de sondas marcadas que tienen secuencias supuestas que codifican regiones de la proteasa de interés, preparación de genotecas genómicas a partir de organismos que expresan la proteasa, y escrutinio de las genotecas respecto al gen de interés por hibridación a las sondas. Los clones que se hibridan positivamente se mapean y secuencian seguidamente.

La proteasa clonada se utiliza luego para transformar una célula hospedadora a fin de expresar la proteasa. El gen de proteasa se liga luego a un plásmido de alto número de copias. Este plásmido se replica en hospedadores en el sentido de que contiene los elementos bien conocidos necesarios para replicación del plásmido, un promotor enlazado operativamente al gen en cuestión (que puede ser suministrado como el propio promotor homólogo del gen si el mismo es reconocido, es decir transcrito, por el hospedador), una región de terminación de la transcripción y poliadenilación (necesaria para estabilidad del mRNA transcrito por el hospedador a partir de gen de proteasa en ciertas células hospedadoras eucariotas) que es exógena o es suministrada por la región terminadora endógena del gen de proteasa y, deseablemente, un gen de selección tal como un gen de resistencia a antibióticos que permite el mantenimiento continuo en cultivo de células hospedadoras infectadas con el plásmido por crecimiento en medios que contienen antibiótico. Los plásmidos de número de copias alto contienen también un origen de replicación para el hospedador, permitiendo con ello que se generen grandes números de plásmidos en el citoplasma sin limitaciones cromosómicas. No obstante, está dentro del alcance de esta invención la integración de copias múltiples del gen de proteasa en el genoma hospedador. Esto es facilitado por organismos procariotas y eucariotas que son particularmente susceptibles de recombinación homóloga.

El gen puede ser un gen natural de *B. lentus*. Alternativamente, puede producirse un gen sintético que codifica una proteasa precursora existente naturalmente o mutante. En un enfoque de este tipo, se determina la secuencia de DNA y/o de aminoácidos de la proteasa precursora. Después de ello se sintetizan fragmentos múltiples y solapantes de DNA sintético monocatenario que, después de hibridación y ligación, producen un DNA sintético que codifica la proteasa precursora. Un ejemplo de construcción de un gen sintético se expone en el Ejemplo 3 de la Patente U.S. 5.204.015, cuya descripción se incorpora en esta memoria por referencia.

Una vez que el gen de la proteasa precursora existente naturalmente o sintético ha sido clonado, se realizan varias modificaciones para incrementar el uso del gen más allá de la síntesis de la proteasa precursora existente naturalmente. Tales modificaciones incluyen la producción de proteasas recombinantes como se expone en la Patente U.S. RE 34.606 y la Publicación EPO No. 0 251 446, y la producción de variantes de proteasas descritas en esta memoria.

El método siguiente de mutagénesis de casete puede utilizarse para facilitar la construcción de las variantes de proteasa de la presente invención, aunque pueden utilizarse otros métodos. En primer lugar, el gen existente naturalmente que codifica la proteasa se obtiene y se secuencia total o parcialmente. Después de ello, se escanea la secuencia en busca de un punto en el cual se desee hacer una mutación (delección, inserción o sustitución) de uno o más aminoácidos en la enzima codificada. Las secuencias que flanquean este punto se evalúan en cuanto a la presencia de sitios de restricción para reemplazar un segmento corto del gen con una agrupación de oligonucleótidos que, una vez expresada, codificará diversos mutantes. Tales sitios de restricción son preferiblemente sitios singulares dentro del gen de la proteasa a fin de facilitar el reemplazamiento del segmento de gen. Sin embargo, puede utilizarse cualquier sitio de restricción conveniente que no sea demasiado redundante en el gen de proteasa, con tal que los fragmentos de gen generados por digestión de restricción puedan reensamblarse en la secuencia apropiada. Sí no están presentes sitios de restricción en localizaciones situadas dentro de una distancia conveniente del punto seleccionado (de 10 a 15 nucleótidos), tales sitios se generan por sustitución de nucleótidos en el gen de tal manera que ni el marco de lectura ni los aminoácidos codificados se cambien en la condición final. La mutación del gen a fin de cambiar su secuencia para conformarse a la secuencia deseada se realiza por extensión con el iniciador M13 de acuerdo con métodos conocidos generalmente. La tarea de localización de regiones flanqueantes adecuadas y evaluación de los cambios necesarios para llegar a dos secuencias de sitio de restricción convenientes se hace rutinaria por la redundancia del código genético, un mapa de enzimas de restricción del gen y el gran número de enzimas de restricción diferentes. Obsérvese que si está disponible un sitio de restricción flanqueante conveniente, el método anterior precisa ser utilizado solamente en conexión con la región flanqueante que no contiene un sitio.

Una vez que se ha clonado el DNA existente naturalmente o DNA sintético, los sitios de restricción que flanquean las posiciones a mutar se digieren con las enzimas de restricción cognadas y se ligan al gen una pluralidad de casetes de oligonucleótidos complementarias de los términos extremos. Por este método se simplifica la mutagénesis, dado que todos los oligonucleótidos pueden sintetizarse de tal modo que tengan los mismos sitios de restricción, y no son necesarios enlazadores sintéticos en ningún caso para crear los sitios de restricción.

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "actividad proteolítica" se define como la tasa de hidrólisis de enlaces peptídicos por miligramo de enzima activa. Existen muchos procedimientos bien conocidos para medir la actividad proteolítica (K.M. Kalisz, "Microbial Proteinases", *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, A. Fiechter, compilador, 1988). Además de o como alternativa a la actividad proteolítica modificada, las enzimas variantes de la presente invención pueden tener otras propiedades modificadas tales como K_m , k_{cat} , relación k_{cat}/K_m y/o especificidad de sustrato modificada y/o perfil de actividad de pH modificado. Estas enzimas pueden adaptarse para el sustrato particular cuya presencia se anticipa, por ejemplo, en la preparación de péptidos o para procesos hidrolíticos tales como usos de colada.

La proteasa variante tiene una eficiencia de lavado mejorada en comparación con la proteasa precursora.

Existen una diversidad de condiciones de lavado que incluyen formulaciones detergentes variables, volumen de agua de lavado, temperatura de agua de lavado, y duración del tiempo de lavado a las que podría estar expuesta una variante de proteasa. Por ejemplo, las formulaciones detergentes utilizadas en diferentes áreas tienen concentraciones diferentes de sus componentes relevantes presentes en el agua de lavado. Por ejemplo, un detergente europeo tiene por regla general aproximadamente 4500-5000 ppm de componentes detergentes en el agua de lavado, mientras que un detergente japonés tiene por regla general aproximadamente 667 ppm de componentes detergentes en el agua de lavado. En Norteamérica, particularmente en los Estados Unidos, un detergente tiene por lo general aproximadamente 975 ppm de componentes detergentes presentes en el agua de lavado.

Un sistema de baja concentración de detergente incluye detergentes en los cuales están presentes menos de aproximadamente 800 ppm de componentes detergentes en el agua de lavado. Los detergentes japoneses se consideran típicamente sistemas de baja concentración de detergente, dado que los mismos tienen aproximadamente 667 ppm de componentes detergentes presentes en el agua de lavado.

Una concentración media de detergente incluye detergentes en los cuales están presentes entre aproximadamente 800 ppm y aproximadamente 2000 ppm de componentes detergentes en el agua de lavado. Los detergentes de Norteamérica están considerados generalmente como sistemas de concentración media de detergente, dado que los mismos tienen aproximadamente 975 ppm de componentes detergentes presentes en el agua de lavado. Brasil tiene por regla general aproximadamente 1500 ppm de componentes detergentes presentes en el agua de lavado.

Un sistema de alta concentración de detergente incluye detergentes en los cuales están presentes más de aproximadamente 2000 ppm de componentes detergentes en el agua de lavado. Los detergentes europeos se consideran generalmente como sistemas de alta concentración de detergente, dado que los mismos tienen aproximadamente 4500-5000 ppm de componentes detergentes en el agua de lavado.

Los detergentes de Latinoamérica son generalmente detergentes mejoradores de fosfatos con altas jabonaduras, y la gama de detergentes utilizada en Latinoamérica puede caer tanto en las concentraciones de detergente media como alta, dado que los mismos están comprendidos entre 1500 ppm y 6000 ppm de componentes detergentes en el agua de lavado. Como se ha mencionado arriba, Brasil tiene como valor típico aproximadamente 1500 ppm de componentes detergentes presentes en el agua de lavado. Sin embargo, otras geografías de detergentes mejoradores de fosfato con altas jabonaduras, no limitadas a otros países de Latinoamérica, pueden tener sistemas de alta concentración de detergente hasta aproximadamente 6000 ppm de componentes detergentes presentes en el agua de lavado.

A la vista de lo que antecede, es evidente que las concentraciones de composiciones detergentes en las soluciones típicas de lavado (en todo el mundo) varían desde menos de aproximadamente 800 ppm de composición detergente ("geografías de baja concentración de detergente"), por ejemplo aproximadamente 667 ppm en Japón, hasta entre aproximadamente 800 ppm y aproximadamente 2000 ppm ("geografías de concentración media de detergente"), por ejemplo aproximadamente 975 ppm en U.S. y aproximadamente 1500 ppm en Brasil, hasta más de aproximadamente 2000 ppm ("geografías de alta concentración de detergente"), por ejemplo aproximadamente 4500 ppm a aproximadamente 5000 ppm en Europa y aproximadamente 6000 ppm en las geografías que emplean mejoradores de fosfato con altas jabonaduras.

Las concentraciones de las soluciones típicas de lavado se determinan empíricamente. Por ejemplo, en los EE.UU., una máquina lavadora típica contiene un volumen de aproximadamente 64,4 l de solución de lavado. De acuerdo con ello, para obtener una concentración de aproximadamente 975 ppm de detergente en la solución de lavado tienen que añadirse aproximadamente 62,79 g de composición detergente a los 64,4 l de solución de lavado. Esta cantidad es la cantidad típica medida en el agua de lavado por el usuario que utiliza la copa de medida provista con el detergente.

