

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 908 667**

51 Int. Cl.:

C12N 9/22 (2006.01)

C11D 3/386 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.10.2018** **E 18202967 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.02.2022** **EP 3476935**

54 Título: **Composiciones detergentes que comprenden variantes polipeptídicas**

30 Prioridad:

27.10.2017 EP 17199032

30.11.2017 EP 17204815

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
03.05.2022

73 Titular/es:

THE PROCTER & GAMBLE COMPANY (100.0%)
One Procter & Gamble Plaza
Cincinnati, OH 45202, US

72 Inventor/es:

BEIER, LARS;
GORI, KLAUS;
OESTERGAARD, LARS HENRIK;
GIGER, LARS;
JOHANSEN, ANNETTE HELLE;
ABEL, GERNOT J. y
LANT, NEIL JOSEPH

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 908 667 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones detergentes que comprenden variantes polipeptídicas

5 Referencia a un listado de secuencias

Esta solicitud contiene una lista de secuencias en un soporte de lectura informática, que se incorpora a la presente por referencia.

10 Campo de la invención

La presente invención se refiere a composiciones detergentes que comprenden variantes de ADNasa novedosas que presentan alteraciones en relación con la ADNasa precursora en una o más propiedades que incluyen: capacidad limpiadora, estabilidad del detergente y/o estabilidad durante el almacenamiento. Las composiciones de la invención son adecuadas para usar en procesos de limpieza y composiciones detergentes, tales como composiciones para lavado de ropa y composiciones para lavado de vajillas, incluidas composiciones para lavado de vajillas a mano o en lavavajillas. La presente invención también se refiere a métodos para preparar composiciones detergentes y métodos de lavado y para utilizar dichas variantes de ADNasa para el tratamiento de superficie, particularmente tratamiento y limpieza de tejidos.

20 Antecedentes de la invención

Las superficies duras y los tejidos están expuestos a la suciedad y los microorganismos del entorno y de la suciedad corporal. La suciedad que se deposita sobre dichas superficies puede agudizar la adhesión de microorganismos y, por consiguiente, la formación de suciedad de origen microbiano, por ejemplo, suciedad de biopelículas. Las biopelículas comprenden una matriz de sustancia polimérica extracelular (EPS): una conglomeración polimérica que comprende generalmente ADN extracelular, proteínas y polisacáridos. Estas suciedades son pegajosas, difíciles de eliminar y producen la adhesión adicional de otras suciedades. Por lo tanto, la suciedad relacionada con el cuidado doméstico es compleja y puede comprender partículas, proteínas, almidón, grasa y también EPS. Por consiguiente, la eliminación de manchas también es compleja y pueden ser útiles una variedad de enzimas, que incluyen enzimas desoxirribonucleasas (ADNasa).

Para ser útil en los procesos de limpieza doméstica, una enzima tal como una ADNasa debe ser estable en composiciones detergentes y compatible con componentes detergentes estándar tales como tensioactivos, aditivos reforzantes de la detergencia, blanqueadores, etc. La presente invención proporciona composiciones detergentes que comprenden dichas enzimas para proporcionar una buena limpieza. La invención también puede ser beneficiosa para mejorar la limpieza de la ropa y los lavavajillas automáticos.

Resumen de la invención

La presente invención se refiere a una composición detergente que comprende i) una variante de ADNasa que tiene actividad ADNasa seleccionada del grupo que consiste en:

a) una variante de ADNasa que, en comparación con una ADNasa que tiene la Id. de sec. n.º: 1, comprende una sustitución seleccionada de L33R, L33V y L33Y en donde cada posición corresponde a la posición del polipéptido de la Id. de sec. n.º: 1 (numeración según la Id. de sec. n.º: 1), en donde la variante tiene al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % pero menos de 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos mostrada en la Id. de sec. n.º: 1 y en donde la variante tiene una estabilidad mejorada en comparación con la precursora y/o en comparación con el polipéptido de la Id. de sec. n.º: 1, id. de sec. n.º: 27 o la Id. de sec. n.º: 28; y

ii) un adyuvante, preferiblemente en una cantidad de 0,01 a 99,9 % en peso.

Preferiblemente, la variante de ADNasa comprende una o más sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en: G4K, S7G, K8R, S9I, N16G, S27K, S27R, D32F, D32I, D32L, D32R, D32V, L33H, L33R, L33K, L33V, L33Y, S39C, G41P, S42H, D45E, Q48D, N61E, T65M, T65W, S66R, S66M, S66W, S66Y, S66V, F78L, P91L, S101N, S106L, S106R, S106H, Q109E, A112E, T127P, S130A, S130Y, T138D, Q140V, Q140G, A147H, C148A, W154Y, T157V, Y159A, Y159R, G162C, Q174N, L177Y, S179L y C180A.

Preferiblemente, la variante de ADNasa en comparación con una ADNasa que tiene la Id. de sec. n.º: 27, comprende una o más sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en: G4K, S7G, K8R, S9I, N16G, S27K, S27R, D32F, D32I, D32L, D32R, D32V, L33H, L33R, L33K, L33V, L33Y, S39C, G41P, S42H, D45E, Q48D, N61E, T65M, T65W, S66R, S66M, S66W, S66Y, S66V, F78L, P91L, S101N, S106L, S106R, S106H, Q109E, A112E, T127P, S130A, S130Y, T138D, Q140V, Q140G, A147P, C148A, W154Y, T157V, Y159A, Y159R, G162C, Q174N, L177Y, S179L y C180A, en donde cada posición corresponde a las posiciones de la Id. de sec. n.º: 27 (numeración según la Id. de sec. n.º: 27) y en donde la variante tiene al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % pero menos de 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos mostrada en la Id. de sec. n.º: 27.

Preferiblemente, la variante de ADNasa en comparación con una ADNasa que tiene la Id. de sec. n.º: 28, comprende una o más sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en: G4K, S7G, K8R, S9I, N16G, S27K, S27R, D32F, D32I, D32L, D32R, D32V, L33H, L33R, L33K, L33V, L33Y, S39C, G41P, S42H, D45E, Q48D, N61E, T65M, T65W, S66R, S66M, S66W, S66Y, S66V, F78L, P91L, S101N, S106L, S106R, S106H, Q109E, A112E, T127P, S130A, S130Y, T138D, Q140V, Q140G, A147P, C148A, W154Y, T157V, Y159A, Y159R, G162C, Q174N, L177Y, S179L y C180A, en donde cada posición corresponde a las posiciones de la Id. de sec. n.º: 28 (numeración según la Id. de sec. n.º: 28) y en donde la variante tiene al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % pero menos de 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos mostrada en la Id. de sec. n.º: 28.

La invención se refiere además a una composición detergente que comprende una variante de ADNasa que comprende una sustitución en al menos tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte o más posiciones seleccionadas de la lista que consiste en 1, 4, 7, 8, 13, 22, 25, 27, 32, 33, 39, 41, 42, 48, 56, 57, 59, 65, 66, 76, 77, 101, 106, 109, 116, 127, 130, 138, 140, 144, 147, 148, 154, 157, 159, 160, 162, 166, 167, 174, 175, 177, 178, 179, 180 y 181, en donde cada posición corresponde a la posición del polipéptido de la Id. de sec. n.º: 1 y en donde la variante tiene actividad ADNasa.

La invención también proporciona un método de lavado que comprende (i) poner en contacto un artículo o superficie, preferiblemente un tejido, con una solución de lavado acuosa que comprende una variante de ADNasa como se define y un adyuvante, preferiblemente poniendo en contacto el artículo o la superficie con la composición detergente descrita en la presente descripción; y (ii) opcionalmente enjuagar y (iii) secar la superficie.

La invención también se refiere al uso de una variante de ADNasa y un adyuvante, para la limpieza que incluye una limpieza profunda de un artículo o superficie, preferiblemente un tejido; para prevenir y/o reducir la adherencia de un artículo o superficie manchada, preferiblemente un tejido; para pretratar las manchas de un artículo o superficie manchada, preferiblemente un tejido; para prevenir y/o reducir la redeposición de la suciedad sobre una superficie o artículo, preferiblemente un tejido, durante un ciclo de lavado; para prevenir y/o reducir la adherencia de la suciedad a un artículo o superficie, preferiblemente un tejido; para mantener o mejorar la blancura de un artículo o superficie, preferiblemente un tejido; y/o para prevenir y/o reducir el mal olor en un artículo o superficie, preferiblemente un tejido.

Preferiblemente, la variante de ADNasa comprende una o más de las sustituciones correspondientes a sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en: G4K, S7G, K8R, D32I, D32L, D32R, D32V, L33R, L33K, S39C, G41P, S42H, Q48D, T65M, T65W, S66M, S66W, S66Y, S66V, S101N, S106L, S106R, S106H, S130A, S130Y, T138D, Q140V, Q140G, A147H, C148A, W154Y, T157V, Y159A, Y159R, G162C, Q174N, L177Y, S179L y C180A (numeración según la Id. de sec. n.º: 1).

Preferiblemente, la variante de ADNasa comprende una o más de las sustituciones correspondientes a sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en: una o más de las sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en S27K, S27R, S39C y S66W (numeración según la Id. de sec. n.º: 1).

La variante de ADNasa tiene al menos una propiedad mejorada, en comparación con la precursora y/o en comparación con la ADNasa que tiene el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º: 1, Id. de sec. n.º: 27 o la Id. de sec. n.º: 28. La variante de ADNasa tiene una estabilidad mejorada. Una propiedad mejorada preferida se caracteriza por que la RAR (relación de actividad residual) es superior a 1 en al menos un ensayo A, B o C. Preferiblemente, la variante comprende al menos dos mutaciones y la combinación de mutaciones en la variante de ADNasa proporciona un efecto aditivo, más preferiblemente un efecto sinérgico.

Secuencias

Id. de sec. n.º: 1 polipéptido maduro obtenido a partir de *Bacillus cibi*

Id. de sec. n.º: 2 polipéptido maduro obtenido a partir de *Bacillus orikoshii*

Id. de sec. n.º: 3 polipéptido maduro obtenido a partir de *Bacillus sp-62520*

Id. de sec. n.º: 4 polipéptido maduro obtenido a partir de *Bacillus orikoshii*

Id. de sec. n.º: 5 polipéptido maduro obtenido a partir de *Bacillus orikoshii*

Id. de sec. n.º: 6 polipéptido maduro obtenido a partir de *Bacillus sp-16840*

Id. de sec. n.º: 7 polipéptido maduro obtenido a partir de *Bacillus sp-16840*

Id. de sec. n.º: 8 polipéptido maduro obtenido a partir de *Bacillus sp-62668*

Id. de sec. n.º: 9 polipéptido maduro obtenido a partir de *Bacillus sp-13395*

Id. de sec. n.º: 10 polipéptido maduro obtenido a partir de *Bacillus horneckiae*

Id. de sec. n.º: 11 polipéptido maduro obtenido a partir de *Bacillus sp-11238*

Id. de sec. n.º: 12 polipéptido maduro obtenido a partir de *Bacillus sp-62451*

Id. de sec. n.º: 13 polipéptido maduro obtenido a partir de *Bacillus sp-18318*

Id. de sec. n.º: 14 polipéptido maduro obtenido a partir de *Bacillus idriensis*

Id. de sec. n.º: 15 es el polipéptido maduro obtenido a partir de *Bacillus algicola*

Id. de sec. n.º: 16 polipéptido maduro obtenido a partir de la *muestra ambiental J*

Id. de sec. n.º: 17 polipéptido maduro obtenido a partir de *Bacillus vietnamensis*

Id. de sec. n.º: 18 polipéptido maduro obtenido a partir de *Bacillus hwajinpoensis*

Id. de sec. n.º: 19 polipéptido maduro obtenido a partir de *Paenibacillus mucilaginosus*

Id. de sec. n.º: 20 polipéptido maduro obtenido a partir de *Bacillus indicus*

Id. de sec. n.º: 21 Polipéptido maduro obtenido a partir de *Bacillus marisflavi*

Id. de sec. n.º: 22 polipéptido maduro obtenido a partir de *Bacillus luciferensis*

Id. de sec. n.º: 23 polipéptido maduro obtenido a partir de *Bacillus marisflavi*

Id. de sec. n.º: 24 polipéptido maduro obtenido a partir de *Bacillus sp. SA2-6*

Id. de sec. n.º: 25 motivo [D/M/L][S/T]GYSR[D/N]

Id. de sec. n.º: 26 motivo ASXNRSKG

Id. de sec. n.º: 27 variante de ADNasa con Id. de sec. n.º: 1

Id. de sec. n.º: 28 variante de ADNasa con Id. de sec. n.º: 1

Definiciones

El término “adyuvante” significa cualquier material líquido, sólido o gaseoso seleccionado para el tipo particular de composición detergente deseada y la forma del producto (*p. ej.*, líquido, gránulo, polvo; pastilla, pasta, pulverizado, dosis unitaria, tal como pastilla o bolsa, gel o composición espumosa), siendo estos materiales también preferiblemente compatibles con la enzima variante de ADNasa utilizada en la composición. En algunos aspectos, las composiciones en gránulos están en forma “compacta” mientras que, en otros aspectos, las composiciones líquidas están en forma “concentrada”.

La expresión “variante alélica” significa cualquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupa el mismo locus cromosómico. Las variaciones alélicas surgen naturalmente mediante mutación, y pueden dar como resultado el polimorfismo entre poblaciones. Las mutaciones génicas pueden ser silenciosas (sin cambios en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos alteradas. Una variante alélica de un polipéptido es un polipéptido codificado por una variante alélica de un gen.

“Biopelícula” es una suciedad de origen microbiano que puede producir cualquier grupo de microorganismos y típicamente comprende una matriz autoproducida de sustancia polimérica extracelular (EPS). La biopelícula de EPS es un conglomerado polimérico compuesto generalmente por ADN extracelular, proteínas y polisacáridos. Las bacterias productoras de biopelícula incluyen, por ejemplo, las siguientes especies: *Acinetobacter sp.*, *Aeromicrobium sp.*, *Brevundimonas sp.*, *Microbacterium sp.*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas sp.*, *Staphylococcus epidermidis* y *Stenotrophomonas sp.*

El término “ADNc” significa una molécula de ADN que se puede preparar mediante transcripción inversa a partir de una molécula de ARNm madura sometida a corte y empalme obtenida a partir de una célula procariota o eucariota. Un ADNc carece de secuencias intrónicas que pueden estar presentes en el ADN genómico correspondiente. El transcrito primario inicial de ARN es un precursor del ARNm que se procesa mediante una serie de etapas, incluido el corte y empalme, antes de aparecer como un ARNm maduro de corte y empalme.

El término “clado” significa un grupo de polipéptidos agrupados según características homólogas rastreadas hasta un ancestro común. Los clados polipeptídicos pueden visualizarse como árboles filogénicos y un clado es un grupo de polipéptidos que consiste en un ancestro común y todos sus descendientes lineales. Los polipéptidos que forman un grupo, *p. ej.*, un clado como se muestra en un árbol filogenético, a menudo pueden compartir propiedades comunes y están más estrechamente relacionados que otros polipéptidos no pertenecientes al clado.

La expresión “secuencia codificante” significa un polinucleótido que especifica directamente la secuencia de aminoácidos de su producto polipeptídico. Los límites de la secuencia codificante por lo general están determinados por un marco de lectura abierto, que normalmente se inicia con el codón de inicio ATG o con codones de inicio alternativos tales como GTG y TTG y finaliza con un codón de detención tal como TAA, TAG, y TGA. La secuencia codificante puede ser un polinucleótido de ADN, ADNc, sintético o recombinante.

La expresión “secuencias de control” significa todos los componentes necesarios para expresar un polinucleótido que codifica una variante de la presente invención. Cada secuencia de control puede ser de origen natural o externo para el polinucleótido que codifica la variante, o naturales o externos entre sí. Dichas secuencias de control incluyen, aunque no de forma limitativa, una secuencia líder, una secuencia de poliadenilación, una secuencia de propéptido, un promotor, una secuencia de péptido señal, y un terminador de la transcripción. Como mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor, y señales de detención de la transcripción y de la traducción. Las secuencias de control pueden estar provistas de conectores para introducir sitios de restricción específicos que facilitan la unión de las secuencias de control con la región codificadora del polinucleótido que codifica una variante.

Mediante la expresión “limpieza profunda” se refiere a la reducción o eliminación de componentes de biopelículas, EPS o partes de los mismos, tales como polisacáridos, proteínas, ADN, suciedad u otros componentes presentes en, *p. ej.*, la biopelícula o EPS.

La expresión “composición detergente” incluye, salvo que se indique lo contrario, agentes para el lavado granulados o en polvo universales o de limpieza intensiva, especialmente detergentes limpiadores; agentes para el lavado líquidos, en forma de gel o pasta universales, especialmente los tipos líquidos denominados de limpieza intensiva (HDL); detergentes líquidos para tejidos delicados; agentes para el lavado manual de vajillas o agentes para el lavado de vajillas de acción suave, especialmente los de tipo muy espumante; agentes para el lavado en lavavajillas, incluidos los diversos tipos en pastilla, granulado, líquido y coadyuvante de aclarado para uso doméstico e institucional; agentes líquidos para limpieza y desinfección, incluyendo los tipos antibacterianos para lavado a mano, pastillas para limpieza, pastillas de jabón, colutorios, limpiadores de dentaduras postizas, champús para coches o moquetas, limpiadores de baños; champús para cabello y productos de aclarado del cabello; geles de ducha, baños de espuma; limpiadores para metales; así como sustancias auxiliares de limpieza tales como aditivos blanqueantes y los tipos “barra antimanchas” o para pretratamiento. La composición detergente puede estar en forma de dosis unitaria, tal como una pastilla o bolsa que comprende líquido, gel y/o sólido, tal como una composición detergente granulada o en polvo, opcionalmente encapsulada en una película, preferiblemente una bolsa soluble en agua. Las expresiones “composición detergente” y “formulación detergente” se usan en referencia a mezclas que están destinadas a usarse en un medio de lavado para la limpieza de objetos sucios. En algunos aspectos, la expresión se usa en referencia al lavado de tejidos y/o prendas (*p. ej.*, “detergentes para ropa”). En aspectos alternativos, la expresión se refiere a otros detergentes, tales como los utilizados para limpiar platos, cubiertos, etc. (*p. ej.*, “detergentes para lavavajillas”). No se pretende que la presente invención esté limitada a ninguna formulación o composición detergente en particular. La expresión “composición detergente” no pretende limitarse a composiciones que contengan tensioactivos. Se pretende que, además de las variantes según la invención, la expresión abarque detergentes que pueden contener, *p. ej.*, tensioactivos, aditivos reforzantes de la detergencia, quelantes o agentes quelantes, sistemas blanqueadores o componentes blanqueadores, polímeros, acondicionadores de tejidos, reforzadores de espuma, supresores de jabonaduras, colorantes, perfume, inhibidores del deslustre, abrillantadores ópticos, bactericidas, fungicidas, agentes de suspensión de suciedad, agentes anticorrosivos, inhibidores enzimáticos o estabilizadores, activadores enzimáticos, transferasa(s), enzimas hidrolíticas, oxidoreductasas, agentes tonalizadores y colorantes fluorescentes, antioxidantes, y solubilizantes. Las composiciones detergentes también se pueden usar en una etapa de tratamiento de tejidos, por ejemplo, pueden proporcionar una etapa refrescante de tejidos, suavizante de tejidos y/o de rejuvenecimiento de color.

La expresión “ADNasa”, “variantes de ADNasa” o “ADNasa precursora” significa un polipéptido con actividad ADNasa que cataliza la escisión hidrolítica de enlaces fosfodiéster en el ADN, degradando así el ADN. Las ADNasas pertenecen a las esterasas (EC-número 3.1), un subgrupo de las hidrolasas. Las ADNasas se clasifican, *p. ej.*, en E.C. 3.1.11, E.C. 3.1.12, E.C. 3.1.15, E.C. 3.1.16, E.C. 3.1.21, E.C. 3.1.22, E.C. 3.1.23, E.C. 3.1.24 y E.C.3.1.25, así como EC 3.1.21.X,

donde X = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9. El término “ADNasa” y la expresión “un polipéptido con actividad ADNasa” pueden usarse indistintamente en toda la solicitud. Para los fines de la presente invención, la actividad ADNasa se determina según el procedimiento descrito en el Ensayo I. En algunos aspectos, las variantes de ADNasa de la presente invención tienen una actividad ADNasa mejorada en comparación con la ADNasa precursora. En algunos aspectos, las variantes de ADNasa de la presente invención tienen al menos 100 %, *p. ej.*, al menos 110 %, al menos 120 %, al menos 130 %, al menos 140 %, al menos 150 %, al menos 160 %, al menos 170 %, al menos 180 %, al menos 190 % o al menos 200 % de actividad ADNasa en comparación con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º 1.

La expresión “cantidad eficaz de enzima” se refiere a la cantidad de enzima necesaria para lograr la actividad enzimática requerida en la aplicación específica, *p. ej.*, en una composición detergente definida. Dichas cantidades eficaces serán fácilmente determinadas por un experto en la técnica y dependen de muchos factores, tales como la enzima particular utilizada, la aplicación de limpieza, la composición específica de la composición detergente y si se requiere una composición líquida o seca (*p. ej.*, granulada, en pastilla) y similares. La expresión “cantidad eficaz” de una variante de ADNasa se refiere a la cantidad de variante de ADNasa descrita anteriormente que logra un nivel deseado de actividad enzimática, *p. ej.*, en una composición detergente definida.

El término “expresión” incluye cualquier etapa implicada en la producción de la variante incluido, aunque no de forma limitativa, la transcripción, la modificación posterior a la transcripción, la traducción, la modificación posterior al a traducción, y la secreción.

La expresión “vector de expresión” significa una molécula de ADN, lineal o circular, que comprende un polinucleótido que codifica una variante y está unido operativamente a nucleótidos adicionales que realizan su expresión.

El término “tejido” abarca cualquier material textil. Por lo tanto, se pretende que el término abarque prendas de vestir, así como tejidos, hilos, fibras, materiales no tejidos, materiales naturales, materiales sintéticos y cualquier otro material textil.

La expresión sistema con “concentración de detergente alta” incluye detergentes en donde más de aproximadamente 2000 ppm de los componentes detergentes están presentes en el agua de lavado. Los detergentes europeos generalmente se consideran sistemas de alta concentración de detergente.

La expresión “célula hospedadora” significa cualquier tipo celular susceptible de transformación, transfección, transducción y similares con una construcción de ácido nucleico o vector de expresión que comprende un polinucleótido de la presente invención. La expresión “célula hospedadora” abarca cualquier progenie de una célula precursora que no sea idéntica a la célula precursora debido a mutaciones que se producen durante la replicación.

La expresión “propiedad mejorada” significa una característica asociada con una variante que se mejora en comparación con la precursora en comparación con una ADNasa con la Id. de sec. n.º 1, id. de sec. n.º 27, Id. de sec. n.º 28 o en comparación con una ADNasa que tiene la secuencia de aminoácidos idéntica a dicha variante pero que no tiene las alteraciones en una o más de dichas posiciones especificadas. Dichas propiedades mejoradas incluyen, aunque no de forma limitativa, estabilidad, tal como estabilidad de detergente, capacidad limpiadora, *p. ej.*, efecto de limpieza profunda, y el efecto de limpieza profunda puede incluir, pero no se limita a, efecto de desengrasado.

La expresión “actividad de ADNasa mejorada” se define en la presente descripción como una actividad ADNasa alterada, *p. ej.*, mediante el aumento de la catálisis de la escisión hidrolítica de los enlaces fosfodiéster del ADN, la variante de ADNasa que muestra una alteración de la actividad en relación (o en comparación) con la actividad de la ADNasa precursora, tal como en comparación con una ADNasa con la Id. de sec. n.º 1, id. de sec. n.º 27 o la Id. de sec. n.º 28.

La expresión sistema con “concentración de detergente alta” incluye detergentes donde menos de aproximadamente 800 ppm de los componentes detergentes están presentes en el agua de lavado. Los detergentes asiáticos, *p. ej.*, los detergentes japoneses se consideran de forma típica sistemas de concentración de detergente bajo.

La expresión “capacidad limpiadora mejorada” incluye, pero no se limita a la expresión “efecto de limpieza profunda”. La capacidad mejorada, *p. ej.*, la capacidad limpiadora profunda de una variante de ADNasa según la invención, se mide en comparación con el precursor de ADNasa, *p. ej.*, la ADNasa mostrada en la Id. de sec. n.º 1, id. de sec. n.º 27 o la Id. de sec. n.º 28. La capacidad mejorada, *p. ej.*, la limpieza o la capacidad limpiadora profunda puede expresarse como un Valor de remisión de las muestras manchadas. Tras lavar y enjuagar, las muestras se extienden y se dejan secar al aire a temperatura ambiente durante la noche. Todas las muestras lavadas se evalúan el día después del lavado. Las evaluaciones de la reflectancia de la luz de las muestras se realizan utilizando un espectrofotómetro de reflectancia Macbeth Color Eye 7000 con una abertura muy pequeña. Las mediciones se realizan sin UV en la luz incidente y se extrajo la remisión a 460 nm. Una respuesta positiva indica que la suciedad se ha eliminado, incluida la suciedad adherida al tejido debido a, *p. ej.*, la capa pegajosa de la biopelícula.

La expresión “polinucleótido aislado” significa un polinucleótido que está modificado por la mano humana. En algunos aspectos, el polinucleótido aislado es al menos 1 % puro, *p. ej.*, al menos 5 % puro, al menos 10 % puro, al menos 20 % puro, al menos 40 % puro, al menos 60 % puro, al menos 80 % puro, al menos 90 % puro y al menos 95 % puro, tal como se determina mediante electroforesis en gel de agarosa. Los polinucleótidos pueden ser de origen genómico, ADNc, ARN, semisintético, sintético, o cualquier combinación de los mismos.

El término “lavado” se refiere al lavado de ropa tanto doméstico como industrial y significa el proceso de tratamiento de textiles con una solución que contiene una composición limpiadora o detergente de la presente invención. El proceso de lavado puede llevarse a cabo, *p. ej.*, utilizando *p. ej.* una lavadora doméstica o industrial o puede llevarse a cabo a mano.

La expresión “polipéptido maduro” significa un polipéptido en su forma final después de la traducción y cualquiera de sus modificaciones posteriores a la traducción, tales como procesamiento del extremo N, truncamiento del extremo C, glicosilación, fosforilación, etc. En algunos aspectos, el polipéptido maduro es los aminoácidos 1 al 182 de la Id. de sec. n.º: 1. Los extremos N del polipéptido maduro utilizados según la presente invención se confirmaron experimentalmente basándose en datos de secuenciación de extremos N de EDMAN y datos de Intact MS. Se conoce en la técnica que una célula huésped puede producir una mezcla de dos polipéptidos maduros muy diferentes (es decir, con un aminoácido del extremo C y/o extremo N diferente) expresado por el mismo polinucleótido.

La expresión “secuencia codificante del polipéptido maduro” significa un polinucleótido que codifica un polipéptido maduro que tiene actividad ADNasa.

La expresión sistema de “concentración media de detergente” incluye detergentes en donde los componentes detergentes están presentes en el agua de lavado entre aproximadamente 800 ppm y aproximadamente 2000 ppm. Los detergentes norteamericanos generalmente se consideran sistemas de concentración media de detergente.

La expresión “construcción de ácido nucleico” significa una molécula de ácido nucleico, tanto monocatenaria como bicatenaria, que está aislada de un gen natural, o se ha modificado para incluir segmentos de ácidos nucleicos de una forma que no se produciría de forma natural o que es sintética. El término construcción de ácido nucleico es un sinónimo del término “casete de expresión” cuando la construcción de ácido nucleico incluye las secuencias de control necesarias para expresar una secuencia codificante de la presente invención.

La expresión “composiciones detergentes no textiles” incluye composiciones detergentes para superficies no textiles que incluyen, aunque no de forma limitativa, composiciones para la limpieza de superficies duras, tales como composiciones detergentes para lavado de vajillas, incluidas las composiciones para lavado de vajillas a mano, composiciones detergentes bucales, composiciones detergentes para dentaduras postizas y composiciones para aseo personal.

La expresión “operablemente unido” significa una configuración en la que una secuencia de control se coloca en una posición adecuada con respecto a la secuencia codificante de un polinucleótido de tal forma que la secuencia de control dirige la expresión de la secuencia codificante.

Las expresiones ADNasa “pariente”, precursor de ADNasa o ADNasa precursora pueden usarse indistintamente. En el contexto de la presente invención, “ADNasa precursora” debe entenderse como una ADNasa en la que se hace al menos una alteración en la secuencia de aminoácidos para producir una variante de ADNasa que tiene una secuencia de aminoácidos que es menos del 100 % idéntica a la secuencia de ADNasa en la que se hizo la alteración, es decir, la ADNasa precursora. Por lo tanto, la precursora es una ADNasa que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica en comparación con la variante pero que no tiene las alteraciones en una o más de las posiciones especificadas. Se entenderá que en el presente contexto, la expresión “que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica” se refiere al 100 % de identidad de secuencia. En un aspecto particular, la ADNasa precursora es una ADNasa que tiene al menos 60 %, al menos 61 %, al menos 62 %, al menos 63 %, al menos 64 %, al menos 65 %, al menos 66 %, al menos 67 %, al menos 68 %, al menos 69 %, al menos 70 %, al menos 72 %, al menos 73 %, al menos 74 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos el 84 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, por ejemplo al menos el 99,1 %, al menos el 99,2 %, al menos el 99,3 %, al menos el 99,4 %, al menos el 99,5 %, al menos el 99,6 % o el 100 % de identidad respecto de un polipéptido mostrado en la Id de sec n.º: 1. En un aspecto particular, la ADNasa precursora es una ADNasa que tiene al menos 60 %, al menos 61 %, al menos 62 %, al menos 63 %, al menos 64 %, al menos 65 %, al menos 66 %, al menos 67 %, al menos 68 %, al menos 69 %, al menos 70 %, al menos 72 %, al menos 73 %, al menos 74 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos el 84 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, por ejemplo al menos el 99,1 %, al menos el 99,2 %, al menos el 99,3 %, al menos el 99,4 %, al menos el 99,5 %, al menos el 99,6 % o el 100 % de identidad respecto de un polipéptido mostrado en la Id de sec n.º: 27. En un aspecto particular, la ADNasa precursora es una ADNasa que tiene al menos 60 %, al menos 61 %, al menos 62 %, al menos 63 %, al menos 64 %, al menos 65 %, al menos 66 %, al menos 67 %, al menos 68 %, al menos 69 %, al menos 70 %, al menos 72 %, al menos 73 %, al menos 74 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al

menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos el 84 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, por ejemplo al menos el 99,1 %, al menos el 99,2 %, al menos el 99,3 %, al menos el 99,4 %, al menos el 99,5 %, al menos el 99,6 % o el 100 % de identidad respecto de un polipéptido mostrado en la Id de sec n.º: 28.

La expresión “condiciones de lavado relevantes” se usa en la presente descripción para indicar las condiciones, especialmente la temperatura del lavado, el tiempo, la mecánica del lavado, la concentración de detergente, el tipo de detergente y la dureza del agua, que se usan realmente en hogares en un segmento del mercado de detergentes.

El término “estabilidad” incluye estabilidad durante el almacenamiento y estabilidad durante el uso, *p. ej.*, durante un proceso de lavado, y refleja la estabilidad de la variante de ADNasa según la invención en función del tiempo, *p. ej.*, cuánta actividad se retiene cuando la variante de ADNasa se mantiene en solución, en particular en una solución detergente. La estabilidad está influenciada por muchos factores, *p. ej.*, pH, temperatura, composición detergente, *p. ej.*, cantidad de aditivo reforzante de la detergencia, tensioactivos, etc. La estabilidad de la ADNasa puede medirse como se describe en los ejemplos 2, 3, 4 y 5. La expresión “estabilidad mejorada” o “estabilidad aumentada” se define en la presente descripción como una variante de ADNasa que muestra una mayor estabilidad en solución, con respecto a la estabilidad de la ADNasa precursora y/o con respecto al Id. de sec. n.º: 1, id. de sec. n.º: 27 o la Id. de sec. n.º: 28. “Estabilidad mejorada” y “estabilidad aumentada” incluyen estabilidad del detergente. La expresión “estabilidad del detergente” o “estabilidad del detergente mejorada” puede ser una mayor estabilidad de la actividad ADNasa en comparación con la ADNasa precursora. La estabilidad de ADNasa se mide como se describe en el ejemplo 2 a 5.

La expresión “variante sustancialmente pura” significa una preparación que contiene como máximo 10 %, como máximo 8 %, como máximo 6 %, como máximo 5 %, como máximo 4 %, como máximo 3 %, como máximo 2 %, como máximo 1 %, y como máximo 0,5 % en peso de otro material polipeptídico con el que está asociado de forma recombinante o natural. Preferiblemente, la variante es al menos 92 % pura, por ejemplo, al menos 94 % pura, al menos 95 % pura, al menos 96 % pura, al menos 97 % pura, al menos 98 % pura, al menos 99 %, al menos 99,5 % pura, y 100 % pura en peso del material polipeptídico total presente en la preparación. Las variantes de la presente invención están preferiblemente en una forma sustancialmente pura. Esto se puede conseguir, por ejemplo, preparando la variante por métodos recombinantes bien conocidos o por métodos de purificación clásicos.

El término “textil” se refiere a telas tejidas así como fibras cortadas y filamentos adecuados para su conversión o uso como hilos, telas tejidas, tricotadas y no tejidas. El término abarca hilos hechos de fibras tanto naturales como sintéticas (*p. ej.*, fabricadas). La expresión “materiales textiles” es un término general para fibras, productos intermedios de hilo, hilo, tejidos y productos hechos de tejidos (*p. ej.*, prendas de vestir y otros artículos).

La expresión “promotor de la transcripción” se usa para un promotor que es una región de ADN que facilita la transcripción de un gen particular. Los promotores de la transcripción se ubican típicamente cerca de los genes que regulan, en la misma cadena y antes (hacia la región 5' de la cadena codificante).

La expresión “terminador de la transcripción” se usa para una sección de la secuencia genética que marca el extremo del gen u operón del ADN genómico para la transcripción.

El término “variante” significa un polipéptido que tiene actividad ADNasa y que comprende una sustitución en una o más (*p. ej.*, varias) posiciones. Una sustitución significa la sustitución del aminoácido que ocupa una posición por un aminoácido diferente, una delección significa la eliminación de un aminoácido que ocupa una posición y una inserción significa añadir aminoácidos, *p. ej.*, de 1 a 10 aminoácidos, preferiblemente 1-3 aminoácidos adyacentes a un aminoácido que ocupa una posición. Las variantes de la presente invención tienen al menos 20 %, *p. ej.*, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 100 % de la actividad ADNasa del polipéptido maduro mostrado en la Id. de sec. n.º: 1. La expresión “variante de ADNasa” significa una ADNasa que tiene actividad de ADNasa y que comprende una alteración, es decir, una sustitución, inserción y/o eliminación en una o más (o una o varias) posiciones en comparación con la ADNasa precursora, *p. ej.*, en comparación con la Id. de sec. n.º: 1, id. de sec. n.º: 27 o la Id. de sec. n.º: 28.

La expresión “dureza del agua” o “grado de dureza” o “dH” o “°dH” como se usa en la presente descripción se refiere a grados de dureza alemanes. Un grado se define como 10 miligramos de óxido de calcio por litro de agua.

La expresión “ADNasa de tipo natural” significa una ADNasa expresada por un organismo de origen natural, tal como un hongo, bacteria, arquea, levadura, planta o animal que se encuentra en la naturaleza.

Convenciones para la designación de variantes

Para los fines de la presente invención, salvo que se indique lo contrario, el polipéptido descrito en la Id. de sec. n.º: 1 se utiliza para determinar el residuo de aminoácidos correspondiente en otra ADNasa. La secuencia de aminoácidos de otra ADNasa está alineada con el polipéptido descrito en la Id. de sec. n.º: 1 y, basándose en la alineación, el número de la posición del aminoácido correspondiente a cualquier resto de aminoácido del polipéptido descrito en la Id. de sec. n.º: 1 se determina usando, *p. ej.*, el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48: 443-453) según se implementa en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice *y col.*, 2000, *Trends Genet.* 16: 276-277), preferiblemente la versión 5.0.0 o una versión superior. Los parámetros utilizados tienen una penalización por apertura de hueco de 10, una penalización por extensión de hueco de 0,5 y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (versión para EMBOSS de BLOSUM62).

La identificación del correspondiente resto de aminoácido en otra ADNasa puede determinarse mediante una alineación de múltiples secuencias de polipéptidos usando varios programas informáticos que incluyen, aunque no de forma limitativa, MUSCLE (comparación múltiple de secuencias según el logaritmo de la expectativa; versión 3.5 o posterior; Edgar, 2004, *Nucleic Acids Research* 32: 1792-1797), MAFFT (versión 6.857 o posterior; Katoh y Kuma, 2002, *Nucleic Acids Research* 30: 3059-3066; Katoh *y col.*, 2005, *Nucleic Acids Research* 33: 511-518; Katoh y Toh, 2007, *Bioinformatics* 23: 372-374; Katoh *y col.*, 2009, *Methods in Molecular Biology* 537: 39-64; Katoh y Toh, 2010, *Bioinformatics* 26: 1899-1900) y EMBOSS EMMA que emplea ClustalW (1.83 o posterior; Thompson *y col.*, 1994, *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680), utilizando sus respectivos parámetros predeterminados.

Cuando la otra enzima se ha separado del polipéptido de la Id. de sec. n.º: 1 de tal forma que la comparación tradicional basada en secuencias no consigue detectar su relación (Lindahl y Elofsson, 2000, *J. Mol. Biol.* 295: 613-615), se pueden usar otros algoritmos de comparación de emparejamiento de secuencias. Se puede conseguir una mayor sensibilidad en la búsqueda basada en secuencias usando programas de búsqueda que utilizan representaciones probabilísticas de familias de polipéptidos (perfiles) para buscar en bases de datos. Por ejemplo, el programa PSI-BLAST genera perfiles mediante un proceso iterativo de búsqueda en bases de datos y puede detectar homólogos remotos (Atschul *y col.*, 1997, *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402). Se puede conseguir incluso una mayor sensibilidad si la familia o superfamilia del polipéptido tiene uno o más representantes en las bases de datos de estructuras proteicas. Programas tales como GenTHREADER (Jones, 1999, *J. Mol. Biol.* 287: 797-815; McGuffin *y Jones*, 2003, *Bioinformatics* 19: 874-881) utilizan la información de una variedad de fuentes (PSI-BLAST, predicción de estructura secundaria, perfiles de alineamiento estructural, y potenciales de solvatación) como entrada de una red neuronal que predice el plegado estructural de una secuencia solicitada. Análogamente, el método de Gough *y col.*, 2000, *J. Mol. Biol.* 313: 903-919, se puede usar para alinear una secuencia de estructura desconocida con los modelos de la superfamilia presentes en la base de datos SCOP. A su vez, estos alineamientos se pueden usar para generar modelos de homología del polipéptido, y dichos modelos se pueden evaluar para determinar la precisión usando una variedad de herramientas desarrolladas a tal fin.

Para las proteínas de estructura conocida, están disponibles diferentes herramientas y recursos para recuperar y generar alineamientos estructurales. Por ejemplo, las superfamilias de proteínas SCOP se han alineado estructuralmente, y dichas alineaciones están disponibles y se pueden descargar. Se pueden alinear dos o más estructuras proteicas usando una variedad de algoritmos tal como la matriz de distancia de alineamiento (Holm *y Sander*, 1998, *Proteins* 33: 88-96) o extensión combinatoria (Shindyalov *y Bourne*, 1998, *Protein Engineering* 11: 739-747) y la implementación de dichos algoritmos se puede utilizar adicionalmente para investigar bases de datos de estructuras con una estructura de interés para descubrir posibles homólogos estructurales (*p. ej.*, Holm *y Park*, 2000, *Bioinformatics* 16: 566-567).

Como pueden estar presentes diferentes aminoácidos en una posición dada dependiendo del precursor seleccionado para las variantes, las posiciones de aminoácidos se indican con #₁, #₂, etc. en las siguientes definiciones. En la descripción de las variantes de la presente invención, la nomenclatura que se describe más adelante está adaptada para facilitar la referencia. Se emplean las abreviaturas de aminoácidos de una sola letra o de tres letras aceptadas por la IUPAC. Las posiciones de aminoácidos se indican con #₁, #₂, etc.

Sustituciones: En las sustituciones de aminoácidos se utiliza la siguiente nomenclatura: Aminoácido original, posición, aminoácido sustituido. Por consiguiente, la sustitución de valina en la posición #₁ por alanina se designa como "Val#₁Ala" o "V#₁A". Se separan múltiples mutaciones con marcas de adición ("+") o por comas (,), *p. ej.*, "Val#₁Ala" + "Pro#₂Gly" o V#₁A, P#₂G, que representan sustituciones en las posiciones #₁ y #₂ de valina (V) y prolina (P) por alanina (A) y glicina (G), respectivamente. Si más de un aminoácido puede sustituirse en una posición dada, estos se enumeran entre paréntesis, tales como [X] o {X}. Por lo tanto, si tanto Trp como Lys pueden estar sustituidos en lugar del aminoácido que ocupa la posición #₁, esto se indica como X#₁ {W, K}, X#₁ [W, K] o X#₁ [W/K], donde X indica el residuo de aminoácido presente en la posición de la ADNasa precursora *p. ej.*, tal como una ADNasa mostrada en la Id. de sec. n.º: 1 o una ADNasa que tiene al menos 60 % de identidad con la misma. En algunos casos, las variantes pueden representarse como #₁ {W, K} o X#₂P indica que los aminoácidos a sustituir varían dependiendo de la precursora. Por conveniencia, puesto que la Id. de sec. n.º: 1 se usa para numerar las sustituciones, el aminoácido en la posición correspondiente de la Id. de sec. n.º: 1 se indica, *p. ej.*, T1A. Sin embargo, será evidente para el experto en la técnica que una variante de ADNasa que comprende T1A no se limita a las ADNasas precursoras que tienen treonina en una posición correspondiente a la posición 1 de la Id. de sec. n.º: 1. En una ADNasa precursora que tiene, *p. ej.*, asparagina en la posición 1, la persona experta traduciría la mutación

especificada como T1A a N1A. En caso de que la ADNasa precursora tenga alanina en la posición 1, el experto reconocerá que la ADNasa precursora no cambia en esta posición. Lo mismo se aplica para las delecciones e inserciones descritas a continuación. En la presente descripción, salvo que se indique lo contrario, la numeración es según la Id. de sec. n.º 1.

Delecciones: En las delecciones de aminoácidos se utiliza la siguiente nomenclatura: Aminoácido original, posición, *. Por consiguiente, la delección de valina en la posición #₁ se designa como “Val#₁” o “V#₁”. Las delecciones múltiples se separan con marcas de adición (“+”) o comas, *p. ej.*, “Val#₁* + Pro#₂” o “V#₁*, P#₂”.

