

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 797 725**

51 Int. Cl.:

C12N 9/20 (2006.01)

C11D 3/386 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.12.2015** **PCT/EP2015/080463**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.06.2016** **WO16102356**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2015** **E 15817259 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2020** **EP 3237609**

54 Título: **Composiciones detergentes, variantes de lipasa y polinucleótidos que codifican las mismas**

30 Prioridad:

22.12.2014 EP 14199760

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

03.12.2020

73 Titular/es:

NOVOZYMES A/S (100.0%)

Krogshoejvej 36

2880 Bagsvaerd, DK

72 Inventor/es:

BORCH, KIM y

VIND, JESPER

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 797 725 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, variantes de lipasa y polinucleótidos que codifican las mismas

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

- 5 [0001] La presente invención se refiere a variantes de lipasa, composiciones de las mismas, métodos para fabricar composiciones de la invención, polinucleótidos que codifican las variantes, constructos de ácido nucleico, vectores de expresión, células huésped que comprenden el polinucleótido, métodos de producción y método para obtener las variantes de la invención.

Descripción de las técnicas relacionadas

- 10 [0002] Las lipasas son importantes biocatalizadores que han demostrado ser útiles para varias aplicaciones y un gran número de lipasas diferentes se han identificado y muchas se han comercializado. Sin embargo, son deseables nuevas lipasas adecuadas para usar en varias composiciones adaptadas a las condiciones actualmente usadas.

- 15 [0003] Las lipasas han sido empleadas en composiciones para la eliminación de manchas lipídicas mediante la hidrólisis de triglicéridos para generar ácidos grasos. Las actuales composiciones detergentes, de limpieza y/o de cuidado de tejidos comprenden muchos ingredientes activos que interfieren con la capacidad de las lipasas para eliminar manchas lipídicas y bajo ciertas circunstancias son perjudiciales para la actividad lipásica. La estabilidad de la lipasa para resistir la interferencia de tales ingredientes es deseable. Además, tales composiciones no se usan inmediatamente después de la producción y, en consecuencia, la estabilidad de las lipasas se puede ver afectada durante el almacenamiento. Así, existe una necesidad de lipasas que sean activas y estables en el entorno fuerte de las composiciones detergentes.
- 20

[0004] La US6624129 se refiere a variantes de lipasa de *Humicola lanuginosa* y divulga que la variante puede comprender una extensión peptídica que comprende una cisteína unida por un puente disulfuro a una segunda cisteína en el polipéptido.

- 25 [0005] La WO 00/60063 se refiere a variantes de lipasa de *Humicola lanuginosa* que pueden comprender una adición peptídica de lipasa consistente en aminoácidos neutros y el aminoácido cisteína y divulga que la variante de lipasa puede comprender una sustitución de un aminoácido con cisteína en una ubicación adecuada para formar un puente disulfuro con la cisteína de la adición peptídica.

- 30 [0006] La presente invención proporciona variantes de lipasa con propiedades mejoradas en comparación con su original. En particular la invención se refiere a variantes que comprenden un puente de cisteína-cisteína (C-C). La WO99/42566 describe variantes C-C donde se añadió una extensión aminoacídica N-terminal que comprende cisteína que pudo formar un puente C-C con una cisteína comprendida en la secuencia de aminoácidos de la lipasa.

RESUMEN DE LA INVENCION

- 35 [0007] La presente invención se refiere a una variante de una lipasa original, variante que comprende sustituciones en las posiciones correspondientes a E1C y N233C del polipéptido maduro mostrado como los aminoácidos numerados del 1 al 269 de la SEQ ID NO: 2, tiene actividad lipásica y tiene al menos un 80% pero menos del 100% de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la lipasa original mostrado como los aminoácidos numerados del 1 al 269 de la SEQ ID NO: 2, donde la variante tiene una estabilidad mejorada en relación con la lipasa original.

- 40 [0008] La presente invención también se refiere a polinucleótidos que codifican las variantes; constructos de ácido nucleico, vectores y células huésped que comprenden los polinucleótidos; composiciones que comprenden una variante de la invención, métodos de fabricación de las composiciones de la invención y métodos de producción o para obtener las variantes de la invención.

Definiciones

[0009]

Lipasa: los términos "lipasa", "enzima lipasa", "enzima lipolítica", "esterasa lipídica", "polipéptido lipolítico" y "proteína lipolítica" se refieren a una enzima de la clase EC3.1.1 tal y como se define por la nomenclatura enzimática. Puede tener actividad lipásica (triacilglicerol-lipasa, EC3.1.1.3), actividad de cutinasa (EC3.1.1.74), actividad de estero-esterasa (EC3.1.1.13) y/o actividad de hidrolasa de éster ceroso (EC3.1.1.50). A efectos de la presente invención, la actividad lipásica se determina según el procedimiento descrito en la sección Ejemplo. En un aspecto, las variantes de la presente invención tienen al menos un 20%, por ejemplo, al menos un 25%, al menos un 30%, al menos un 35%, al menos un 40%, al menos un 45%, al menos un 50%, al menos un 55%, al menos un 60%, al menos un 65%, al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95% o el 100% de la actividad lipásica del polipéptido maduro de SEQ ID NO: 2.

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

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

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

Secuencias de control: el término "secuencias de control" significa secuencias de ácido nucleico necesarias para la expresión de un polinucleótido que codifica una variante de la presente invención. Cada secuencia de control puede ser nativa (es decir, del mismo gen) o foránea (es decir, de un gen diferente) respecto al polinucleótido que codifica la variante o nativa o foránea entre sí. Tales secuencias de control incluyen, pero de forma no limitativa, un 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 parada transcripcional y traslacional. Las secuencias de control pueden estar provistas de conectores con el propósito de introducir sitios de restricción específicos que faciliten el ligamiento de las secuencias de control con la región codificante del polinucleótido que codifica una variante.

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

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

Fragmento: el término "fragmento" significa un polipéptido con uno o más (por ejemplo, varios) aminoácidos ausentes del amino y/o el carboxilo terminal de un polipéptido; donde el fragmento tiene actividad lipásica. En un aspecto, un fragmento contiene al menos un 50%, al menos un 55%, al menos un 60%, al menos un 65%, al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% pero menos del 100% del número de aminoácidos 1 a 269 del polipéptido maduro de una lipasa original. En un aspecto, la lipasa original es la SEQ ID NO: 2; la SEQ ID NO: 4; o la SEQ ID NO: 6.

Condiciones de astringencia alta: el término "condiciones de astringencia alta" significa, para sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, la prehibridación y la hibridación a 42 °C en SSPE 5X, SDS al 0,3%, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón fragmentado y desnaturalizado y formamida al 50%, siguiendo procedimientos de transferencia de Southern estándar durante 12 a 24 horas. El material portador se lava finalmente tres veces, cada una durante 15 minutos, usando SSC 2X, SDS al 0,2% a 65°C.

Célula huésped: el término "célula huésped" significa cualquier tipo celular que sea susceptible a la transformación, la transfección, la transducción o similar con un constructo de ácido nucleico o vector de expresión que comprenda un polinucleótido de la presente invención. El término "célula huésped" abarca cualquier descendiente de una célula original que no es idéntico a la célula original debido a mutaciones que ocurren durante la replicación.

Propiedad mejorada: el término "propiedad mejorada" significa una característica asociada a una variante que está mejorada en comparación con el original. La propiedad mejorada de las variantes de la presente invención es una estabilidad mejorada en comparación con la enzima original o el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 2. En un aspecto la enzima original es la SEQ ID NO: 2; la SEQ ID NO: 4; o la SEQ ID NO: 6. En un aspecto la estabilidad de la presente invención puede ser termoestabilidad, estabilidad en presencia de enzimas proteolíticas, estabilidad en presencia de tensoactivo, estabilidad en presencia de un agente reductor, estabilidad en composiciones detergentes, estabilidad bajo condiciones de almacenamiento, estabilidad bajo condiciones de almacenamiento en presencia de proteasa, estabilidad bajo condiciones de almacenamiento

en presencia de un agente reductor o estabilidad en detergente. La propiedad se determina por el ensayo descrito en la sección "Ejemplos".

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

Condiciones de astringencia baja: el término "condiciones de astringencia baja" significa, para sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, la prehibridación y la hibridación a 42 °C en SSPE 5X, SDS al 0,3%, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón fragmentado y desnaturalizado y formamida al 25%, siguiendo procedimientos de transferencia de Southern estándar durante 12 a 24 horas. El material portador se lava finalmente tres veces, cada una durante 15 minutos, usando SSC 2X, SDS al 0,2% a 50°C.

Polipéptido maduro: el término "polipéptido maduro" significa un polipéptido en su forma final después de la traducción y cualquier modificación postraduccional, tal como el procesamiento N-terminal, el truncamiento C-terminal, la glicosilación, la fosforilación, etc. En un aspecto, el polipéptido maduro está constituido por los aminoácidos 1 a 269 de la SEQ ID NO: 2, 1 a 274 de la SEQ ID NO: 4 o 1 a 269 de la SEQ ID NO: 6. Se conoce en la técnica que una célula huésped puede producir una mezcla de dos de varios polipéptidos maduros diferentes (es decir, con un aminoácido C-terminal y/o N-terminal diferente) expresados por el mismo polinucleótido.

Secuencia codificante del polipéptido maduro: el término "secuencia codificante del polipéptido maduro" significa un polinucleótido que codifica un polipéptido maduro que tiene actividad lipásica. En un aspecto, la secuencia codificante del polipéptido maduro está constituida por los nucleótidos 67 a 873 de la SEQ ID NO: 1, 67 a 888 de la SEQ ID NO: 3; o 67 a 873 de la SEQ ID NO: 5.

Condiciones de astringencia media: el término "condiciones de astringencia media" significa, para sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, la prehibridación y la hibridación a 42°C en SSPE 5X, SDS al 0,3%, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón fragmentado y desnaturalizado y formamida al 35%, siguiendo procedimientos de transferencia de Southern estándar durante 12 a 24 horas. El material portador se lava finalmente tres veces, cada una durante 15 minutos, usando SSC 2X, SDS al 0,2% a 55°C.

Condiciones de astringencia media-alta: el término "condiciones de astringencia media-alta" significa, para sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, la prehibridación y la hibridación a 42 °C en SSPE 5X, SDS al 0,3%, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón fragmentado y desnaturalizado y formamida al 35%, siguiendo procedimientos de transferencia de Southern estándar durante 12 a 24 horas. El material portador se lava finalmente tres veces, cada una durante 15 minutos, usando SSC 2X, SDS al 0,2% a 60°C.

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

Construido de ácido nucleico: el término "construido de ácido nucleico" significa una molécula de ácido nucleico, ya sea monocatenaria o bicatenaria, que se aísla de un gen de origen natural o se modifica para contener segmentos de ácidos nucleicos de manera que de otro modo no existiría en la naturaleza o que es sintética, que comprende una o más secuencias de control.

Operativamente enlazado: el término "operativamente enlazado" significa una configuración donde una secuencia de control se coloca en una posición apropiada respecto a la secuencia codificante de un polinucleótido de manera que la secuencia de control dirige la expresión de la secuencia codificante.

Original o lipasa original: el término "original" o "lipasa original" significa una lipasa a la que se le hace una modificación para producir las variantes enzimáticas de la presente invención. El original puede ser un polipéptido de origen natural (de tipo salvaje) o una variante o fragmento del mismo.

Agente reductor: el término "agente reductor" significa cualquier agente o sustancia que puede reducir, es decir, romper, un enlace bisulfuro presente en una lipasa según la invención. Ejemplos de agentes reductores que pueden romper un puente de cisteína (puente de Cys, puente C-C) son tales como, por ejemplo, la tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), el ditiotretol (DTT), el 2-mercaptoetanol (beta-ME), la tris(3-hidroxipropil)fosfina (THPP) y los sulfitos (tal como el sulfito de sodio).

Identidad de secuencia: la relación entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos se describe mediante el parámetro "identidad de secuencia".

A efectos de la presente invención, la identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos se determina usando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) según se implementa en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277), preferiblemente la versión 5.0.0 o posterior. Los parámetros usados son una penalización por apertura de espacio de 10, una penalización por extensión de espacio de 0,5 y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (versión de EMBOSS de BLOSUM62). El resultado de Needle etiquetado como "identidad más larga" (obtenido usando la opción -nobrief) se usa como la identidad en porcentaje y se calcula de la siguiente manera:

(Residuos idénticos x 100)/(Longitud del alineamiento - Número total de espacios en el alineamiento)

A efectos de la presente invención, la identidad de secuencia entre dos secuencias de desoxirribonucleótidos se determina usando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, *supra*) según se implementa en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, *supra*), preferiblemente la versión 5.0.0 o posterior. Los parámetros usados son una penalización por apertura de espacio de 10, una penalización por extensión de espacio de 0,5 y la matriz de sustitución EDNAFULL (versión de EMBOSS de NCBI NUC4.4). El resultado de Needle etiquetado como "identidad más larga" (obtenido usando la opción -nobrief) se usa como la identidad en porcentaje y se calcula de la siguiente manera:

(Desoxirribonucleótidos idénticos x 100)/(Longitud del alineamiento - Número total de espacios en el alineamiento)

Subsecuencia: el término "subsecuencia" significa un polinucleótido con uno o más (por ejemplo, varios) nucleótidos ausentes del extremo 5' y/o 3' de una secuencia codificante del polipéptido maduro; donde la subsecuencia codifica un fragmento con actividad lipásica. En un aspecto, una subsecuencia contiene al menos un 50%, al menos un 55%, al menos un 60%, al menos un 65%, al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% pero menos del 100% del número de nucleótidos 67 a 873 de la SEQ ID NO: 1, 67 a 888 de la SEQ ID NO: 3 o 67 a 873 de la SEQ ID NO: 5.

Variante: el término "variante" significa un polipéptido que tiene actividad lipásica que comprende una modificación, es decir, una sustitución, una inserción y/o una eliminación, en una o más (por ejemplo, varias) posiciones. Una sustitución significa el reemplazo del aminoácido que ocupa una posición con un aminoácido diferente; una delección significa la eliminación del aminoácido que ocupa una posición; y una inserción significa la adición de un aminoácido adyacente e inmediatamente posterior al aminoácido que ocupa una posición. Las variantes de la presente invención tienen al menos un 20%, por ejemplo, al menos un 40%, al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 95% o al menos el 100% de la actividad lipásica del polipéptido maduro de SEQ ID NO: 2.

Condiciones de astringencia muy alta: el término "condiciones de astringencia muy alta" significa, para sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, la prehibridación y la hibridación a 42 °C en SSPE 5X, SDS al 0,3%, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón fragmentado y desnaturalizado y formamida al 50%, siguiendo procedimientos de transferencia de Southern estándar durante 12 a 24 horas. El material portador se lava finalmente tres veces, cada una durante 15 minutos, usando SSC 2X, SDS al 0,2% a 70°C.

Condiciones de astringencia muy baja: el término "condiciones de astringencia muy baja" significa, para sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, la prehibridación y la hibridación a 42 °C en SSPE 5X, SDS al 0,3%, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón fragmentado y desnaturalizado y formamida al 25%, siguiendo procedimientos de transferencia de Southern estándar durante 12 a 24 horas. El material portador se lava finalmente tres veces, cada una durante 15 minutos, usando SSC 2X, SDS al 0,2% a 45°C.

Rendimiento de lavado: en el presente contexto, el término "rendimiento de lavado" se usa como la capacidad de una enzima para eliminar lípidos o manchas que contienen lípidos presentes en el objeto que se va a limpiar. El rendimiento de lavado se puede cuantificar calculando el valor denominado G/Int definido en la descripción del AMSA en la sección Métodos más adelante. El término "rendimiento de lavado" incluye la limpieza general, por ejemplo, la limpieza de superficies duras como en el lavado de vajillas, pero también el rendimiento de lavado en tejidos, como el lavado de ropa, y también limpieza industrial e institucional.

Lipasa de tipo salvaje: el término lipasa "de tipo salvaje" significa una lipasa expresada por un microorganismo de origen natural, tal como una bacteria, una levadura o un hongo filamentoso encontrados en la naturaleza.

Convenciones para la designación de variantes

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

[0011] La identificación del residuo de aminoácido correspondiente en otra lipasa se puede determinar por un alineamiento de múltiples secuencias polipeptídicas usando varios programas informáticos, incluidos, pero de forma no limitativa, MUSCLE (comparación de múltiples secuencias por log-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 et al., 2005, Nucleic Acids Research 33: 511-518; Katoh y Toh, 2007, Bioinformatics 23: 372-374; Katoh et al., 2009, Methods in Molecular Biology 537: 39-64; Katoh y Toh, 2010, Bioinformatics 26: 1899-1900) y EMBOSS EMMA empleando ClustalW (1.83 o posterior; Thompson et al., 1994, Nucleic Acids Research 22: 4673-4680), usando sus respectivos parámetros por defecto.

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

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

[0014] Al describir las variantes de la presente invención, la nomenclatura descrita abajo está adaptada para una mayor facilidad de referencia. Se emplea la abreviatura de aminoácidos aceptada de la IUPAC de una única letra o de tres letras.

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

[0016] Delecciones. Para la delección de un aminoácido, se usa la nomenclatura siguiente: aminoácido original, posición, *. Por consiguiente, la delección de glicina en la posición 195 se designa como "Gly195*" o "G195*". Las delecciones múltiples se separan con signos de suma ("+"), por ejemplo, "Gly195* + Ser411*" o "G195* + S411*".

[0017] Inserciones. Para la inserción de un aminoácido, se usa la nomenclatura siguiente: aminoácido original, posición, aminoácido original, aminoácido insertado. Por consiguiente, la inserción de lisina después de glicina en la posición 195 se designa "Gly195GlyLys" o "G195GK". Una inserción de múltiples aminoácidos se designa [aminoácido original, posición, aminoácido original, aminoácido insertado n.º 1, aminoácido insertado n.º 2; etc.]. Por ejemplo, la inserción de lisina y alanina después de glicina en la posición 195 se indica como "Gly195GlyLysAla" o "G195GKA".

[0018] En tales casos el residuo o los residuos de aminoácido insertado(s) se numeran mediante la adición de letras minúsculas al número de posición del residuo de aminoácido precedente al residuo o los residuos de aminoácido insertado(s). En el ejemplo anterior, la secuencia sería, por tanto:

Original:	Variante:
195	195 195a 195b
G	G - K - A

[0019] Múltiples modificaciones. Las variantes que comprenden múltiples modificaciones se separan con signos de suma ("+"), por ejemplo, "Arg170Tyr+Gly195Glu" o "R170Y+G195E", que representan una sustitución de arginina y glicina en las posiciones 170 y 195 por tirosina y ácido glutámico, respectivamente.

- 5 [0020] Diferentes modificaciones. Cuando se pueden introducir diferentes modificaciones en una posición, las diferentes modificaciones se separan con una coma, por ejemplo, "Arg170Tyr,Glu" representa una sustitución de arginina en la posición 170 por tirosina o ácido glutámico. Así, "Tyr167Gly,Ala + Arg170Gly,Ala" designa las variantes siguientes:
"Tyr167Gly+Arg170Gly", "Tyr167Gly+Arg170Ala", "Tyr167Ala+Arg170Gly" y "Tyr167Ala+Arg170Ala".

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

- 10 [0021] La presente invención proporciona variantes de lipasa con estabilidad mejorada en comparación con la lipasa original o el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 2.

Variantes

- 15 [0022] La presente invención se refiere a una variante de una lipasa original, variante que comprende sustituciones en las posiciones correspondientes a E1C y N233C del polipéptido maduro mostrado como los aminoácidos numerados del 1 al 269 de la SEQ ID NO: 2, tiene actividad lipásica y tiene al menos un 80% pero menos del 100% de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la lipasa original mostrado como los aminoácidos numerados del 1 al 269 de la SEQ ID NO: 2, donde la variante tiene una estabilidad mejorada en relación con la lipasa original.

- 20 [0023] En un aspecto la lipasa original es una lipasa que es un polipéptido con una secuencia de aminoácidos que:
(a) tiene al menos un 90 % de identidad con la lipasa de tipo salvaje derivada de la cepa de *Humicola lanuginosa* DSM 4109; (b) en comparación con dicha lipasa de tipo salvaje, comprende una sustitución de un aminoácido eléctricamente neutro o cargado negativamente en la superficie de la estructura tridimensional dentro de 15 Å de E1 o Q249 con un aminoácido cargado positivamente; y (c) comprende la adición peptídica en el extremo C-terminal; y/o (d) reúne las limitaciones siguientes: (i) comprende un aminoácido negativo en la posición E210 de dicha lipasa de tipo salvaje; (ii) comprende un aminoácido cargado negativamente en la región correspondiente a las posiciones 90-101 de dicha lipasa de tipo salvaje; y (iii) comprende un aminoácido neutro o negativo en una posición correspondiente a N94 de dicha lipasa de tipo salvaje y/o tiene una carga eléctrica neta negativa o neutra en la región correspondiente a las posiciones 90-101 de dicha lipasa de tipo salvaje.

- 30 [0024] En un aspecto la lipasa original es una lipasa que tiene actividad lipásica, tiene al menos un 80% pero menos del 100% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2 y comprende sustituciones en las posiciones correspondientes a T231R+N233R y al menos una o más (por ejemplo, varias) de D96E, D111A, D254S, G163K, P256T, G91T, D27R y G38A de la SEQ ID NO: 2.

- 35 [0025] En un aspecto la lipasa original tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 4 o la SEQ ID NO: 6. En un aspecto la lipasa original comprende o consiste en el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 6.

[0026] En un aspecto, la variante tiene una identidad de secuencia de al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 91%, al menos un 92%, al menos un 93%, al menos un 94%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98% o al menos un 99%, pero menos del 100%, respecto a la identidad de secuencia con el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 2.

- 40 [0027] En un aspecto, el número de sustituciones en las variantes de la presente invención es 1-40, por ejemplo, 1-30, 1-20, 1-10 y 1-5, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 sustituciones.

- 45 [0028] En un aspecto, la variante comprende o consiste en las sustituciones E1C +N233C del polipéptido maduro de SEQ ID NO: 2 o de un polipéptido con al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 91%, al menos un 92%, al menos un 93%, al menos un 94%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, al menos un 99% de identidad con el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 2 que tiene actividad lipásica, y además la variante tiene una estabilidad mejorada en comparación con la lipasa madura de SEQ ID NO: 2. En un aspecto la estabilidad de la presente invención puede ser termoestabilidad, estabilidad en presencia de enzimas proteolíticas, estabilidad en presencia de tensoactivo, estabilidad en presencia de un agente reductor, estabilidad en composiciones detergentes, estabilidad bajo condiciones de almacenamiento, estabilidad bajo condiciones de

almacenamiento en presencia de proteasa, estabilidad bajo condiciones de almacenamiento en presencia de un agente reductor o estabilidad en detergente.

[0029] Las variantes pueden comprender además una o más sustituciones adicionales en una o más (por ejemplo, varias) otras posiciones. Por ejemplo, en un aspecto la variante comprende además una o más (por ejemplo, varias) sustituciones correspondientes a cualquiera de las posiciones seleccionadas de: 2, 4, 8, 11, 15, 27, 33, 38, 43, 48, 51, 54, 56, 57, 58, 60, 69, 71, 83, 86, 91, 92, 94, 96, 97, 98, 99, 101, 111, 123, 150, 152, 163, 176, 179, 187, 188, 189, 198, 199, 200, 210, 216, 220, 224, 225, 227, 228, 229, 231, 236, 238, 239, 246, 249, 254, 255, 256, 257, 260, 263, 264, 265, 266, 267, 269 de la SEQ ID NO: 2. En un aspecto la variante comprende además una o más (por ejemplo, varias) sustituciones correspondientes a cualquiera de las posiciones seleccionadas de: V2K, Q4R, Q4V, N8R, N11R, Q15C, D27G, D27R, N33K, N33Q, G38A, E43C, D48C, F51V, S54T, E56K, D57G, S58A, V60K, V60S, L69R, N71C, S83T, I86V, G91A, G91N, G91Q, N92D, N94K, N94R, D96E, D96G, D96L, D96W, L97M, K98E, K98I, K98Q, E99K, E99N, N101D, N101S, D111A, T123V, A150G, A152G, G163K, V176L, R179L, V187Y, V187W, Q188R, T189Y, T189W, H198S, T199R, N200R, E210K, E210Q, S216P, Y220F, S224R, G225R, L227G, L227R, V228R, P229R, T231R, V236R, I238C, E239C, G246C, Q249R, D254S, I255G, P256K, P256T, P256V, A257I, A257V, W260C, G263Q, L264A, I265T, G266D, T267A, L269N, L269V de la SEQ ID NO: 2. En un aspecto la variante comprende o consiste en conjuntos de sustituciones en las posiciones correspondientes a: E1C D27R N33K G38A F51V S54T E56K D96E K98I D111A G163K N233C D254S P256T; E1C V2K D27G N33K G38A F51V D96E D111A G163K N233C D254S P256T; E1C V2K D27R N33K G38A F51V D96E D111A G163K Q188R N233C D254S P256T; E1C D27R G38A G91A N92D D96L K98Q D111A G163K N233C D254S P256T; E1C D27R G38A G91N N94R D96E D111A G163K S216P L227G N233C D254S P256T; E1C T231R N233C; E1C T231R N233C Q249R D254S; E1C G225R T231R N233C; E1C Q15C E43C T231R N233C; E1C L227R T231R N233C; E1C P229R T231R N233C; E1C L227G T231R N233C; E1C E99N N101S T231R N233C; E1C L227G T231R N233C D254S; E1C E210K L227G T231R N233C; E1C D27R N33K G38A F51V D96E K98E N101D D111A G163K H198S E210K Y220F T231R N233C D254S P256T; E1C D27R N33K G38A F51V S54T E56K D57G L69R D96E K98I D111A A152G G163K T231R N233C D254S P256T; E1C V187Y T189Y L227G T231R N233C; E1C D27R N33K G38A F51V D96E K98E N101D D111A T123V G163K H198S E210K Y220F T231R N233C D254S P256T; E1C V60K I86V A150G E210K L227G T231R N233C P256K; E1C V187W T189W L227G T231R N233C; E1C N94K D96L L227G T231R N233C; E1C G91A N92D D96L K98Q L227G T231R N233C; E1C N8R L227G T231R N233C; E1C L227G V228R T231R N233C; E1C Q4R L227G T231R N233C; E1C N11R L227G T231R N233C; E1C S224R L227G T231R N233C; E1C L227G T231R N233C V236R; E1C N200R L227G T231R N233C; E1C T199R L227G T231R N233C; E1C V2K D27R N33K G38A F51V D96E D111A G163K T231R N233C D254S P256T; E1C D27R N33K G38A F51V S54T E56K D96E K98I D111A G163K T231R N233C D254S P256T; E1C D27R N33K G38A F51V D96E K98I D111A G163K H198S Y220F T231R N233C D254S P256T; E1C D27R N33K G38A F51V E56K L69R D96E K98E D111A G163K R179L T231R N233C D254S P256T A257I; E1C V2K D27R N33K G38A F51V D96E D111A G163K T231R N233C D254S P256T A257I; E1C D27R N33K G38A F51V S54T E56K D96E K98I D111A G163K T231R N233C D254S P256T A257I; E1C D27R N33K G38A F51V S54T E56K D57G D96E K98I D111A G163K T231R N233C D254S I255G P256T A257V L269V; E1C V2K D27R N33K G38A F51V L69R D96E K98E D111A G163K V176L E210K L227G T231R N233C D254S P256T; E1C D27R N33K G38A F51V D96E K98E N101D D111A T123V G163K H198S E210K Y220F T231R N233C D254S P256T; E1C D27R N33K G38A F51V D96E K98E N101D D111A T123V G163K H198S E210K Y220F T231R N233C D254S P256T; E1C D27R G38A F51V L69R D96E K98E D111A G163K E210K T231R N233C D254S P256T; y E1C N11R D27R N33K D48C F51V L69R N71C E87Q K98E N101R T143A E210K G225R L227G P229R T231R N233C Q249R P250R D254S I255G P256K de la SEQ ID NO: 2.

[0030] En un aspecto las variantes según la invención comprenden o consisten en uno o más (por ejemplo, varios) puente(s) de cisteína adicional(es) además del puente de cisteína en una posición correspondiente a E1C N233C de la SEQ ID NO: 2. En un aspecto las variantes comprenden o consisten en uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez puente(s) de cisteína adicional(es). Tales puentes de cisteína adicionales pueden conectar una extensión N- o C-terminal que comprende una cisteína a la parte madura de la lipasa como se ha descrito en WO99/42566 y/o el puente de cisteína puede conectar diferentes partes de la lipasa madura como en las proteínas de origen natural. Las proteínas comprenden naturalmente puentes de cisteína y, por ejemplo, la lipasa de SEQ ID NO: 2 tiene tres puentes de cisteína localizados en las posiciones C22-C268, C36-C41 y C104-C107. Debe entenderse que las extensiones que comprenden una cisteína mencionadas en WO99/42566 en un aspecto se pueden añadir a las variantes de la invención junto con una sustitución E239C con el fin de proporcionar un puente de cisteína adicional. Ejemplos de otros puentes de cisteína que se incluirán en las variantes de la invención pueden ser, por ejemplo, en las posiciones correspondientes a Q15C E43C y/o D48C N71C de la SEQ ID NO: 2.

[0031] Los cambios de aminoácidos pueden ser de una naturaleza menor, es decir, sustituciones o inserciones conservadoras de aminoácidos que no afectan significativamente al plegamiento y/o la actividad de la proteína; delecciones pequeñas, típicamente de 1-30 aminoácidos; extensiones amino- o carboxiterminales pequeñas, tales como un residuo de metionina aminoterminal; un péptido conector pequeño de hasta 20-25 residuos; o una extensión pequeña que facilita la purificación cambiando la carga neta u otra función, tal como un tracto de polihistidina, un epítipo antigénico o un dominio de unión.

[0032] Ejemplos de sustituciones conservadoras se incluyen en los grupos de aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), aminoácidos ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), aminoácidos polares (glutamina y asparagina), aminoácidos hidrofóbicos (leucina, isoleucina y valina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina) y aminoácidos pequeños (glicina, alanina, serina, treonina y metionina). Sustituciones de aminoácidos que no modifican generalmente la actividad específica se conocen en la técnica y son descritas, por ejemplo, por H. Neurath y R.L. Hill, 1979, en, *The Proteins*, Academic Press, Nueva York. Sustituciones comunes son Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu y Asp/Gly.

[0033] Alternativamente, los cambios de aminoácidos son de tal naturaleza que las propiedades físico químicas de los polipéptidos se ven modificadas. Por ejemplo, los cambios de aminoácidos pueden mejorar la termoestabilidad del polipéptido, modificar la especificidad de sustrato, cambiar el pH óptimo y similares.

[0034] Se pueden identificar aminoácidos esenciales en un polipéptido según procedimientos conocidos en la técnica, tales como la mutagénesis dirigida al sitio o la mutagénesis por barrido de alanina (Cunningham y Wells, 1989, *Science* 244: 1081-1085). En la última técnica, se introducen mutaciones individuales de alanina en cada residuo de la molécula y se evalúa la actividad lipásica de las moléculas mutantes resultantes para identificar residuos de aminoácidos que son críticos para la actividad de la molécula. Véase también, Hilton et al., 1996, *J. Biol. Chem.* 271: 4699-4708. El sitio activo de la enzima u otra interacción biológica puede determinarse también mediante análisis físico de la estructura, como se determina con técnicas tales como la resonancia magnética nuclear, la cristalografía, la difracción electrónica o el marcaje por fotoafinidad, junto con la mutación de aminoácidos del sitio de contacto putativo. Véanse, por ejemplo, de Vos et al., 1992, *Science* 255: 306-312; Smith et al., 1992, *J. Mol. Biol.* 224: 899-904; Wlodaver et al., 1992, *FEBS Lett.* 309: 59-64. La identidad de aminoácidos esenciales también puede inferirse a partir de un alineamiento con un polipéptido relacionado.