Como ejemplo adicional, diferentes geografías utilizan diferentes temperaturas de lavado. La temperatura del agua de lavado en Japón es típicamente menor que la utilizada en Europa.

La variante de proteasa de la invención que exhibe una eficiencia de lavado mejorada comparada con la proteasa precursora.

Las sustituciones se hacen preferiblemente en la subtilisina de *Bacillus lentus* (recombinante o de tipo nativo), aunque las sustituciones pueden hacerse en cualquier proteasa de *Bacillus*.

Sobre la base de los resultados de escrutinio obtenidos con las proteasas variantes, las mutaciones indicadas en la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* son importantes para la actividad proteolítica, la eficiencia y/o la estabilidad de estas enzimas y la eficiencia limpiadora o de lavado de tales enzimas variantes.

Muchas de las variantes de proteasa de la invención son útiles en la formulación de diversas composiciones detergentes de formulaciones para cuidado personal tales como champúes o lociones. Varios compuestos conocidos son agentes tensioactivos adecuados útiles en composiciones que comprenden los mutantes de proteasa de la invención. Estos incluyen detergentes no iónicos, aniónicos, catiónicos, o de ion dipolar, como se describe en los documentos U.S. 4.404.128 concedido a Barry J. Anderson y U.S. 4.261.868 concedido a Jirl Flora, et al. Una formulación detergente adecuada es la descrita en el Ejemplo 7 de la Patente U.S. 5.204.015. La técnica está familiarizada con las diferentes formulaciones que pueden utilizarse como composiciones de limpieza. Además de composiciones de limpieza típicas, se comprende fácilmente que las variantes de proteasa de la presente invención pueden utilizarse para cualquier propósito para el que se utilicen proteasas nativas o de tipo salvaje. Así, estas variantes pueden utilizarse, por ejemplo, en aplicaciones de jabón en barra o líquido, formulaciones para cuidado de vajillas, soluciones o productos para limpieza de lentes de contacto, hidrólisis de péptidos, tratamiento de residuos, aplicaciones textiles, como enzimas de fusión-escisión en la producción de proteínas, etc. Las variantes de la presente invención pueden comprender eficiencia mejorada en una composición detergente (en comparación con el precursor). Tal como se utiliza en esta memoria, la eficiencia mejorada en un detergente se define como el aumento de limpieza de ciertas manchas sensibles a enzimas tales como grasa o sangre, tal como se determina por evaluación visual después de un ciclo de lavado estándar.

Las proteasas de la invención pueden formularse en detergentes conocidos en polvo y líquidos que tienen pH comprendido entre 6,5 y 12,0 a niveles de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 5% (preferiblemente 0,1% a 0,5%) en peso. Estas composiciones detergentes de limpieza pueden incluir también otras enzimas tales como proteasas, amilasas, celulasas, lipasas o endoglicosidasas conocidas, así como mejoradores y estabilizadores.

La adición de las proteasas de la invención a composiciones de limpieza convencionales no crea ninguna limitación especial de uso. Dicho de otro modo, cualesquiera temperaturas y pH adecuados para el detergente son adecuados también para las presentes composiciones con tal que el pH esté dentro del intervalo arriba indicado, y la temperatura sea inferior a la temperatura descrita de desnaturalización de la proteasa. Adicionalmente, las proteasas de la invención pueden utilizarse en una composición de limpieza sin detergentes, sea nuevamente solas o en combinación con mejoradores y estabilizadores.

ES 2 241 180 T5

La presente invención se refiere también a composiciones de limpieza que contienen las variantes de proteasa de la invención. Las composiciones de limpieza pueden contener además aditivos que se utilizan comúnmente en composiciones de limpieza. Éstos pueden seleccionarse, pero sin carácter limitante, de blanqueantes, agentes tensioactivos, mejoradores, enzimas y catalizadores de blanqueo. Resultaría fácilmente evidente para una persona con experiencia ordinaria en la técnica qué aditivos son adecuados para inclusión en las composiciones. La lista proporcionada en esta memoria no es en modo alguno exhaustiva y debería tomarse solamente como ejemplos de aditivos adecuados. Será también inmediatamente evidente para una persona con experiencia ordinaria en la técnica utilizar sólo aquellos aditivos que son compatibles con las enzimas y otros componentes de la composición, por ejemplo, agentes tensioactivos.

Cuando está presente, la cantidad de aditivo presente en la composición de limpieza es de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 99,9%, con preferencia aproximadamente 1% a aproximadamente 95%, y de modo más preferible aproximadamente 1% a aproximadamente 80%.

Las proteasas variantes de la presente invención pueden incluirse en piensos para animales, tales como parte de aditivos para piensos animales como se describe, por ejemplo, en los documentos U.S. 5.612.055; U.S. 5.314.692; y U.S. 5.147.642.

Un aspecto de la invención es una composición para el tratamiento de un producto textil que incluye proteasas variantes de la presente invención. La composición puede utilizarse para tratar por ejemplo seda o lana como se describe en publicaciones tales como RD 216.034; EP 134.267; U.S. 4.533.359; y EP 344.259.

Lo que sigue se presenta a modo de ejemplo y no debe interpretarse como limitación del alcance de las reivindicaciones.

(Tabla pasa a página siguiente)

Ejemplo 1

Se produjeron y purificaron un gran número de variantes de proteasa utilizando métodos bien conocidos en la técnica. Todas las mutaciones se realizaron en subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*. Las variantes se muestran en la Tabla 3.

TABLA 3

N76D	S103A	V104I	M222S
N76D	A98E	S103A	V104I
N76D	S78T	S103A	V104I
N76D	S103A	V104I	I107V
V4E	N76D	S103A	V104I
N76D	S103A	V104I	I246V
N76D	N77D	S103A	V104I
N76D	S103A	V104I	N218I
A16T	N76D	S103A	V104I
A1E	N76D	S103A	V104I
N76D	S103A	V104I	N261D
N76D	S103A	V104I	S160T
N76D	S103A	V104I	S216C
H17Q	N76D	S103A	V104I
S37T	N76D	S103A	V104I
N76D	N77D	S103A	V104I
T38S	N76D	S103A	V104I

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q236R												
V68A	L75R	N76D	S103A	V104I	G159D	Q236H											
V68A	N76D	N76D	S103A	A114V	V121I	G159D	Q236H	Q245R									
Q12R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q236H											
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Y209S	Q236H	T253K										
V68A	N76D	S103A	V104I	N117K	G159D	N184S	Q236H										
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q236H	N243I											
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q236H	Q245L											
V68A	N76D	S103A	V104I	A142V	G159D												
V68A	N76D	S103A	V104I	N123S	G159D	Q236H	H249Y										
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q236H	H249Q											
N76D	S103A	V104I	M222S	Q245R													
N76D	S103A	V104I	Q12R	M222S	H249R												
N76D	S103A	V104I	N173R	M222S													
N76D	S103A	V104I	M222S	Y263F													
L21M	N76D	S103A	V104I	M222S	K237R	Y263F											
N76D	S103A	V104I	Q109R	M222S													
N76D	S103A	V104I	Q109R	M222S	E271D												
G61R	N76D	S103A	V104I	M222S													

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

N76D	S103A	V104I	Q137R	M222S															
N76D	S103A	V104I	Q109R	M222S	N248S														
N76D	S103A	V104I	M222S	H249R															
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q236H	Q245R	N261D												
V68A	N76D	S103A	V104I	S141N	G159D	Q236H	Q245R	T255S											
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q236H	Q245R	R247H												
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A174V	N204D	Q236H	Q245R											
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	N204D	Q236H	Q245R												
V68A	N76D	S103A	V104I	A133V	G159D	N218D	Q236H	Q245R											
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R												
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A194I	V203A	Q236H	Q245R											
Q12R	N76D	S103A	V104I	M222S	Q245R														
N76D	S103A	V104I	A232V	Q245R															
S24T	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R											
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N252K												
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A										
Q12R	N76D	S103A	I104T	M222S	V244I	Q245R													
Q12R	N76D	S103A	M222S	P210T	Q245R														
Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	M222S	Q245R													

T22K	V68A	N76D	S103A	V104I													
V68A	N76D	S103A	N184D														
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K									
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R											
V68A	S103A	V104I	N140D	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N252K									
N43S	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N252K									
N43K	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R										
N43D	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N252K									
V68A	S87G	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N252K	R275S								
Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	M222S	Q245R	N248S	L262M									
Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	A215V	M222S	Q245R										
Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	M222S	V227A	Q245R	L262S									
Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	A215T	M222S	Q245R										
Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	M222S	Q245R	N261D										
N76D	S103A	I104T	S130T	M222S	Q245R												
Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	N218D	M222S	Q245R	L262S	N269D								
Q12R	S57P	N76D	S103A	I104T	S130T	M222S	Q245R	K251Q									
Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	R170S	N185D	M222S	N243D	Q245R								
Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	M222S	Q245R	V268A										

39

V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	L257V	R275H					
N76D	S103A	V104I	L257V	R275H									
V68A	S103A	V104I	G159D	T224A	A232V	Q236H	Q245R	L257V					
N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	L257V						
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Y209W	A232V	Q236H	Q245R					
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	G211R	A232V	Q236H	Q245R					
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	G211V	A232V	Q236H	Q245R					
Q12R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Y214L	A232V	Q236H	Q245R				
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A215R	A232V	Q236H	Q245R					
Q12R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R					
G20R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	S259G				
V68A	S87R	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	T260V				
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N261G					
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N261W					
N76D	S103A	V104I	A232V	Q236H	S242P	Q245R							
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	P210L	A232V	Q236H	Q245R					
Q12R	A48V	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R				
N76D	S103A	V104I	A232V	Q236H	Q245R								
N76D	S103A	V104I	G159D	Y192F	A232V	Q236H	Q245R						