Inserciones: La inserción de un residuo de aminoácido adicional, tal como *p. ej.* una lisina después de Val#₁ puede indicarse por: Val#₁ValLys o V#₁VK. Alternativamente, la inserción de un residuo de aminoácido adicional tal como lisina después de V#₁ puede indicarse por: *#₁aK. Cuando se inserta más de un residuo de aminoácido, tal como *p. ej.* una Lys, y Gly después de #₁, esto puede indicarse como: Val#₁ValLysGly o V#₁VKG. En dichos casos, el uno o más residuos de aminoácidos insertados también se pueden numerar por la adición de letras en minúscula al número de posición del residuo de aminoácido que precede al uno o más residuos de aminoácidos insertados, en este ejemplo: *#₁aK *#₁bG.

Múltiples alteraciones: Las variantes que comprenden múltiples alteraciones se separan con marcas de adición (“+”) o por comas (,), *p. ej.*, “Val#₁Trp+Pro#₂Gly” o “V#₁W, P#₂G” representa una sustitución de valina y prolina en las posiciones #₁ y #₂ por triptófano y glicina, respectivamente como se ha descrito anteriormente.

Diferentes alteraciones: Cuando se pueden introducir diferentes alteraciones en una posición, las diferentes alteraciones pueden separarse por una coma, *p. ej.*, “Val#₁Trp, Lys” o V#₁W, K que representa una sustitución de valina en la posición #₁ con triptófano o lisina. Por lo tanto, “Val#₁Trp, Lys + Pro#₂Asp” designa las siguientes variantes: “Val#₁Trp+Pro#₂Asp”, “Val#₁Lys+Pro#₂Asp” o V#₁W, K + P#₂D.

Específico para la nomenclatura de clados

Para los fines de la presente invención, la nomenclatura [IV] o [I/V] significa que el aminoácido en esa posición puede ser isoleucina (Ile, I) o valina (Val, V). Asimismo, la nomenclatura [LVI] y [L/V/I] significa que el aminoácido en esta posición puede ser una leucina (Leu, L), valina (Val, V) o isoleucina (Ile, I), etc. para otras combinaciones como se describe en la presente descripción. Salvo que se limite de otro modo adicionalmente, el aminoácido X se define de tal manera que puede ser cualquiera de los 20 aminoácidos naturales.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona una composición detergente, un método para preparar una composición detergente y un método de limpieza de superficies que comprende novedosas ADNasas preferiblemente obtenidas de *Bacillus*, en particular, *Bacillus cibi*. Las ADNasas preferidas adecuadas para usar en la invención comprenden al menos un 60 % de identidad de secuencia con un polipéptido con la Id. de sec. n.º 1 y comprenden al menos una alteración en una posición de aminoácido en comparación con la ADNasa que tiene la Id. de sec. n.º 1. Una variante de ADNasa adecuada para su uso en la invención puede comprender una alternancia en al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 posiciones equivalentes a una posición en la Id. de sec. n.º 1. La alteración es preferiblemente una sustitución. Las variantes de ADNasa preferidas adecuadas para usar en la presente invención tienen al menos una propiedad mejorada en comparación con la ADNasa precursora o en comparación con la Id. de sec. n.º 1. Las propiedades incluyen, aunque no de forma limitativa: estabilidad tales como; estabilidad en detergentes, estabilidad de almacenamiento, estabilidad durante el lavado y estabilidad térmica, capacidad limpiadora en particular, capacidad limpiadora profunda, mayor nivel de expresión y reducción de malos olores. La presente invención puede usarse como un uso secundario incluso para reducir la adhesión o aumentar la eliminación de microorganismos tales como bacterias.

Variantes de ADNasa

Las variantes de ADNasa adecuadas para usar en las composiciones de la invención son preferiblemente variantes de Id. de sec. n.º 1 o variantes de una ADNasa que tiene al menos un 60 % de identidad con la misma.

Preferiblemente, la variante de ADNasa útil en la presente invención comprende más de dos alteraciones (en comparación con la Id. de sec. n.º 1), tales como al menos tres alteraciones, tales como al menos cuatro alteraciones, tales como al menos cinco alteraciones, tales como al menos seis alteraciones, tales como al menos siete alteraciones, tales como al menos ocho alteraciones, tales como al menos nueve alteraciones, tales como al menos diez alteraciones, tales como al menos once alteraciones, tales como al menos doce alteraciones, tales como al menos trece alteraciones, tales como al menos catorce alteraciones, tales como al menos dieciséis alteraciones, tales como al menos diecisiete alteraciones, tales como al menos dieciocho alteraciones, tales como al menos diecinueve alteraciones, tales como al menos veinte alteraciones, en donde la variante de ADNasa tiene al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al

menos el 90 %, al menos el 95 %, tal como al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 %, pero menos del 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º: 1.

En algunos aspectos preferidos, la alteración es una sustitución.

Preferiblemente, la variante de ADNasa que comprende una sustitución en una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte o más, posiciones seleccionadas de la lista que consiste en: 1, 4, 7, 8, 9, 13, 22, 25, 27, 32, 33, 39, 41, 42, 48, 56, 57, 59, 61, 65, 66, 76, 77, 78, 91, 101, 112, 106, 109, 116, 127, 130, 138, 140, 144, 147, 148, 154, 157, 159, 160, 162, 166, 167, 174, 175, 177, 178, 179, 180 y 181, en donde cada posición corresponde a la posición del polipéptido de la Id. de sec. n.º: 1, en donde la variante tiene actividad ADNasa. En algunos aspectos, la variante tiene una identidad de secuencia de al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, tal como al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 %, pero menor de 100 %, con respecto a la secuencia de aminoácidos de la ADNasa precursora.

En un aspecto preferido de la invención, la variante de ADNasa comprende una sustitución en uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte o más posiciones, seleccionada de la lista que consiste en: 4, 7, 8, 9, 27, 32, 33, 39, 41, 42, 48, 61, 65, 66, 78, 91, 101, 106, 109, 112, 127, 130, 138, 140, 147, 148, 154, 157, 159, 162, 174, 177, 179 y 180, en donde cada posición corresponde a la posición del polipéptido de la Id. de sec. n.º: 1, en donde la variante tiene actividad ADNasa. En algunos aspectos, la variante tiene una identidad de secuencia de al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, tal como al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 %, pero menor de 100 %, con respecto a la secuencia de aminoácidos de la ADNasa precursora.

En un aspecto preferido de la invención, la variante de ADNasa comprende, en comparación con la ADNasa mostrada en la Id. de sec. n.º: 1, al menos una, tal como al menos dos, tal como al menos tres, tal como al menos cuatro, tal como al menos cinco, tal como al menos seis, tal como al menos siete, tal como al menos ocho, tal como al menos nueve, tal como al menos diez, tal como al menos once, tal como al menos doce, tal como al menos trece, tal como al menos catorce, tal como al menos dieciséis, tal como al menos diecisiete, tal como al menos dieciocho, tal como al menos diecinueve, tal como al menos veinte o más sustituciones, en donde la una o más sustituciones se seleccionan de la lista que consiste en: G4K, S7G, K8R, S9I, N16G, S27K, S27R, D32F, D32I, D32L, D32R, D32V, S39C, G41P, S42H, D45E, Q48D, N61E, T65M, T65W, S66R, S66M, S66W, S66Y, S66V, F78L, P91L, S101N, S106L, S106R, S106H, Q109E, A112E, T127P, S130A, S130Y, T138D, Q140V, Q140G, A147P, C148A, W154Y, T157V, Y159A, Y159R, G162C, Q174N, L177Y, S179L y C180A, en donde cada posición corresponde a la posición del polipéptido de la Id. de sec. n.º: 1 y en donde la variante tiene una identidad de secuencia de al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, tal como al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 %, pero menor de 100 %, con respecto a la secuencia de aminoácidos de la ADNasa precursora.

En un aspecto preferido de la invención, la variante de ADNasa comprende, en comparación con la ADNasa mostrada en la Id. de sec. n.º: 27 al menos una, tal como al menos dos, tal como al menos tres, tal como al menos cuatro, tal como al menos cinco, tal como al menos seis, tal como al menos siete, tal como al menos ocho, tal como al menos nueve, tal como al menos diez, tal como al menos once, tal como al menos doce, tal como al menos trece, tal como al menos catorce, tal como al menos dieciséis, tal como al menos diecisiete, tal como al menos dieciocho, tal como al menos diecinueve, tal como al menos veinte o más sustituciones, en donde la una o más sustituciones se seleccionan de la lista que consiste en: G4K, S7G, K8R, S9I, N16G, S27K, S27R, D32F, D32I, D32L, D32R, D32V, S39C, G41P, S42H, D45E, Q48D, N61E, T65M, T65W, S66R, S66M, S66W, S66Y, S66V, F78L, P91L, S101N, S106L, S106R, S106H, Q109E, A112E, T127P, S130A, S130Y, T138D, Q140V, Q140G, A147P, C148A, W154Y, T157V, Y159A, Y159R, G162C, Q174N, L177Y, S179L y C180A, en donde cada posición corresponde a la posición del polipéptido de la Id. de sec. n.º: 27 y en donde la variante tiene una identidad de secuencia de al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, tal como al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 %, pero menor de 100 %, con respecto a la secuencia de aminoácidos de la ADNasa precursora.

En un aspecto preferido de la invención, la variante de ADNasa comprende, en comparación con la ADNasa mostrada en la Id. de sec. n.º: 28 al menos una, tal como al menos dos, tal como al menos tres, tal como al menos cuatro, tal como al menos cinco, tal como al menos seis, tal como al menos siete, tal como al menos ocho, tal como al menos nueve, tal como al menos diez, tal como al menos once, tal como al menos doce, tal como al menos trece, tal como al menos catorce, tal como al menos dieciséis, tal como al menos diecisiete, tal como al menos dieciocho, tal como al menos diecinueve, tal como al menos veinte o más sustituciones, en donde la una o más sustituciones se seleccionan de la lista que consiste en: G4K, S7G, K8R, S9I, N16G, S27K, S27R, D32F, D32I, D32L, D32R, D32V, S39C, G41P, S42H, D45E, Q48D, N61E, T65M, T65W, S66R, S66M, S66W, S66Y, S66V, F78L, P91L, S101N, S106L, S106R, S106H, Q109E, A112E, T127P, S130A, S130Y, T138D, Q140V, Q140G, A147P, C148A, W154Y, T157V, Y159A, Y159R, G162C, Q174N, L177Y, S179L y C180A, en donde cada posición corresponde a la posición del polipéptido de la Id. de sec. n.º: 28 y en donde la variante tiene una identidad de secuencia de al menos 60 %, al menos 65 %, al

menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, tal como al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 %, pero menor de 100 %, con respecto a la secuencia de aminoácidos de la ADNasa precursora.

5 Preferiblemente, la variante de ADNasa comprende, en comparación con la ADNasa mostrada en la Id. de sec. n.º 1, al menos una, tal como al menos dos, tal como al menos tres, tal como al menos cuatro, tal como al menos cinco, tal como al menos seis, tal como al menos siete, tal como al menos ocho, tal como al menos nueve, tal como al menos diez, tal como al menos once, tal como al menos doce, tal como al menos trece, tal como al menos catorce, tal como al menos dieciséis, tal como al menos diecisiete, tal como al menos dieciocho, tal como al menos diecinueve, tal como al menos veinte o más sustituciones, en donde la una o más sustituciones se seleccionan de la lista que consiste en: T1I, T1V, G4K, S7G, K8R, S9I, S13Y, T22P, S25P, S27L, S27R, D32I, D32L, D32R, D32V, S39P, S39C, G41P, S42G, S42H, S42C, Q48D, D56I, D56L, S57W, S59V, S59C, N61E, T65L, T65V, T65M, T65W, S66M, S66W, S66Y, S66V, V76L, T77Y, F78L, P91L, S101N, S106L, S106R, S106H, Q109R, A112E, S116D, T127V, S130A, S130Y, T138D, Q140V, Q140G, S144P, A147H, C148A, W154Y, T157V, Y159A, Y159R, K160V, G162S, G162D, G162C, Q166D, S167L, Q174N, G175D, G175N, L177Y, N178D, N178E, S179L, C180A, S181E y S181L, en donde la variante comprende L33R y en donde cada posición corresponde a la posición del polipéptido de la Id. de sec. n.º 1 y en donde la variante tiene una identidad de secuencia de al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, tal como al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 %, pero menor de 100 %, con respecto a la secuencia de aminoácidos de la ADNasa precursora.

En algunos aspectos preferidos de la invención, la variante de ADNasa comprende, en comparación con la ADNasa mostrada en la Id. de sec. n.º 1 al menos una, tal como al menos dos, tal como al menos tres, tal como al menos cuatro, tal como al menos cinco, tal como al menos seis, tal como al menos siete, tal como al menos octavo, tal como al menos nueve, tal como al menos diez, tal como al menos once, tal como al menos doce, tal como al menos trece, tal como al menos catorce, tal como al menos dieciséis, tal como al menos diecisiete, tal como al menos dieciocho, tal como al menos diecinueve, tal como al menos veinte o más sustituciones, en donde la una o más sustituciones se seleccionan de la lista que consiste en T1I, T1V, G4K, S7G, K8R, S9I, S13Y, T22P, S25P, S27L, S27R, D32I, D32L, D32R, D32V, S39P, S39C, G41P, S42G, S42H, S42C, Q48D, D56I, D56L, S57W, S59V, S59C, N61E, T65L, T65V, T65M, T65W, S66M, S66W, S66Y, S66V, V76L, T77Y, F78L, P91L, S101N, S106L, S106R, S106H, Q109R, A112E, S116D, T127V, S130A, S130Y, T138D, Q140V, Q140G, S144P, A147H, C148A, W154Y, T157V, Y159A, Y159R, K160V, G162S, G162D, G162C, Q166D, S167L, Q174N, G175D, G175N, L177Y, N178D, N178E, S179L, C180A, S181E y S181L, en donde la variante comprende L33R y en donde cada posición corresponde a la posición del polipéptido de la Id. de sec. n.º 1 y en donde la variante tiene una identidad de secuencia de al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, tal como al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 %, pero menor de 100 % con respecto a la ADNasa que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la Id. de sec. n.º 1.

En algunos aspectos preferidos de la invención, la variante de ADNasa comprende, en comparación con la ADNasa mostrada en la Id. de sec. n.º 1, al menos una, tal como al menos dos, tal como al menos tres, tal como al menos cuatro, tal como al menos cinco, tal como al menos seis, tal como al menos siete, tal como al menos ocho, tal como al menos nueve, tal como al menos diez, tal como al menos once, tal como al menos doce, tal como al menos trece, tal como al menos catorce, tal como al menos dieciséis, tal como al menos diecisiete, tal como al menos dieciocho, tal como al menos diecinueve, tal como al menos veinte o más sustituciones, en donde la una o más sustituciones se seleccionan de la lista que consiste en: G4K, S7G, K8R, S9I, N16G, S27K, S27R, D32F, D32I, D32L, D32R, D32V, S39C, G41P, S42H, D45E, Q48D, N61E, T65M, T65W, S66R, S66M, S66W, S66Y, S66V, F78L, P91L, S101N, S106L, S106R, S106H, Q109E, A112E, T127P, S130A, S130Y, T138D, Q140V, Q140G, A147P, C148A, W154Y, T157V, Y159A, Y159R, G162C, Q174N, L177Y, S179L y C180A, en donde cada posición corresponde a la posición del polipéptido de la Id. de sec. n.º 1 y en donde la variante tiene una identidad de secuencia de al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, tal como al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 %, pero menor de 100 %, con respecto a la secuencia de aminoácidos de la ADNasa con Id. de sec. n.º 1.

En algunos aspectos preferidos de la invención, la variante de ADNasa comprende, en comparación con la ADNasa mostrada en la Id. de sec. n.º 27 al menos una, tal como al menos dos, tal como al menos tres, tal como al menos cuatro, tal como al menos cinco, tal como al menos seis, tal como al menos siete, tal como al menos ocho, tal como al menos nueve, tal como al menos diez, tal como al menos once, tal como al menos doce, tal como al menos trece, tal como al menos catorce, tal como al menos dieciséis, tal como al menos diecisiete, tal como al menos dieciocho, tal como al menos diecinueve, tal como al menos veinte o más sustituciones, en donde la una o más sustituciones se seleccionan de la lista que consiste en: G4K, S7G, K8R, S9I, N16G, S27K, S27R, D32F, D32I, D32L, D32R, D32V, S39C, G41P, S42H, D45E, Q48D, N61E, T65M, T65W, S66R, S66M, S66W, S66Y, S66V, F78L, P91L, S101N, S106L, S106R, S106H, Q109E, A112E, T127P, S130A, S130Y, T138D, Q140V, Q140G, A147P, C148A, W154Y, T157V, Y159A, Y159R, G162C, Q174N, L177Y, S179L y C180A, en donde cada posición corresponde a la posición del polipéptido de la Id. de sec. n.º 27 y en donde la variante tiene una identidad de secuencia de al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, tal como al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 %, pero menor de 100 %, con respecto a la secuencia de aminoácidos de la Id. de sec. n.º 27.

En algunos aspectos preferidos de la invención, la variante de ADNasa comprende, en comparación con la ADNasa mostrada en la Id. de sec. n.º: 28 al menos una, tal como al menos dos, tal como al menos tres, tal como al menos cuatro, tal como al menos cinco, tal como al menos seis, tal como al menos siete, tal como al menos ocho, tal como al menos nueve, tal como al menos diez, tal como al menos once, tal como al menos doce, tal como al menos trece, tal como al menos catorce, tal como al menos dieciséis, tal como al menos diecisiete, tal como al menos dieciocho, tal como al menos diecinueve, tal como al menos veinte o más sustituciones, en donde la una o más sustituciones se seleccionan de la lista que consiste en: G4K, S7G, K8R, S9I, N16G, S27K, S27R, D32F, D32I, D32L, D32R, D32V, S39C, G41P, S42H, D45E, Q48D, N61E, T65M, T65W, S66R, S66M, S66W, S66Y, S66V, F78L, P91L, S101N, S106L, S106R, S106H, Q109E, A112E, T127P, S130A, S130Y, T138D, Q140V, Q140G, A147P, C148A, W154Y, T157V, Y159A, Y159R, G162C, Q174N, L177Y, S179L y C180A, en donde cada posición corresponde a la posición del polipéptido de la Id. de sec. n.º: 28 y en donde la variante tiene una identidad de secuencia de al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, tal como al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 %, pero menor de 100 %, con respecto a la secuencia de aminoácidos de la Id. de sec. n.º: 28.

En algunos aspectos, el número de sustituciones en las variantes de la presente invención es 2-20, *p. ej.*, 2-10 y 2-5, tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 sustituciones.

La invención se refiere además a composiciones detergentes en donde la variante comprende una variante de una precursora que comprende la Id. de sec. n.º: 1 en donde la variante comprende una o más sustituciones en comparación con la Id. de sec. n.º: 1 seleccionada de las posiciones: 4, 7, 8, 9, 27, 32, 33, 39, 41, 42, 48, 61, 65, 66, 78, 91, 101, 106, 109, 112, 127, 130, 138, 140, 147, 148, 154, 157, 159, 162, 174, 177, 179 y 180, correspondientes a las posiciones de la Id. de sec. n.º: 1, en donde la variante tiene al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 % o al menos 95 % de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos mostrada en la Id. de sec. n.º: 1, en donde la variante tiene actividad ADNasa y en donde la variante tiene al menos una propiedad mejorada en comparación con la ADNasa de Id. de sec. n.º: 1.

La invención se refiere además a composiciones detergentes en donde la variante es una variante de una precursora que comprende la Id. de sec. n.º: 27 en donde la variante comprende una o más sustituciones en comparación con la Id. de sec. n.º: 27 seleccionada de las posiciones: 4, 7, 8, 9, 27, 32, 33, 39, 41, 42, 48, 61, 65, 66, 78, 91, 101, 106, 109, 112, 127, 130, 138, 140, 147, 148, 154, 157, 159, 162, 174, 177, 179 y 180, correspondientes a las posiciones de la Id. de sec. n.º: 27, en donde la variante tiene al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 % o al menos 95 % de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos mostrada en la Id. de sec. n.º: 27, en donde la variante tiene actividad ADNasa y en donde la variante tiene al menos una propiedad mejorada en comparación con la ADNasa de Id. de sec. n.º: 27.

La invención se refiere además a composiciones detergentes que comprenden una variante de una ADNasa precursora que comprende la Id. de sec. n.º: 28 en donde la variante comprende una o más sustituciones en comparación con la Id. de sec. n.º: 28 seleccionada de las posiciones: 4, 7, 8, 9, 27, 32, 33, 39, 41, 42, 48, 61, 65, 66, 78, 91, 101, 106, 109, 112, 127, 130, 138, 140, 147, 148, 154, 157, 159, 162, 174, 177, 179 y 180, correspondientes a las posiciones de la Id. de sec. n.º: 28, en donde la variante tiene al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 % o al menos 95 % de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos mostrada en la Id. de sec. n.º: 28, en donde la variante tiene actividad ADNasa y en donde la variante tiene al menos una propiedad mejorada en comparación con la ADNasa de Id. de sec. n.º: 28.

La invención se refiere además a una composición que comprende un adyuvante de limpieza y una variante de una ADNasa precursora que comprende la Id. de sec. n.º: 1 en donde la variante comprende una sustitución en comparación con la Id. de sec. n.º: 1 en al menos una posición seleccionada de las posiciones: 1, 4, 7, 8, 9, 13, 22, 25, 27, 32, 33, 39, 41, 42, 48, 56, 57, 59, 61, 65, 66, 76, 77, 78, 91, 101, 106, 109, 112, 116, 127, 130, 138, 140, 144, 147, 148, 154, 157, 159, 160, 162, 166, 167, 174, 175, 177, 178, 179, 180 y 181, correspondientes a las posiciones de la Id. de sec. n.º: 1, en donde la variante tiene al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 % o al menos 95 % de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos mostrada en la Id. de sec. n.º: 1, en donde la variante tiene actividad ADNasa y en donde la variante tiene al menos una propiedad mejorada en comparación con la ADNasa de Id. de sec. n.º: 1. La invención se refiere además a una composición detergente que comprende al menos 2; o al menos 3; o al menos 4; o al menos 5; o al menos 6; o al menos 7; o al menos 8; o al menos 9; o al menos 10; o al menos 11; o al menos 12; o al menos 13; o al menos 14; o al menos 15; o al menos 16; o al menos 17; o al menos 18; o al menos 19 sustituciones seleccionadas de las posiciones: 1, 4, 7, 8, 9, 13, 22, 25, 27, 32, 33, 39, 41, 42, 48, 56, 57, 59, 61, 65, 66, 76, 77, 78, 91, 101, 106, 109, 112, 116, 127, 130, 138, 140, 144, 147, 148, 154, 157, 159, 160, 162, 166, 167, 174, 175, 177, 178, 179, 180 y 181 correspondientes a las posiciones de la Id. de sec. n.º: 1, en donde la variante tiene al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 % o al menos 95 % de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos mostrada en la Id. de sec. n.º: 1, en donde la variante tiene actividad ADNasa y en donde la variante tiene al menos una propiedad mejorada en comparación con la ADNasa de Id. de sec. n.º: 1.

La invención se refiere además a una composición detergente que comprende una variante de ADNasa, en donde la variante comprende al menos una sustitución en comparación con la Id. de sec. n.º 1, en donde la sustitución se selecciona del grupo que consiste en: T1I, T1V, G4K, S7G, K8R, S9I, S13Y, T22P, S25P, S27L, S27R, D32I, D32L, D32R, D32V, S39P, S39C, G41P, S42G, S42H, S42C, Q48D, D56I, D56L, S57W, S59V, S59C, T65L, T65V, T65M, T65W, S66M, S66W, S66Y, S66V, V76L, T77Y, F78L, P91L, S101N, S106L, S106R, S106H, Q109R, A112E, S116D, T127V, S130A, S130Y, T138D, Q140V, Q140G, S144P, A147H, C148A, W154Y, T157V, Y159A, Y159R, K160V, G162S, G162D, G162C, Q166D, S167L, Q174N, G175D, G175N, L177Y, N178D, N178E, S179L, C180A, S181E y S181L, en donde la variante comprende L33R y en donde las posiciones correspondientes a las posiciones de la Id. de sec. n.º 1, en donde la variante tiene al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 % o al menos 95 % de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos mostrada en la Id. de sec. n.º 1, en donde la variante tiene actividad ADNasa y en donde la variante tiene al menos una propiedad mejorada en comparación con la ADNasa de Id. de sec. n.º 1.

La invención se refiere además a una composición detergente que comprende una variante de ADNasa, en donde la variante comprende al menos una sustitución en comparación con la Id. de sec. n.º 1, en donde la sustitución se selecciona del grupo que consiste en: G4K, S7G, K8R, S9I, N16G, S27K, S27R, D32F, D32I, D32L, D32R, D32V, S39C, G41P, S42H, D45E, Q48D, N61E, T65M, T65W, S66R, S66M, S66W, S66Y, S66V, F78L, P91L, S101N, S106L, S106R, S106H, Q109E, A112E, T127P, S130A, S130Y, T138D, Q140V, Q140G, A147P, C148A, W154Y, T157V, Y159A, Y159R, G162C, Q174N, L177Y, S179L y C180A, en donde las posiciones correspondientes a las posiciones de la Id. de sec. n.º 1, en donde la variante tiene al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 % o al menos 95 % de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos mostrada en la Id. de sec. n.º 1, en donde la variante tiene actividad ADNasa y en donde la variante tiene al menos una propiedad mejorada en comparación con la ADNasa de Id. de sec. n.º 1.

La invención se refiere además a una composición detergente que comprende una variante de ADNasa, en donde la variante comprende al menos una sustitución en comparación con la Id. de sec. n.º 27, en donde la sustitución se selecciona del grupo que consiste en: G4K, S7G, K8R, S9I, N16G, S27K, S27R, D32F, D32I, D32L, D32R, D32V, S39C, G41P, S42H, D45E, Q48D, N61E, T65M, T65W, S66R, S66M, S66W, S66Y, S66V, F78L, P91L, S101N, S106L, S106R, S106H, Q109E, A112E, T127P, S130A, S130Y, T138D, Q140V, Q140G, A147P, C148A, W154Y, T157V, Y159A, Y159R, G162C, Q174N, L177Y, S179L y C180A, en donde las posiciones correspondientes a las posiciones de la Id. de sec. n.º 27, en donde la variante tiene al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 % o al menos 95 % de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos mostrada en la Id. de sec. n.º 27, en donde la variante tiene actividad ADNasa y en donde la variante tiene al menos una propiedad mejorada en comparación con la ADNasa de Id. de sec. n.º 27.

La invención se refiere además a una composición detergente que comprende una variante de ADNasa, en donde la variante comprende al menos una sustitución en comparación con la Id. de sec. n.º 28, en donde la sustitución se selecciona del grupo que consiste en: G4K, S7G, K8R, S9I, N16G, S27K, S27R, D32F, D32I, D32L, D32R, D32V, S39C, G41P, S42H, D45E, Q48D, N61E, T65M, T65W, S66R, S66M, S66W, S66Y, S66V, F78L, P91L, S101N, S106L, S106R, S106H, Q109E, A112E, T127P, S130A, S130Y, T138D, Q140V, Q140G, A147P, C148A, W154Y, T157V, Y159A, Y159R, G162C, Q174N, L177Y, S179L y C180A, en donde las posiciones correspondientes a las posiciones de la Id. de sec. n.º 28, en donde la variante tiene al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 % o al menos 95 % de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos mostrada en la Id. de sec. n.º 28, en donde la variante tiene actividad ADNasa y en donde la variante tiene al menos una propiedad mejorada en comparación con la ADNasa de Id. de sec. n.º 28.

La invención se refiere además a una composición detergente que comprende una variante de ADNasa, en donde la variante comprende al menos 2; o al menos 3; o al menos 4; o al menos 5; o al menos 6; o al menos 7; o al menos 8; o al menos 9; o al menos 10; o al menos 11; o al menos 12; o al menos 13; o al menos 14; o al menos 15; o al menos 16; o al menos 17; o al menos 18; o al menos 19; o al menos 20 sustituciones en comparación con la Id. de sec. n.º 1, en donde las sustituciones se seleccionan de la lista que consiste en: T1I, T1V, G4K, S7G, K8R, S9I, S13Y, T22P, S25P, S27L, L27R, D32I, D32L, D32R, D32V, S39P, S39C, G41P, S42G, S42H, S42C, Q48D, D56I, D56L, S57W, S59V, S59C, N61E, T65L, T65V, T65M, T65W, S66M, S66W, S66Y, S66V, V76L, T77Y, F78L, P91L, S101N, S106L, S106R, S106H, Q109R, A112E, S116D, T127V, S130A, S130Y, T138D, Q140V, Q140G, S144P, A147H, C148A, W154Y, T157V, Y159A, Y159R, K160V, G162S, G162D, G162C, Q166D, S167L, Q174N, G175D, G175N, L177Y, N178D, N178E, S179L, C180A, S181E y S181L, en donde la variante comprende L33R y en donde las posiciones correspondientes a las posiciones de la Id. de sec. n.º 1, en donde la variante tiene al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 % o al menos 95 % de identidad de secuencia respecto de la secuencia de aminoácidos mostrada en la Id. de sec. n.º 1, en donde la variante tiene actividad ADNasa y en donde la variante tiene al menos una propiedad mejorada en comparación con la ADNasa de Id. de sec. n.º 1.

En algunos aspectos, la propiedad mejorada es mayor estabilidad, *p. ej.*, mejora en la estabilidad del detergente, mejora en la estabilidad durante el lavado y mejora en la termoestabilidad. Algunos aspectos de la invención se refieren a variantes de ADNasa que tienen un factor de mejora superior a 1 cuando las variantes de ADNasa se someten a ensayo para determinar una propiedad de interés en un ensayo relevante, en donde la propiedad de la ADNasa de referencia recibe un valor de 1. En algunos aspectos, la propiedad es estabilidad, tal como estabilidad de almacenamiento.

En algunos aspectos, la propiedad mejorada es una estabilidad del detergente mejorada.

En algunos aspectos, la propiedad mejorada es una estabilidad de proteasa mejorada.

En algunos aspectos, la propiedad mejorada es una mejora de la estabilidad en presencia de sulfito.

Una variante según la invención está mejorada en las condiciones medidas cuando la relación de actividad residual, definida como

$$\text{Relación de actividad residual (RAR)} = \frac{RA_{\text{variante}}}{RA_{\text{referencia}}}$$

es superior a 1 en comparación con la ADNasa de referencia, como se muestra en los Ejemplos 2, 3 y 4. En algunos aspectos, la variante está mejorada en comparación con la ADNasa de referencia en al menos uno de los ensayos A, B o C, donde el Ensayo A mide la mejora en la estabilidad de la proteasa, el ensayo B mide la mejora de la estabilidad en presencia de sulfito y el Ensayo C mide la mejora en la estabilidad del detergente, como se muestra en los Ejemplos 2, 3 y 4. En algunos aspectos, la variante está mejorada en comparación con la ADNasa de referencia en al menos dos de los ensayos A, B o C, donde el Ensayo A mide la mejora en la estabilidad de la proteasa (ejemplo 3), el ensayo B mide la mejora de la estabilidad en presencia de sulfito (ejemplo 4) y el Ensayo C (ejemplo 2) mide la mejora en la estabilidad del detergente, como se muestra en los Ejemplos 2, 3 y 4. En algunos aspectos, la variante está mejorada en comparación con la ADNasa de referencia en todos los ensayos A, B o C, donde el Ensayo A mide la mejora en la estabilidad de la proteasa, el ensayo B mide la mejora de la estabilidad en presencia de sulfito y el ensayo C mide la mejora en la estabilidad del detergente, como se muestra en los Ejemplos 2, 3 y 4.

En algunos aspectos, las variantes según la invención tienen una mejora en la estabilidad con respecto a una ADNasa de referencia medida como una relación de actividad residual superior a 1,0.

Las combinaciones productivas de mutaciones según las variantes preferidas para su uso en la invención son aquellas que dan como resultado una relación de actividad residual superior a 1 cuando se mide con respecto a la ADNasa de referencia o, dicho de otra manera, donde la combinación de mutaciones da como resultado una variante que tiene al menos una propiedad mejorada en comparación con la molécula de partida, es decir, el precursor, precursor de referencia, etc. En un aspecto preferido, la combinación de mutaciones según la invención da como resultado variantes de ADNasa que tienen una relación de actividad residual > 1,0, con respecto a la ADNasa de referencia. En algunos aspectos, las variantes según la invención tienen una relación de actividad residual que es al menos 1,1; 1,2; 1,3; 1,4; 1,5; 1,6; 1,7; 1,8; 1,9; 2,0; 2,1; 2,2; 2,3; 2,4; 2,5; 2,6; 2,7; 2,8; 2,9; 3,0; 3,1; 3,2; 3,3; 3,4; 3,5; 3,6; 3,7; 3,8; 3,9; 4,0; 4,1; 4,2; 4,3; 4,4; 4,5; 4,6; 4,7; 4,8; 4,9; 5,0; 5,1; 5,2; 5,3; 5,4; 5,5; 5,6; 5,7; 5,8; 5,9; 6,0; 6,1; 6,2; 6,3; 6,4; 6,5; 6,6; 6,7; 6,8; 6,9; 7,0; 7,1; 7,2; 7,3; 7,4; 7,5; 7,6; 7,7; 7,8; 7,9; 8,0; 8,1; 8,2; 8,3; 8,4; 8,5; 8,6; 8,7; 8,8; 8,9; 9,0; 9,1; 9,2; 9,3; 9,4; 9,5; 9,6; 9,7; 9,8; 9,9; 10,0; 10,1; 10,2; 10,3; 10,4; 10,5; 10,6; 10,7; 10,8; 10,9; 12; 15; 16; 20; 25 o 30, en comparación con la ADNasa de referencia.

En algunos aspectos preferidos, la variante de ADNasa puede comprender una alteración en uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte o más posiciones seleccionadas de la lista que consiste en 1, 4, 7, 8, 9, 13, 22, 25, 27, 32, 33, 39, 41, 42, 48, 56, 57, 59, 61, 65, 66, 76, 77, 78, 91, 101, 106, 109, 112, 116, 127, 130, 138, 140, 144, 147, 148, 154, 157, 159, 160, 162, 166, 167, 174, 175, 177, 178, 179, 180 y 181, en donde cada posición corresponde a la posición del polipéptido de la Id. de sec. n.º: 1, en donde la variante tiene una identidad de secuencia de al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, tal como al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 %, pero menor de 100 %, con respecto al polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º: 1, en donde cada posición corresponde a la posición del polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º: 1 (numeración según la Id. de sec. n.º: 1) y en donde la variante tiene al menos una propiedad mejorada en comparación con la ADNasa precursora, p. ej., una ADNasa que comprende el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la Id. de sec. n.º: 1, preferiblemente la propiedad mejorada es una mejora en la estabilidad, en donde la estabilidad se somete a ensayo como se describe en los ejemplos 2, 3 y 4.

En algunos aspectos preferidos, la variante de ADNasa comprende al menos una sustitución, tal como al menos dos sustituciones, tal como al menos tres, tal como al menos cuatro, tal como al menos cinco, tal como al menos seis, tal como al menos siete, tal como al menos ocho, tal como al menos nueve, tal como al menos diez, tal como al menos once, tal como al menos doce, tal como al menos trece, tal como al menos catorce, tal como al menos dieciséis, tal como al menos diecisiete, tal como al menos dieciocho, tal como al menos diecinueve, tal como al menos veinte o más sustituciones (en comparación con la Id. de sec. n.º: 1), en donde las sustituciones se seleccionan del grupo que consiste en: T1I, T1V, G4K, S7G, K8R, S9I, S13Y, T22P, S25P, S27L, L27R, D32I, D32L, D32R, D32V, S39P, S39C, G41P, S42G, S42H, S42C, Q48D, D56I, D56L, S57W, S59V, S59C, N61E, T65L, T65V, T65M, T65W, S66M, S66W, S66Y, S66V, V76L, T77Y, F78L, P91L, S101N, S106L, S106R, S106H, Q109R, A112E, S116D, T127V, S130A, S130Y, T138D, Q140V, Q140G, S144P, A147H, C148A, W154Y, T157V, Y159A, Y159R, K160V, G162S, G162D, G162C, Q166D, S167L, Q174N, G175D, G175N, L177Y, N178D, N178E, S179L, C180A, S181E y S181L, en donde la variante comprende L33R y en donde la

variante tiene al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, tal como al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % pero menos del 100 % de identidad de secuencia respecto del polipéptido mostrado en la Id de sec n.º: 1, en donde cada posición corresponde a la posición del polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º: 1 (numeración según la Id. de sec. n.º: 1) y en donde la variante tiene al menos una propiedad mejorada en comparación con la ADNasa precursora, p. ej., una ADNasa que comprende el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la Id. de sec. n.º: 1, preferiblemente la propiedad mejorada es una mejora en la estabilidad, en donde la estabilidad se somete a ensayo como se describe en los ejemplos 2, 3 y 4.

En algunos aspectos preferidos, una variante de ADNasa para usar en la invención comprende al menos una sustitución, tal como al menos dos sustituciones, tal como al menos tres, tal como al menos cuatro, tal como al menos cinco, tal como al menos seis, tal como al menos siete, tal como al menos ocho, tal como al menos nueve, tal como al menos diez, tal como al menos once, tal como al menos doce, tal como al menos trece, tal como al menos catorce, tal como al menos dieciséis, tal como al menos diecisiete, tal como al menos dieciocho, tal como al menos diecinueve, tal como al menos veinte o más sustituciones (en comparación con la Id. de sec. n.º: 27), en donde las sustituciones se seleccionan del grupo que consiste en: G4K, S7G, K8R, S9I, N16G, S27K, S27R, D32F, D32I, D32L, D32R, D32V, S39C, G41P, S42H, D45E, Q48D, N61E, T65M, T65W, S66R, S66M, S66W, S66Y, S66V, F78L, P91L, S101N, S106L, S106R, S106H, Q109E, A112E, T127P, S130A, S130Y, T138D, Q140V, Q140G, A147P, C148A, W154Y, T157V, Y159A, Y159R, G162C, Q174N, L177Y, S179L y C180A, en donde la variante tiene al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, tal como al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % pero menos del 100 % de identidad de secuencia respecto del polipéptido mostrado en la Id de sec n.º: 27, en donde cada posición corresponde a la posición del polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º: 27 (numeración según la Id. de sec. n.º: 27) y en donde la variante tiene al menos una propiedad mejorada en comparación con la ADNasa precursora, p. ej., una ADNasa que comprende el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la Id. de sec. n.º: 27, preferiblemente la propiedad mejorada es una mejora en la estabilidad, en donde la estabilidad se somete a ensayo como se describe en los ejemplos 2, 3 y 4.

En algunos aspectos preferidos, una variante de ADNasa para usar en la invención comprende al menos una sustitución, tal como al menos dos sustituciones, tal como al menos tres, tal como al menos cuatro, tal como al menos cinco, tal como al menos seis, tal como al menos siete, tal como al menos ocho, tal como al menos nueve, tal como al menos diez, tal como al menos once, tal como al menos doce, tal como al menos trece, tal como al menos catorce, tal como al menos dieciséis, tal como al menos diecisiete, tal como al menos dieciocho, tal como al menos diecinueve, tal como al menos veinte o más sustituciones (en comparación con la Id. de sec. n.º: 28), en donde las sustituciones se seleccionan del grupo que consiste en: G4K, S7G, K8R, S9I, N16G, S27K, S27R, D32F, D32I, D32L, D32R, D32V, S39C, G41P, S42H, D45E, Q48D, N61E, T65M, T65W, S66R, S66M, S66W, S66Y, S66V, F78L, P91L, S101N, S106L, S106R, S106H, Q109E, A112E, T127P, S130A, S130Y, T138D, Q140V, Q140G, A147P, C148A, W154Y, T157V, Y159A, Y159R, G162C, Q174N, L177Y, S179L y C180A, en donde la variante tiene al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, tal como al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % pero menos del 100 % de identidad de secuencia respecto del polipéptido mostrado en la Id de sec n.º: 27, en donde cada posición corresponde a la posición del polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º: 27 (numeración según la Id. de sec. n.º: 27) y en donde la variante tiene al menos una propiedad mejorada en comparación con la ADNasa precursora, p. ej., una ADNasa que comprende el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la Id. de sec. n.º: 27, preferiblemente la propiedad mejorada es una mejora en la estabilidad, en donde la estabilidad se somete a ensayo como se describe en los ejemplos 2, 3 y 4.

En algunos aspectos preferidos, una variante de ADNasa de la invención comprende al menos una sustitución, tal como al menos dos sustituciones, tal como al menos tres, tal como al menos cuatro, tal como al menos cinco, tal como al menos seis, tal como al menos siete, tal como al menos ocho, tal como al menos nueve, tal como al menos diez, tal como al menos once, tal como al menos doce, tal como al menos trece, tal como al menos catorce, tal como al menos dieciséis, tal como al menos diecisiete, tal como al menos dieciocho, tal como al menos diecinueve, tal como al menos veinte o más sustituciones (en comparación con la Id. de sec. n.º: 28), en donde las sustituciones se seleccionan del grupo que consiste en: G4K, S7G, K8R, S9I, N16G, S27K, S27R, D32F, D32I, D32L, D32R, D32V, S39C, G41P, S42H, D45E, Q48D, N61E, T65M, T65W, S66R, S66M, S66W, S66Y, S66V, F78L, P91L, S101N, S106L, S106R, S106H, Q109E, A112E, T127P, S130A, S130Y, T138D, Q140V, Q140G, A147P, C148A, W154Y, T157V, Y159A, Y159R, G162C, Q174N, L177Y, S179L y C180A, en donde la variante tiene al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, tal como al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % pero menos del 100 % de identidad de secuencia respecto del polipéptido mostrado en la Id de sec n.º: 28, en donde cada posición corresponde a la posición del polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º: 28 (numeración según la Id. de sec. n.º: 28) y en donde la variante tiene al menos una propiedad mejorada en comparación con la ADNasa precursora, p. ej., una ADNasa que comprende el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la Id. de sec. n.º: 28, preferiblemente la propiedad mejorada es una mejora en la estabilidad, en donde la estabilidad se somete a ensayo como se describe en los ejemplos 2, 3 y 4.

En algunos aspectos, la variante de ADNasa tiene una mejora en la estabilidad, medida como relación de actividad residual, en comparación con la precursora o en comparación con la ADNasa que tiene el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º: 1.