[0035] En un aspecto la variante tiene al menos un 50%, al menos un 55%, al menos un 60%, al menos un 65%, al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos el 100% de la actividad de la lipasa original.

[0036] La variante de la invención tiene una estabilidad mejorada.

[0037] En un aspecto, la variante tiene una termoestabilidad mejorada en comparación con la enzima original. En un aspecto la variante es más estable a una temperatura aumentada en comparación con la lipasa original. La termoestabilidad se determina usando el ensayo de DSC como se describe en el ejemplo 1.

[0038] En un aspecto, la variante tiene una estabilidad mejorada en presencia de enzimas proteolíticas en comparación con la enzima original. En un aspecto, la variante es más estable en presencia de enzimas proteolíticas en comparación con la lipasa original. En un aspecto la variante es más estable en presencia de enzimas proteolíticas a una temperatura aumentada en comparación con la lipasa original. La estabilidad mejorada en presencia de enzimas proteolíticas se puede determinar usando el ensayo de DSC como se describe en el ejemplo 1.

[0039] En un aspecto, la variante tiene una estabilidad mejorada en presencia de tensoactivo en comparación con la enzima original. En un aspecto, la variante es más estable en presencia de tensoactivo en comparación con la lipasa original. En un aspecto la variante es más estable en presencia de tensoactivo a una temperatura aumentada en comparación con la lipasa original. La estabilidad mejorada en presencia de tensoactivo se puede determinar usando el ensayo de DSC como se describe en el ejemplo 1.

[0040] En un aspecto, la variante tiene una estabilidad mejorada en presencia de un agente reductor en comparación con la enzima original. En un aspecto, la variante es más estable en presencia de un agente reductor en comparación con la lipasa original. En un aspecto la variante es más estable en presencia de un agente reductor a una temperatura aumentada en comparación con la lipasa original. La estabilidad mejorada en presencia de un agente reductor se puede determinar usando el ensayo de NanoDSF como se describe en el ejemplo 1.

[0041] En un aspecto, la variante tiene una estabilidad mejorada en composiciones detergentes en comparación con la enzima original. En un aspecto, la variante es más estable en composiciones detergentes en comparación con la lipasa original. En un aspecto la variante es más estable en composiciones detergentes a una temperatura aumentada en comparación con la lipasa original. La estabilidad mejorada en composiciones detergentes se puede determinar usando el ensayo de DSC como se describe en el ejemplo 1.

[0042] En un aspecto, la variante tiene una estabilidad mejorada bajo condiciones de almacenamiento (es decir, tiene una estabilidad mejorada de almacenamiento) en comparación con la enzima original. En un aspecto, la

variante es más estable bajo condiciones de almacenamiento en comparación con la lipasa original. En un aspecto la variante es más estable bajo condiciones de almacenamiento a una temperatura aumentada en comparación con la lipasa original. La estabilidad mejorada bajo condiciones de almacenamiento se puede determinar usando el protocolo A de ensayo de estabilidad de almacenamiento como se describe en el ejemplo 1.

5 [0043] En un aspecto, la variante tiene una estabilidad mejorada bajo condiciones de almacenamiento (es decir, tiene una estabilidad mejorada de almacenamiento) en presencia de proteasa en comparación con la enzima original. En un aspecto, la variante es más estable bajo condiciones de almacenamiento en presencia de proteasa en comparación con la lipasa original. En un aspecto la variante es más estable bajo condiciones de almacenamiento en presencia de proteasa a una temperatura aumentada en comparación con la lipasa original. La estabilidad mejorada bajo condiciones de almacenamiento en presencia de proteasa se puede determinar usando el protocolo B de ensayo de estabilidad de almacenamiento como se describe en el ejemplo 1.

15 [0044] En un aspecto, la variante tiene una estabilidad mejorada bajo condiciones de almacenamiento (es decir, tiene una estabilidad mejorada de almacenamiento) en presencia de un agente reductor en comparación con la enzima original. En un aspecto, la variante es más estable bajo condiciones de almacenamiento en presencia de un agente reductor en comparación con la lipasa original. En un aspecto la variante es más estable bajo condiciones de almacenamiento en presencia de un agente reductor a una temperatura aumentada en comparación con la lipasa original. La estabilidad mejorada bajo condiciones de almacenamiento en presencia de un agente reductor se puede determinar usando una versión modificada del ensayo de estabilidad de almacenamiento como se describe en el ejemplo 1.

20 [0045] En un aspecto, la variante tiene una estabilidad en detergente mejorada en comparación con la enzima original. En un aspecto, la variante es más estable en detergente en comparación con la lipasa original. En un aspecto la variante es más estable en detergente a una temperatura aumentada en comparación con la lipasa original. La estabilidad mejorada en detergente se puede determinar usando el ensayo de DSC o el ensayo de NanoDSF como se describe en el ejemplo 1.

25 **Lipasas originales**

[0046] En un aspecto, el original tiene una identidad de secuencia con el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 6 de al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 91%, al menos un 92%, al menos un 93%, al menos un 94%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, al menos un 99% o el 100%, que tiene actividad lipásica. En un aspecto, la secuencia de aminoácidos del original difiere en hasta 40 aminoácidos, por ejemplo, 1-40, 1-30, 1-20, 1-10, 1-5, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40, del polipéptido maduro de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 6. En un aspecto, el original comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 4 o la SEQ ID NO: 6. En un aspecto, el original comprende o consiste en el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 6. En un aspecto, el original comprende o consiste en los aminoácidos 1 a 269 de la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 4 o la SEQ ID NO: 6.

40 [0047] En un aspecto, el original es un fragmento de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 6 que contiene al menos un 50%, al menos un 55%, al menos un 60%, al menos un 65%, al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% pero menos del 100% del número de aminoácidos 1 a 269 de la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 4 o la SEQ ID NO: 6. En un aspecto, el original es una variante alélica del polipéptido maduro de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 6.

45 [0048] En un aspecto la lipasa original es una lipasa que es un polipéptido con una secuencia de aminoácidos que: (a) tiene al menos un 90 % de identidad con la lipasa de tipo salvaje derivada de la cepa de *Humicola lanuginosa* DSM 4109; (b) en comparación con dicha lipasa de tipo salvaje, comprende una sustitución de un aminoácido eléctricamente neutro o cargado negativamente en la superficie de la estructura tridimensional dentro de 15 Å de E1 o Q249 con un aminoácido cargado positivamente; y (c) comprende una adición peptídica en el extremo C-terminal; y/o (d) reúne las limitaciones siguientes: (i) comprende un aminoácido negativo en la posición E210 de dicha lipasa de tipo salvaje; (ii) comprende un aminoácido cargado negativamente en la región correspondiente a las posiciones 90-101 de dicha lipasa de tipo salvaje; y (iii) comprende un aminoácido neutro o negativo en una posición correspondiente a N94 de dicha lipasa de tipo salvaje y/o tiene una carga eléctrica neta negativa o neutra en la región correspondiente a las posiciones 90-101 de dicha lipasa de tipo salvaje.

55 [0049] En un aspecto la lipasa original es una lipasa que tiene actividad lipásica, tiene al menos un 80% pero menos del 100% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2 y comprende sustituciones en las posiciones correspondientes a T231R+N233R y al menos una o más (por ejemplo, varias) de D96E, D111A, D254S, G163K, P256T, G91T, D27R y G38A de la SEQ ID NO: 2.

[0050] En un aspecto el original es el polipéptido con la secuencia de la SEQ ID NO: 2. En un aspecto el original es el polipéptido con la secuencia de la SEQ ID NO: 4. En un aspecto el original es el polipéptido con la secuencia de la SEQ ID NO: 6.

5 [0051] El polipéptido puede ser un polipéptido híbrido donde una región de un polipéptido está fusionada en el extremo N-terminal o el extremo C-terminal de una región de otro polipéptido.

10 [0052] El original puede ser un polipéptido de fusión o un polipéptido de fusión escindible donde otro polipéptido está fusionado en el extremo N-terminal o el extremo C-terminal del polipéptido de la presente invención. Un polipéptido de fusión se produce fusionando un polinucleótido que codifica otro polipéptido a un polinucleótido de la presente invención. Técnicas para producir polipéptidos de fusión se conocen en la técnica e incluyen ligar las secuencias codificantes que codifican los polipéptidos de modo que estén en marco y que la expresión del polipéptido de fusión esté bajo control de los mismos promotor(es) y terminador. También se pueden construir polipéptidos de fusión usando la tecnología de inteína donde se crean polipéptidos de fusión postraduccionalmente (Cooper et al., 1993, EMBO J. 12: 2575-2583; Dawson et al., 1994, Science 266: 776-779).

15 [0053] Un polipéptido de fusión puede comprender además un sitio de escisión entre los dos polipéptidos. Tras la secreción de la proteína de fusión, el sitio se escinde liberando dos polipéptidos. Los ejemplos de sitios de escisión incluyen, pero de forma no limitativa, los sitios descritos en Martin et al., 2003, J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 3: 568-576; Svetina et al., 2000, J. Biotechnol. 76: 245-251; Rasmussen-Wilson et al., 1997, Appl. Environ. Microbiol. 63: 3488-3493; Ward et al., 1995, Biotechnology 13: 498-503; y Contreras et al., 1991, Biotechnology 9: 378-381; Eaton et al., 1986, Biochemistry 25: 505-512; Collins-Racie et al., 1995, Biotechnology 13: 982-987; Carter et al., 1989, Proteins: Structure, Function, and Genetics 6: 240-248; y Stevens, 2003, Drug Discovery World 4: 35-48.

[0054] El original se puede obtener de microorganismos de cualquier género. A efectos de la presente invención, el término "obtenido/a/os/as de" como se utiliza en la presente en relación con una fuente dada significará que el original codificado por un polinucleótido es producido por la fuente o por una cepa donde se ha insertado el polinucleótido de la fuente. En un aspecto, el original se secreta extracelularmente.

25 [0055] El original puede ser una lipasa bacteriana. Por ejemplo, el original puede ser un polipéptido bacteriano grampositivo tal como una lipasa de *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Geobacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Oceanobacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* o *Streptomyces*, o un polipéptido bacteriano gramnegativo tal como una lipasa de *Campylobacter*, *E. coli*, *Flavobacterium*, *Fusobacterium*, *Helicobacter*, *Ilyobacter*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Salmonella* o *Ureaplasma*.

30 [0056] En un aspecto, el original es una lipasa de *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* o *Bacillus thuringiensis*.

35 [0057] En un aspecto, el original es una lipasa de *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus uberis* o *Streptococcus equi* subesp. *Zooepidemicus*.

[0058] En un aspecto, el original es una lipasa de *Streptomyces achromogenes*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces griseus* o *Streptomyces lividans*.

40 [0059] El original puede ser una lipasa fúngica. Por ejemplo, el original puede ser una lipasa de levadura tal como una lipasa de *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* o *Yarrowia*; o una lipasa fúngica filamentosa tal como una lipasa de *Acremonium*, *Agaricus*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Botryosphaeria*, *Ceriporiopsis*, *Chaetomidium*, *Chrysosporium*, *Claviceps*, *Cochliobolus*, *Coprinopsis*, *Coptotermes*, *Corynascus*, *Cryphonectria*, *Cryptococcus*, *Diplodia*, *Exidia*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Holomastigotoides*, *Humicola*, *Irpex*, *Lentinula*, *Leptosphaeria*, *Magnaporthe*, *Melanocarpus*, *Meripilus*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Piromyces*, *Poitrasia*, *Pseudoplectanina*, *Pseudotriconympha*, *Rhizomucor*, *Schizophyllum*, *Scytalidium*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolypocladium*, *Trichoderma*, *Trichophaea*, *Verticillium*, *Volvariella* o *Xylaria*.

[0060] En un aspecto, el original es una lipasa de *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis* o *Saccharomyces oviformis*.

50 [0061] En un aspecto, el original es una lipasa de *Acremonium cellulolyticus*, *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*,

Aspergillus oryzae, *Chrysosporium inops*, *Chrysosporium keratinophilum*, *Chrysosporium lucknowense*, *Chrysosporium merdarium*, *Chrysosporium pannicola*, *Chrysosporium queenslandicum*, *Chrysosporium tropicum*, *Chrysosporium zonatum*, *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochroum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, *Fusarium venenatum*, *Humicola grisea*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Irpex lacteus*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium purpurogenum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Thielavia achromatica*, *Thielavia albomyces*, *Thielavia albopilosa*, *Thielavia australeinsis*, *Thielavia fimeti*, *Thielavia microspora*, *Thielavia ovispora*, *Thielavia peruviana*, *Thielavia setosa*, *Thielavia spededonium*, *Thielavia subthermophila*, *Thielavia terrestris*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei* o *Trichoderma viride*.

[0062] En un aspecto, el original es una lipasa de *Humicola lanuginosa*, por ejemplo, la lipasa de SEQ ID NO: 2 o el polipéptido maduro de la misma.

[0063] Se entenderá que, para las especies anteriormente mencionadas, la invención abarca tanto los estados perfectos como los imperfectos y otros equivalentes taxonómicos, por ejemplo, anamorfos, independientemente del nombre de especie por el que cual se conocen. Aquellas personas expertas en la técnica reconocerán fácilmente la identidad de equivalentes apropiados.

[0064] Cepas de estas especies son fácilmente accesibles al público en un número de colecciones de cultivos, como la American Type Culture Collection (ATCC), la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), la Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS) y la Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center (NRRL).

[0065] El original se puede identificar y obtener de otras fuentes, incluidos microorganismos aislados de la naturaleza (por ejemplo, suelo, abonos, agua, etc.) o muestras de ADN obtenidas directamente de materiales naturales (por ejemplo, suelo, abonos, agua, etc.) usando las sondas anteriormente mencionadas. Técnicas para aislar microorganismos y ADN directamente de hábitats naturales se conocen en la técnica. Un polinucleótido que codifica un original puede luego obtenerse cribando de forma similar una biblioteca de ADN genómico o ADNc de otro microorganismo o muestra de ADN mixto. Una vez un polinucleótido que codifica un original se ha detectado con la(s) sonda(s), el polinucleótido se puede aislar o clonar utilizando técnicas que son conocidas por aquellas personas expertas en la materia (véase, por ejemplo, Sambrook et al., 1989, *supra*).

Preparación de variantes

[0066] La presente invención también se refiere a métodos para obtener una variante de una lipasa original, que comprenden introducir en una lipasa original una sustitución en las posiciones correspondientes a E1C y N233C del polipéptido maduro mostrado como los aminoácidos numerados del 1 al 269 de la SEQ ID NO: 2, donde la variante tiene actividad lipásica y tiene al menos un 80% pero menos del 100% de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la lipasa original mostrado como los aminoácidos numerados del 1 al 269 de la SEQ ID NO: 2; donde la variante tiene una estabilidad mejorada en relación con la lipasa original; y recuperar la variante.

[0067] Las variantes se pueden preparar usando cualquier procedimiento de mutagénesis conocido en la técnica, tal como la mutagénesis dirigida al sitio, la construcción de genes sintéticos, la construcción de genes semisintéticos, la mutagénesis aleatoria, la transposición, etc.

[0068] La mutagénesis dirigida al sitio es una técnica donde una o más (por ejemplo, varias) mutaciones se introducen en uno o más sitios definidos en un polinucleótido que codifica el original.

[0069] La mutagénesis dirigida al sitio se puede realizar *in vitro* por PCR, que implica el uso de cebadores de oligonucleótidos con la mutación deseada. La mutagénesis dirigida al sitio también puede realizarse *in vitro* por mutagénesis de "cassette", que implica la escisión por una enzima de restricción en un sitio en el plásmido que comprende un polinucleótido que codifica el original y el ligamiento posterior 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 que los extremos pegajosos del plásmido y el inserto se enlacen entre sí. Véanse, por ejemplo, Scherer y Davis, 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 4949-4955; y Barton et al., 1990, Nucleic Acids Res. 18: 7349-4966.

[0070] La mutagénesis dirigida al sitio también puede realizarse *in vivo* por métodos conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º 2004/0171154; Storici et al., 2001, Nature

Biotechnol. 19: 773-776; Kren et al., 1998, Nat. Med. 4: 285-290; y Calissano y Macino, 1996, Fungal Genet. Newslett. 43: 15-16.

[0071] Cualquier procedimiento de mutagénesis dirigida al sitio se puede usar en la presente invención. Hay muchos kits comerciales disponibles que se pueden usar para preparar variantes.

5 [0072] La construcción de genes sintéticos implica la síntesis *in vitro* de una molécula de polinucleótido diseñada para codificar un polipéptido de interés. La síntesis génica se puede realizar utilizando una serie de técnicas, como la tecnología multiplex basada en microchips descrita por Tian et al. (2004, Nature 432: 1050-1054) y tecnologías similares donde se sintetizan oligonucleótidos y se ensamblan sobre chips microfluídicos fotoprogramables.

10 [0073] Sustituciones, deleciones, y/o inserciones de aminoácidos únicos o múltiples se pueden hacer y evaluar usando métodos conocidos de mutagénesis, recombinación y/o transposición, seguidos de un procedimiento de cribado relevante, tales como los descritos por Reidhaar-Olson y Sauer, 1988, Science 241: 53-57; Bowie y Sauer, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 2152-2156; WO95/17413; o WO95/22625. Otros métodos que se pueden usar incluyen la PCR con tendencia al error, la presentación en fagos (por ejemplo, Lowman et al., 1991, Biochemistry 30: 10832-10837; US5,223,409; WO92/06204) y la mutagénesis dirigida a la región (Derbyshire et al., 1986, Gene 15 46: 145; Ner et al., 1988, DNA 7: 127).

[0074] Los métodos de mutagénesis/transposición se pueden combinar con métodos de cribado automatizados de alto rendimiento para detectar la actividad de polipéptidos clonados mutagenizados expresados por células huésped (Ness et al., 1999, Nature Biotechnology 17: 893-896). Las moléculas de ADN mutagenizadas que codifican polipéptidos activos se pueden recuperar de las células huésped y secuenciar rápidamente usando métodos 20 estándar en la técnica. Estos métodos permiten la determinación rápida de la importancia de residuos de aminoácidos individuales en un polipéptido.

[0075] La construcción de genes semisintéticos se realiza combinando aspectos de la construcción de genes sintéticos y/o la mutagénesis dirigida al sitio y/o la mutagénesis aleatoria y/o la transposición. La construcción semisintética se caracteriza por un proceso en el que se utilizan fragmentos de polinucleótidos que se sintetizan, 25 en combinación con técnicas PCR. Así, se pueden sintetizar *de novo* regiones definidas de genes, mientras que otras regiones se pueden amplificar usando cebadores mutagénicos específicos de sitio, mientras aún otras regiones se pueden someter a una amplificación por PCR con tendencia al error o por PCR sin tendencia al error. Las subsecuencias de polinucleótidos pueden luego ser redistribuidas.

Polinucleótidos

30 [0076] La presente invención también se refiere a polinucleótidos que codifican una variante de la presente invención.

Constructos de ácido nucleico

[0077] La presente invención también se refiere a constructos de ácido nucleico que comprenden un polinucleótido que codifica una variante de la presente invención operativamente enlazada para una o más secuencias de control 35 que dirigen la expresión de la secuencia codificante en una célula huésped adecuada bajo condiciones compatibles con las secuencias de control.

[0078] El polinucleótido se puede manipular de diversas maneras para proveer a la expresión de una variante. La manipulación del polinucleótido antes de su inserción en un vector puede ser deseable o necesaria dependiendo del vector de expresión. Las técnicas para modificar polinucleótidos utilizando métodos de ADN recombinante son 40 bien conocidas en la técnica.

[0079] La secuencia de control puede ser un promotor, un polinucleótido que es reconocido por una célula huésped para la expresión del polinucleótido. El promotor contiene secuencias de control transcripcionales que median la expresión de la variante. El promotor puede ser cualquier polinucleótido que muestre actividad transcripcional en la célula huésped incluidos promotores mutantes, truncados e híbridos, y se puede obtener de genes que codifican 45 polipéptidos extracelulares o intracelulares tanto homólogos como heterólogos respecto a la célula huésped.

[0080] Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de los constructos de ácido nucleico de la presente invención en una célula huésped bacteriana son los promotores obtenidos del gen de la alfa-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* (*amyQ*), el gen de la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (*amyL*), el gen de la penicilinas de *Bacillus licheniformis* (*penP*), el gen de la amilasa maltogénica de *Bacillus stearothermophilus* (*amyM*), el gen de la levansucrasa de *Bacillus subtilis* (*sacB*), los genes de *xylA* y *xylB* de *Bacillus subtilis*, el gen 50

cryIIIA de *Bacillus thuringiensis* (Agaïsse y Lereclus, 1994, Molecular Microbiology 13: 97-107), el operón *lac* de *E. coli*, el promotor *trc* de *E. coli* (Egon et al., 1988, Gene 69: 301-315), el gen de la agarasa de *Streptomyces coelicolor* (*dagA*) y el gen de la beta-lactamasa procariótica (Villa-Kamaroff et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 3727-3731), así como el promotor *tac* (DeBoer et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 21-25). Promotores adicionales se describen en "Useful proteins from recombinant bacteria" en Gilbert et al., 1980, Scientific American 242: 74-94; y en Sambrook et al., 1989, *supra*. Ejemplos de promotores en serie se describen en WO99/43835.

[0081] Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de los constructos de ácido nucleico de la presente invención en una célula huésped fúngica filamentosa son promotores obtenidos de los genes para la acetamidasa de *Aspergillus nidulans*, la alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger*, la alfa-amilasa estable en ácido de *Aspergillus niger*, la glucoamilasa (*glaA*) de *Aspergillus niger* o *Aspergillus awamori*, la TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, la proteasa alcalina de *Aspergillus oryzae*, la triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae*, la proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum* (WO96/00787), la amiloglucosidasa de *Fusarium venenatum* (WO00/56900), Daria de *Fusarium venenatum* (WO00/56900), Quinn de *Fusarium venenatum* (WO00/56900), la lipasa de *Rhizomucor miehei*, la proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, la beta-glucosidasa de *Trichoderma reesei*, la celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei*, la celobiohidrolasa II de *Trichoderma reesei*, la endoglucanasa de *Trichoderma reesei*, la endoglucanasa II de *Trichoderma reesei*, la endoglucanasa III de *Trichoderma reesei*, la endoglucanasa IV de *Trichoderma reesei*, la endoglucanasa V de *Trichoderma reesei*, la xilanasa I de *Trichoderma reesei*, la xilanasa II de *Trichoderma reesei*, la beta-xilosidasa de *Trichoderma reesei*, así como el promotor NA2-tpi (un promotor modificado a partir de un gen de la alfa-amilasa neutra de *Aspergillus* donde el líder no traducido se ha sustituido por un líder no traducido de un gen de triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus*; los ejemplos no limitativos incluyen promotores modificados a partir de un gen de la alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger* donde el líder no traducido se ha sustituido por un líder no traducido de un gen de triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus oryzae*); y promotores mutantes, truncados e híbridos de los mismos.

[0082] En un huésped de levadura, se obtienen promotores útiles de los genes para la enolasa (ENO-1) de *Saccharomyces cerevisiae*, la galactocinasa (GAL1) de *Saccharomyces cerevisiae*, la alcohol dehidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfatodeshidrogenasa (ADH1, ADH2/GAP) de *Saccharomyces cerevisiae*, la triosa fosfato isomerasa (TPI) de *Saccharomyces cerevisiae*, la metalotioneína (CUP1) de *Saccharomyces cerevisiae* y la quinasa de 3-fosfoglicerato de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros promotores útiles para células huésped de levadura son descritos por Romanos et al., 1992, Yeast 8: 423-488.

[0083] La secuencia de control también puede ser un terminador de la transcripción, que es reconocido por una célula huésped para terminar la transcripción. La secuencia terminadora está operativamente enlazada al extremo 3' del polinucleótido que codifica la variante. Se puede usar cualquier terminador que sea funcional en la célula huésped.

[0084] Terminadores preferidos para células huésped bacterianas son obtenidos de los genes para la proteasa alcalina (*aprH*) de *Bacillus clausii*, la alfa-amilasa (*amyL*) de *Bacillus licheniformis* y el ARN ribosómico (*rrnB*) de *Escherichia coli*.

[0085] Terminadores preferidos para células huésped fúngicas filamentosas son obtenidos de los genes para la antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, la glucoamilasa de *Aspergillus niger*, la alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger*, la TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae* y la proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum*.

[0086] Terminadores preferidos para células huésped de levadura son obtenidos de los genes para la enolasa de *Saccharomyces cerevisiae*, el citocromo C (CYC1) de *Saccharomyces cerevisiae* y la gliceraldehído-3-fosfatodeshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros terminadores útiles para células huésped de levadura son descritos por Romanos et al., 1992, *supra*.

[0087] La secuencia de control también puede ser una región estabilizadora de ARNm aguas abajo de un promotor y aguas arriba de la secuencia codificante de un gen que aumenta la expresión del gen.

[0088] Ejemplos de regiones estabilizadoras de ARNm adecuadas se obtienen de un gen *cryIIIA* de *Bacillus thuringiensis* (WO94/25612) y un gen SP82 de *Bacillus subtilis* (Hue et al., 1995, Journal of Bacteriology 177: 3465-3471).

[0089] La secuencia de control también puede ser un líder, una región no traducida de un ARNm que sea importante para la traducción por la célula huésped. La secuencia líder está operativamente enlazada al extremo 5' del polinucleótido que codifica la variante. Se puede usar cualquier líder que sea funcional en la célula huésped.

[0090] Líderes preferidos para células huésped fúngicas filamentosas son obtenidos de los genes para la TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae* y la triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans*.

[0091] Líderes adecuados para células huésped de levadura son obtenidos de los genes para la enolasa (ENO-1) de *Saccharomyces cerevisiae*, la quinasa de 3-fosfoglicerato de *Saccharomyces cerevisiae*, el factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae* y la alcohol deshidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa (ADH2/GAP) de *Saccharomyces cerevisiae*.

[0092] La secuencia de control también puede ser una secuencia de poliadenilación, una secuencia operativamente enlazada al extremo 3' de la secuencia de codificación de la variante y, 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.

[0093] Secuencias de poliadenilación preferidas para células huésped fúngicas filamentosas son obtenidas de los genes para la antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, la glucoamilasa de *Aspergillus niger*, la alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger*, la TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae* y la proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum*.

[0094] Secuencias de poliadenilación útiles para células huésped de levadura son descritas por Guo y Sherman, 1995, Mol. Cellular Biol. 15: 5983-5990.

[0095] La secuencia de control también puede ser una región codificante del péptido señal que codifica un péptido señal enlazado al extremo N-terminal de una variante y dirige la variante hacia la vía secretora de la célula. El extremo 5' de la secuencia codificante del polinucleótido puede contener intrínsecamente una secuencia codificante del péptido señal enlazada naturalmente en el marco de lectura de traducción con el segmento de la secuencia codificante que codifica la variante. Alternativamente, el extremo 5' de la secuencia codificante puede contener una secuencia codificante del péptido señal que sea foránea respecto a la secuencia codificante. Se puede requerir una secuencia codificante del péptido señal foránea en la que la secuencia codificante no contenga naturalmente una secuencia codificante del péptido señal. Alternativamente, una secuencia codificante del péptido señal foránea puede simplemente reemplazar la secuencia codificante del péptido señal natural para aumentar la secreción de la variante. Sin embargo, se puede usar cualquier secuencia codificante del péptido señal que dirija la variante expresada hacia la vía secretora de una célula huésped.

[0096] Secuencias codificantes del péptido señal eficaces para células huésped bacterianas son las secuencias codificantes del péptido señal obtenidas de los genes para la amilasa maltogénica de *Bacillus* NCIB 11837, la subtilisina de *Bacillus licheniformis*, la beta-lactamasa de *Bacillus licheniformis*, la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, las proteasas neutras (nprT, nprS, nprM) de *Bacillus stearothermophilus* y prsA de *Bacillus subtilis*. Péptidos señal adicionales son descritos por Simonen y Palva, 1993, Microbiological Reviews 57: 109-137.

[0097] Secuencias codificantes del péptido señal eficaces para células huésped fúngicas filamentosas son las secuencias codificantes del péptido señal obtenidas de los genes para la amilasa neutra de *Aspergillus niger*, la glucoamilasa de *Aspergillus niger*, la TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, la celulasa de *Humicola insolens*, la endoglucanasa V de *Humicola insolens*, la lipasa de *Humicola lanuginosa* y la proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*.

[0098] Péptidos señal útiles para células huésped de levadura son obtenidos de los genes para el factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae* y la invertasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otras secuencias codificantes de péptidos señal útiles son descritas por Romanos et al., 1992, *supra*.

[0099] La secuencia de control también puede ser una secuencia codificante de un propéptido que codifica un propéptido situado en el extremo N-terminal de una variante. El polipéptido resultante se conoce como una proenzima o propolipéptido (o un zimógeno en algunos casos). Un propolipéptido es generalmente inactivo y se puede convertir en un polipéptido activo por escisión catalítica o autocatalítica del propéptido a partir del propolipéptido. La secuencia codificante del propéptido puede ser obtenida de los genes para la proteasa alcalina de *Bacillus subtilis* (aprE), la proteasa neutra de *Bacillus subtilis* (nprT), la lacasa de *Myceliophthora thermophila* (WO 95/33836), la proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei* y el factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae*.

[0100] Cuando tanto el péptido señal como las secuencias de propéptido están presentes, la secuencia de propéptido está situada junto al extremo N-terminal de la variante y la secuencia de péptido señal está situada junto al extremo N-terminal de la secuencia de propéptido.

[0101] También puede ser deseable añadir secuencias reguladoras que regulen la expresión de la variante en relación con el crecimiento de la célula huésped. Ejemplos de sistemas reguladores son aquellos que causan 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. Los sistemas reguladores en sistemas procarióticos incluyen los sistemas operadores *lac*, *tac* y *trp*. En levadura, se puede usar el sistema ADH2 o el sistema GAL1. En hongos filamentosos, se pueden usar el promotor de la glucoamilasa de *Aspergillus niger*, el promotor de la TAKA alfa-amilasa de *Aspergillus oryzae* y el promotor de la glucoamilasa de *Aspergillus oryzae*. Otros ejemplos de secuencias reguladoras son aquellas que permiten la amplificación génica. En sistemas eucarióticos, estas secuencias reguladoras incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa que se amplifica en presencia de metotrexato y los genes de metalotioneína que se amplifican con metales pesados. En estos casos, el polinucleótido que codifica la variante estaría operativamente enlazado con la secuencia reguladora.

10 Vectores de expresión

[0102] La presente invención también se refiere a vectores de expresión recombinantes que comprenden un polinucleótido que codifica una variante de la presente invención, un promotor y señales de parada transcripcional y traslacional. Las varias secuencias de nucleótidos y de control se pueden unir para producir un vector de expresión recombinante que puede incluir uno o más sitios de restricción convenientes para permitir la inserción o la sustitución del polinucleótido que codifica la variante en tales sitios. Alternativamente, el polinucleótido se puede expresar mediante la inserción del polinucleótido o un constructo de ácido nucleico que comprende el polinucleótido en un vector apropiado para la expresión. En la creación del vector de expresión, la secuencia codificante se localiza en el vector de modo que la secuencia codificante esté operativamente enlazada con las secuencias de control apropiadas para la expresión.

[0103] El vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector (por ejemplo, un plásmido o un virus) que se pueda someter convenientemente a procedimientos de ADN recombinante y puede dar lugar a la expresión del polinucleótido. La elección del vector dependerá típicamente de la compatibilidad del vector con la célula huésped en la que el vector se va a introducir. El vector puede ser un plásmido lineal o circular cerrado.

[0104] El vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, la replicación del cual es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido, un elemento extracromosómico, un minicromosoma o un cromosoma artificial. El vector puede contener cualquier medio para asegurar la autorreplicación. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en la célula huésped, se integra en el genoma y se replica junto con el/los cromosoma(s) en que se ha integrado. Además, se puede usar un vector o plásmido único o dos o más vectores o plásmidos que juntos contengan el ADN total que se va a introducir en el genoma de la célula huésped, o un transposón.