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

N76D	S103A	V104I	V147I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248S	K251R			
Q12R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	A272S			
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	N183K	Q206L	A232V	Q236H	Q245R			
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	S256R				
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q206R	A232V	Q236H	Q245R				
K27R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R				
V68A	N76D	S103A	V104I	N116T	G159D	R170S	N185S	A232V	Q236H	Q245R		
G61E	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
N43D	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	S212P	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	S99N	G159D	N184D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					
V68A	S103A	V104I	G159D	Y209W	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	Q109R	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
G20R	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	Y209F	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	N261D			
V68A	S103A	V104I	G159D	N185D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	P210R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			

V68A	S103A	V104I	G159D	P210T	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	P210S	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	N185D	P210L	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
V68A	S103A	V104I	G159D	P210L	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	S212A	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	S212E	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	T213E	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	T213S	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
V68A	A103V	V104I	G159D	T213E	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	T213G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	A215V	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	A215R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	S216T	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	S216V	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	S216C	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
G20A	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	N173D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			

V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	K251V	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	Q206R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252F				
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252L				
P55S	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252F			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	T255V			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	S256N			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	S256E			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	S256R			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	T260R			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	L257R			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	G258D			
I8V	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	N269D		
V68A	S103A	V104I	N116S	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	T260E		
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	N261R			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	N261D			
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					
S103A	V104I	G159D	A232S	Q236H	Q245R	N248D	N252K					

V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236R	Q245R	N248D	N252K				
N18S	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245V	N248D	N252K				
V68A	N76D	S101T	S103A	V104I	G159D	T213R	N218S	A232V	Q236H	Q245R	T260A	
V68A	S103A	V104I	G159D	A228V	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
T33S	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
V68A	N76D	E89D	S103A	V104I	G159D	P210L	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A	
G61E	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
S103A	V104I	G159D	V205I	P210I	A232V	Q236H	Q245R					
G61E	V68A	S103A	V104I	S130A	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
G61E	V68A	S103A	V104I	A133S	Q137R	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	
G61E	S103A	V104I	A133V	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248G	N252K				
V68A	S103A	V104I	G159D	N218S	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
G61E	V68A	S103A	V104I	G159D	S160V	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
S3L	G61E	V68A	N76D	S103A	V104I	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
G61E	V68A	S103A	V104I	G159D	S167F	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
G97E	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
A98D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				

S99E	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
S101E	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
S101G	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
G102A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
S103A	V104I	S106E	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
S103A	V104I	Q109E	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	N261R				
S103A	V104I	Q109R	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
N62D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
S103A	V104I	G159D	N184D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
S103A	V104I	G159D	S166D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
S103A	V104I	G159D	L217E	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
G20R	N62D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
N62D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	Q245R	N248D	N252K		
S103A	V104I	G159D	Q206R	L217E	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
N62D	S103A	V104I	G159D	Q206R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S103A	V104I	S130G	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
S103A	V104I	P131V	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
K27N	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				

T38G	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
T38A	N76D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A			
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A	E271G		
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Y209W	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A		
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	P210I	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A		
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	V205I	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A		
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	P210I	A232V	Q236H	Q245R	T260A			
V68A	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A				
N76D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A				
V68A	S103A	V104I	G159D	Y209W	A232V	Q236H	Q245R					
V68A	S103A	V104I	G159D	P210I	A232V	Q236H	Q245R					
V68A	S103A	V104I	G159D	A230V	A232V	Q236H	Q245R					
V68A	S103A	V104I	G159D	L126F	A232V	Q236H	Q245R					
V68A	S103A	V104I	G159D	V205I	A232V	Q236H	Q245R					
V68A	S103A	V104I	G159D	P210L	A232V	Q236H	Q245R					
S103A	V104I	G159D	A230V	Q236H	Q245R							
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	T260A					
S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R							
V68A	S103A	V104I	G159D	A174V	A232V	Q236H	Q245R	L257V				

47

S103A	V104I	G159D	V205I	P210I	A232V	Q236H	Q245R										
V68A	S103A	V104I	S128L	G159D	A232V	Q236H	Q245R										
A48V	S103A	V104I	G159D	A230V	Q236H	Q245R											
A48V	V68A	S103A	V104I	G159D	Y209W	A232V	Q236H	Q245R	Q245R								
A48V	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	Q245R	N248D	N252K							
A48V	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	Q245R	L257V	N261W							
G102A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	Q245R	N248D	N252K							
Q12R	G102A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	Q245R	N248D	N252K						
S101G	G102A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	Q245R	N248D	N252K						
A98L	G102A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	Q245R	N248D	N252K						
G102A	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	Q245R	N248D	N252K							
S103A	V104I	P131V	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K									
S103A	V104I	G159D	N184S	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K									
S103A	V104I	G159D	N184G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K									
S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	V244T	Q245R	N248D	N252K									
S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	V244A	Q245R	N248D	N252K									
N62D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	Q245R	N248D	N252K							
Q12R	N62D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	Q245R	N248D	N252K						
S101G	S103A	V104I	G159D	N185D	A232V	Q236H	Q245R	Q245R	N248D	N252K							

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

S101G	S103A	V104I	G159D	Q206E	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S101G	S103A	V104I	G159D	T213Q	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
A98L	G102A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S101G	G102A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
A98L	G102A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
A98L	G102A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	N248D	N252K			
N62D	S103A	V104I	Q109R	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
N62D	S103A	V104I	G159D	S212G	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
N62D	S101G	S103A	V104I	G159D	S212G	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	
S103A	V104I	G159D	A232V	Q245R	N248D	N252K						
S103A	V104I	G159D	A230V	Q245R								
N62D	S103A	V104I	S130G	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
S101G	S103A	V104I	S130G	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S101G	S103A	V104I	S128G	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S101G	S103A	V104I	S128L	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
N62D	S101G	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
N62D	S103A	V104I	S128G	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
N62D	S103A	V104I	S128L	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
S101G	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	T260A			

S101G	S103A	V104I	P131V	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
A98V	S101G	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S99G	S101G	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S101G	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S101G	S103A	V104I	G159D	Y209W	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S101G	S103A	V104I	G159D	P210I	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S101G	S103A	V104I	G159D	V205I	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S101G	S103A	V104I	G159D	A230V	Q236H	Q245R						
S101G	S103A	V104I	G159D	A194P	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
N76D	S101G	S103A	V104I	G159D	A194P	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
S101G	S103A	V104I	G159D	A230V	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
N62D	S103A	V104I	G159D	N185D	Q206E	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	E271Q

Ejemplo 2

Un gran número de las variantes de proteasas producidas en el Ejemplo 1 se ensayaron respecto a eficiencia en dos tipos de detergente y condiciones de lavado utilizando un ensayo de micromuestras descrito en "An improved method of assaying for a preferred enzyme and/or preferred detergent composition", documento U.S. No. de Serie 60/068.796.

La Tabla 4 enumera las proteasas variantes ensayadas y los resultados de los ensayos en dos detergentes diferentes. Para la columna A, el detergente era 0,67 g/l de Ariel Ultra filtrado (Procter & Gamble, Cincinnati, OH, EE.UU.), en una solución que contenía 51,4 mg/l de dureza mixta $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, y se utilizaron 0,3 ppm de enzima en cada pocillo a 20°C. Para la columna B, el detergente era 3,38 g/l de Ariel Futur filtrado (Procter & Gamble, Cincinnati, OH, EE.UU.), en una solución que contenía 256,8 mg/l de dureza mixta $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, y se utilizaron 0,3 ppm de enzima en cada pocillo a 40°C.

												A	B
N76D	S103A	V104I										1	1
S103A	V104I	A228T										0.56	1.11
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N252K					1.41	1.85
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D N252K					2.77	1.20
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R						2.26	1.67
V68A	S103A	V104I	N140D	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N252K				2.96	1.42
N43S	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N252K				1.91	1.80
N43K	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R					2.05	1.78
N43D	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N252K				2.00	1.34
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	L257V					2.38	1.67
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D					2.83	0.53
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	K237E	Q245R					2.87	0.20
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N252S					2.56	1.41
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	L257V R275H					3.97	0.47
V68A	S103A	V104I	G159D	T224A	A232V	Q236H	Q245R	L257V				3.35	1.28
G61E	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D N252K				3.77	0.09
N43D	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D N252K				3.50	0.47
V68A	S103A	V104I	G159D	S212P	A232V	Q236H	Q245R	N248D N252K				2.81	1.46

[illegible]

53

N76D	S103A	V104I	Q206R							0.33	1.02
N76D	S103A	V104I	S212P	G258R						0.38	1.08
T58S	N76D	S103A	V104I	E271G						0.84	1.26
N76D	S103A	V104I	Q206E	N261D						1.97	0.04
V4E	N76D	S103A	V104I	Q206E						1.51	0.05
N76D	N77D	S103A	V104I	Q206E						1.40	0.04
N76D	S103A	V104I	A158E							1.95	0.16
N76D	S103A	V104I	Q206E							2.41	0.88
N76D	N77D	S103A	V104I	A133T	N185D	K251T				1.34	0.03
N76D	S103A	V104I	Q206E	N261D						1.78	0.04
N76D	S103A	V104I	G159D	Q206E	V244A					2.16	0.04
V4E	N76D	S103A	V104I	S188E						1.91	0.04
V4E	N76D	S103A	V104I	A158E						2.06	0.04
N76D	S103A	V104I	Q206E	K251T						1.73	0.06
A48T	N76D	S103A	V104I	L111M	G159D					2.04	0.16
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q236H					3.20	0.09
L42V	N76D	S103A	V104I	G159D						1.83	0.17
Q12H	N62H	N76D	S103A	V104I	G159D					1.42	0.14
L42I	N76D	S103A	V104I	G159D						1.86	0.18
N76D	S103A	V104I	G146S	G159D						1.87	0.19