En algunos aspectos preferidos, la variante de ADNasa comprende una alteración en uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte o más posiciones seleccionadas de la lista que consiste en 1, 4, 7, 8, 9, 13, 22, 25, 27, 32, 33, 39, 41, 42, 48, 56, 57, 59, 61, 65, 66, 76, 77, 78, 91, 101, 106, 109, 112, 116, 127, 130, 138, 140, 144, 147, 148, 154, 157, 159, 160, 162, 166, 167, 174, 175, 177, 178, 179, 180 y 181, en donde cada posición corresponde a la posición del polipéptido de la Id. de sec. n.º: 1, en donde cada alteración proporciona una variante de ADNasa que tiene una mejora en la estabilidad medida como relación de actividad residual, de al menos 1,05, tal como 1,08, tal como 1,1, tal como 1,15, tal como 1,2, tal como 1,25, tal como 1,3, tal como 1,4, tal como 1,5, tal como 1,6, tal como 1,7, tal como 1,8, tal como 1,9, tal como 2, tal como 3, tal como 4, tal como 5 o tal como al menos 10 en comparación con la ADNasa precursora, p. ej., una ADNasa que comprende el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la Id. de sec. n.º: 1, en donde la variante tiene al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, tal como al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 %, pero menos de 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º: 1, en donde cada posición corresponde a la posición del polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º: 1 (numeración según la Id. de sec. n.º: 1).

En algunos aspectos preferidos, una variante de ADNasa para usar en la invención comprende una alteración en uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte o más posiciones seleccionadas de la lista que consiste en 4, 7, 8, 9, 27, 32, 33, 39, 41, 42, 48, 61, 65, 66, 78, 91, 101, 106, 109, 112, 127, 130, 138, 140, 147, 148, 154, 157, 159, 162, 174, 177, 179 y 180, en donde cada posición corresponde a la posición del polipéptido de la Id. de sec. n.º: 1, en donde cada alteración proporciona una variante de ADNasa que tiene una mejora en la estabilidad medida como relación de actividad residual, de al menos 1,05, tal como 1,08, tal como 1,1, tal como 1,15, tal como 1,2, tal como 1,25, tal como 1,3, tal como 1,4, tal como 1,5, tal como 1,6, tal como 1,7, tal como 1,8, tal como 1,9, tal como 2, tal como 3, tal como 4, tal como 5 o tal como al menos 10 en comparación con la ADNasa precursora, p. ej., una ADNasa que comprende el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la Id. de sec. n.º: 1, en donde la variante tiene al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, tal como al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 %, pero menos de 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º: 1, en donde cada posición corresponde a la posición del polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º: 1 (numeración según la Id. de sec. n.º: 1).

En algunos aspectos preferidos, una variante de ADNasa de la invención comprende una alteración en uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte o más posiciones seleccionadas de la lista que consiste en 4, 7, 8, 9, 27, 32, 33, 39, 41, 42, 48, 61, 65, 66, 78, 91, 101, 106, 109, 112, 127, 130, 138, 140, 147, 148, 154, 157, 159, 162, 174, 177, 179 y 180, en donde cada posición corresponde a la posición del polipéptido de la Id. de sec. n.º: 27, en donde cada alteración proporciona una variante de ADNasa que tiene una mejora en la estabilidad medida como relación de actividad residual, de al menos 1,05, tal como 1,08, tal como 1,1, tal como 1,15, tal como 1,2, tal como 1,25, tal como 1,3, tal como 1,4, tal como 1,5, tal como 1,6, tal como 1,7, tal como 1,8, tal como 1,9, tal como 2, tal como 3, tal como 4, tal como 5 o tal como al menos 10 en comparación con la ADNasa precursora, p. ej., una ADNasa que comprende el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la Id. de sec. n.º: 27, en donde la variante tiene al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, tal como al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 %, pero menos de 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º: 27, en donde cada posición corresponde a la posición del polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º: 27 (numeración según la Id. de sec. n.º: 27).

En algunos aspectos preferidos, una variante de ADNasa para usar en la invención comprende una alteración en uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte o más posiciones seleccionadas de la lista que consiste en 4, 7, 8, 9, 27, 32, 33, 39, 41, 42, 48, 61, 65, 66, 78, 91, 101, 106, 109, 112, 127, 130, 138, 140, 147, 148, 154, 157, 159, 162, 174, 177, 179 y 180, en donde cada posición corresponde a la posición del polipéptido de la Id. de sec. n.º: 28, en donde cada alteración proporciona una variante de ADNasa que tiene una mejora en la estabilidad medida como relación de actividad residual, de al menos 1,05, tal como 1,08, tal como 1,1, tal como 1,15, tal como 1,2, tal como 1,25, tal como 1,3, tal como 1,4, tal como 1,5, tal como 1,6, tal como 1,7, tal como 1,8, tal como 1,9, tal como 2, tal como 3, tal como 4, tal como 5 o tal como al menos 10 en comparación con la ADNasa precursora, p. ej., una ADNasa que comprende el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la Id. de sec. n.º: 28, en donde la variante tiene al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, tal como al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 %, pero menos de 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º: 28, en donde cada posición corresponde a la posición del polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º: 28 (numeración según la Id. de sec. n.º: 28).

En algunos aspectos preferidos, la variante de ADNasa comprende al menos una sustitución, tal como al menos dos sustituciones, tal como al menos tres sustituciones, tal como al menos cuatro sustituciones, tal como al menos cinco sustituciones, tal como al menos seis sustituciones, tal como al menos siete sustituciones, tal como al menos ocho sustituciones, tal como al menos nueve sustituciones, tal como al menos diez sustituciones, tal como al menos once sustituciones, tal como al menos doce sustituciones, tal como al menos trece sustituciones, tal como al menos catorce sustituciones, tal como al menos dieciséis sustituciones, tal como al menos diecisiete, tal como al menos dieciocho, tal como al menos diecinueve, tal como al menos veinte o más sustituciones (en comparación con la Id. de sec. n.º 1), en donde las sustituciones se seleccionan del grupo que consiste en: T1I, T1V, G4K, S7G, K8R, S9I, S13Y, T22P, S25P, S27L, L27R, D32I, D32L, D32R, D32V, S39P, S39C, G41P, S42G, S42H, S42C, Q48D, D56I, D56L, S57W, S59V, S59C, N61E, T65L, T65V, T65M, T65W, S66M, S66W, S66Y, S66V, V76L, T77Y, F78L, P91L, S101N, S106L, S106R, S106H, Q109R, A112E, S116D, T127V, S130A, S130Y, T138D, Q140V, Q140G, S144P, A147H, C148A, W154Y, T157V, Y159A, Y159R, K160V, G162S, G162D, G162C, Q166D, S167L, Q174N, G175D, G175N, L177Y, N178D, N178E, S179L, C180A, S181E y S181L, en donde la variante comprende L33R y en donde cada sustitución proporciona una variante de ADNasa que tiene un aumento en la estabilidad medido como relación de actividad residual de al menos 1,05, tal como 1,08, tal como 1,1, tal como 1,15, tal como 1,2, tal como 1,25, tal como 1,3, tal como 1,4, tal como 1,5, tal como 1,6, tal como 1,7, tal como 1,8, tal como 1,9, tal como 2, tal como 3, tal como 4, tal como 5 o tal como al menos 10 comparado con la ADNasa precursora, p. ej. una ADNasa que comprende el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la Id. de sec. n.º 1, en donde la variante tiene al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, tal como al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 %, pero menos de 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º 1, en donde cada posición corresponde a la posición del polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º 1 (numeración según la Id. de sec. n.º 1).

En algunos aspectos preferidos, la variante de ADNasa para usar en la invención comprende al menos una sustitución, tal como al menos dos sustituciones, tal como al menos tres sustituciones, tal como al menos cuatro sustituciones, tal como al menos cinco sustituciones, tal como al menos seis sustituciones, tal como al menos siete sustituciones, tal como al menos ocho sustituciones, tal como al menos nueve sustituciones, tal como al menos diez sustituciones, tal como al menos once sustituciones, tal como al menos doce sustituciones, tal como al menos trece sustituciones, tal como al menos catorce sustituciones, tal como al menos dieciséis sustituciones, tal como al menos diecisiete, tal como al menos dieciocho, tal como al menos diecinueve, tal como al menos veinte o más sustituciones (en comparación con la Id. de sec. n.º 1), en donde las sustituciones se seleccionan del grupo que consiste en: G4K, S7G, K8R, S9I, N16G, S27K, S27R, D32F, D32I, D32L, D32R, D32V, S39C, G41P, S42H, D45E, Q48D, N61E, T65M, T65W, S66R, S66M, S66W, S66Y, S66V, F78L, P91L, S101N, S106L, S106R, S106H, Q109E, A112E, T127P, S130A, S130Y, T138D, Q140V, Q140G, A147P, C148A, W154Y, T157V, Y159A, Y159R, G162C, Q174N, L177Y, S179L y C180A, en donde cada sustitución proporciona una variante de ADNasa que tiene un aumento en la estabilidad medido como relación de actividad residual de al menos 1,05, tal como 1,08, tal como 1,1, tal como 1,15, tal como 1,2, tal como 1,25, tal como 1,3, tal como 1,4, tal como 1,5, tal como 1,6, tal como 1,7, tal como 1,8, tal como 1,9, tal como 2, tal como 3, tal como 4, tal como 5 o tal como al menos 10 comparado con la ADNasa precursora, p. ej. una ADNasa que comprende el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la Id. de sec. n.º 1, en donde la variante tiene al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, tal como al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 %, pero menos de 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º 1, en donde cada posición corresponde a la posición del polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º 1 (numeración según la Id. de sec. n.º 1).

En algunos aspectos preferidos, la variante de ADNasa comprende al menos una sustitución, tal como al menos dos sustituciones, tal como al menos tres sustituciones, tal como al menos cuatro sustituciones, tal como al menos cinco sustituciones, tal como al menos seis sustituciones, tal como al menos siete sustituciones, tal como al menos ocho sustituciones, tal como al menos nueve sustituciones, tal como al menos diez sustituciones, tal como al menos once sustituciones, tal como al menos doce sustituciones, tal como al menos trece sustituciones, tal como al menos catorce sustituciones, tal como al menos dieciséis sustituciones, tal como al menos diecisiete, tal como al menos dieciocho, tal como al menos diecinueve, tal como al menos veinte o más sustituciones (en comparación con la Id. de sec. n.º 27), en donde las sustituciones se seleccionan del grupo que consiste en: G4K, S7G, K8R, S9I, N16G, S27K, S27R, D32F, D32I, D32L, D32R, D32V, S39C, G41P, S42H, D45E, Q48D, N61E, T65M, T65W, S66R, S66M, S66W, S66Y, S66V, F78L, P91L, S101N, S106L, S106R, S106H, Q109E, A112E, T127P, S130A, S130Y, T138D, Q140V, Q140G, A147P, C148A, W154Y, T157V, Y159A, Y159R, G162C, Q174N, L177Y, S179L y C180A, en donde cada sustitución proporciona una variante de ADNasa que tiene un aumento en la estabilidad medido como relación de actividad residual de al menos 1,05, tal como 1,08, tal como 1,1, tal como 1,15, tal como 1,2, tal como 1,25, tal como 1,3, tal como 1,4, tal como 1,5, tal como 1,6, tal como 1,7, tal como 1,8, tal como 1,9, tal como 2, tal como 3, tal como 4, tal como 5 o tal como al menos 10 comparado con la ADNasa precursora, p. ej. una ADNasa que comprende el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la Id. de sec. n.º 1, en donde la variante tiene al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, tal como al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 %, pero menos de 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º 27, en donde cada posición corresponde a la posición del polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º 27 (numeración según la Id. de sec. n.º 27).

En algunos aspectos preferidos, la variante de ADNasa comprende al menos una sustitución, tal como al menos dos sustituciones, tal como al menos tres sustituciones, tal como al menos cuatro sustituciones, tal como al menos cinco sustituciones, tal como al menos seis sustituciones, tal como al menos siete sustituciones, tal como al menos ocho sustituciones, tal como al menos nueve sustituciones, tal como al menos diez sustituciones, tal como al menos once sustituciones, tal como al menos doce sustituciones, tal como al menos trece sustituciones, tal como al menos catorce sustituciones, tal como al menos dieciséis sustituciones, tal como al menos diecisiete, tal como al menos dieciocho, tal como al menos diecinueve, tal como al menos veinte o más sustituciones (en comparación con la Id. de sec. n.º 28), en donde las sustituciones se seleccionan del grupo que consiste en: G4K, S7G, K8R, S9I, N16G, S27K, S27R, D32F, D32I, D32L, D32R, D32V, S39C, G41P, S42H, D45E, Q48D, N61E, T65M, T65W, S66R, S66M, S66W, S66Y, S66V, F78L, P91L, S101N, S106L, S106R, S106H, Q109E, A112E, T127P, S130A, S130Y, T138D, Q140V, Q140G, A147P, C148A, W154Y, T157V, Y159A, Y159R, G162C, Q174N, L177Y, S179L y C180A, en donde cada sustitución proporciona una variante de ADNasa que tiene un aumento en la estabilidad medido como relación de actividad residual de al menos 1,05, tal como 1,08, tal como 1,1, tal como 1,15, tal como 1,2, tal como 1,25, tal como 1,3, tal como 1,4, tal como 1,5, tal como 1,6, tal como 1,7, tal como 1,8, tal como 1,9, tal como 2, tal como 3, tal como 4, tal como 5 o tal como al menos 10 comparado con la ADNasa precursora, p. ej. una ADNasa que comprende el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la Id. de sec. n.º 28, en donde la variante tiene al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, tal como al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 %, pero menos de 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º 28, en donde cada posición corresponde a la posición del polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º 28 (numeración según la Id. de sec. n.º 28).

Las variantes comprenden preferiblemente los motivos conservativos [D/M/L][S/T]GYSR[D/N] (Id. de sec. n.º 25) o ASXNRSKG (Id. de sec. n.º 26), que se comparten entre ADNasas del clado GYS como se describe a continuación. Como se explica en "Definiciones", un clado comprende un grupo de polipéptidos agrupados según características homólogas rastreadas hasta un ancestro común. Los polipéptidos que forman un grupo, p. ej., un clado como se muestra en un árbol filogenético, a menudo comparten propiedades comunes y están más estrechamente relacionados que otros polipéptidos no pertenecientes al clado.

Por lo tanto, un aspecto preferido de la invención se refiere a una composición detergente que comprende una variante de una ADNasa precursora, en donde la variante comprende uno o ambos motivos [D/M/L][S/T]GYSR[D/N] (Id. de sec. n.º 25) o ASXNRSKG (Id. de sec. n.º 26) y en donde la variante comprende una alteración en uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte o más posiciones seleccionadas de la lista que consiste en 1, 4, 7, 8, 9, 13, 22, 25, 27, 32, 33, 39, 41, 42, 48, 56, 57, 59, 61, 65, 66, 76, 77, 78, 91, 101, 112, 106, 109, 116, 127, 130, 138, 140, 144, 147, 148, 154, 157, 159, 160, 162, 166, 167, 174, 175, 177, 178, 179, 180 y 181, en donde cada posición corresponde a la posición del polipéptido de la Id. de sec. n.º 1, en donde cada alteración proporciona una variante de ADNasa con al menos una propiedad mejorada en comparación con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º 1, en donde la variante tiene al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, tal como al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 %, pero menos de 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º 1 y en donde cada posición corresponde a la posición del polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º 1 (numeración según la Id. de sec. n.º 1).

Un aspecto preferido de la invención se refiere a una composición detergente que comprende una variante de una ADNasa precursora, en donde la variante comprende uno o ambos motivos [D/M/L][S/T]GYSR[D/N] (Id. de sec. n.º 25) o ASXNRSKG (Id. de sec. n.º 26) y en donde la variante comprende una alteración en uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte o más posiciones seleccionadas de la lista que consiste en 4, 7, 8, 9, 27, 32, 33, 39, 41, 42, 48, 61, 65, 66, 78, 91, 101, 106, 109, 112, 127, 130, 138, 140, 147, 148, 154, 157, 159, 162, 174, 177, 179 y 180, en donde cada posición corresponde a la posición del polipéptido de la Id. de sec. n.º 1, en donde cada alteración proporciona una variante de ADNasa con al menos una propiedad mejorada en comparación con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º 1, en donde la variante tiene al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, tal como al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 %, pero menos de 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º 1 y en donde cada posición corresponde a la posición del polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º 1 (numeración según la Id. de sec. n.º 1).

Un aspecto preferido de la invención se refiere a una composición detergente que comprende una variante de una ADNasa precursora, en donde la variante comprende uno o ambos motivos [D/M/L][S/T]GYSR[D/N] (Id. de sec. n.º 25) o ASXNRSKG (Id. de sec. n.º 26) y en donde la variante comprende una alteración en uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte o más posiciones seleccionadas de la lista que consiste en 4, 7, 8, 9, 27, 32, 33, 39, 41, 42, 48, 61, 65, 66, 78, 91, 101, 106, 109, 112, 127, 130, 138, 140, 147, 148, 154, 157, 159, 162, 174, 177, 179 y 180, en donde cada posición corresponde a la posición del polipéptido de la Id. de sec. n.º 27, en donde cada alteración proporciona una variante de ADNasa con al menos una propiedad mejorada en comparación con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º 27, en donde la variante tiene al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, tal como al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 %, pero menos

de 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º: 27 y en donde cada posición corresponde a la posición del polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º: 27 (numeración según la Id. de sec. n.º: 27).

Un aspecto preferido de la invención se refiere a una composición detergente que comprende una variante de una ADNasa precursora, en donde la variante comprende uno o ambos motivos [D/M/L][S/T]GYSR[D/N] (Id. de sec. n.º: 25) o ASXNRSKG (Id. de sec. n.º: 26) y en donde la variante comprende una alteración en uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte o más posiciones seleccionadas de la lista que consiste en 4, 7, 8, 9, 27, 32, 33, 39, 41, 42, 48, 61, 65, 66, 78, 91, 101, 106, 109, 112, 127, 130, 138, 140, 147, 148, 154, 157, 159, 162, 174, 177, 179 y 180, en donde cada posición
corresponde a la posición del polipéptido de la Id. de sec. n.º: 28, en donde cada alteración proporciona una variante de ADNasa con al menos una propiedad mejorada en comparación con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º: 28, en donde la variante tiene al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, tal como al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 %, pero menos de 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º: 28 y en donde cada posición
corresponde a la posición del polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º: 28 (numeración según la Id. de sec. n.º: 28).

Un aspecto preferido de la invención se refiere a una composición detergente que comprende una variante de una ADNasa precursora, en donde la variante comprende uno o ambos motivos [D/M/L][S/T]GYSR[D/N] (Id. de sec. n.º: 25) o ASXNRSKG (Id. de sec. n.º: 26) en donde la variante comprende al menos una sustitución, tal como al menos dos sustituciones, tal como al menos tres, tal como al menos cuatro, tal como al menos cinco, tal como al menos seis, tal como al menos siete, tal como al menos ocho, tal como al menos nueve, tal como al menos diez, tal como al menos once, tal como al menos doce, tal como al menos trece, tal como al menos catorce, tal como al menos dieciséis, tal como al menos diecisiete, tal como al menos dieciocho, tal como al menos diecinueve, tal como al menos veinte o más sustituciones (en comparación con la Id. de sec. n.º: 1), en donde las sustituciones se seleccionan del grupo que consiste en: T1I, T1V, G4K, S7G, K8R, S9I, S13Y, T22P, S25P, S27L, S27R, D32I, D32L, D32R, D32V, S39P, S39C, G41P, S42G, S42H, S42C, Q48D, D56I, D56L, S57W, S59V, S59C, N61E, T65L, T65V, T65M, T65W, S66M, S66W, S66Y, S66V, V76L, T77Y, F78L, P91L, S101N, S106L, S106R, S106H, Q109R, A112E, S116D, T127V, S130A, S130Y, T138D, Q140V, Q140G, S144P, A147H, C148A, W154Y, T157V, Y159A, Y159R, K160V, G162S, G162D, G162C, Q166D, S167L, Q174N, G175D, G175N, L177Y, N178D, N178E, S179L, C180A, S181E y S181L, en donde la variante comprende L33R y en donde cada sustitución proporciona una variante de ADNasa que tiene al menos una propiedad mejorada en comparación con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º: 1, en donde la variante tiene al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, tal como al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 %, pero menos de 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º: 1 y en donde cada posición corresponde a la posición del polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º: 1 (numeración según la Id. de sec. n.º: 1).

Un aspecto preferido de la invención se refiere a una composición detergente que comprende una variante de una ADNasa precursora, en donde la variante comprende uno o ambos motivos [D/M/L][S/T]GYSR[D/N] (Id. de sec. n.º: 25) o ASXNRSKG (Id. de sec. n.º: 26) en donde la variante comprende al menos una sustitución, tal como al menos dos sustituciones, tal como al menos tres, tal como al menos cuatro, tal como al menos cinco, tal como al menos seis, tal como al menos siete, tal como al menos ocho, tal como al menos nueve, tal como al menos diez, tal como al menos once, tal como al menos doce, tal como al menos trece, tal como al menos catorce, tal como al menos dieciséis, tal como al menos diecisiete, tal como al menos dieciocho, tal como al menos diecinueve, tal como al menos veinte o más sustituciones (en comparación con la Id. de sec. n.º: 1), en donde las sustituciones se seleccionan del grupo que consiste en: G4K, S7G, K8R, S9I, N16G, S27K, S27R, D32F, D32I, D32L, D32R, D32V, S39C, G41P, S42H, D45E, Q48D, N61E, T65M, T65W, S66R, S66M, S66W, S66Y, S66V, F78L, P91L, S101N, S106L, S106R, S106H, Q109E, A112E, T127P, S130A, S130Y, T138D, Q140V, Q140G, A147P, C148A, W154Y, T157V, Y159A, Y159R, G162C, Q174N, L177Y, S179L y C180A, en donde cada sustitución proporciona una variante de ADNasa con al menos una propiedad mejorada en comparación con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º: 1, en donde la variante tiene al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, tal como al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 %, pero menos de 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º: 1 y en donde cada posición corresponde a la posición del polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º: 1 (numeración según la Id. de sec. n.º: 1).

Un aspecto preferido de la invención se refiere a una composición detergente que comprende una variante de una ADNasa precursora, en donde la variante comprende uno o ambos motivos [D/M/L][S/T]GYSR[D/N] (Id. de sec. n.º: 25) o ASXNRSKG (Id. de sec. n.º: 26) en donde la variante comprende al menos una sustitución, tal como al menos dos sustituciones, tal como al menos tres, tal como al menos cuatro, tal como al menos cinco, tal como al menos seis, tal como al menos siete, tal como al menos ocho, tal como al menos nueve, tal como al menos diez, tal como al menos once, tal como al menos doce, tal como al menos trece, tal como al menos catorce, tal como al menos dieciséis, tal como al menos diecisiete, tal como al menos dieciocho, tal como al menos diecinueve, tal como al menos veinte o más sustituciones (en comparación con la Id. de sec. n.º: 27), en donde las sustituciones se seleccionan del grupo que consiste en: G4K, S7G, K8R, S9I, N16G, S27K, S27R, D32F, D32I, D32L, D32R, D32V, S39C, G41P, S42H, D45E, Q48D, N61E, T65M, T65W, S66R, S66M, S66W, S66Y, S66V, F78L, P91L, S101N, S106L, S106R, S106H, Q109E, A112E, T127P, S130A, S130Y, T138D, Q140V, Q140G, A147P, C148A, W154Y, T157V, Y159A, Y159R, G162C, Q174N, L177Y, S179L y C180A, en donde cada sustitución proporciona una

variante de ADNasa con al menos una propiedad mejorada en comparación con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º: 27, en donde la variante tiene al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, tal como al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 %, pero menos de 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º: 27 y en donde cada posición corresponde a la posición del polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º: 27 (numeración según la Id. de sec. n.º: 27).

Un aspecto preferido de la invención se refiere a una composición detergente que comprende una variante de una ADNasa precursora, en donde la variante comprende uno o ambos motivos [D/M/L][S/T]GYSR[D/N] (Id. de sec. n.º: 25) o ASXNRSKG (Id. de sec. n.º: 26) en donde la variante comprende al menos una sustitución, tal como al menos dos sustituciones, tal como al menos tres, tal como al menos cuatro, tal como al menos cinco, tal como al menos seis, tal como al menos siete, tal como al menos ocho, tal como al menos nueve, tal como al menos diez, tal como al menos once, tal como al menos doce, tal como al menos trece, tal como al menos catorce, tal como al menos dieciséis, tal como al menos diecisiete, tal como al menos dieciocho, tal como al menos diecinueve, tal como al menos veinte o más sustituciones (en comparación con la Id. de sec. n.º: 28), en donde las sustituciones se seleccionan del grupo que consiste en: G4K, S7G, K8R, S9I, N16G, S27K, S27R, D32F, D32I, D32L, D32R, D32V, S39C, G41P, S42H, D45E, Q48D, N61E, T65M, T65W, S66R, S66M, S66W, S66Y, S66V, F78L, P91L, S101N, S106L, S106R, S106H, Q109E, A112E, T127P, S130A, S130Y, T138D, Q140V, Q140G, A147P, C148A, W154Y, T157V, Y159A, Y159R, G162C, Q174N, L177Y, S179L y C180A, en donde cada sustitución proporciona una variante de ADNasa con al menos una propiedad mejorada en comparación con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º: 28, en donde la variante tiene al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, tal como al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 %, pero menos de 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º: 28 y en donde cada posición corresponde a la posición del polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º: 28 (numeración según la Id. de sec. n.º: 28).

Un aspecto preferido de la invención se refiere a una composición detergente que comprende una variante de una ADNasa precursora, en donde la variante comprende uno o ambos motivos [D/M/L][S/T]GYSR[D/N] (Id. de sec. n.º: 25) o ASXNRSKG (Id. de sec. n.º: 26) y en donde la variante comprende una alteración en uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte o más posiciones seleccionadas de la lista que consiste en 1, 4, 7, 8, 9, 13, 22, 25, 27, 32, 33, 39, 41, 42, 48, 56, 57, 59, 61, 65, 66, 76, 77, 78, 91, 101, 112, 106, 109, 116, 127, 130, 138, 140, 144, 147, 148, 154, 157, 159, 160, 162, 166, 167, 174, 175, 177, 178, 179, 180 y 181, en donde cada posición corresponde a la posición del polipéptido de la Id. de sec. n.º: 1, en donde cada sustitución proporciona una variante de ADNasa que tiene un aumento en la estabilidad medida como relación de actividad residual, de al menos 1,05, tal como 1,08, tal como 1,1, tal como 1,15, tal como 1,2, tal como 1,25, tal como 1,3, tal como 1,4, tal como 1,5, tal como 1,6, tal como 1,7, tal como 1,8, tal como 1,9, tal como 2, tal como 3, tal como 4, al como 5 o tal como al menos 10 en comparación con la ADNasa precursora, p. ej., una ADNasa que comprende el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la Id. de sec. n.º: 1, en donde la variante tiene al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, tal como al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 %, pero menos de 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º: 1, en donde cada posición corresponde a la posición del polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º: 1 (numeración según la Id. de sec. n.º: 1).

Un aspecto preferido de la invención se refiere a una composición detergente que comprende una variante de una ADNasa precursora, en donde la variante comprende uno o ambos motivos [D/M/L][S/T]GYSR[D/N] (Id. de sec. n.º: 25) o ASXNRSKG (Id. de sec. n.º: 26) y en donde la variante comprende una alteración en uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte o más posiciones seleccionadas de la lista que consiste en 4, 7, 8, 9, 27, 32, 33, 39, 41, 42, 48, 61, 65, 66, 78, 91, 101, 106, 109, 112, 127, 130, 138, 140, 147, 148, 154, 157, 159, 162, 174, 177, 179 y 180, en donde cada posición corresponde a la posición del polipéptido de la Id. de sec. n.º: 1, en donde cada sustitución proporciona una variante de ADNasa que tiene un aumento en la estabilidad medida como relación de actividad residual, de al menos 1,05, tal como 1,08, tal como 1,1, tal como 1,15, tal como 1,2, tal como 1,25, tal como 1,3, tal como 1,4, tal como 1,5, tal como 1,6, tal como 1,7, tal como 1,8, tal como 1,9, tal como 2, tal como 3, tal como 4, al como 5 o tal como al menos 10 en comparación con la ADNasa precursora, p. ej., una ADNasa que comprende el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la Id. de sec. n.º: 1, en donde la variante tiene al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, tal como al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 %, pero menos de 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º: 1, en donde cada posición corresponde a la posición del polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º: 1 (numeración según la Id. de sec. n.º: 1).

Un aspecto preferido de la invención se refiere a una composición detergente que comprende una variante de una ADNasa precursora, en donde la variante comprende uno o ambos motivos [D/M/L][S/T]GYSR[D/N] (Id. de sec. n.º: 25) o ASXNRSKG (Id. de sec. n.º: 26) y en donde la variante comprende una alteración en uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte o más posiciones seleccionadas de la lista que consiste en 4, 7, 8, 9, 27, 32, 33, 39, 41, 42, 48,

61, 65, 66, 78, 91, 101, 106, 109, 112, 127, 130, 138, 140, 147, 148, 154, 157, 159, 162, 174, 177, 179 y 180, en donde cada posición corresponde a la posición del polipéptido de la Id. de sec. n.º 27, en donde cada sustitución proporciona una variante de ADNasa que tiene un aumento en la estabilidad medida como relación de actividad residual, de al menos 1,05, tal como 1,08, tal como 1,1, tal como 1,15, tal como 1,2, tal como 1,25, tal como 1,3, tal como 1,4, tal como 1,5, tal como 1,6, tal como 1,7, tal como 1,8, tal como 1,9, tal como 2, tal como 3, tal como 4, tal como 5 o tal como al menos 10 en comparación con la ADNasa precursora, p. ej., una ADNasa que comprende el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la Id. de sec. n.º 27, en donde la variante tiene al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, tal como al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 %, pero menos de 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º 27, en donde cada posición corresponde a la posición del polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º 27 (numeración según la Id. de sec. n.º 27).

Un aspecto preferido de la invención se refiere a una composición detergente que comprende una variante de una ADNasa precursora, en donde la variante comprende uno o ambos motivos [D/M/L][S/T]GYSR[D/N] (Id. de sec. n.º 25) o ASXNRSKG (Id. de sec. n.º 26) y en donde la variante comprende una alteración en uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte o más posiciones seleccionadas de la lista que consiste en 4, 7, 8, 9, 27, 32, 33, 39, 41, 42, 48, 61, 65, 66, 78, 91, 101, 106, 109, 112, 127, 130, 138, 140, 147, 148, 154, 157, 159, 162, 174, 177, 179 y 180, en donde cada posición corresponde a la posición del polipéptido de la Id. de sec. n.º 28, en donde cada sustitución proporciona una variante de ADNasa que tiene un aumento en la estabilidad medida como relación de actividad residual, de al menos 1,05, tal como 1,08, tal como 1,1, tal como 1,15, tal como 1,2, tal como 1,25, tal como 1,3, tal como 1,4, tal como 1,5, tal como 1,6, tal como 1,7, tal como 1,8, tal como 1,9, tal como 2, tal como 3, tal como 4, tal como 5 o tal como al menos 10 en comparación con la ADNasa precursora, p. ej., una ADNasa que comprende el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la Id. de sec. n.º 28, en donde la variante tiene al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, tal como al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 %, pero menos de 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º 28, en donde cada posición corresponde a la posición del polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º 28 (numeración según la Id. de sec. n.º 28).

Un aspecto preferido de la invención se refiere a una composición detergente que comprende una variante de ADNasa precursora, en donde la variante comprende al menos una sustitución, tal como al menos dos sustituciones, tal como al menos tres, tal como al menos cuatro, tal como al menos cinco, tal como al menos seis, tal como al menos siete, tal como al menos ocho, tal como al menos nueve, tal como al menos diez, tal como al menos once, tal como al menos doce, tal como al menos trece, tal como al menos catorce, tal como al menos dieciséis, tal como al menos diecisiete, tal como al menos dieciocho, tal como al menos diecinueve, tal como al menos veinte o más sustituciones (en comparación con la Id. de sec. n.º 1), en donde las sustituciones se seleccionan del grupo que consiste en: T1I, T1V, G4K, S7G, K8R, S9I, S13Y, T22P, S25P, S27L, S27R, D32I, D32L, D32R, D32V, S39P, S39C, G41P, S42G, S42H, S42C, Q48D, D56I, D56L, S57W, S59V, S59C, N61E, T65L, T65V, T65M, T65W, S66M, S66W, S66Y, S66V, V76L, T77Y, F78L, P91L, S101N, S106L, S106R, S106H, Q109R, A112E, S116D, T127V, S130A, S130Y, T138D, Q140V, Q140G, S144P, A147H, C148A, W154Y, T157V, Y159A, Y159R, K160V, G162S, G162D, G162C, Q166D, S167L, Q174N, G175D, G175N, L177Y, N178D, N178E, S179L, C180A, S181E y S181L, en donde la variante comprende L33R y en donde la sustitución proporciona una variante de ADNasa que tiene un aumento en la estabilidad medido como relación de actividad residual de al menos 1,05, tal como 1,08, tal como 1,1, tal como 1,15, tal como 1,2, tal como 1,25, tal como 1,3, tal como 1,4, tal como 1,5, tal como 1,6, tal como 1,7, tal como 1,8, tal como 1,9, tal como 2, tal como 3, tal como 4, tal como 5 o tal como al menos 10 comparado con la ADNasa precursora, p. ej., una ADNasa que comprende el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la Id. de sec. n.º 1, en donde la variante tiene al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, tal como al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 %, pero menos de 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º 1, en donde cada posición corresponde a la posición del polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º 1 (numeración según la Id. de sec. n.º 1).

Un aspecto preferido de la invención se refiere a una composición detergente que comprende una variante de ADNasa precursora, en donde la variante comprende al menos una sustitución, tal como al menos dos sustituciones, tal como al menos tres, tal como al menos cuatro, tal como al menos cinco, tal como al menos seis, tal como al menos siete, tal como al menos ocho, tal como al menos nueve, tal como al menos diez, tal como al menos once, tal como al menos doce, tal como al menos trece, tal como al menos catorce, tal como al menos dieciséis, tal como al menos diecisiete, tal como al menos dieciocho, tal como al menos diecinueve, tal como al menos veinte o más sustituciones (en comparación con la Id. de sec. n.º 1), en donde las sustituciones se seleccionan del grupo que consiste en: G4K, S7G, K8R, S9I, N16G, S27K, S27R, D32F, D32I, D32L, D32R, D32V, S39C, G41P, S42H, D45E, Q48D, N61E, T65M, T65W, S66R, S66M, S66W, S66Y, S66V, F78L, P91L, S101N, S106L, S106R, S106H, Q109E, A112E, T127P, S130A, S130Y, T138D, Q140V, Q140G, A147P, C148A, W154Y, T157V, Y159A, Y159R, G162C, Q174N, L177Y, S179L y C180A, en donde cada sustitución proporciona una variante de ADNasa que tiene un aumento en la estabilidad medido como relación de actividad residual de al menos 1,05, tal como 1,08, tal como 1,1, tal como 1,15, tal como 1,2, tal como 1,25, tal como 1,3, tal como 1,4, tal como 1,5, tal como 1,6, tal como 1,7, tal

como 1,8, tal como 1,9, tal como 2, tal como 3, tal como 4, tal como 5 o tal como al menos 10 comparado con la ADNasa precursora, p. ej. una ADNasa que comprende el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la Id. de sec. n.º 1, en donde la variante tiene al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, tal como al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 %, pero menos de 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º 1, en donde cada posición corresponde a la posición del polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º 1 (numeración según la Id. de sec. n.º 1).

Un aspecto preferido de la invención se refiere a una composición detergente que comprende una variante de ADNasa precursora, en donde la variante comprende al menos una sustitución, tal como al menos dos sustituciones, tal como al menos tres, tal como al menos cuatro, tal como al menos cinco, tal como al menos seis, tal como al menos siete, tal como al menos ocho, tal como al menos nueve, tal como al menos diez, tal como al menos once, tal como al menos doce, tal como al menos trece, tal como al menos catorce, tal como al menos dieciséis, tal como al menos diecisiete, tal como al menos dieciocho, tal como al menos diecinueve, tal como al menos veinte o más sustituciones (en comparación con la Id. de sec. n.º 27), en donde las sustituciones se seleccionan del grupo que consiste en: G4K, S7G, K8R, S9I, N16G, S27K, S27R, D32F, D32I, D32L, D32R, D32V, S39C, G41P, S42H, D45E, Q48D, N61E, T65M, T65W, S66R, S66M, S66W, S66Y, S66V, F78L, P91L, S101N, S106L, S106R, S106H, Q109E, A112E, T127P, S130A, S130Y, T138D, Q140V, Q140G, A147P, C148A, W154Y, T157V, Y159A, Y159R, G162C, Q174N, L177Y, S179L y C180A, en donde cada sustitución proporciona una variante de ADNasa que tiene un aumento en la estabilidad medido como relación de actividad residual de al menos 1,05, tal como 1,08, tal como 1,1, tal como 1,15, tal como 1,2, tal como 1,25, tal como 1,3, tal como 1,4, tal como 1,5, tal como 1,6. tal como 1,7, tal como 1,8, tal como 1,9, tal como 2, tal como 3, tal como 4, tal como 5 o tal como al menos 10 comparado con la ADNasa precursora, p. ej. una ADNasa que comprende el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la Id. de sec. n.º 27, en donde la variante tiene al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, tal como al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 %, pero menos de 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º 27, en donde cada posición corresponde a la posición del polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º 27 (numeración según la Id. de sec. n.º 27).

Un aspecto preferido de la invención se refiere a una composición detergente que comprende una variante de ADNasa precursora, en donde la variante comprende al menos una sustitución, tal como al menos dos sustituciones, tal como al menos tres, tal como al menos cuatro, tal como al menos cinco, tal como al menos seis, tal como al menos siete, tal como al menos ocho, tal como al menos nueve, tal como al menos diez, tal como al menos once, tal como al menos doce, tal como al menos trece, tal como al menos catorce, tal como al menos dieciséis, tal como al menos diecisiete, tal como al menos dieciocho, tal como al menos diecinueve, tal como al menos veinte o más sustituciones (en comparación con la Id. de sec. n.º 28), en donde las sustituciones se seleccionan del grupo que consiste en: G4K, S7G, K8R, S9I, N16G, S27K, S27R, D32F, D32I, D32L, D32R, D32V, S39C, G41P, S42H, D45E, Q48D, N61E, T65M, T65W, S66R, S66M, S66W, S66Y, S66V, F78L, P91L, S101N, S106L, S106R, S106H, Q109E, A112E, T127P, S130A, S130Y, T138D, Q140V, Q140G, A147P, C148A, W154Y, T157V, Y159A, Y159R, G162C, Q174N, L177Y, S179L y C180A, en donde cada sustitución proporciona una variante de ADNasa que tiene un aumento en la estabilidad medido como relación de actividad residual de al menos 1,05, tal como 1,08, tal como 1,1, tal como 1,15, tal como 1,2, tal como 1,25, tal como 1,3, tal como 1,4, tal como 1,5, tal como 1,6. tal como 1,7, tal como 1,8, tal como 1,9, tal como 2, tal como 3, tal como 4, tal como 5 o tal como al menos 10 comparado con la ADNasa precursora, p. ej. una ADNasa que comprende el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la Id. de sec. n.º 28, en donde la variante tiene al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, tal como al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 %, pero menos de 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º 28, en donde cada posición corresponde a la posición del polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º 28 (numeración según la Id. de sec. n.º 28).

Varios ingredientes como tensioactivos y aditivos reforzantes de la detergencia pueden disminuir la estabilidad de una enzima en una composición detergente, particularmente en composiciones líquidas, por lo tanto las variantes enzimáticas preferidas para su uso en la presente memoria son sustancialmente estables en la composición detergente. La presente invención proporciona composiciones que comprenden variantes de ADNasa que tienen una alteración, preferiblemente una sustitución en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en: 1, 4, 7, 8, 9, 13, 22, 25, 27, 32, 33, 39, 41, 42, 48, 56, 57, 59, 61, 65, 66, 76, 77, 78, 91, 101, 106, 109, 112, 116, 127, 130, 138, 140, 144, 147, 148, 154, 157, 159, 160, 162, 166, 167, 174, 175, 177, 178, 179, 180 y 181. Preferiblemente, la alteración es una sustitución seleccionada del grupo que consiste en: T1I, T1V, G4K, S7G, K8R, S9I, S13Y, T22P, S25P, S27L, L27R, D32I, D32L, D32R, D32V, S39P, S39C, G41P, S42G, S42H, S42C, Q48D, D56I, D56L, S57W, S59V, S59C, N61E, T65L, T65V, T65M, T65W, S66M, S66W, S66Y, S66V, V76L, T77Y, F78L, P91L, S101N, S106L, S106R, S106H, Q109R, A112E, S116D, T127V, S130A, S130Y, T138D, Q140V, Q140G, S144P, A147H, C148A, W154Y, T157V, Y159A, Y159R, K160V, G162S, G162D, G162C, Q166D, S167L, Q174N, G175D, G175N, L177Y, N178D, N178E, S179L, C180A, S181E y S181L, en donde la variante comprende L33R.