[0105] 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 viral, resistencia a metales pesados, prototrofia a auxótrofos, y similar.

[0106] Ejemplos de marcadores seleccionables bacterianos son genes *dal* de *Bacillus licheniformis* o *Bacillus subtilis*, o marcadores que confieren resistencia antibiótica tal como resistencia a ampicilina, cloranfenicol, canamicina, neomicina, espectinomicina o tetraciclina. Marcadores adecuados para células huésped de levadura incluyen, pero de forma no limitativa, ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1 y URA3. Los marcadores seleccionables para usar en una célula huésped fúngica filamentosa incluyen, pero de forma no limitativa, *amdS* (acetamidasa), *argB* (ornitina-carbamoiltransferasa), *bar* (fosfonitricina acetiltransferasa), *hph* (higromicina fosfotransferasa), *niaD* (nitrato-reductasa), *pyrG* (orotidina-5'-fosfato-descarboxilasa), *sC* (sulfato adeniltransferasa) y *trpC* (antranilato sintasa), así como equivalentes de los mismos. Para usar en una célula de *Aspergillus* se prefieren los genes *amdS* y *pyrG* de *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus oryzae* y un gen *bar* de *Streptomyces hygroscopicus*.

[0107] El vector contiene preferiblemente un elemento o elementos que permite(n) la integración del vector en el genoma de la célula huésped o la replicación autónoma del vector en la célula independientemente del genoma.

[0108] Para la integración en el genoma de la célula huésped, el vector puede depender de la secuencia del polinucleótido que codifica la variante 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 huésped en una ubicación o ubicaciones precisa(s) en el/los cromosoma(s). Para aumentar la probabilidad de integración en una ubicación precisa, los elementos de integración deben contener un número suficiente de ácidos nucleicos, 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 la secuencia diana correspondiente para aumentar la probabilidad de una recombinación homóloga. Los elementos de integración pueden ser cualquier secuencia que sea homóloga a la secuencia diana en el genoma de la célula huésped. Además, los elementos de integración pueden ser

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

[0109] Para la replicación autónoma, el vector puede comprender además un origen de replicación que permita que el vector se replique autónomamente en la célula huésped en cuestión. El origen de replicación puede ser cualquier replicador plasmídico que medie la replicación autónoma que funcione en una célula. El término "origen de replicación" o "replicador plasmídico" significa un polinucleótido que permite que un plásmido o vector se replique *in vivo*.

[0110] Ejemplos de orígenes bacterianos de replicación 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 pAMB1 que permiten la replicación en *Bacillus*.

[0111] Ejemplos de orígenes de replicación para usar en una célula huésped de levadura son el origen de replicación de 2 micras, ARS1, ARS4, la combinación de ARS1 y CEN3 y la combinación de ARS4 y CEN6.

[0112] Ejemplos de orígenes de replicación útiles en una célula fúngica filamentosa son AMA1 y ANS1 (Gems et al., 1991, Gene 98: 61-67; Cullen et al., 1987, Nucleic Acids Res. 15: 9163-9175; WO 00/24883). El aislamiento del gen AMA1 y la construcción de plásmidos o vectores que comprenden el gen se puede conseguir según los métodos descritos en WO 00/24883.

[0113] Se pueden insertar más de una copia de un polinucleótido de la presente invención en una célula huésped para aumentar la producción de una variante. Un aumento en el número de copias del polinucleótido se puede obtener integrando al menos una copia adicional de la secuencia en el genoma de la célula huésped o incluyendo un gen marcador seleccionable amplificable con el polinucleótido, donde las células que contienen copias amplificadas del gen marcador seleccionable, y así copias adicionales del polinucleótido, se pueden seleccionar para cultivar las células en presencia del agente seleccionable apropiado.

[0114] Los procedimientos usados para ligar los elementos anteriormente descritos para construir los vectores de expresión recombinantes de la presente invención son bien conocidos por una persona experta en la materia (véase, por ejemplo, Sambrook et al., 1989, *supra*).

Células huésped

[0115] La presente invención también se refiere a células huésped recombinantes, que comprenden un polinucleótido que codifica una variante de la presente invención operativamente enlazada a una o más secuencias de control que dirigen la producción de una variante de la presente invención. Un constructo o vector que comprende un polinucleótido se introduce en una célula huésped de modo que el constructo o el vector se mantiene como un integrante cromosómico o como un vector extracromosómico que se autorreplica como se ha descrito anteriormente. El término "célula huésped" abarca cualquier descendiente de una célula original que no es idéntico a la célula original debido a mutaciones que ocurren durante la replicación. La elección de una célula huésped dependerá en gran parte del gen que codifica la variante y su fuente.

[0116] La célula huésped puede ser cualquier célula útil en la producción recombinante de una variante, por ejemplo, una procariota o una eucariota.

[0117] La célula huésped procariótica puede ser cualquier bacteria grampositiva o gramnegativa. Las bacterias grampositivas incluyen, pero de forma no limitativa, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Geobacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Oceanobacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Streptomyces*. Las bacterias gramnegativas incluyen, pero de forma no limitativa, *Campylobacter*, *E. coli*, *Flavobacterium*, *Fusobacterium*, *Helicobacter*, *Ilyobacter*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Salmonella* y *Ureaplasma*.

[0118] La célula huésped bacteriana puede ser cualquier célula de *Bacillus* incluidas, pero de forma no limitativa, células de *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus thuringiensis*.

[0119] La célula huésped bacteriana también puede ser cualquier célula de *Streptococcus* incluidas, pero de forma no limitativa, células de *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus uberis* y *Streptococcus equi* subesp. *Zooepidemicus*.

[0120] La célula huésped bacteriana también puede ser cualquier célula de *Streptomyces*, incluidas, pero de forma no limitativa, células de *Streptomyces achromogenes*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces griseus* y *Streptomyces lividans*.

[0121] La introducción de ADN en una célula de *Bacillus* se puede efectuar por transformación de protoplastos (véase, por ejemplo, Chang y Cohen, 1979, Mol. Gen. Genet. 168: 111-115), transformación de células competentes (véanse, por ejemplo, Young y Spizizen, 1961, J. Bacteriol. 81: 823-829 o Dubnau y Davidoff-Abelson, 1971, J. Mol. Biol. 56: 209-221), electroporación (véase, por ejemplo, Shigekawa y Dower, 1988, Biotechniques 6: 742-751) o conjugación (véase, por ejemplo, Koehler y Thorne, 1987, J. Bacteriol. 169: 5271-5278). La introducción de ADN en una célula de *E. coli* se puede efectuar por transformación de protoplastos (véase, por ejemplo, Hanahan, 1983, J. Mol. Biol. 166: 557-580) o electroporación (véase, por ejemplo, Dower et al., 1988, Nucleic Acids Res. 16: 6127-6145). La introducción de ADN en una célula de *Streptomyces* se puede efectuar por transformación de protoplastos, electroporación (véase, por ejemplo, Gong et al., 2004, Folia Microbiol. (Praha) 49: 399-405), conjugación (véase, por ejemplo, Mazodier et al., 1989, J. Bacteriol. 171: 3583-3585) o transducción (véase, por ejemplo, Burke et al., 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 6289-6294). La introducción de ADN en una célula de *Pseudomonas* se puede efectuar por electroporación (véase, por ejemplo, Choi et al., 2006, J. Microbiol. Methods 64: 391-397) o conjugación (véase, por ejemplo, Pinedo y Smets, 2005, Appl. Environ. Microbiol. 71: 51-57). La introducción de ADN en una célula de *Streptococcus* se puede efectuar por competencia natural (véase, por ejemplo, Perry y Kuramitsu, 1981, Infect. Immun. 32: 1295-1297), transformación de protoplastos (véase, por ejemplo, Catt y Jollick, 1991, Microbios 68: 189-207), electroporación (véase, por ejemplo, Buckley et al., 1999, Appl. Environ. Microbiol. 65: 3800-3804) o conjugación (véase, por ejemplo, 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.

[0122] La célula huésped también puede ser una eucariota, tal como una célula de mamífero, de insecto, vegetal o fúngica.

[0123] La célula huésped puede ser una célula fúngica. "Hongos" como se utiliza en la presente incluye los filos Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota y Zygomycota, así como el Oomycota y todos los hongos mitospóricos (según definen Hawkswort et al., en Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi, 8ª edición, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, Reino Unido).

[0124] La célula huésped fúngica puede ser una célula de levadura. "Levadura" como se utiliza en la presente incluye levadura ascoesporógena (Endomycetales), levadura basidioesporógena y levadura de los hongos imperfectos (Blastomycetes). Ya que la clasificación de las levaduras puede cambiar en el futuro, para los fines de esta invención, levadura debe definirse como se describe en Biology and Activities of Yeast (Skinner, Passmore y Davenport, editores, Soc. App. Bacteriol. Symposium Series No. 9, 1980).

[0125] La célula huésped de levadura puede ser una célula de *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* o *Yarrowia* tales como una célula de *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis*, *Saccharomyces oviformis* o *Yarrowia lipolytica*.

[0126] La célula huésped fúngica puede ser una célula fúngica filamentosa. Los "hongos filamentosos" incluyen todas las formas filamentosas de la subdivisión Eumycota y Oomycota (según definen Hawkswort et al., 1995, *supra*). Los hongos filamentosos se caracterizan generalmente por una pared micelial compuesta por quitina, celulosa, glucano, quitosano, manano y otros polisacáridos complejos. El crecimiento vegetativo es por elongación de hifas y el catabolismo del carbono es estrictamente aeróbico. En cambio, el crecimiento vegetativo por levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae* es por brote de un talo unicelular y el catabolismo del carbono puede ser fermentativo.

[0127] La célula huésped fúngica filamentosa puede ser una célula de *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Bjerkandera*, *Ceriporiopsis*, *Chrysosporium*, *Coprinus*, *Coriolus*, *Cryptococcus*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Phlebia*, *Piromyces*, *Pleurotus*, *Schizophyllum*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolypocladium*, *Trametes* o *Trichoderma*.

[0128] Por ejemplo, la célula huésped fúngica filamentosa puede ser una célula de *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Bjerkandera adusta*, *Ceriporiopsis aneirina*, *Ceriporiopsis caregiea*, *Ceriporiopsis gilvescens*, *Ceriporiopsis pannocinta*, *Ceriporiopsis rivulosa*, *Ceriporiopsis subrufa*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Chrysosporium inops*, *Chrysosporium keratinophilum*, *Chrysosporium lucknowense*, *Chrysosporium merdarium*, *Chrysosporium pannicola*, *Chrysosporium queenslandicum*, *Chrysosporium tropicum*, *Chrysosporium zonatum*, *Coprinus cinereus*,

Coriolus hirsutus, *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochroum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, *Fusarium venenatum*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Mucormiehei*, *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*.

[0129] Las células fúngicas se pueden transformar por un proceso que implique la formación de protoplastos, la transformación de los protoplastos y la regeneración de la pared celular de una manera conocida *per se*. Se describen procedimientos adecuados para la transformación de células huésped de *Aspergillus* y *Trichoderma* en EP 238023, Yelton et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 1470-1474 y Christensen et al., 1988, Bio/Technology 6: 1419-1422. Se describen métodos adecuados para transformar especies de *Fusarium* en Malardier et al., 1989, Gene 78: 147-156 y WO 96/00787. Las levaduras pueden transformarse usando los procedimientos descritos por Becker y Guarente, en Abelson, J.N. y Simon, M.I., editores, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, volumen 194, págs. 182-187, Academic Press, Inc., Nueva York; Ito et al., 1983, J. Bacteriol. 153: 163; y Hinnen et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 1920.

Métodos de producción

[0130] La presente invención también se refiere a métodos de producción de una variante, que comprenden: (a) cultivar una célula huésped de la presente invención bajo condiciones adecuadas para la expresión de la variante; y (b) recuperar la variante.

[0131] Las células huésped se cultivan en un medio nutritivo adecuado para la producción de la variante usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la célula se puede cultivar por cultivo en matraz de agitación, o fermentación a pequeña escala o a gran escala (incluidas las fermentaciones continuas, por lote, por lote alimentado o en estado sólido) en fermentadores de laboratorio o industriales realizados en un medio adecuado y bajo condiciones que permiten que la variante sea expresada y/o aislada. El cultivo tiene lugar en un medio nutritivo adecuado que comprende fuentes de nitrógeno y carbono y sales inorgánicas, usando procedimientos conocidos en la técnica. Los medios adecuados están disponibles de proveedores comerciales o se pueden preparar según composiciones publicadas (por ejemplo, en catálogos de la American Type Culture Collection). Si la variante se secreta en el medio nutritivo, la variante se puede recuperar directamente del medio. Si la variante no se secreta, se puede recuperar de lisados celulares.

[0132] La variante se puede detectar usando métodos conocidos en la técnica que sean específicos para las variantes. Estos métodos de detección incluyen, pero de forma no 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 de la variante. La actividad lipásica se puede determinar usando el ensayo de p-nitrofenilo (pNP) como se describe en la sección "Ejemplos".

[0133] La variante se puede recuperar usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la variante se puede recuperar del medio nutritivo por procedimientos convencionales que incluyen, pero de forma no limitativa, la recolección, la centrifugación, la filtración, la extracción, el secado por pulverización, la evaporación o la precipitación.

[0134] La variante se puede purificar por una variedad de procedimientos conocidos en la técnica que incluyen, pero de forma no limitativa, la cromatografía (por ejemplo, de intercambio iónico, de afinidad, hidrofóbica, el cromatografía de exclusión por tamaño), procedimientos electroforéticos (por ejemplo, el isoelectroenfoque preparativo), la solubilidad diferencial (por ejemplo, la precipitación con sulfato amónico), la SDS-PAGE o la extracción (véase, por ejemplo, Protein Purification, Janson y Ryden, editores, VCH Publishers, Nueva York, 1989) para obtener variantes sustancialmente puras.

[0135] En un aspecto, la variante no se recupera, sino que se usa una célula huésped de la presente invención que expresa la variante como una fuente de la variante.

Composiciones

[0136] La presente invención también se refiere a composiciones que comprenden una variante de lipasa de la presente invención. En ciertos aspectos la presente invención se refiere a una composición detergente que comprende una variante de una lipasa original, variante que comprende sustituciones en las posiciones

correspondientes a E1C y N233C del polipéptido maduro mostrado como los aminoácidos numerados del 1 al 269 de la SEQ ID NO: 2, tiene actividad lipásica y tiene al menos un 80% pero menos del 100% de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la lipasa original mostrado como los aminoácidos numerados del 1 al 269 de la SEQ ID NO: 2, donde la variante tiene una estabilidad mejorada en relación con la lipasa original.

5 [0137] En un aspecto la lipasa original es una lipasa que es un polipéptido con una secuencia de aminoácidos que: (a) tiene al menos un 90 % de identidad con la lipasa de tipo salvaje derivada de la cepa de *Humicola lanuginosa* DSM 4109; (b) en comparación con dicha lipasa de tipo salvaje, comprende una sustitución de un aminoácido eléctricamente neutro o cargado negativamente en la superficie de la estructura tridimensional dentro de 15 Å de E1 o Q249 con un aminoácido cargado positivamente; y (c) comprende una adición peptídica en el extremo C-terminal; y/o (d) reúne las limitaciones siguientes: (i) comprende un aminoácido negativo en la posición E210 de dicha lipasa de tipo salvaje; (ii) comprende un aminoácido cargado negativamente en la región correspondiente a las posiciones 90-101 de dicha lipasa de tipo salvaje; y (iii) comprende un aminoácido neutro o negativo en una posición correspondiente a N94 de dicha lipasa de tipo salvaje y/o tiene una carga eléctrica neta negativa o neutra en la región correspondiente a las posiciones 90-101 de dicha lipasa de tipo salvaje.

15 [0138] En un aspecto la lipasa original es una lipasa que tiene actividad lipásica, tiene al menos un 80% pero menos del 100% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2 y comprende sustituciones en las posiciones correspondientes a T231R+N233R y al menos una o más (por ejemplo, varias) de D96E, D111A, D254S, G163K, P256T, G91T, D27R y G38A de la SEQ ID NO: 2.

20 [0139] En un aspecto la lipasa original tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 4 o la SEQ ID NO: 6. En un aspecto la lipasa original comprende o consiste en el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 6.

[0140] En un aspecto la invención se refiere a composiciones que comprenden variantes de lipasa que comprenden además una sustitución en una posición correspondiente a cualquiera de las posiciones; 2, 4, 8, 11, 15, 27, 33, 38, 43, 48, 51, 54, 56, 57, 58, 60, 69, 71, 83, 86, 91, 92, 94, 96, 97, 98, 99, 101, 111, 123, 150, 152, 163, 176, 179, 187, 188, 189, 198, 199, 200, 210, 216, 220, 224, 225, 227, 228, 229, 231, 236, 238, 239, 246, 249, 254, 255, 256, 257, 260, 263, 264, 265, 266, 267, 269 de la SEQ ID NO: 2. En un aspecto las sustituciones se seleccionan de: V2K, Q4R, Q4V, N8R, N11R, Q15C, D27G, D27R, N33K, N33Q, G38A, E43C, D48C, F51V, S54T, E56K, D57G, S58A, V60K, V60S, L69R, N71C, S83T, I86V, G91A, G91N, G91Q, N92D, N94K, N94R, D96E, D96G, D96L, D96W, L97M, K98E, K98I, K98Q, E99K, E99N, N101D, N101S, D111A, T123V, A150G, A152G, G163K, V176L, R179L, V187Y, V187W, Q188R, T189Y, T189W, H198S, T199R, N200R, E210K, E210Q, S216P, Y220F, S224R, G225R, L227G, L227R, V228R, P229R, T231R, V236R, L238C, E239C, G246C, Q249R, D254S, I255G, P256K, P256T, P256V, A257I, A257V, W260C, G263Q, L264A, I265T, G266D, T267A, L269N, L269V de la SEQ ID NO: 2. En un aspecto un conjunto de sustituciones se selecciona de: E1C D27R N33K G38A F51V S54T E56K D96E K98I D111A G163K N233C D254S P256T; E1C V2K D27G N33K G38A F51V D96E D111A G163K N233C D254S P256T; E1C V2K D27R N33K G38A F51V D96E D111A G163K Q188R N233C D254S P256T; E1C D27R G38A G91A N92D D96L K98Q D111A G163K N233C D254S P256T; E1C D27R G38A G91N N94R D96E D111A G163K S216P L227G N233C D254S P256T; E1C T231R N233C; E1C T231R N233C Q249R D254S; E1C G225R T231R N233C; E1C Q15C E43C T231R N233C; E1C L227R T231R N233C; E1C P229R T231R N233C; E1C L227G T231R N233C; E1C E99N N101S T231R N233C; E1C L227G T231R N233C D254S; E1C E210K L227G T231R N233C; E1C D27R N33K G38A F51V D96E K98E N101D D111A G163K H198S E210K Y220F T231R N233C D254S P256T; E1C D27R N33K G38A F51V S54T E56K D57G L69R D96E K98I D111A A152G G163K T231R N233C D254S P256T; E1C V187Y T189Y L227G T231R N233C; E1C D27R N33K G38A F51V D96E K98E N101D D111A T123V G163K H198S E210K Y220F T231R N233C D254S P256T; E1C V60K I86V A150G E210K L227G T231R N233C P256K; E1C V187W T189W L227G T231R N233C; E1C N94K D96L L227G T231R N233C; E1C G91A N92D D96L K98Q L227G T231R N233C; E1C N8R L227G T231R N233C; E1C L227G V228R T231R N233C; E1C Q4R L227G T231R N233C; E1C N11R L227G T231R N233C; E1C S224R L227G T231R N233C; E1C L227G T231R N233C V236R; E1C N200R L227G T231R N233C; E1C T199R L227G T231R N233C; E1C V2K D27R N33K G38A F51V D96E D111A G163K T231R N233C D254S P256T; E1C D27R N33K G38A F51V S54T E56K D96E K98I D111A G163K T231R N233C D254S I255G P256T A257V L269V; E1C V2K D27R N33K G38A F51V L69R D96E K98E D111A G163K V176L E210K L227G T231R N233C D254S P256T; E1C D27R N33K G38A F51V D96E K98E N101D D111A T123V G163K H198S E210K Y220F T231R N233C D254S P256T; E1C D27R N33K G38A F51V D96E K98E N101D D111A T123V G163K H198S E210K Y220F T231R N233C D254S P256T; y E1C N11R D27R N33K D48C F51V L69R N71C E87Q K98E N101R T143A E210K G225R L227G P229R T231R N233C Q249R P250R D254S I255G P256K.

[0141] La variante de la invención tiene una estabilidad aumentada en comparación con la lipasa original.

[0142] La lista no limitativa de componentes de la composición ilustrados de ahora en adelante son adecuados para usar en las composiciones y los métodos en la presente pueden ser preferiblemente incorporados en ciertas formas de realización de la invención, por ejemplo, para asistir o aumentar el rendimiento de limpieza, para el tratamiento del sustrato que se va a limpiar o para modificar la estética de la composición como es el caso de perfumes, colorantes, tintes o similares. Los niveles de cualquiera de tales componentes incorporados en cualquier composición son adicionales a cualesquiera materiales enumerados previamente para su incorporación. La naturaleza precisa de estos componentes adicionales, y los niveles de incorporación de los mismos, dependerá de la forma física de la composición y la naturaleza de la operación de limpieza para la que se va a usar. Aunque los componentes mencionados a continuación están categorizados por un encabezado general según una funcionalidad particular, esto no debe interpretarse como una limitación, ya que un componente puede comprender funcionalidades adicionales, como apreciará la persona experta en la materia.

[0143] A menos que se indique lo contrario, las cantidades en porcentaje son en peso de la composición (% en peso). Materiales componentes adecuados incluyen, pero de forma no limitativa, tensoactivos, coadyuvantes, agentes quelantes, agentes inhibidores de transferencia de tinte, dispersantes, enzimas y estabilizadores enzimáticos, materiales catalíticos, activadores de blanqueo, peróxido de hidrógeno, fuentes de peróxido de hidrógeno, perácidos preformados, agentes de dispersión poliméricos, agentes de eliminación/antirredeposición de suciedad arcillosa, abrillantadores, supresores de espuma, tintes, tintes de matizado, perfumes, sistemas de liberación de perfume, agentes elastificantes de la estructura, suavizantes de tejidos, portadores, hidrótrofos, adyuvantes de procesamiento, solventes y/o pigmentos. Además de la divulgación a continuación, se encuentran ejemplos adecuados de tales otros componentes y niveles de uso en US5576282, US6306812 y US6326348.

[0144] Así, en ciertas formas de realización la invención no contiene uno o varios de los siguientes materiales complementarios: tensoactivos, jabones, coadyuvantes, agentes quelantes, agentes inhibidores de transferencia de tinte, dispersantes, enzimas adicionales, estabilizadores enzimáticos, materiales catalíticos, activadores de blanqueo, peróxido de hidrógeno, fuentes de peróxido de hidrógeno, perácidos preformados, agentes de dispersión poliméricos, agentes de eliminación/antirredeposición de suciedad arcillosa, abrillantadores, supresores de espuma, tintes, perfumes, sistemas de liberación de perfume, agentes elastificantes de la estructura, suavizantes de tejidos, portadores, hidrótrofos, adyuvantes de procesamiento, solventes y/o pigmentos. Sin embargo, cuando uno o más componentes están presentes, tales uno o más componentes pueden estar presentes como se detalla a continuación:

Tensoactivos - Las composiciones según la presente invención pueden comprender un tensoactivo o sistema tensoactivo donde el tensoactivo se puede seleccionar de tensoactivos no iónicos, tensoactivos aniónicos, tensoactivos catiónicos, tensoactivos anfóteros, tensoactivos zwitteriónicos, tensoactivos no iónicos semipolares y sus mezclas derivadas. En caso de existir, el tensoactivo está típicamente presente a un nivel de 0,1 a 60 % en peso, de 0,2 a 40 % en peso, de 0,5 a 30 % en peso, de 1 a 50 % en peso, de 1 a 40 % en peso, de 1 a 30 % en peso, de 1 a 20 % en peso, de 3 a 10 % en peso, de 3 a 5 % en peso, de 5 a 40 % en peso, de 5 a 30 % en peso, de 5 a 15 % en peso, de 3 a 20 % en peso, de 3 a 10 % en peso, de 8 a 12 % en peso, de 10 a 12 % en peso, de 20 a 25 % en peso o de 25 a 60%.

[0145] Los tensoactivos detergentes aniónicos adecuados incluyen tensoactivos detergentes de sulfato y sulfonato.

[0146] Los tensoactivos detergentes de sulfonato adecuados incluyen alquilbencenosulfonato, en un aspecto, C₁₀₋₁₃ alquilbencenosulfonato. Se puede obtener alquilbencenosulfonato (LAS) adecuado, sulfonando alquilbenceno lineal (LAB) disponible comercialmente; el LAB adecuado incluye LAB de bajo 2-fenilo, tales como Isochem® o Petrelab®, otros LAB adecuados incluyen LAB de alto 2-fenilo, tal como Hyblene®. Un tensoactivo detergente aniónico adecuado es un alquilbencenosulfonato que se obtiene por un proceso catalizado DETAL, aunque otras vías de síntesis, tal como HF, también pueden ser adecuadas. En un aspecto se usa una sal magnésica de LAS.

[0147] Los tensoactivos detergentes de sulfato adecuados incluyen sulfato de alquilo, en un aspecto, sulfato de alquilo C₈₋₁₈, o predominantemente sulfato de alquilo C₁₂.

[0148] Otro tensoactivo detergente de sulfato adecuado es un sulfato alcoxilado de alquilo, en un aspecto, sulfato etoxilado de alquilo, en un aspecto, un sulfato alcoxilado de alquilo C₈₋₁₈, en un aspecto, un sulfato etoxilado de alquilo C₈₋₁₈, típicamente el sulfato alcoxilado de alquilo tiene un grado de alcoxilación medio de 0,5 a 20, o de 0,5 a 10, típicamente el sulfato alcoxilado de alquilo es un sulfato etoxilado de alquilo C₈₋₁₈ con un grado de etoxilación medio de 0,5 a 10, de 0,5 a 7, de 0,5 a 5 o de 0,5 a 3.

[0149] El sulfato de alquilo, sulfato alcoxilado de alquilo y alquilbencenosulfonatos pueden ser lineales o ramificados, sustituidos o no sustituidos.

[0150] El tensoactivo detergente puede ser un tensoactivo detergente ramificado de cadena media, en un aspecto, un tensoactivo detergente aniónico ramificado de cadena media, en un aspecto, un sulfato de alquilo ramificado de cadena media y/o un alquilbencenosulfonato ramificado de cadena media, por ejemplo un sulfato de alquilo ramificado de cadena media. En un aspecto, las ramificaciones de cadena media son grupos alquilo C₁₋₄, típicamente grupos metilo y/o etilo.

[0151] Los ejemplos no limitativos de tensoactivos aniónicos incluyen sulfatos y sulfonatos, en particular, alquilbencenosulfonatos lineales (LAS), isómeros de LAS, alquilbencenosulfonatos ramificados (BABS), fenilalcanosulfonatos, alfa-olefinasulfonatos (AOS), sulfonatos de olefina, sulfonatos de alqueno, alcano-2,3-diilbis(sulfatos), hidroxialcanosulfonatos y disulfonatos, alquilsulfatos (AS) tal como el dodecilsulfato de sodio (SDS), sulfatos de alcoholes grasos (FAS), sulfatos de alcoholes primarios (PAS), etersulfatos de alcohol (AES o AEOS o FES, también conocidos como etoxisulfatos de alcohol o sulfatos de éter de alcoholes grasos), alcanosulfonatos secundarios (SAS), sulfonatos de parafina (PS), sulfonatos de éster, ésteres de glicerol de ácidos grasos sulfonados, alfa-sulfo ésteres de metilo de ácidos grasos (alfa-SFMe o SES), incluyendo sulfonato de éster metílico (MES), ácido alquil- o alquénilsuccínico, ácido dodecenil/tetradecenil succínico (DTSA), derivados de ácidos grasos de aminoácidos, diésteres y monoésteres de ácido sulfo-succínico o jabón, y combinaciones de los mismos.

[0152] Los tensoactivos detergentes no iónicos adecuados se seleccionan del grupo consistente en: etoxilatos de alquilo C₈-C₁₈, tal como, NEODOL®; alcoxilatos de fenol de alquilo C₆-C₁₂ donde las unidades de alcoxilato pueden ser unidades etilenoxi, unidades propilenoxi o una mezcla de las mismas; condensados de alcohol C₁₂-C₁₈ y fenol de alquilo C₆-C₁₂ con polímeros de bloque de óxido de etileno/óxido de propileno tal como Pluronic®; alcoholes ramificados de cadena media C₁₄-C₂₂; alcoxilatos de alquilo ramificado de cadena media C₁₄-C₂₂, típicamente con un grado de alcoxilación medio de 1 a 30; alquilpolisacáridos, en un aspecto, alquilpoliglucósidos; amidas de polihidroxi ácido graso; tensoactivos de alcoholes poli(oxialquilados) protegidos con éter; y sus mezclas derivadas.

[0153] Los tensoactivos detergentes no iónicos adecuados incluyen poliglucósido de alquilo y/o un alcohol alcoxilado de alquilo.

[0154] En un aspecto, los tensoactivos detergentes no iónicos incluyen alcoholes alcoxilados de alquilo, en un aspecto, alcohol alcoxilado de alquilo C₈₋₁₈, por ejemplo, un alcohol etoxilado de alquilo C₈₋₁₈, el alcohol alcoxilado de alquilo puede tener un grado de alcoxilación medio de 1 a 50, de 1 a 30, de 1 a 20 o de 1 a 10. En un aspecto, el alcohol alcoxilado de alquilo puede ser un alcohol etoxilado de alquilo C₈₋₁₈ con un grado medio de etoxilación de 1 a 10, de 1 a 7, más de 1 a 5 o de 3 a 7. El alcohol alcoxilado de alquilo puede ser lineal o ramificado, y sustituido o no sustituido. Los tensoactivos no iónicos adecuados incluyen Lutensol®.

[0155] Los ejemplos no limitativos de tensoactivos no iónicos incluyen alcohol etoxilatos (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), alquilpoliglucósidos (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 de polihidroxialquilo o derivados N-acil N-alquil de glucosamina (glucamidas, GA o glucamidas de ácidos grasos, FAGA), así como productos disponibles bajo los nombres comerciales SPAN y TWEEN, y combinaciones de los mismos.

[0156] Los tensoactivos detergentes catiónicos adecuados incluyen compuestos de alquilpiridinio, compuestos de amonio cuaternario de alquilo, compuestos de fosfonio cuaternario de alquilo, compuestos de sulfonio ternario de alquilo, y sus mezclas derivadas.

[0157] Los tensoactivos detergentes catiónicos adecuados son compuestos de amonio cuaternario con la fórmula general: (R)(R₁)(R₂)(R₃)N⁺ X⁻, donde R es una fracción de alquilo o alquénilo C₆₋₁₈ lineal o ramificado, sustituido o no sustituido, R₁ y R₂ se seleccionan independientemente de fracciones metílicas o etílicas, R₃ es una fracción de hidroxilo, hidroximetilo o hidroxietilo, X es un anión que proporciona neutralidad de carga, los aniones adecuados incluyen: haluros, por ejemplo, cloruro; sulfato; y sulfonato. Tensoactivos detergentes catiónicos adecuados son cloruros de monoalquil C₆₋₁₈ monohidroxietil dimetil amonio cuaternario. Tensoactivos detergentes catiónicos altamente adecuados son cloruro de monoalquil C₈₋₁₀ monohidroxietil dimetil amonio cuaternario, cloruro de monoalquil C₁₀₋₁₂ monohidroxietil dimetil amonio cuaternario y cloruro de monoalquil Cio monohidroxietil dimetil amonio cuaternario.

[0158] Ejemplos no limitativos de tensoactivos catiónicos incluyen quat de alquildimetiletanolamina (ADMEAQ), bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), cloruro de dimetildistearilamonio (DSDMAC) y alquilbencildimetilamonio, compuestos de alquil amonio cuaternario, compuestos de amonio cuaternario alcoxilado (AQA), quats de éster y combinaciones de los mismos.