N76D	S103A	V104I	G159D	N238S								1.90	0.15
N76D	S103A	V104I	G159D	T224A								1.61	0.07
N76D	S103A	V104I	S212P	V268F	E271V							0.44	1.42
N76D	S87R	S103A	V104I	S212P	E271V							0.39	2.03
N76D	S103A	V104I	S212P	Q245L	E271V							0.62	1.79
N76D	S103A	V104I	Q109R	Q245R								0.11	1.78
N76D	S103A	V104I	Q109R	P210L								0.12	1.21
G20V	N62S	N76D	S103A	V104I								1.63	0.78
V68A	N76D	S103A	V104I	Q236H								2.37	0.44
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q236H	E271V						2.97	0.45
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q236H	Q245R						3.00	0.61
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	L217I	Q236H	E271V					2.71	0.12
H17Q	V68A	N76D	S103A	V104I								2.46	0.38
V68A	N76D	S103A	V104I									2.46	0.61
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q236R							3.31	0.11
V68A	L75R	N76D	S103A	V104I	G159D	Q236H						3.06	0.14
V68A	N76D	S103A	V104I	A114V	V121I	G159D	Q236H	Q245R				3.11	0.40
Q12R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q236H						3.12	0.34
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Y209S	Q236H	T253K					3.18	0.03
V68A	N76D	S103A	V104I	N117K	G159D	N184S	Q236H					2.78	0.06

V68A	N76D	S103A	V104I	Q236H								2.49	0.57
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q236H	Q245L						3.37	0.03
V68A	N76D	S103A	V104I	N123S	G159D	Q236H	H249Y					3.11	0.03
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q236H	H249Q						3.15	0.04
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q236H	Q245R	N261D					3.31	0.03
V68A	N76D	S103A	V104I	S141N	G159D	Q236H	Q245R	T255S				3.26	0.62
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q236H	Q245R	R247H					2.78	0.03
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A174V	N204D	Q236H	Q245R				3.28	0.02
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	N204D	Q236H	Q245R					3.34	0.02
V68A	N76D	S103A	V104I	A133V	G159D	N218D	Q236H	Q245R				3.28	0.03
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R					2.91	0.58
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A194I	V203A	Q236H	Q245R				2.86	0.13
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A			1.30	1.73
T22K	V68A	N76D	S103A	V104I								1.83	1.13
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	P210R	A232V	Q236H	Q245R				1.28	1.54
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	L257V				3.72	0.8
N76D	S103A	V104I	A232V	Q236H	Q245R	L257V						0.6	1.5
N76D	S103A	V104I	L257V	R275H								1.91	0.15
N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	L257V					1.92	1.09
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Y209W	A232V	Q236H	Q245R				3.57	0.99

V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	G211R	A232V	Q236H	Q245R			1.74	1.76
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	G211V	A232V	Q236H	Q245R			3.15	1.06
Q12R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Y214L	A232V	Q236H	Q245R		2.33	1.92
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A215R	A232V	Q236H	Q245R			1.67	1.45
Q12R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R			2.16	1.72
G20R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	S259G		2.77	1.59
V68A	N76D	S87R	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	T260V		2.62	1.49
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N261G			2.92	0.68
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N261W			2.17	1.37
N76D	S103A	V104I	A232V	Q236H	S242P	Q245R					0.48	1.2
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	P210L	A232V	Q236H	Q245R			2.92	0.76
Q12R	A48V	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R		2.09	1.86
N76D	S103A	V104I	A232V	Q236H	Q245R						0.51	1.44
N76D	S103A	V104I	G159D	Y192F	A232V	Q236H	Q245R				1.60	1.14
N76D	S103A	V104I	V147I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248S	K251R		1.35	1.29
Q12R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	A272S		1.92	1.81
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	N183K	Q206L	A232V	Q236H	Q245R		1.17	1.53
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	S256R			2.01	1.72
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q206R	A232V	Q236H	Q245R			2.09	1.62
K27R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R			3.00	1.08

V68A	N76D	S103A	V104I	N116T	G159D	R170S	N185S	A232V	Q236H	Q245R	ND	ND
N76D	S103A	V104I	M222S	Q245R							1.01	1.23
Q12R	N76D	S103A	V104I	M222S	H249R						0.57	1.65
N76D	S103A	V104I	N173R	M222S							0.86	0.46
N76D	S103A	V104I	M222S	Y263F							1.24	0.77
L21M	N76D	S103A	V104I	M222S	K237R	Y263F					1.18	0.76
N76D	S103A	V104I	Q109R	M222S							0.52	1.16
N76D	S103A	V104I	Q109R	M222S	E271D						0.56	1.12
G61R	N76D	S103A	V104I	M222S							0.43	0.96
N76D	S103A	V104I	Q137R	M222S							0.42	1.25
N76D	S103A	V104I	M222S	H249R							1.15	1.01
Q12R	N76D	S103A	V104I	M222S	Q245R						0.53	1.46
N76D	S103A	V104I	A232V	Q245R							0.69	1.56
Q12R	N76D	S103A	I104T	M222S	V244I	Q245R					0.66	1.74
Q12R	N76D	S103A	V104I	M222S	P210T	Q245R					0.52	1.56
Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	M222S	Q245R					0.70	1.61
Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	A215V	M222S	Q245R				0.79	1.85
Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	M222S	V227A	Q245R	L262S			0.78	1.56
Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	M222S	Q245R	N261D				1.25	1.30
N76D	S103A	I104T	S130T	M222S	Q245R						1.29	1.30

5	Q12R	S57P	N76D	S103A	I104T	S130T	M222S	Q245R	K251Q			1.44	0.16
10	Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	R170S	N185D	M222S	N243D	Q245R		2.01	0.04
15	Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	M222S	Q245R	V268A				0.77	1.60
20	Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	M222S	P210S	Q245R				0.73	1.66
25	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R				2.09	0.86

Ejemplo 3

La Tabla 5 enumera las proteasas variantes ensayadas del Ejemplo 1 y los resultados de los ensayos en cuatro detergentes diferentes. Se realizaron los mismos ensayos de eficiencia que en el Ejemplo 2 sobre las proteasas variantes indicadas con los detergentes siguientes. Para la columna A, el detergente era 0,67 g/l de Ariel Ultra filtrado (Procter & Gamble, Cincinnati, OH, EE.UU.), en una solución que contenía 51,4 mg/l de dureza mixta $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, y se utilizaron 0,3 ppm de enzimas en cada pocillo a 20°C. Para la columna B, el detergente era 3,38 g/l de Ariel Futur filtrado (Procter & Gamble, Cincinnati, OH, EE.UU.), en una solución que contenía 256,8 mg/l de dureza mixta $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, y se utilizaron 0,3 ppm de enzima en cada pocillo a 40°C. Para la columna C, se utilizaron 3,5 g/l de detergente HSP1 (Procter & Gamble, Cincinnati, OH, EE.UU.), en una solución que contenía 137,0 mg/l de dureza mixta $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, y 0,3 ppm de enzima en cada pocillo a 20°C. Para la columna D, se utilizaron 1,5 ml/l de detergente Tide KT (Procter & Gamble, Cincinnati, OH, EE.UU.), en una solución que contenía 51,4 mg/l de dureza mixta $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, y 0,3 ppm de enzima en cada pocillo a 20°C.

													A	B	C	D
N78D	S103A	V104I											1	1	1	1
S103A	V104I	G159D	AZ32V	Q236H	Q245R	N248D	N252K						1.44	1.41	1.39	1.26
V68A	S103A	V104I	G159D	Y209W	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				2.34	1.49	1.65	2.35
V68A	S103A	V104I	Q109R	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				1.05	1.41	1.20	1.19
G20R	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				1.81	1.72	1.66	1.31
V68A	S103A	V104I	G159D	Y209F	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				2.19	1.38	1.60	2.02
V68A	S103A	V104I	G159D	N185D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				2.91	0.91	1.48	2.70
V68A	S103A	V104I	G159D	P210R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				0.93	1.39	1.23	0.80
V68A	S103A	V104I	G159D	N185D	P210L	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	N252K		2.67	0.86	1.41	2.68
V68A	S103A	V104I	G159D	P210L	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				2.22	1.43	1.55	1.78
V68A	S103A	V104I	G159D	S212C	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				2.30	1.43	1.63	2.07
V68A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				2.31	1.47	1.62	2.01
V68A	S103A	V104I	G159D	S212E	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				2.63	0.56	1.36	2.66
V68A	S103A	V104I	G159D	T213E	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				2.75	0.50	1.27	2.78
V68A	S103A	V104I	T213S	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					1.11	1.38	1.31	0.75
V68A	A103V	V104I	G159D	T213E	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				2.27	0.15	1.12	2.01
V68A	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				1.37	1.42	1.37	1.06
V68A	S103A	V104I	G159D	A215V	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				2.14	1.40	1.53	1.54

V68A	S103A	V104I	G159D	A215R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					1.22	1.56	1.47	1.20
V68A	S103A	V104I	G159D	S216T	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					2.12	1.36	1.56	1.56
V68A	S103A	V104I	G159D	S216V	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					1.88	1.36	1.47	1.87
V68A	S103A	V104I	G159D	S216C	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					2.24	0.33	1.07	2.89
V68A	S103A	V104I	G159D	N173D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					2.43	0.46	1.29	2.42
V68A	S103A	V104I	G159D	Q206R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					0.98	1.46	1.24	0.95
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252F						2.52	1.00	1.42	2.42
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252L						2.05	1.13	1.30	1.85
P55S	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252F					2.61	0.91	1.43	3.22
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	T255V					2.18	1.36	1.58	1.72
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	S250N					2.14	1.46	1.59	1.65
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	S256E					2.46	0.77	1.33	2.58
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	S256R					1.31	1.52	1.46	0.94
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	T260R					1.21	1.41	1.31	1.05
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	L257R					1.51	1.41	0.65	1.18
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	G258D					2.56	0.59	1.30	2.64
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	N261R					1.02	1.47	1.37	0.84
V68A	S103A	V104I	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K							1.04	1.50	1.32	0.73
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K						2.60	0.93	1.41	2.67
V68A	S103A	V104I	G159D	A228V	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					2.31	1.38	1.53	1.57
G51E	V68A	S103A	V104I	S130A	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D					2.83	0.25	1.33	2.44