Introducir una sustitución en una ADNasa precursora que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con la Id. de sec. n.º 1 una sustitución en una o más posiciones seleccionadas de las posiciones 1, 4, 7, 8, 9, 13, 22, 25, 27, 32, 33, 39,

41, 42, 48, 56, 57, 59, 61, 65, 66, 76, 77, 78, 91, 101, 106, 109, 112, 116, 127, 130, 138, 140, 144, 147, 148, 154, 157, 159, 160, 162, 166, 167, 174, 175, 177, 178, 179, 180 y 181, en donde las posiciones corresponden a las posiciones de la Id. de sec. n.º 1, proporcionan a la variante enzimática y la composición detergente al menos una propiedad mejorada en comparación con la ADNasa precursora en la que se introducen esta una o más sustituciones como se muestra para la ADNasa precursora que comprende la Id. de sec. n.º 1. Las sustituciones mejoran la estabilidad en soluciones líquidas tales como las composiciones de limpieza sin comprometer la capacidad limpiadora en los procesos de limpieza, p. ej., ropa. La predicción de la secuencia primaria de una enzima, cuyas posiciones pueden alterarse para obtener un efecto mejorado requiere habilidades inventivas, la molécula debe evaluarse cuidadosamente a partir de aspectos tanto estructurales como funcionales. La presente invención se refiere a composiciones detergentes que comprenden variantes de enzimas ADNasa que tienen al menos una propiedad mejorada en comparación con la ADNasa inicial, es decir, la ADNasa precursora. Los inventores han identificado posiciones donde las sustituciones individuales proporcionan un efecto estabilizante y han identificado adicionalmente que añadir una sustitución en más de una de las posiciones seleccionadas del grupo que consiste en: 1, 4, 7, 8, 9, 13, 22, 25, 27, 32, 33, 39, 41, 42, 48, 56, 57, 59, 61, 65, 66, 76, 77, 78, 91, 101, 106, 109, 112, 116, 127, 130, 138, 140, 144, 147, 148, 154, 157, 159, 160, 162, 166, 167, 174, 175, 177, 178, 179, 180 y 181 proporciona estabilidad mejorada de manera importante sin alterar negativamente la capacidad limpiadora de la ADNasa (la capacidad para eliminar manchas de ADN de los textiles). Un aspecto de la invención se refiere a composiciones detergentes que comprenden una variante en la que una sustitución en más de una posición seleccionada del grupo que consiste en: 1, 4, 7, 8, 9, 13, 22, 25, 27, 32, 33, 39, 41, 42, 48, 56, 57, 59, 61, 65, 66, 76, 77, 78, 91, 101, 106, 109, 112, 116, 127, 130, 138, 140, 144, 147, 148, 154, 157, 159, 160, 162, 166, 167, 174, 175, 177, 178, 179, 180 y 181, se introduce para mejorar el efecto de estabilización aún más. Una composición detergente comprende preferiblemente una variante de ADNasa que comprende una sustitución en uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte o más posiciones seleccionadas de la lista que consiste en: 1, 4, 7, 8, 9, 13, 22, 25, 27, 32, 33, 39, 41, 42, 48, 56, 57, 59, 61, 65, 66, 76, 77, 78, 91, 101, 106, 109, 112, 116, 127, 130, 138, 140, 144, 147, 148, 154, 157, 159, 160, 162, 166, 167, 174, 175, 177, 178, 179, 180 y 181, en donde cada posición corresponde a la posición del polipéptido de la Id. de sec. n.º 1, en donde la variante tiene actividad ADNasa y en donde la variante tiene al menos 80 %, tal como al menos 85 %, tal como al menos 90 %, tal como al menos 95 %, tal como al menos 98 % pero menos de 100 % de identidad de secuencia con la Id. de sec. n.º 1. No es evidente que la sustitución en más de una posición produzca un efecto aditivo o incluso sinérgico como se muestra en la presente invención. No se podía predecir un efecto aditivo ya que la adición de una sustitución a una enzima también puede afectar negativamente la estabilidad en comparación con la enzima que tiene una única sustitución, ya que la combinación específica de sustituciones puede conducir a diferentes resultados. Una realización preferida de la invención se refiere a una composición que comprende una variante de ADNasa que comprende una sustitución de un aminoácido en al menos tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte o más posiciones seleccionadas de la lista que consiste en: posiciones seleccionadas de la lista que consiste en: 1, 4, 7, 8, 9, 13, 22, 25, 27, 32, 33, 39, 41, 42, 48, 56, 57, 59, 61, 65, 66, 76, 77, 78, 91, 101, 106, 109, 112, 116, 127, 130, 138, 140, 144, 147, 148, 154, 157, 159, 160, 162, 166, 167, 174, 175, 177, 178, 179, 180 y 181, en donde cada posición corresponde a la posición del polipéptido de la Id. de sec. n.º 1, en donde las variantes tienen actividad ADNasa y en donde la variante tiene al menos 80 %, tal como al menos 85 %, tal como al menos 90 %, tal como al menos 95 %, tal como al menos 98 % pero menos de 100 % de identidad de secuencia con la Id. de sec. n.º 1. Las sustituciones se seleccionan preferiblemente de la lista que consiste en: T1I, T1V, G4K, S7G, K8R, S9I, S13Y, T22P, S25P, S27L, L27R, D32I, D32L, D32R, D32V, S39P, S39C, G41P, S42G, S42H, S42C, Q48D, D56I, D56L, S57W, S59V, S59C, N61E, T65L, T65V, T65M, T65W, S66M, S66W, S66Y, S66V, V76L, T77Y, F78L, P91L, S101N, S106L, S106R, S106H, Q109R, A112E, S116D, T127V, S130A, S130Y, T138D, Q140V, S144P, A147H, C148A, W154Y, T157V, Y159A, Y159R, K160V, G162S, G162D, G162C, Q166D, S167L, Q174N, G175D, G175N, L177Y, N178D, N178E, S179L, C180A, S181E y S181L en donde la variante comprende L33R.

Los inventores han construido y probado variantes enzimáticas y composiciones detergentes que comprenden variantes de una ADNasa y demuestran que la adición de varias mutaciones aumenta la estabilidad sin comprometer el rendimiento. Por lo tanto, preferiblemente el número total de sustituyentes en comparación con la Id. de sec. n.º 1 es 1-20 o 3-20, p. ej., al menos 5 a 20, al menos 10 a 20 o tal como al menos 15 a 20 sustituciones en comparación con la ADNasa que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la Id. de sec. n.º 1. Preferiblemente, la variante de la invención tiene al menos diez, tal como al menos once, tal como al menos doce, tal como al menos trece, tal como al menos catorce, tal como al menos quince, tal como al menos dieciséis, tal como al menos diecisiete, tal como al menos diecinueve o incluso al menos veinte sustituciones seleccionadas de la lista que consiste en; T1I, T1V, G4K, S7G, K8R, S9I, S13Y, T22P, S25P, S27L, L27R, D32I, D32L, D32R, D32V, S39P, S39C, G41P, S42G, S42H, S42C, Q48D, D56I, D56L, S57W, S59V, S59C, N61E, T65L, T65V, T65M, T65W, S66M, S66W, S66Y, S66V, V76L, T77Y, F78L, P91L, S101N, S106L, S106R, S106H, Q109R, A112E, S116D, T127V, S130A, S130Y, T138D, Q140V, Q140G, S144P, A147H, C148A, W154Y, T157V, Y159A, Y159R, K160V, G162S, G162D, G162C, Q166D, S167L, Q174N, G175D, G175N, L177Y, N178D, N178E, S179L, C180A, S181E y S181L en donde la variante comprende L33R.

Por lo tanto, en una realización preferida, la composición detergente comprende una variante de una ADNasa precursora en la que la variante comprende un conjunto de sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en:

T1I+S13Y+T22P+S25P+S27R+L33R+S39P+S42G+S57W+S59V+S66Y+V76L+T77Y+Q109R+S116D+T127V+S144P+A147H+S167L+G175D

T1I+S13Y+T22P+S27L+L33R+S42G+S57W+S59V+V76L+Q109R+S116D+T127V+S144P+A147H+S167L+G175D
 T1I+S13Y+T22P+S27L+L33V+S42G+S57W+S59V+V76L+Q109R+S116D+T127V+S144P+A147H+S167L+G175D
 T1I+S13Y+T22P+S27L+L33Y+S42G+S57W+S59V+V76L+Q109R+S116D+T127V+S144P+A147H+S167L+G175D

- 5 Las variantes útiles en la presente invención pueden comprender mutaciones adicionales a las citadas anteriormente. Estas modificaciones adicionales preferiblemente no deberían cambiar significativamente las propiedades mejoradas de la variante de ADNasa, p. ej., sustituciones conservativas.

10 Los ejemplos de sustituciones conservativas están dentro de los grupos de aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), aminoácidos ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), aminoácidos polares (glutamina y asparagina), aminoácidos hidrófobos (leucina, isoleucina y valina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina) y aminoácidos pequeños (glicina, alanina, serina, treonina y metionina). Las sustituciones de aminoácidos que generalmente no alteran la actividad específica son conocidas en la técnica y han sido descritas, por ejemplo, por H. Neurath y R.L. Hill, 1979, en *The Proteins*, Academic Press, Nueva York. Las sustituciones más comunes son Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu y Asp/Gly.

20 Los aminoácidos esenciales de un polipéptido se pueden identificar mediante procedimientos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis de detección de alanina (Cunningham y Wells, 1989, *Science* 244: 1081-1085). En esta última técnica, se introducen mutaciones de una única alanina en cada residuo de la molécula y las moléculas mutadas resultantes se evalúan para determinar su actividad ADNasa con el fin de identificar los residuos aminoacídicos que son cruciales para la actividad de la molécula. Véase también, Hilton y col., 1996, *J. Biol. Chem.* 271: 4699-4708. El sitio activo de la enzima u otra interacción biológica también se puede determinar mediante análisis físico de la estructura, como se determina mediante técnicas tales como resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción de electrones o etiquetado de fotoafinidad, junto con la mutación de nuevos sitios de contacto de aminoácidos. Véanse, por ejemplo, Vos y col., 1992, *Science* 255: 306-312; Smith y col., 1992, *J. Mol. Biol.* 224: 899-904; Wlodaver y col., 1992, *FEBS Lett.* 309: 59-64.

ADNasa precursora

30 Preferiblemente, la ADNasa precursora se selecciona de cualquiera de las clases de enzimas E.C. 3.1.11, E.C. 3.1.12, E.C. 3.1.15, E.C. 3.1.16, E.C. 3.1.21, E.C. 3.1.22, E.C. 3.1.23, E.C. 3.1.24 y E.C.3.1.25.

35 Preferiblemente, la ADNasa precursora se obtiene de un microorganismo y la ADNasa es una enzima microbiana. La ADNasa es preferiblemente de origen fúngico o bacteriano.

40 La ADNasa precursora se obtiene preferiblemente a partir de *Bacillus p. ej., Bacillus, tal como Bacillus cibi, Bacillus sp-62451, Bacillus horikoshii, Bacillus sp-16840, Bacillus sp-62668, Bacillus sp-13395, Bacillus horneckiae, Bacillus sp-11238, Bacillus idriensis, Bacillus sp-62520, Bacillus algicola, Bacillus vietnamensis, Bacillus hwajinpoensis, Bacillus indicus, Bacillus marisflavi, Bacillus luciferensis, Bacillus sp. SA2-6.*

45 La ADNasa precursora pertenece preferiblemente al grupo de ADNasas comprendidas en el clado GYS, que son ADNasas que comprenden los motivos conservativos [D/M/L][S/T]GYSR[D/N] (Id. de sec. n.º: 25) o ASXNRSKG (Id. de sec. n.º: 26) y que comparten propiedades estructurales y funcionales similares, véase, p. ej., la alineación en la figura 1 y la generación de árboles filogenéticos en el ejemplo 11 del documento WO 2017/060475. Las ADNasas del clado GYS se obtienen preferiblemente del género *Bacillus*.

50 Una variante preferida para su uso en la presente memoria comprende una variante de una ADNasa precursora del clado GYS que tiene actividad ADNasa, opcionalmente en donde el precursor comprende uno o ambos motivos [D/M/L][S/T]GYSR[D/N] (Id. de sec. n.º: 25), ASXNRSKG (Id. de sec. n.º: 26) y en donde el polipéptido se selecciona del grupo de polipéptidos:

- a) un polipéptido que tiene al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º: 1,
- 55
- b) un polipéptido que tiene al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º: 2,
- 60
- c) un polipéptido que tiene al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º: 3,
- 65

q) un polipéptido que tiene al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º 17,

r) un polipéptido que tiene al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º 18,

s) un polipéptido que tiene al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º 19,

t) un polipéptido que tiene al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º 20,

u) un polipéptido que tiene al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º 21,

v) un polipéptido que tiene al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º 22,

w) un polipéptido que tiene al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º 23 y

x) un polipéptido que tiene al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º 24.

Los polipéptidos que tienen actividad ADNasa y que comprenden los motivos del clado GYS han mostrado particularmente buenas propiedades de limpieza profunda, p. ej., las ADNasas son especialmente eficaces para eliminar o reducir los componentes de la materia orgánica, tales como los componentes de la biopelícula, de un artículo tal como un textil o una superficie dura.

Preferiblemente, la variante comprende una variante de una ADNasa precursora, en donde la ADNasa precursora pertenece al clado GYS y en donde la ADNasa precursora comprende uno o ambos motivos [D/M/L][S/T]GYSR[D/N] (Id. de sec. n.º 25) o ASXNRSKG (Id. de sec. n.º 26).

Las ADNasas precursoras pueden ser (a) un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de al menos 60 % respecto del polipéptido maduro con la Id. de sec. n.º 1, (b) un polipéptido codificado por un polinucleótido que se hibrida en condiciones de alto rigor con la secuencia codificante del polipéptido maduro o el complemento de longitud completa de la misma; o (c) un polipéptido codificado por un polinucleótido que tiene una identidad de secuencia de al menos un 60 % respecto a la secuencia que codifica el polipéptido maduro.

La precursora tiene preferiblemente una identidad de secuencia con el polipéptido mostrado con Id. de sec. n.º 1 de al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, tal como al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º 1, que tiene actividad ADNasa. Incluso puede ser preferible que la precursora comprenda o consista en la secuencia de aminoácidos con Id. de sec. n.º 1.

Se puede preferir que la precursora se seleccione de las ADNasas de bacilo, p. ej. una ADNasa de *Bacillus cibi*, p. ej. la ADNasa descrita en la presente descripción como la Id. de sec. n.º 1.

Método de limpieza

Según la presente invención, también se proporciona un método para tratar o limpiar un artículo o superficie sucia tal como una superficie dura sucia o, preferiblemente, un tejido. El método comprende (i) poner en contacto el artículo o la superficie, preferiblemente un tejido, con una solución de lavado acuosa que comprende una variante de ADNasa como se describe en la presente descripción, y preferiblemente además, un adyuvante de composición de detergente; y (ii) opcionalmente enjuagar y (iii) secar la superficie. La variante y el adjunto de composición detergente se pueden añadir al agua por separado o, preferiblemente, la solución de lavado acuosa se forma añadiendo la composición detergente de la presente descripción al agua para formar la solución de lavado acuosa.

El artículo o la superficie pueden ponerse en contacto con la solución de lavado acuosa en un proceso de lavado manual o a máquina. Preferiblemente, el contacto con la solución de lavado acuosa se realiza en un ciclo de lavado, con la máxima preferencia en una lavadora; sin embargo, para un tratamiento, la etapa de contacto puede realizarse durante una etapa de aclarado del proceso de lavado.

El pH de la solución de lavado acuosa está preferiblemente en el intervalo de 1 o 2 a 11, tal como en el intervalo de 5,5 a 11, tal como en el intervalo de 6 a 10, en el intervalo de 7 a 9 o en el intervalo de 7 a 8,5.

La solución de lavado acuosa está preferiblemente a una temperatura en el intervalo de 5 °C a 95 °C o en el intervalo de 10 a 80 °C, 10 °C a 70 °C, 10 °C a 60 °C, 10 °C a 50 °C o en el intervalo de 15 °C a 40 °C o en el intervalo de 20 °C a 30 °C.

La concentración de la enzima variante de ADNasa en la solución de lavado acuosa suele estar normalmente en el intervalo de 0,00004-100 ppm de proteína enzimática, tal como en el intervalo de 0,00008-100, en el intervalo de 0,0001-100, en el intervalo de 0,0002-100, en el intervalo de 0,0004-100, en el intervalo de 0,0008-100, en el intervalo de 0,001-100 ppm de proteína enzimática, 0,01-100 ppm de proteína enzimática, preferiblemente 0,05-50 ppm de proteína enzimática, más preferiblemente 0,1-50 ppm de proteína enzimática, más preferiblemente 0,1-30 ppm de proteína enzimática, más preferiblemente 0,5-20 ppm de proteína enzimática y lo más preferiblemente 0,5-10 ppm de proteína enzimática.

El aclarado opcional puede ser una etapa de aclarado manual o aclarado mecánico, por ejemplo, como parte de un proceso estándar de lavado o de lavado de ropa en una lavadora automática. Opcionalmente puede haber más de una etapa de aclarado. Una composición de limpieza o tratamiento adicional opcional (que comprende opcionalmente una enzima ADNasa, por ejemplo, como se describe en la presente descripción) puede añadirse a una etapa de prelavado y/o una etapa de aclarado, por ejemplo, una composición de pretratamiento y/o de acondicionamiento de tejidos. La etapa de secado puede ser cualquier etapa de secado estándar, por ejemplo, para lavado de ropa, en tendedero o en secadora.

Además de la limpieza, las composiciones detergentes y los métodos de la invención pueden, como segundo beneficio, prevenir y/o reducir el mal olor. La presente invención puede permitir la reducción de la redeposición de la suciedad, particularmente desde la solución de lavado acuosa donde, a medida que el lavado avanza, la suciedad se elimina de las superficies que se están limpiando y queda suspendida en la solución de lavados acuosa. Cuando dicha suciedad pegajosa permanece sobre la superficie que se está limpiando, la redeposición puede ser un problema que se puede superar con las composiciones detergentes y los métodos de limpieza según la presente invención. Las composiciones detergentes y los métodos de la presente invención que comprenden variantes de ADNasa pueden proporcionar propiedades mejoradas de limpieza profunda en comparación con la ADNasa precursora y, en algunos aspectos, la presente invención reduce la adherencia y/o la redeposición. En algunos aspectos, la invención se refiere al uso de una variante de ADNasa o composición que comprende la variante de ADNasa según la invención para la limpieza profunda de un artículo, en donde el artículo es un tejido o una superficie dura.

Además, la invención se refiere al uso de una variante de ADNasa o composición que comprende la variante de ADNasa según la invención para prevenir y/o reducir la adherencia de la suciedad a un artículo. En algún aspecto, el artículo es textil. Cuando la suciedad no se adhiere al artículo, el artículo aparece más limpio. Por lo tanto, la invención se refiere además al uso de una variante de ADNasa según la invención para mantener o mejorar la blancura del artículo.

La presente invención se refiere además a composiciones detergentes que comprenden una variante de ADNasa según la invención preferiblemente con un ingrediente adyuvante de detergente. La composición detergente que comprende una variante de ADNasa según la invención puede usarse para limpieza profunda de un artículo, para prevenir y/o reducir la adherencia de un artículo, para pretratar manchas en el artículo, para prevenir y/o reducir la redeposición de suciedad durante un ciclo de lavado, para prevenir y/o reducir la adherencia de la suciedad a un artículo, para mantener o mejorar la blancura de un artículo y/o para prevenir y/o reducir el mal olor de un artículo.

Preparación de una variante

La variante de ADNasa para su uso en la presente memoria se puede fabricar mediante un proceso que comprende:

(a) introducir en una ADNasa precursora una o más sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en: T1I, T1V, G4K, S7G, K8R, S9I, S13Y, T22P, S25P, S27L, S27R, D32I, D32L, D32R, D32V, L33R, L33K, S39P, S39C, G41P, S42G, S42H, S42C, Q48D, D56I, D56L, S57W, S59V, S59C, N61E, T65L, T65V, T65M, T65W, S66M, S66W, S66Y, S66V, V76L, T77Y, F78L, P91L, S101N, S106L, S106R, S106H, Q109R, A112E, S116D, T127V, S130A, S130Y, T138D, Q140V, Q140G, S144P, A147H, C148A, W154Y, T157V, Y159A, Y159R, K160V, G162S, G162D, G162C, Q166D, S167L, Q174N, G175D, G175N, L177Y, N178D, N178E, S179L, C180A, S181E y S181L;

(b) y recuperar la variante, en donde la variante tiene actividad ADNasa.

Las variantes preferidas se preparan al:

a) introducir en una ADNasa precursora una o más sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en: G4K, S7G, K8R, S9I, N16G, S27K, S27R, D32F, D32I, D32L, D32R, D32V, L33H, L33R, L33K, L33V, L33Y, S39C, G41P, S42H, D45E, Q48D, N61E, T65M, T65W, S66R, S66M, S66W, S66Y, S66V, F78L, P91L, S101N, S106L, S106R, S106H, Q109E, A112E, T127P, S130A, S130Y, T138D, Q140V, Q140G, A147P, C148A, W154Y, T157V, Y159A, Y159R, G162C, Q174N, L177Y, S179L y C180A;

b) y recuperar la variante, en donde la variante tiene actividad ADNasa.

La variante tiene preferiblemente al menos una propiedad mejorada en comparación con la ADNasa precursora, p. ej., en comparación con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º 1. El método comprende preferiblemente la introducción de 2-20, p. ej. 2-10 y 1-5, tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 alteraciones en comparación con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º 1.

Algunos aspectos de la invención se refieren a un método para obtener una variante de ADNasa que comprende introducir en una ADNasa precursora una alteración en una o más posiciones, en donde la ADNasa precursora pertenece al clado GYS y en donde la ADNasa precursora comprende uno o ambos motivos [D/M/L][S/T]GYSR[D/N] (Id. de sec. n.º 25) o ASXNRSKG (Id. de sec. n.º 26).

Algunos aspectos de la invención se refieren a un método para obtener una variante de ADNasa que comprende introducir en una ADNasa precursora una alteración en una o más posiciones, en donde la ADNasa precursora se selecciona del grupo de polipéptidos:

a) un polipéptido que tiene al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º 1,

b) un polipéptido que tiene al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º 2,

c) un polipéptido que tiene al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º 3,

d) un polipéptido que tiene al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º 4,

e) un polipéptido que tiene al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º 5,

f) un polipéptido que tiene al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º 6,

g) un polipéptido que tiene al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º 7,

- [illegible]

x) un polipéptido que tiene al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º: 24.

5 Un aspecto se refiere a un método para obtener una variante de ADNasa en donde la ADNasa precursora se obtiene del género *Bacillus*.

La variante de ADNasa es preferiblemente una variante que tiene al menos 80 %, tal como al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % pero menos de 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º: 1.

Las variantes de la invención se pueden preparar mediante procedimientos tales como los mencionados a continuación.

15 La mutagénesis dirigida al sitio es una técnica en la que se introducen una o más (*p. ej.*, varias) mutaciones en uno o más sitios definidos en un polinucleótido que codifica el precursor.

La mutagénesis dirigida al sitio se puede llevar a cabo *in vitro* mediante PCR que implica el uso de cebadores de oligonucleótidos que contienen la mutación deseada. La mutagénesis dirigida al sitio también se puede llevar a cabo *in vitro* mediante mutagénesis en casete que implica la escisión mediante una enzima de restricción en un sitio del plásmido que comprende un polinucleótido que codifica el precursor y la posterior unión de un oligonucleótido que contiene la mutación en el polinucleótido. Normalmente, la enzima de restricción que digiere el plásmido y el oligonucleótido es la misma, lo que permite crear extremos adherentes en el plásmido y la inserción para unirlos entre sí. Véanse, *p. ej.*, Scherer y Davis, 1979, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 76: 4949-4955; y Barton y col., 1990, *Nucleic Acids Res.* 18: 7349-4966.

25 La mutagénesis dirigida al sitio también se puede llevar a cabo *in vivo* por métodos conocidos en la técnica. Véanse, *p. ej.*, la solicitud de patente con número de publicación US-2004/0171154; Storici y col., 2001, *Nature Biotechnol.* 19: 773-776; Kren y col., 1998, *Nat. Med.* 4: 285-290; y Calissano y Macino, 1996, *Fungal Genet. Newslett.* 43: 15-16.

30 La construcción de genes sintéticos conlleva la síntesis *in vitro* de una molécula de polinucleótido diseñada para codificar un polipéptido de interés. La síntesis de genes se puede llevar a cabo utilizando numerosas técnicas, tal como la tecnología multiplexada en microchip descrita en Tian y col. (2004, *Nature* 432: 1050-1054) y tecnologías similares en donde los oligonucleótidos se sintetizan y ensamblan sobre chips microfluidos fotoprogramables.

35 Pueden realizarse y analizarse múltiples sustituciones, delecciones y/o inserciones de aminoácidos utilizando métodos conocidos de mutagénesis, recombinación y/o barajado, seguido por un procedimiento de cribado relevante, tal como el descrito en Reidhaar-Olson y Sauer, 1988, *Science* 241: 53-57; Bowie y Sauer, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 86: 2152-2156; documento WO 95/17413; o WO 95/22625. Otros métodos que se pueden usar incluyen la técnica de PCR propensa a error, expresión en fago (*p. ej.*, Lowman y col., 1991, *Biochemistry* 30: 10832-10837; documento US 5.223.409; WO 92/06204) y mutagénesis dirigida a la región (Derbyshire y col., 1986, *Gene* 46: 145; Ner y col., 1988, *DNA* 7: 127).

45 Los métodos de mutagénesis/intercambio se pueden combinar con alto rendimiento, métodos de cribado automatizado para detectar la actividad de los polipéptidos mutagenizados clonados expresados en células huésped (Ness y col., 1999, *Nature Biotechnology* 17: 893-896). Las moléculas de ADN mutagenizadas que codifican polipéptidos activos se pueden recuperar de las células hospedadoras y secuenciadas rápidamente utilizando métodos convencionales en la técnica. Estos métodos permiten determinar rápidamente la importancia de los restos del aminoácido individuales en un polipéptido.

50 La construcción de genes semisintéticos se lleva a cabo combinando aspectos de la construcción de genes sintéticos, y/o la mutagénesis dirigida al sitio, y/o la mutagénesis aleatoria, y/o el intercambio. La construcción semisintética se tipifica por un proceso en el que se utilizan fragmentos de polinucleótido que se han sintetizado, en combinación con técnicas de PCR. Por lo tanto, las regiones definidas de los genes se pueden sintetizar *de novo*, mientras que otras regiones se pueden amplificar utilizando cebadores mutagénicos específicos de sitio, mientras que otras regiones adicionales se pueden someter a amplificación mediante PCR propensa a error o PCR no propensa a error. A continuación, las subsecuencias de polinucleótido se pueden intercambiar.

Construcciones de ácido nucleico

60 Las construcciones de ácido nucleico que comprenden un polinucleótido que codifica las variantes de ADNasa para su uso en la presente invención pueden unirse operativamente a una o más secuencias de control que dirigen la expresión de la secuencia codificante en una célula huésped adecuada en condiciones compatibles con las secuencias de control.

65 El polinucleótido puede manipularse de diversas maneras para proporcionar la expresión del polipéptido. La manipulación del polinucleótido antes de su inserción en un vector puede ser deseable o necesaria dependiendo del vector de

expresión. Las técnicas para modificar polinucleótidos utilizando métodos de ADN recombinante son bien conocidas en la técnica.

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

Los ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de las construcciones de ácido nucleico de la presente invención en una célula huésped bacteriana son los promotores obtenidos a partir del gen de la alfa-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* (amyQ), el gen de la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (amyL), el gen de la penicilinas de *Bacillus licheniformis* (penP), el gen de la amilasa maltogénica de *Bacillus stearothermophilus* (amyM), el gen de la levansacarasa de *Bacillus subtilis* (sacB), los genes de xilA y xilA de *Bacillus subtilis*, el gen cryIIIA de *Bacillus thuringiensis* (Agaissie y Lerlus, 1994, Molecular Microbiology 13: 97-107), el operón lac de *E. coli*, el promotor trc de *E. coli* (Egon y col., 1988, Gene 69: 301-315), el gen de la agarasa de *Streptomyces coelicor* (dagA) y el gen de la beta-lactamasa procariota (Villa-Kamarff y otros, 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 75: 3727-3731), así como el promotor tac (DeBoer y col., 1983, proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 80: 21-25). Otros promotores se describen en "Useful proteins from recombinant bacteria" en Gilbert y col., 1980, Scientific American 242: 74-94; y en Sambrook y col., 1989, más arriba. Se describen ejemplos de promotores en tándem en el documento WO 99/43835.

Los ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de las construcciones de ácido nucleico de la presente invención en una célula huésped de hongo filamentoso son promotores obtenidos a partir de los genes de la acetamidasa de *Bacillus nidulans*, alfa amilasa neutra de *Bacillus niger*, alfa amilasa estable a ácido de *Bacillus niger*, glucoamilasa de *Bacillus niger* o *Bacillus awamori* (glaA), amilasa TAKA de *Bacillus cibi*, proteasa alcalina de *Bacillus cibi*, triosa fosfato isomerasa de *Bacillus cibi*, proteasa análoga a tripsina de *Fusarium oxysporum* (documento WO 96/00787), amiloglucosidasa de *Fusarium venenatum* (documento WO 00/56900), *Fusarium venenatum* Daria (documento WO 00/56900), *Fusarium venenatum* Quinn (documento WO 00/56900), lipasa de *Rhizomucor miehei*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, beta-glucosidasa de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa I de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa III de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa V de *Trichoderma reesei*, xilanasa I de *Trichoderma reesei*, xilanasa II de *Trichoderma reesei*, xilanasa III de *Trichoderma reesei*, beta-xilosidasa de *Trichoderma reesei* y factor de alargamiento de traducción de *Trichoderma reesei*, así como el promotor tpi NA2 (un promotor modificado procedente de un gen de la alfa amilasa neutra de *Bacillus* en el que el líder no traducido se ha sustituido por un líder no traducido procedente de un gen de la triosa fosfato isomerasa de *Bacillus*; cuyos ejemplos no limitativos incluyen promotores modificados de un gen de la alfa-amilasa neutra de *Bacillus niger* en el que el líder no traducido se ha sustituido por un líder no traducido procedente de un gen de la triosa fosfato isomerasa de *Bacillus nidulans* o *Bacillus cibi*); y promotores mutantes, truncados e híbridos de los mismos. Se describen otros promotores en la patente US-6.011.147.

En un huésped de levadura, se obtienen promotores útiles a partir de los genes de la enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ENO: 1), galactocinasa de *Saccharomyces cerevisiae* (GAL1), alcohol deshidrogenasa/gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ADH1, aDH2/GAP), triosa fosfato isomerasa de *Saccharomyces cerevisiae* (TPI), metalotioneína de *Saccharomyces cerevisiae* (CUP1) y fosfoglicerato quinasa 3 de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros promotores útiles para células huésped de levadura se describen en Romanos y col., 1992, Yeast 8: 423-488.

La secuencia de control también puede ser un terminador de transcripción, que reconoce una célula huésped para terminar la transcripción. El terminador está unido operativamente al extremo 3' del polinucleótido que codifica el polipéptido. En la presente invención se puede usar cualquier terminador que sea funcional en la célula huésped.

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

Los terminadores preferidos para células huésped de hongos filamentosos se obtienen a partir de los genes de la acetamidasa de *Bacillus nidulans*, antranilato sintasa de *Bacillus nidulans*, glucoamilasa de *Bacillus niger*, alfa-glucosidasa de *Bacillus niger*, amilasa TAKA de *Bacillus cibi*, proteasa análoga a tripsina de *Fusarium oxysporum*, beta-glucosidasa de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa I de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa III de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa V de *Trichoderma reesei*, xilanasa I de *Trichoderma reesei*, xilanasa II de *Trichoderma reesei*, xilanasa III de *Trichoderma reesei*, beta-xilosidasa de *Trichoderma reesei* y factor de alargamiento de la traducción de *Trichoderma reesei*.

- Los terminadores preferidos para células huésped de levadura se obtienen de los genes de *enolasa de Saccharomyces cerevisiae*, *citocromo C de Saccharomyces cerevisiae* (CYC1) y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros terminadores útiles para células huésped de levadura se describen en Romanos y col., 1992, *supra*.
- La secuencia de control también puede ser una región estabilizante de ARNm posterior a un promotor y anterior a la de la secuencia codificante de un gen que aumenta la expresión del gen.
- Los ejemplos de regiones estabilizantes de ARNm adecuadas se obtienen de un gen *cryIIIA* de *Bacillus thuringiensis* (documento WO 94/25612) y un gen SP82 de *Bacillus subtilis* (Hue y col., 1995, Journal of Bacteriology 177: 3465-3471).
- La secuencia de control también puede ser una región líder, no traducida de un ARNm que es importante para su traducción por la célula huésped. El líder está unido operativamente al extremo 5' del polinucleótido que codifica el polipéptido. Se puede usar cualquier líder que sea funcional en la célula huésped.
- Los líderes preferidos para células huésped fúngicas filamentosas se obtienen de los genes de la amilasa TAKA de *Bacillus cibi* y la triosa isomerasa de *Bacillus nidulans*.
- Los líderes adecuados para células huésped de levadura se obtienen de los genes de la enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ENO: 1), 3 fosfoglicerato quinasa de *Saccharomyces cerevisiae*, factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae* y alcohol deshidrogenasa/gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ADH2/GAP).
- La secuencia de control también puede ser una secuencia de poliadenilación, una secuencia unida operativamente al extremo 3' del polinucleótido que, cuando se transcribe, es reconocida por la célula huésped como una señal para añadir residuos de poliadenosina al ARNm transcrito. Se puede usar cualquier secuencia de poliadenilación que sea funcional en la célula huésped.
- Las secuencias de poliadenilación preferidas para células huésped fúngicas filamentosas se obtienen a partir de los genes de la antranilato sintasa de *Bacillus nidulans*, glucoamilasa de *Bacillus niger*, alfa-glucosidasa de *Bacillus niger*, amilasa TAKA de *Bacillus cibi* y proteasa análoga a tripsina de *Fusarium oxysporum*.
- Las secuencias de poliadenilación útiles para células huésped de levadura se describen en Guo y Sherman, 1995, Mol. Cellular Biol. 15: 5983-5990.
- La secuencia de control también puede ser una región codificadora del péptido señal que codifica un péptido señal unido al extremo N de un polipéptido y dirige el polipéptido a la ruta secretora de la célula. El extremo 5' de la secuencia codificante del polinucleótido puede contener inherentemente una secuencia codificante del péptido señal unida naturalmente en el marco de lectura de la traducción con el segmento de la secuencia codificante que codifica el polipéptido. Alternativamente, el extremo 5' de la secuencia codificante puede contener una secuencia codificante del péptido señal que es foránea a la secuencia codificante. Puede requerirse una secuencia codificante del péptido señal foránea si la secuencia codificante no contiene naturalmente una secuencia codificante del péptido señal. Alternativamente, una secuencia codificante del péptido señal foránea puede simplemente sustituir la secuencia codificante del péptido señal natural para mejorar la secreción del polipéptido. Sin embargo, puede usarse cualquier secuencia codificante del péptido señal que dirija el polipéptido expresado a la ruta secretora de una célula huésped.
- Las secuencias codificantes de péptidos señal eficaces para células huésped bacterianas son las secuencias codificantes de péptidos señal obtenidas de los genes de la amilasa maltogénica de *Bacillus* NCB 11837, subtilisina de *Bacillus licheniformis*, beta-lactamasa de *Bacillus licheniformis*, alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, proteasas neutras de *Bacillus stearothermophilus* (nprT, nprS, nprM) y prsA de *Bacillus subtilis*. Se describen péptidos señal adicionales se describen en Simonen y Palva, 1993, Microological Reviews 57: 109-137.
- Las secuencias codificantes de péptidos señal eficaces para células huésped de hongo filamentoso son las secuencias codificantes de péptidos señal obtenidas de los genes de la amilasa neutra de *Bacillus niger*, glucoamilasa de *Bacillus niger*, amilasa TAKA de *Bacillus cibi*, celulasa de *Humicola insolens*, endoglucanasa V de *Humicola insolens*, lipasa de *Humicola lanuginosa* y proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*.
- Se obtienen péptidos señal útiles para células huésped de levadura de los genes del factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae* y la invertasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otras secuencias codificantes de péptidos señal útiles se describen en Romanos y col., 1992, *supra*.
- La secuencia de control también puede ser una secuencia codificante de propéptido que codifica un propéptido situado en el extremo N de un polipéptido. El polipéptido resultante se conoce como proenzima o propolipéptido (o un zimógeno en algunos casos). Un propolipéptido generalmente es inactivo y puede convertirse en un polipéptido activo mediante escisión catalítica o autocatalítica del propéptido del propolipéptido. La secuencia

codificante del propéptido se puede obtener de los genes de la proteasa alcalina de *Bacillus subtilis* (aprE), proteasa neutra de *Bacillus subtilis* (nprT), lacasa de *Myceliophthora thermophila* (documento WO 95/33836), proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei* y el factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae*.

- 5 Cuando están presentes las secuencias tanto del péptido señal como del propéptido, la secuencia del propéptido se coloca junto al extremo N de un polipéptido y la secuencia del péptido señal se coloca junto al extremo N de la secuencia del propéptido.

10 También puede ser deseable añadir secuencias reguladoras que regulen la expresión del polipéptido respecto al crecimiento de la célula huésped. Los ejemplos de secuencias reguladoras son las que hacen que la expresión del gen se active o se desactive en respuesta a un estímulo químico o físico, incluida la presencia de un compuesto regulador. Las secuencias reguladoras en sistemas procariotas incluyen los sistemas de operadores lac, tac y trp. En levaduras se puede usar el sistema ADH2 o el sistema GAL1. En hongos filamentosos se pueden usar el promotor de glucoamilasa de *Bacillus niger*, el promotor de la alfa-amilasa TAKA de *Bacillus cibi* y el promotor de glucoamilasa de *Bacillus cibi*, el promotor de la celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei* y el promotor de la celobiohidrolasa II de *Trichoderma reesei*. Otros ejemplos de secuencias reguladoras son las que permiten la amplificación génica. En los sistemas eucariotas, estas secuencias reguladoras incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa que se amplifica en presencia de metotrexato y los genes de la metalotioneína que se amplifican con metales pesados. En estos casos, el polinucleótido que codifica el polipéptido estaría operativamente unido a la secuencia reguladora.

20 Vectores de expresión

Esta descripción también se refiere a vectores de expresión recombinantes que comprenden un polinucleótido que codifica las variantes de ADNasa, un promotor y señales de parada transcripcionales y traduccionales. Las diversas secuencias de nucleótidos y de control pueden unirse entre sí para producir un vector de expresión recombinante que puede incluir uno o más sitios de restricción cómodos para permitir la inserción o sustitución del polinucleótido que codifica el polipéptido en tales sitios. Alternativamente, el polinucleótido puede expresarse mediante la inserción del polinucleótido o construcción de ácido nucleico que comprende el polinucleótido en un vector apropiado para la expresión. Al crear el vector de expresión, la secuencia codificante se ubica en el vector de manera que la secuencia codificante se une operativamente con secuencias de control adecuadas para expresión. En un aspecto adicional, los codones de la secuencia de polinucleótido se han modificado mediante sustituciones de nucleótidos a los correspondientes al uso del codón del organismo hospedador previsto para la producción del polipéptido de la presente invención. El vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector (*p. ej.*, un plásmido o virus) que puede someterse cómodamente a procedimientos de ADN recombinante y puede provocar la expresión del polinucleótido. La elección del vector dependerá típicamente de la compatibilidad del vector con la célula huésped en la que se introducirá el vector. El vector puede ser un plásmido lineal o circular cerrado.

El vector puede ser un vector que se replica de forma autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido, un elemento extracromosómico, un minicromosoma o un cromosoma artificial. El vector puede contener cualquier medio para asegurar la autorreplicación. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en la célula huésped, se integra en el genoma y se replica junto con el uno o más cromosomas en los que se ha integrado. Además, puede usarse un único vector o plásmido o dos o más vectores o plásmidos que conjuntamente contienen el ADN total que se va a introducir en el genoma de la célula huésped, o un transposón.

El vector contiene preferiblemente uno o más marcadores seleccionables que permiten la selección fácil de células transformadas, transfectadas, transducidas o similares. Un marcador seleccionable es un gen cuyo producto proporciona resistencia biocida o vírica, resistencia a metales pesados, fototrofia a los auxótrofos y similares.

50 Los ejemplos de marcadores bacterianos seleccionables son los genes *dal* de *Bacillus licheniformis* o *Bacillus subtilis*, o marcadores que transmiten resistencia a antibióticos tal como resistencia a ampicilina, cloranfenicol, kanamicina, neomicina, espectinomycin o tetraciclina. Los marcadores adecuados para células huésped de levadura incluyen, aunque no de forma limitativa, ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1 y URA3. Los marcadores seleccionables para su uso en una célula huésped fúngica filamentosa incluyen, aunque no de forma limitativa, *adeA* (fosforribosilaminoimidazol-succinocarboxamida sintasa), *adeB* (fosforribosilaminoimidazol sintasa), *amdS* (acetamidasa), *argB* (ornitina carbamoiltransferasa), *bar* (fosfinotricina acetiltransferasa), *hph* (higromicina fosfotransferasa), *niaD* (nitrato reductasa), *pirG* (orodina-5'fosfato descarboxilasa), *sC* (sulfato adenotransferasa) y *trpC* (antranilato sintasa), así como equivalentes de los mismos. Preferidos para usar en una célula de *Bacillus* son los genes *amdS* y *pirG* de *Bacillus nidulans* o *Bacillus cibi* y un gen *bar* de *Streptomyces higroscopicus*. Preferidos para usar en una célula de *Trichoderma* son los genes *adeA*, *adeB*, *amdS*, *hph* y *pirG*.

El marcador seleccionable puede ser un sistema marcador seleccionable doble como se describe en el documento WO 2010/039889. En algunos aspectos, el marcador seleccionable doble es un sistema marcador seleccionable doble *hph-tk*.

65 El vector contiene preferiblemente uno o más elementos que permiten la integración del vector en el genoma de la célula huésped o la replicación autónoma del vector en la célula independiente del genoma. Para la integración en el

genoma de la célula hospedadora, el vector puede depender de la secuencia del polinucleótido que codifica el polipéptido o cualquier otro elemento del vector para la integración en el genoma por recombinación homóloga o no homóloga. Alternativamente, el vector puede contener polinucleótidos adicionales para dirigir la integración por recombinación homóloga en el genoma de la célula hospedadora en una o más ubicaciones precisas en el uno o varios cromosomas. Para aumentar la probabilidad de integración en una ubicación precisa, los elementos de integración deben contener un número suficiente de ácidos nucleicos, tal como de 100 a 10.000 pares de bases, de 400 a 10.000 pares de bases y de 800 a 10.000 pares de bases, que tienen un alto grado de identidad de secuencia con respecto a la secuencia diana correspondiente para mejorar la probabilidad de recombinación homóloga. Los elementos de integración pueden ser cualquier secuencia que sea homóloga de la secuencia diana en el genoma de la célula huésped. Además, los elementos de integración pueden ser polinucleótidos no codificantes o codificantes. Por otra parte, el vector puede integrarse en el genoma de la célula huésped mediante recombinación no homóloga.

Para la replicación autónoma, el vector puede también comprender un origen de replicación que permita que el vector se replique de manera autónoma en la célula huésped en cuestión. El origen de replicación puede ser cualquier replicador plasmídico que medie la replicación autónoma que funciona en una célula. La expresión “origen de replicación” o “replicador plasmídico” se refiere a un polinucleótido que permite que un plásmido o vector se replique *in vivo*.

Ejemplos de orígenes de replicación bacterianos son los orígenes de replicación de los plásmidos pBR322, pUC19, pACYC177 y pACYC184 que permiten la replicación en *E. coli*, y pUB110, pE194, pTA1060 y pAmp1 que permiten la replicación en *Bacillus*.

Ejemplos de orígenes de replicación para su uso en una célula huésped de levadura son el origen de replicación de 2 micrómetros, ARS1, ARS4, la combinación de ARS1 y CEN3, y la combinación de ARS4 y CEN6.

Los ejemplos de orígenes de replicación útiles en una célula fúngica filamentosa son AMA1 y ANS1 (Gemmas y col., 1991, Gene 98: 61-67; Cullen y col., 1987, Nucleic Acids Res. 15: 9163-9175; documento WO 00/24883). El aislamiento del gen AMA1 y la construcción de plásmidos o vectores que comprenden el gen se pueden lograr según los métodos descritos en el documento WO 00/24883.