[0159] Los tensoactivos anfotéricos/zwitteriónicos adecuados incluyen óxidos de amina y betaínas tales como alquildimetilbetaínas, sulfobetaínas o combinaciones de los mismos. Tensoactivos aniónicos neutralizados con aminas - Los tensoactivos aniónicos de la presente invención y los cotensoactivos aniónicos complementarios pueden existir en una forma ácida, y dicha forma ácida se puede neutralizar para formar una sal tensoactiva que sea deseable para usar en las presentes composiciones detergentes. Los agentes típicos para la neutralización incluyen la base de contraión metálico tales como hidróxidos, por ejemplo, NaOH o KOH. Otros agentes preferidos para neutralizar tensoactivos aniónicos de la presente invención y tensoactivos o cotensoactivos aniónicos complementarios en sus formas ácidas incluyen amoníaco, aminas o alcanolaminas. Se prefieren las alcanolaminas. Ejemplos no limitativos adecuados incluidas la monoetanolamina, la dietanolamina, la trietanolamina y otras alcanolaminas lineales o ramificadas conocidas en la técnica; por ejemplo, las alcanolaminas altamente preferidas incluyen el 2-amino-1-propanol, el 1-aminopropanol, la monoisopropanolamina o el 1-amino-3-propanol. La neutralización con aminas se puede realizar en un grado completo o parcial, por ejemplo, parte de la mezcla tensoactiva aniónica se puede neutralizar con sodio o potasio y parte de la mezcla tensoactiva aniónica se puede neutralizar con aminas o alcanolaminas. Los ejemplos no limitativos de los tensoactivos semipolares incluyen óxidos de amina (AO) tales como el óxido de alquildimetilamina.

[0160] Pueden preferirse sistemas tensoactivos que comprendan mezclas de uno o más tensoactivos aniónicos y además uno o más no iónicos, opcionalmente con un tensoactivo adicional tal como un tensoactivo catiónico. Las proporciones en peso preferidas de tensoactivos aniónicos respecto a no iónicos son al menos 2:1 o al menos de 1:1 a 1:10.

[0161] En un aspecto, un sistema tensoactivo puede comprender una mezcla de tensoactivos isoprenoides representados por la fórmula A y la fórmula B:



donde Y es CH₂ o nulo, y Z se puede elegir de manera que el tensoactivo resultante se selecciona de los tensoactivos siguientes: un tensoactivo de carboxilato de alquilo, un tensoactivo de alquil polialcoxi, un tensoactivo aniónico de alquil polialcoxi sulfato, un tensoactivo de sulfonato de éster de alquilglicerol, un tensoactivo de óxido de alquildimetilamina, un tensoactivo a base de polihidroxi alquilo, un tensoactivo de éster de alquilfosfato, un tensoactivo de sulfonato de alquilglicerol, un tensoactivo de poligluconato de alquilo, un tensoactivo de éster de alquilpolifosfato, un tensoactivo de alquilfosfonato, un tensoactivo de alquilpoliglucósido, un tensoactivo de alquilmonoglucósido, un tensoactivo de alquidiglucósido, un tensoactivo de alquilsulfosuccinato, un tensoactivo de alquildisulfato, un tensoactivo de alquildisulfonato, un tensoactivo de alquilsulfosuccinamato, un tensoactivo de alquilglucamida, un tensoactivo de taurinato de alquilo, un tensoactivo de sarcosinato de alquilo, un tensoactivo de glicinato de alquilo, un tensoactivo de isetonato de alquilo, un tensoactivo de dialcanolamida de alquilo, un tensoactivo de monoalcanolamida de alquilo, un tensoactivo de sulfato de monoalcanolamida de alquilo, un tensoactivo de diglicolamida de alquilo, un tensoactivo de sulfato de diglicolamida de alquilo, un tensoactivo de éster de alquilglicerol, un tensoactivo de sulfato de éster de alquilglicerol, un tensoactivo de éter de alquilglicerol, un tensoactivo de sulfato de éter de alquilglicerol, un tensoactivo de sulfonato de éster de alquilmetílico, un tensoactivo de éter de alquilpoliglicerol, un tensoactivo de sulfato de éter de alquilpoliglicerol, un tensoactivo de éster de sorbitano de alquilo, un tensoactivo de amonioalcanosulfonato de alquilo, un tensoactivo de alquil amidopropilbetaína, un tensoactivo a base de quat alilado de alquilo, un tensoactivo a base de quat monohidroxi alquil-dialquilado de alquilo, un tensoactivo a base de quat de alquil dihidroxialquil monoalquilo, un tensoactivo de quat alquilado, un tensoactivo de quat de alquil trimetilamonio, un tensoactivo a base de quat de alquil polihidroxi alquil oxipropilo, un tensoactivo de quat de éster de alquilglicerol, un tensoactivo de quat de alquilglicolamina, un tensoactivo de amonio cuaternario de alquil monometil dihidroxietilo, un tensoactivo de amonio cuaternario de alquil dimetil monohidroxietilo, un tensoactivo de alquil trimetilamonio, un tensoactivo a base de alquilimidazolina, un tensoactivo de alquen-2-il-succinato, un tensoactivo de ácido carboxílico alquil α -sulfonado, un tensoactivo de éster alquílico de ácido carboxílico alquil α -sulfonado, un tensoactivo de sulfonato de alfa olefina, un tensoactivo de etoxilato de alquilfenol, un tensoactivo de alquilbencenosulfonato, un tensoactivo de alquilsulfobetaína, un tensoactivo de alquilhidroxisulfobetaína, un tensoactivo de alquil amoniocarboxilato betaína, un tensoactivo de alquil sacarosa éster, un tensoactivo de alquil alcanolamida, un tensoactivo de alquil di(polioxi-etileno) monoalquilamonio, un tensoactivo de alquil mono(polioxi-etileno) dialquilamonio, un tensoactivo de alquilbencil dimetilamonio, un tensoactivo de aminopropionato de alquilo, un tensoactivo de alquil amidopropil dimetilamina, o una mezcla derivada; y, si Z es una fracción cargada, la carga de Z se equilibra mediante un contraión orgánico o metálico adecuado. Los contraiones adecuados incluyen un contraión metálico, una amina o una alcanolamina, por ejemplo, alcanolamonio C1-C6. Más específicamente, los contraiones adecuados incluyen Na⁺, Ca⁺, Li⁺, K⁺, Mg⁺, por ejemplo, monoetanolamina (MEA), dietanolamina (DEA), trietanolamina (TEA), 2-amino-1-propanol, 1-aminopropanol, metildietanolamina, dimetiletanolamina, monoisopropanolamina, triisopropanolamina, 1-amino-3-propanol, o mezclas derivadas. En un aspecto, las composiciones contienen de un

5% a un 97% de uno o más tensoactivos no isoprenoides; y uno o más aditivos de limpieza complementarios; donde la proporción de peso de tensoactivo de fórmula A respecto al tensoactivo de fórmula B es de 50:50 a 95:5.

- 5 [0162] Jabón - Las composiciones de la presente pueden contener jabón. Sin estar limitado por la teoría, puede ser deseable incluir jabón, ya que actúa en parte como un tensoactivo y en parte como un mejorador y puede ser útil para la supresión de espuma y puede interactuar además favorablemente con los varios compuestos catiónicos de la composición para mejorar la suavidad en los tejidos textiles tratados con las composiciones de la invención. Puede utilizarse cualquier jabón conocido en la técnica para usar en detergentes para ropa. En un aspecto, las composiciones contienen de un 0 % en peso a un 20 % en peso, de un 0,5 % en peso a un 20 % en peso, de un 4 % en peso a un 10 % en peso, o de un 4 % en peso a un 7 % en peso de jabón.
- 10 [0163] Los ejemplos de jabón útiles en la presente incluyen jabones de ácido oleico, jabones de ácido palmítico, jabones de ácido graso de nuez de palma y sus mezclas derivadas. Los jabones típicos están en forma de mezclas de jabones de ácidos grasos con diferentes longitudes de cadena y grados de sustitución. Una tal mezcla es ácido graso de nuez de palma descabezado.
- 15 [0164] En un aspecto, el jabón se selecciona de ácido graso libre. Los ácidos grasos adecuados son saturados y/o insaturados y se pueden obtener de fuentes naturales como una planta o ésteres animales (por ejemplo, aceite de nuez de palma, aceite de palma, aceite de coco, aceite de babasú, aceite de alazor, aceite de resina, aceite de ricino, aceites de sebo y de pescado, grasa y sus mezclas derivadas), o sintéticamente preparados (por ejemplo, mediante la oxidación de petróleo o por hidrogenación de monóxido de carbono mediante el proceso Fisher Tropsch).
- 20 [0165] Los ejemplos de ácidos grasos saturados adecuados para usar en las composiciones de esta invención incluyen ácido cáptico, láurico, mirístico, palmítico, esteárico, araquídico y behénico. Las especies de ácido graso insaturado adecuadas incluyen: ácido palmitoleico, oleico, linoleico, linolénico y ricinoleico. Ejemplos de ácidos grasos preferidos son ácidos grasos saturados C_n, ácidos grasos saturados C₁₂-C₁₄ y ácidos grasos saturados o insaturados C_n a C₁₈, y sus mezclas derivadas.
- 25 [0166] En caso de existir, la proporción en peso de cotensoactivo catiónico suavizante de tejidos a ácido graso es preferiblemente de aproximadamente 1:3 a aproximadamente 3:1, más preferiblemente de aproximadamente 1:1,5 a aproximadamente 1,5:1, más preferiblemente aproximadamente 1:1.
- 30 [0167] Los niveles de tensoactivos aniónicos jabonosos y no jabonosos en la presente son porcentajes en peso de la composición detergente, especificados en función de una forma ácida. Sin embargo, como se entiende comúnmente en la técnica, los tensoactivos y jabones aniónicos se neutralizan en la práctica usando bases de sodio, potasio o alcanolamonio, tales como el hidróxido sódico o la monoetanolamina.
- 35 [0168] Hidrótropos - Las composiciones de la presente invención pueden comprender uno o más hidrótropos. Un hidrótropo es un compuesto que solubiliza compuestos hidrofóbicos en soluciones acuosas (o de manera opuesta, sustancias polares en un entorno no polar). Típicamente, los hidrótropos tienen un carácter tanto hidrófilo como hidrofóbico (denominadas propiedades anfílicas como se conoce de los tensoactivos); sin embargo, la estructura molecular de los hidrótropos generalmente no favorece la autoagregación espontánea, véase, por ejemplo, la revisión por Hodgdon y Kaler (2007), Current Opinion in Colloid & Interface Science 12: 121-128. Los hidrótropos no presentan una concentración crítica por encima de la cual se produce la autoagregación como pasa con los tensoactivos y los lípidos que forman mesofases micelares, laminares u otras bien definidas. En cambio, muchos
- 40 hidrótropos muestran un proceso de agregación de tipo continuo donde los tamaños de los agregados crecen a medida que aumenta la concentración. Sin embargo, muchos hidrótropos modifican el comportamiento de fase, la estabilidad y las propiedades coloidales de los sistemas que contienen sustancias de carácter polar y no polar, incluidas mezclas de agua, aceite, tensoactivos y polímeros. Los hidrótropos se usan clásicamente en las industrias farmacéutica, de cuidado personal, de alimentación, para aplicaciones técnicas. El uso de hidrótropos en
- 45 composiciones detergentes permite, por ejemplo, formulaciones más concentradas de tensoactivos (como en el proceso de compactación de detergentes líquidos por eliminación de agua) sin inducir fenómenos no deseados tales como la separación de fases o una alta viscosidad.
- 50 [0169] El detergente puede contener de 0 a 10 % en peso, tal como de 0 a 5 % en peso, de 0,5 a 5 % en peso o de 3% a 5 % en peso, de un hidrótropo. Se puede utilizar cualquier hidrótropo conocido en la técnica para usar en detergentes. Los ejemplos no limitativos de hidrótropos incluyen bencenosulfonato de sodio, sulfonato de p-tolueno de sodio (STS), sulfonato de xileno de sodio (SXS), sulfonato de cumeno de sodio (SCS), sulfonato de cimeno de sodio, óxidos de amina, alcoholes y poliglicoléteres, hidroxinaftoato de sodio, sulfonato de hidroxinaftaleno de sodio, sulfato de etilhexilo de sodio y combinaciones derivadas.

[0170] **Mejoradores** - Las composiciones de la presente invención pueden comprender uno o más mejoradores, comejoradores, sistemas de mejoradores o una mezcla derivada. Cuando se usa un mejorador, la composición de limpieza comprenderá típicamente de un 0 a un 65 % en peso, al menos un 1 % en peso, de un 2 a un 60 % en peso o de un 5 a un 10 % en peso de mejorador. En una composición de limpieza de lavado de vajillas, el nivel de mejorador es típicamente de un 40 a un 65 % en peso o de un 50 a un 65 % en peso. La composición puede estar sustancialmente libre de mejorador; sustancialmente libre significa zeolita y/o fosfato "no añadidos deliberadamente". Los mejoradores de zeolita típicos incluyen zeolita A, zeolita P y zeolita MAP. Un mejorador de fosfato típico es el tripolifosfato de sodio.

[0171] El mejorador y/o el comejorador puede particularmente ser un agente quelante que forma complejos hidrosolubles con el Ca y el Mg. Puede utilizarse cualquier mejorador y/o comejorador conocido en la técnica para usar en detergentes. Los ejemplos no limitativos de mejoradores incluyen zeolitas, difosfatos (pirofosfatos), trifosfatos tal como trifosfato de sodio (STP o STPP), carbonatos tal como carbonato de sodio, silicatos solubles tal como metasilicato de sodio, silicatos estratificados (por ejemplo, SKS-6 de Hoechst), etanolaminas tal como 2-aminoetan-1-ol (MEA), iminodietanol (DEA) y 2,2',2"-nitrilotrietanol (TEA), y carboximetilululina (CMI), y combinaciones derivadas.

[0172] La composición de limpieza puede incluir un comejorador solo o en combinación con un mejorador, por ejemplo, un mejorador de zeolita. Los ejemplos no limitativos de comejoradores incluyen homopolímeros de poliacrilatos o copolímeros de los mismos, tal como poli(ácido acrílico) (PAA) o copoli(ácido acrílico/ácido maléico) (PAA/PMA). Ejemplos no limitativos adicionales incluyen citrato, quelantes tales como aminocarboxilatos, aminopolicarboxilatos y fosfonatos, y ácido alquil- o alqueni succínico. Ejemplos específicos adicionales incluyen ácido 2,2',2"-nitrilotriacético (NTA), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), ácido iminodisuccínico (IDS), ácido etilendiamino- N,N'-disuccínico (EDDS), ácido metilglicinadiacético (MGDA), ácido glutámico-ácido N,N-diacético (GLDA), 1-hidroxietano-1,1-diilbis(ácido fosfónico) (HEDP), etilendiaminotetrakis(metilen)tetrakis(ácido fosfónico) (EDTMPA), dietilentriaminopentakis(metilen)pentakis(ácido fosfónico) (DTPMPA), 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-(2-sulfometil) aspártico (SMAS), ácido N-(2-sulfoetil) aspártico (SEAS), ácido N-(2-sulfometil) glutámico (SMGL), ácido N-(2-sulfoetil) glutámico (SEGL), ácido N-metiliminodiacético (MIDA), ácido α -alanina-N,N-diacético (α -ALDA), ácido serina-N,N-diacético (SEDA), ácido isoserina-N,N-diacético (ISDA), ácido fenilalanina-N,N-diacético (PHDA), ácido antranílico N,N-ácido diacético (ANDA), ácido sulfanílico-ácido N,N-diacético (SLDA), ácido taurina-N,N-diacético (TUDA) y ácido sulfometil-N,N-diacético (SMDA), N-(hidroxietil)-etilendiaminotriacetato (HEDTA), dietanolglicina (DEG), dietilentriamina penta (ácido metilen fosfónico) (DTPMP), ácido aminotris(metilenefosfónico) (ATMP), y combinaciones y sales derivadas. Mejoradores y/o comejoradores ejemplares adicionales se describen en, por ejemplo, WO09/102854, US5977053.

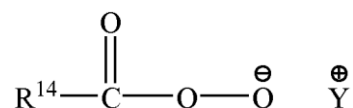
[0173] En un aspecto, la invención se refiere a composiciones que comprenden una variante de una lipasa original, variante que comprende sustituciones en las posiciones correspondientes a E1C y N233C del polipéptido maduro de SEQ ID NO: 2, tiene actividad lipásica y tiene al menos un 60% pero menos del 100% de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 2, donde la composición comprende hasta un 10 % en peso o un 15 % en peso de aluminosilicato (base anhidra) y/o mejorador de fosfato, donde la composición tiene una alcalinidad de reserva mayor de 4 o 7,5. Como se utiliza en la presente, el término "alcalinidad de reserva" es una medida de la capacidad tamponadora de la composición (g/NaOH/100 g de composición) determinada por valoración de una solución de composición al 1% (p/v) con ácido clorhídrico a pH 7,5, es decir, para calcular la alcalinidad de reserva. La alcalinidad de reserva se puede calcular como se describe en la página 9 en WO2006/090335. En un aspecto, la lipasa original es una lipasa que es un polipéptido con una secuencia de aminoácidos que: (a) tiene al menos un 90 % de identidad con la lipasa de tipo salvaje derivada de la cepa de *Humicola lanuginosa* DSM 4109; (b) en comparación con dicha lipasa de tipo salvaje, comprende una sustitución de un aminoácido eléctricamente neutro o cargado negativamente en la superficie de la estructura tridimensional dentro de 15 Å de E1 o Q249 con un aminoácido cargado positivamente; y (c) comprende una adición peptídica en el extremo C-terminal; y/o (d) reúne las limitaciones siguientes: (i) comprende un aminoácido negativo en la posición E210 de dicha lipasa de tipo salvaje; (ii) comprende un aminoácido cargado negativamente en la región correspondiente a las posiciones 90-101 de dicha lipasa de tipo salvaje; y (iii) comprende un aminoácido neutro o negativo en una posición correspondiente a N94 de dicha lipasa de tipo salvaje y/o tiene una carga eléctrica neta negativa o neutra en la región correspondiente a las posiciones 90-101 de dicha lipasa de tipo salvaje. En un aspecto la lipasa original es una lipasa que tiene actividad lipásica, tiene al menos un 80% pero menos del 100% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2 y comprende sustituciones en las posiciones correspondientes a T231R+N233R y al menos una o más (por ejemplo, varias) de D96E, D111A, D254S, G163K, P256T, G91T, D27R y G38A de la SEQ ID NO: 2. En un aspecto la lipasa original tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 4 o la SEQ ID NO: 6. En un aspecto la lipasa original comprende o consiste en el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 6. En un aspecto la invención se refiere a composiciones que comprenden variantes de lipasa que comprenden además una sustitución en una posición correspondiente a cualquiera de las posiciones; 2, 4, 8, 11, 15, 27, 33, 38, 43, 48, 51, 54, 56, 57, 58, 60, 69, 71, 83, 86, 91, 92, 94, 96, 97, 98, 99, 101, 111, 123, 150, 152, 163, 176, 179, 187, 188, 189, 198, 199, 200, 210, 216, 220, 224, 225, 227, 228, 229, 231, 236, 238, 239, 246,

249, 254, 255, 256, 257, 260, 263, 264, 265, 266, 267, 269 de la SEQ ID NO: 2. En un aspecto las sustituciones se seleccionan de: V2K, Q4R, Q4V, N8R, N11R, Q15C, D27G, D27R, N33K, N33Q, G38A, E43C, D48C, F51V, S54T, E56K, D57G, S58A, V60K, V60S, L69R, N71C, S83T, I86V, G91A, G91N, G91Q, N92D, N94K, N94R, D96E, D96G, D96L, D96W, L97M, K98E, K98I, K98Q, E99K, E99N, N101D, N101S, D111A, T123V, A150G, A152G, G163K, V176L, R179L, V187Y, V187W, Q188R, T189Y, T189W, H198S, T199R, N200R, E210K, E210Q, S216P, Y220F, S224R, G225R, L227G, L227R, V228R, P229R, T231R, V236R, I238C, E239C, G246C, Q249R, D254S, I255G, P256K, P256T, P256V, A257I, A257V, W260C, G263Q, L264A, I265T, G266D, T267A, L269N, L269V de la SEQ ID NO: 2. En un aspecto un conjunto de sustituciones se selecciona de: E1C D27R N33K G38A F51V S54T E56K D96E K98I D111A G163K N233C D254S P256T; E1C V2K D27G N33K G38A F51V D96E D111A G163K N233C D254S P256T; E1C V2K D27R N33K G38A F51V D96E D111A G163K Q188R N233C D254S P256T; E1C D27R G38A G91A N92D D96L K98Q D111A G163K N233C D254S P256T; E1C D27R G38A G91N N94R D96E D111A G163K S216P L227G N233C D254S P256T; E1C T231R N233C; E1C T231R N233C Q249R D254S; E1C G225R T231R N233C; E1C Q15C E43C T231R N233C; E1C L227R T231R N233C; E1C P229R T231R N233C; E1C L227G T231R N233C; E1C E99N N101S T231R N233C; E1C L227G T231R N233C D254S; E1C E210K L227G T231R N233C; E1C D27R N33K G38A F51V D96E K98E N101D D111A G163K H198S E210K Y220F T231R N233C D254S P256T; E1C D27R N33K G38A F51V S54T E56K D57G L69R D96E K98I D111AA152G G163K T231R N233C D254S P256T; E1C V187Y T189Y L227G T231R N233C; E1C D27R N33K G38A F51V D96E K98E N101D D111A T123V G163K H198S E210K Y220F T231R N233C D254S P256T; E1C V60K I86V A150G E210K L227G T231R N233C P256K; E1C V187W T189W L227G T231R N233C; E1C N94K D96L L227G T231R N233C; E1C G91A N92D D96L K98Q L227G T231R N233C; E1C N8R L227G T231R N233C; E1C L227G V228R T231R N233C; E1C Q4R L227G T231R N233C; E1C N11R L227G T231R N233C; E1C S224R L227G T231R N233C; E1C L227G T231R N233C V236R; E1C N200R L227G T231R N233C; E1C T199R L227G T231R N233C; E1C V2K D27R N33K G38A F51V D96E D111A G163K T231R N233C D254S P256T; E1C D27R N33K G38A F51V S54T E56K D96E K98I D111A G163K T231R N233C D254S P256T; E1C D27R N33K G38A F51V D96E K98I D111A G163K H198S Y220F T231R N233C D254S P256T; E1C D27R N33K G38A F51V E56K L69R D96E K98E D111A G163K R179L T231R N233C D254S P256T A257I; E1C V2K D27R N33K G38A F51V D96E D111A G163K T231R N233C D254S P256T A257I; E1C D27R N33K G38A F51V S54T E56K D96E K98I D111A G163K T231R N233C D254S I255G P256T A257V L269V; E1C V2K D27R N33K G38A F51V L69R D96E K98E D111A G163K V176L E210K L227G T231R N233C D254S P256T; E1C D27R N33K G38A F51V D96E K98E N101D D111A T123V G163K H198S E210K Y220F T231R N233C D254S P256T; E1C D27R N33K G38A F51V D96E K98E N101D D111A T123V G163K H198S E210K Y220F T231R N233C D254S P256T; E1C D27R G38A F51V L69R D96E K98E D111A G163K E210K T231R N233C D254S P256T; y E1C N11R D27R N33K D48C F51V L69R N71C E87Q K98E N101R T143A E210K G225R L227G P229R T231R N233C Q249R P250R D254S I255G P256K.

[0174] Agentes quelantes e inhibidores de crecimiento de cristales - Las composiciones de la presente pueden contener un agente quelante y/o un inhibidor de crecimiento de cristales. Las moléculas adecuadas incluyen agentes quelantes de cobre, hierro y/o manganeso y sus mezclas derivadas. Las moléculas adecuadas incluyen DTPA (ácido dietilentriaminopentaacético), HEDP (ácido hidroxietanodifosfónico), DTPMP (ácido dietilentriaminopenta(metilen fosfónico)), hidrato de sal disódica del ácido 1,2-dihidroxibenceno-3,5-disulfónico, etilendiamina, dietilentriamina, ácido etilendiaminodisuccínico (EDDS), ácido N-hidroxi-etil-etilendiaminotriacético (HEDTA), ácido trietilentetraaminohexaacético (TTHA), ácido N-hidroxi-etiliminodiacético (HEIDA), dihidroxi-etilglicina (DHEG), ácido etilendiaminotetrapropiónico (EDTP), carboximetil inulina y ácido 2-fosfonobutano 1,2,4-tricarboxílico (Bayhibit® AM) y derivados de los mismos. Típicamente la composición puede comprender de un 0,005 a un 15 % en peso o de un 3,0 a un 10 % en peso de agente quelante o de inhibidor de crecimiento de cristales.

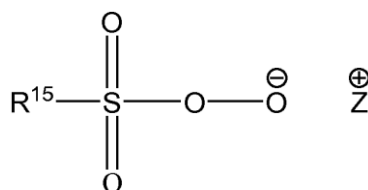
[0175] Componente blanqueador - El componente blanqueador adecuado para la incorporación en los métodos y las composiciones de la invención comprende un o una mezcla de más de un componente blanqueador. Los componentes blanqueadores adecuados incluyen catalizadores de blanqueo, fotoblanqueadores, activadores de blanqueo, peróxido de hidrógeno, fuentes de peróxido de hidrógeno, perácidos preformados y sus mezclas derivadas. En general, cuando se usa un componente blanqueador, las composiciones de la presente invención pueden comprender de un 0 a un 30 % en peso, de un 0,00001 a un 90 % en peso, de un 0,0001 a un 50 % en peso, de un 0,001 a un 25 % en peso o de un 1 a un 20 % en peso. Los ejemplos de componentes blanqueadores adecuados incluyen:

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



donde: R^{14} se selecciona de alquilo, aralquilo, cicloalquilo, arilo o grupos heterocíclicos; el grupo R^{14} puede ser lineal o ramificado, sustituido o no sustituido; e Y es cualquier contraión adecuado que consigue la neutralidad de carga eléctrica, preferiblemente Y se selecciona de hidrógeno, sodio o potasio. Preferiblemente, R^{14} es un alquilo C_{6-9} lineal o ramificado, sustituido o no sustituido. Preferiblemente, el peroxiácido o la sal derivada se selecciona de ácido peroxihexanoico, ácido peroxiheptanoico, ácido peroxioctanoico, ácido peroxinonanoico, ácido peroxidecanoico, cualquier sal derivada o cualquier combinación de los mismos. Peroxiácidos particularmente preferidos son los ácidos ftalimido-peroxi-alcanoicos, en particular el ácido ϵ -ftalimido peroxi hexanoico (PAP). Preferiblemente, el peroxiácido o la sal derivada tiene un punto de fusión en el rango de desde 30°C hasta 60°C.

El peroxiácido preformado o la sal derivada puede también ser un ácido peroxisulfónico o una sal derivada, típicamente con una estructura química que corresponde a la siguiente fórmula química:



donde: R^{15} se selecciona de grupos alquilo, aralquilo, cicloalquilo, arilo o heterocíclico; el grupo R^{15} puede ser lineal o ramificado, sustituido o no sustituido; y Z es cualquier contraión adecuado que consigue la neutralidad de carga eléctrica, preferiblemente Z se selecciona de hidrógeno, sodio o potasio. Preferiblemente R^{15} es un alquilo C_{6-9} lineal o ramificado, sustituido o no sustituido. Preferiblemente tales componentes blanqueadores pueden estar presente en las composiciones de la invención en una cantidad de 0,01 a 50 % en peso o de 0,1 a 20 % en peso.

(2) Las fuentes de peróxido de hidrógeno incluyen, por ejemplo, sales de perhidrato inorgánicas, incluidas sales de metales alcalinos tales como sales de sodio de perborato (normalmente mono- o tetrahidrato), sales de percarbonato, persulfato, perfosfato, persilicato y sus mezclas derivadas. En un aspecto de la invención las sales de perhidrato inorgánico tales como las seleccionadas del grupo que consiste en sales de sodio de perborato, percarbonato y sus mezclas derivadas. Si se emplean, las sales de perhidrato inorgánicas están típicamente presentes en cantidades de 0,05 a 40 % en peso o de 1 a 30 % en peso de toda la composición y se incorporan típicamente en tales composiciones como un sólido cristalino que puede estar recubierto. Los recubrimientos adecuados incluyen: sales inorgánicas tales como sales de metales alcalinos de silicato, carbonato o borato o mezclas derivadas, o materiales orgánicos tales como polímeros hidrosolubles o dispersables, ceras, aceites o jabones grasos. Preferiblemente, tales componentes blanqueadores pueden estar presentes en las composiciones de la invención en una cantidad de 0,01 a 50 % en peso o de 0,1 a 20 % en peso.

(3) El término activador de blanqueo se entiende en la presente como un compuesto que reacciona con peróxido de hidrógeno para formar un perácido mediante perhidrólisis. El perácido así formado constituye el blanqueador activado. Los activadores de blanqueo adecuados para ser usados en la presente incluyen aquellos que pertenecen a la clase de ésteres, amidas, imidas o anhídridos. Los activadores de blanqueo adecuados son aquellos que tienen $\text{R}-(\text{C}=\text{O})-\text{L}$, donde R es un grupo alquilo, opcionalmente ramificado, que tiene, cuando el activador de blanqueo es hidrofóbico, de 6 a 14 átomos de carbono, o de 8 a 12 átomos de carbono y, cuando el activador de blanqueo es hidrófilo, menos de 6 átomos de carbono o menos de 4 átomos de carbono; y L es un grupo saliente. Ejemplos de grupos salientes adecuados son el ácido benzoico y derivados del mismo -especialmente benceno sulfonato. Los activadores de blanqueo adecuados incluyen dodecanoil oxibenceno sulfonato, decanoil oxibenceno sulfonato, ácido decanoil oxibenzoico o sales derivadas, 3,5,5-trimetil hexanoiloxibenceno sulfonato, tetraacetietilendiamina (TAED), sodio 4-[(3,5,5-trimetilhexanoil)oxi]benceno-1-sulfonato (ISONOBS), 4-(dodecanoiloxi)benceno-1-sulfonato (LOBS), 4-(decanoiloxi)benceno-1-sulfonato, 4-(decanoiloxi)benzoato (DOBS o DOBA), 4-(nonanoiloxi)benceno-1-sulfonato (NOBS) y/o aquellos descritos en WO98/17767. Una familia de activadores de blanqueo se describe en EP624154 y en esa familia se prefiere particularmente el acetil trietil citrato (ATC). El ATC o un triglicérido de cadena corta como la triacetina tienen la ventaja de que son respetuosos con el medio ambiente. Además, el acetil trietil citrato y la triacetina tienen una buena estabilidad hidrolítica en el producto durante el almacenamiento y son activadores de blanqueo eficientes. Finalmente, el ATC es multifuncional, ya que el citrato liberado en la reacción de perhidrólisis puede funcionar como un mejorador. Alternativamente, el sistema blanqueante puede comprender peroxiácidos de, por ejemplo, tipo amida, imida o sulfona. El sistema blanqueante también puede comprender perácidos tales como el ácido 6-(ftalimido)peroxihexanoico (PAP). También se describen activadores de blanqueo adecuados en WO98/17767. Mientras que puede emplearse

cualquier activador de blanqueo adecuado, en un aspecto de la invención la composición de limpieza objeto puede comprender NOBS, TAED o mezclas derivadas. En caso de existir, el perácido y/o el activador de blanqueo está generalmente presente en la composición en una cantidad de 0,1 a 60 % en peso, de 0,5 a 40 % en peso o de 0,6 a 10 % en peso en función del tejido y la composición de cuidado en el hogar. Uno o más perácidos hidrofóbicos o precursores de los mismos se pueden usar en combinación con uno o más perácidos hidrófilos o precursores del mismo. Preferiblemente tales componentes blanqueadores pueden estar presentes en las composiciones de la invención en una cantidad de 0,01 a 50 % en peso, o de 0,1 a 20 % en peso.