G81E	S103A	V104I	A133V	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					2.10	0.97	1.30	2.29
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248G	N252K						1.37	1.54	0.89	1.27
V68A	S103A	V104I	G159D	N218S	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					2.30	1.50	1.62	1.56
G20R	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					1.72	1.72	1.67	1.15
V68A	N76D	E89D	S103A	V104I	G159D	P210L	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A			1.32	1.30	1.11	1.28
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					2.50	0.83	1.43	2.25
G81E	V68A	S103A	V104I	G159D	S160V	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				4.20	0.07	ND	1.28
S3L	G61E	V68A	N76D	S103A	V104I	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				3.47	0.60	ND	1.45
G61E	V68A	S103A	V104I	G159D	Y167F	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				4.32	0.79	ND	1.55
G97E	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K						3.14	0.41	ND	1.40
A98D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K						2.71	0.68	ND	1.72
S99E	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K						2.97	0.68	ND	1.71
S101E	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K						3.50	0.27	ND	1.90
S101G	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K						2.24	1.60	ND	1.33
G102A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K						3.35	1.33	ND	1.69
S103A	V104I	S108E	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K						4.88	0.55	ND	2.71
S103A	V104I	Q109E	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K						4.22	1.05	ND	2.40
S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	N281R						5.45	2.19	ND	2.58
S103A	V104I	Q109R	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K						3.76	2.16	ND	1.82
N82D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K						7.42	0.13	ND	2.46
S103A	V104I	G159D	N184D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K						5.43	1.36	ND	2.84

S103A	V104I	G159D	S166D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				5.12	1.21	ND	3.97
S103A	V104I	G159D	L217E	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				6.38	0.95	ND	3.09
G20R	N62D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		3.17	2.63	ND	2.60
N62D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			4.38	1.92	ND	2.54
S103A	V104I	G159D	Q206R	L217E	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			3.05	2.61	ND	1.10
N62D	S103A	V104I	G159D	Q208R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			4.09	2.46	ND	2.55
S103A	V104I	G159D	N184G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				2.32	2.08	ND	2.40
S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	V244T	Q245R	N248D	N252K				2.34	2.04	ND	1.86
S103A	V104I	G159D	A232V	Q238H	V244A	Q245R	N248D	N252K				2.24	2.11	ND	1.95
K27N	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				2.81	1.56	ND	2.47
T38G	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				2.30	2.09	ND	1.82
N62D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	S256R		2.63	2.66	ND	1.44
Q12R	N62D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		2.01	2.76	ND	1.99
N62D	S103A	V104I	G159D	N185D	Q206E	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	7.74	0.94	ND	5.39
S101G	S103A	V104I	G159D	N185D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			5.14	1.41	ND	1.92
S101G	S103A	V104I	G159D	Q206E	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			4.97	0.57	ND	1.36
S101G	S103A	V104I	G159D	T213Q	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			2.41	1.86	ND	1.01
A98L	G102A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			4.42	0.50	ND	2.88
S101G	G102A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			5.88	1.20	ND	3.84
G102A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			5.87	2.10	ND	3.19
Q12R	G102A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		2.98	2.67	ND	2.17

A98L	G102A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			4.02	0.41	ND	2.25
S101G	G102A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			6.63	2.07	ND	2.08
G102A	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				2.03	2.48	ND	2.25
N62D	S103A	V104I	Q109R	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			2.96	2.76	ND	2.34
S103A	V104I	G159D	A232V	Q245R	N248D	N252K							2.74	2.10	ND	1.86
S103A	V104I	G159D	A230V	Q245R									2.11	2.35	ND	1.49
N62D	S103A	V104I	S130G	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			3.42	0.71	ND	2.58
S101G	S103A	V104I	S130G	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				2.59	1.32	ND	1.61
S101G	S103A	V104I	S128G	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				1.30	1.23	ND	9.0
S101G	S103A	V104I	S128L	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				2.94	0.71	ND	1.08
N62D	S101G	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			3.17	0.83	ND	2.35
N62D	S103A	V104I	S128G	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			2.15	1.38	ND	1.77
N62D	S103A	V104I	S128L	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			3.07	0.07	ND	1.45
S101G	S103A	V104I	P131V	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				2.26	1.16	ND	3.05
A98V	S101G	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				1.82	1.34	ND	1.08
S99G	S101G	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				2.16	1.47	ND	1.20
S101G	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				1.79	1.38	ND	1.01
S101G	S103A	V104I	G159D	Y209W	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				1.15	1.18	ND	8.7
S101G	S103A	V104I	G159D	P210I	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				1.47	1.23	ND	1.03
S101G	S103A	V104I	G159D	V205I	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				1.90	1.38	ND	1.05
S101G	S103A	V104I	G159D	A230V	Q236H	Q245R							1.55	1.51	ND	1.23
S101G	S103A	V104I	G159D	A194P	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				1.96	1.30	ND	1.10
N76D	S101G	S103A	V104I	G159D	A194P	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			2.49	0.80	ND	1.25

REIVINDICACIONES

1. Una variante de proteasa que comprende una sustitución de aminoácido relativa a una proteasa precursora en una posición de residuo correspondiente a la posición 103 y una sustitución de aminoácido relativa a la proteasa precursora en una posición de residuo correspondiente a la posición 245 de la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* y una o más sustituciones de aminoácidos relativas a la proteasa precursora en posiciones de residuos seleccionadas del grupo que consiste en las posiciones de residuos correspondientes a las posiciones 1, 12, 61, 62, 68, 76, 97, 98, 101, 102, 104, 109, 130, 131, 159, 170, 183, 185, 205, 209, 210, 211, 212, 213, 215, 217, 222, 230, 232, 248, 252, 257, 260, 261, 270 y 275 de la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*, gracias a lo cual la variante de proteasa tiene una eficiencia de lavado mejorada comparada con la proteasa precursora.

2. Una variante de proteasa que comprende una sustitución de aminoácido relativa a una proteasa precursora en una posición de residuo correspondiente a la posición 103 y una sustitución de aminoácido relativa a la proteasa precursora en una posición de residuo correspondiente a la posición 236 y una sustitución de aminoácido relativa a la proteasa precursora en una posición de residuo correspondiente a la posición 245 de la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* y una o más sustituciones de aminoácidos relativas a la proteasa precursora en posiciones de residuos seleccionadas del grupo que consiste en las posiciones de residuos correspondientes a las posiciones 1, 12, 61, 62, 68, 76, 97, 98, 101, 102, 104, 109, 130, 131, 159, 183, 185, 205, 209, 210, 211, 212, 213, 215, 217, 230, 232, 243, 248, 252, 257, 260, 270 y 275 de la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*, gracias a lo cual la variante de proteasa tiene una eficiencia de lavado mejorada comparada con la proteasa precursora.

3. La variante de proteasa de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que la proteasa precursora es una subtilisina de *Bacillus*.

4. La variante de proteasa de acuerdo con la reivindicación 3, en la que la proteasa precursora es una subtilisina de *Bacillus lentus*.

5. Un DNA que codifica una variante de proteasa de la reivindicación 1 o la reivindicación 2.

6. Un vector de expresión que codifica el DNA de la reivindicación 5.

7. Una célula hospedadora transformada con el vector de expresión de la reivindicación 6.

8. Una composición de limpieza que comprende la variante de proteasa de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2.

9. Una comida para animales que comprende la variante de proteasa de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2.

10. Una composición para el tratamiento de un producto textil que comprende la variante de proteasa de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2.

11. La variante de proteasa de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende una serie de sustituciones relativas a la proteasa precursora seleccionadas del grupo que consiste en las siguientes series de posiciones de residuos de la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*:

68/103/104/159/232/236/245/252;

68/103/104/159/232/236/245/248/252;

68/103/104/159/232/236/245;

68/103/104/140/159/232/236/245/252;

43/68/103/104/159/232/236/245/252;

43/68/103/104/159/232/236/245;

68/103/104/159/232/236/245/257;

68/103/104/159/232/236/245/248;

68/103/104/159/232/236/237/245;

68/103/104/159/232/236/245/252;

68/103/104/159/232/236/245/257/275;

ES 2 241 180 T5

68/103/104/159/224/232/236/245/257;
61/68/103/104/159/232/236/245/248/252;
5 43/68/103/104/159/232/236/245/248/252;
68/103/104/159/212/232/236/245/248/252;
76/103/104/212/245/271;
10 76/103/104/109/245;
68/76/103/104/159/236/245;
68/76/103/104/159/236/245/261;
15 68/76/103/104/141/159/236/245/255;
68/76/103/104/159/236/245/247;
20 68/76/103/104/159/174/204/236/245;
68/76/103/104/159/204/236/245;
25 68/76/103/104/133/159/218/236/245;
68/76/103/104/159/232/236/245;
68/76/103/104/159/194/203/236/245;
30 68/76/103/104/159/213/232/236/245/260;
68/76/103/104/159/232/236/245/257;
35 76/103/104/232/236/245/257;
76/103/104/159/232/236/245/257;
68/76/103/104/159/209/232/236/245;
40 68/76/103/104/159/211/232/236/245;
68/76/103/104/159/211 /232/236/245;
45 12/68/76/103/104/159/214/232/236/245;
68/76/103/104/159/215/232/236/245;
12/68/76/103/104/159/232/236/245;
50 20/68/76/103/104/159/232/236/245/259;
68/76/87/103/104/159/232/236/245/260;
55 68/76/103/104/159/232/236/245/261;
68/76/103/104/159/232/236/245/261;
76/103/104/232/236/242/245;
60 68/76/103/104/159/210/232/236/245;
12/48/68/76/103/104/159/232/236/245;
65 76/103/104/232/236/245;
76/103/104/159/192/232/236/245;