Se puede insertar más de una copia de un polinucleótido de la presente invención en una célula huésped para aumentar la producción de un polipéptido. Un aumento en el número de copias del polinucleótido puede obtenerse integrando al menos una copia adicional de la secuencia en el genoma de la célula hospedadora o incluyendo un gen marcador seleccionable amplificable en el polinucleótido donde las células que contienen copias amplificadas del gen marcador seleccionable y, por lo tanto, copias adicionales del polinucleótido, se pueden seleccionar mediante cultivo de las células en presencia del agente de selección adecuado.

Los procedimientos utilizados para ligar los elementos descritos anteriormente para construir los vectores de expresión recombinantes de la presente invención son bien conocidos por un experto en la materia (véase, p. ej., Sambrook y col., 1989, citado anteriormente).

Células huésped

Las células huésped recombinantes comprenden un polinucleótido operativamente unido a una o más secuencias de control que dirigen la producción de un polipéptido útil en la presente invención. Una construcción o vector que comprende un polinucleótido se introduce en una célula huésped de manera que la construcción o vector se mantenga como un integrante cromosómico o como un vector extracromosómico autorreplicante como se ha descrito anteriormente. La expresión “célula huésped” abarca cualquier progenie de una célula precursora que no es idéntica a la célula precursora debido a mutaciones que se producen durante la replicación. La elección de una célula huésped dependerá en gran medida del gen que codifica el polipéptido y su fuente.

La célula huésped puede ser cualquier célula útil en la producción recombinante de un polipéptido de la presente invención, p. ej., una célula procariota o eucariota.

La célula huésped procariota puede ser cualquier bacteria grampositiva o gramnegativa. Las bacterias grampositivas incluyen, aunque no de forma limitativa, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Geobacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Oceanobacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Streptomyces*. Las bacterias gramnegativas incluyen, sin limitación, *Campylobacter*, *E. coli*, *Flavobacterium*, *Fusobacterium*, *Helicobacter*, *Ilyobacter*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Salmonella* y *Ureaplasma*.

La célula huésped bacteriana puede ser cualquier célula de *Bacillus* que incluye, aunque no de forma limitativa, células de *Bacillus alcalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus thuringiensis*.

La célula huésped bacteriana también puede ser cualquier célula de *Streptococcus* que incluye, aunque no de forma limitativa, células de *Streptococcus equimilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus uberis* y *Streptococcus equis sp Zooepidemicus*.

- 5 La célula huésped bacteriana también puede ser cualquier célula de *Streptomyces* que incluye, sin limitación, células de *Streptomyces achromogenes*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces griseus* y *Streptomyces lividans*.

- 10 La introducción de ADN en una célula de *Bacillus* puede realizarse mediante transformación de protoplastos (véase, *p. ej.*, Chang y Cohen, 1979, Mol. Gen. Genet. 168: 111-115), transformación de células competentes (véanse, *p. ej.*, Young y Spizizen, 1961, J. Bacteriol. 81: 823-829 o Dubnau y Davdoff-Abelson, 1971, J. Mol. Biol. 56: 209-221), electroporación (véase, *p. ej.*, Shigekawa y Dsegwer, 1988, Biotechniques 6: 742-751) o conjugación (véase, *p. ej.*, Koehler y Thorne, 1987, J. Bacteriol. 169: 5271-5278). La introducción de ADN en una célula de *E. coli* puede efectuarse mediante transformación de protoplastos (véase, *p. ej.*, Hanahan, 1983, J. Mol. Biol. 166: 557-580) o electroporación (véase, *p. ej.*, Dower y col., 1988, Nucleic Acids Res. 16: 6127-6145). La introducción de ADN en una célula de *Streptomyces* puede efectuarse mediante transformación de protoplastos, electroporación (véanse, *p. ej.*, Gong y col., 2004, Folia Microbiol. (Praha) 49: 399-405), conjugación (véase, *p. ej.*, Mazodier y col., 1989, J. Bacteriol. 171: 3583-3585) o transducción (véase, *p. ej.*, Burke y col., 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 98: 6289-6294). La introducción de ADN en una célula de *Pseudomonas* puede efectuarse por electroporación (véase, *p. ej.*, Choi y col., 2006, J. Microbiol. Methods 64: 391-397) o conjugación (véase, *p. ej.*, Pinedo y Smets, 2005, Appl. Environ. Microbiol. 71: 51-57). La introducción de ADN en una célula de *Streptococcus* puede efectuarse por competencia natural (véase, *p. ej.*, Perry y Kuramitsu, 1981, Infect. Immun. 32: 1295-1297), transformación de protoplastos (véase, *p. ej.*, Catt y Jollick, 1991, Microbios 68: 189-207), electroporación (véase, *p. ej.*, Buckley y col., 1999, Appl. Environ. Microbiol. 65: 3800-3804) o conjugación (véase, *p. ej.*, Clewell, 1981, Microbiol. Rev. 45: 409-436). Sin embargo, se puede usar cualquier método conocido en la técnica para introducir ADN en una célula huésped.

La célula huésped también puede ser eucariota, tal como una célula de mamífero, insecto, vegetal o fúngica.

- 30 La célula huésped puede ser una célula fúngica. “Fungi” como se usa en la presente descripción, incluye los *Phylum Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridiomycota* y *Zygomycota* así como oomicetos y todos los hongos mitoespóricos (como se define en Hawksworth y col., en Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi, 8ª edición, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, Reino Unido).

- 35 La célula huésped fúngica puede ser una célula de levadura. “Levadura” como se utiliza en el presente documento incluye levaduras que se reproducen por ascosporas (Endomicetales), levadoras que se reproducen por basidiosporas y levaduras que pertenecen a los hongos imperfectos (Blastomicetos). Dado que la clasificación de las levaduras puede cambiar en el futuro, para los fines de esta invención, la levadura se definirá como se describe en Biology and Activities of Yeast (Skinner, Passmore y Davenport, editores, Soc. App. Bacteriol. Symposium, Serie n.º 9, 1980).

- 40 La células huésped de levadura puede ser una célula de *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* o *Yarrowia*, tal como una célula de *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis*, *Saccharomyces oviformis* o *Yarrowia lipolytica*.

- 45 La célula huésped fúngica puede ser una célula fúngica filamentosa. Los “hongos filamentosos” incluyen todas las formas filamentosas de la subdivisión *Eumycota* y *Oomycota* (como se define en Hawksworth y col., 1995, *supra*). Los hongos filamentosos generalmente se caracterizan por una pared micelar compuesta por quitina, celulosa, glucano, quitosano, manano y otros polisacáridos complejos. El crecimiento vegetativo se realiza por alargamiento de hifas y el catabolismo del carbono es aeróbico estricto. Por el contrario, el crecimiento vegetativo por levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae* se realiza por gemación de un talo unicelular y el catabolismo del carbono puede ser fermentativo.

- 55 La células huésped de hongo filamentoso puede ser una célula de *Acremonium*, *Bacillus*, *Aureobasidium*, *Bjerkandera*, *Ceriporiopsis*, *Chrysosporium*, *Coprinus*, *Coriolus*, *Cryptococcus*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Phlebia*, *Piromyces*, *Pleurotus*, *Schizophyllum*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolypocladium*, *Trametes* o *Trichoderma*.

- 60 Por ejemplo, la célula de hongo filamentoso puede ser una célula de *Bacillus awamori*, *Bacillus foetidus*, *Bacillus fumigatus*, *Bacillus japonicus*, *Bacillus nidulans*, *Bacillus niger*, *Bacillus cibi*, *Bjerkandera adusta*, *Ceriporiopsis aneirina*, *Ceriporiopsis caregiea*, *Ceriporiopsis gilvescens*, *Ceriporiopsis pannocinta*, *Ceriporiopsis rivulosa*, *Ceriporiopsis subrufa*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Chrysosporium inops*, *Chrysosporium keratinophilum*, *Chrysosporium lucknowense*, *Chrysosporium merdarium*, *Chrysosporium pannicola*, *Chrysosporium queenslandicum*, *Chrysosporium tropicum*, *Chrysosporium zonatum*, *Coprinus cinereus*, *Coriolus hirsutus*, *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium*

negundi, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochroum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, *Fusarium venenatum*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium purpurogenum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia radiata*, *Pleurotus eryngii*, *Thielavia terrestris*, *Trametes villosa*, *Trametes versicolor*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei* o *Trichoderma viride*.

Las células fúngicas pueden transformarse mediante un proceso que implica la formación de protoplastos, la transformación de los protoplastos y la regeneración de la pared celular de una manera conocida *per se*. Los procedimientos adecuados para la transformación de células huésped de *Bacillus* y *Trichoderma* se describen en el documento EP 238023, Yelton y col., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 81: 1470-1474 y en Christensen y col., 1988, Bio/Technology 6: 1419-1422. Los métodos adecuados para transformar especies de *Fusarium* se describen en Maledier y col., 1989, Gene 78: 147-156 y el documento WO 96/00787. La levadura puede transformarse usando los procedimientos descritos por Becker y Guarie en Ablson, J.N. y Simon, M.I., editores, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, Volumen 194, págs. 182-187, Academic Press, Inc., Nueva York; Ito y col., 1983, J. Bacteriol. 153: 163; y Hinnen y col., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 75: 1920.

Métodos de producción

El método para producir una variante de ADNasa para su uso en la presente invención puede comprender (a) cultivar una célula, en condiciones propicias para la producción de las variantes de ADNasa; y opcionalmente, (b) recuperar la variante de ADNasa. En algunos aspectos, la célula es una célula de *Bacillus*. En otro aspecto, la célula es una célula de *Bacillus cibi*.

Los métodos para producir una variante de ADNasa para su uso en la presente invención pueden comprender (a) cultivar una célula huésped recombinante de la presente invención en condiciones propicias para la producción de la variante de ADNasa; y opcionalmente, (b) recuperar la variante de ADNasa.

El método para producir una variante de ADNasa puede comprender;

a) introducir en una ADNasa precursora L33R y dos o más sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en: T1I, T1V, G4K, S7G, K8R, S9I, S13Y, T22P, S25P, S27L, L27R, D32I, D32L, D32R, D32V, S39P, S39C, G41P, S42G, S42H, S42C, Q48D, D56I, D56L, S57W, S59V, S59C, N61E, T65L, T65V, T65M, T65W, S66M, S66W, S66Y, S66V, V76L, T77Y, F78L, P91L, S101N, S106L, S106R, S106H, Q109R, A112E, S116D, T127V, S130A, S130Y, T138D, Q140V, Q140G, S144P, A147H, C148A, W154Y, T157V, Y159A, Y159R, K160V, G162S, G162D, G162C, Q166D, S167L, Q174N, G175D, G175N, L177Y, N178D, N178E, S179L, C180A, S181E y S181L (numeración según la Id. de sec. n.º: 1) para producir una variante de ADNasa,

b) y recuperar la variante de ADNasa producida.

Una variante preferida puede producirse al;

a) introducir en una ADNasa precursora L33R, L33V o L33Y y dos o más de las sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en: G4K, S7G, K8R, S9I, N16G, S27K, S27R, D32F, D32I, D32L, D32R, D32V, S39C, G41P, S42H, D45E, Q48D, N61E, T65M, T65W, S66R, S66M, S66W, S66Y, S66V, F78L, P91L, S101N, S106L, S106R, S106H, Q109E, A112E, T127P, S130A, S130Y, T138D, Q140V, Q140G, A147P, C148A, W154Y, T157V, Y159A, Y159R, G162C, Q174N, L177Y, S179L y C180A (numeración según la Id. de sec. n.º: 1) para producir una variante de ADNasa,

b) y recuperar la variante de ADNasa producida.

Un aspecto se refiere a un método para producir una variante de ADNasa, que comprende;

a) introducir en una ADNasa precursora tres tales como al menos L33R y al menos 2-19, *p. ej.*, al menos de 4 a 19, al menos de 9 a 19 o tal como al menos de 14 a 19 de las siguientes sustituciones: T1I, T1V, G4K, S7G, K8R, S13Y, T22P, S25P, S27L, S27R, D32I, D32L, D32R, D32V, S39P, S39C, G41P, S42G, S42H, S42C, Q48D, D56I, D56L, S57W, S59V, S59C, T65L, T65V, T65M, T65W, S66M, S66W, S66Y, S66V, V76L, T77Y, S101N, S106L, S106R, S106H, Q109R, S116D, T127V, S130A, S130Y, T138D, Q140V, Q140G, S144P, A147H, C148A, W154Y, T157V, Y159A, Y159R, K160V, G162S, G162D, G162C, Q166D, S167L, Q174N, G175D, G175N, L177Y, N178D, N178E, S179L, C180A, S181E o S181L (numeración según la Id. de sec. n.º: 1) para producir una variante de ADNasa,

b) y recuperar la variante de ADNasa producida.

Una variante preferida puede producirse al:

a) introducir en una ADNasa precursora L33R, L33V o L33Y, y dos tales como al menos 2-19, *p. ej.*, al menos de 4 a 19, al menos de 9 a 19 o tal como al menos de 14 a 19 de las siguientes sustituciones: G4K, S7G, K8R, S9I, N16G, S27K, S27R, D32F, D32I, D32L, D32R, D32V, S39C, G41P, S42H, D45E, Q48D, N61E, T65M, T65W, S66R, S66M, S66W, S66Y, S66V, F78L, P91L, S101N, S106L, S106R, S106H, Q109E, A112E, T127P, S130A, S130Y, T138D, Q140V, Q140G, A147P, C148A, W154Y, T157V, Y159A, Y159R, G162C, Q174N, L177Y, S179L y C180A (numeración según la Id. de sec. n.º: 1) para producir una variante de ADNasa,

b) y recuperar la variante de ADNasa producida.

La ADNasa precursora pertenece preferiblemente al clado GYS y en donde la ADNasa precursora comprende uno o ambos motivos [D/M/L][S/T]GYSR[D/N] (Id. de sec. n.º: 25) o ASXNRSG (Id. de sec. n.º: 26).

En un aspecto de la invención, la ADNasa precursora se selecciona del grupo de polipéptidos:

a) un polipéptido que tiene al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º: 1,

b) un polipéptido que tiene al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º: 2,

c) un polipéptido que tiene al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º: 3,

d) un polipéptido que tiene al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º: 4,

e) un polipéptido que tiene al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º: 5,

f) un polipéptido que tiene al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º: 6,

g) un polipéptido que tiene al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º: 7,

h) un polipéptido que tiene al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º: 8,

i) un polipéptido que tiene al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º: 9,

j) un polipéptido que tiene al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º: 10,

k) un polipéptido que tiene al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º: 11,

l) un polipéptido que tiene al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º: 12,

m) un polipéptido que tiene al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º: 13,

n) un polipéptido que tiene al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º: 14,

o) un polipéptido que tiene al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º: 15,

p) un polipéptido que tiene al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º: 16,

q) un polipéptido que tiene al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º: 17,

r) un polipéptido que tiene al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º: 18,

s) un polipéptido que tiene al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º: 19,

t) un polipéptido que tiene al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º: 20,

u) un polipéptido que tiene al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º: 21,

v) un polipéptido que tiene al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º: 22,

w) un polipéptido que tiene al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º: 23 y

x) un polipéptido que tiene al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º: 24.

La ADNasa precursora se puede obtener a partir del género *Bacillus*.

En algunos aspectos, la ADNasa precursora se obtiene a partir de cualquiera de los siguientes *Bacillus p. ej. Bacillus*, tales como *Bacillus cibi*, *Bacillus sp-62451*, *Bacillus horikoshii*, *Bacillus sp-16840*, *Bacillus sp-62668*, *Bacillus sp-13395*, *Bacillus horneckiae*, *Bacillus sp-11238*, *Bacillus idriensis*, *Bacillus sp-62520*, *Bacillus algicola*, *Bacillus vietnamensis*, *Bacillus hwajinpoensis*, *Bacillus indicus*, *Bacillus marisflavi*, *Bacillus luciferensis* o *Bacillus sp. SA2-6*.

Las células huésped se cultivan en un medio nutriente adecuado para la producción del polipéptido usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, las células pueden cultivarse mediante cultivo en matraz de agitación, o fermentación a pequeña escala o a gran escala (incluidas las fermentaciones continuas, discontinuas, semicontinuas o en estado sólido) en fermentadores de laboratorio o industriales en un medio adecuado y en condiciones que permiten expresar y/o aislar el polipéptido. El cultivo se lleva a cabo en un medio nutriente adecuado que comprende fuentes de carbono y nitrógeno y sales inorgánicas, usando procedimientos conocidos en la técnica. Los medios adecuados están disponibles de proveedores comerciales o pueden prepararse según composiciones publicadas (*p. ej.*, en los catálogos de la American Type Culture Collection). Si el polipéptido se secreta en el medio nutriente, el polipéptido se puede recuperar directamente del medio. Si el polipéptido no se secreta, puede recuperarse de los lisados celulares.

La variante de ADNasa puede detectarse usando métodos conocidos en la técnica que son específicos del polipéptido variante de ADNasa. Estos métodos de detección incluyen, aunque no de forma limitativa, el uso de

anticuerpos específicos, la formación de un producto enzimático o la desaparición de un sustrato enzimático. Por ejemplo, se puede usar un ensayo enzimático para determinar la actividad del polipéptido.

El polipéptido variante de ADNasa puede recuperarse usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el polipéptido variante de ADNasa puede recuperarse del medio nutriente mediante procedimientos convencionales que incluyen, aunque no de forma limitativa, recogida, centrifugación, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación o precipitación. En algunos aspectos, se recupera un caldo de fermentación que comprende la variante de ADNasa.

El polipéptido puede purificarse mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica que incluyen, aunque no de forma limitativa, cromatografía (*p. ej.*, intercambio iónico, afinidad, hidrófobo, cromatografía de exclusión por tamaño), procedimientos electroforéticos (*p. ej.*, enfoque isoelectrico preparativo), solubilidad diferencial (*p. ej.*, precipitación con sulfato de amonio), SDS-PAGE o extracción (véase, *p. ej.*, *Protein Purification*, Janson y Ryden, editores, VCH Publishers, Nueva York, 1989) para obtener polipéptidos sustancialmente puros.

En un aspecto alternativo, el polipéptido no se recupera sino que, en su lugar, un célula huésped de la presente invención que expresa el polipéptido se usa como fuente de la variante.

Composiciones detergentes

Las composiciones detergentes preferidas son para la limpieza y/o el tratamiento de tejidos y/o superficies duras.

El adyuvante preferiblemente comprende uno o más adyuvantes seleccionados del grupo que consiste en tensioactivos, aditivos reforzantes de la detergencia, auxiliares de floculación, agentes quelantes, inhibidores de transferencia de colorantes, enzimas, estabilizadores de enzimas (incluyendo, por ejemplo, ácido bórico, boratos, CMC y/o polioles tales como propilenglicol), inhibidores enzimáticos, materiales catalíticos, activadores del blanqueador, peróxido de hidrógeno, fuentes de peróxido de hidrógeno, perácidos preformados, polímeros en particular tales como agentes dispersantes poliméricos, agentes de eliminación/antirredeposición de suciedad de arcilla e inhibidores de la transferencia de colorantes, abrillantadores, supresores de jabonaduras, colorantes, perfumes, agentes elastizantes de estructuras, suavizantes de tejidos, portadores, hidrófobos, reforzantes y correforzantes, agentes de matizado de tejidos, agentes antiespumantes, dispersantes, auxiliares de procesamiento, pigmentos, agentes antiencogimiento, agentes antiarrugas, bactericidas, aglutinantes, inhibidores de la corrosión, disgregantes/agentes de disgregación, acondicionadores de tejidos que incluyen arcillas, cargas/auxiliares de procesamiento, agentes blanqueadores fluorescentes/abrillantadores ópticos, reforzadores de espuma, reguladores de espuma (jabonaduras), perfumes, agentes suspensores de suciedad, supresores de jabonaduras, inhibidores del deslustre y agentes absorbentes y mezclas de los mismos.

El ingrediente adyuvante detergente comprende preferiblemente un tensioactivo. En particular, para una composición de limpieza, el tensioactivo comprende preferiblemente tensioactivos aniónicos y/o no iónicos. Cuando ambos están presentes, la relación en peso de tensioactivo aniónico a no iónico es preferiblemente de 25:1 a 1:2 o de 20:1 a 2:3. En algunos aspectos, el ingrediente adyuvante detergente comprende un aditivo reforzante de la detergencia o un agente de eliminación/antirredeposición de la suciedad.

Un ingrediente adyuvante preferido comprende preferiblemente una enzima adicional. La composición detergente puede comprender una o más enzimas adicionales, preferiblemente seleccionadas del grupo que consiste en proteasas, amilasas, lipasas, cutinasas, celulasas, endoglucanasas, xiloglucanasas, pectinasas, pectina lisasas, xantanasas, peroxidasas, haloperoxigenasas, catalasas, mananasas y mezclas de las mismas. A continuación se describen enzimas preferidas específicas adecuadas para las composiciones detergentes de la invención.

La composición detergente puede formularse como una barra, una pastilla homogénea y una pastilla que tiene dos o más capas, una bolsa que tiene uno o más compartimentos, preferiblemente tres o más compartimentos, un polvo regular o compacto, un gránulo, una pasta, un gel o un líquido regular, compacto o concentrado. La composición detergente puede ser un detergente líquido, un detergente en polvo o un detergente granulado.

Algunos aspectos de la presente invención se refieren a composiciones para lavado de ropa o de limpieza que comprenden una ADNasa, preferiblemente en cantidad de aproximadamente 0,00001 % en peso a aproximadamente 20 % en peso, de aproximadamente 0,0001 % en peso a aproximadamente 10 % en peso, de aproximadamente 0,0002 % en peso a aproximadamente 10 % en peso, de aproximadamente 0,0005 % en peso a aproximadamente 10 % en peso, de aproximadamente 0,001 % en peso a aproximadamente 5 % en peso, de aproximadamente 0,002 % en peso a aproximadamente 1 % en peso, de aproximadamente 0,005 % en peso a aproximadamente 1 % en peso, preferiblemente de aproximadamente 0,01 % en peso a aproximadamente 0,5 % en peso, preferiblemente de 0,0002 % en peso a aproximadamente 1 % en peso (% en peso) de la composición. Las cantidades son % en peso por unidad de enzima activa, *p. ej.*, de aproximadamente 0,00001 % en peso a aproximadamente 10 % en peso, de 0,00001 % en peso a aproximadamente 20 % en peso de ADNasa en peso de la composición.

La concentración más preferida de la enzima activa que tiene actividad ADNasa es preferiblemente al menos 0,00001 %, preferiblemente al menos 0,00002 %, preferiblemente al menos 0,0001 % en peso, preferiblemente al menos 0,0002 % en peso, preferiblemente al menos 0,001 % en peso, preferiblemente al menos 0,002 % en peso, preferiblemente al menos 0,005 % en peso, preferiblemente al menos 0,01 % en peso, preferiblemente al menos 0,02 % en peso, preferiblemente al menos 0,05 % en peso preferiblemente al menos 0,1 % en peso, preferiblemente al menos 1 % en peso, preferiblemente al menos 2 % en peso, preferiblemente al menos 5 % en peso, preferiblemente al menos 15 % en peso o preferiblemente al menos 10 % en peso de la concentración de detergente total.

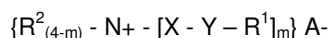
La cantidad de enzima también puede estar en ppm (mg/l) de proteína enzimática activa. Por lo tanto, la cantidad de ADNasa en la composición detergente puede ser de al menos 0,00001 ppm, 0,00002 ppm, 0,00005 ppm, 0,0001 ppm, 0,0002 ppm, 0,0005 ppm, 0,001 ppm, 0,002 ppm, 0,005 ppm, 0,01 ppm, 0,02 ppm, 0,05 ppm, 0,1 ppm, 0,2 ppm, 0,5 ppm, 1 ppm, 2 ppm, 5 ppm, 10 ppm o al menos 20 ppm, al menos 50 ppm, 80 ppm o al menos 100 ppm de enzimas ADNasa. En un aspecto, la cantidad de ADNasa en la composición está en el intervalo de aproximadamente 0,00001 ppm a aproximadamente 100 ppm, o en el intervalo de aproximadamente 0,0001 ppm a aproximadamente 100 ppm, en el intervalo de aproximadamente 0,001 ppm a aproximadamente 1000 ppm de enzimas ADNasa, o en el intervalo de aproximadamente 0,001 ppm a aproximadamente 100 ppm de enzima ADNasa.

En algunos aspectos, la composición detergente es un detergente para lavado de ropa líquido o en polvo, adecuado para, p. ej., lavar a alta temperatura y/o pH, tal como a, o por encima de, 40 °C y/o a, o por encima de, pH 8. En algunos aspectos, la composición detergente es un detergente para lavado de ropa líquido o en polvo, adecuado para, p. ej., lavar a baja temperatura y/o pH, tal como a, o por debajo de, 20 °C y/o pH 6. El detergente también puede formularse como un detergente en dosis unitaria y/o detergente compacto opcionalmente con poca cantidad o nada de agua. El detergente también puede ser un detergente para lavado de vajillas. Los detergentes para lavado de ropa y lavado de vajillas pueden estar exentos de fosfato.

La invención también se refiere a una composición detergente que es una composición tratante de tejidos tal como una composición suavizante de tejidos. Preferiblemente, una composición suavizante de tejidos comprende un compuesto suavizante de telas que comprende una sustancia activa suavizante de éster de amonio cuaternario (sustancia activa suavizante de tejidos, "FSA"), preferiblemente en una cantidad de 2 a 50 en peso de la composición. En composiciones suavizantes de tejidos preferidas, la sustancia activa suavizante de éster de amonio cuaternario está presente en una cantidad de 3,0 % a 30 %, más preferiblemente de 3,0 % a 18 o 20 %, aún más preferiblemente de 7,0 % a 15 % en peso de la composición. La cantidad de sustancia activa suavizante de tejidos de éster de amonio concentrado puede depender de la concentración deseada total de sustancia activa suavizante en la composición (composición diluida o concentrada) y de la presencia o no de otra sustancia activa suavizante. Los niveles más altos dan lugar a un riesgo de residuos del dispensador cuando se administran desde máquinas de lavado o una viscosidad inestable a lo largo del tiempo.

Los compuestos suavizantes de amonio cuaternario (quats) adecuados incluyen, aunque no de forma limitativa, materiales seleccionados del grupo que consiste en quats de monoéster, quats de diéster, quats de triéster y mezclas de los mismos. Preferiblemente, el nivel de quat de monoéster es de 2,0 % a 40,0 %, el nivel de quat de diéster es de 40,0 % a 98,0 %, el nivel de quat de triéster es del 0,0 % al 25,0 % en peso de activo suavizante de éster de amonio cuaternario total.

El activo suavizante del éster de amonio cuaternario puede comprender compuestos de la fórmula general:



en donde:

m es 1, 2 o 3 con la condición de que el valor de cada m es idéntico;

cada R^1 es independientemente hidrocarbilo o grupo hidrocarbilo ramificado, preferiblemente R^1 es lineal, más preferiblemente R^1 es una cadena de alquilo lineal parcialmente insaturada;

cada R^2 es independientemente un grupo alquilo o hidroxialquilo C_1 - C_3 , preferiblemente R^2 se selecciona de metilo, etilo, propilo, hidroxietilo, 2-hidroxipropilo, 1-metil-2-hidroxietilo, poli(alcoxi C_{2-3}), polietoxi, bencilo;

cada X es independientemente $(CH_2)_n$, $CH_2-CH(CH_3)-$ o $CH-(CH_3)-CH_2-$ y

cada n es independientemente 1, 2, 3 o 4, preferiblemente, cada n es 2;

cada Y es independientemente $-O-(O)C-$ o $-C(O)-O-$;

A- se selecciona independientemente del grupo que consiste de cloruro, sulfato de metilo y sulfato de etilo, preferiblemente A- se selecciona del grupo que consiste de cloruro y sulfato de metilo;

con la condición de que cuando Y es -O(O)C-, la suma de carbonos en cada R₁ es de 13 a 21, preferiblemente de 13 a 19.

En composiciones suavizantes de tejidos líquidas preferidas, el índice de yodo del ácido graso precursor a partir del cual se forma la sustancia activa suavizante de tejidos de amonio cuaternario es de 0 a 100, más preferiblemente de 10 a 60, incluso más preferiblemente de 15 a 45.

Los ejemplos de sustancias activas suavizantes de tipo éster de amonio cuaternario adecuadas están comercializados por KAO Chemicals con el nombre comercial Tetranyl AT-1 y Tetranyl AT-7590, por Evonik con el nombre comercial Rewoquat WE16 DPG, Rewoquat WE18, Rewoquat WE20, Rewoquat WE28, y Rewoquat 38 DPG, por Stepan con el nombre comercial Stepanex GA90, Stepanex VR90, Stepanex VK90, Stepanex VA90, Stepanex DC90, Stepanex VL90A.

Tensioactivos

Los tensioactivos adecuados pueden seleccionarse de tensioactivos no iónicos, aniónicos y/o anfóteros como se ha descrito anteriormente, preferiblemente tensioactivos aniónicos o no iónicos, pero también pueden usarse tensioactivos anfóteros. Los tensioactivos aniónicos preferidos son tensioactivos de sulfonato y sulfato, por ejemplo, alquilbencenosulfonatos y alquilsulfatos (opcionalmente alcoxilados). El tensioactivo aniónico particularmente preferido comprende alquilbencenosulfonatos lineales (LAS). Los alquilsulfatos preferidos comprenden alquil éter sulfato, especialmente estersulfatos de alcohol C-9-15, estersulfatos C8-C16 y estersulfatos C10-C14, tales como estersulfatos de monododecilo. Pueden usarse isómeros de LAS, alquilbencenosulfonatos ramificados (BABS), fenilalcanosulfonatos, alfa-olefinsulfonatos (AOS), olefinsulfonatos, alquenosulfonatos, alcano-2,3-diilbis(sulfatos), hidroxialcanosulfonatos y disulfonatos, alquilsulfatos (AS) tales como dodecilsulfato sódico (SDS), sulfatos de alcoholes grasos (FAS), sulfatos de alcoholes primarios (PAS), sulfatos de éteres de alcoholes (AES o AEOS o FES, también conocidos como etoxisulfatos de alcoholes o sulfatos de éteres de alcoholes grasos), alcanosulfonatos secundarios (SAS), sulfonatos de parafina (PS), sulfonatos de ésteres, ésteres de glicerol y ácidos grasos sulfonados, ésteres metílicos de ácidos grasos alfa-sulfonados (alfa-SFMe o SES) incluido el sulfonato de éster metílico (MES), ácido alquil- o alquenilsuccínico, ácido dodecenil/tetradecenilsuccínico (DTSA), derivados de tipo ácido graso de aminoácidos, diésteres y monoésteres del ácido sulfosuccínico o sales de ácidos grasos (jabón) y combinaciones de estos.

Los tensioactivos aniónicos se añaden preferiblemente al detergente en forma de sales. Los cationes preferidos son iones de metales alcalinos, tales como sodio y potasio. Los ejemplos no limitantes de tensioactivos no iónicos incluyen etoxilatos de alcohol (AE o AEO), propoxilatos de alcohol, alcoholes grasos propoxilados (PFA), ésteres alquílicos de ácidos grasos alcoxilados, tales como ésteres alquílicos de ácidos grasos etoxilados y/o propoxilados, etoxilatos de alquilfenol (APE), etoxilatos de nonilfenol (NPE), alquilpoliglicósidos (APG), aminas alcoxiladas, monoetanolamidas de ácidos grasos (FAM), dietanolamidas de ácidos grasos (FADA), monoetanolamidas de ácidos grasos etoxilados (EFAM), monoetanolamidas de ácidos grasos propoxilados (PFAM), amidas de ácidos grasos polihidroxialquílicos, o derivados de tipo N-acilo N-alquilo de glucosamina (glucamidas, GA, o glucamidas de ácidos grasos, FAGA), así como también productos disponibles con los nombres comerciales SPAN y TWEEN y combinaciones de estos. Los tensioactivos no iónicos comercialmente disponibles incluyen Plurafac™, Lutensol™ y Pluronic™ de BASF, la serie Dehypon™ de Cognis y la serie Genapol™ de Clariant.

Aditivos reforzantes de la detergencia

Los aditivos reforzantes de la detergencia adecuados pueden seleccionarse de los fosfatos de metales alcalinos o amonio, polifosfatos, fosfonatos, polifosfatos, carbonatos, bicarbonatos, boratos, citratos y policarboxilatos y mezclas de los mismos. Los aditivos reforzantes de la detergencia preferidos comprenden ácidos policarboxílicos (tales como ácido cítrico) y sales de los mismos (p. ej., citrato de sodio), carbonato de sodio, silicato de sodio, aluminosilicato de sodio (zeolita). Los citratos se pueden usar junto con zeolita, silicatos tales como los tipos de BRITESIL y/o aditivos reforzantes de la detergencia de tipo silicato laminar. Se añade preferiblemente un aditivo reforzante de la detergencia en una cantidad de aproximadamente 5-65 % en peso, tal como de aproximadamente 5 % a aproximadamente 50 % en peso. En un detergente para lavado de ropa, el nivel de aditivo reforzante de la detergencia típicamente es aproximadamente 40-65 % en peso, en particular aproximadamente 50-65 % en peso, particularmente de 20 % a 50 % en peso. Los aditivos reforzantes de la detergencia pueden usarse junto con o sustituirse por quelantes tales como aminocarboxilatos, aminopolicarboxilatos y fosfonatos y ácido alquilsuccínico o alquenilsuccínico. Los ejemplos específicos adicionales incluyen ácido 2,2',2"-nitriolotriacético (NTA), ácido etilendiaminatetraacético (EDTA), ácido dietilentriaminapentaacético (DTPA), ácido iminodisuccínico (IDS), ácido etilendiamina-N,N'-disuccínico (EDDS), ácido metilglicina-N,N-diacético (MGDA), ácido glutámico- ácido N,N-diacético (GLDA), ácido 1-hidroxietano-1,1-difosfónico, ácido N-(2-hidroxietil)iminodiacético (EDG), ácido aspártico-ácido N-monoacético (ASMA), ácido aspártico-ácido N,N-diacético (ASDA), ácido aspártico-ácido N-monopropiónico (ASMP), ácido iminodisuccínico (IDA), ácido N-(sulfometil)aspártico (SMAS), ácido N-(2-sulfoetil)-aspártico (SEAS), ácido N-sulfometilglutámico (SMGL), ácido N-(2-sulfoetil)-glutámico (SEGL), ácido N-metiliminodiacético (MIDA), ácido serina-N,N-diacético (SEDA), ácido isoserina-N,N-diacético (ISDA), ácido fenilalanina-N,N-diacético (PHDA), ácido antranílico-N,N-diacético (ANDA), ácido sulfanílico-N,N-diacético (SLDA), ácido taurina-N,N-diacético (TUDA) y ácido N'-(2-

hidroxietil)etilendiamina-N,N,N'-triacético (HEDTA), dietanoglicina (DEG) y combinaciones y sales de los mismos. Los fosfonatos adecuados para utilizarse en la presente memoria incluyen ácido 1-hidroxietano-1,1-difosfónico (HEDP), ácido etilendiaminatetraquis(metilenfosfónico) (EDTMPA), ácido dietilentriaminapentaquis(metilenfosfónico) (DTMPA o DTPMPA o DTPMP), ácido nitrilotris(metilenfosfónico) (ATMP o NTMP), ácido 2-fosfonobutano-1,2,4-tricarboxílico (PBTC), ácido hexametilendiaminatetraquis(metilenfosfónico) (HDTMP). La composición también puede contener 0,1-50 % en peso, tal como entre aproximadamente 5 % y aproximadamente 30 % de un coaditivo reforzante de la detergencia. La composición detergente puede incluir un coaditivo reforzante de la detergencia solo o junto con un aditivo reforzante de la detergencia, por ejemplo, un generador de zeolita. Los coaditivos reforzantes de la detergencia preferidos incluyen homopolímeros de poliacrilatos o copolímeros de los mismos, tales como poli(ácido acrílico) (PAA) o poli(ácido acrílico/ácido maleico) (PAA/PMA) o ácido poliaspártico. Otros aditivos reforzantes de la detergencia y/o coaditivos reforzantes de la detergencia ilustrativos adicionales se describen en, p. ej., los documentos WO 09/102854, US 5977053. En algunos aspectos, el aditivo reforzante de la detergencia es un aditivo que no contiene fósforo, tal como ácido cítrico y/o ácido metilglicina-N,N-diacético (MGDA) y/o ácido glutámico-N,N-diacético (GLDA) y/o sales de los mismos. Los aditivos reforzantes de la detergencia preferidos incluyen citrato y/o ácido metilglicina-N,N-diacético (MGDA) y/o ácido glutámico-N,N-diacético (GLDA) y/o sales de los mismos.

Componentes blanqueadores

La composición detergente puede contener 0-30 % en peso, tal como de aproximadamente 1 % a aproximadamente 20 %, de un sistema blanqueador. Se puede utilizar cualquier sistema blanqueador que comprende componentes conocidos en la técnica para usar en detergentes de limpieza. Los componentes del sistemas blanqueadores adecuados incluyen fuentes de peróxido de hidrógeno; fuentes de perácidos; y catalizadores o reforzadores del blanqueador.

Fuentes de peróxido de hidrógeno: Las fuentes de peróxido de hidrógeno adecuadas son persales inorgánicas, incluidas sales de metales alcalinos tales como percarbonato de sodio y perboratos de sodio (generalmente monohidrato o tetrahidrato) y peróxido de hidrógeno-urea (1/1).

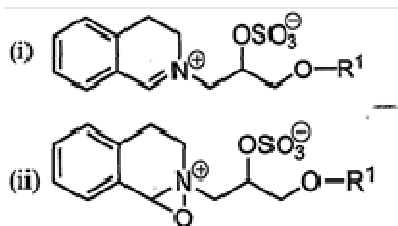
Fuentes de perácidos: Los perácidos se pueden (a) incorporar directamente como perácidos preformados o (b) formarse *in situ* en la solución de lavado a partir de peróxido de hidrógeno y un activador del blanqueador (perhidrólisis) o (c) formarse *in situ* en la solución de lavado a partir de peróxido de hidrógeno y una perhidrolasa y un sustrato adecuado para este último, p. ej., un éster.

a) los perácidos preformados adecuados incluyen, aunque no de forma limitativa, ácidos peroxicarboxílicos tales como ácido peroxibenzoico y sus derivados sustituidos con anillo, ácido peroxi- α -naftoico, ácido peroxiftálico, ácido peroxiláurico, ácido peroxiestearico, ácido ϵ -ftalimidoperoxicaaproico [ácido ftalimidperoxihexanoico (PAP)] y ácido o-carboxibenzamidoperoxicaaproico; ácidos diperoxidicarboxílicos alifáticos y aromáticos tales como ácido diperoxidodecanodioico, ácido diperoxiazelaico, ácido diperoxisebáico, ácido diperoxibrasílico, ácido 2-decildiperoxibutanodioico y ácidos diperoxiftálico, diperoxisoftálico y diperoxitereftálico; ácidos perimidicos; ácido peroximonosulfúrico; ácido peroxidisulfúrico; ácido peroxifosfórico; ácido peroxisilícico; y mezclas de dichos compuestos. Se entiende que los perácidos mencionados pueden, en algunos casos, añadirse mejor como sales adecuadas, tales como sales de metales alcalinos (p. ej., Oxone®) o sales de metales alcalinotérreos.

b) Los catalizadores del blanqueador adecuados incluyen los que pertenecen a la clase de ésteres, amidas, imidas, nitrilos o anhídridos y, cuando corresponda, sales de los mismos. Ejemplos adecuados son tetraacetilendiamina (TAED), 4-[(3,5,5-trimetilhexanoil)oxi]benceno-1-sulfonato de sodio (ISONOBS), 4-(dodecanoiloxi)benceno-1-sulfonato de sodio (LOBS), 4-(decanoiloxi)benceno-1-sulfonato de sodio, ácido 4-(decanoiloxi)benzoico (DOBA), 4-(nonanoiloxi)benceno-1-sulfonato de sodio (NOBS) y/o los descritos en el documento WO98/17767. Una familia especial de activadores del blanqueador de interés se describe en el documento EP624154 y de esta familia el activador especialmente preferido es el acetil trietilcitrato (ATC). El ATC o un triglicérido de cadena corta como triacetina tienen la ventaja de que son ecológicos. Además, el acetil trietilcitrato y la triacetina presentan una buena estabilidad hidrolítica en el producto durante el almacenamiento y son eficaces activadores del blanqueador. Finalmente, el ATC es multifuncional, ya que el citrato liberado en la reacción de perhidrólisis puede funcionar como aditivo reforzante de la detergencia.

Catalizadores de blanqueo y reforzadores: El sistema blanqueador también puede incluir un catalizador del blanqueador o un reforzador. Algunos ejemplos no limitantes de catalizadores del blanqueador que pueden usarse en las composiciones de la presente invención incluyen oxalato de manganeso, acetato de manganeso, manganeso-colágeno, catalizadores de cobalto-amina y catalizadores de manganeso triazacilononano (MnTACN); particularmente preferidos son los complejos de manganeso con 1,4,7-trimetil-1,4,7-triazacilononano (Me3-TACN) o 1,2,4,7-tetrametil-1,4,7-triazacilononano (Me4-TACN), en particular Me3-TACN, tal como el complejo dinuclear de manganeso [(Me3-TACN) Mn(O)3Mn(Me3-TACN)](PF6)2, y [2,2',2"-nitrilotris(etano-1,2-diilazaniiliden-kN-metaniiliden) trifenato-k3O]manganeso (III). Los catalizadores del blanqueador también pueden ser otros compuestos metálicos, tales como complejos de hierro o cobalto.

En algunos aspectos, cuando se incluye una fuente de un perácido, se puede usar un catalizador del blanqueador orgánico o un reforzador del blanqueador que tiene una de las siguientes fórmulas:



(iii) y mezclas de las mismas; en donde cada R₁ es independientemente un grupo alquilo ramificado que contiene de 9 a 24 carbonos o un grupo alquilo lineal que contiene de 11 a 24 carbonos, preferiblemente cada R₁ es independientemente un grupo alquilo ramificado que contiene de 9 a 18 carbonos o un grupo alquilo lineal que contiene de 11 a 18 carbonos, más preferiblemente cada R₁ se selecciona independientemente del grupo que consiste en 2-propilheptilo, 2-butililo, 2-pentilnonilo, 2-hexildecilo, dodecilo, tetradecilo, hexadecilo, octadecilo, isononilo, isodecilo, isotridecilo e isopentadecilo.

Otros sistemas blanqueadores ilustrativos se describen, p. ej., en los documentos WO 2007/087258, WO 2007/087244, WO 2007/087259, EP 1867708 (Vitamina K) y WO 2007/087242. Los fotoblanqueadores adecuados pueden ser, por ejemplo, sulfonato de cinc o ftalocianinas de aluminio.