Las cantidades de fuente de peróxido de hidrógeno y perácido o activador de blanqueo se pueden seleccionar de manera que la proporción molar de oxígeno disponible (de la fuente de peróxido) a perácido sea de 1:1 a 35:1, o incluso de 2:1 a 10:1.

(4) Diacil peróxidos – Las especies de blanqueo preferidas de diacil peróxido incluyen aquellas seleccionadas de diacil peróxidos con la fórmula general: $R^1-C(O)-OO-(O)C-R^2$, donde R^1 representa un alquilo C_6-C_{18} , preferiblemente un grupo alquilo C_6-C_{12} con una cadena lineal de al menos 5 átomos de carbono y opcionalmente con uno o más sustituyentes (por ejemplo, $-N^+(CH_3)_3$, $-COOH$ o $-CN$) y/o una o más fracciones de interrupción (por ejemplo, $-CONH-$ o $-CH=CH-$) interpoladas entre átomos de carbono adyacentes del radical alquilo, y R^2 representa un grupo alifático compatible con una fracción de peróxido, de manera que R^1 y R^2 juntos contienen un total de 8 a 30 átomos de carbono. En un aspecto preferido, R^1 y R^2 son cadenas de alquilo C_6-C_{12} no sustituidas lineales. Más preferiblemente R^1 y R^2 son idénticos. Se prefieren particularmente diacil peróxidos donde tanto R^1 como R^2 son grupos alquilo C_6-C_{12} . Preferiblemente, al menos uno de, más preferiblemente solo uno de, los grupos R (R_1 o R_2), no contiene ramificaciones o anillos colgantes en la posición alfa, o preferiblemente ni en la posición alfa ni en la beta o más preferiblemente en ninguna de las posiciones alfa o beta o gamma. En una forma de realización preferida adicional, el DAP puede ser asimétrico, de manera que preferiblemente la hidrólisis del grupo acilo R_1 es rápida en generar perácido, pero la hidrólisis del grupo acilo R^2 es lenta.

La especie de blanqueo de tetraacil peróxido se selecciona preferiblemente de tetraacil peróxidos con la fórmula general: $R^3-C(O)-OO-C(O)-(CH_2)_n-C(O)-OO-C(O)-R^3$, donde R^3 representa un grupo alquilo C_1-C_9 , o C_3-C_7 , y n representa un número entero de 2 a 12, o de 4 a 10 inclusive.

Preferiblemente, la especie de blanqueo de diacil y/o tetraacil peróxido está presente en una cantidad suficiente para proporcionar al menos 0,5 ppm, al menos 10 ppm o al menos 50 ppm en peso de la solución de lavado. En una forma de realización preferida, la especie de blanqueo está presente en una cantidad suficiente para proporcionar de 0,5 a 300 ppm, de 30 a 150 ppm en peso de la solución de lavado.

Preferiblemente el componente blanqueador comprende un catalizador de blanqueo (5 y 6).

(5) Se prefieren catalizadores de blanqueo orgánicos (no metálicos), que incluyen catalizadores de blanqueo capaces de aceptar un átomo de oxígeno de un peroxiácido y/o una sal derivada y de transferir el átomo de oxígeno a un sustrato oxidable. Los catalizadores de blanqueo adecuados incluyen, pero de forma no limitativa: cationes y poliones de iminio; zwitteriones de iminio; aminas modificadas; óxidos de aminas modificadas; N-sulfonil iminas; N-fosfonil iminas; N-acil iminas; dióxidos de tiadiazol; perfluoroiminas; cetonas de azúcares cíclicos y sus mezclas derivadas.

[0176] Los cationes y poliones de iminio adecuados incluyen, pero de forma no limitativa, N-metil-3,4-dihidroisoquinolinio tetrafluoroborato, preparado como se describe en Tetrahedron (1992), 49(2), 423-38 (por ejemplo, compuesto 4, p. 433); N-metil-3,4-dihidroisoquinolinio p-tolueno sulfonato, preparado como se describe en US5360569 (por ejemplo, columna 11, ejemplo 1); y N-octil-3,4-dihidroisoquinolinio p-tolueno sulfonato, preparado como se describe en US5360568 (por ejemplo, columna 10, ej. 3).

[0177] Los zwitteriones de iminio adecuados incluyen, pero de forma no limitativa, N-(3-sulfopropil)-3,4-dihidroisoquinolinio, sal interna, preparado como se describe en US5576282 (por ejemplo, columna 31, ej. II); N-[2-(sulfooxi)dodecil]-3,4-dihidroisoquinolinio, sal interna, preparado como se describe en US5817614 (por ejemplo, columna 32, ej. V); 2-[3-[(2-etilhexil)oxi]-2-(sulfooxi)propil]-3,4-dihidroisoquinolinio, sal interna, preparado como se describe en WO05/047264 (por ejemplo p. 18, ej. 8), y 2-[3-[(2-butiloctil)oxi]-2-(sulfooxi)propil]-3,4-dihidroisoquinolinio, sal interna.

[0178] Los catalizadores de transferencia de oxígeno de amina modificada adecuados incluyen, pero de forma no limitativa, 1,2,3,4-tetrahidro-2-metil-1-isoquinolinol, que puede producirse según los procedimientos descritos en Tetrahedron Letters (1987), 28(48), 6061-6064. Los catalizadores de transferencia de oxígeno de óxido de amina modificada adecuados incluyen, pero de forma no limitativa, 1-hidroxi-N-oxi-N-[2-(sulfooxi)decil]-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina de sodio.

[0179] Los catalizadores de transferencia de oxígeno de N-sulfonil imina adecuados incluyen, pero de forma no limitativa, 3-metil-1,2-bencisotiazol 1,1-dióxido, preparado según el procedimiento descrito en el Journal of Organic Chemistry (1990), 55(4), 1254-61.

[0180] Los catalizadores de transferencia de oxígeno de N-fosfonil imina adecuados incluyen, pero de forma no limitativa, [R-(E)]-N-[(2-cloro-5-nitrofenil)metilén]-P-fenil-P-(2,4,6-trimetilfenil)-amida fosfínica, que puede producirse según los procedimientos descritos en el Journal of the Chemical Society, Chemical Communications (1994), (22), 2569-70.

5 [0181] Los catalizadores de transferencia de oxígeno de N-acil imina adecuados incluyen, pero de forma no limitativa, [N(E)]-N-(fenilmetilén)acetamida, que puede producirse según los procedimientos descritos en Polish Journal of Chemistry (2003), 77(5), 577-590.

10 [0182] Los catalizadores de transferencia de oxígeno de dióxido de tiadiazol adecuados incluyen, pero de forma no limitativa, 3-metil-4-fenil-1,2,5-tiadiazol 1,1-dióxido, que puede producirse según los procedimientos descritos en US5753599 (columna 9, ej. 2).

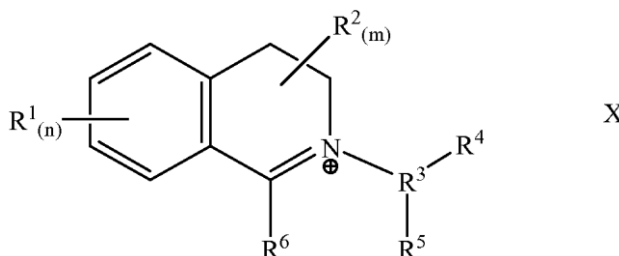
[0183] Los catalizadores de transferencia de oxígeno de perfluoroimina adecuados incluyen, pero de forma no limitativa, (Z)-2,2,3,3,4,4,4-heptafluoro-N-(nonafluorobutil)butanimidoilfluoruro, que puede producirse según los procedimientos descritos en Tetrahedron Letters (1994), 35(34), 6329-30.

15 [0184] Los catalizadores de transferencia de oxígeno de cetona de azúcares cíclicos adecuados incluyen, pero de forma no limitativa, 1,2:4,5-di-O-isopropiliden-D-eritro-2,3-hexodiuoro-2,6-piranos como se prepara en US6649085 (columna 12, ej. 1).

[0185] Preferiblemente, el catalizador de blanqueo comprende un grupo funcional iminio y/o carbonilo y típicamente es capaz de formar un grupo funcional de oxaziridinio y/o dioxirano tras aceptar un átomo de oxígeno, especialmente tras aceptar un átomo de oxígeno de un peroxiácido y/o una sal derivada. Preferiblemente, el catalizador de blanqueo comprende un grupo funcional de oxaziridinio y/o es capaz de formar un grupo funcional de oxaziridinio tras aceptar un átomo de oxígeno, especialmente tras aceptar un átomo de oxígeno de un peroxiácido y/o una sal derivada. Preferiblemente, el catalizador de blanqueo comprende un grupo funcional de iminio cíclico, preferiblemente donde la fracción cíclica tiene un tamaño de anillo de cinco a ocho átomos (incluido el átomo de nitrógeno), preferiblemente seis átomos. Preferiblemente, el catalizador de blanqueo comprende un grupo funcional de ariliminio, preferiblemente un grupo funcional de ariliminio bicíclico, preferiblemente un grupo funcional de 3,4-dihidroisoquinolinio. Típicamente, el grupo funcional de imina es un grupo funcional de imina cuaternaria y típicamente es capaz de formar un grupo funcional de oxaziridinio cuaternario tras aceptar un átomo de oxígeno, especialmente tras aceptar un átomo de oxígeno de un peroxiácido y/o una sal derivada. En un aspecto, la composición detergente comprende un componente blanqueador que tiene un $\log P_{o/w}$ no mayor de 0, no mayor de -0,5, no mayor de -1,0, no mayor de -1,5, no mayor de -2,0, no mayor de -2,5, no mayor de -3,0 o no mayor de -3,5. El método para determinar $\log P_{o/w}$ se describe con más detalle a continuación.

[0186] Típicamente, el ingrediente blanqueador es capaz de generar una especie de blanqueo con una X_{SO} de 0,01 a 0,30, de 0,05 a 0,25 o de 0,10 a 0,20. El método para determinar la X_{SO} se describe con más detalle a continuación. Por ejemplo, los ingredientes de blanqueo con una estructura de isoquinolinio son capaces de generar una especie de blanqueo que tiene una estructura de oxaziridinio. En este ejemplo, la X_{SO} es el de las especies de blanqueo de oxaziridinio.

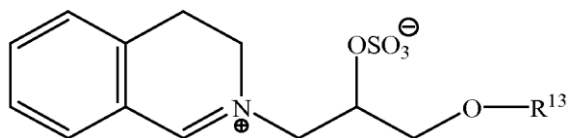
[0187] Preferiblemente, el catalizador de blanqueo tiene una estructura química que corresponde a la siguiente fórmula química:



40 donde: n y m son independientemente de 0 a 4, preferiblemente n y m son ambos 0; cada R^1 se selecciona independientemente de un radical sustituido o no sustituido seleccionado del grupo que consiste en radicales hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, arilo, arilo fusionado, anillo heterocíclico, anillo heterocíclico fusionado, nitro, halo, ciano, sulfonato, alcoxi, ceto, carboxílico y carboalcoxi; y cualesquiera dos sustituyentes R^1 vecinos pueden combinarse para formar un arilo fusionado, anillo heterocíclico fusionado o carbocíclico fusionado; cada R^2 se
45 selecciona independientemente de un radical sustituido o no sustituido seleccionado independientemente del grupo

que consiste en hidrógeno, hidroxilo, alquilo, cicloalquilo, alcarilo, arilo, aralquilo, alquilenos, anillo heterocíclico, alcóxido, grupos arilcarbonilo, grupos carboxialquilo y grupos amídicos; cualquier R^2 se puede juntar con cualquier otro R^2 para formar parte de un anillo común; cualquier R^2 geminal puede combinarse para formar un carbonilo; y cualesquiera dos R^2 pueden combinarse para formar una fracción insaturada fusionada sustituida o no sustituida; R^3 es un alquilo C_1 a C_{20} sustituido o no sustituido; R^4 es hidrógeno o la fracción Qt-A, donde: Q es un alquileo ramificado o no ramificado, $t = 0$ o 1 y A es un grupo aniónico seleccionado del grupo que consiste en OSO_3^- , SO_3^- , CO_2^- , OCO_2^- , OPO_3^{2-} , OPO_3H^- y OPO_2^- ; R^5 es hidrógeno o la fracción $-CR^{11}R^{12}-Y-G_b-Y_c-[(CR^9R^{10})_y-O]_k-R^8$, donde: cada Y se selecciona independientemente del grupo que consiste en O, S, N-H o N- R^8 ; y cada R^8 se selecciona independientemente del grupo que consiste en alquilo, arilo y heteroarilo, donde dichas fracciones están sustituidas o no sustituidas y donde, ya estén sustituidas o no sustituidas, dichas fracciones tienen menos de 21 carbonos; cada G se selecciona independientemente del grupo que consiste en CO, SO_2 , SO, PO y PO_2 ; R^9 y R^{10} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H y alquilo C_1-C_4 ; R^{11} y R^{12} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H y alquilo o, cuando se toman juntos, pueden unirse para formar un carbonilo; $b = 0$ o 1 ; c puede ser 0 o 1 , pero c debe ser 0 si $b = 0$; y es un número entero de 1 a 6 ; k es un número entero de 0 a 20 ; R^6 es H o una fracción de alquilo, arilo o heteroarilo; donde dichas fracciones están sustituidas o no sustituidas; y X, si está presente, es un contraión de equilibrio de carga adecuado, preferiblemente X está presente cuando R^4 es hidrógeno, X adecuados incluyen, pero de forma no limitativa: cloruro, bromuro, sulfato, metosulfato, sulfonato, p-toluenosulfonato, tetrafluoruro de boro y fosfato.

[0188] En un aspecto de la presente invención, el catalizador de blanqueo tiene una estructura que corresponde a la fórmula general siguiente:



donde R^{13} es un grupo alquilo ramificado que contiene de tres a 24 átomos de carbono (incluidos los átomos de carbono de ramificación) o un grupo alquilo lineal que contiene de uno a 24 átomos de carbono; preferiblemente R^{13} es un grupo alquilo ramificado que contiene de ocho a 18 átomos de carbono o un grupo alquilo lineal que contiene de ocho a dieciocho átomos de carbono; preferiblemente R^{13} se selecciona del grupo que consiste en 2-propilheptilo, 2-butiloctilo, 2-pentilnonilo, 2-hexildecilo, n-dodecilo, n-tetradecilo, n-hexadecilo, n-octadecilo, isononilo, isodecilo, isotridecilo e iso-pentadecilo; preferiblemente R^{13} se selecciona del grupo que consiste en 2-butiloctilo, 2-pentilnonilo, 2-hexildecilo, isotridecilo e isopentadecilo.

[0189] Preferiblemente el componente blanqueador comprende una fuente de perácido además de un catalizador de blanqueo, particularmente un catalizador de blanqueo orgánico. La fuente de perácido se puede seleccionar de (a) perácido preformado; (b) sal de percarbonato, perborato o persulfato (fuente de peróxido de hidrógeno) preferiblemente en combinación con un activador de blanqueo; y (c) enzima perhidrolasa y un éster para formar perácido *in situ* en presencia de agua en un paso de tratamiento de tejidos o superficies duras.

[0190] En caso de existir, el perácido y/o el activador de blanqueo está generalmente presente en la composición en una cantidad de $0,1$ a 60% en peso, de $0,5$ a 40% en peso o de $0,6$ a 10% en peso basado en la composición. Uno o más perácidos hidrofóbicos o precursores de los mismos se pueden usar en combinación con uno o más perácidos hidrófilos o precursores de los mismos.

[0191] Las cantidades de fuente de peróxido de hidrógeno y perácido o activador de blanqueo se pueden seleccionar de manera que la proporción molar de oxígeno disponible (de la fuente de peróxido) a perácido es de $1:1$ a $35:1$ o de $2:1$ a $10:1$.

(6) Catalizadores de blanqueo que contienen metal - El componente blanqueador puede ser proporcionado por un complejo de metal catalítico. Un tipo de catalizador de blanqueo que contiene metal es un sistema catalizador que comprende un catión metálico de transición de actividad catalítica de blanqueo definida, tal como cationes de cobre, hierro, titanio, rutenio, tungsteno, molibdeno o manganeso, un catión metálico auxiliar con poca o ninguna actividad catalítica de blanqueo, tal como cationes de zinc o de aluminio, y un quelante con constantes de estabilidad definidas para los cationes metálicos catalíticos y auxiliares, particularmente ácido etilendiaminotetraacético, ácido etilendiaminotetra(metilenfosfónico) y sales hidrosolubles derivadas. Tales catalizadores se describen en US4430243. Se describen catalizadores preferidos en WO99/839406, US6218351 y WO00/012667. Particularmente preferidos son los ligandos o catalizadores de metales de transición, por lo tanto, que son ligandos donadores de N polidentados con puentes cruzados.

[0192] Si se desea, las composiciones en la presente se pueden catalizar mediante un compuesto de manganeso. Tales compuestos y niveles de uso se conocen bien en la técnica e incluyen, por ejemplo, los catalizadores a base de manganeso descritos en US5576282.

5 [0193] Los catalizadores de blanqueo de cobalto útiles en la presente se conocen, y se describen, por ejemplo, en US5597936; US5595967. Tales catalizadores de cobalto se preparan fácilmente por procedimientos conocidos, tal como se enseña, por ejemplo, en US5597936 y US5595967.

10 [0194] Las composiciones en la presente pueden incluir también adecuadamente un complejo metálico de transición de ligandos tales como bispidonas (US7501389) y/o ligandos rígidos macropolicíclicos -abreviados como "MRL". Como un material práctico, y no a modo de limitación, las composiciones y los procesos en la presente se pueden ajustar para proporcionar del orden de al menos una parte por cien millones de las especies MRL activas en el medio de lavado acuoso, y proporcionarán típicamente de 0,005 a 25 ppm, de 0,05 a 10 ppm o de 0,1 a 5 ppm del MRL en la solución de lavado.

15 [0195] Metales de transición adecuados en el presente catalizador de blanqueo metálico de transición incluyen, por ejemplo, manganeso, hierro y cromo. Los MRL adecuados incluyen 5,12-dietil-1,5,8,12-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecano. Los MRL metálicos de transición adecuados se preparan fácilmente por procedimientos conocidos, tal como se enseña, por ejemplo, en US6225464 y WO00/32601.

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

25 [0196] Componentes blanqueadores particularmente preferidos son los catalizadores de blanqueo, en particular los catalizadores de blanqueo orgánicos.

[0197] Sistemas blanqueantes ejemplares se describen también, por ejemplo, en WO2007/087258, WO2007/087244, WO2007/087259 y WO2007/087242.

30 [0198] Agentes de teñido de tejidos - La composición puede comprender un agente de teñido de tejidos. Los agentes de teñido de tejidos adecuados incluyen tintes, conjugados de tinte-arcilla y pigmentos. Los tintes adecuados incluyen tintes de molécula pequeña y tintes poliméricos. Los tintes de molécula pequeña adecuados incluyen tintes de molécula pequeña seleccionados del grupo que consiste en tintes que entran en las clasificaciones Color Index (C.I.) de Direct Blue, Direct Red, Direct Violet, Acid Blue, Acid Red, Acid Violet, Basic Blue, Basic Violet y Basic Red o mezclas derivadas.

35 [0199] En un aspecto, los tintes de molécula pequeña adecuados incluyen tintes de molécula pequeña seleccionados del grupo que consiste en los números de Color Index (Society of Dyers and Colorists, Bradford, Reino Unido) Direct Violet 9, Direct Violet 35, Direct Violet 48, Direct Violet 51, Direct Violet 66, Direct Violet 99, Direct Blue 1, Direct Blue 71, Direct Blue 80, Direct Blue 279, Acid Red 17, Acid Red 73, Acid Red 88, Acid Red 150, Acid Violet 15, Acid Violet 17, Acid Violet 24, Acid Violet 43, Acid Red 52, Acid Violet 49, Acid Violet 50, Acid Blue 15, Acid Blue 17, Acid Blue 25, Acid Blue 29, Acid Blue 40, Acid Blue 45, Acid Blue 75, Acid Blue 80, Acid Blue 83, Acid Blue 90 and Acid Blue 113, Acid Black 1, Basic Violet 1, Basic Violet 3, Basic Violet 4, Basic Violet 10, Basic Violet 35, Basic Blue 3, Basic Blue 16, Basic Blue 22, Basic Blue 47, Basic Blue 66, Basic Blue 75, Basic Blue 159 y sus mezclas derivadas. En un aspecto, los tintes de molécula pequeña adecuados incluyen tintes de molécula pequeña seleccionados del grupo que consiste en los números de Color Index (Society of Dyers and Colorists, Bradford, Reino Unido) Acid Violet 17, Acid Violet 43, Acid Red 52, Acid Red 73, Acid Red 88, Acid Red 150, Acid Blue 25, Acid Blue 29, Acid Blue 45, Acid Blue 113, Acid Black 1, Direct Blue 1, Direct Blue 71, Direct Violet 51 y sus mezclas derivadas. En un aspecto, los tintes de molécula pequeña adecuados incluyen tintes de molécula pequeña seleccionados del grupo que consiste en los números de Color Index (Society of Dyers and Colorists, Bradford, Reino Unido) Acid Violet 17, Direct Blue 71, Direct Violet 51, Direct Blue 1, Acid Red 88, Acid Red 150, Acid Blue 29, Acid Blue 113 o mezclas derivadas.

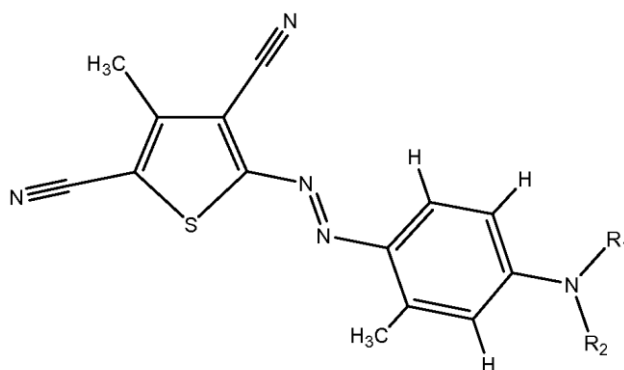
45

50 [0200] Los tintes poliméricos adecuados incluyen tintes poliméricos seleccionados del grupo que consiste en polímeros que contienen cromógenos conjugados (conjugados de tinte-polímero) y polímeros con cromógenos copolimerizados en el esqueleto del polímero y sus mezclas derivadas.

[0201] En un aspecto, los tintes poliméricos adecuados incluyen tintes poliméricos seleccionados del grupo que consiste en colorantes sustanciales de tejidos vendidos bajo el nombre de Liquitint® (Milliken), conjugados de tinte-

polímero formados a partir de al menos un tinte reactivo y un polímero seleccionado del grupo consistente en polímeros que comprenden una fracción seleccionada del grupo consistente en una fracción de hidroxilo, una fracción de amina primaria, una fracción de amina secundaria, una fracción de tiol y sus mezclas derivadas. En todavía un aspecto, los tintes poliméricos adecuados incluyen tintes poliméricos seleccionados del grupo que consiste en Liquitint® Violet CT, carboximetilcelulosa (CMC) conjugada con un tinte azul reactivo, violeta reactivo o rojo reactivo tal como CMC conjugada con C.I. Reactive Blue 19, vendido por Megazyme, Wicklow, Irlanda bajo el nombre de producto AZO-CM-CELLULOSE, código de producto S-ACMC, colorantes poliméricos de trifenilmetano alcoxilado, colorantes poliméricos de tiofeno alcoxilado y sus mezclas derivadas.

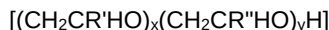
[0202] Los tintes de tefido preferidos incluyen los agentes blanqueadores encontrados en WO08/87497. Estos agentes blanqueadores pueden estar caracterizados por la estructura siguiente (I):



(I)

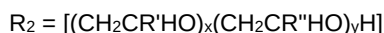
donde R₁ y R₂ pueden seleccionarse independientemente de:

a)



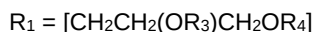
15 donde R' se selecciona del grupo que consiste en H, CH₃, CH₂O(CH₂CH₂O)_zH y mezclas derivadas; donde R'' se selecciona del grupo que consiste en H, CH₂O(CH₂CH₂O)_zH, y mezclas derivadas; donde x + y ≤ 5; donde y ≥ 1; y donde z = 0 a 5;

b) R₁ = alquilo, arilo o arilalquilo y

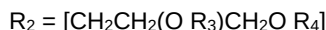


20 donde R' se selecciona del grupo que consiste en H, CH₃, CH₂O(CH₂CH₂O)_zH, y mezclas derivadas; donde R'' se selecciona del grupo que consiste en H, CH₂O(CH₂CH₂O)_zH, y mezclas derivadas; donde x + y ≤ 10; donde y ≥ 1; y donde z = 0 a 5;

c)



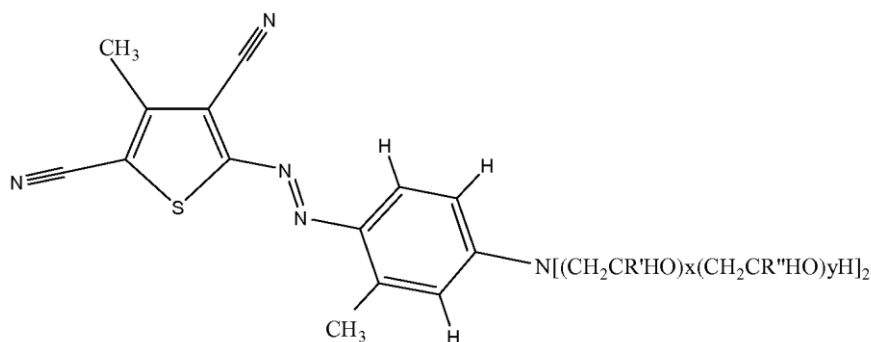
25 y



donde R₃ se selecciona del grupo que consiste en H, (CH₂CH₂O)_zH y mezclas derivadas; y donde z = 0 a 10; donde R₄ se selecciona del grupo que consiste en grupos (C₁-C₁₆)alquilo, arilo y mezclas derivadas; y

30 d) donde R₁ y R₂ pueden seleccionarse independientemente del producto de la adición de amino de óxido de estireno, éter glicidil metílico, éter glicidil isobutílico, isopropilglicidil éter, t-butilglicidil éter, 2-etilhexilglicidil éter y glicidilhexadecil éter, seguido de la adición de 1 a 10 unidades de óxido de alquileo.

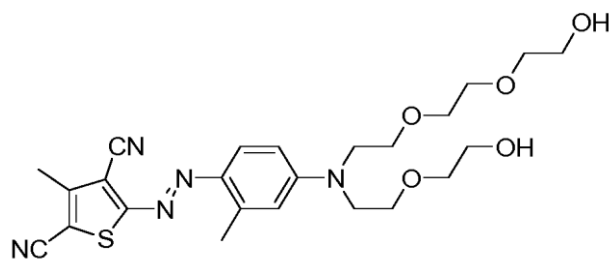
[0203] Un agente de blanqueamiento preferido de la presente invención puede estar caracterizado por la estructura siguiente (II):



(II)

- 5 donde R' se selecciona del grupo que consiste en H, CH₃, CH₂O(CH₂CH₂O)_zH y sus mezclas derivadas; donde R'' se selecciona del grupo que consiste en H, CH₂O(CH₂CH₂O)_zH y sus mezclas derivadas; donde x + y ≤ 5; donde y ≥ 1; y donde z = 0 a 5.

[0204] Un agente de blanqueamiento preferido adicional de la presente invención puede estar caracterizado por la estructura siguiente (III):



(III)

- 10 que comprende típicamente una mezcla con un total de 5 grupos EO. Moléculas preferidas adecuadas son aquellas en la estructura I con los siguientes grupos colgantes en la "parte a" anterior.

TABLA 1

	R1				R2			
	R'	R''	X	y	R'	R''	x	y
A	H	H	3	1	H	H	0	1
B	H	H	2	1	H	H	1	1
c = b	H	H	1	1	H	H	2	1
d = a	H	H	0	1	H	H	3	1

Agentes blanqueadores adicionales de uso incluyen aquellos descritos en US2008/34511 (Unilever). Un agente preferido es "Violet 13".