ES 2 241 180 T5

76/103/104/147/159/232/236/245/248/251;
12/68/76/103/104/159/232/236/245/272;
5 68/76/103/104/159/183/206/232/236/245;
68/76/103/104/159/232/236/245/256;
68/76/103/104/159/206/232/236/245;
10 27/68/76/103/104/159/232/236/245;
68/76/103/104/116/159/170/185/232/236/245;
15 76/103/104/222/245;
12/76/103/104/222/245;
76/103/104/222/245;
20 12/76/103/104/222/245;
76/103/104/232/245;
25 12/76/103/104/222/244/245;
12/76/103/104/130/222/245;
12/76/103/104/130/215/222/245;
30 12/76/103/104/130/222/227/245/262;
12/76/103/104/130/222/245/261;
35 76/103/104/130/222/245;
12/57/76/103/104/130/222/245/251;
12/76/103/104/130/170/185/222/243/245;
40 12/76/103/104/130/222/245/268;
12/76/103/104/130/222/210/245;
45 103/104/159/232/236/245/248/252;
68/103/104/159/209/232/236/245/248/252;
68/103/104/109/159/232/236/245/248/252;
50 68/103/104/159/209/232/236/245/248/252;
68/103/104/159/185/232/236/245/248/252;
55 68/103/104/159/210/232/236/245/248/252;
68/103/104/159/185/210/232/236/245/248/252;
68/103/104/159/210/232/236/245/248/252;
60 68/103/104/159/212/232/236/245/248/252;
68/103/104/159/212/232/236/245/248/252;
65 68/103/104/159/212/232/236/245/248/252;
68/103/104/159/213/232/236/245/248/252;

ES 2 241 180 T5

68/103/104/213/232/236/245/248/252;
68/A 103V/104/159/213/232/236/245/248/252;
5 68/103/104/159/213/232/236/245/248/252;
68/103/104/159/215/232/236/245/248/252;
68/103/104/159/215/232/236/245/248/252;
10 68/103/104/159/216/232/236/245/248/252;
68/103/104/159/216/232/236/245/248/252;
15 68/103/104/159/216/232/236/245/248/252;
68/103/104/159/173/232/236/245/248/252;
68/103/104/159/206/232/236/245/248/252;
20 68/103/104/159/232/236/245/248/252;
55/68/103/104/159/232/236/245/248/252;
25 68/103/104/159/232/236/245/248/252/255;
68/103/104/159/232/236/245/248/252/256;
68/103/104/159/232/236/245/248/252/256;
30 68/103/104/159/232/236/245/248/252/260;
68/103/104/159/232/236/245/248/252/257;
35 68/103/104/159/232/236/245/248/252/258;
68/103/104/159/232/236/245/248/252/261;
68/103/104/232/236/245/248/252;
40 68/103/104/159/232/236/245/248/252;
68/103/104/159/228/232/236/245/248/252;
45 61/68/103/104/130/159/232/236/245/248/252;
61/103/104/133/159/232/236/245/248/252;
68/103/104/159/232/236/245/248/252;
50 68/103/104/159/218/232/236/245/248/252;
20/68/103/104/159/232/236/245/248/252;
55 68/76/89/103/104/159/210/213/232/236/245/260;
68/76/103/104/159/232/236/245/248/252;
61/68/103/104/159/160/232/236/245/248/252;
60 3/61/68/76/103/104/232/236/245/248/252;
61/68/103/104/159/167/232/236/245/248/252;
65 97/103/104/159/232/236/245/248/252;
98/103/104/159/232/236/245/248/252;

ES 2 241 180 T5

99/103/104/159/232/236/245/248/252;
101/103/104/159/232/236/245/248/252;
5 102/103/104/159/232/236/245/248/252;
103/104/106/159/232/236/245/248/252;
103/104/109/159/232/236/245/248/252;
10 103/104/159/232/236/245/248/252/261;
103/104/109/159/232/236/245/248/252;
15 62/103/104/159/232/236/245/248/252;
103/104/159/184/232/236/245/248/252;
103/104/159/166/232/236/245/248/252;
20 103/104/159/217/232/236/245/248/252;
20/62/103/104/159/213/232/236/245/248/252;
25 62/103/104/159/213/232/236/245/248/252;
103/104/159/206/217/232/236/245/248/252;
62/103/104/159/206/232/236/245/248/252;
30 103/104/159/184/232/236/245/248/252;
103/104/159/232/236/244/245/248/252;
35 103/104/159/232/236/244/245/248/252;
27/103/104/159/232/236/245/248/252;
38/103/104/159/232/236/245/248/252;
40 62/103/104/159/213/232/236/245/248/252/256;
12/62/103/104/159/213/232/236/245/248/252;
45 62/103/104/159/185/206/213/232/236/245/248/252/271;
101 /103/104/159/185/232/236/245/248/252;
101/103/104/159/206/232/236/245/248/252;
50 101/103/104/159/213/232/236/245/248/252;
98/102/103/104/159/232/236/245/248/252;
55 101/102/103/104/159/232/236/245/248/252;
102/103/104/159/212/232/236/245/248/252;
12/102/103/104/159/212/232/236/245/248/252;
60 98/102/103/104/159/212/232/236/245/248/252;
101/102/103/104/159/212/232/236/245/248/252;
65 102/103/104/159/213/232/236/245/248/252;
62/103/104/109/159/213/232/236/245/248/252;

ES 2 241 180 T5

103/104/159/232/245/248/252;

103/104/159/230/245;

5 62/103/104/13G/159/213/232/236/245/248/252;

101/103/104/13G/159/232/236/245/248/252;

101 /103/104/128/159/232/236/245/248/252;

10 101/103/104/128/159/232/236/245/248/252;

62/101/103/104/159/213/232/236/245/248/252;

15 62/103/104/128/159/213/232/236/245/248/252;

101/103/104/131/159/232/236/245/248/252;

98/101 /103/104/159/232/236/245/248/252;

20 99/101/103/104/159/232/236/245/248/252;

101/103/104/159/212/232/236/245/248/252;

25 101/103/104/159/209/232/236/245/248/252;

101/103/104/159/210/232/236/245/248/252;

101/103/104/159/205/232/236/245/248/252;

30 101/103/104/159/230/236/245;

101/103/104/159/194/232/236/245/248/252; y

35 76/101/103/104/159/194/232/236/245/248/252.

12. La variante de proteasa de acuerdo con la reivindicación 11, que comprende una serie de sustituciones relativas a la proteasa precursora seleccionadas del grupo que consiste en las siguientes series de posiciones de residuos de subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*:

V68A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N252K;

V68A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;

45 V68A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R;

V68A/S103A/V104I/N140D/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N252K;

50 N43S/V68A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N252K;

N43K/V68A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R;

N43D/V68A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N252K;

55 V68A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/L257V;

V68A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D;

60 V68A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/K237E/Q245R;

V68A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N252S;

V68A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/L257V/R275H;

65 V68A/S103A/V104I/G159D/T224A/A232V/Q236H/Q245R/L257V;

G61E/V68A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;

ES 2 241 180 T5

N43D/V68A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
V68A/S103A/V104I/G159D/S212P/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
5 N76D/S103A/V104I/S212P/Q245L/E271V;
N76D/S103A/V104I/Q109R/Q245R;
V68A/N76D/S103A/V104I/G159D/Q236H/Q245R;
10 V68A/N76D/S103A/V104I/A114V/V121I/G159D/Q236H/Q245R;
V68A/N76D/S103A/V104I/G159D/Q236H/Q245L;
15 V68A/N76D/S103A/V104I/G159D/Q236H/Q245R/N261D;
V68A/N76D/S103A/V104I/S141N/G159D/Q236H/Q245R/T255S;
V68A/N76D/S103A/V104I/G159D/Q236H/Q245R/R247H;
20 V68A/N76D/S103A/V104I/G159D/A174V/N204D/Q236H/Q245R;
V68A/N76D/S103A/V104I/G159D/N204D/Q236H/Q245R;
25 V68A/N76D/S103A/V104I/A133V/G159D/N218D/Q236H/Q245R;
V68A/N76D/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R;
V68A/N76D/S103A/V104I/G159D/A194I/V203A/Q236H/Q245R
30 V68A/N76D/S103A/V104I/G159D/T213R/A232V/Q236H/Q245R/T260A;
V68A/N76D/S103A/V104I/G159D/P210R/A232V/Q236H/Q245R;
35 V68A/N76D/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/L257V;
N76D/S103A/V104I/A232V/Q236H/Q245R/L257V;
N76D/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/L257V;
40 V68A/N76D/S103A/V104I/G159D/Y209W/A232V/Q236H/Q245R;
V68A/N76D/S103A/V104I/G159D/G211R/A232V/Q236H/Q245R;
45 V68A/N76D/S103A/V104I/G159D/G211V/A232V/Q236H/Q245R;
Q12R/V68A/N76D/S103A/V104I/G159D/Y214L/A232V/Q236H/Q245R;
V68A/N76D/S103A/V104I/G159D/A215R/A232V/Q236H/Q245R;
50 Q12R/V68A/N76D/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R;
G20R/V68A/N76D/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/S259G;
55 V68A/N76D/S87R/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/T260V;
V68A/N76D/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N261G;
V68A/N76D/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N261W;
60 N76D/S103A/V104I/A232V/Q236H/S242P/Q245R;
V68A/N76D/S103A/V104I/G159D/P210L/A232V/Q236H/Q245R;
65 Q12R/A48V/V68A/N76D/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R;
N76D/S103A/V104I/A232V/Q236H/Q245R;