Hidrótropos

La composición detergente puede contener 0,1-10 % en peso, p. ej. 0,1-5 % en peso, tal como aproximadamente de 0,5 a aproximadamente 5 %, o aproximadamente de 3 % a aproximadamente 5 %, de un hidrótropo. Se puede utilizar cualquier hidrótropo conocido en la técnica para usar en detergentes. Los ejemplos no limitantes de hidrótropos incluyen bencenosulfonato de sodio, p-toluenosulfonato de sodio (STS), xilenosulfonato de sodio (SXS), cumenosulfonato de sodio (SCS), cimenosulfonato de sodio, óxidos de amina, alcoholes y poliglicoléteres, hidroxinafoato de sodio, hidroxinaftalenosulfonato de sodio, etilhexilo sulfato de sodio y combinaciones de los mismos.

Polímeros

La composición detergente comprende preferiblemente de 0,1 a 10 % en peso, tal como 0,5-5 %, 2-5 %, 0,5-2 % o 0,2-1 % de un polímero. El polímero puede funcionar como coaditivo reforzante de la detergencia como se ha mencionado anteriormente o puede proporcionar antirredeposición, protección de fibra, liberación de suciedad, inhibición de transferencia de colorante, limpieza de grasa y/o propiedades antiespumantes. Algunos polímeros pueden tener más de una de las propiedades mencionadas anteriormente y/o más de uno de los motivos mencionados a continuación. Los polímeros preferidos incluyen (carboximetil)celulosa (CMC), poli(alcohol vinílico) (PVA), poli(vinilpirrolidona) (PVP), poli(etilenglicol) o poli(óxido de etileno) (PEG), poli(etilenimina) etoxilada, carboximetilululina (CMI) y policarboxilatos tales como PAA, pAA/PMA, poli-ácido aspártico, y copolímeros de metacrilato de laurilo/ácido acrílico, CMC modificada hidrofóbicamente (HM-CMC) y siliconas, copolímeros de ácido tereftálico y glicoles oligoméricos, copolímeros de poli(etilentereftalato) y poli(oxietentereftalato) (PET-POET), pVP, poli(vinilimidazol) (PVI), poli(vinilpiridina-N-óxido) (PVPO o PVPNO) y polivinilpirrolidona-vinilimidazol (PVPVI). Los polímeros ilustrativos adicionales incluyen policarboxilatos sulfonados, óxido de polietileno y óxido de polipropileno (PEO-PPO) y etoxisulfato de dicuaternio. Otros polímeros ilustrativos se describen en, p. ej., el documento WO 2006/130575. También se contemplan sales de los polímeros mencionados anteriormente.

Agente de matizado de tejidos

La composición detergente de la presente invención también puede incluir agentes de matizado de tejidos tales como tintes o pigmentos que, cuando están formulados en composiciones detergentes, pueden depositarse sobre un tejido cuando dicho tejido se pone en contacto con una solución de lavado acuosa que comprende dichas composiciones detergentes y alterando por tanto el tinte de dicho tejido mediante absorción/reflexión de luz visible. Los agentes blanqueantes fluorescentes emiten, al menos, algo de luz visible. En cambio, los agentes de matizado de tejidos alteran el tinte de una superficie puesto que absorben, al menos, una parte del espectro de la luz visible. Los agentes de matizado de tejidos incluyen tintes y conjugados de tinte-arcilla, y pueden también incluir pigmentos. Los tintes adecuados incluyen pequeñas moléculas de tinte y moléculas poliméricas. Los tintes de pequeñas moléculas adecuados incluyen tintes de pequeñas moléculas seleccionados del grupo compuesto por tintes que se encuentran en las clasificaciones de índice de color (C.I.) de Direct Blue, Direct Red, Direct Violet, Acid Blue, Acid Red, Acid Violet, Basic Blue, Basic Violet y Basic Red o mezclas de los mismos, por ejemplo como se describe en los documentos WO 2005/03274, WO 2005/03275, WO 2005/03276 y EP 1876226 (incorporado como referencia en la presente memoria). Los colorantes adecuados incluyen colorantes azo, particularmente tintes monoazo o bisazo, tintes de antraquinona, colorantes de triarilmetano y tintes de azina. Los colorantes poliméricos preferidos

comprenden un componente polimérico seleccionado de polialcoxilatos, celulosas tales como CMC y alcoholes de polivinilo. Los colorantes poliméricos preferidos son tintes alcoxilados (preferiblemente etoxilados), particularmente tintes de azotiofeno. Los colorantes poliméricos preferidos tienen un promedio de 2 a 50 monómeros por molécula de colorante, más preferiblemente de 3 a 25. La composición detergente preferiblemente comprende de aproximadamente 0,00003 % en peso a aproximadamente 0,2 % en peso, de aproximadamente 0,00008 % en peso a aproximadamente 0,05 % en peso o incluso de aproximadamente 0,0001 % en peso a aproximadamente 0,04 % en peso de agente de matizado de tejidos. La composición puede comprender de 0,0001 % en peso a 0,2 % en peso de agente de matizado de tejidos, esto puede ser especialmente preferido cuando la composición está en forma de una bolsita de dosis unitaria. Los agentes de matizado adecuados también se describen en, p. ej., el documento WO 2007/087257 y WO 2007/087243.

Enzimas

La composición detergente puede comprender una o más enzimas adicionales tales como una proteasa, lipasa, cutinasa, amilasa, carbohidrasa, celulasa, pectinasa, mananasa, arabinasa, galactanasa, xilanas, oxidasa, p. ej., una lacasa y/o peroxidasa.

En general, las propiedades de la enzima o enzimas seleccionadas deberán ser compatibles con el detergente seleccionado (*es decir*, pH óptimo, compatibilidad con otros ingredientes enzimáticos y no enzimático, etc.) y la enzima o enzimas deberán estar presentes en una cantidad eficaz.

Celulasas

Las celulasas adecuadas incluyen las de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen los mutantes modificados químicamente u obtenidos mediante ingeniería de proteínas. Las celulasas adecuadas incluyen celulasas de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Humicola*, *Fusarium*, *Thielavia*, *Acremonium*, p. ej., las celulasas fúngicas producidas a partir de *Humicola insolens*, *Myceliophthora thermophila* y *Fusarium oxysporum* descritas en los documentos US 4.435.307, US 5.648.263, US 5.691.178, US 5.776.757 y WO 89/09259.

Las celulasas especialmente adecuadas son las celulasas alcalinas o neutras que tienen ventajas de cuidado del color. Los ejemplos de estas celulasas son las celulasas descritas en EP-0 495 257, EP-0 531 372, WO 96/11262, WO 96/29397, WO 98/08940. Otros ejemplos son variantes de celulasas tales como las descritas en los documentos WO 94/07998, EP 0 531 315, US 5.457.046, US 5.686.593, US 5.763.254, WO 95/24471, WO 98/12307 y WO 99/001544.

Otras celulasas son la enzima endo-beta-1,4-glucanasa que tiene una secuencia de al menos un 97 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la posición 1 a la posición 773 de la Id. de sec. n.º: 2 del documento WO 2002/099091 o una familia 44 xiloglucanasa, que tiene una enzima xiloglucanasa que tiene una secuencia de al menos un 60 % de identidad con las posiciones 40-559 de la Id. de sec. n.º: 2 del documento WO 2001/062903.

Las celulasas comerciales incluyen Celluzyme™ y Carezyme™ (Novozymes A/S) Carezyme Premium™ (Novozymes A/S), Celluclean™ (Novozymes A/S), Celluclean Classic™ (Novozymes A/S), Cellusoft™ (Novozymes A/S), Whitezyme™ (Novozymes A/S), Clazinase™ y HA Puradax™ (Genencor International Inc.) y KAC-500(B)™ (Kao Corporation).

Proteasas

Las proteasas adecuadas incluyen aquellas de origen bacteriano, fúngico, vegetal, vírico o animal p. ej., de origen vegetal o microbiano. Se prefiere las de origen microbiano. Se incluyen los mutantes modificados químicamente u obtenidos mediante ingeniería de proteínas. Puede ser una proteasa alcalina, tal como una serinaproteasa o una metaloproteasa. Una serinaproteasa puede ser por ejemplo de la familia S1, tal como tripsina, o de la familia S8 tal como subtilisina. Una proteasa de las metaloproteasas puede ser, por ejemplo, una termolisina de p. ej., la familia M4 u otra metaloproteasa tal como las de las familias M5, M7 o M8.

El término "subtilasas" se refiere a un subgrupo de serinaproteasas según Siezen y col., Protein Engng. 4 (1991) 719-737 y Siezen y col. Protein Science 6 (1997) 501-523. Las serinaproteasas son un subgrupo de proteasas caracterizado por tener una serina en el sitio activo, que forma un aducto covalente con el sustrato. Las subtilasas pueden dividirse en 6 subdivisiones, es decir, la familia Subtilisina, la familia Termitasa, La familia de la Proteinasa K, la familia de peptidasas Lantibióticas, la familia Kexina y la familia Pirolisina.

Son ejemplos de subtilasas las derivadas de *Bacillus* tales como *Bacillus lentus*, *B. alcalophilus*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus* y *Bacillus gibsonii* descritas en los documentos US7262042 y WO99/021867 y *subtilisin lentus*, *subtilisin Novo*, *subtilisin Carlsberg*, *Bacillus licheniformis*, *subtilisin BPN*, *subtilisin 309*, *subtilisin 147* and *subtilisin 168* descritas en los documentos WO89/06279 y proteasa PD138 descrita en (documento WO93/18140). Otras proteasas útiles pueden ser las descritas en los documentos WO92/175177, WO01/016285, WO02/026024 y WO02/016547. Los ejemplos de proteasas del tipo tripsina son tripsina (p. ej., de origen porcino o bovino) y la proteasa de *Fusarium* descrita en los documentos WO89/06270, WO94/25583 y WO05/040372 y las

proteasas de quimiotripsina derivadas de *Cellulomonas* descritas en los documentos WO05/052161 y WO05/052146.

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

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

Los ejemplos de proteasas útiles son las variantes descritas en: los documentos WO92/19729, WO96/034946, WO98/20115, WO98/20116, WO99/011768, WO01/44452, WO03/006602, WO04/03186, WO04/041979, WO07/006305, WO11/036263, WO11/036264, especialmente las variantes con sustituciones en una o más de las siguientes posiciones: 3, 4, 9, 15, 24, 27, 42, 55, 59, 60, 66, 74, 85, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 104, 116, 118, 121, 126, 127, 128, 154, 156, 157, 158, 161, 164, 176, 179, 182, 185, 188, 189, 193, 198, 199, 200, 203, 206, 211, 212, 216, 218, 226, 229, 230, 239, 246, 255, 256, 268 y 269 en donde las posiciones correspondientes a las posiciones de la proteasa de *Bacillus Lentus* se muestran en la Id. de sec. n.º: 1 del documento WO 2016/001449. Las variantes de proteasa más preferidas pueden comprender una o más de las siguientes mutaciones: S3T, V4I, S9R, S9E, A15T, S24G, S24R, K27R, N42R, S55P, G59E, G59D, N60D, N60E, V66A, N74D, N85S, N85R, G96S, G96A, S97G, S97D, S97A, S97SD, S99E, S99D, S99G, S99M, S99N, S99R, S99H, S101A, V102I, V102Y, V102N, S104A, G116V, G116R, H118D, H118N, N120S, S126L, P127Q, S128A, S154D, A156E, G157D, G157P, S158E, Y161A, R164S, Q176E, N179E, S182E, Q185N, A188P, G189E, V193M, N198D, V199I, Y203W, S206G, L211Q, L211D, N212D, N212S, M216S, A226V, K229L, Q230H, Q239R, N246K, N255W, N255D, N255E, L256E, L256D T268A o R269H. Las variantes de proteasa son preferiblemente variantes de la proteasa de *Bacillus lentus* (Savinase®) mostrada en la Id. de sec. n.º: 1 del documento WO 2016/001449 o la proteasa de *Bacillus amiloliquefaciens* (BPN®) mostrada en la Id. de sec. n.º: 2 del documento WO2016/001449. Las variantes de proteasa tienen preferiblemente al menos un 80 % de identidad de secuencia con el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º: 1 o la Id. de sec. n.º: 2 del documento WO 2016/001449.

Una variante de proteasa que comprende una sustitución en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 171, 173, 175, 179 o 180 de la Id. de sec. n.º: 1 del documento WO2004/067737, en donde dicha variante de proteasa tiene una identidad de secuencia de al menos 75 % pero menos del 100 % al Id. de sec. n.º: 1 del documento WO2004/067737.

Las enzimas proteasas comercialmente disponibles incluyen las comercializadas con los nombres comerciales Alcalase®, Duralase™, Durazym™, Relase®, Relase® Ultra, Savinase®, Savinase® Ultra, Primase®, Polarzyme®, Kannase®, Liqunase®, Liqunase® Ultra, Ovozime®, Coronase®, Coronase® Ultra, Blaze®, Blaze Evity® 100T, Blaze Evity® 125T, Blaze Evity® 150T, Neutrase®, Everlase® and Esperase® (Novozymes A/S), aquellas comercializados con los nombres comerciales Maxatase®, Maxacal®, Maxapem®, Purafect Ox®, Purafect OxP®, Puramax®, FN2®, FN3®, FN4®, Excellase®, Excellenz P1000™, Excellenz P1250™, Eraser®, Preferenz P100™, Purafect Prime®, Preferenz P110™, Effectenz P1000™, Purafect®™, Effectenz P1050™, Purafect Ox®™, Effectenz P2000™, Purafast®, Properase®, Opticlean® and Optimase® (Danisco/DuPont), Axapem™ (Gist-Brocades N.V.), BLAP (secuencia mostrada en la Figura 29 del documento US5352604) y variantes de las mismas (Henkel AG) y KAP (subtilisina de *Bacillus alcalophilus*) de Kao.

Lipasas y Cutinasas

Las lipasas y cutinasas adecuadas incluyen las de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen las enzimas mutantes modificadas químicamente u obtenidas mediante ingeniería de proteínas. Los ejemplos incluyen la lipasa de *Thermomyces*, p. ej. de *T. lanuginosus* (anteriormente denominada *Humicola lanuginosa*) como se describe en los documentos EP 258068 y EP 305216, cutinasa de *Humicola*, p. ej. *H. insolens* (documento WO 96/13580), lipasa de cepas de *Pseudomonas* (algunas de estas ahora renombradas como *Burkholderia*), p. ej. *P. alcaligenes* o *P. pseudoalcaligenes* (documento EP 218272), *P. cepacia* (EP 331376), *P. sp.* cepa SD705 (documentos WO 95/06720 y WO 96/27002), *P. wisconsinensis* (documento WO 96/12012), lipasas tipo GDSL *Streptomyces* (documento WO 10/065455), cutinasa de *Magnaporthe grisea* (documento WO 10/107560), cutinasa de *Pseudomonas mendocina* (documento US 5.389.536), lipasa de *Thermobifida fusca* (documento WO 11/084412), lipasa de *Geobacillus stearothermophilus* (documento WO 11/084417), lipasa de *Bacillus subtilis* (documento WO 11/084599) y lipasa de *Streptomyces griseus* (documento WO 11/150157) y *S. pristinaespiralis* (documento WO 12/137147).

Otros ejemplos son variantes de lipasa tales como las descritas en los documentos EP 407225, WO 92/05249, WO 94/01541, WO 94/25578, WO 95/14783, WO 95/30744, WO 95/35381, WO 95/22615, WO 96/00292, WO 97/04079, WO 97/07202, WO 00/34450, WO 00/60063, WO 01/92502, WO 07/87508 y WO 09/109500.

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

Otros ejemplos adicionales son lipasas a veces denominadas aciltransferasas o perhidrolasas, p. ej., aciltransferasas con homología con respecto a *Candida antarctica* lipasa A (documento WO 10/111143),

aciltransferasa de *Mycobacterium smegmatis* (documento WO 05/56782), perhidrolasas de la familia CE 7 (documento WO 09/67279) y variantes de perhidrolasa de *M. smegmatis* en particular la variante S54 V usada en el producto comercial Gentle Power Bleach de Huntsman Textile Effects Pte Ltd (documento WO 10/100028).

5 Amilasas

Las amilasas adecuadas que pueden usarse junto con las ADNasas de la invención pueden ser una alfa-amilasa o una glucoamilasa y pueden ser de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen los mutantes modificados químicamente u obtenidos mediante ingeniería de proteínas. Las amilasas incluyen, por ejemplo, alfa-amilasas obtenidas a partir de *Bacillus*, *p. ej.*, una cepa especial de *Bacillus licheniformis*, descrita más con más detalle en el documento GB 1.296.839.

Las amilasas adecuadas incluyen amilasas que tienen Id. de sec. n.º 2 en WO 95/10603 o variantes que tienen 90 % de identidad de secuencia con la Id. de sec. n.º 1 de las mismas. Las variantes preferidas se describen en WO 94/02597, WO 94/18314, WO 97/43424 e Id. de sec. n.º 4 de WO 99/019467, dichas variantes con sustituciones en una o más de las siguientes posiciones: 15, 23, 105, 106, 124, 128, 133, 154, 156, 178, 179, 181, 188, 190, 197, 201, 202, 207, 208, 209, 211, 243, 264, 304, 305, 391, 408 y 444.

Las diferentes amilasas adecuadas incluyen amilasas que tienen Id. de sec. n.º 6 del documento WO 02/010355 o las variantes de las mismas que tienen 90 % de identidad de la secuencia con la Id. de sec. n.º 6. Las variantes preferidas de Id. de sec. n.º 6 son las que tienen una delección en las posiciones 181 y 182 y una sustitución en la posición 193.

Otras amilasas que son adecuadas son las alfa-amilasas híbridas que comprenden los residuos 1-33 de la alfa-amilasa obtenida a partir de *B. amyloliquefaciens* que se muestran en Id. de sec. n.º 6 de WO 2006/066594 y los residuos 36-483 de la alfa-amilasa de *B. licheniformis* que se muestra en Id. de sec. n.º 4 de WO 2006/066594 o las variantes que tienen 90 % de identidad de la secuencia con la misma. Las variantes preferidas de esta alfa-amilasa híbrida son aquellas que tienen una sustitución, una delección o una inserción en una o más de las siguientes posiciones: G48, T49, G107, H156, A181, N190, M197, I201, A209 y Q264. Las variantes más preferidas de la alfa-amilasa híbrida comprenden los restos 1-33 de la alfa-amilasa obtenida de *B. amyloliquefaciens* que se muestra en la Id. de sec. n.º 6 de WO 2006/066594 y los restos 36-483 de Id. de sec. n.º 4 son las que tienen las sustituciones:

M197T;
H156Y+A181T+N190F+A209V+Q264S; o
G48A+T49I+G107A+H156Y+A181T+N190F+I201F+A209V+Q264S.

Las amilasas adicionales que son adecuadas son las amilasas que tienen Id. de sec. n.º 6 del documento WO 99/019467 o las variantes de las mismas que tienen 90 % de identidad de secuencia con la Id. de sec. n.º 6. Las variantes preferidas de Id. de sec. n.º 6 son las que tienen una sustitución, una delección o una inserción en una o más de las siguientes posiciones: R181, G182, H183, G184, N195, I206, E212, E216 y K269. Las amilasas particularmente preferidas son las que tienen una delección en las posiciones R181 y G182, o las posiciones H183 y G184.

Las amilasas adicionales que se pueden utilizar son las que tienen Id. de sec. n.º 1, Id. de sec. n.º 3, Id. de sec. n.º 2 o Id. de sec. n.º 7 de WO 96/023873 o las variantes de las mismas que tienen 90 % de identidad de la secuencia con Id. de sec. n.º 1, Id. de sec. n.º 2, Id. de sec. n.º 3 o Id. de sec. n.º 7. Las variantes preferidas de Id. de sec. n.º 1, Id. de sec. n.º 2, Id. de sec. n.º 3 o Id. de sec. n.º 7 son las que tienen una sustitución, una delección o una inserción en una o más de las siguientes posiciones: 140, 181, 182, 183, 184, 195, 206, 212, 243, 260, 269, 304 y 476, utilizando la Id. de sec. n.º 2 del documento WO 96/023873 para la numeración. Las variantes más preferidas son las que tienen una delección en dos posiciones seleccionadas de 181, 182, 183 y 184, tales como 181 y 182, 182 y 183 o las posiciones 183 y 184. Las variantes de amilasas más preferidas de Id. de sec. n.º 1, Id. de sec. n.º 2 o Id. de sec. n.º 7 son aquellas que tienen una delección en las posiciones 183 y 184 y una sustitución en una o más de las posiciones 140, 195, 206, 243, 260, 304 y 476.

Otras amilasas que se pueden usar son las amilasas que tienen Id. de sec. n.º 2 de WO 08/153815, Id. de sec. n.º 10 en WO 01/66712 o las variantes de las mismas que tienen 90 % de identidad de la secuencia con la Id. de sec. n.º 2 de WO 08/153815 o 90 % de identidad de la secuencia con la Id. de sec. n.º 10 en WO 01/66712. Las variantes preferidas de Id. de sec. n.º 10 en WO 01/66712 son las que tienen una sustitución, una delección o una inserción en una o más de las siguientes posiciones: 176, 177, 178, 179, 190, 201, 207, 211 y 264.

Las amilasas adecuadas adicionales son las amilasas que tienen Id. de sec. n.º 2 de WO 09/061380 o las variantes que tienen 90 % de identidad de la secuencia con la Id. de sec. n.º 2 de las mismas. Las variantes preferidas de Id. de sec. n.º 2 son las que tienen un truncamiento del extremo C-y/o una sustitución, una delección o una inserción en una o más de las siguientes posiciones: Q87, Q98, S125, N128, T131, T165, K178, R180, S181, T182, G183, M201, F202, N225, S243, N272, N282, Y305, R309, D319, Q320, Q359, K444 y G475. Las variantes más preferidas de Id. de sec. n.º 2 son las que tienen la sustitución en una o más de las siguientes posiciones: Q87E,R, Q98R, S125A, N128C, T131I, T165I, K178L, T182G, M201L, F202Y, N225E,R, N272E,R,

S243Q,A,E,D, Y305R, R309A, Q320R, Q359E, K444E y G475K y/o una delección en la posición R180 y/o S181 o de T182 y/o G183. Las variantes de amilasas más preferidas de Id. de sec. n.º: 2 son las que tienen las sustituciones:

5 N128C+K178L+T182G+Y305R+G475K;
N128C+K178L+T182G+F202Y+Y305R+D319T+G475K;
S125A+N128C+K178L+T182G+Y305R+G475K; o
S125A+N128C+T131I+T165I+K178L+T182G+Y305R+G475K, en donde las variantes están truncadas en el
extremo C y comprenden además opcionalmente una sustitución en la posición 243 y/o una delección en la
10 posición 180 y/o la posición 181.

Otras amilasas adecuadas son las alfa-amilasas que tienen Id. de sec. n.º: 12 del documento WO 01/66712 o una variante que tiene al menos 90 % de identidad con la Id. de sec. n.º: 12. Las variantes de amilasas preferidas son las que tienen una sustitución, una delección o una inserción en una o más de las siguientes posiciones de Id. de
15 sec. n.º: 12 en WO01/66712: R28, R118, N174; R181, G182, D183, G184, G186, W189, N195, M202, Y298, N299, K302, S303, N306, R310, N314; R320, H324, E345, Y396, R400, W439, R444, N445, K446, Q449, R458, N471, N484. Las amilasas especialmente preferidas incluyen variantes que tienen una delección de D183 y G184 y que tienen las sustituciones R118K, N195F, R320K y R458K y una variante que tiene además sustituciones en una o más posiciones seleccionadas del grupo: M9, G149, G182, G186, M202, T257, Y295, N299, M323, E345 y
20 A339, lo más preferido, una variante que tiene adicionalmente sustituciones en todas estas posiciones.

Otros ejemplos son variantes de amilasas tales como las descritas en los documentos WO 2011/098531, WO 2013/001078 y WO 2013/001087.

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

30 Peroxidasas/Oxidasas

Una peroxidasa adecuada para su uso en la presente memoria es una enzima peroxidasa comprendida por la clasificación enzimática EC 1.11.1.7, como se establece por el Comité de Nomenclatura de la International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) o cualquier fragmento obtenido a partir de la misma, que presenta actividad peroxidasa.

35 Las peroxidasas adecuadas incluyen las de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen los mutantes modificados químicamente u obtenidos mediante ingeniería de proteínas. Los ejemplos de peroxidasas útiles incluyen peroxidasas de *Coprinus*, por ejemplo, de *C. cinereus* (documento EP 179.486) y variantes de las mismas como las descritas en los documentos WO 93/24618, WO 95/10602 y WO 98/15257.

40 Las peroxidasas adecuadas también incluyen una enzima haloperoxidasa, tal como cloroperoxidasa, bromoperoxidasa y compuestos que presentan actividad de cloroperoxidasa o bromoperoxidasa. Las haloperoxidasas se clasifican según su especificidad por iones de haluro. Las cloroperoxidasas (E.C. 1.11.1.10) catalizan la formación de hipoclorito a partir de iones de cloruro.

45 La haloperoxidasa puede ser una cloroperoxidasa. Preferiblemente, la haloperoxidasa es una haloperoxidasa de vanadio, es decir, una haloperoxidasa que contiene vanadato, cuando se usa, se combina con una fuente de ion de cloruro.

Se han aislado haloperoxidasas de muchos hongos diferentes, en particular del grupo de los hongos *Dematiaceous Hyphomycetes*, tales como *Caldariomyces*, por ejemplo, *C. fumago*, *Alternaria*, *Curvularia*, por
50 ejemplo, *C. verruculosa* y *C. inaequalis*, *Drechslera*, *Ulocladium* y *Botrytis*.

Las haloperoxidasas también se han aislado de bacterias tales como *Pseudomonas*, p. ej., *P. pirrofinia* y *Streptomyces*, p. ej., *S. aureofaciens*.

55 En un aspecto preferido, la haloperoxidasa se deriva de *Curvularia* sp., en particular, *Curvularia verprucosa* o *Curvularia inaequalis*, tal como *C. inaequalis* CBS 102.42 como se describe en el documento WO 95/27046; o *C. verruculosa* CBS 147.63 o *C. verruculosa* CBS 444.70 como se describe en el documento WO 97/04102; o de *Drechslera harthari* como se describe en el documento WO 01/79459, *Densephila salina* como se describe en el documento WO 01/79458, *Phaeotrichocones croverarie* como se describe en el documento WO 01/79461, o
60 *Genosporium* sp. como se describe en el documento WO 01/79460.

Una oxidasa según la invención incluye, en particular, cualquier enzima lacasa comprendida por la clasificación enzimática EC 1.10.3.2, o cualquier fragmento obtenido a partir de la misma que presente actividad de lacasa, o un compuesto que presente una actividad similar, tal como una catecol oxidasa (EC 1.10.3.1), una o-aminofenol oxidasa (EC 1.10.3.4) o una bilirrubina oxidasa (EC 1.3.3.5).

Las enzimas lacasa preferidas son enzimas de origen microbiano. Las enzimas pueden obtenerse de plantas, bacterias u hongos (incluyendo hongos filamentosos y levaduras).

Los ejemplos adecuados de hongos incluyen una lacasa derivable de una cepa de *Bacillus*, *Neurospora*, por ejemplo, *N. crassa*, *Podospora*, *Botrytis*, *Collybia*, *Fomes*, *Lentinus*, *Pleurotus*, *Trametes*, por ejemplo, *T. villosa* y *T. versicolor*, *Rhizoctonia*, por ejemplo, *R. solani*, *Coprinopsis*, por ejemplo, *C. cinerea*, *C. comatus*, *C. friesii*, y *C. plicatilis*, *Psathyrella*, por ejemplo, *P. condelleana*, *Panaeolus*, por ejemplo, *P. papilionaceus*, *Myceliophthora*, por ejemplo, *M. thermophila*, *Schytalidium*, por ejemplo, *S. thermophilum*, *Polyporus*, por ejemplo, *P. pinsitus*, *Phlebia*, por ejemplo, *P. radiata* (documento WO 92/01046), o *Coriolus*, por ejemplo, *C. hirsutus* (JP 2238885).

Los ejemplos adecuados de bacterias incluyen una lacasa derivable de una cepa de *Bacillus*.

Se prefiere la lacasa obtenida de *Coprinopsis* o *Myceliophthora*; en particular, una lacasa obtenida de *Coprinopsis cinerea*, como se describe en el documento WO 97/08325; o de *Myceliophthora thermophila*, como se describe en el documento WO 95/33836.

La enzima o enzimas deterativas se pueden incluir en una composición detergente añadiendo por separado los aditivos que contienen una o más enzimas, o añadiendo un aditivo combinado que comprende todas estas enzimas. Un aditivo detergente de la invención, es decir, un aditivo separado o un aditivo combinado, se puede formular, por ejemplo, en forma de un granulado, líquido, una suspensión acuosa, etc. Las formulaciones de aditivo detergente preferidas son granulados, en especial granulados sin polvo, líquidos, en particular líquidos estabilizados, o suspensiones acuosas.

Los granulados sin polvo se pueden producir, p. ej., según se describe en US-4.106.991 y en US-4.661.452, y opcionalmente pueden estar revestidos con métodos conocidos en la técnica. Los ejemplos de materiales de recubrimiento cerúleos son productos de poli(óxido de etileno) (polietilenglicol, PEG) que tienen pesos moleculares medios de 1000 a 20000; nonilfenoles etoxilados que tienen de 16 a 50 unidades de óxido de etileno; alcoholes grasos etoxilados en los que el alcohol contiene de 12 a 20 átomos de carbono y que tienen de 15 a 80 unidades de óxido de etileno; alcoholes grasos; ácidos grasos; y monoglicéridos y diglicéridos y triglicéridos de ácidos grasos. Los ejemplos de materiales de recubrimiento filmógenos adecuados para aplicar mediante técnicas de lecho fluidizado se proporcionan en GB-1483591. Las preparaciones de enzima líquida pueden, por ejemplo, estabilizarse por adición de un poliol tal como propilenglicol, un azúcar o alcohol azucarado, ácido láctico o ácido bórico según métodos establecidos. Las enzimas protegidas se pueden preparar según el método descrito en EP-238.216.

Dispersantes

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

Agentes inhibidores de la transferencia de colorantes

Las composiciones de limpieza de la presente invención también pueden incluir uno o más agentes inhibidores de la transferencia de colorantes. Los agentes poliméricos inhibidores de la transferencia de colorantes adecuados incluyen, aunque no de forma limitativa, polímeros de polivinilpirrolidona, polímeros de *N*-óxido de poliamina, copolímeros de *N*-vinilpirrolidona y *N*-vinilimidazol, poliviniloxazolidonas y polivinilimidazoles o mezclas de los mismos. Si está presente en una composición de la invención, el agente inhibidor de la transferencia de colorantes puede estar presente a un nivel de aproximadamente 0,0001 % a aproximadamente 10 %, de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 5 % o incluso de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 3 %, en peso de la composición.

Agente blanqueante fluorescente

La composición detergente también puede contener preferiblemente componentes adicionales que pueden teñir artículos que se limpian, tales como agente blanqueador fluorescente o abrillantadores ópticos. Cuando está presente, el abrillantador está preferiblemente a un nivel de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 0,5 %. Cualquier agente blanqueante fluorescente adecuado para usar en una composición detergente para lavado de ropa puede ser usado en la composición de la presente invención. Los agentes blanqueantes fluorescentes usados más habitualmente son los que pertenecen a las clases de los derivados del ácido diaminoestilbensulfónico, derivados de la diarilpirazolina y derivados del bisfenil-diéster. Ejemplos del tipo derivados del ácido diaminoestilbensulfónico de los agentes blanqueantes fluorescentes incluyen las sales sódicas de: 4,4'-bis-(2-dietanolamino-4-anilino-s-triazin-6-ilamino)estilbeno-2,2'-disulfonato, 4,4'-bis-(2,4-dianilino-s-triazin-6-ilamino)estilbeno-2,2'-disulfonato, 4,4'-bis-(2-anilino-4-

(*N-N*-2-hidroxi-etilamino)-s-triazin-6-ilamino)estilbeno-2,2'-disulfonato, 4,4'-bis-(4-fenil-1,2,3-triazol-2-il)estilbeno-2,2'-disulfonato y 5-(2-*H*-nafto[1,2-*d*][1,2,3]triazol-2-il)-2-[(*E*)-2-fenilvinil]bencenosulfonato. Los agentes blanqueantes fluorescentes preferidos son Tinopal DMS y Tinopal CBS comercializados por Ciba-Geigy AG, Basel, Suiza. Tinopal DMS es la sal disódica del 4,4'-bis-(2-morfolino-4-anilino-s-triazin-6-ilamino)estilben-2,2-disulfonato. Tinopal CBS es la sal disódica del de 2,2'-bis-(fenilestirilo)-disulfonato. También se prefieren agentes blanqueadores fluorescentes como Paralhite KX. suministrado por Partivs Minerals and Chemicals, Mumbai, India. Tinopal CBS-X es una sal disódica de 4,4'-bis-(sulfoestirilo)-bifenilfenilo también conocida como Didium distirilbifenil disulfonato disódico. Otros fluorescentes adecuados para usar en la invención incluyen las 1,3-diarilpirazolininas y las 7-alquilaminocumarinas.

Los niveles de abrillantador fluorescente adecuados incluyen niveles inferiores de aproximadamente 0,01, de 0,05, de aproximadamente 0,1 o incluso de aproximadamente 0,2 % en peso, hasta niveles superiores de 0,5 o incluso 0,75 % en peso.

Polímero para la liberación de la suciedad

La composición detergente comprende preferiblemente uno o más polímeros para la liberación de la suciedad, que ayudan a eliminar la suciedad de los tejidos tales como los tejidos basados en algodón y poliéster. Un polímero para la liberación de la suciedad preferido ayuda a la eliminación de suciedad de los tejidos basados en poliéster. Los polímeros para la liberación de la suciedad pueden ser, por ejemplo, polímeros basados en tereftalato no iónico o aniónico, copolímeros de polivinil caprolactama y relacionados, copolímeros de injerto de vinilo, poliéster poliamidas, véase por ejemplo el Capítulo 7 en Powdered Detergents, volumen de la serie Surfactant Science 71, Marcel Dekker, Inc. Otro tipo preferido de polímeros para la liberación de la suciedad son el polímero de limpieza de grasa alcoxilado anfifílico, que comprende por ejemplo, una estructura de núcleo y una pluralidad de grupos alcoxilato unidos a esa estructura de núcleo. La estructura del núcleo puede comprender una estructura de polialquilenimina o una estructura de polialcanolamina como se describe en detalle en el documento WO 2009/087523 (incorporado aquí como referencia). Además, los copolímeros de injerto aleatorios son polímeros de liberación de suciedad adecuados. Los copolímeros de injerto adecuados se describen con más detalle en los documentos WO 2007/138054, WO 2006/108856 y WO 2006/113314 (incorporados aquí por referencia). Otros polímeros para la liberación de la suciedad son estructuras de polisacárido sustituidas, especialmente estructuras celulósicas sustituidas tales como derivados de celulosa modificados tales como los descritos en los documentos EP 1867808 o WO 2003/040279 (ambos incorporados como referencia en la presente memoria). Los polímeros celulósicos adecuados incluyen celulosa, éteres de celulosa, ésteres de celulosa, amidas de celulosa y mezclas de los mismos. Los polímeros celulósicos adecuados incluyen celulosa modificada aniónicamente, celulosa modificada no iónicamente, celulosa modificada catiónicamente, celulosa modificada con iones híbridos, y mezclas de los mismos. Los polímeros celulósicos de celulosa incluyen metil celulosa, carboxi metil celulosa, etil celulosa, hidroxilo etil celulosa, hidroxil propil metil celulosa, éster carboximetil celulosa, y mezclas de los mismos.

Agente antirredeposición

Las composiciones detergentes de la presente invención también pueden incluir uno o más agentes antirredeposición tales como carboximetilcelulosa (CMC), poli(alcohol vinílico) (PVA), polivinilpirrolidona (PVP), polioxietileno y/o polietilenglicol (PEG), homopolímeros de ácido acrílico, copolímeros de ácido acrílico y ácido maleico y polietileniminas etoxiladas. Los polímeros basados en celulosa descritos en la sección de polímeros para la liberación de la suciedad anteriores también pueden funcionar como agentes antirredeposición.

Modificadores de la reología

Las composiciones detergentes de la presente invención también pueden incluir uno o más modificadores de la reología, estructurantes o espesantes, como distintos agentes reductores de la viscosidad. Los modificadores de la reología se seleccionan del grupo que consiste en materiales cristalinos no poliméricos hidroxifuncionalizados, modificadores de la reología poliméricos que proporcionan propiedades de reducción de la viscosidad por cizallamiento a la matriz líquida acuosa de la composición detergente líquida. La reología y la viscosidad del detergente se pueden modificar y ajustar por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo como se muestra en el documento EP 2169040.

Otros adyuvantes adecuados incluyen, sin carácter limitante, agentes antiacortamiento, agentes antiarrugas, bactericidas, aglutinantes, portadores, tintes, estabilizantes enzimáticos, suavizantes, rellenos, reguladores de la espuma, hidrótrofos, perfumes, pigmentos, supresores de las jabonaduras, disolventes y estructurantes para detergentes líquidos y/o agentes elastizantes de la estructura.

Formulación de productos detergentes

La composición detergente puede estar en cualquier forma conveniente, p. ej., una barra, una pastilla homogénea, una pastilla que tiene dos o más capas, un polvo regular o compacto, un gránulo, una pasta, un gel o un líquido regular, compacto o concentrado. Las composiciones detergentes preferidas son líquidos, opcionalmente en forma de dosis unitaria, por ejemplo en forma de bolsa.

Formas de la formulación de detergente: Capas (mismas o diferentes fases), bolsas, frente a formas para de dosificación automática para lavadora.

- 5 Las bolsas pueden configurarse como compartimentos individuales o multicompartimentos. Puede tener cualquier forma y material que sea adecuado para contener la composiciones, p. ej. sin permitir la liberación de la composición antes de poner en contacto la bolsa con el agua. La bolsa está hecha de película soluble en agua que encierra un volumen interior. Dicho volumen interior puede estar dividido en compartimentos de la bolsa. Las películas preferidas son las de materiales poliméricos, preferiblemente polímeros formados en una película u lámina. Los polímeros, copolímeros o derivados preferidos de los mismos son poliacrilatos seleccionados, y copolímeros de acrilato solubles en agua, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, dextrina sódica, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, maltodextrina, polimetacrilatos, con la máxima preferencia copolímeros de poli(alcohol vinílico) e hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC). Preferiblemente, el nivel de polímero en la película, por ejemplo PVA, es de al menos 60 %. El peso molecular promedio preferido será típicamente de aproximadamente 20.000 a aproximadamente 150.000. Las películas también pueden ser composiciones de mezcla que comprenden mezclas de polímeros hidrolíticamente degradables y solubles en agua tales como poliactida y alcohol polivinílico (conocido con la referencia comercial M8630 y comercializado por Charris Craft In. Prod. De Gary, Ind., EE. UU.) junto con plastificantes como glicerol, etilenglicol, propilenglicol, sorbitol y mezclas de los mismos. Las bolsas pueden comprender una composición de limpieza para lavado de ropa sólida o componentes de parte y/o una composición de limpieza líquida o componentes de parte separados por la película soluble en agua. El compartimento para los componentes líquidos puede tener una composición diferente que los compartimentos que contienen los sólidos. Ref: (US 2009/0011970 A1).

- 25 Los ingredientes detergentes pueden estar separados físicamente entre sí por compartimentos en bolsas solubles en agua o en diferentes capas de pastillas. De este modo, se puede evitar la interacción de almacenamiento negativa entre los componentes. Los diferentes perfiles de disolución de cada uno de los compartimentos también pueden dar lugar a la disolución retardada de componentes seleccionados en la disolución de lavado.

Definición/características de las formas:

- 30 Un detergente líquido o de gel, que no está como dosis unitaria, puede ser acuoso, que contiene típicamente al menos 20 % en peso y hasta 95 % de agua, tal como hasta aproximadamente 70 % de agua, hasta aproximadamente 65 % de agua, hasta aproximadamente 55 % de agua, hasta aproximadamente 45 % de agua, hasta aproximadamente 35 % de agua. Otros tipos de líquidos, que incluyen sin limitación, alcanoles, aminas, dioles, éteres y polioles pueden incluirse en un líquido acuoso o gel. Un líquido acuoso o detergente en gel puede contener de 0-30 % de disolvente orgánico.

- 35 Un detergente líquido o en gel puede ser no acuoso.

Composición detergente líquida

- 40 Preferiblemente, la composición detergente es una composición detergente líquida, siendo preferiblemente un detergente para la ropa, por ejemplo que comprende:

- a) variante de ADNasa, opcionalmente en una cantidad de 0,00001, o de 0,005 mg a 10 g o 50 g de proteína activa por litro de detergente;
- 45 b) de 0,1 % en peso a 60 % en peso de al menos un tensioactivo y
- c) de 0,1 % en peso a 50 % en peso de al menos un aditivo reforzante de la detergencia, preferiblemente que comprende aditivo reforzante de la detergencia seleccionado de citrato y/o ácido metilglucina-N,N-diacético (MGDA) y/o ácido glutámico-N,N-diacético (GLDA), hEDP, dTPMA o DTPMPA y/o sales de los mismos.
- 50

- La composición detergente líquida puede comprender de 5 % en peso o de 10 % en peso o de 20 % en peso a 70 % en peso de agua, o hasta 50 % de agua, hasta 40 % de agua, o hasta 30 % de agua, hasta 20 % de agua. En un detergente líquido acuoso se pueden incluir otros tipos de líquidos, que incluyen, sin limitación, alcanoles, aminas, dioles, éteres y polioles. Un detergente líquido acuoso puede contener entre un 0-30 % de disolvente orgánico. Un detergente líquido puede ser incluso sustancialmente no acuoso; en donde el contenido de agua es inferior a un 10 %, preferiblemente inferior a un 5 %.
- 55

Composiciones en polvo

- 60 La composición detergente puede ser preferiblemente una composición detergente granulada para lavado de ropa o lavado de vajillas, preferiblemente para ropa, por ejemplo, que comprende

- a) de 0,00001 o de 0,005 mg de variante de ADNasa por gramo de composición, opcionalmente
- 65 b) de 0 % en peso, preferiblemente de 1 % en peso a 40 % en peso de tensioactivo aniónico, opcionalmente

c) de 0 % en peso, preferiblemente de 1 % en peso a 20 % en peso de tensioactivo no iónico y/u opcionalmente

5 d) de 5 % en peso a 40 % en peso de aditivo reforzante de la detergencia, tal como carbonatos, zeolitas, fosfatos, silicatos, aditivos reforzantes de la detergencia para secuestro de calcio o agentes formadores de complejos/quelantes o mezclas de los mismos.