- 15 [0205] Los conjugados de tinte-arcilla adecuados incluyen conjugados de tinte-arcilla seleccionados del grupo que comprende al menos un tinte catiónico/básico y una arcilla de esmectita, y sus mezclas derivadas. En un aspecto, los conjugados de tinte-arcilla adecuados incluyen conjugados de tinte-arcilla seleccionados del grupo que consiste en un tinte catiónico/básico seleccionado del grupo que consiste en C.I. Basic Yellow 1 hasta 108, C.I. Basic Orange 1 hasta 69, C.I. Basic Red 1 hasta 118, C.I. Basic Violet 1 hasta 51, C.I. Basic Blue 1 hasta 164, C.I. Basic Green 1 hasta 14, C.I. Basic Brown 1 hasta 23, C.I. Basic Black 1 hasta 11 y una arcilla seleccionada del grupo que consiste en arcilla de montmorillonita, arcilla de hectorita, arcilla de saponita y sus mezclas derivadas. En todavía un aspecto, los conjugados de tinte-arcilla adecuados incluyen conjugados de tinte-arcilla seleccionados del grupo que consiste en: conjugado de montmorillonita Basic Blue B7 C.I. 42595, conjugado de montmorillonita Basic Blue B9 C.I. 52015,
- 20

- conjugado de montmorillonita Basic Violet V3 C.I. 42555, conjugado de montmorillonita Basic Green G1 C.I. 42040, conjugado de montmorillonita Basic Red R1 C.I. 45160, conjugado de montmorillonita C.I. Basic Black 2, conjugado de hectorita Basic Blue B7 C.I. 42595, conjugado de hectorita Basic Blue B9 C.I. 52015, conjugado de hectorita Basic Violet V3 C.I. 42555, conjugado de hectorita Basic Green G1 C.I. 42040, conjugado de hectorita Basic Red R1 C.I. 45160, conjugado de hectorita C.I. Basic Black 2, conjugado de saponita Basic Blue B7 C.I. 42595, conjugado de saponita Basic Blue B9 C.I. 52015, conjugado de saponita Basic Violet V3 C.I. 42555, conjugado de saponita Basic Green G1 C.I. 42040, conjugado de saponita Basic Red R1 C.I. 45160, conjugado de saponita C.I. Basic Black 2 y sus mezclas derivadas.
- 5
- [0206] Los pigmentos adecuados incluyen pigmentos seleccionados del grupo que consiste en flavantrona, indantrona, indantrona clorada con de 1 a 4 átomos de cloro, pirantrona, dicloropirantrona, monobromodicloropirantrona, dibromodicloropirantrona, tetrabromopirantrona, diimida de ácido perileno-3,4,9,10-tetracarboxílico, donde los grupos imida pueden ser no sustituidos o sustituidos por C1-C3-alquilo o un radical fenilo o heterocíclico, y donde los radicales fenilo y heterocíclicos pueden llevar adicionalmente sustituyentes que no confieren solubilidad en agua, amidas de ácido antrapirimidincarboxílico, violantrona, isoviolantrona, pigmentos de dioxazina, ftalocianina de cobre que puede contener hasta 2 átomos de cloro por molécula, policloro ftalocianina de cobre o polibromocloro ftalocianina de cobre con hasta 14 átomos de bromo por molécula y sus mezclas derivadas. En un aspecto, los pigmentos adecuados incluyen pigmentos seleccionados del grupo que consiste en azul ultramarino (C.I. Pigment Blue 29), violeta ultramarino (C.I. Pigment Violet 15) y sus mezclas derivadas.
- 10
- 15
- [0207] Los agentes de teñido de tejidos anteriormente mencionados se pueden usar en combinación (se puede usar cualquier mezcla de agentes de teñido de tejidos). Agentes de teñido adecuados se describen con más detalle en US7208459. Niveles preferidos de tinte en composiciones de la invención son 0,00001 a 0,5 % en peso o 0,0001 a 0,25 % en peso. La concentración de tintes preferida en agua para el paso de tratamiento y/o limpieza es de 1 ppb a 5 ppm, 10 ppb a 5 ppm o 20 ppb a 5 ppm. En composiciones preferidas, la concentración de tensoactivo será de 0,2 a 3 g/l.
- 20
- [0208] Encapsulados - La composición puede comprender un encapsulado. En un aspecto, un encapsulado que comprende un núcleo, un recubrimiento con una superficie interna y una externa, donde dicho recubrimiento encapsula dicho núcleo.
- 25
- [0209] En un aspecto de dicho encapsulado, dicho núcleo puede comprender un material seleccionado del grupo que consiste en perfumes; abrillantadores; tintes; repelentes de insectos; siliconas; ceras; sabores; vitaminas; agentes suavizantes de tejidos; agentes de cuidado de la piel en un aspecto, parafinas; enzimas; agentes antibacterianos; blanqueadores; productos refrescantes; y mezclas derivadas; y dicho recubrimiento puede comprender un material seleccionado del grupo que consiste en polietilenos; poliamidas; polivinilalcoholes, opcionalmente con otros comonomeros; poliestirenos; poliisoprenos; policarbonatos; poliésteres; poliacrilatos; aminoplastos, en un aspecto dicho aminoplasto puede comprender unas poliureas, poliuretano y/o poliureauretano, en un aspecto dicha poliurea puede comprender polioximetilenurea y/o formaldehído de melamina; poliolefinas; polisacáridos, en un aspecto dicho polisacárido puede comprender alginato y/o quitosano; gelatina; goma laca; resinas epoxi; polímeros de vinilo; inorgánicos insolubles en agua; silicona; y sus mezclas derivadas.
- 30
- 35
- [0210] En un aspecto de dicho encapsulado, dicho núcleo puede comprender perfume.
- [0211] En un aspecto de dicho encapsulado, dicho recubrimiento puede comprender formaldehído de melamina y/o formaldehído de melamina reticulado.
- 40
- [0212] En un aspecto, los encapsulados adecuados pueden comprender un material central y un recubrimiento, donde dicho recubrimiento al menos parcialmente rodea dicho material central, se describe. Al menos un 75%, un 85% o un 90% de dichos encapsulados pueden tener una fuerza de fractura de 0,2 a 10 MPa, de 0,4 a 5 MPa, de 0,6 a 3,5 MPa o de 0,7 a 3 MPa; y una fuga de agente beneficioso de 0 a 30%, de 0 a 20% o de 0 a 5%.
- [0213] En un aspecto, al menos un 75%, un 85% o un 90% de dichos encapsulados pueden tener un tamaño de partícula de 1 a 80 micras, de 5 a 60 micras, de 10 a 50 micras o de 15 a 40 micras.
- 45
- [0214] En un aspecto, al menos un 75%, un 85% o un 90% de dichos encapsulados pueden tener un grosor de pared de partícula de 30 a 250 nm, de 80 a 180 nm o de 100 a 160 nm.
- [0215] En un aspecto, dicho material central de los encapsulados puede comprender un material seleccionado del grupo que consiste en una materia prima de perfume y/o opcionalmente un material seleccionado del grupo que consiste en aceite vegetal, incluidos aceites vegetales puros y/o mezclados, incluidos aceite de ricino, aceite de coco, aceite de semilla de algodón, aceite de uva, colza, aceite de soja, aceite de maíz, aceite de palma, aceite de
- 50

linaza, aceite de alazor, aceite de oliva, aceite de cacahuete, aceite de coco, aceite de nuez de palma, aceite de ricino, aceite de limón y mezclas derivadas; ésteres de aceites vegetales, ésteres, incluidos adipato de dibutilo, ftalato de dibutilo, adipato de butilbencilo, adipato de benciloctilo, fosfato de tricresilo, fosfato de trioctilo y mezclas derivadas; hidrocarburos de cadena lineal o ramificada, incluidos aquellos hidrocarburos de cadena lineal o ramificada que tienen un punto de ebullición mayor de aproximadamente 80°C; terfenilos parcialmente

[0216] En un aspecto, dicho material de pared de los encapsulados puede comprender una resina adecuada que incluya el producto de reacción de un aldehído y una amina, los aldehídos adecuados incluyen formaldehído. Las aminas adecuadas incluyen melamina, urea, benzoguanamina, glicolurilo y sus mezclas derivadas. Las melaminas adecuadas incluyen melamina de metilol, melamina de metilol metilada, imino melamina y sus mezclas derivadas. Las ureas adecuadas incluyen dimetilolurea, dimetilolurea metilada, urea-resorcinol y sus mezclas derivadas.

[0217] En un aspecto, se pueden emplear secuestrantes de formaldehído adecuados con un encapsulado, por ejemplo, en una suspensión acuosa de cápsula y/o añadidos a una composición antes, durante o después de que el encapsulado se añada a tal composición. Las cápsulas adecuadas pueden hacerse por la siguiente enseñanza de US2008/0305982; y/o US2009/0247449.

[0218] En un aspecto preferido la composición puede comprender también un adyuvante de deposición, preferiblemente consistente en el grupo que comprende polímeros catiónicos o no iónicos. Los polímeros adecuados incluyen almidones catiónicos, hidroxietilcelulosa catiónica, polivinilformaldehído, goma garrofín, mananos, xiloglucanos, goma tamarinda, polietilentereftalato y polímeros que contienen metacrilato de dimetilaminoetilo, opcionalmente con uno o monómeros seleccionados del grupo que comprende ácido acrílico y acrilamida.

[0219] Perfumes - En un aspecto la composición comprende un perfume que comprende una o más materias primas de perfume seleccionadas del grupo que consiste en 1,1'-oxibis-2-propanol; ácido 1,4-ciclohexanodicarboxílico, éster dietílico; (etoximetoxi)ciclododecano; 1,3-nonanodiol, monoacetato; ácido (3-metilbutoxi)acético, 2-propenil éster; beta-metil ciclododecanoetanol; 2-metil-3-[(1,7,7-trimetilbicyclo[2.2.1]hept-2-il)oxi]-1-propanol; oxaciclohexadecan-2-ona; alfa-metil-bencenometanol acetato; trans-3-etoxi-1,1,5-trimetilciclohexano; 4-(1,1-dimetiletil)ciclohexanol acetato; dodecahidro-3a,6,6,9a-tetrametilnafto[2,1-b]furan; beta-metil bencenopropanal; beta-metil-3-(1-metiletil)bencenopropanal; 4-fenil-2-butanona; ácido 2-metilbutanoico, éster etílico; benzaldehído; ácido 2-metilbutanoico, 1-metiletil éster; dihidro-5-pentil-2(3H)furanona; (2E)-1-(2,6,6-trimetil-2-ciclohexen-1-il)-2-buten-1-ona; dodecanal; undecanal; 2-etil- alfa, alfa-dimetilbencenopropanal; decanal; alfa, alfa-dimetilbencenoetanol acetato; 2-(fenilmetil)octanal; ácido 2-[[3-[4-(1,1-dimetiletil)fenil]-2-metilpropiliden]amino]benzoico, éster metílico; 1-(2,6,6-trimetil-3-ciclohexen-1-il)-2-buten-1-ona; 2-pentilciclopentanona; ácido 3-oxo-2-pentil ciclopentanoacético, éster metílico; 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído; 3-etoxi-4-hidroxibenzaldehído; 2-heptilciclopentanona; 1-(4-metilfenil)etanona; (3E)-4-(2,6,6-trimetil-1-ciclohexen-1-il)-3-buten-2-ona; (3E)-4-(2,6,6-trimetil-2-ciclohexen-1-il)-3-buten-2-ona; bencenoetanol; 2H-1-benzopiran-2-ona; 4-metoxibenzaldehído; 10-undecenal; ácido propanoico, fenilmetil éster; beta-metilbencenopentanol; 1,1-dietoxi-3,7-dimetil-2,6-octadieno; alfa, alfa-dimetilbencenoetanol; (2E)-1-(2,6,6-trimetil-1-ciclohexen-1-il)-2-buten-1-ona; ácido acético, fenilmetil éster; ácido ciclohexanopropanoico, 2-propenil éster; ácido hexanoico, 2-propenil éster; 1,2-dimetoxi-4-(2-propenil)benceno; 1,5-dimetil-biciclo[3.2.1]octan-8-ona oxima; 4-(4-hidroxi-4-metilpentil)-3-ciclohexeno-1-carboxaldehído; 3-buten-2-ol; ácido 2-[[[2,4(o 3,5)-dimetil-3-ciclohexen-1-il]metilen]amino]benzoico, éster metílico; 8-ciclohexadecen-1-ona; metil ionona; 2,6-dimetil-7-octen-2-ol; 2-metoxi-4-(2-propenil)fenol; (2E)-3,7-dimetil-2,6-octadien-1-ol; ácido 2-hidroxi-benzoico, (3Z)-3-hexenil éster; 2-tridecenonitrilo; 4-(2,2-dimetil-6-metilenciclohexil)-3-metil-3-buten-2-ona; tetrahidro-4-metil-2-(2-metil-1-propenil)-2H-pirano; ácido acético, (2-metilbutoxi)-, 2-propenil éster; ácido benzoico, 2-hidroxi-, 3-metilbutil éster; 2-buten-1-ona, 1-(2,6,6-trimetil-1-ciclohexen-1-il)-, (Z)-; ácido ciclopentanocarboxílico, 2-hexil-3-oxo-, metil éster; bencenopropanal, 4-etil-, alfa-, alfa-dimetil-, 3-ciclohexeno-1-carboxaldehído, 3-(4-hidroxi-4-metilpentil)-; etanona 1-(2,3,4,7,8,8a-hexahidro-3,6,8,8-tetrametil-1H-3a,7- metanoazulen-5-il)-, [3R-(3.alfa.,3a.beta.,7.beta.,8a.alfa.)]-; undecanal, 2-metil-2H-piran-2-ona, 6-butiltetrahidro-, bencenopropanal, 4-(1,1-dimetiletil)-. alfa.-metil-, 2(3H)-furanona, 5-heptildihidro-, ácido benzoico, 2-[(7-hidroxi-3,7-dimetiloctilideno)amino]-, metil; ácido benzoico, 2-hidroxi-, fenilmetil éster; naftaleno, 2-metoxi-, 2-ciclopenten-1-ona, 2-hexil-, 2(3H)-furanona, 5-hexildihidro-, ácido oxiranocarboxílico, 3-metil-3-fenil-, éster etílico; 2-oxabicyclo[2.2.2]octano, 1,3,3-trimetil-, bencenopentanol, .gamma.-metil-, 3-octanol, 3,7-dimetil-, 3,7-dimetil-2,6-octadienonitrilo; 3,7-dimetil-6-octen-1-ol; acetato de terpineol; 2-metil-6-metileno-7-octen-2-ol, derivado dihidro; 3a,4,5,6,7,7a-hexahidro-4,7-metano-1H-inden-6-ol propanoato; 3-metil-2-buten-1-ol acetato; (Z)-3-hexen-1-ol acetato; 2-etil-4-(2,2,3-trimetil-3-ciclopenten-1-il)-2-buten-1-ol; 4-(octahidro-4,7-metano-5H-inden-5-ilideno)-butanal; 3-2,4-dimetil-ciclohexeno-1-carboxaldehído; 1-(1,2,3,4,5,6,7,8-octahidro-2,3,8,8-tetrametil-2-naftalenil)-etanona; ácido 2-hidroxi-benzoico, éster metílico; ácido 2-hidroxi-benzoico, hexil éster; 2-fenoxi-etanol; ácido 2-hidroxi-benzoico, éster de pentilo; 2,3-heptanodiona; 2-hexen-1-ol; 6-octen-2-ol, 2,6-dimetil-, damascona (alfa, beta, gamma o delta o mezclas derivadas), 4,7-metano-1H-inden-6-ol, 3a,4,5,6,7,7a-hexahidro-, acetato; 9-undecenal;

8-undecenal; isociclocitral; etanona, 1-(1,2,3,5,6,7,8,8a-octahidro-2,3,8,8-tetrametil-2-naftalenil)-; 3-ciclohexeno-1-carboxaldehído, 3,5-dimetil-; 3-ciclohexeno-1-carboxaldehído, 2,4-dimetil-; 1,6-octadien-3-ol, 3,7-dimetil-; 1,6-octadien-3-ol, 3,7-dimetil-, acetato; Lilial (p-t-bucinal) y ciclopentanona, 2-[2-(4-metil-3-ciclohexen-1-il)propil]- y 1-metil-4-(1-metiletenil)ciclohexeno y sus mezclas derivadas.

5 [0220] En un aspecto la composición puede comprender una partícula de perfume encapsulada que comprende un compuesto hidroxílico hidrosoluble o melanina-formaldehído o alcohol polivinílico modificado. En un aspecto el encapsulado comprende (a) una matriz sólida al menos parcialmente hidrosoluble que comprende uno o más compuestos hidroxílicos hidrosolubles, preferiblemente almidón; y (b) un aceite de perfume encapsulado por la matriz sólida.

10 [0221] En otro aspecto el perfume puede complejarse previamente con una poliamina, preferiblemente una polietilenimina para formar una base de Schiff.

15 [0222] Polímeros - La composición puede comprender uno o más polímeros. Ejemplos son carboximetilcelulosa, poli(vinil-pirrolidona), poli(etilenglicol), alcohol polivinílico, poli(vinilpiridina-N-óxido), poli(vinilimidazol), policarboxilatos tales como poliacrilatos, copolímeros de ácido maleico/acrílico y copolímeros de lauril metacrilato/ácido acrílico.

[0223] La composición puede comprender uno o más polímeros de limpieza anfífilos tal como el compuesto con la siguiente estructura general: bis((C₂H₅O)(C₂H₄O)_n)(CH₃)-N⁺-C_xH_{2x}-N⁺-(CH₃)-bis((C₂H₅O)(C₂H₄O)_n), donde n = de 20 a 30, y x = de 3 a 8, o variantes sulfatadas o sulfonadas derivadas.

20 [0224] La composición puede comprender polímeros de limpieza de grasa alcoxilados anfífilos que tienen propiedades hidrófilas e hidrofóbicas equilibradas de manera que eliminan partículas de grasa de tejidos y superficies. Formas de realización específicas de los polímeros de limpieza de grasa alcoxilados anfífilos de la presente invención comprenden una estructura central y una pluralidad de grupos alcoxilato unidos a esa estructura central. Estos pueden comprender polialquileniminas alcoxiladas, preferiblemente con un bloque de óxido de polietileno interno y un bloque de óxido de polipropileno externo.

25 [0225] Policarboxilatos alcoxilados tales como los obtenidos a partir de poliacrilatos son útiles en la presente para proporcionar un rendimiento de eliminación de grasa adicional. Tales materiales se describen en WO91/08281 y PCT90/01815. Químicamente, estos materiales comprenden poliacrilatos que tienen una cadena lateral etoxi por cada 7-8 unidades de acrilato. Las cadenas laterales tienen la fórmula -(CH₂CH₂O)_m(CH₂)_nCH₃, donde m es 2-3 y n es 6-12. Las cadenas laterales están unidas por un éster al "esqueleto" de poliacrilato para proporcionar un
30 estructura de tipo polímero "peine". El peso molecular puede variar, pero está típicamente en el rango de 2000 a 50.000. Tales policarboxilatos alcoxilados pueden comprender de un 0,05 % en peso a un 10 % en peso de las composiciones en la presente.

35 [0226] Los tensoactivos derivados de isoprenoides de la presente invención, y sus mezclas con otros cotensoactivos y otros ingredientes complementarios, son particularmente adecuados para ser usados con un copolímero de injerto anfílico, preferiblemente el copolímero de injerto anfílico comprende (i) un esqueleto de polietilenglicol; y (ii) y al menos una fracción colgante seleccionada de acetato de polivinilo, alcohol polivinílico y sus mezclas derivadas. Un copolímero de injerto anfílico preferido es Sokalan HP22, suministrado por BASF. Los polímeros adecuados incluyen copolímeros de injerto aleatorios, preferiblemente un copolímero de óxido de polietileno injertado con acetato de polivinilo con un esqueleto de óxido de polietileno y múltiples cadenas laterales de acetato de polivinilo.
40 El peso molecular del esqueleto de óxido de polietileno es preferiblemente 6000 y la proporción en peso del óxido de polietileno respecto a acetato de polivinilo es de 40 a 60 y no mayor de 1 punto de injerto por 50 unidades de óxido de etileno.

45 [0227] Polímero de carboxilato - La composición de la presente invención también puede incluir uno o más polímeros de carboxilato tal como un copolímero aleatorio de maleato/acrilato u homopolímero de poliacrilato. En un aspecto, el polímero de carboxilato es un homopolímero de poliacrilato que tiene un peso molecular de 4.000 a 9.000 Da, o de 6.000 a 9.000 Da.

[0228] Polímero de liberación de suciedad - La composición de la presente invención también puede incluir uno o más polímeros de liberación de suciedad con una estructura tal y como se define por una de las siguientes estructuras (I), (II) o (III):

50 (I) -[(OCHR¹-CHR²)_a-O-OC-Ar-CO-]_d
(II) -[(OCHR³-CHR⁴)_b-O-OC-sAr-CO-]_e
(III) -[(OCHR⁵-CHR⁶)_c-OR⁷]_f

donde:

a, b y c son de 1 a 200;

d, e y f son de 1 a 50;

Ar es un fenileno 1,4-sustituido;

sAr es fenileno 1,3-sustituido sustituido en la posición 5 con SO₃Me;

Me es Li, K, Mg/2, Ca/2, Al/3, amonio, mono-, di-, tri- o tetraalquilamonio donde los grupos alquilo son alquilo C₁-C₁₈ o hidroxialquilo C₂-C₁₀, o mezclas derivadas;

R¹, R², R³, R⁴, R⁵ y R⁶ se seleccionan independientemente de H o n- o isoalquilo C₁-C₁₈; y

R⁷ es un alquilo lineal o ramificado C₁-C₁₈, o un alquenilo lineal o ramificado C₂-C₃₀, o un grupo cicloalquilo con de 5 a 9 átomos de carbono, o un grupo arilo C₈-C₃₀ o un grupo arilalquilo C₆-C₃₀.

[0229] Polímeros de liberación de suciedad adecuados son polímeros de liberación de suciedad de poliéster tales como los polímeros Repel-o-tex, incluidos Repel-o-tex, SF-2 y SRP6 suministrados por Rhodia. Otros polímeros de liberación de suciedad adecuados incluyen los polímeros Texcare, incluidos Texcare SRA100, SRA300, SRN100, SRN170, SRN240, SRN300 y SRN325 suministrados por Clariant. Otros polímeros de liberación de suciedad adecuados son los polímeros Marloquest, tal como Marloquest SL suministrado por Sasol.

[0230] Polímero celulósico - La composición de la presente invención también puede incluir uno o más polímeros celulósicos, incluidos aquellos seleccionados de alquilcelulosa, alcoxilalquilcelulosa, carboxialquilcelulosa, alquilcarboxialquilcelulosa. En un aspecto, los polímeros celulósicos se seleccionan del grupo que comprende carboximetilcelulosa, metilcelulosa, metilhidroxietilcelulosa, metilcarboximetilcelulosa y sus mezclas derivadas. En un aspecto, la carboximetilcelulosa tiene un grado de sustitución de carboximetilo de 0,5 a 0,9 y un peso molecular de 100.000 a 300.000 Da.

[0231] Enzimas - La composición puede comprender una o más enzimas que proporcionan un rendimiento de limpieza y/o beneficios de cuidado de tejidos. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen, pero de forma no limitativa, hemicelulasas, peroxidases, proteasas, celulasas, xilanasas, lipasas, fosfolipasas, esterases, cutinasas, pectinasas, mananasas, pectato liasas, queratinasas, reductasas, oxidasas, fenoloxidasas, lipoxigenasas, ligninasas, pululaninas, tanasas, pentosaninas, malanasas, β-glucanasas, arabinosidasas, hialuronidasas, condroitinasas, lacasa, clorofilasas, amilasas o mezclas derivadas. Una combinación típica es un cóctel enzimático que puede comprender, por ejemplo, una proteasa y una lipasa conjuntamente con amilasa. En caso de existir en una composición, las enzimas adicionales anteriormente mencionadas pueden estar presentes en niveles de 0,00001 a 2 % en peso, de 0,0001 a 1 % en peso o de 0,001 a 0,5 % en peso de proteína enzimática en peso de la composición.

[0232] En general las propiedades de la(s) enzima(s) seleccionada(s) deberían ser compatibles con el detergente seleccionado, (es decir, pH óptimo, compatibilidad con otros ingredientes enzimáticos y no enzimáticos, etc.), y la(s) enzima(s) debería(n) estar presentes en cantidades eficaces.

[0233] En un aspecto preferido las enzimas incluirían una celulasa. Las celulasas adecuadas incluyen aquellas de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen mutantes químicamente modificados o diseñados por ingeniería de proteínas. Las celulasas adecuadas incluyen celulasas de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Humicola*, *Fusarium*, *Thielavia*, *Acremonium*, por ejemplo, las celulasas fúngicas producidas por *Humicola insolens*, *Myceliophthora thermophila* y *Fusarium oxysporum* descritas en US4435307, US5648263, US5691178, US5776757 y WO89/09259.

[0234] Celulasas especialmente adecuadas son las celulasas alcalinas o neutras que tienen beneficios para el cuidado del color. Ejemplos de tales celulasas son las celulasas descritas en EP0495257, EP0531372, WO96/11262, WO96/29397, WO98/08940. Otros ejemplos son variantes de celulasa tales como las descritas en WO94/07998, EP0531315, US5457046, US5686593, US5763254, WO95/24471, WO98/12307 y PCT/DK98/00299.

[0235] Las celulasas disponibles comercialmente incluyen Celluzyme™ y Carezyme™ (Novozymes A/S), Clazinase™ y Puradax HA™ (Genencor International Inc.) y KAC-500(B)™ (Kao Corporation).

[0236] En un aspecto las enzimas preferidas incluirían una proteasa. Las proteasas adecuadas incluyen aquellas de origen bacteriano, fúngico, vegetal, viral o animal, por ejemplo, de origen vegetal o microbiano. Se prefiere un origen microbiano. Se incluyen mutantes químicamente modificados o diseñados por ingeniería de proteínas. Puede ser una proteasa alcalina, tal como una proteasa serínica o una metaloproteasa. Una proteasa serínica puede, por ejemplo, ser de la familia S1, tal como la tripsina, o la familia S8, tal como la subtilisina. Una proteasa de metaloproteasas puede, por ejemplo, ser una termolisina de, por ejemplo, la familia M4, u otra metaloproteasa tal como las de las familias M5, M7 o M8.

[0237] El término "subtilasas" se refiere a un subgrupo de proteasas serínicas según Siezen et al., Protein Engng. 4 (1991) 719-737 y Siezen et al. Protein Science 6 (1997) 501-523. Las proteasas serínicas son un subgrupo de proteasas caracterizadas por tener una serina en el sitio activo, que forma un aducto covalente con el sustrato. Las subtilasas se pueden dividir en 6 subdivisiones, es decir, la familia de subtilisinas, la familia de termitasas, la familia de proteinasa K, la familia de peptidasa lantibiótica, la familia de kexina y la familia de pirolisina.

[0238] Ejemplos de subtilasas son aquellas derivadas de *Bacillus* tal como *Bacillus lentus*, *B. alkalophilus*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus* y *Bacillus gibsonii* descritas en US7262042 y WO09/021867, y subtilisina *lentus*, subtilisina *Novo*, subtilisina *Carlsberg*, *Bacillus licheniformis*, subtilisina *BPN'*, subtilisina 309, subtilisina 147 y subtilisina 168 descritas en WO89/06279 y proteasa PD138 descrita en (WO93/18140). Otras proteasas útiles pueden ser aquellas descritas en WO92/175177, WO01/016285, WO02/026024 y WO02/016547. Ejemplos de proteasas similares a la tripsina son tripsina (por ejemplo, de origen porcino o bovino) y la proteasa de *Fusarium* descrita en WO89/06270, WO94/25583 y WO05/040372, y las proteasas de quimotripsina derivadas de *Cellumonas* descritas en WO05/052161 y WO05/052146.

[0239] Una proteasa preferida adicional es la proteasa alcalina de *Bacillus lentus* DSM 5483, como se describe, por ejemplo, en WO95/23221, y variantes de las mismas que se describen en WO92/21760, WO95/23221, EP1921147 y EP1921148.

[0240] Ejemplos de metaloproteasas son la metaloproteasa neutra como se describe en WO07/044993 (Genencor Int.) tal como aquellas derivadas de *Bacillus amyloliquefaciens*. Ejemplos de proteasas útiles son las variantes descritas en: WO92/19729, WO96/034946, WO98/20115, WO98/20116, WO99/011768, WO01/44452, WO03/006602, WO04/03186, WO04/041979, WO07/006305, WO11/036263, WO11/036264, especialmente las variantes con sustituciones en una o más de las siguientes posiciones: 3, 4, 9, 15, 27, 36, 57, 68, 76, 87, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 106, 118, 120, 123, 128, 129, 130, 160, 167, 170, 194, 195, 199, 205, 206, 217, 218, 222, 224, 232, 235, 236, 245, 248, 252 y 274 usando la numeración de BPN'. De manera más preferida las variantes de subtilasa pueden comprender las mutaciones: S3T, V4I, S9R, A15T, K27R, *36D, V68A, N76D, N87S,R, *97E, A98S, S99G,D,A, S99AD, S101G,M,R S103A, V104I,Y,N, S106A, G118V,R, H120D,N, N123S, S128L, P129Q, S130A, G160D, Y167A, R170S, A194P, G195E, V199M, V205I, L217D, N218D, M222S, A232V, K235L, Q236H, Q245R, N252K, T274A (usando la numeración de BPN').

[0241] Las enzimas proteásicas disponibles comercialmente adecuadas incluyen aquellas vendidas bajo los nombres comerciales Alcalase®, Blaze®, Duralase™, Durazym™, Relase®, Relase® Ultra, Savinase®, Savinase® Ultra, Primase®, Polarzyme®, Kannase®, Liquanase®, Liquanase® Ultra, Ovozyme®, Coronase®, Coronase® Ultra, Neutrase®, Everlase® y Esperase® todas podrían ser vendidas como Ultra® o Evity® (Novozymes A/S), aquellas vendidas bajo el nombre comercial Maxatase®, Maxacal®, Maxapem®, Purafect®, Purafect Prime®, Preferenz™, Purafect MA®, Purafect Ox®, Purafect OxP®, Puramax®, Properase®, Effectenz™, FN2®, FN3®, FN4®, Excellase®, Opticlean® y Optimase® (Danisco/DuPont), Axapem™ (Gist-Brocades N.V.), BLAP (secuencia mostrada en la figura 29 de la US5352604) y variantes derivadas (Henkel AG) y KAP (subtilisina de *Bacillus alkalophilus*) de Kao.

[0242] En un aspecto las enzimas preferidas incluirían una amilasa. Las amilasas adecuadas pueden ser una alfa-amilasa o una glucoamilasa y pueden ser de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen mutantes químicamente modificados o diseñados por ingeniería de proteínas. Las amilasas incluyen, por ejemplo, alfa-amilasas obtenidas de *Bacillus*, por ejemplo, una cepa especial de *Bacillus licheniformis*, descrita con más detalle en GB1296839.

[0243] Las amilasas adecuadas incluyen amilasas con la SEQ ID NO: 3 en WO95/10603 o variantes que tienen un 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3 de la misma. Variantes preferidas se describen en WO94/02597, WO94/18314, WO97/43424 y la SEQ ID NO: 4 de WO99/019467, tal como variantes con sustituciones en una o más de las siguientes posiciones: 15, 23, 105, 106, 124, 128, 133, 154, 156, 178, 179, 181, 188, 190, 197, 201, 202, 207, 208, 209, 211, 243, 264, 304, 305, 391, 408 y 444.

[0244] Diferentes amilasas adecuadas incluyen amilasas con la SEQ ID NO: 6 en WO02/010355 o variantes de las mismas que tienen un 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 6. Variantes preferidas de la SEQ ID NO: 6 son aquellas que tienen una delección en las posiciones 181 y 182 y una sustitución en la posición 193.

[0245] Otras amilasas que son adecuadas son una alfa-amilasa híbrida que comprende los residuos 1-33 de la alfa-amilasa derivada de *B. amyloliquefaciens* mostrada en la SEQ ID NO: 6 de WO2006/066594 y los residuos 36-483 de la alfa-amilasa de *B. licheniformis* mostrada en la SEQ ID NO: 4 de WO2006/066594 o variantes que tienen un 90% de identidad de secuencia de la misma. 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, 1201, A209 y Q264. Las variantes más preferidas de la alfa-amilasa híbrida que

comprende los residuos 1-33 de la alfa-amilasa derivada de *B. amyloliquefaciens* mostrada en la SEQ ID NO: 6 de WO2006/066594 y los residuos 36-483 de la SEQ ID NO: 4 son aquellas con las sustituciones:

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

[0246] Amilasas adicionales que son adecuadas son las amilasas que tienen la SEQ ID NO: 6 en WO99/019467 o variantes de las mismas que tienen un 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 6. Variantes preferidas de la SEQ ID NO: 6 son aquellas 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. Amilasas particularmente preferidas son aquellas que tienen una delección en las posiciones R181 y G182 o las posiciones H183 y G184.

[0247] Amilasas adicionales que se pueden usar son aquellas que tienen la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 7 de WO96/023873 o variantes de las mismas que tienen un 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 3 o la SEQ ID NO: 7. Variantes preferidas de la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 3 o la SEQ ID NO: 7 son aquellas 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. Variantes más preferidas son aquellas que tienen una delección en las posiciones 181 y 182 o las posiciones 183 y 184. Las variantes de amilasa más preferidas de la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 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.

[0248] Otras amilasas que se pueden usar son amilasas que tienen la SEQ ID NO: 2 de la WO08/153815, la SEQ ID NO: 10 en WO01/66712 o variantes de las mismas que tienen un 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2 de la WO08/153815 o un 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 10 en WO01/66712. Variantes preferidas de la SEQ ID NO: 10 en WO01/66712 son aquellas 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.

[0249] Amilasas adecuadas adicionales son amilasas que tienen la SEQ ID NO: 2 de la WO09/061380 o variantes que tienen un 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2 de las mismas. Variantes preferidas de la SEQ ID NO: 2 son aquellas que tienen un truncamiento del extremo C-terminal 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. Variantes más preferidas de la SEQ ID NO: 2 son aquellas 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. Variantes de amilasa más preferidas de SEQ ID NO: 2 son aquellas con las sustituciones:

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

[0250] Otras amilasas adecuadas son la alfa-amilasa con SEQ ID NO: 12 en WO01/66712 o una variante con al menos un 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 12. Variantes de amilasa preferidas son aquellas que tienen una sustitución, una delección o una inserción en una o más de las siguientes posiciones de la SEQ ID NO: 12 en WO01/66712: R28, R118, N174; R181, G182, D183, G184, G186, W189, N195, M202, Y298, N299, K302, S303, N306, R310, N314; R320, H324, E345, Y396, R400, W439, R444, N445, K446, Q449, R458, N471, N484. Las amilasas preferidas en particular incluyen variantes que tienen una delección de D183 y G184 y con las sustituciones R118K, N195F, R320K y R458K, y una variante que tiene adicionalmente sustituciones en una o más posiciones seleccionadas del grupo: M9, G149, G182, G186, M202, T257, Y295, N299, M323, E345 y A339, con la máxima preferencia una variante que tiene adicionalmente sustituciones en todas estas posiciones.

[0251] Otros ejemplos son variantes de amilasa tales como las descritas en WO2011/098531, WO2013/001078 y WO2013/001087.

[0252] Amilasas disponibles comercialmente son Duramyl™, Termamyl™, Termamyl Ultra™, Fungamyl™, Ban™, Stainzyme™, Stainzyme Plus™, Amplify®, Supramyl™, Natalase™, Liquozyme X y BAN™ (de Novozymes A/S), KEMZYM® AT 9000 Biozym Biotech Trading GmbH Wehlstrasse 27b A-1200 Viena Austria, y Rapidase™,

Purastar™/Effectenz™, Powerase, Preferenz S100, Preferenx S110, ENZYSE®, OPTISIZE HT PLUS® y PURASTAR OXAM® (Danisco/DuPont) y KAM® (Kao).