ES 2 241 180 T5

N76D/S103A/V104I/G159D/Y192F/A232V/Q236H/Q245R;
N76D/S103A/V104I/V147I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248S/K251R;
5 Q12R/V68A/N76D/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/A272S;
V68A/N76D/S103A/V104I/G159D/N183K/Q206L/A232V/Q236H/Q245R;
V68A/N76D/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/S256R;
10 V68A/N76D/S103A/V104I/G159D/Q206R/A232V/Q236H/Q245R;
K27R/V68A/N76D/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R;
15 V68A/N76D/S103A/V104I/N116T/G159D/R170S/N185S/A232V/Q236H/Q245R;
N76D/S103A/V104I/M222S/Q245R;
Q12R/N76D/S103A/V104I/M222S/H245R;
20 N76D/S103A/V104I/M222S/H245R;
Q12R/N76D/S103A/V104I/M222S/Q245R;
25 N76D/S103A/V104I/A232V/Q245R;
Q12R/N76D/S103A/I104T/M222S/V244I/Q245R;
Q12R/N76D/S103A/V104I/M222S/P210T/Q245R;
30 Q12R/N76D/S103A/I104T/S130T/M222S/Q245R;
Q12R/N76D/S103A/I104T/S130T/A215V/M222S/Q245R;
35 Q12R/N76D/S103A/I104T/S130T/M222S/V227A/Q245R/L262S;
Q12R/N76D/S103A/I104T/S130T/M222S/Q245R/N261D;
N76D/S103A/I104T/S130T/M222S/Q245R;
40 Q12R/S57P/N760/S103A/I104T/S130T/M222S/Q245R/K251Q;
Q12R/N76D/S103A/I104T/S130T/R170S/N185D/M222S/N243D/Q245R;
45 Q12R/N76D/S103A/I104T/S130T/M222S/Q245R/V268A;
Q12R/N76D/S103A/I104T/S130T/M222S/P210S/Q245R;
V68A/N76D/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R;
50 S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
V68A/S103A/V104I/G159D/Y209W/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
55 V68A/S103A/V104I/Q109R/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
G20R/V68A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
V68A/S103A/V104I/G159D/Y209F/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
60 V68A/S103A/V104I/G159D/N185D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
V68A/S103A/V104I/G159D/P210R/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
65 V68A/S103A/V104I/G159D/N185D/P210L/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
V68A/S103A/V104I/G159D/P210L/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;

ES 2 241 180 T5

V68A/S103A/V104I/G159D/S212C/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
V68A/S103A/V104I/G159D/S212G/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
5 V68A/S103A/V104I/G159D/S212E/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
V68A/S103A/V104I/G159D/T213E/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
V68A/S103A/V104I/T213S/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
10 V68A/A103V/V104I/G159D/T213E/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
V68A/S103A/V104I/G159D/T213R/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
15 V68A/S103A/V104I/G159D/A215V/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
V68A/S103A/V104I/G159D/A215R/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
V68A/S103A/V104I/G159D/S216T/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
20 V68A/S103A/V104I/G159D/S216V/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
V68A/S103A/V104I/G159D/S216C/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
25 V68A/S103A/V104I/G159D/N173D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
V68A/S103A/V104I/G159D/Q206R/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
V68A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252F;
30 V68A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252L;
P55S/V68A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252F;
35 V68A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K/T255V;
V68A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K/S256N;
V68A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K/S256E;
40 V68A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K/S256R;
V68A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K/T260R;
45 V68A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K/L257R;
V68A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K/G258D;
V68A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K/N261R;
50 V68A/S103A/V104I/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
V68A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245V/N248D/N252K;
55 V68A/S103A/V104I/G159D/A228V/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
G61E/V68A/S103A/V104I/S130A/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
G61E/S103A/V104I/A133V/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
60 V68A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248G/N252K;
V68A/S103A/V104I/G159D/N218S/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
65 G20R/V68A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
V68A/N76D/E89D/S103A/V104I/G159D/P210L/T213R/A232V/Q236H/Q245R/T260A;

ES 2 241 180 T5

V68A/N76D/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
G61E/V68A/S103A/V104I/G159D/S160V/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
5 S3L/G61E/V68A/N76D/S103A/V104I/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
G61E/V68A/S103A/V104I/G159D/Y167F/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
10 G97E/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
A98D/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
S99E/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
15 S101E/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
S101G/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
G102A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
20 S103A/V104I/S106E/G1 59D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
S103A/V104I/Q109E/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
25 S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K/N261R;
S103A/V104I/Q109R/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
N62D/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
30 S103A/V104I/G159D/N184D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
S103A/V104I/G159D/S166D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
35 S103A/V104I/G159D/L217E/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
G20R/N62D/S103A/V104I/G159D/T213R/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
N62D/S103A/V104I/G159D/T213R/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
40 S103A/V104I/G159D/Q206R/L217E/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
N62D/S103A/V104I/G159D/Q206R/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
45 S103A/V104I/G159D/N184G/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/V244T/Q245R/N248D/N252K;
S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/V244A/Q245R/N248D/N252K;
50 K27N/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
T38G/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
55 N62D/S103A/V104I/G159D/T213R/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K/S256R;
Q12R/N62D/S103A/V104I/G159D/T213R/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
N62D/S103A/V104I/G159D/N185D/Q206E/T213R/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K/E2 71Q;
60 S101G/S103A/V104I/G159D/N185D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
S101G/S103A/V104I/G159D/Q206E/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
65 S101G/S103A/V104I/G159D/T213Q/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
A98L/G102A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;

ES 2 241 180 T5

S101G/G102A/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
G102A/S103A/V104I/G159D/S212G/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
5 Q12R/G102A/S103A/V104I/G159D/S212G/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
A98L/G102A/S103A/V104I/G159D/S212G/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
S101G/G102A/S103A/V104I/G159D/S212G/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
10 G102A/S103A/V104I/G159D/T213R/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
N62D/S103A/V104I/Q109R/G159D/T213R/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
15 S103A/V104I/G159D/A232V/Q245R/N248D/N252K;
S103A/V104I/G159D/A230V/Q245R;
N62D/S103A/V104I/S130G/G159D/T213R/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
20 S101G/S103A/V104I/S130G/G 159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
S101G/S103A/V104I/S128G/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
25 S101G/S103A/V104I/S128L/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
N62D/S101G/S103A/V104I/G159D/T213R/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
N62D/S103A/V104I/S128G/G159D/T213R/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
30 N62D/S103A/V104I/S128L/G159D/T213R/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
S101G/S103A/V104I/P131V/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
35 A98V/S101G/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
S99G/S101G/S103A/V104I/G159D/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
S101G/S103A/V104I/G159D/S212G/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
40 S101G/S103A/V104I/G159D/Y209W/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
S101G/S103A/V104I/G159D/P210I/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
45 S101G/S103A/V104I/G159D/V205I/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
S101G/S103A/V104I/G159D/A230V/Q236H/Q245R;
S101G/S103A/V104I/G159D/A194P/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K;
50 N76D/S101G/S103A/V104I/G159D/A194P/A232V/Q236H/Q245R/N248D/N252K.

55

60

65

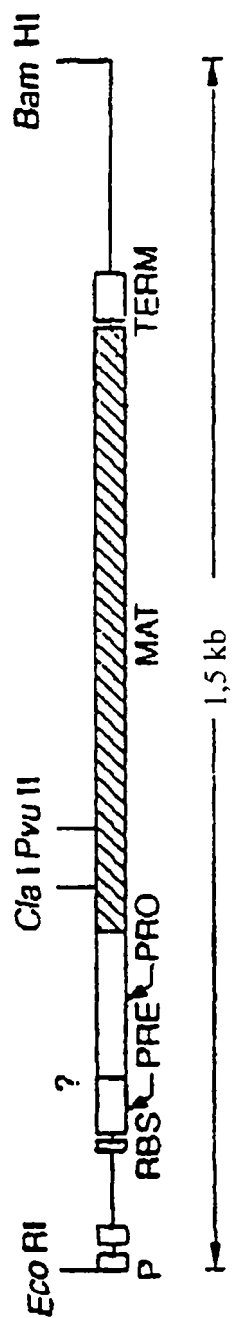


FIG. 1A

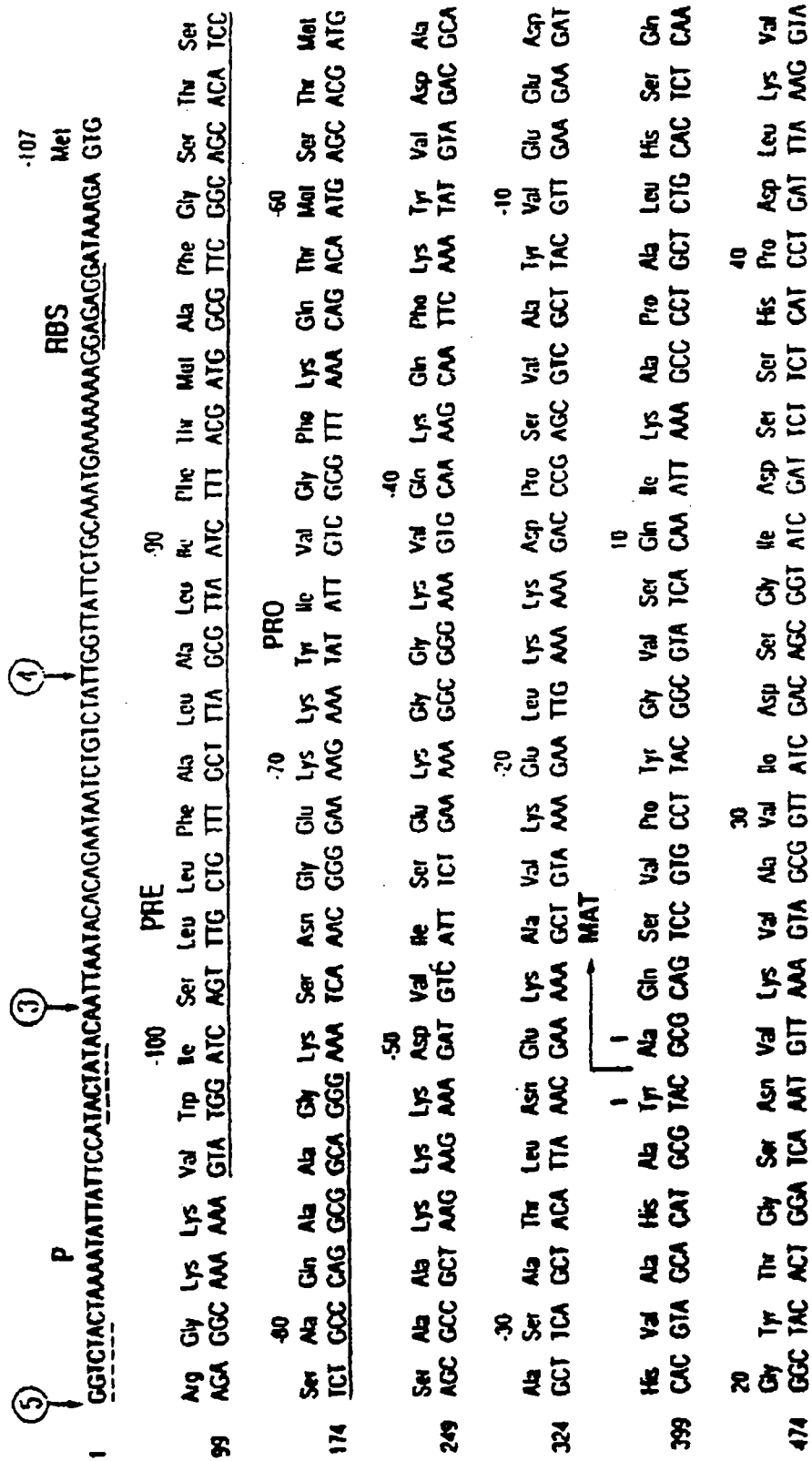


FIG. 1B - 1

549 Ala Gly Gly Ala Ser Met Val Pro Ser Gly Thr Asn Pro Asn Asp 60 Asp Asn Ser His Gly Thr His Val Ala
 GCA GGC GGA GCC AGC ATG GTT CCT TCT TCT GAA ACA AAT CCT TTC CAA GAC AAC AAC TCT TCT CAC GGA ACT CAC GTT GCC