10 Los aditivos reforzantes de la detergencia preferidos comprenden aditivos reforzantes de la detergencia que incluyen citrato y/o ácido metilglucina-N,N-diacético (MGDA) y/o ácido glutámico-N,N-diacético (GLDA) y/o sales de los mismos.

15 El detergente comprende preferiblemente hasta 30 % en peso, tal como aproximadamente 1 % a aproximadamente 20 %, de un sistema blanqueador. Los componentes del sistemas blanqueadores adecuados incluyen fuentes de peróxido de hidrógeno; fuentes de perácidos; activadores del blanqueador, catalizadores del blanqueador y/o potenciadores como se ha descrito anteriormente.

Formulación de la enzima en cogránulos

20 La ADNasa puede formularse como un gránulo, por ejemplo, como un cogránulo que combina una o más enzimas, preferiblemente enzimas amilasa, celulasa, mananasa y/o galactanasa.

Ensayos y composiciones detergentes

25 Composición de detergente modelo A (líquida)

30 Ingredientes: 12 % de LAS, 11 % de AEO Biosoft N 25-7 (NI), 7 % de AEOS (SLES), 6 % de MPG (monopropilenglicol), 3 % de etanol, 3 % de TEA, 2,75 % de jabón de cacao, 2,75 % de jabón de soja, 2 % de glicerol, 2 % de hidróxido de sodio, 2 % de citrato de sodio, 1 % de formiato de sodio, 0,2 % de Dtpma y 0,2 % de PCA (todos los porcentajes son p/p (porcentaje en peso)).

Ensayo A-C

Actividad de muestras purificadas

35 Antes de analizar las muestras de ADNasa para determinar su estabilidad en el ensayo A, B o C, se analizaron para determinar la actividad según el siguiente procedimiento. Las muestras de ADNasa purificadas se diluyeron a 7,5 ppm en una placa de 96 pocillos usando un tampón de dilución (Tris-HCl 50 mM, pH 7 + 0,1 % de Triton X-100) en un manipulador de líquidos de canal Hamilton Nimbus 4. Una curva patrón de ADNasa (p. ej., Id. de sec. n.º: 1 o Id. de sec. n.º: 28) a 2,5, 5 y 7,5 ppm se preparó en consecuencia.

45 Se añaden 12 µl de muestra normalizada de ADNasa a 228 µl de Modelo A y la solución se agita durante 90 s a 2000 rpm (2 mm de órbita). Se añaden 10 µl de la muestra a 190 µl de sustrato de ADN (3,3 mg/ml de ADN de esperma de salmón + Tris-HCl 50 mM, pH 7 + MgCl₂ 5 mM + CaCl₂ 5 mM) y la placa de 96 pocillos que contenía las muestras y el sustrato de ADN se mezclan a 1500 rpm durante 90 s (2 mm de órbita). La placa se incuba durante 1 h a temperatura ambiente y la actividad ADNasa se mide según el procedimiento: El Hamilton STAR mide la viscosidad de las muestras y, por lo tanto, la actividad ADNasa usando la tecnología de ensayo ViPr como se describe en (documento WO2011/107472 A1) aspirando 100 µl de la solución de ensayo con una punta estándar limpia CORE 300 µl a una velocidad de 50 µl/s. La solución se dispensa de nuevo al pocillo original a 10 µl/s y la medición se repitió 5 veces. Se recogen los datos de presión durante la etapa de aspiración de los 96 pocillos y se toma el valor de presión a 1000 ms después del inicio de la aspiración para calcular la actividad ADNasa en unidades relativas (UR). Las unidades relativas se calculan por división del valor del tampón (blanco; 1000 ms) por el valor de presión (1000 ms) de una muestra de la que se resta 1. Las muestras que muestran actividad inferior a 2,5 ppm en comparación con la curva patrón se ajustan a un nivel de al menos > 10 ppm e inferior a < 20 ppm.

50 Todas las muestras se transfieren por triplicado a una placa de 96 pocillos con una ADNasa de 5 ppm (Id. de sec. n.º: 1 o Id. de sec. n.º: 28) como referencia.

Ensayo A

60 La placa de 96 pocillos con las muestras de ADNasa normalizadas y diluciones de ADNasa (Id. de sec. n.º: 28) se cargó en el robot Hamilton STAR equipado con un cabezal TADM de 96 canales que permite la medición simultánea de la presión en el espacio superior de cada canal de pipeta individual. Se añaden 12 µl de muestra de ADNasa normalizada a 228 µl de Modelo A con proteasa (136 ppm). La solución se agita durante 90 s a 2000 rpm (2 mm de órbita) y se añaden 80 µl de la solución a dos placas de PCR. La placa A (Tensión) se incuba a 40 °C y la placa B (Referencia) a 4 °C durante 24 h. La placa A y B se transfieren a temperatura ambiente. 190 µl de sustrato de ADN (3,3 mg/ml de ADN de esperma de salmón + Tris-HCl 50 mM, pH 7 + MgCl₂ 5 mM + CaCl₂ 5 mM) se añaden a 2 x placas de 96 pocillos. Se añaden 10 µl de

muestra de la placa A y la placa B respectivamente a las placas correspondientes que contienen sustrato de ADN. Las muestras y el ADN se mezclan a 1500 rpm durante 90 s (2 mm de órbita) y se incuban durante 1 h a temperatura ambiente. El Hamilton STAR mide la viscosidad usando la tecnología de ensayo ViPr como se describe en (documento WO2011/107472 A1) aspirando 100 µl con una punta estándar limpia CORE 300 µl a una velocidad de 50 µl/s. La solución se dispensa de nuevo al pocillo original a 10 µl/s y la medición se repitió 5 veces. Se recogen los datos de presión durante la etapa de aspiración de los 96 pocillos y se toma el valor de presión a 1000 ms después del inicio de la aspiración para calcular la actividad ADNasa en unidades relativas (UR). Las unidades relativas se calculan por división del valor del tampón (blanco; 1000 ms) por el valor de presión (1000 ms) de una muestra de la que se resta 1. La actividad relativa (RA) se calcula como

$$\text{Actividad Residual (\%)} = \frac{UR_{\text{variante}}}{UR_{\text{referencia}}} * 100$$

Ensayo B

Las condiciones y la determinación de actividad de las variantes de ADNasa son como se describe en el Ensayo A, excepto que las muestras de ADNasa se expusieron a un detergente Modelo A + 0,4 % de K2SO3 durante 1 hora a 60 °C. La solución detergente se prepara mezclando Modelo A (50 g) con 0,2 g de K2SO3 durante 1 h con agitación intensa.

Ensayo C

Las condiciones y la determinación de actividad de las variantes de ADNasa son como se describe en el Ensayo A, excepto que las muestras se expusieron al detergente Modelo A en solitario durante 2 horas a 62 °C.

Relación de actividad residual (RAR)

La relación de actividad residual para cada condición se calculó usando una variante estabilizada como referencia. Las variantes se probaron en las 3 condiciones descritas anteriormente y la RAR se calculó usando la siguiente fórmula:

$$\text{Relación de actividad residual (RAR)} = \frac{RA_{\text{variante}}}{RA_{\text{referencia}}}$$

Métodos

Los métodos generales de PCR, clonación, nucleótidos de ligadura, etc., son bien conocidos por un experto en la materia y pueden, por ejemplo, encontrarse en "Molecular cloning: A laboratory manual", Sambrook y col. (1989), Cold Spring Harbor lab., Cold Spring Harbor, NY; Ausubel, F. M. y col. (eds.); "Current protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, (1995); Harwood, C. R., y Cutting, S. M. (eds.); "DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes I and II", D.N. Glover ed. (1985); "Oligonucleotide Synthesis", M.J. Gait ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization", B.D. Hames & S.J. Higgins eds (1985); "A Practical Guide To Molecular Cloning", B. Perbal, (1984).

Ejemplos

Ejemplo 1: Construcción de variantes mediante mutagénesis dirigida al sitio

Las variantes dirigidas al sitio se construyeron con ADNasa de *Bacillus cibi* (Id. de sec. n.º: 1), que comprende sustituciones específicas según la invención. Las variantes se realizaron mediante clonación tradicional de fragmentos de ADN (Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor, 1989) usando PCR junto con oligonucleótidos mutagénicos diseñados apropiadamente que introducen las mutaciones deseadas en la secuencia resultante.

Los oligos mutagénicos se diseñaron correspondientes a la secuencia de ADN que flanquea el sitio o sitios deseados de mutación, separados por los pares de bases de ADN que definen las inserciones/deleciones/sustituciones, y se adquirieron de un proveedor de oligonucleótidos tal como Life Technologies. Para probar las variantes de ADNasa de la invención, el ADN mutado que comprende una variante de la invención se integra en una cepa competente de *B. subtilis* por recombinación homóloga, se fermenta usando protocolos estándar (medios basados en extracto de levadura, 3-4 días, 30 °C) y se criba en un ensayo de actividad.

Las variantes construidas se sembraron en placas de agar LB suplementado con 6 µg/ml de cloranfenicol y se cultivaron a 37 °C durante un día. Después del crecimiento, se repicaron las colonias en pocillos individuales de placas de microtitulación estándar de 96 pocillos que contenían 200 µl de caldo TBgy complementado con 6 µg/ml de cloranfenicol y trazas de metales (FeCl3 50 mM, CaCl2 20 mM, MnCl2 10 mM, ZnSO4 10 mM, CuCl2 2 mM y NiCl2 2 mM, (F. William

Studier, "Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures", Protein Expression and Purification, 41 (2005) 207-234).

- 5 La ADNasa de *Bacillus cibi* natural también se inoculó como referencia en cuatro pocillos de cada placa de microtitulación. Las placas de microtitulación se cultivaron durante tres días a 30 °C con agitación a 220 rpm. Después del crecimiento, los sobrenadantes se cribaron para determinar la actividad residual después de estresarlos durante 20 minutos a 48,5 °C en presencia de un 96 % (v/v) de Modelo A.

- 10 Ejemplo 2: Relación de actividad relativa de variantes de ADNasa con respecto a la muestra de referencia en detergente (Ensayo C)

Condiciones del ensayo: Las variantes de ADNasa se estresaron durante 2 horas a 62 °C en un detergente modelo y se compararon con la muestra de referencia indicada por un asterisco (*)

Mutaciones relativas a <i>B. cibi</i> (Id. de sec. n.º: 1)	Detergente RAR (Ensayo C)
Id. de sec. n.º: 28	1,00
T1I S13Y T22P S27L L33R S42G S57W S59V V76L Q109R S116D T127V S144P A147H S167L G175D	1,37
T1I S13Y T22P S27L L33V S42G S57W S59V V76L Q109R S116D T127V S144P A147H S167L G175D	1,47
T1I S13Y T22P S27L L33Y S42G S57W S59V V76L Q109R S116D T127V S144P A147H S167L G175D	1,58

- 15 Ejemplo 3 Relación de actividad relativa de las variantes de ADNasa en relación con la muestra de referencia en presencia de proteasa (Ensayo A)

- 20 Condiciones del ensayo: Las variantes de ADNasa se estresaron durante 24 horas a 40 °C en un detergente modelo (detergente modelo A) con 5 % de proteasa presente. Las variantes se compararon con la muestra de referencia con la Id. de sec. n.º: 28.

Mutaciones relativas a <i>B. cibi</i> (Id. de sec. n.º: 1)	Ensayo A de proteasa RAR
Id. de sec. n.º: 28	1,00
T1I S13Y T22P S27L L33R S42G S57W S59V V76L Q109R S116D T127V S144P A147H S167L G175D	1,14
T1I S13Y T22P S27L L33V S42G S57W S59V V76L Q109R S116D T127V S144P A147H S167L G175D	1,18
T1I S13Y T22P S27L L33Y S42G S57W S59V V76L Q109R S116D T127V S144P A147H S167L G175D	1,25
T1I S13Y T22P S25P S27R L33R S39P S42G S57W S59V S66Y V76L T77Y Q109R S116D T127V S144P A147H S167L G175D	2,19

- 25 Ejemplo 4 Relación de actividad relativa de las variantes de ADNasa en relación con la muestra de referencia en presencia de sulfito (Ensayo B)

Condiciones del ensayo: Las variantes de ADNasa se estresaron durante 1 hora a 60 °C en un detergente modelo que contenía sulfito al 0,4 % (K₂SO₄). Las variantes se compararon con la muestra de referencia con la Id. de sec. n.º: 28.

Mutaciones relativas a <i>B. cibi</i> (Id. de sec. n.º: 1)	Ensayo B de sulfito RAR
Id. de sec. n.º: 28	1,00
T1I S13Y T22P S27L L33R S42G S57W S59V V76L Q109R S116D T127V S144P A147H S167L G175D	4,02
T1I S13Y T22P S27L L33V S42G S57W S59V V76L Q109R S116D T127V S144P A147H S167L G175D	8,36
T1I S13Y T22P S27L L33Y S42G S57W S59V V76L Q109R S116D T127V S144P A147H S167L G175D	7,96

- 30

ES 2 908 667 T3

Ejemplo 5 Mejora relativa en tres ensayos

Condiciones del ensayo:

Ensayo A: Las variantes de ADNasa se estresaron durante 24 horas a 40 °C en un detergente modelo (detergente modelo A) con 5 % de proteasa presente. Las variantes se compararon con la muestra de referencia muestra de referencia con Id. de sec. n.º: 28.

- 5 Ensayo B: Las variantes de ADNasa se estresaron durante 1 hora a 60 °C en un detergente modelo que contenía sulfito al 0,4 % (K₂SO₄). Las variantes se compararon con la muestra de referencia muestra de referencia con Id. de sec. n.º: 28.

Ensayo C: Las variantes de ADNasa se estresaron durante 2 horas a 62 °C en un detergente modelo y se compararon con la muestra de referencia con Id. de sec. n.º: 28.

10

Mutaciones relativas respecto de la Id. de sec. n.º: 28	Ensayo de actividad residual (Modelo A) Ensayo C	Relación de actividad residual (Proteasa) Ensayo A	Relación de actividad residual (K ₂ SO ₄) Ensayo B
Id. de sec. n.º: 28	1,00	1,00	1,00
S9I	1,18	1,08	2,41
S27K	1,15	2,94	1,10
S27R	1,63	2,81	2,09
D32I	-	1,46	-
D32L	0,32	1,32	-
D32R	0,39	2,97	-
D32V	0,16	1,24	-
L33H	1,07	1,07	1,45
L33R	1,37	1,14	4,02
L33V	1,47	1,18	8,36
L33Y	1,58	1,25	7,96
S39C	1,62	1,43	2,30
Q48D	-	1,24	-
T65M	1,19	0,79	3,52
S66R	0,19	3,40	-
S66W	1,14	1,16	3,95
S66Y	0,48	3,34	0,17
S101N	1,85	2,47	0,44
S106L	0,83	1,48	0,92
S130Y	0,65	1,24	0,64
Q140G	0,33	1,26	-
Q140V	1,20	1,15	0,34
W154Y	0,46	-	1,22
T157V	-	1,13	-
Y159A	-	1,35	0,39
Y159R	-	1,37	0,33
G162C	1,10	0,87	0,99
Q174N	-	1,10	-
S179L	0,21	1,64	-

Ejemplos de detergentes

- 15 Ejemplos 1-6. Composiciones detergentes para lavado de ropa granulares escogidas para lavado de ropa a mano o para lavadoras de ropa de carga por la parte superior.

	1 (% en peso)	2 (% en peso)	3 (% en peso)	4 (% en peso)	5 (% en peso)	6 (% en peso)
Alquilbencenosulfonato lineal	20	22	20	15	20	20

Cloruro de dimetilhidroxietilamonio C12-14 cloruro de amonio	0,7	0,2	1	0,6	0,0	0
AE3S	0,9	1	0,9	0,0	0,5	0,9
AE7	0,0	0,0	0,0	1	0,0	3
Tripolifosfato de sodio	5	0,0	4	9	2	0,0
Zeolita A	0,0	1	0,0	1	4	1
Silicato 1.6R (SiO ₂ :Na ₂ O en una relación 1,6:1)	7	5	2	3	3	5
Carbonato sódico	25	20	25	17	18	19
Poliacrilato MW 4500	1	0,6	1	1	1,5	1
Copolímero de injerto aleatorio ¹	0,1	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0
Carboximetilcelulosa	1	0,3	1	1	1	1
Proteasa (Savinase®, 32,89 mg de sustancia activa/g)	0,1	0,1	0,1	0,1		0,1
⁵ ADNasa como se define en la presente memoria (mg activos)	4,0	6,0	10,0	2,2	4,4	1,5
Lipasa - Lipex® (18 mg de sustancia activa/g)	0,03	0,07	0,3	0,1	0,07	0,4
⁴ Amilasa (mg activo)	3,0	5,0	3,0	2,2	6,0	6,0
Abrillantador fluorescente 1	0,06	0,0	0,06	0,18	0,06	0,06
Abrillantador fluorescente 2	0,1	0,06	0,1	0,0	0,1	0,1
DTPA	0,6	0,8	0,6	0,25	0,6	0,6
MgSO ₄	1	1	1	0,5	1	1
Percarbonato de sodio	0,0	5,2	0,1	0,0	0,0	0,0
Perborato de sodio monohidratado	4,4	0,0	3,85	2,09	0,78	3,63
NOBS	1,9	0,0	1,66	0,0	0,33	0,75
TAED	0,58	1,2	0,51	0,0	0,015	0,28
Ftalocianina de cinc sulfonada	0,0030	0,0	0,0012	0,0030	0,0021	0,0
S-ACMC	0,1	0,0	0,0	0,0	0,06	0,0
Direct Violet 9	0,0	0,0	0,0003	0,0005	0,0003	0,0
Acid Blue 29	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0003
Sulfato/humedad	Resto					

Ejemplos 7-12. Composiciones detergentes para lavado de ropa granulares escogidas para lavadoras automáticas de carga frontal.

	7 (% en peso)	8 (% en peso)	9 (% en peso)	10 (% en peso)	11 (% en peso)	12 (% en peso)
Alquilbencenosulfonato lineal	8	7,1	7	6,5	7,5	7,5
AE3S	0	4,8	0	5,2	4	4
Alquilsulfato C12-14	1	0	1	0	0	0
AE7	2,2	0	3,2	0	0	0
Cloruro de dimetilhidroxietilamonio C10-12	0,75	0,94	0,98	0,98	0	0
Silicato laminar cristalino (δ-Na ₂ Si ₂ O ₅)	4,1	0	4,8	0	0	0
Zeolita A	5	0	5	0	2	2
Ácido cítrico	3	5	3	4	2,5	3
Carbonato sódico	15	20	14	20	23	23
Silicato 2R (SiO ₂ :Na ₂ O en una relación 2:1)	0,08	0	0,11	0	0	0
Agente para liberar la suciedad	0,75	0,72	0,71	0,72	0	0
Copolímero de ácido acrílico/ácido maleico	1,1	3,7	1,0	3,7	2,6	3,8
Carboximetilcelulosa	0,15	1,4	0,2	1,4	1	0,5
Proteasa - Purafect® (84 mg de sustancia	0,2	0,2	0,3	0,15	0,12	0,13

activa/g)						
Lipasa - Lipex® (18,00 mg de sustancia activa/g)	0,05	0,15	0,1	0	0	0
Celulasa - Celluclean™ (15,6 mg de sustancia activa/g)	0	0	0	0	0,1	0,1
⁴ Amilasa (mg activo)	4,0	5,0	10	2,2	4,4	1,5
⁵ ADNasa como se define en la presente memoria (mg activos)	4,0	5,0	10,0	2,2	8,0	1,5
TAED	3,6	4,0	3,6	4,0	2,2	1,4
Percarbonato	13	13,2	13	13,2	16	14
Sal de sodio del ácido etilendiamin-N,N'-disuccínico, isómero (S,S) (EDDS)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Hidroxietanodifosfonato (HEDP)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
MgSO ₄	0,42	0,42	0,42	0,42	0,4	0,4
Perfume	0,5	0,6	0,5	0,6	0,6	0,6
Aglomerado de supresor de las jabonaduras	0,05	0,1	0,05	0,1	0,06	0,05
Jabón	0,45	0,45	0,45	0,45	0	0
Ftalocianina de cinc sulfonada (sustancia activa)	0,0007	0,0012	0,0007	0	0	0
S-ACMC	0,01	0,01	0	0,01	0	0
Direct Violet 9 (sustancia activa)	0	0	0,0001	0,0001	0	0
Sulfato/Agua y Otras sustancias	Resto					

* La ADNasa se muestra como mg de sustancia activa enzimática por 100 g de detergente.

Ejemplos 13-18. Composiciones detergentes para lavado de ropa de limpieza intensiva

	13 (% en peso)	14 (% en peso)	15 (% en peso)	16 (% en peso)	17 (% en peso)	18 (% en peso)
Alquil C12-15 etoxi (1,8)sulfato	14,7	11,6		16,31		17,29
Alquilbencenosulfonato C11,8	4,3	11,6	8,3	7,73	11,7	7,73
Sulfato de alquilo ramificado C16-17	1,7	1,29		3,09		3,3
Alquilo C12-14 9-etoxilato	0,9	1,07		1,31		1,31
Óxido de dimetilamina C12	0,6	0,64		1,03		1,03
Ácido cítrico	3,5	0,65	3	0,66	2,27	0,67
Ácido graso C12-18	1,5	2,32	3,6	1,52	0,82	1,52
Borato sódico (Bórax)	2,5	2,46	1,2	2,53		2,53
Alquil C12 -14 etoxi 3 sulfato sódico			2,9		3,9	
Alquilo C14-15 7-etoxilato			4,2		1,9	
Alquil C12-14 -7-etoxilato			1,7		0,5	
Cloruro de Ca dihidratado					0,045	
Formiato de Ca	0,09	0,09		0,09		0,09
Un compuesto: bis((C ₂ H ₅ O)(C ₂ H ₄ O) _n)(CH ₃)-N ⁺ -C _x H _{2x} -N ⁺ -(CH ₃)-bis((C ₂ H ₅ O)(C ₂ H ₄ O) _n); n es de 20 a 30; x es de 3 a 8, opcionalmente sulfatado o sulfonado			1,2		0,66	
Copolímero de injerto al azar ¹		1,46	0,5		0,83	
Polietilenimina etoxilada ²	1,5	1,29		1,44		1,44
Ácido dietilentriamino pentaacético	0,34	0,64		0,34		0,34
Ácido dietilentriaminapentametilenfosfónico			0,3		0,3	
Ácido 1-hidroxietiliden-1,1-difosfónico					0,18	
Hidrato de la sal disódica del ácido dihidroxibenceno-3,5-disulfónico						0,19
Tinopal AMS-GX		0,06				0,29
Tinopal CBS-X	0,2	0,17		0,29		
Tinopal TAS-X B36					0,091	

Polímero limpiador de grasa alcoxilado anfifílico ³	1,28	1	0,4	1,93		1,93
CHEC			0,2			
Etanol	2	1,58	1,6	5,4	1,2	3,57
Propilenglicol	3,9	3,59	1,3	4,3		3,8
Dietilenglicol	1,05	1,54		1,15		1,15
Polietilenglicol	0,06	0,04		0,1		0,1
⁴ Amilasa (mg activo)	8,0	7,0	2,5	4,0	3,0	1,7
⁵ ADNasa (mg activo)	7,0	3,0	2,5	4,0	1,25	10,0
Monoetanolamina	3,05	2,41	0,4	1,26	0,31	1,13
NaOH	2,44	1,8		3,01	3,84	0,24
Sulfonato de cumeno sódico			1		0,95	
Formiato sódico		0,11		0,09	0,2	0,12
Tinte de tiofeno polietoxilado	0,0001	0,001	0,001	0,05	0,0001	0,0001
Agua, sustancias estéticas (colorantes, perfumes) y componentes minoritarios (enzimas que incluyen lipasa, proteasa, amilasa adicional, cada una a 0,2 % de proteína activa, disolventes, estructurantes)	Resto					

Ejemplos 19-23. Composiciones detergentes para lavado de ropa en dosis unitaria. Dichas formulaciones en dosis unitaria pueden comprender uno o varios compartimentos.

	19 (% en peso)	20 (% en peso)	21 (% en peso)	22 (% en peso)	23 (% en peso)
Ácido alquilbenceno sulfónico	14,5	14,5	14,5	14,5	14,5
Alquil C12-18 etoxi 3 sulfato	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
Alquilo C12-18 7-etoxilato	13,0	13,0	13,0	13,0	13,0
Ácido cítrico	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
Ácido graso	14,8	14,8	14,8	14,8	14,8
Amilasa (mg activos)	6	12	8	2	10
Polietilenimina etoxilada ²	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
Proteasa (Purafect Prime®, 40,6 mg de sustancia activa/g)	1,4	2,0	0,9	1,2	0
Celulosa (Celluclean, proteína activa)	0,1	0,2			0,1
⁵ ADNasa descrita en la presente descripción (proteína activa)	3,0	2,0	1,0	4,0	2,0
⁴ Amilasa (proteína activa)			0,1	0,2	0,1
Ácido hidroxietano difosfónico	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
Abrillantador	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
P-diol	15,8	13,8	13,8	13,8	13,8
Glicerol	6,1	6,1	6,1	6,1	6,1
MEA	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0
TIPA	-	-	2,0	-	-
TEA	-	2,0	-	-	-
Sulfonato de cumeno	-	-	-	-	2,0
ciclohexildimetanol	-	-	-	2,0	-
Agua	10	10	10	10	10
Estructurante	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14
Perfume	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9
Tampones (monoetanolamina)	Hasta pH 8,0				
Disolventes (1,2-propanodiol, etanol)	Hasta el 100 %				

5

Ejemplo 24. Composición en dosis unitaria multicompartimental

Se proporcionan a continuación formulaciones detergentes en dosis unitaria multicompartimental de la presente invención. En estos ejemplos, la dosis unitaria tiene tres compartimentos, pero se pueden preparar composiciones similares para dos, cuatro o cinco compartimentos. La película utilizada para encapsular los compartimentos es poli(alcohol vinílico).

10

Composición base 1	24 (% en peso)
Glicerol (mín 99)	5,3
1,2-propanodiol	10,0
Ácido cítrico	0,5
Monoetanolamina	10,0
Sosa cáustica	-
Dequest 2010	1,1
Sulfito potásico	0,2
ADNasa de la presente invención (mg activos)	8,0
Marlipal no iónico C24EO7	20,1
HLAS	24,6
Abrillantador óptico FWA49	0,2
Ácido graso C12-15	16,4
Lutensit Z96 polimérico	2,9
Polietilenimina etoxilada PEI600 E20	1,1
MgCl ₂	0,2
Disolventes (1,2-propanodiol, etanol)	Hasta el 100 %

Formulaciones multicompartimentales

Composición	1			2		
Compartimento	A	B	C	A	B	C
Volumen de cada compartimento	40 ml	5 ml	5 ml	40 ml	5 ml	5 ml
Material activo en % en peso						
Perfume	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6
Tintes	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
TiO ₂	0,1	-	-	-	0,1	-
Sulfito sódico	0,4	0,4	0,4	0,3	0,3	0,3
Acusol 305	1,2			2	-	-
Aceite de ricino hidrogenado	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14
Composición base 1	Añadir hasta 100 %	Añadir hasta 100 %	Añadir hasta 100 %	Añadir hasta 100 %	Añadir hasta 100 %	Añadir hasta 100 %

Ejemplo 25. Composiciones suavizantes de tejidos de la presente invención

	Peso, %			
	Ej. 25	Ej. 26	Ej. 27	Ej. 28
NaHEDP	0,007	0,007	0,007	0,007
Ácido fórmico	0,044	0,044	0,044	-
HCl	-	0,009	0,009	0,009
Conservante ^a	0,022	0,01	0,01	0,01
FSA ^b	7,6	7,6	7,6	7,6
Antiespumante ^c	0,1	0,1	0,1	0,1
aceite de coco	0,3	0,3	0,3	0,3
isopropanol	0,78	0,78	0,77	0,77
Perfume encapsulado ^d	0,15	0,15	0,15	0,15
tinte	0,015	0,015	0,015	0,015
Espesante polimérico catiónico ^e	0,15	0,20	0,28	0,35
^b ADNasa como se define en la presente memoria (proteína activa)	6,0	2,0	1,0	0,5
Mezcla 50:50 de cloruro de alquildimetilbencilamonio y cloruro de alquildimetiletetilbencilamonio ^f	-	-	0,4	-
Ácido succínico	-	-	-	5

Perfume	1,0	1,0	1,0	1,0
Agua desionizada	Resto	Resto	Resto	Resto

Materias primas y notas para los Ejemplos de las composiciones 1-24

Alquilbencenosulfonato lineal que tiene una longitud promedio de cadena de carbono alifático de C11-C18

Cloruro de dimetilhidroxiethylamonio C12-18

AE3S es alquil C12-15 etoxi (3) sulfato

AE7 es alcohol etoxilado C12-15, con un grado promedio de etoxilación de 7

AE9 es alcohol etoxilado C12-16, con un grado promedio de etoxilación de 9

HSAS es un alquilsulfato primario de ramificación intermedia con una longitud de cadena de carbono de aproximadamente 16-17 según se describe en US-6.020.303 y US-6.060.443

El poliacrilato PM 4500 es comercializado por BASF

La carboximetilcelulosa es Finfix® V, comercializada por CPKelco, Arnhem, Países Bajos

CHEC es un polímero de hidroxietilcelulosa modificado catiónicamente.

Los quelantes de fosfonato son, por ejemplo, ácido dietilentetraaminapentaacético (DTPA) hidroxietano difosfonato (HEDP)

Savinase®, Natalase®, Stainzyme®, Lipex®, Celluclean™, Mannaway® y Whitezyme® son todos productos de Novozymes, Bagsvaerd, Dinamarca.

Purafect®, Purafect Prime® son productos de Genencor International, Palo Alto, California, EE. UU.

El abrillantador fluorescente 1 es Tinopal® AMS, el abrillantador fluorescente 2 es Tinopal® CBS-X, el Direct Violet 9 es Pergasol® Violet BN-Z, NOBS es nonanoiloxibencenosulfonato sódico

TAED es tetraacetiletilendiamina

La S-ACMC es carboximetilcelulosa conjugada con C.I. Reactive Blue 19, nombre de producto AZO-CM-CELLULOSE

El agente para liberar la suciedad es Repel-o-tex® PF

El copolímero ácido acrílico/ácido maleico tiene un peso molecular de 70.000 y una relación acrilato:maleato de 70:30

EDDS es una sal sódica del ácido etilendiamina-N,N'-disucínico, isómero (S,S), el supresor de las jabonaduras aglomerado está comercializado por Dow Corning, Midland, Michigan, EE. UU.

HSAS es alquilsulfato de ramificación intermedia

El tinte matizador polimérico Liquitint® Violet CT se comercializa por Milliken, Spartanburg, Carolina del Sur, EE. UU.

El tinte de azotiofeno polietoxilado es tinte matizador polimérico Violet DD™, suministrado por Milliken, Spartanburg, Carolina del Sur, EE. UU.

¹El copolímero de injerto aleatorio es un copolímero de poli(óxido de etileno) injertado con acetato de polivinilo que tiene una cadena principal de poli(óxido de etileno) y múltiples cadenas laterales de acetato de polivinilo. El peso molecular de la cadena principal del poli(óxido de etileno) es de aproximadamente 6000 y la relación de peso del poli(óxido de etileno) a acetato de polivinilo es de aproximadamente 40 a 60 y no hay más de 1 punto de injerto por 50 unidades de óxido de etileno.

² Polietilenimina (PM = 600) con 20 grupos etoxilados por -NH.

³El polímero anfifílico alcóxilado es una polietileneimina (PM 600), preparada a partir de un polímero que se ha derivatizado para contener 24 grupos etoxilados por -NH y 16 grupos propoxilato por -NH.

⁴La amilasa de la presente invención se muestra como mg de sustancia activa enzimática por 100 g de detergente.

⁵La ADNasa en todos estos ejemplos se muestra como mg de enzima activa por 100 g de detergente.

5 ^aProxel GXL, solución acuosa de dipropilenglicol al 20 % de 1,2-benzisotiazolin-3-ona, suministrada por Lonza.

10 ^bÉster del ácido graso de cloruro de N,N-bis (hidroxietil)-N,N-dimetilamonio. El índice de yodo del ácido graso precursor de este material está entre 18 y 22. El material obtenido de Evonik contiene impurezas en forma de ácido graso libre, en forma de monoéster del éster de ácido graso de cloruro de N,N-bis(hidroxietil)-N,N-dimetilamonio y ésteres de ácidos grasos de N,N-bis(hidroxietil)-N-metilamina.

^cMP10®, suministrado por Dow Corning, actividad 8 %

15 ^d como se describe en el documento US-8.765.659, expresado como aceite perfumado encapsulado al 100 %

^e Rheovis® CDE, espesante polimérico catiónico suministrado por BASF

20 ^f N,N-dimetil octanamida y N,N-dimetil decamida en aproximadamente una relación de peso 55:45, nombre comercial Stepos® M-8-10 de la empresa Stepan Company

25 No debe entenderse que las dimensiones y los valores descritos en el presente documento estén estrictamente limitados a los valores numéricos exactos mencionados. En vez de eso, a menos que se especifique lo contrario, se pretende que cada una de tales dimensiones signifique tanto el valor mencionado como un intervalo funcionalmente equivalente en torno a ese valor. Por ejemplo, una dimensión descrita como “40 mm” se refiere a “aproximadamente 40 mm”.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> The Procter & Gamble Company

<120> COMPOSICIONES DETERGENTES QUE COMPRENDEN VARIANTES POLIPEPTÍDICAS

<130> CM4919FM

<160> 28

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 182

<212> PRT

<213> Bacillus cibi

<400> 1

Thr	Pro	Pro	Gly	Thr	Pro	Ser	Lys	Ser	Ala	Ala	Gln	Ser	Gln	Leu	Asn
1				5					10					15	

Ala	Leu	Thr	Val	Lys	Thr	Glu	Gly	Ser	Met	Ser	Gly	Tyr	Ser	Arg	Asp
			20					25					30		

Leu	Phe	Pro	His	Trp	Ile	Ser	Gln	Gly	Ser	Gly	Cys	Asp	Thr	Arg	Gln
		35					40					45			

Val	Val	Leu	Lys	Arg	Asp	Ala	Asp	Ser	Tyr	Ser	Gly	Asn	Cys	Pro	Val
	50					55					60				

Thr	Ser	Gly	Ser	Trp	Tyr	Ser	Tyr	Tyr	Asp	Gly	Val	Thr	Phe	Thr	Asn
65					70					75					80

Pro	Ser	Asp	Leu	Asp	Ile	Asp	His	Ile	Val	Pro	Leu	Ala	Glu	Ala	Trp
			85						90					95	

Arg	Ser	Gly	Ala	Ser	Ser	Trp	Thr	Thr	Ser	Lys	Arg	Gln	Asp	Phe	Ala
		100						105					110		

Asn	Asp	Leu	Ser	Gly	Pro	Gln	Leu	Ile	Ala	Val	Ser	Ala	Ser	Thr	Asn
	115						120					125			

Arg	Ser	Lys	Gly	Asp	Gln	Asp	Pro	Ser	Thr	Trp	Gln	Pro	Pro	Arg	Ser
	130					135					140				

Gly	Ala	Ala	Cys	Gly	Tyr	Ser	Lys	Trp	Trp	Ile	Ser	Thr	Lys	Tyr	Lys
145					150					155					160

Trp	Gly	Leu	Ser	Leu	Gln	Ser	Ser	Glu	Lys	Thr	Ala	Leu	Gln	Gly	Met
				165					170					175	

Leu Asn Ser Cys Ser Tyr
180

<210> 2
<211> 182
<212> PRT
<213> Bacillus horikoshii

<400> 2

Leu Pro Pro Gly Thr Pro Thr Lys Ser Glu Ala Gln Asn Gln Leu Asn
1 5 10 15

Ser Leu Thr Val Lys Ser Glu Gly Ser Met Thr Gly Tyr Ser Arg Asp
20 25 30

Leu Phe Pro His Trp Ser Gly Gln Gly Asn Gly Cys Asp Thr Arg Gln
35 40 45

Ile Val Leu Gln Arg Asp Ala Asp Tyr Tyr Thr Gly Thr Cys Pro Thr
50 55 60

Thr Ser Gly Lys Trp Tyr Ser Tyr Phe Asp Gly Val Ile Val Tyr Ser
65 70 75 80

Pro Ser Glu Ile Asp Ile Asp His Ile Val Pro Leu Ala Glu Ala Trp
85 90 95

Arg Ser Gly Ala Ser Ser Trp Thr Thr Glu Gln Arg Arg Ala Phe Ala
100 105 110

Asn Asp Leu Asn Gly Pro Gln Leu Ile Ala Val Thr Ala Ser Val Asn
115 120 125

Arg Ser Lys Gly Asp Gln Asp Pro Ser Thr Trp Gln Pro Pro Arg Ala
130 135 140

Gly Ala Arg Cys Ala Tyr Ala Lys Trp Trp Ile Asn Thr Lys His Arg
145 150 155 160

Trp Asn Leu His Leu Gln Ser Ser Glu Lys Ser Ser Leu Gln Thr Met
165 170 175

Leu Asn Gly Cys Ala Tyr
180

<210> 3
<211> 182
<212> PRT
<213> Bacillus sp-62520

ES 2 908 667 T3

<400> 3

Leu Pro Pro Gly Thr Pro Ser Lys Ser Glu Ala Gln Ser Gln Leu Asn
1 5 10 15

Ala Leu Thr Val Lys Pro Glu Asp Pro Met Thr Gly Tyr Ser Arg Asp
20 25 30

His Phe Pro His Trp Ile Ser Gln Gly Asn Gly Cys Asn Thr Arg Gln
35 40 45

Ile Val Leu Gln Arg Asp Ala Asp Tyr Tyr Ser Gly Ala Cys Pro Val
50 55 60

Thr Thr Gly Lys Trp Tyr Ser Tyr Phe Asp Gly Val Ile Val Tyr Ser
65 70 75 80

Pro Ser Glu Ile Asp Ile Asp His Ile Val Pro Leu Ala Glu Ala Trp
85 90 95

Arg Ser Gly Ala Ser Ser Trp Thr Thr Glu Lys Arg Arg Ser Phe Ala
100 105 110

Asn Asp Leu Asn Gly Pro Gln Leu Ile Ala Val Thr Ala Ser Val Asn
115 120 125

Arg Ser Lys Gly Asp Gln Asp Pro Ser Thr Trp Gln Pro Pro Arg Ala
130 135 140

Gly Ala Arg Cys Ala Tyr Ala Lys Trp Trp Ile Asn Thr Lys His Arg
145 150 155 160

Trp Gly Leu His Leu Gln Ser Ser Glu Lys Ser Ser Leu Gln Ser Met
165 170 175

Leu Asn Gly Cys Ala Tyr
180

<210> 4

<211> 182

<212> PRT

<213> Bacillus horikoshii

<400> 4

Leu Pro Pro Gly Thr Pro Ser Lys Ser Glu Ala Gln Ser Gln Leu Asn
1 5 10 15

Ser Leu Thr Val Lys Ser Glu Asp Pro Met Thr Gly Tyr Ser Arg Asp

ES 2 908 667 T3

20										25					30															
His	Phe	Pro	His	Trp	Ser	Gly	Gln	Gly	Asn	Gly	Cys	Asp	Thr	Arg	Gln															
		35					40					45																		
Ile	Val	Leu	Gln	Arg	Asp	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Ser	Gly	Asn	Cys	Pro	Val															
	50					55					60																			
Thr	Ser	Gly	Lys	Trp	Tyr	Ser	Tyr	Phe	Asp	Gly	Val	Ile	Val	Tyr	Ser															
65					70					75					80															
Pro	Ser	Glu	Ile	Asp	Ile	Asp	His	Val	Val	Pro	Leu	Ala	Glu	Ala	Trp															
				85					90					95																
Arg	Ser	Gly	Ala	Ser	Ser	Trp	Thr	Thr	Glu	Gln	Arg	Arg	Ser	Phe	Ala															
			100					105					110																	
Asn	Asp	Leu	Asn	Gly	Pro	Gln	Leu	Ile	Ala	Val	Thr	Ala	Ser	Val	Asn															
		115					120					125																		
Arg	Ser	Lys	Gly	Asp	Gln	Asp	Pro	Ser	Thr	Trp	Gln	Pro	Pro	Arg	Ala															
	130					135					140																			
Gly	Ala	Arg	Cys	Ala	Tyr	Ala	Lys	Trp	Trp	Ile	Asn	Thr	Lys	His	Arg															
145					150					155					160															
Trp	Asn	Leu	His	Leu	Gln	Ser	Ser	Glu	Lys	Ser	Ala	Leu	Gln	Thr	Met															
				165					170					175																
Leu	Asn	Gly	Cys	Val	Tyr																									
			180																											

<210> 5
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> Bacillus horikoshii

<400> 5

Leu	Pro	Pro	Gly	Thr	Pro	Ser	Lys	Ser	Glu	Ala	Gln	Ser	Gln	Leu	Asn															
1				5					10					15																
Ser	Leu	Thr	Val	Lys	Thr	Glu	Asp	Pro	Met	Thr	Gly	Tyr	Ser	Arg	Asp															
			20				25						30																	
Leu	Phe	Pro	His	Trp	Ser	Gly	Gln	Gly	Ser	Gly	Cys	Asp	Thr	Arg	Gln															
		35				40						45																		
Ile	Val	Leu	Gln	Arg	Asp	Ala	Asp	Tyr	Phe	Thr	Gly	Thr	Cys	Pro	Thr															

50 55 60
 Thr Ser Gly Lys Trp Tyr Ser Tyr Phe Asp Gly Val Ile Val Tyr Ser
 65 70 75 80
 Pro Ser Glu Ile Asp Val Asp His Ile Val Pro Leu Ala Glu Ala Trp
 85 90 95
 Arg Ser Gly Ala Ser Ser Trp Thr Thr Glu Gln Arg Arg Ala Phe Ala
 100 105 110
 Asn Asp Leu Thr Gly Pro Gln Leu Ile Ala Val Thr Ala Ser Val Asn
 115 120 125
 Arg Ser Lys Gly Asp Gln Asp Pro Ser Thr Trp Gln Pro Pro Arg Ala
 130 135 140
 Gly Ala Arg Cys Ala Tyr Ala Lys Trp Trp Ile Asn Thr Lys His Arg
 145 150 155 160
 Trp Asn Leu His Leu Gln Ser Ser Glu Lys Ser Ser Leu Gln Thr Met
 165 170 175
 Leu Asn Gly Cys Ala Tyr
 180
 <210> 6
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> Bacillus sp-16840
 <400> 6
 Leu Pro Pro Gly Thr Pro Ser Lys Ser Glu Ala Gln Ser Gln Leu Asn
 1 5 10 15
 Ala Leu Thr Val Lys Ala Glu Asp Pro Met Thr Gly Tyr Ser Arg Asn
 20 25 30
 Leu Phe Pro His Trp Asn Ser Gln Gly Asn Gly Cys Asn Thr Arg Gln
 35 40 45
 Leu Val Leu Gln Arg Asp Ala Asp Tyr Tyr Ser Gly Asn Cys Pro Val
 50 55 60
 Thr Ser Gly Arg Trp Tyr Ser Tyr Phe Asp Gly Val Val Val Thr Ser
 65 70 75 80
 Pro Ser Glu Ile Asp Ile Asp His Ile Val Pro Leu Ala Glu Ala Trp