[0253] Lipasas y cutinasas adecuadas incluyen aquellas de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen enzimas mutantes modificadas químicamente o diseñadas por ingeniería de proteínas. Los ejemplos incluyen una lipasa de *Thermomyces*, por ejemplo de *T. lanuginosus* (previamente denominada *Humicola lanuginosa*) como se describe en EP258068 y EP305216, cutinasa de *Humicola*, por ejemplo *H. insolens* (WO96/13580), lipasa de cepas de *Pseudomonas* (algunas de estas ahora redenominadas a *Burkholderia*), por ejemplo *P. alcaligenes* o *P. pseudoalcaligenes* (EP218272), *P. cepacia* (EP331376), *P. sp.* cepa SD705 (WO95/06720 y WO96/27002), *P. wisconsinensis* (WO96/12012), lipasas de *Streptomyces* de tipo GDSL (WO10/065455), cutinasa de *Magnaporthe grisea* (WO10/107560), cutinasa de *Pseudomonas mendocina* (US5,389,536), lipasa de *Thermobifida fusca* (WO11/084412, WO13/033318), lipasa de *Geobacillus stearothermophilus* (WO11/084417), lipasa de *Bacillus subtilis* (WO11/084599) y lipasa de *Streptomyces griseus* (WO11/150157) y *S. pristinaespiralis* (WO12/137147).

[0254] Otros ejemplos son variantes de lipasa tales como las descritas en EP407225, WO92/05249, WO94/01541, WO94/25578, WO95/14783, WO95/30744, WO95/35381, WO95/22615, WO96/00292, WO97/04079, WO97/07202, WO00/34450, WO00/60063, WO01/92502, WO07/87508 y WO09/109500.

[0255] Los productos de lipasa comerciales preferidos incluyen Lipolase™, Lipex™, Lipex Evity™, Lipex 105T™, Lipolex™ y Lipoclean™ (Novozymes A/S), Lumafast (originalmente de Genencor) y Lipomax (originalmente de Gist-Brocades).

[0256] Todavía otros ejemplos son las lipasas referidas a veces como aciltransferasas o perhidrolasas, por ejemplo aciltransferasas con homología a la lipasa A de *Candida antarctica* (WO10/111143), la aciltransferasa de *Mycobacterium smegmatis* (WO05/56782), perhidrolasas de la familia CE 7 (WO09/67279) y variantes de la perhidrolasa de *M. smegmatis*, en particular la variante S54V usada en el producto comercial Gentle Power Bleach de Huntsman Textile Effects Pte Ltd (WO10/100028).

[0257] En un aspecto, otras enzimas preferidas incluyen endoglucanasas derivadas microbianas que muestran una actividad de endo-beta-1,4-glucanasa (EC3.2.1.4), incluido un polipéptido bacteriano endógeno respecto a un miembro del género *Bacillus* que tiene una secuencia de al menos un 90%, un 94%, un 97% o un 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2 en US7141403 y sus mezclas derivadas. Endoglucanasas adecuadas se venden bajo los nombres comerciales Celluclean® y Whitezyme® (Novozymes).

[0258] Otras enzimas preferidas incluyen pectato liasas vendidas bajo los nombres comerciales Pectawash®, Pectaway®, Xpect® y mananasas vendidas bajo los nombres comerciales Mannaway® (Novozymes) y Purabrite® (Danisco/DuPont).

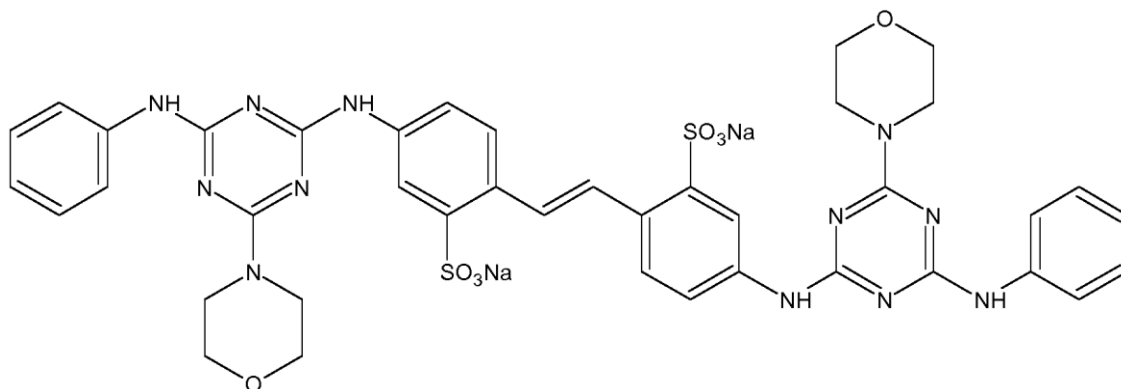
[0259] La(s) enzima(s) detergente(s) se puede(n) incluir en una composición detergente por adición de aditivos separados que contienen una o más enzimas, o por adición de un aditivo combinado que comprende todas estas enzimas. Un aditivo de detergente de la invención, es decir, un aditivo separado o un aditivo combinado, se puede formular, por ejemplo, como granulado, líquido, suspensión acuosa, etc. Formulaciones de aditivos de detergentes preferidas son los granulados, en particular los granulados no pulverulentos, los líquidos, en particular los líquidos estabilizados, o las suspensiones acuosas.

[0260] Los granulados no pulverulentos pueden ser producidos, por ejemplo, como se describe en US4106991 y US4661452 y pueden opcionalmente recubrirse por métodos conocidos en la técnica. Ejemplos de materiales de recubrimiento cerosos son productos de poli(óxido de etileno) (polietilenglicol, PEG) con pesos molares medios de 1000 a 20000; nonilfenoles etoxilados que tienen de 16 a 50 unidades de óxido de etileno; alcoholes grasos etoxilados donde el alcohol contiene de 12 a 20 átomos de carbono y en el cual hay de 15 a 80 unidades de óxido de etileno; alcoholes grasos; ácidos grasos; y mono- y di- y triglicéridos de ácidos grasos. Ejemplos de materiales de recubrimiento formadores de películas adecuados para la aplicación por técnicas de lecho fluidificado se dan en GB1483591. Las preparaciones enzimáticas líquidas pueden, por ejemplo, ser estabilizadas añadiendo un poliol tal como propilenglicol, un azúcar o alcohol de azúcar, ácido láctico o ácido bórico según métodos establecidos. Se pueden preparar enzimas protegidas según el método descrito en EP238216.

[0261] Agentes inhibidores de transferencia de tinte - Las composiciones de la presente invención también pueden incluir uno o más agentes inhibidores de transferencia de tinte. Los agentes inhibidores de transferencia de tinte poliméricos adecuados incluyen, pero de forma no limitativa, polímeros de polivinilpirrolidona, polímeros N-óxido de poliamina, copolímeros de N-vinilpirrolidona y N-vinilimidazola, poliviniloxazolidonas y polivinilimidazolas o mezclas derivadas. En caso de existir en una composición, los agentes inhibidores de transferencia de tinte pueden estar presentes en niveles de 0,0001 a 10 % en peso, de 0,01 a 5 % en peso o de 0,1 a 3 % en peso.

[0262] Abrillantadores - Las composiciones de la presente invención pueden contener también componentes adicionales que pueden teñir los artículos que se están limpiando, tal como abrillantadores fluorescentes.

[0263] La composición puede comprender abrillantador fluorescente C.I. 260 en forma alfa-cristalina con la estructura siguiente:



5

[0264] En un aspecto, el abrillantador es un abrillantador soluble en agua fría, tal como el abrillantador fluorescente C.I. 260 en forma alfa-cristalina. En un aspecto el abrillantador está predominantemente en la forma alfa-cristalina, lo que significa que típicamente al menos un 50 % en peso, al menos un 75 % en peso, al menos un 90 % en peso, al menos un 99 % en peso o incluso sustancialmente todo el abrillantador fluorescente C.I. 260 está en la forma alfa-cristalina.

10

[0265] El abrillantador está típicamente en la forma particulada micronizada, con un tamaño de partícula primario medio en peso de 3 a 30 micrómetros, de 3 micrómetros a 20 micrómetros o de 3 a 10 micrómetros.

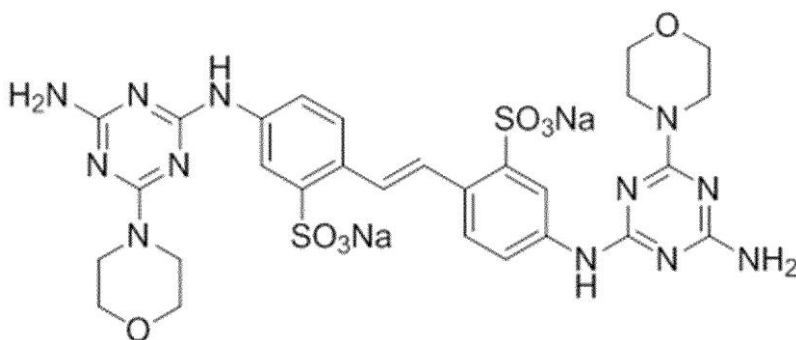
[0266] La composición puede comprender abrillantador fluorescente C.I. 260 en la forma beta-cristalina y la proporción en peso de: (i) abrillantador fluorescente C.I. 260 en la forma alfa-cristalina, respecto a (ii) abrillantador fluorescente C.I. 260 en la forma beta-cristalina, puede ser al menos 0,1 o al menos 0,6. La BE680847 se refiere a un proceso para la fabricación de abrillantador fluorescente C.I. 260 en la forma alfa-cristalina.

15

[0267] Blanqueadores ópticos comerciales que pueden ser útiles en la presente invención se pueden clasificar en subgrupos, que incluyen, pero no se limitan necesariamente a, derivados de estilbeno, pirazolina, cumarina, ácido carboxílico, metincianinas, dibenzotiofeno-5,5-dióxido, azoles, heterociclos de anillos con 5 y 6 miembros y otros agentes misceláneos. Ejemplos de tales abrillantadores se describen en "The Production and Application of Fluorescent Brightening Agents", M. Zahradnik, publicado por John Wiley & Sons, Nueva York (1982). Ejemplos no limitantes específicos de blanqueadores ópticos que son útiles en las presentes composiciones son aquellos identificados en US4790856 y US3646015.

20

[0268] Un abrillantador adecuado adicional tiene la estructura siguiente:



25

[0269] Los niveles de abrillantador fluorescente adecuados incluyen niveles inferiores de desde 0,01 % en peso, desde 0,05 % en peso, desde 0,1 % en peso o desde 0,2 % en peso a niveles superiores de 0,5 % en peso o 0,75 % en peso.

[0270] En un aspecto el abrillantador se puede cargar sobre una arcilla para formar una partícula. Sales de silicato - Las composiciones de la presente invención pueden contener también sales de silicato, tales como silicato de sodio o de potasio. La composición puede comprender desde un 0 % en peso a menos de un 10 % en peso de sal de silicato, a un 9 % en peso, o a un 8 % en peso, o a un 7 % en peso, o a un 6 % en peso, o a un 5 % en peso, o a un 4 % en peso, o a un 3 % en peso, o incluso a un 2 % en peso, y de más de un 0 % en peso, o de un 0,5 % en peso, o de un 1 % en peso de sal de silicato. Una sal de silicato adecuada es silicato sódico.

[0271] Dispersantes - Las composiciones de la presente invención pueden contener también dispersantes. Los materiales orgánicos hidrosolubles adecuados incluyen los ácidos homo- o co-poliméricos o sus sales, donde el ácido policarboxílico comprende al menos dos radicales carboxilo separados entre sí por no más de dos átomos de carbono.

[0272] Estabilizadores enzimáticos - Las enzimas para usar en las composiciones se pueden estabilizar mediante varias técnicas. Las enzimas que han sido empleadas en la presente pueden estabilizarse mediante la presencia de fuentes hidrosolubles de iones calcio y/o magnesio. Ejemplos de agentes estabilizantes convencionales son, por ejemplo, un poliol tal como propilenglicol o glicerol, un azúcar o un alcohol de azúcar, un péptido aldehído, ácido láctico, ácido bórico o un derivado de ácido bórico, por ejemplo, un éster de borato aromático, o un derivado de ácido fenil borónico tal como ácido 4-formilfenil borónico, y la composición se puede formular como se describe en, por ejemplo, WO92/19709 y WO92/19708. En caso de composiciones acuosas que comprenden proteasa, un inhibidor de proteasa reversible, tal como un compuesto de boro, incluidos borato, ácido 4-formil fenilborónico, ácido fenilborónico y derivados de los mismos, o compuestos tales como formiato de calcio, formiato de sodio y 1,2-propanodiol se pueden añadir para mejorar adicionalmente la estabilidad. El péptido aldehído puede ser de la fórmula B₂-B₁-B₀-R, donde: R es hidrógeno, CH₃, CX₃, CHX₂ o CH₂X, donde X es un átomo de halógeno; B₀ es un residuo de fenilalanina con un sustituyente OH en la posición *p* y/o en la posición *m*; B₁ es un residuo de aminoácido único; y B₂ consiste en uno o más residuos de aminoácidos, que comprenden opcionalmente un grupo de protección N-terminal. Los péptidos aldehídos preferidos incluyen, pero de forma no limitativa: Z-RAY-H, Ac-GAY-H, Z-GAY-H, Z-GAL-H, Z-GAF-H, Z-GAV-H, Z-RVY-H, Z-LVY-H, Ac-LGAY-H, Ac-FGAY-H, Ac-YGAY-H, Ac-FGVY-H o Ac-WLVY-H, donde Z es benciloxicarbonil y Ac es acetilo.

[0273] Solventes - Los solventes adecuados incluyen agua y otros solventes tales como fluidos lipofílicos. Los ejemplos de fluidos lipofílicos adecuados incluyen siloxanos, otras siliconas, hidrocarburos, éteres de glicol, derivados de glicerina tales como éteres de glicerina, aminas perfluoradas, solventes perfluorados y de hidrofluoroéter, solventes orgánicos no fluorados de baja volatilidad, solventes de diol, otros solventes respetuosos con el medio ambiente y sus mezclas derivadas.

[0274] Estructurante/espesantes - Los líquidos estructurados pueden o estar estructurados internamente, por lo cual la estructura está formada por ingredientes primarios (por ejemplo, material tensoactivo) y/o estructurados externamente proporcionando una estructura de matriz tridimensional usando ingredientes secundarios (por ejemplo, polímeros, arcilla y/o material de silicato). La composición puede comprender un estructurante, de 0,01 a 5 % en peso o de 0,1 a 2,0 % en peso. El estructurante se selecciona típicamente del grupo que consiste en diglicéridos y triglicéridos, diestearato de etilenglicol, celulosa microcristalina, materiales a base de celulosa, celulosa de microfibra, emulsiones hinchables en medio alcalino modificadas hidrofóbicamente tal como Polygel W30 (3VSigma), biopolímeros, goma xantana, goma gellan, y sus mezclas derivadas. Un estructurante adecuado incluye aceite de ricino hidrogenado y derivados no etoxilados del mismo. Un estructurante adecuado se describe en US6855680. Tales estructurantes tienen un sistema de estructuración de tipo hebra con un rango de proporciones de aspecto. Otros estructurantes adecuados y los procesos para hacerlos se describen en WO10/034736.

[0275] Agentes de acondicionamiento - La composición de la presente invención puede incluir un compuesto graso de alto punto de fusión. El compuesto graso de alto punto de fusión útil en la presente tiene un punto de fusión de 25°C o mayor, y se selecciona del grupo que consiste en alcoholes grasos, ácidos grasos, derivados de alcoholes grasos, derivados de ácidos grasos, y sus mezclas derivadas. Los compuestos de ese tipo de bajo punto de fusión no se destinan a estar incluidos en esta sección. Se encuentran ejemplos no limitativos de los compuestos de alto punto de fusión en International Cosmetic Ingredient Dictionary, quinta edición, 1993, y CTFA Cosmetic Ingredient Handbook, segunda edición, 1992.

[0276] El compuesto graso de alto punto de fusión se incluye en la composición con un nivel de 0,1 a 40 % en peso, de 1 a 30 % en peso, de 1,5 a 16 % en peso, de 1,5 a 8 % en peso en vista de proporcionar beneficios de acondicionamiento mejorados tales como la sensación resbaladiza durante la aplicación a un cabello mojado, suavidad y sensación hidratada en un cabello seco.

[0277] Las composiciones de la presente invención pueden contener un polímero catiónico. Las concentraciones del polímero catiónico en la composición varían típicamente de un 0,05 a un 3 % en peso, de un 0,075 a un 2,0 %

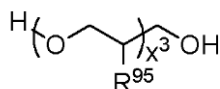
en peso o de un 0,1 a un 1,0 % en peso. Los polímeros catiónicos adecuados tendrán densidades de carga catiónica de al menos 0,5 meq/g, al menos 0,9 meq/g, al menos 1,2 meq/g, al menos 1,5 meq/g o menos de 7 meq/g, y menos de 5 meq/g, al pH de uso previsto de la composición, pH que variará generalmente de pH3 a pH9 o entre pH4 y pH8. En la presente, "densidad de carga catiónica" de un polimérico se refiere a la proporción del número de cargas positivas en el polímero respecto al peso molecular del polímero. El peso molecular medio de tales polímeros catiónicos adecuados estará generalmente entre 10.000 y 10 millones, entre 50.000 y 5 millones o entre 100.000 y 3 millones.

[0278] Los polímeros catiónicos adecuados para usar en las composiciones de la presente invención contienen fracciones catiónicas que contienen nitrógeno, tales como amonio cuaternario o fracciones amino protonadas catiónicas. Cualquier contraión aniónico se puede usar en asociación con los polímeros catiónicos siempre y cuando los polímeros permanezcan solubles en agua, en la composición o en una fase coacervada de la composición, y siempre y cuando los contraiones sean física y químicamente compatibles con los componentes esenciales de la composición o, de otro modo, no perjudiquen excesivamente el rendimiento, la estabilidad o la estética de la composición. Ejemplos no limitantes de tales contraiones incluyen haluros (por ejemplo, cloruro, fluoruro, bromuro, yoduro), sulfato y metilsulfato.

[0279] Ejemplos no limitantes de tales polímeros se describen en el CTFA Cosmetic Ingredient Dictionary, 3ª edición, editado por Estrin, Crosley y Haynes, (The Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association, Inc., Washington, D.C. (1982)).

[0280] Otros polímeros catiónicos adecuados para usar en la composición incluyen polímeros polisacáridos, derivados catiónicos de goma guar, éteres de celulosa que contienen nitrógeno cuaternario, polímeros sintéticos, copolímeros de celulosa eterificada, guar y almidón. Cuando se usan, los polímeros catiónicos en la presente o son solubles en la composición o son solubles en una fase coacervada compleja en la composición formada por el polímero catiónico y el componente tensoactivo aniónico, anfotérico y/o zwitteriónico descrito previamente. Coacervatos complejos del polímero catiónico también pueden formarse con otros materiales cargados en la composición. Polímeros catiónicos adecuados se describen en US3962418; US3958581; y US2007/0207109.

[0281] La composición de la presente invención puede incluir un polímero no iónico como agente de acondicionamiento. Glicoles de polialquilenos con un peso molecular de más de 1000 son útiles en la presente. Útiles son aquellos con la siguiente fórmula general:



donde R^{95} se selecciona del grupo que consiste en H, metilo y sus mezclas derivadas. Agentes de acondicionamiento, y en particular siliconas, se pueden incluir en la composición. Los agentes de acondicionamiento útiles en las composiciones de la presente invención comprenden típicamente un líquido insoluble en agua, dispersable en agua, no volátil, que forma partículas líquidas emulsionadas. Agentes de acondicionamiento adecuados para usar en la composición son aquellos agentes de acondicionamiento caracterizados generalmente como siliconas (por ejemplo, aceites de silicona, siliconas catiónicas, gomas de silicona, siliconas altamente refractarias y resinas de silicona), aceites de acondicionamiento orgánicos (por ejemplo, aceites de hidrocarburos, poliolefinas y ésteres grasos) o combinaciones derivadas, o aquellos agentes de acondicionamiento que de otro modo forman partículas líquidas dispersas en la matriz acuosa de tensoactivo de la presente. Tales agentes de acondicionamiento deberían ser física y químicamente compatibles con los componentes esenciales de la composición, y no deberían de otro modo perjudicar excesivamente la estabilidad, la estética o el rendimiento de la composición.

[0282] La concentración del agente de acondicionamiento en la composición debería ser suficiente para proporcionar los beneficios de acondicionamiento deseados. Tal concentración puede variar con el agente de acondicionamiento, el rendimiento de acondicionamiento deseado, el tamaño medio de las partículas de agente de acondicionamiento, el tipo y la concentración de otros componentes, y otros factores similares.

[0283] La concentración del agente de acondicionamiento de silicona varía típicamente de un 0,01 a un 10 % en peso. Ejemplos no limitativos de agentes de acondicionamiento de silicona adecuados, y agentes de suspensión opcionales para la silicona, se describen en la reexpedición de la patente de EE.UU. N.º 34,584; US5104646; US5106609; US4152416; US2826551; US3964500; US4364837; US6607717; US6482969; US5807956; US5981681; US6207782; US7465439; US7041767; US7217777; US2007/0286837A1; US2005/0048549A1; US2007/0041929A1; GB849433; DE10036533; Chemistry and Technology of Silicones, Nueva York: Academic Press (1968); General Electric Silicone Rubber Product Data Sheets SE 30, SE 33, SE 54 y SE 76; Silicon

Compounds, Petrarch Systems, Inc. (1984); y en Encyclopedia of Polymer Science and Engineering, vol. 15, 2ª ed., págs. 204-308, John Wiley & Sons, Inc. (1989).

[0284] Las composiciones de la presente invención también pueden comprender de un 0,05 a un 3 % en peso de al menos un aceite de acondicionamiento orgánico como el agente de acondicionamiento, ya sea solo o en combinación con otros agentes de acondicionamiento, tales como las siliconas (descritas en la presente). Los aceites de acondicionamiento adecuados incluyen aceites de hidrocarburos, poliolefinas y ésteres grasos. también son adecuados para usar en las composiciones en la presente los agentes de acondicionamiento descritos en US5674478 y US5750122 o en US4529586; US4507280; US4663158; US4197865; US4217914; US4381919; y US4422853.

[0285] Higiene y mal olor - Las composiciones de la presente invención también pueden comprender uno o más de ricinoleato de zinc, timol, sales de amonio cuaternario tal como Bardac®, polietileniminas (tal como Lupasol® de BASF) y complejos de zinc de las mismas, plata y compuestos de plata, especialmente aquellos diseñados para liberar lentamente Ag⁺ o dispersiones de nanoplatata.

[0286] Probióticos - Las composiciones pueden comprender probióticos tales como los descritos en WO09/043709.

[0287] Potenciadores de espuma - Si se desea una alta espuma, potenciadores de espuma tales como los sulfatos de alcanolamidas C₁₀-C₁₆ o de alquilo C₁₀-C₁₄ se pueden incorporar en las composiciones, típicamente en niveles de un 1 a un 10 % en peso. Las amidas de monoetanol y dietanol C₁₀-C₁₄ ilustran una clase típica de tales potenciadores de espuma. También es ventajoso el uso de tales potenciadores de espuma con tensoactivos complementarios de alta espuma tales como los óxidos de amina, las betaínas y las sultainas indicadas anteriormente. Si se desea, sales de magnesio y/o calcio hidrosolubles tales como MgCl₂, MgSO₄, CaCl₂, CaSO₄ y similares, se pueden añadir en niveles de, típicamente, un 0,1 a un 2 % en peso, para proporcionar espuma adicional y para mejorar el rendimiento de eliminación de grasa.

[0288] Supresores de espuma - Compuestos para reducir o suprimir la formación de espuma se pueden incorporar en las composiciones de la presente invención. La supresión de espuma puede ser de importancia particular en el denominado "proceso de limpieza de alta concentración" como se describe en US4489455 y US4489574, y en lavadoras de estilo de carga frontal. Se puede usar una amplia variedad de materiales como supresores de espuma, y los supresores de espuma son bien conocidos por las personas expertas en la técnica. Véase, por ejemplo, Kirk Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, tercera edición, volumen 7, p. 430-447 (John Wiley & Sons, Inc., 1979). Los ejemplos de supresores de espuma incluyen un ácido graso monocarboxílico y sales solubles en el mismo, hidrocarburos de alto peso molecular tal como parafina, ésteres de ácidos grasos (por ejemplo, triglicéridos de ácidos grasos), ésteres de ácidos grasos de alcoholes monovalentes, cetonas alifáticas C₁₈-C₄₀ (por ejemplo, estearona), amino triazinas N-alquiladas, hidrocarburos cerosos preferiblemente con un punto de fusión por debajo de aproximadamente 100°C, supresores de espuma de silicona y alcoholes secundarios. Se describen supresores de espuma en US2954347; US4265779; US4265779; US3455839; US3933672; US4652392; US4978471; US4983316; US5288431; US4639489; US4749740; US4798679; US4075118; EP89307851.9; EP150872; y DOS 2,124,526.

[0289] Para cualquier composición detergente que se vaya a usar en lavadoras de ropa automáticas, no debería formarse espuma hasta el punto en que desborde la lavadora. Los supresores de espuma, cuando se utilizan, están preferiblemente presentes en una "cantidad supresora de espuma". Por "cantidad supresora de espuma" se entiende que el formulador de la composición puede seleccionar una cantidad de este agente de control de espuma que controlará suficientemente la espuma para resultar en un detergente para ropa de baja formación de espuma para usar en las lavadoras de ropa automáticas.

[0290] Las composiciones en la presente comprenderán generalmente de un 0 a un 10 % en peso de supresor de espuma. Cuando se utilizan como supresores de espuma, los ácidos grasos monocarboxílicos, y las sales en estos, estarán presentes típicamente en cantidades de hasta un 5 % en peso. Preferiblemente, se utiliza de un 0,5 a un 3 % en peso de supresor de espuma de monocarboxilato graso. Los supresores de espuma de silicona se utilizan típicamente en cantidades de hasta un 2,0 % en peso, aunque pueden usarse cantidades más altas. Supresores de espuma de fosfato de monoestearilo se utilizan generalmente en cantidades que varían de un 0,1 a un 2 % en peso. Los supresores de espuma de hidrocarburos se utilizan típicamente en cantidades que varían de un 0,01 a un 5,0 % en peso, aunque se pueden usar niveles más altos. Los supresores de espuma alcohólicos se usan típicamente a de un 0,2 a un 3 % en peso.

[0291] Las composiciones en la presente pueden tener una actividad de limpieza sobre una amplia variedad de pH. En ciertas formas de realización, las composiciones tienen una actividad de limpieza de pH4 a pH11,5. En otras formas de realización, las composiciones son activas de pH6 a pH11, de pH7 a pH11, de pH8 a pH11, de pH9 a pH11 o de pH10 a pH11,5.

[0292] Las composiciones en la presente pueden tener una actividad de limpieza sobre un amplio rango de temperaturas, por ejemplo, desde 10°C o inferior a 90°C. Preferiblemente, la temperatura estará por debajo de 50°C o 40°C o incluso 30°C. En ciertas formas de realización, el rango de temperaturas óptimo para las composiciones es de 10°C a 20°C, de 15°C a 25°C, de 15°C a 30°C, de 20°C a 30°C, de 25°C a 35°C, de 30°C a 40°C, de 35°C a 45°C o de 40°C a 50°C.

Forma de la composición

[0293] Las composiciones de la invención se emplean ventajosamente, por ejemplo, en aplicaciones de lavado de ropa, limpieza de superficies duras, aplicaciones de lavado de vajillas, así como aplicaciones cosméticas tales como dentaduras postizas, dientes, cabello y piel. Las composiciones de la invención son en particular composiciones sólidas o líquidas de limpieza y/o tratamiento. En un aspecto la invención se refiere a una composición, donde la forma de la composición se selecciona del grupo que consiste en un líquido regular, compacto o concentrado; un gel; una pasta; una pastilla de jabón; un polvo regular o compactado; un sólido granulado; un comprimido homogéneo o multicapa con dos o más capas (fases iguales o diferentes); una bolsa con uno o más compartimentos; una forma de dosis unitaria única o multicompartimental; o cualquier combinación de los mismos.

[0294] La forma de la composición puede separar los componentes físicamente entre sí en compartimentos como, por ejemplo, bolsas disolubles en agua o en diferentes capas de comprimidos. Así se puede evitar una interacción de almacenamiento negativa entre los componentes. Diferentes perfiles de disolución de cada uno de los compartimentos también pueden dar lugar a la disolución retardada de los componentes seleccionados en la solución de lavado.

[0295] Las bolsas se pueden configurar como de compartimento único o multicompartimentales. Pueden ser de cualquier forma, estado y material que sea adecuado para sostener la composición, por ejemplo, sin permitir la liberación de la composición para liberar la composición de la bolsa antes del contacto con el agua. La bolsa está hecha de película hidrosoluble que encierra un volumen interno. Dicho volumen interno se puede dividir en compartimentos de la bolsa. Las películas preferidas son materiales poliméricos, preferiblemente polímeros que se conforman en una película u hoja. Los polímeros, copolímeros o derivados de los mismos preferidos son poliácridatos seleccionados y copolímeros de acrilato hidrosolubles, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, dextrina de sodio, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, maltodextrina, poli metacrilatos, más preferiblemente copolímeros de alcohol polivinílico e hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC). Preferiblemente, el nivel de polímero en la película, por ejemplo, PVA, es de al menos aproximadamente un 60%. El peso molecular medio preferido será típicamente aproximadamente de 20.000 a aproximadamente 150.000. Las películas también pueden ser de composiciones mezcladas que comprenden mezclas de polímeros hidrolíticamente degradables e hidrosolubles tales como polilactida y alcohol polivinílico (conocido bajo la referencia comercial M8630 como se vende por MonoSol LLC, Indiana, EE.UU.) más plastificantes como glicerol, etilenglicerol, propilenglicerol, sorbitol y sus mezclas derivadas. Las bolsas pueden comprender una composición de limpieza de ropa o componentes parciales sólidos y/o una composición de limpieza o componentes parciales líquidos separados por la película hidrosoluble. El compartimento para componentes líquidos puede ser diferente en composición a los compartimentos que contienen sólidos (US2009/0011970 A1).

Partículas de lipasa

[0296] Las variantes de lipasa de la presente invención comprendidas en una película hidrosoluble pueden estar presentes como partículas de lipasa. Las partículas de lipasa pueden contener incluso una o más enzimas adicionales, como se describe a continuación.

[0297] Las partículas de lipasa son cualquier forma de variante de lipasa en una forma particulada sólida. Puede ser como cristales de lipasa, precipitado de lipasa, lipasa pulverizada o liofilizada o cualquier forma de lipasa granulada, ya sea como un polvo o una suspensión en líquido. Típicamente el tamaño de partícula, medido como diámetro esférico equivalente (tamaño de partícula medio basado en volumen), de las partículas de lipasa está por debajo de 2 mm, preferiblemente por debajo de 1 mm, por debajo de 0,5 mm, por debajo de 0,25 mm o por debajo de 0,1 mm; y por encima de 0,05 µm, preferiblemente por encima de 0,1 µm, por encima de 0,5 µm, por encima de 1 µm, por encima de 5 µm o por encima de 10 µm. En una forma de realización preferida, el tamaño de partícula de las partículas de lipasa es de 0,5 µm a 100 µm.

[0298] Las partículas de lipasa contienen al menos un 1% p/p de proteína lipasa, preferiblemente al menos un 5% p/p de proteína lipasa, al menos un 10% p/p de proteína lipasa, al menos un 20% p/p de proteína lipasa, al menos un 30% p/p de proteína lipasa, al menos un 40% p/p de proteína lipasa, al menos un 50% p/p de proteína lipasa, al menos un 60% p/p de proteína lipasa, al menos un 70% p/p de proteína lipasa, al menos un 80% p/p de proteína lipasa o al menos un 90% p/p de proteína lipasa.