70 Gly Thr Val Ala Ala Leu Asn Ser Ile Cys GGT GTC ATA TTA GGC GTT Val Ala Pro Ser Ala Ser Leu Tyr Ala Val Lys
 GGC ACA GTT GCG GCT CTT AAT AAC TCA ATC ATC GGT GTC ATA TTA GGC GTT Val Ala Pro Ser Ala Ser Leu Tyr Ala Val Lys

80 Asp Ala 100 Val Leu Gly Ala Asp Gly Ser Gly Gln Tyr Ser Thr Ile Asn Gly Ile Cys Thr Ala Ile Asn Asn Met
 GTT CTC GGT GCT GAC GAC GGT TCC TCC GGC CAA TAC AGC TGG ATC ATT AAC GGA ATC GAG TGG GCG ATC GCA AAC AAT ATG

120 Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly Pro Ser Cys Ser Ala Ala Leu Lys Ala Val Asp Lys Ala Val Ala
 GAC GTT ATT AAC ATG AGC ATC GGT GGC GCA GGC GGT TCT TCT GGT TCT GGT TCT TTA AAA GCG GCA GTT GAT AAA GCC GTT GCA

140 Ser Gly Val Val Val Val Ala Ala Gly Asn Cys Thr Ser Ser Ser Thr Val Val Gly Tyr Pro Gly
 TCC GGC GTC GTA GTC GTT GCG GCA GGC GGT AAC GGT AAC GAA GAA GGC ACT TCC GGC AGC TCA AGC ACA GTG GGC TAC CCT GGT

170 Lys Tyr Pro Ser Val Ile Ala Val Gly Ala Val Asp Ser Ser Asn Gln Arg Ala Ser Phe Ser Ser Val Gly Pro
 AAA TAC CCT TCT GTC ATT GCA GTA GGC GCT GTT GAC AGC AGC AAC CAA ACA GCA TCT TTC TCA AGC GTA GGA CCT

200 Gly Leu Asp Val Met Ala Pro Gly Val Ser Ile Cys Ser Thr Leu Pro Gly Asn Lys Tyr Gly Ala Tyr Asn Gly
 GAG CTT GAT GTC ATG GCA CCT GGC GTA TCT ATC CAA AGC ACC CTT CCT GCA AAC AAA TAC GGG GCG TAC AAC GGT

220 Thr Ser Met Ala Ser Pro His Val Val Ala Gly Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lys His Pro Asn Thr Thr Asn Thr
 ACG TCA ATG GCA TCT CCG CAC GTT GCC GGA GCG GCT GCT TIG ATT CTT TCT AAG CAC CCG AAC TGG ACA AAC ACT

FIG. 1B - 2

250 Gln 260 Gln
 Gln Val Arg Ser Ser Leu Glu Asn Thr Thr Thr Lys Leu Gly Asp Ser Phe Tyr Gly Lys Gly Leu Ho Asn
 1149 CAA GTC CGC AGC AGT TTA GAA AAC AAC ACC ACT ACA AAA CTT GGT GAT ICT TIC TAC TAT GCA AAA GGG CTG AIC AAC
 270 275
 Val Gln Ala Ala Gln OC
 1224 GTA CAG CCG GCA GCT CAG TAA AAC ATAAAMACGGCCTTGGCCCGCGGTTTATTTTCTCTCGGCATGTTCAATCCGCTCC
 TERM
 1316 ATATCGACGGATGGCTCCCTCTGAAATTTTAACGAGAAACGGCGGGTTGACCCGGCTCAGTCCCGTAACGGCCAMGTCCTGAAACGTCTCAATCGCCG
 1416 CTCCCGGTTCCGGTCAGCICAAIGCCGTAACGGTCCGGCGCGGTTTCTCTGAAACGGGAGACGGCATTCGTATCGGATC

FIG._1B - 3

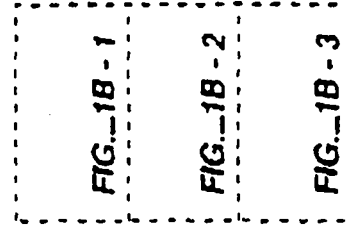


FIG._1B

**RESIDUOS CONSERVADOS EN SUBTILISINAS DE
BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS**

1	10	20
A Q S V P . G	A P A . H . .	G
21	30	40
. T G S . V K V A V . D . G		H P
41	50	60
D L . . . G G A S . V P		Q D
61	70	80
. N . H G T H V A G T . A A L N N S I G		
81	90	100
V L G V A P S A . L Y A V K V L G A . G		
101	110	120
S G . . S . L . . G . E W A . N		
121	130	140
V . N . S L G . P S . S		A . .
141	150	160
. G V . V V A A . G N . G . . .		
161	170	180
. Y P . . Y A V G A .		
181	190	200
D . . N . . A S F S . . G . . L D . . A		
201	210	220
P G V . . Q S T . P G . . Y . . . N G T		
221	230	240
S M A . P H V A G A A A L . . . K . . .		
241	250	260
W . . . Q . R . . L . N T . . . L G . .		
261	270	
. . Y G . G L . N . . A A . .		

FIG._2

COMPARACIÓN DE SECUENCIAS DE SUBTILISINA DE :

*B. amyloliquefaciens**B. subtilis**B. licheniformis**B. lentus*

01	A Q S V P Y G V S Q I K A P A L H S Q G Y T G S N V K V A V I D S G I D S S H P	10	20	30
	A Q S V P Y G I S Q I K A P A L H S Q G Y T G S N V K V A V I D S G I D S S H P			
	A Q T V P Y G I P L I K A D K V Q A Q G F K G A N V K V A V L D T G I Q A S H P			
	A Q S V P W G I S R V Q A P A A H N R G L T G S G V K V A V L D T G I S T * H P			
41	D L K V A G G A S M V P S E T N P F Q D N N S H G T H V A G T V A A L N N S I G	50	60	70
	D L N V R G G A S F V P S E T N P Y Q D G S S H G T H V A G T V A A L N N S I G			
	D L N V V G G A S F V A G E A Y * N * T D G N G H G T H V A G T V A A L D N T T G			
	D L N I R G G A S F V P G E * P S T Q D G N G H G T H V A G T V A A L N N S I G			
81	V L G V A P S A S L Y A V K V L G A D G S G Q Y S S W I I N G I E W A I A N N M D	90	100	110
	V L G V S P S A S L Y A V K V L D S T G S G Q Y S S W I I N G I E W A I S N N M D			
	V L G V A P S V S L Y A V K V L N S S G S G S Y S S G I V S G I E W A T N G M D			
	V L G V A P S A E L Y A V K V L G A S G S G S V S S I A Q G L E W A G N N G M H			
121	V I N H S L G G P S G S A A L K A A V D K A V A S G V V V A A A G N E G T S G	130	140	150
	V I N H S L G G P T G S T A L K T V V D K A V S S G I V V A A A A G N E G S S G			
	V I N H S L G G A S G S T A M K Q A V D N A Y A R G V V V A A A A G N S G N S G			
	V A N L S L G S P S P S A T L E Q A V N S A T S R G V L V A A S G N S G A G S			

FIG._3A

161 170 180 190
 S S S T V G Y P G K Y P S V I A V G A V D S S N Q R A S F S S V G P E L D V M A
 S S S T V G Y P P A K Y P S T I A V G A V N S S N Q R A S F S S A G S E L D V M A
 S T N T I G Y P P A K Y P S V I A V G A V D S S N S N R R A S F S S V G A E L E V M A
 * * * I S Y P A R Y A N A M A V G A T D Q N N R R A S F S S Q Y G A G L D I V A

201 210 220 230
 P G V S I Q S T L P G N K Y G A Y N G T S M A S P H V A G A A A L I L S K H P N
 P G V S I Q S T L P G G T Y G A Y N G T S M A T P H V A G A A A L I L S K H P T
 P G A G V Y S T Y P P T N T Y A T L N G T S M A S P H V A G A A A L I L S K H P N
 P G V N V Q S T Y P P G S T Y A S L N G T S M A T P H V A G A A A L V K Q K N P S

241 250 260 270
 W T N T Q Q V R S S L E N T T T K L G D S F Y Y G K G L I N V Q A A A Q
 W T N A Q Q V R R L E S T A T T Y L G N S F Y Y G K G L I N V Q A A A Q
 L S A S Q Q V R R L S S T A T T Y L G S S F Y Y G K G L I N V E A A A Q
 W S N V Q I R R N H L K N T A T S L G S T N L Y G S G L V N A E A A T R

FIG._3B

FIG._3