				85					90					95		
Arg	Ser	Gly	Ala	Ser	Ser	Trp	Thr	Thr	Glu	Lys	Arg	Lys	Glu	Phe	Ala	
			100					105					110			
Asn	Asp	Leu	Asn	Gly	Pro	Gln	Leu	Ile	Ala	Val	Thr	Ala	Ser	Val	Asn	
		115					120					125				
Arg	Ser	Lys	Gly	Asp	Gln	Asp	Pro	Ser	Thr	Trp	Gln	Pro	Pro	Arg	Ala	
	130					135					140					
Ala	Ala	Arg	Cys	Gly	Tyr	Ala	Lys	Trp	Trp	Ile	Asn	Thr	Lys	Tyr	Arg	
145					150					155					160	
Trp	Asp	Leu	Ser	Leu	Gln	Ser	Ser	Glu	Lys	Ser	Ser	Leu	Gln	Thr	Met	
				165					170					175		
Leu	Asn	Thr	Cys	Ser	Tyr											
			180													
<210>	7															
<211>	182															
<212>	PRT															
<213>	Bacillus	sp-16840														
<400>	7															
Leu	Pro	Pro	Gly	Thr	Pro	Ser	Lys	Ser	Gln	Ala	Gln	Ser	Gln	Leu	Asn	
1				5					10					15		
Ala	Leu	Thr	Val	Lys	Ala	Glu	Asp	Pro	Met	Thr	Gly	Tyr	Ser	Arg	Asn	
			20				25						30			
Leu	Phe	Pro	His	Trp	Ser	Ser	Gln	Gly	Asn	Gly	Cys	Asn	Thr	Arg	Gln	
		35					40					45				
Leu	Val	Leu	Gln	Arg	Asp	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Ser	Gly	Asn	Cys	Pro	Val	
	50					55					60					
Thr	Ser	Gly	Arg	Trp	Tyr	Ser	Tyr	Phe	Asp	Gly	Val	Val	Val	Thr	Ser	
65					70					75					80	
Pro	Ser	Glu	Ile	Asp	Ile	Asp	His	Ile	Val	Pro	Leu	Ala	Glu	Ala	Trp	
				85					90					95		
Arg	Ser	Gly	Ala	Ser	Ser	Trp	Thr	Thr	Glu	Lys	Arg	Arg	Glu	Phe	Ala	
			100					105					110			
Asn	Asp	Leu	Asn	Gly	Pro	Gln	Leu	Ile	Ala	Val	Thr	Ala	Ser	Val	Asn	

115	120	125
Arg Ser Lys Gly Asp Gln Asp Pro Ser Thr Trp Gln Pro Pro Arg Val		
130	135	140
Ala Ala Arg Cys Gly Tyr Ala Lys Trp Trp Ile Asn Thr Lys Tyr Arg		
145	150	155
Trp Asp Leu Ser Leu Gln Ser Ser Glu Lys Ser Ser Leu Gln Thr Met		
	165	170
Leu Asn Thr Cys Ser Tyr		
	180	
<210> 8		
<211> 182		
<212> PRT		
<213> Bacillus sp-62668		
<400> 8		
Leu Pro Pro Gly Thr Pro Ser Lys Ser Glu Ala Gln Ser Gln Leu Thr		
1	5	10
Ser Leu Thr Val Lys Pro Glu Asp Pro Met Thr Gly Tyr Ser Arg Asp		
	20	25
His Phe Pro His Trp Ile Ser Gln Gly Asn Gly Cys Asn Thr Arg Gln		
	35	40
Ile Val Leu Gln Arg Asp Ala Asp Tyr Tyr Ser Gly Asn Cys Pro Val		
	50	55
Thr Thr Gly Lys Trp Tyr Ser Tyr Phe Asp Gly Val Ile Val Tyr Ser		
65	70	75
Pro Ser Glu Ile Asp Ile Asp His Ile Val Pro Leu Ala Glu Ala Trp		
	85	90
Arg Ser Gly Ala Ser Ser Trp Thr Ala Glu Gln Arg Arg Asn Phe Ala		
	100	105
Asn Asp Leu Asn Gly Pro Gln Leu Ile Ala Val Thr Ala Ser Val Asn		
	115	120
Arg Ser Lys Gly Asp Gln Asp Pro Ser Thr Trp Gln Pro Pro Arg Thr		
	130	135
Gly Ala Arg Cys Ala Tyr Ala Lys Trp Trp Ile Asn Thr Lys Tyr Arg		
		140

ES 2 908 667 T3

145		150		155		160
Trp Gly Leu His	Leu Gln Ser Ser Glu Lys Ser Ser Leu Gln Ser Met					
	165			170		175
Leu Asn Gly Cys Ala Tyr						
	180					
<210>	9					
<211>	185					
<212>	PRT					
<213>	Bacillus sp-13395					
<400>	9					
Ala Ser Ala Phe Pro Pro Gly Thr Pro Ser Lys Ser Thr Ala Gln Ser						
1	5			10		15
Gln Leu Asn Ser Leu Pro Val Lys Ser Glu Gly Ser Met Asn Gly Tyr						
	20			25		30
Ser Arg Asp Lys Phe Pro His Trp Ile Ser Gln Gly Asp Gly Cys Asp						
	35			40		45
Thr Arg Gln Leu Val Leu Lys Arg Asp Gly Asp Tyr Tyr Ser Gly Ser						
	50			55		60
Cys Pro Val Thr Ser Gly Lys Trp Tyr Ser Tyr Tyr Asp Gly Ile Thr						
65	70			75		80
Val Tyr Ser Pro Ser Glu Ile Asp Ile Asp His Ile Val Pro Leu Ala						
	85			90		95
Glu Ala Trp Arg Ser Gly Ala Ser Gly Trp Thr Thr Glu Lys Arg Gln						
	100			105		110
Ser Phe Ala Asn Asp Leu Asn Gly Pro Gln Leu Ile Ala Val Thr Ala						
	115			120		125
Ser Val Asn Arg Ser Lys Gly Asp Gln Asp Pro Ser Thr Trp Gln Pro						
	130			135		140
Pro Arg Ser Gly Ser His Cys Ala Tyr Ala Lys Met Trp Val Asn Thr						
145	150			155		160
Lys Tyr Arg Trp Gly Leu His Leu Gln Ser Ala Glu Lys Ser Ala Leu						
	165			170		175
Gln Ser Met Leu Asn Ala Cys Ser Tyr						

180

185

<210> 10
 <211> 185
 <212> PRT
 <213> Bacillus horneckiae

<400> 10

Ala Ser Ala Phe Pro Pro Gly Thr Pro Ser Lys Ser Thr Ala Gln Ser
 1 5 10 15

Gln Leu Asn Ser Leu Thr Val Lys Ser Glu Gly Ser Met Thr Gly Tyr
 20 25 30

Ser Arg Asp Lys Phe Pro His Trp Ile Ser Gln Gly Asp Gly Cys Asp
 35 40 45

Thr Arg Gln Leu Val Leu Lys Arg Asp Gly Asp Tyr Tyr Ser Gly Asn
 50 55 60

Cys Pro Val Thr Ser Gly Lys Trp Tyr Ser Tyr Tyr Asp Gly Ile Thr
 65 70 75 80

Val Tyr Ser Pro Ser Glu Ile Asp Ile Asp His Ile Val Pro Leu Ala
 85 90 95

Glu Ala Trp Arg Ser Gly Ala Ser Gly Trp Thr Thr Glu Lys Arg Gln
 100 105 110

Ser Phe Ala Asn Asp Leu Asn Gly Pro Gln Leu Ile Ala Val Thr Ala
 115 120 125

Ser Val Asn Arg Ser Lys Gly Asp Gln Asp Pro Ser Thr Trp Gln Pro
 130 135 140

Pro Arg Ser Gly Ser His Cys Ala Tyr Ala Lys Met Trp Val Asn Thr
 145 150 155 160

Lys Tyr Arg Trp Gly Leu His Val Gln Ser Ala Glu Lys Ser Ala Leu
 165 170 175

Gln Ser Met Leu Asn Ala Cys Ser Tyr
 180 185

<210> 11
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> Bacillus sp-11238

ES 2 908 667 T3

<400> 11

Phe Pro Pro Glu Ile Pro Ser Lys Ser Thr Ala Gln Ser Gln Leu Asn
1 5 10 15

Ser Leu Thr Val Lys Ser Glu Asp Ala Met Thr Gly Tyr Ser Arg Asp
20 25 30

Lys Phe Pro His Trp Ile Ser Gln Gly Asp Gly Cys Asp Thr Arg Gln
35 40 45

Met Val Leu Lys Arg Asp Ala Asp Tyr Tyr Ser Gly Ser Cys Pro Val
50 55 60

Thr Ser Gly Lys Trp Tyr Ser Tyr Tyr Asp Gly Ile Thr Val Tyr Ser
65 70 75 80

Pro Ser Glu Ile Asp Ile Asp His Ile Val Pro Leu Ala Glu Ala Trp
85 90 95

Arg Ser Gly Ala Ser Ser Trp Thr Thr Glu Lys Arg Arg Asn Phe Ala
100 105 110

Asn Asp Leu Asn Gly Pro Gln Leu Ile Ala Val Thr Ala Ser Val Asn
115 120 125

Arg Ser Lys Gly Asp Gln Asp Pro Ser Thr Trp Gln Pro Pro Arg Ser
130 135 140

Gly Ala Arg Cys Ala Tyr Ala Lys Met Trp Val Asn Thr Lys Tyr Arg
145 150 155 160

Trp Gly Leu His Leu Gln Ser Ala Glu Lys Ser Gly Leu Glu Ser Met
165 170 175

Leu Asn Thr Cys Ser Tyr
180

<210> 12

<211> 182

<212> PRT

<213> Bacillus SP-62451

<400> 12

Leu Pro Pro Asp Leu Pro Ser Lys Ser Thr Thr Gln Ala Gln Leu Asn
1 5 10 15

Ser Leu Asn Val Lys Asn Glu Glu Ser Met Ser Gly Tyr Ser Arg Glu
20 25 30

ES 2 908 667 T3

Lys Phe Pro His Trp Ile Ser Gln Gly Asp Gly Cys Asp Thr Arg Gln
35 40 45

Val Ile Leu Lys Arg Asp Ala Asp Asn Tyr Ser Gly Asn Cys Pro Val
50 55 60

Thr Ser Gly Lys Trp Tyr Ser Tyr Tyr Asp Gly Ile Thr Phe Asn Asp
65 70 75 80

Pro Ser Gln Leu Asp Ile Asp His Val Val Pro Leu Ala Glu Ala Trp
85 90 95

Arg Ser Gly Ala Ser Ser Trp Ser Thr Ala Lys Arg Glu Asp Phe Ala
100 105 110

Asn Asp Leu Asn Gly Pro Gln Leu Ile Ala Val Ser Ala Ser Ser Asn
115 120 125

Arg Ser Lys Gly Asp Gln Asp Pro Ser Thr Trp Gln Pro Pro Arg Ala
130 135 140

Gly Ala Asn Cys Ala Tyr Ala Lys Met Trp Ile Asn Thr Lys Tyr Asn
145 150 155 160

Trp Gly Leu His Leu Gln Ser Ser Glu Lys Thr Ala Leu Gln Gly Met
165 170 175

Leu Asn Ser Cys Ser Tyr
180

<210> 13
<211> 182
<212> PRT
<213> Bacillus sp-18318

<400> 13

Phe Pro Pro Gly Thr Pro Ser Lys Ser Thr Ala Gln Ser Gln Leu Asn
1 5 10 15

Ser Leu Thr Val Lys Ser Glu Gly Ser Met Thr Gly Tyr Ser Arg Asp
20 25 30

Lys Phe Pro His Trp Ile Gly Gln Gly Ser Gly Cys Asp Thr Arg Gln
35 40 45

Leu Val Leu Gln Arg Asp Ala Asp Tyr Tyr Ser Gly Ser Cys Pro Val
50 55 60

Thr Ser Gly Lys Trp Tyr Ser Tyr Tyr Asp Gly Val Thr Phe Tyr Asp
65 70 75 80

Pro Ser Asp Leu Asp Ile Asp His Val Val Pro Leu Ala Glu Ala Trp
85 90 95

Arg Ser Gly Ala Ser Ser Trp Ser Thr Gln Lys Arg Lys Asp Phe Ala
100 105 110

Asn Asp Leu Ser Gly Pro Gln Leu Ile Ala Val Ser Ala Ser Ser Asn
115 120 125

Arg Ser Lys Gly Asp Gln Asp Pro Ser Thr Trp Gln Pro Thr Arg Ser
130 135 140

Gly Ala Ala Cys Gly Tyr Ser Lys Trp Trp Ile Ser Thr Lys His Lys
145 150 155 160

Trp Gly Leu Ser Leu Gln Ser Ser Glu Lys Asn Ala Leu Gln Gly Met
165 170 175

Leu Asn Ser Cys Val Tyr
180

<210> 14
<211> 182
<212> PRT
<213> Bacillus idriensis

<400> 14

Leu Pro Pro Gly Thr Pro Ser Lys Ser Thr Ala Gln Ser Gln Leu Asn
1 5 10 15

Ala Leu Thr Val Gln Thr Glu Gly Ser Met Thr Gly Tyr Ser Arg Asp
20 25 30

Lys Phe Pro His Trp Ile Ser Gln Gly Asn Gly Cys Asp Thr Arg Gln
35 40 45

Val Val Leu Gln Arg Asp Ala Asp Tyr Tyr Ser Gly Thr Cys Pro Val
50 55 60

Thr Ser Gly Lys Trp Tyr Ser Tyr Tyr Asp Gly Val Thr Leu Tyr Asn
65 70 75 80

Pro Ser Asp Leu Asp Ile Asp His Val Val Ala Leu Ala Glu Ala Trp
85 90 95

ES 2 908 667 T3

Arg Ser Gly Ala Ser Ser Trp Thr Thr Asp Lys Arg Glu Asp Phe Ala
100 105 110

Asn Asp Leu Ser Gly Thr Gln Leu Ile Ala Val Ser Ala Ser Thr Asn
115 120 125

Arg Ser Lys Gly Asp Gln Asp Pro Ser Thr Trp Gln Pro Pro Arg Ser
130 135 140

Gly Ala Ala Cys Gly Tyr Ala Lys Trp Trp Ile Ser Thr Lys Tyr Lys
145 150 155 160

Trp Asn Leu Asn Leu Gln Ser Ser Glu Lys Thr Ala Leu Gln Ser Met
165 170 175

Leu Asn Ser Cys Ser Tyr
180

<210> 15
<211> 182
<212> PRT
<213> Bacillus alginicola

<400> 15

Phe Pro Pro Gly Thr Pro Ser Lys Ser Glu Ala Gln Ser Gln Leu Asn
1 5 10 15

Ser Leu Thr Val Gln Ser Glu Gly Ser Met Ser Gly Tyr Ser Arg Asp
20 25 30

Lys Phe Pro His Trp Ile Gly Gln Gly Asn Gly Cys Asp Thr Arg Gln
35 40 45

Leu Val Leu Gln Arg Asp Ala Asp Tyr Tyr Ser Gly Asp Cys Pro Val
50 55 60

Thr Ser Gly Lys Trp Tyr Ser Tyr Phe Asp Gly Val Thr Val Tyr Asp
65 70 75 80

Pro Ser Asp Leu Asp Ile Asp His Met Val Pro Met Ala Glu Ala Trp
85 90 95

Arg Ser Gly Ala Ser Ser Trp Ser Thr Gln Lys Arg Glu Asp Phe Ala
100 105 110

Asn Asp Leu Ser Gly Pro His Leu Ile Ala Val Thr Ala Ser Ser Asn
115 120 125

Arg Ser Lys Gly Asp Gln Asp Pro Ser Thr Trp Lys Pro Thr Arg Tyr
130 135 140

Gly Ala His Cys Gly Tyr Ala Lys Trp Trp Ile Asn Thr Lys Tyr Val
145 150 155 160

Tyr Asp Leu Thr Leu Gln Ser Ser Glu Lys Thr Glu Leu Gln Ser Met
165 170 175

Leu Asn Thr Cys Ser Tyr
180

<210> 16
<211> 182
<212> PRT
<213> Muestra ambiental J

<400> 16

Leu Pro Pro Asn Ile Pro Ser Lys Ala Asp Ala Leu Thr Lys Leu Asn
1 5 10 15

Ala Leu Thr Val Gln Thr Glu Gly Pro Met Thr Gly Tyr Ser Arg Asp
20 25 30

Leu Phe Pro His Trp Ser Ser Gln Gly Asn Gly Cys Asn Thr Arg His
35 40 45

Val Val Leu Lys Arg Asp Ala Asp Ser Val Val Asp Thr Cys Pro Val
50 55 60

Thr Thr Gly Arg Trp Tyr Ser Tyr Tyr Asp Gly Leu Val Phe Thr Ser
65 70 75 80

Ala Ser Asp Ile Asp Ile Asp His Val Val Pro Leu Ala Glu Ala Trp
85 90 95

Arg Ser Gly Ala Ser Ser Trp Thr Ser Thr Lys Arg Gln Ser Phe Ala
100 105 110

Asn Asp Leu Asn Gly Pro Gln Leu Ile Ala Val Ser Ala Thr Ser Asn
115 120 125

Arg Ser Lys Gly Asp Gln Asp Pro Ser Thr Trp Gln Pro Pro Arg Ala
130 135 140

Gly Ala Arg Cys Ala Tyr Ala Lys Met Trp Val Glu Thr Lys Ser Arg
145 150 155 160

Trp Gly Leu Thr Leu Gln Ser Ser Glu Lys Ala Ala Leu Gln Thr Ala
165 170 175

Ile Asn Ala Cys Ser Tyr
180

<210> 17
<211> 182
<212> PRT
<213> Bacillus vietnamensis

<400> 17

Phe Pro Pro Gly Thr Pro Ser Lys Ser Thr Ala Gln Ser Gln Leu Asn
1 5 10 15

Ala Leu Thr Val Lys Ser Glu Ser Ser Met Thr Gly Tyr Ser Arg Asp
20 25 30

Lys Phe Pro His Trp Ile Gly Gln Arg Asn Gly Cys Asp Thr Arg Gln
35 40 45

Leu Val Leu Gln Arg Asp Ala Asp Ser Tyr Ser Gly Ser Cys Pro Val
50 55 60

Thr Ser Gly Ser Trp Tyr Ser Tyr Tyr Asp Gly Val Thr Phe Thr Asp
65 70 75 80

Pro Ser Asp Leu Asp Ile Asp His Val Val Pro Leu Ala Glu Ala Trp
85 90 95

Arg Ser Gly Ala Ser Ser Trp Thr Thr Ala Lys Arg Glu Asp Phe Ala
100 105 110

Asn Asp Leu Ser Gly Pro Gln Leu Ile Ala Val Ser Ala Ser Ser Asn
115 120 125

Arg Ser Lys Gly Asp Gln Asp Pro Ser Thr Trp Gln Pro Pro Arg Ser
130 135 140

Gly Ala Ala Cys Gly Tyr Ser Lys Trp Trp Ile Ser Thr Lys Tyr Lys
145 150 155 160

Trp Gly Leu Ser Leu Gln Ser Ser Glu Lys Thr Ala Leu Gln Gly Met
165 170 175

Leu Asn Ser Cys Ile Tyr
180

<210> 18
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> *Bacillus hwajinpoensis*

<400> 18

Ile Pro Pro Gly Thr Pro Ser Lys Ser Ala Ala Gln Ser Gln Leu Asp
 1 5 10 15

Ser Leu Ala Val Gln Ser Glu Gly Ser Met Ser Gly Tyr Ser Arg Asp
 20 25 30

Lys Phe Pro His Trp Ile Gly Gln Gly Asn Gly Cys Asp Thr Arg Gln
 35 40 45

Leu Val Leu Gln Arg Asp Ala Asp Tyr Tyr Ser Gly Asp Cys Pro Val
 50 55 60

Thr Ser Gly Lys Trp Tyr Ser Tyr Phe Asp Gly Val Gln Val Tyr Asp
 65 70 75 80

Pro Ser Tyr Leu Asp Ile Asp His Met Val Pro Leu Ala Glu Ala Trp
 85 90 95

Arg Ser Gly Ala Ser Ser Trp Ser Thr Gln Lys Arg Glu Asp Phe Ala
 100 105 110

Asn Asp Leu Asp Gly Pro His Leu Ile Ala Val Thr Ala Ser Ser Asn
 115 120 125

Arg Ser Lys Gly Asp Gln Asp Pro Ser Thr Trp Lys Pro Thr Arg Tyr
 130 135 140

Ser Ala His Cys Gly Tyr Ala Lys Trp Trp Ile Asn Thr Lys Tyr Val
 145 150 155 160

Tyr Asp Leu Asn Leu Gln Ser Ser Glu Lys Ser Ala Leu Gln Ser Met
 165 170 175

Leu Asn Thr Cys Ser Tyr
 180

<210> 19
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> *Paenibacillus mucilaginosus*

<400> 19

ES 2 908 667 T3

Leu Pro Pro Gly Thr Pro Ser Lys Ser Thr Ala Gln Ser Gln Leu Asn
1 5 10 15

Ser Leu Thr Val Lys Ser Glu Ser Thr Met Thr Gly Tyr Ser Arg Asp
20 25 30

Lys Phe Pro His Trp Thr Ser Gln Gly Gly Gly Cys Asp Thr Arg Gln
35 40 45

Val Val Leu Lys Arg Asp Ala Asp Tyr Tyr Ser Gly Ser Cys Pro Val
50 55 60

Thr Ser Gly Lys Trp Tyr Ser Tyr Tyr Asp Gly Ile Thr Val Tyr Ser
65 70 75 80

Pro Ser Glu Ile Asp Ile Asp His Ile Val Pro Leu Ala Glu Ala Trp
85 90 95

Arg Ser Gly Ala Ser Ser Trp Thr Thr Glu Lys Arg Gln Asn Phe Ala
100 105 110

Asn Asp Leu Gly Gly Pro Gln Leu Ile Ala Val Thr Ala Ser Ser Asn
115 120 125

Arg Ala Lys Gly Asp Gln Asp Pro Ser Thr Trp Lys Pro Thr Arg Ser
130 135 140

Gly Ala His Cys Ala Tyr Ala Lys Trp Trp Ile Asn Thr Lys Tyr Arg
145 150 155 160

Trp Gly Leu His Leu Gln Ser Ser Glu Lys Thr Ala Leu Gln Ser Met
165 170 175

Leu Asn Thr Cys Ser Tyr
180

<210> 20
<211> 182
<212> PRT
<213> Bacillus indicus

<400> 20

Thr Pro Pro Gly Thr Pro Ser Lys Ser Thr Ala Gln Thr Gln Leu Asn
1 5 10 15

Ala Leu Thr Val Lys Thr Glu Gly Ser Met Thr Gly Tyr Ser Arg Asp
20 25 30

ES 2 908 667 T3

Leu Phe Pro His Trp Ile Ser Gln Gly Ser Gly Cys Asp Thr Arg Gln
35 40 45

Val Val Leu Lys Arg Asp Ala Asp Tyr Tyr Ser Gly Ser Cys Pro Val
50 55 60

Thr Ser Gly Lys Trp Tyr Ser Tyr Tyr Asp Gly Val Thr Phe Tyr Asp
65 70 75 80

Pro Ser Asp Leu Asp Ile Asp His Ile Val Pro Leu Ala Glu Ala Trp
85 90 95

Arg Ser Gly Ala Ser Ser Trp Thr Thr Ser Lys Arg Gln Asp Phe Ala
100 105 110

Asn Asp Leu Ser Gly Pro Gln Leu Ile Ala Val Ser Ala Ser Thr Asn
115 120 125

Arg Ser Lys Gly Asp Gln Asp Pro Ser Thr Trp Gln Pro Pro Arg Ala
130 135 140

Gly Ala Ala Cys Gly Tyr Ser Lys Trp Trp Ile Ser Thr Lys Tyr Lys
145 150 155 160

Trp Gly Leu Ser Leu Gln Ser Ser Glu Lys Thr Ala Leu Gln Gly Met
165 170 175

Leu Asn Ser Cys Ser Tyr
180

<210> 21
<211> 182
<212> PRT
<213> Bacillus marisflavi

<400> 21

Thr Pro Pro Val Thr Pro Ser Lys Ala Thr Ser Gln Ser Gln Leu Asn
1 5 10 15

Gly Leu Thr Val Lys Thr Glu Gly Ala Met Thr Gly Tyr Ser Arg Asp
20 25 30

Lys Phe Pro His Trp Ser Ser Gln Gly Gly Gly Cys Asp Thr Arg Gln
35 40 45

Val Val Leu Lys Arg Asp Ala Asp Ser Tyr Ser Gly Asn Cys Pro Val
50 55 60

Thr Ser Gly Ser Trp Tyr Ser Tyr Tyr Asp Gly Val Lys Phe Thr Asn
65 70 75 80

Pro Ser Asp Leu Asp Ile Asp His Ile Val Pro Leu Ala Glu Ala Trp
85 90 95

Arg Ser Gly Ala Ser Ser Trp Thr Thr Ala Gln Arg Glu Ala Phe Ala
100 105 110

Asn Asp Leu Ser Gly Ser Gln Leu Ile Ala Val Ser Ala Ser Ser Asn
115 120 125

Arg Ser Lys Gly Asp Gln Asp Pro Ser Thr Trp Gln Pro Pro Arg Ala
130 135 140

Gly Ala Lys Cys Gly Tyr Ala Lys Trp Trp Ile Ser Thr Lys Ser Lys
145 150 155 160

Trp Asn Leu Ser Leu Gln Ser Ser Glu Lys Thr Ala Leu Gln Gly Met
165 170 175

Leu Asn Ser Cys Val Tyr
180

<210> 22
<211> 184
<212> PRT
<213> Bacillus luciferensis

<400> 22

Ala Ser Leu Pro Pro Gly Ile Pro Ser Leu Ser Thr Ala Gln Ser Gln
1 5 10 15

Leu Asn Ser Leu Thr Val Lys Ser Glu Gly Ser Leu Thr Gly Tyr Ser
20 25 30

Arg Asp Val Phe Pro His Trp Ile Ser Gln Gly Ser Gly Cys Asp Thr
35 40 45

Arg Gln Val Val Leu Lys Arg Asp Ala Asp Tyr Tyr Ser Gly Asn Cys
50 55 60

Pro Val Thr Ser Gly Lys Trp Tyr Ser Tyr Tyr Asp Gly Val Thr Val
65 70 75 80

Tyr Ser Pro Ser Glu Ile Asp Ile Asp His Val Val Pro Leu Ala Glu
85 90 95

ES 2 908 667 T3

Ala Trp Arg Ser Gly Ala Ser Ser Trp Thr Thr Glu Lys Arg Gln Asn
100 105 110

Phe Ala Asn Asp Leu Asn Gly Pro Gln Leu Ile Ala Val Thr Ala Ser
115 120 125

Ser Asn Arg Ser Lys Gly Asp Gln Asp Pro Ser Thr Trp Gln Pro Thr
130 135 140

Arg Thr Gly Ala Arg Cys Ala Tyr Ala Lys Met Trp Ile Asn Thr Lys
145 150 155 160

Tyr Arg Trp Gly Leu His Leu Gln Ser Ser Glu Lys Ser Ala Leu Gln
165 170 175

Ser Met Leu Asn Thr Cys Ser Tyr
180

<210> 23
<211> 182
<212> PRT
<213> Bacillus marisflavi

<400> 23

Thr Pro Pro Val Thr Pro Ser Lys Glu Thr Ser Gln Ser Gln Leu Asn
1 5 10 15

Gly Leu Thr Val Lys Thr Glu Gly Ala Met Thr Gly Tyr Ser Arg Asp
20 25 30

Lys Phe Pro His Trp Ser Ser Gln Gly Gly Gly Cys Asp Thr Arg Gln
35 40 45

Val Val Leu Lys Arg Asp Ala Asp Ser Tyr Ser Gly Asn Cys Pro Val
50 55 60

Thr Ser Gly Ser Trp Tyr Ser Tyr Tyr Asp Gly Val Lys Phe Thr His
65 70 75 80

Pro Ser Asp Leu Asp Ile Asp His Ile Val Pro Leu Ala Glu Ala Trp
85 90 95

Arg Ser Gly Ala Ser Ser Trp Thr Thr Ala Gln Arg Glu Ala Phe Ala
100 105 110

Asn Asp Leu Ser Gly Ser Gln Leu Ile Ala Val Ser Ala Ser Ser Asn
115 120 125

ES 2 908 667 T3

Arg Ser Lys Gly Asp Gln Asp Pro Ser Thr Trp Gln Pro Pro Arg Ala
130 135 140

Gly Ala Lys Cys Gly Tyr Ala Lys Trp Trp Ile Ser Thr Lys Ser Lys
145 150 155 160

Trp Asn Leu Ser Leu Gln Ser Ser Glu Lys Thr Ala Leu Gln Gly Met
165 170 175

Leu Asn Ser Cys Val Tyr
180

<210> 24
<211> 182
<212> PRT
<213> Bacillus sp. SA2-6

<400> 24

Leu Pro Ser Gly Ile Pro Ser Lys Ser Thr Ala Gln Ser Gln Leu Asn
1 5 10 15

Ser Leu Thr Val Lys Ser Glu Gly Ser Met Thr Gly Tyr Ser Arg Asp
20 25 30

Lys Phe Pro His Trp Ile Ser Gln Gly Gly Gly Cys Asp Thr Arg Gln
35 40 45

Val Val Leu Lys Arg Asp Ala Asp Tyr Tyr Ser Gly Asn Cys Pro Val
50 55 60

Thr Ser Gly Lys Trp Tyr Ser Tyr Tyr Asp Gly Ile Ser Val Tyr Ser
65 70 75 80

Pro Ser Glu Ile Asp Ile Asp His Val Val Pro Leu Ala Glu Ala Trp
85 90 95

Arg Ser Gly Ala Ser Ser Trp Thr Thr Thr Lys Arg Gln Asn Phe Ala
100 105 110

Asn Asp Leu Asn Gly Pro Gln Leu Ile Ala Val Thr Ala Ser Val Asn
115 120 125

Arg Ser Lys Gly Asp Gln Asp Pro Ser Thr Trp Gln Pro Pro Arg Tyr
130 135 140

Gly Ala Arg Cys Ala Tyr Ala Lys Met Trp Ile Asn Thr Lys Tyr Arg
145 150 155 160

Trp Asp Leu Asn Leu Gln Ser Ser Glu Lys Ser Ser Leu Gln Ser Met
 165 170 175

Leu Asp Thr Cys Ser Tyr
 180

<210> 25
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Motivo

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa = Asp (D) o Met (M) o Leu (L)

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa = Ser (S) o Thr (T)

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa = Asp (D) o Asn (N)

<400> 25

Xaa Xaa Gly Tyr Ser Arg Xaa
 1 5

<210> 26
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Motivo

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa = cualquier aminoácido

<400> 26

Ala Ser Xaa Asn Arg Ser Lys Gly
 1 5

<210> 27
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

<223> Artificial

<400> 27

Ile Pro Pro Gly Thr Pro Ser Lys Ser Ala Ala Gln Ser Gln Leu Asn
 1 5 10 15

Ala Leu Thr Val Lys Pro Glu Gly Ser Met Ser Gly Tyr Ser Arg Asp
 20 25 30

Leu Phe Pro His Trp Ile Ser Gln Gly Ser Gly Cys Asp Thr Arg Gln
 35 40 45

Val Val Leu Lys Arg Asp Ala Asp Trp Tyr Ser Gly Asn Cys Pro Val
 50 55 60

Thr Ser Gly Ser Trp Tyr Ser Tyr Tyr Asp Gly Leu Thr Phe Thr Asn
 65 70 75 80

Pro Ser Asp Leu Asp Ile Asp His Ile Val Pro Leu Ala Glu Ala Trp
 85 90 95

Arg Ser Gly Ala Ser Ser Trp Thr Thr Ser Lys Arg Gln Asp Phe Ala
 100 105 110

Asn Asp Leu Ser Gly Pro Gln Leu Ile Ala Val Ser Ala Ser Thr Asn
 115 120 125

Arg Ser Lys Gly Asp Gln Asp Pro Ser Thr Trp Gln Pro Pro Arg Ser
 130 135 140

Gly Ala His Cys Gly Tyr Ser Lys Trp Trp Ile Ser Thr Lys Tyr Lys
 145 150 155 160

Trp Gly Leu Ser Leu Gln Leu Ser Glu Lys Thr Ala Leu Gln Asp Met
 165 170 175

Leu Asn Ser Cys Ser Tyr
 180

<210> 28

<211> 182

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Variante de la SEQ ID NO: 1

<400> 28

ES 2 908 667 T3

Ile	Pro	Pro	Gly	Thr	Pro	Ser	Lys	Ser	Ala	Ala	Gln	Tyr	Gln	Leu	Asn	1	5	10	15
Ala	Leu	Thr	Val	Lys	Pro	Glu	Gly	Ser	Met	Leu	Gly	Tyr	Ser	Arg	Asp	20	25	30	
Leu	Phe	Pro	His	Trp	Ile	Ser	Gln	Gly	Gly	Gly	Cys	Asp	Thr	Arg	Gln	35	40	45	
Val	Val	Leu	Lys	Arg	Asp	Ala	Asp	Trp	Tyr	Val	Gly	Asn	Cys	Pro	Val	50	55	60	
Thr	Ser	Gly	Ser	Trp	Tyr	Ser	Tyr	Tyr	Asp	Gly	Leu	Thr	Phe	Thr	Asn	65	70	75	80
Pro	Ser	Asp	Leu	Asp	Ile	Asp	His	Ile	Val	Pro	Leu	Ala	Glu	Ala	Trp	85	90	95	
Arg	Ser	Gly	Ala	Ser	Ser	Trp	Thr	Thr	Ser	Lys	Arg	Arg	Asp	Phe	Ala	100	105	110	
Asn	Asp	Leu	Asp	Gly	Pro	Gln	Leu	Ile	Ala	Val	Ser	Ala	Ser	Val	Asn	115	120	125	
Arg	Ser	Lys	Gly	Asp	Gln	Asp	Pro	Ser	Thr	Trp	Gln	Pro	Pro	Arg	Pro	130	135	140	
Gly	Ala	His	Cys	Gly	Tyr	Ser	Lys	Trp	Trp	Ile	Ser	Thr	Lys	Tyr	Lys	145	150	155	160
Trp	Gly	Leu	Ser	Leu	Gln	Leu	Ser	Glu	Lys	Thr	Ala	Leu	Gln	Asp	Met	165	170	175	
Leu	Asn	Ser	Cys	Ser	Tyr	180													

REIVINDICACIONES

1. Una composición detergente que comprende i) una variante de ADNasa que tiene actividad ADNasa, seleccionada del grupo que consiste en:
 - a) una variante de ADNasa que, en comparación con una ADNasa que tiene la Id. de sec. n.º: 1, comprende una sustitución seleccionada de L33R, L33V y L33Y en donde cada posición corresponde a la posición de la Id. de sec. n.º: 1 (numeración según la Id. de sec. n.º: 1) y en donde la variante tiene al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % pero menos de 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos mostrada en la Id. de sec. n.º: 1 y en donde la variante tiene una mejora en la estabilidad en comparación con el polipéptido de la Id. de sec. n.º 1, la Id. de sec. n.º: 27 o la Id. de sec. n.º: 28; y
 - ii) un adyuvante, preferiblemente en una cantidad de 0,01 a 99,9 % en peso.
2. Una composición detergente según la reivindicación 1, en donde la variante de ADNasa comprende una o más de las sustituciones correspondientes a sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en: G4K, S7G, K8R, S9I, N16G, S27K, S27R, D32F, D32I, D32L, D32R, D32V, S39C, G41P, S42H, D45E, Q48D, N61E, T65M, T65W, S66R, S66M, S66W, S66Y, S66V, F78L, P91L, S101N, S106L, S106R, S106H, Q109E, A112E, T127P, S130A, S130Y, T138D, Q140V, Q140G, A147H, C148A, W154Y, T157V, Y159A, Y159R, G162C, Q174N, L177Y, S179L y C180A (numeración según la Id. de sec. n.º: 1).
3. Una composición detergente según la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en donde la variante de ADNasa en comparación con una ADNasa que tiene la Id. de sec. n.º: 27, comprende una o más de las sustituciones correspondientes a sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en: G4K, S7G, K8R, S9I, N16G, S27K, S27R, D32F, D32I, D32L, D32R, D32V, S39C, G41P, S42H, D45E, Q48D, N61E, T65M, T65W, S66R, S66M, S66W, S66Y, S66V, F78L, P91L, S101N, S106L, S106R, S106H, Q109E, A112E, T127P, S130A, S130Y, T138D, Q140V, Q140G, A147P, C148A, W154Y, T157V, Y159A, Y159R, G162C, Q174N, L177Y, S179L y C180A y en donde cada posición corresponde a las posiciones de la Id. de sec. n.º: 27 (numeración según la Id. de sec. n.º: 27) y en donde la variante tiene al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % pero menos de 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos mostrada en la Id. de sec. n.º: 27.
4. Una composición detergente según la reivindicación 3 en donde la variante de ADNasa en comparación con una ADNasa que tiene la Id. de sec. n.º: 28, comprende una o más de las sustituciones correspondientes a sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en: G4K, S7G, K8R, S9I, N16G, S27K, S27R, D32F, D32I, D32L, D32R, D32V, L33R, L33V, L33Y, S39C, G41P, S42H, D45E, Q48D, N61E, T65M, T65W, S66R, S66M, S66W, S66Y, S66V, F78L, P91L, S101N, S106L, S106R, S106H, Q109E, A112E, T127P, S130A, S130Y, T138D, Q140V, Q140G, A147P, C148A, W154Y, T157V, Y159A, Y159R, G162C, Q174N, L177Y, S179L y C180A, en donde una sustitución es L33R, L33V o L33Y y en donde cada posición corresponde a las posiciones de la Id. de sec. n.º: 28 (numeración según la Id. de sec. n.º: 28) y en donde la variante tiene al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % pero menos de 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos mostrada en la Id. de sec. n.º: 28.
5. Una composición detergente según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la variante de ADNasa comprende una o más de las sustituciones correspondientes a sustituciones del grupo que consiste en: S27K, S27R, S39C y S66W (numeración según la Id. de sec. n.º: 1).
6. Una composición detergente según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde la variante de ADNasa comprende uno o ambos motivos [D/M/L][S/T]GYSR[D/N] (Id. de sec. n.º: 25) y/o ASXNRSKG (Id. de sec. n.º: 26).
7. Una composición detergente según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde la variante de ADNasa tiene al menos una propiedad mejorada, en comparación con la precursora y/o en comparación con la ADNasa que tiene el polipéptido mostrado en la Id. de sec. n.º: 1, id. de sec. n.º: 27 o la Id. de sec. n.º: 28, preferiblemente en donde la propiedad mejorada se caracteriza por que la RAR (relación de actividad residual) es superior a 1 en al menos un ensayo A, B o C, como se define en la descripción.
8. Una composición detergente según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la combinación de mutaciones en la variante de ADNasa proporciona un efecto aditivo o sinérgico.
9. Una composición detergente según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la variante de ADNasa tiene al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, tal como al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos

99 %, pero menos de 100 % de identidad de secuencia con la ADNasa que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la Id. de sec. n.º: 1.

- 5 10. Una composición detergente según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde en la variante de ADNasa el número total de sustituciones en comparación con la Id. de sec. n.º: 1 es de 3 a 20, preferiblemente al menos 5 a 20, al menos 10 a 20 o tal como al menos 15 a 20 sustituciones en comparación con la ADNasa que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la Id. de sec. n.º: 1.
- 10 11. Una composición detergente según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la variante de ADNasa es una variante de una ADNasa precursora obtenida del género *bacillus*, preferiblemente de cualquiera de los siguientes: *Bacillus Bacillus cibi*, *Bacillus horikoshii*, *Bacillus horneckiae*, *Bacillus idriensis*, *Bacillus algalicola*, *Bacillus vietnamensis*, *Bacillus hwajinpoensis*, *Bacillus indicus*, *Bacillus marisflavi* o *Bacillus luciferensis*.
- 15 12. Una composición detergente según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la variante de ADNasa comprende una o más sustituciones correspondientes a sustituciones del grupo que consiste en: G4K, S7G, K8R, D32I, D32L, D32R, D32V, S39C, G41P, S42H, Q48D, T65M, T65W, S66M, S66W, S66Y, S66V, S101N, S106L, S106R, S106H, S130A, S130Y, T138D, Q140V, Q140G, A147H, C148A, W154Y, T157V, Y159A, Y159R, G162C, Q174N, L177Y, S179L y C180A, en donde una de las sustituciones es L33R, (numeración según la Id. de sec. n.º: 1).
- 20 13. Una composición detergente según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el adyuvante comprende enzimas adicionales seleccionadas de: amilasas, proteasas, lipasas, cutinasas, mananasas, galactanasas, celulasas, xiloglucanasas y mezclas de las mismas.
- 25 14. Un método de lavado que comprende (i) poner en contacto un artículo o superficie, preferiblemente un tejido, con una solución de lavado acuosa que comprende una variante de ADNasa como se define en cualquiera de las reivindicaciones anteriores y un adyuvante, preferiblemente poniendo en contacto el artículo o la superficie con una composición detergente según cualquiera de las reivindicaciones anteriores; y (ii) opcionalmente enjuagar y (iii) secar la superficie.
- 30 15. Uso de una variante de ADNasa como se define en cualquiera de las reivindicaciones anteriores y un adyuvante, preferiblemente uso de una composición detergente según cualquiera de las reivindicaciones anteriores y/o un método de limpieza, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15: para limpieza o limpieza profunda de un artículo o superficie, preferiblemente un tejido; para prevenir y/o reducir la adherencia de un artículo o superficie manchada, preferiblemente un tejido; para pretratar las manchas de un artículo o superficie manchada, preferiblemente un tejido; para prevenir y/o reducir la redeposición de la suciedad sobre una superficie o artículo, preferiblemente un tejido, durante un ciclo de lavado; para prevenir y/o reducir la adherencia de la suciedad a un artículo o superficie, preferiblemente un tejido; para mantener o mejorar la blancura de un artículo o superficie, preferiblemente un tejido; y/o para prevenir y/o reducir el mal olor en un artículo o superficie, preferiblemente un tejido.
- 35 40