[0299] En una forma de realización preferida, las partículas de lipasa son cristales de lipasa, o la proteína de lipasa está en una forma cristalina.

[0300] La cristalización de la enzima se puede realizar de varias formas, como se conoce en la técnica (por ejemplo, como se describe en WO91/09943 o WO94/22903).

- 5 [0301] La lipasa se puede formular en la partícula de lipasa como se conoce en la técnica para formulaciones enzimáticas sólidas, tales como formulaciones para reducir el polvo, mejorar la estabilidad y/o modificar la velocidad de liberación de la enzima. La partícula de lipasa también se puede formular en una matriz o recubierta con agentes que suprimen la disolución de la partícula enzimática en la solución PVOH/película usada para preparar la película hidrosoluble.
- 10 [0302] Las moléculas de lipasa en la superficie de las partículas de lipasa también pueden ser reticuladas, como CLEC (cristales de enzima reticulada) o CLEA (agregado de enzima reticulada).

Película hidrosoluble

- 15 [0303] Las películas hidrosolubles, los ingredientes opcionales para uso en las mismas y los métodos para hacerlas se conocen en la técnica. En una clase de formas de realización, la película hidrosoluble incluye PVOH. El PVOH es una resina sintética preparada generalmente por la alcoholisis, normalmente denominada hidrólisis o saponificación, de acetato de polivinilo. El PVOH completamente hidrolizado, donde prácticamente todos los grupos de acetato se han convertido en grupos alcohol, es un polímero fuertemente enlazado por puentes de hidrógeno y altamente cristalino que se disuelve solo en agua caliente -a más de aproximadamente 140°F (60°C). Si se permite que un número suficiente de grupos acetato permanezcan después de la hidrólisis del acetato de polivinilo, entonces el polímero PVOH, que se conoce como parcialmente hidrolizado, se enlaza por puentes de hidrógeno más débilmente y es menos cristalino y es soluble en agua fría -a menos de aproximadamente 50°F (10°C). Una película intermedia soluble en agua fría/caliente puede incluir, por ejemplo, PVOH hidrolizado parcialmente intermedio (por ejemplo, con grados de hidrólisis de aproximadamente un 94% a aproximadamente un 98%), y es fácilmente soluble solo en agua caliente -por ejemplo, disolución rápida a temperaturas de aproximadamente 40°C y superiores.
- 20 Ambos tipos de PVOH, completa y parcialmente hidrolizado, son comúnmente referidos como homopolímeros de PVOH, aunque el tipo parcialmente hidrolizado es técnicamente un copolímero de alcohol vinílico-acetato de vinilo.

- 30 [0304] El grado de hidrólisis del PVOH incluido en las películas hidrosolubles de la presente descripción pueden ser de aproximadamente un 75% a aproximadamente un 99%. A medida que el grado de hidrólisis se reduce, una película hecha de la resina tendrá una fuerza mecánica reducida pero una solubilidad más rápida a temperaturas inferiores a aproximadamente 20°C. A medida que el grado de hidrólisis aumenta, una película hecha de la resina tenderá a ser mecánicamente más fuerte y la termoformabilidad tenderá a reducirse. El grado de hidrólisis del PVOH se puede elegir de manera que la hidrosolubilidad de la resina sea dependiente de la temperatura, y así la solubilidad de una película hecha de la resina, agente compatibilizante e ingredientes adicionales también se ven influidos. En una clase de formas de realización, la película es soluble en agua fría. Una película soluble en agua fría, soluble en agua a una temperatura inferior a 10°C, puede incluir PVOH con un grado de hidrólisis en un rango de aproximadamente un 75% a aproximadamente un 90%, o en un rango de aproximadamente un 80% a aproximadamente un 90%, o en un rango de aproximadamente un 85% a aproximadamente un 90%. En otra clase de formas de realización, la película es soluble en agua caliente. Una película soluble en agua caliente, soluble en agua a una temperatura de al menos aproximadamente 60°C, puede incluir PVOH con un grado de hidrólisis de al menos aproximadamente un 98%.

- 45 [0305] Otras resinas formadoras de película para el uso además de o como alternativa al PVOH pueden incluir, pero de forma no limitativa, alcoholes polivinílicos modificados, poliácridatos, copolímeros de acrilato hidrosolubles, poliácridatos, poliácridamidas, polivinilpirrolidona, pululano, polímeros naturales hidrosolubles incluidos, pero de forma no limitativa, goma guar, goma xantana, carragenano y almidón, derivados de polímero hidrosoluble incluidos, pero de forma no limitativa, almidón etoxilado y almidón hidroxipropilado, poli(acrilamido-2-metilpropano sulfonato de sodio), polimonometilmaleato, copolímeros de los mismos y combinaciones de cualquiera de los anteriormente mencionados. En una clase de formas de realización, la resina formadora de película es un terpolímero consistente en alcohol vinílico, vinil acetato y acrilamido-2-metilpropanosulfonato de sodio. De forma inesperada, las películas hidrosolubles a base de un alcohol vinílico, vinil acetato y terpolímero de acrilamido-2-metilpropanosulfonato de sodio han demostrado un alto porcentaje de recuperación de enzima.

[0306] La resina hidrosoluble se puede incluir en la película hidrosoluble en cualquier cantidad adecuada, por ejemplo, una cantidad en un rango de aproximadamente un 35 % en peso a aproximadamente un 90 % en peso. La proporción en peso preferida de la cantidad de la resina hidrosoluble en comparación con la cantidad combinada de todas las enzimas, estabilizadores enzimáticos y aditivos secundarios puede ser cualquier proporción adecuada,

por ejemplo, una proporción en un rango de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5 o aproximadamente 1 a 3 o aproximadamente 1 a 2.

[0307] Las resinas hidrosolubles para usar en las películas descritas en la presente (incluidas, pero de forma no limitativa, resinas de PVOH) pueden estar caracterizadas por cualquier viscosidad adecuada para las propiedades de película deseadas, opcionalmente una viscosidad en un rango de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 30,0 cP o aproximadamente 10,0 cP a aproximadamente 25 cP. La viscosidad de una resina de PVOH se determina por medición de una solución recién hecha usando un viscosímetro de tipo Brookfield LV con adaptador UL como se describe en el método de prueba Brookfield del estándar británico EN ISO 15023-2:2006 anexo E. Es una práctica internacional establecer la viscosidad de las soluciones acuosas de alcohol polivinílico al 4% a 20°C. Todas las viscosidades del PVOH especificadas en la presente en cP deberían entenderse referidas a la viscosidad de la solución acuosa de alcohol polivinílico al 4% a 20°C, a menos que se especifique lo contrario.

[0308] Es bien sabido en la técnica que la viscosidad de una resina de PVOH está correlacionada con el peso molecular medio en peso ($\bar{P}_M$) de la misma resina de PVOH, y a menudo la viscosidad se usa como un indicador representativo del $\bar{P}_M$. Así, el peso molecular medio en peso de la resina hidrosoluble puede estar opcionalmente en un rango de aproximadamente 35.000 a aproximadamente 190.000 o de aproximadamente 80.000 a aproximadamente 160.000. Solo es necesario que el peso molecular de la resina sea suficiente para permitir que sea moldeada por técnicas adecuadas para formar una película plástica fina.

[0309] Las películas hidrosolubles según la presente descripción pueden incluir otros ingredientes aditivos opcionales, incluidos, pero de forma no limitativa, plastificantes, tensoactivos, antiespumantes, formadores de película, agentes antibloqueo, agentes de liberación interna, agentes antiamarilleo y otros ingredientes funcionales, por ejemplo, en cantidades adecuadas para su fin previsto.

[0310] El agua está reconocida como un plastificante muy eficiente para el PVOH y otros polímeros; sin embargo, la volatilidad del agua hace que su utilidad sea limitada, ya que las películas poliméricas necesitan tener al menos alguna resistencia (robustez) frente a una variedad de condiciones ambientales, incluidas humedad relativa alta y baja. La glicerina es mucho menos volátil que el agua y ha sido bien establecida como un plastificante eficaz para el PVOH y otros polímeros. La glicerina u otros plastificantes líquidos de este tipo por sí mismos pueden causar "sudoración" superficial y untuosidad si el nivel usado en la formulación de la película es demasiado alto. Esto puede conducir a problemas en una película tal como una sensación inaceptable para la mano del consumidor e incluso el bloqueo de la película en el rollo o en pilas de hojas si la sudoración no se mitiga de alguna manera, tal como empolvando la superficie. Esto podría caracterizarse como sobreplastificación. Sin embargo, si se añade demasiado poco plastificante a la película, la película puede carecer de ductilidad y flexibilidad suficientes para muchos usos finales, por ejemplo, para ser convertida en un formato de uso final tal como bolsas.

[0311] Los plastificantes para usar en las películas hidrosolubles de la presente descripción incluyen, pero de forma no limitativa, sorbitol, glicerol, diglicerol, propilenglicol, etilenglicol, dietilenglicol, trietilenglicol, tetraetilenglicol, polietilenglicoles hasta un PM de 400, 2 metil 1, 3 propanodiol, ácido láctico, monoacetina, triacetina, citrato de trietilo, 1,3-butanodiol, trimetilolpropano (TMP), poliéter triol y combinaciones de los mismos. Los polioles, como se ha descrito anteriormente, son generalmente útiles como plastificantes. A medida que se usa menos plastificante, la película puede volverse más frágil, mientras que, a medida que se usa más plastificante, la película puede perder resistencia a la tracción. Los plastificantes se pueden incluir en las películas hidrosolubles en una cantidad en un rango de aproximadamente 25 phr a aproximadamente 50 phr, o de aproximadamente 30 phr a aproximadamente 45 phr, o de aproximadamente 32 phr a aproximadamente 42 phr, por ejemplo.

[0312] Los tensoactivos para usar en las películas hidrosolubles son bien conocidos en la técnica. Opcionalmente, los tensoactivos se incluyen para ayudar en la dispersión de la solución de resina durante la fundición. Los tensoactivos adecuados para las películas hidrosolubles de la presente descripción incluyen, pero de forma no limitativa, sulfosuccinatos de dialquilo, ésteres de ácidos grasos lactilados de glicerol y propilenglicol, ésteres lactílicos de ácidos grasos, alquilsulfatos de sodio, polisorbato 20, polisorbato 60, polisorbato 65, polisorbato 80, éteres de polietilenglicol de alquilo, lecitina, ésteres de ácidos grasos acetilados de glicerol y propilenglicol, lauril sulfato de sodio, ésteres acetilados de ácidos grasos, óxido de miristil dimetilamina, cloruro de trimetil sebo alquil amonio, compuestos de amonio cuaternario, sales derivadas y combinaciones de cualquiera de los anteriores. Así, los tensoactivos se pueden incluir en las películas hidrosolubles en una cantidad inferior a aproximadamente 2 phr, por ejemplo, menos de aproximadamente 1 phr o menos de aproximadamente 0,5 phr, por ejemplo.

[0313] Un tipo de componente secundario contemplado para el uso es un antiespumante. Los antiespumantes pueden ayudar a fusionar las burbujas de espuma. Los antiespumantes adecuados para usar en las películas hidrosolubles según la presente descripción incluyen, pero de forma no limitativa, sílices hidrófobas, por ejemplo dióxido de silicio o humo de sílice en tamaños de partículas finas, incluidos antiespumantes Foam Blast® disponibles de Emerald Performance Materials, incluidos Foam Blast® 327, Foam Blast® UVD, Foam Blast® 163,

Foam Blast® 269, Foam Blast® 338, Foam Blast® 290, Foam Blast® 332, Foam Blast® 349, Foam Blast® 550 y Foam Blast® 339, que son antiespumantes patentados de aceite no mineral. En formas de realización, los antiespumantes se pueden usar en una cantidad de 0,5 phr, o menos, por ejemplo, 0,05 phr, 0,04 phr, 0,03 phr, 0,02 phr o 0,01 phr. Preferiblemente, se evitarán cantidades significativas de dióxido de silicio, para evitar el blanqueamiento por estrés.

[0314] Los procesos para hacer artículos hidrosolubles, incluidas películas, incluyen fundición, moldeo por soplado, extrusión y extrusión por soplado, como se conoce en la técnica. Una clase contemplada de formas de realización se caracteriza porque la película hidrosoluble descrita en la presente se forma por fundición, por ejemplo, mezclando los ingredientes descritos aquí con agua para crear una mezcla acuosa, por ejemplo una solución con sólidos opcionalmente dispersos, aplicando la mezcla a una superficie y secando el agua para crear una película. De forma similar, se pueden formar otras composiciones secando la mezcla mientras está confinada en una forma deseada.

[0315] En una clase contemplada de formas de realización, la película hidrosoluble se forma por fundido de una mezcla hidrosoluble, donde la mezcla hidrosoluble se prepara según los pasos de:

- (a) proporcionar una mezcla de resina hidrosoluble, agua y cualquier aditivo opcional excepto los plastificantes;
- (b) hervir la mezcla durante 30 minutos;
- (c) desgasificar la mezcla en un horno a una temperatura de al menos 40°C; opcionalmente en un rango de 40°C a 70°C, por ejemplo, aproximadamente 65°C;
- (d) añadir una o más enzimas, plastificante y agua adicional a la mezcla a una temperatura de 65°C o menos;
- y
- (e) agitar la mezcla sin vórtice hasta que la mezcla parezca sustancialmente uniforme en color y consistencia; opcionalmente durante un período de tiempo en un rango de 30 minutos a 90 minutos, opcionalmente al menos 1 hora; y
- (f) fundir la mezcla rápidamente después del período de tiempo de agitación (por ejemplo, en 4 horas o 2 horas o 1 hora).

[0316] Si la enzima se añade a la mezcla demasiado pronto, por ejemplo, con los aditivos secundarios o la resina, la actividad de la enzima puede reducirse. Sin pretender estar vinculado a ninguna teoría particular, se cree que la ebullición de la mezcla con la enzima lleva a la desnaturalización de la enzima y el almacenamiento en solución durante periodos prolongados de tiempo lleva también a una reducción en la actividad enzimática.

[0317] En una clase de formas de realización, la alta actividad enzimática se mantiene en las películas hidrosolubles según la presente descripción secando las películas rápidamente bajo condiciones de moderadas a suaves. Como se utiliza en la presente, secando rápidamente se refiere a un tiempo de secado inferior a 24 horas, opcionalmente inferior a 12 horas, opcionalmente inferior a 8 horas, opcionalmente inferior a 2 horas, opcionalmente inferior a 1 hora, opcionalmente inferior a 45 minutos, opcionalmente inferior a 30 minutos, opcionalmente inferior a 20 minutos, opcionalmente inferior a 10 minutos, por ejemplo, en un rango de aproximadamente 6 minutos a aproximadamente 10 minutos u 8 minutos. Como se utiliza en la presente, condiciones de moderadas a suaves se refieren a temperaturas de secado inferiores a 170°F (77°C), opcionalmente en un rango de aproximadamente 150°F a aproximadamente 170°F (de aproximadamente 66°C a aproximadamente 77°C), por ejemplo, 165°F (74°C). A medida que la temperatura de secado aumenta, las enzimas tienden a desnaturalizarse más rápido, mientras que, a medida que la temperatura de secado se reduce, el tiempo de secado aumenta, exponiendo así las enzimas a la solución durante un periodo de tiempo prolongado.

[0318] La película es útil para crear un paquete que contenga una composición, por ejemplo, composiciones de lavado de ropa o lavado de vajillas, formando así una bolsa. La película descrita en la presente también puede ser usada para hacer un paquete con dos o más compartimentos hechos de la misma película o en combinación con películas de otros materiales poliméricos. Pueden obtenerse películas adicionales, por ejemplo, por fundición, moldeo por soplado, extrusión o extrusión por soplado del mismo material polimérico o uno diferente, como se conoce en la técnica. En un tipo de forma de realización, los polímeros, copolímeros o derivados de los mismos adecuados para el uso como la película adicional se seleccionan de alcoholes polivinílicos, polivinilpirrolidona, óxidos de polialquileño, ácido poliacrílico, celulosa, éteres de celulosa, ésteres de celulosa, amidas de celulosa, acetatos de polivinilo, ácidos policarboxílicos y sales, poliaminoácidos o péptidos, poliamidas, poli(acrilamida), copolímeros de ácidos maleico/acrílico, polisacáridos, incluidos almidón y gelatina, gomas naturales tales como el xantano y carragenanos. Por ejemplo, los polímeros se pueden seleccionar de poli(acrilatos) y copolímeros de acrilato hidrosolubles, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sodio, dextrina, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, maltodextrina, polimetacrilatos y combinaciones de los mismos, o seleccionar de alcoholes polivinílicos, copolímeros de alcohol polivinílico e hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), y combinaciones de los mismos.

[0319] Las bolsas y/o los paquetes de la presente descripción comprenden al menos un compartimento sellado. Así, las bolsas pueden comprender un compartimento único o múltiples compartimentos. Las bolsas pueden tener regiones con y sin enzimas. En formas de realización que incluyen múltiples compartimentos, cada compartimento puede contener composiciones idénticas y/o diferentes. A su vez, las composiciones pueden tomar cualquier forma adecuada incluidas, pero de forma no limitativa, líquida, sólida y combinaciones de las mismas (por ejemplo, un sólido suspendido en un líquido). En algunas formas de realización, las bolsas comprenden un primer, un segundo y un tercer compartimento, cada uno de los cuales contiene respectivamente una composición primera, segunda y tercera diferentes. En algunas formas de realización, las composiciones pueden ser visualmente distintas como se describe en EP 2258820.

[0320] Los compartimentos de las bolsas y/o los paquetes multicompartimentales pueden ser del mismo/de los mismos o diferente(s) tamaño(s) y/o volumen/volúmenes. Los compartimentos de las presentes bolsas multicompartimentales pueden estar separados o unidos de cualquier manera adecuada. En algunas formas de realización, el segundo y/o el tercero y/o los posteriores compartimentos están superpuestos sobre el primer compartimento. En un aspecto, el tercer compartimento puede estar superpuesto sobre el segundo compartimento, que está a su vez superpuesto sobre el primer compartimento en una configuración de sándwich. Alternativamente, el segundo y el tercer compartimentos pueden estar superpuestos sobre el primer compartimento. Sin embargo, también se prevé igualmente que los compartimentos primero, segundo y opcionalmente tercero y posteriores puedan estar unidos entre sí en una relación lado a lado. Los compartimentos se pueden empaquetar en una cadena, donde cada compartimento es individualmente separable por una línea de perforación. Por lo tanto, cada compartimento puede ser arrancado individualmente del resto de la cadena por el usuario final.

[0321] En algunas formas de realización, las bolsas y/o los paquetes multicompartimentales incluyen tres compartimentos consistentes en un gran primer compartimento y dos compartimentos más pequeños. El segundo y tercer compartimento más pequeños están superpuestos sobre el primer compartimento más grande. El tamaño y la geometría de los compartimentos se eligen de manera que se pueda conseguir esta disposición. La geometría de los compartimentos puede ser igual o diferente. En algunas formas de realización, el segundo y el opcionalmente tercer compartimento tiene cada uno una geometría y forma diferentes en comparación con el primer compartimento. En estas formas de realización, el segundo y el opcionalmente tercer compartimento están dispuestos en un diseño sobre el primer compartimento. El diseño puede ser decorativo, educativo o ilustrativo, por ejemplo, para ilustrar un concepto o una instrucción, y/o usarse para indicar el origen del producto. En algunas formas de realización, el primer compartimento es el compartimento más grande con dos caras grandes selladas alrededor del perímetro y el segundo compartimento es más pequeño, cubriendo menos de aproximadamente un 75% o menos de aproximadamente un 50% del área de superficie de una cara del primer compartimento. En formas de realización donde hay un tercer compartimento, la estructura anteriormente mencionada puede ser la misma pero el segundo y el tercer compartimentos cubren menos de aproximadamente un 60% o menos de aproximadamente un 50% o menos de aproximadamente un 45% del área de superficie de una cara del primer compartimento.

[0322] Las bolsas y/o los paquetes de la presente descripción pueden comprender una o más películas diferentes. Por ejemplo, en las formas de realización de compartimento único, el paquete puede estar hecho de una pared que se pliega sobre sí misma y está sellada en los bordes o, alternativamente, dos paredes que están selladas juntas en los bordes. En las formas de realización de múltiples compartimentos, el paquete puede estar hecho de una o más películas, de manera que cualquier compartimento de paquete dado puede comprender paredes hechas de una única película o de múltiples películas con composiciones diferentes. En un aspecto, una bolsa multicompartimental comprende al menos tres paredes: una pared superior externa; una pared inferior externa; y una pared divisoria. La pared superior externa y la pared inferior externa son generalmente opuestas y forman el exterior de la bolsa. La pared divisoria es interior a la bolsa y está fijada a las paredes externas generalmente opuestas a lo largo de una línea de sellado. La pared divisoria separa el interior de la bolsa multicompartimental en al menos un primer compartimento y un segundo compartimento. En una clase de formas de realización, la pared divisoria puede ser la única película que contiene enzima, minimizando así la exposición del consumidor a las enzimas.

[0323] Se pueden hacer bolsas y paquetes usando cualquier equipo y método adecuados. Por ejemplo, las bolsas de compartimento único pueden hacerse usando técnicas de llenado de forma vertical, llenado de forma horizontal o llenado de tambor giratorio conocidas comúnmente en la técnica. Tales procesos pueden ser continuos o intermitentes. La película puede humedecerse y/o calentarse para aumentar su maleabilidad. El método también puede implicar el uso de vacío para atraer la película a un molde adecuado. El vacío que atrae a la película hacia el molde se puede aplicar durante aproximadamente 0,2 a aproximadamente 5 segundos, o aproximadamente 0,3 a aproximadamente 3, o aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1,5 segundos, una vez que la película está sobre la porción horizontal de la superficie. Este vacío puede ser tal que proporcione una presión negativa en un rango de 10 mbar a 1000 mbar, o en un rango de 100 mbar a 600 mbar, por ejemplo.

- [0324] Los moldes, en los que se pueden hacer paquetes, pueden tener cualquier forma, longitud, ancho y profundidad, dependiendo de las dimensiones requeridas de las bolsas. Los moldes también pueden variar en tamaño y forma de uno a otro, si es deseable. Por ejemplo, el volumen de las bolsas finales puede ser de aproximadamente 5 ml a aproximadamente 300 ml, o aproximadamente 10 a 150 ml, o aproximadamente 20 a aproximadamente 100 ml, y que los tamaños de molde se ajustan en consecuencia.
- [0325] En un aspecto, el paquete incluye un primer y un segundo compartimento sellado. El segundo compartimento está en una relación generalmente superpuesta con el primer compartimento sellado de manera que el segundo compartimento sellado y el primer compartimento sellado comparten una pared divisoria interior a la bolsa.
- [0326] En un aspecto, el paquete que incluye un primer y un segundo compartimento incluye además un tercer compartimento sellado. El tercer compartimento sellado está en una relación generalmente superpuesta con el primer compartimento sellado, de manera que el tercer compartimento sellado y el primer compartimento sellado comparten una pared divisoria interior a la bolsa.
- [0327] En varios aspectos, la primera composición y la segunda composición se seleccionan de una de las siguientes combinaciones: líquido, líquido; líquido, polvo; polvo, polvo; y polvo, líquido.
- [0328] En varios aspectos, las composiciones primera, segunda y tercera se seleccionan de una de las siguientes combinaciones: sólido, líquido, líquido y líquido, líquido, líquido.
- [0329] En un aspecto, el compartimento único o la pluralidad de compartimentos sellados contiene una composición. La pluralidad de compartimentos puede contener la misma composición o una diferente. La composición se selecciona de un líquido, un sólido o una combinación de los mismos.
- [0330] Se puede aplicar calor a la película en el proceso comúnmente conocido como termomoldeo. El calor se puede aplicar usando cualquier medio adecuado. Por ejemplo, la película se puede calentar directamente pasándola bajo un elemento calefactor o a través de aire caliente, antes de alimentarla sobre una superficie o una vez sobre una superficie. Alternativamente, se puede calentar indirectamente, por ejemplo, calentando la superficie o aplicando un artículo caliente sobre la película. La película se puede calentar usando una luz infrarroja. La película se puede calentar a una temperatura de al menos 50°C, por ejemplo, aproximadamente 50 a aproximadamente 150°C, aproximadamente 50 a aproximadamente 120°C, aproximadamente 60 a aproximadamente 130°C, aproximadamente 70 a aproximadamente 120°C o aproximadamente 60 a aproximadamente 90°C.
- [0331] Alternativamente, la película se puede humedecer por cualquier medio adecuado, por ejemplo, directamente por pulverización de un agente humectante (incluidos agua, una solución de la composición de película, un plastificante para la composición de película o cualquier combinación de los anteriormente mencionados) sobre la película, antes de alimentarla sobre la superficie o una vez sobre la superficie, o indirectamente humedeciendo la superficie o aplicando un artículo húmedo sobre la película.
- [0332] Una vez que una película se ha calentado y/o humedecido, se puede atraer a un molde apropiado, preferiblemente usando vacío. La película se puede termoformar con una proporción de estiramiento de al menos aproximadamente 1,5, por ejemplo, y opcionalmente hasta una proporción de estiramiento de 2, por ejemplo. El llenado de la película moldeada se puede realizar utilizando cualquier medio adecuado. En algunas formas de realización, el método más preferido dependerá de la forma del producto y la velocidad requerida de llenado. En algunas formas de realización, la película moldeada se llena por técnicas de llenado en línea. Los paquetes llenados abiertos se cierran entonces formando las bolsas, usando una segunda película, por cualquier método adecuado. Esto se puede lograr mientras está en la posición horizontal y en movimiento continuo y constante. El cierre se puede lograr alimentando continuamente una segunda película, preferiblemente una película hidrosoluble, por encima y sobre los paquetes abiertos y luego preferiblemente sellando la primera y la segunda película juntas, típicamente en el área entre los moldes y, por tanto, entre los paquetes.
- [0333] Puede utilizarse cualquier método adecuado de sellado del paquete y/o los compartimentos individuales de los mismos. Ejemplos no limitativos de tales medios incluyen el termosellado, la soldadura con solvente, el sellado con solvente o húmedo y combinaciones de los mismos. El paquete hidrosoluble y/o los compartimentos individuales de los mismos pueden sellarse por calor a una temperatura de al menos 200°F (93°C), por ejemplo, en un rango de aproximadamente 220°F (aproximadamente 105°C) a aproximadamente 290°F (aproximadamente 145°C) o aproximadamente 230°F (aproximadamente 110°C) a aproximadamente 280°F (aproximadamente 140°C). Típicamente, solo el área que va a formar el sello se trata con calor o solvente. El calor o el solvente se puede aplicar por cualquier método, típicamente sobre el material de cierre y típicamente solo en las áreas que van a formar el sello. Si se usa el sellado o la soldadura con solvente o húmedos, puede preferirse aplicar también calor. Los métodos de sellado/soldadura húmedos o con solvente preferidos incluyen la aplicación selectiva de solvente sobre el área entre los moldes, o sobre el material de cierre, por ejemplo, por pulverización o imprimiéndolo sobre

estas áreas, y luego aplicando presión sobre estas áreas, para formar el sello. Se pueden usar rodillos y correas de sellado como se ha descrito anteriormente (opcionalmente proporcionando también calor), por ejemplo.

[0334] Las bolsas formadas pueden entonces ser cortadas por un dispositivo de corte. El corte se puede realizar usando cualquier método conocido. Se puede preferir que el corte se haga también de manera continua y preferiblemente con velocidad constante y preferiblemente mientras está en posición horizontal. El dispositivo de corte puede, por ejemplo, ser un artículo afilado o un artículo caliente o un láser, por lo cual en los últimos casos, el artículo caliente o el láser 'quema' a través de la película/el área de sellado.

[0335] Los diferentes compartimentos de unas bolsas multicompartimentales pueden hacerse juntos con un estilo contiguo donde las bolsas resultantes unidas pueden o no separarse por corte. Alternativamente, los compartimentos se pueden hacer por separado.

[0336] En algunas formas de realización, las bolsas se pueden hacer según un proceso que incluye los pasos de:

- a) formar un primer compartimento (como se ha descrito anteriormente);
- b) formar un rebaje dentro de parte o todo el compartimento cerrado formado en el paso (a), para generar un segundo compartimento moldeado superpuesto sobre el primer compartimento;
- c) llenar y cerrar los segundos compartimentos mediante una tercera película;
- d) sellar las películas primera, segunda y tercera; y
- e) cortar las películas para producir una bolsa multicompartimental.

[0337] El rebaje formado en el paso (b) se puede conseguir mediante la aplicación de vacío al compartimento preparado en el paso (a).

[0338] En algunas formas de realización, el segundo y/o el tercer compartimento(s) se pueden hacer en un paso separado y luego combinarse con el primer compartimento como se describe en EP 2088187 o WO 2009/152031.

[0339] En otras formas de realización, las bolsas pueden hacerse según un proceso que incluye los pasos de:

- a) formar un primer compartimento, usando opcionalmente calor y/o vacío, usando una primera película en una primera máquina conformadora;
- b) llenar el primer compartimento con una primera composición;
- c) en una segunda máquina conformadora, deformar una segunda película, usando opcionalmente calor y vacío, para hacer un segundo y opcionalmente un tercer compartimento moldeado;
- d) llenar el segundo y opcionalmente tercer compartimento;
- e) sellar el segundo y opcionalmente tercer compartimento usando una tercera película;
- f) colocar el segundo y opcionalmente el tercer compartimento sellado(s) sobre el primer compartimento;
- g) sellar el primer, el segundo y opcionalmente el tercer compartimento; y
- h) cortar las películas para producir una bolsa multicompartimental.

[0340] La primera y la segunda máquina conformadora se pueden seleccionar en función de su idoneidad para realizar el proceso anterior. En algunas formas de realización, la primera máquina conformadora es preferiblemente una máquina conformadora horizontal y la segunda máquina conformadora es preferiblemente una máquina conformadora de tambor giratorio, preferiblemente localizada sobre la primera máquina conformadora.

[0341] Debe entenderse que, mediante el uso de estaciones de alimentación apropiadas, puede ser posible fabricar bolsas multicompartimentales que incorporen un número de composiciones diferentes o distintivas y/o composiciones líquidas, en gel o en pasta diferentes o distintivas.

Procesos de fabricación de las composiciones

[0342] Las composiciones de la presente invención se pueden formular en cualquier forma adecuada y preparar por cualquier proceso elegido por el formulador, de los cuales se describen ejemplos no limitativos en los ejemplos de los Solicitantes y en US4990280; US20030087791A1; US20030087790A1; US20050003983A1; US20040048764A1; US4762636; US6291412; US20050227891A1; EP1070115A2; US5879584; US5691297; US5574005; US5569645; US5565422; US5516448; US5489392; US5486303. Las composiciones de la invención o preparadas según la invención comprenden una composición de limpieza y/o tratamiento incluidas, pero de forma no limitativa, composiciones para tratar tejidos, superficies duras y cualquier otra superficie en el área del cuidado de tejidos y del hogar, incluidos: cuidado del aire, incluyendo ambientadores y sistemas de liberación de aromas, cuidado de vehículos, lavado de vajillas, acondicionamiento de tejidos (incluidos suavizantes y/o refrescantes), detergencia para ropa, aditivo y/o cuidado de ropa y enjuagado, limpieza y/o tratamiento de superficies duras,

incluidos limpiadores de suelos e inodoros, agentes de lavado granulosos o en forma de polvo multiusos o para "trabajos pesados", especialmente detergentes de limpieza; agentes de lavado multiusos líquidos, en gel o en forma de pasta, especialmente los tipos líquidos denominados para trabajos pesados; detergentes líquidos para tejidos finos; agentes de lavado de vajillas a mano o agentes de lavado de vajillas para trabajos ligeros, especialmente aquellos del tipo de alta formación de espuma; agentes de lavado de vajillas a máquina, incluidos los varios tipos de comprimidos, granulosos, líquidos y abrillantadores para uso doméstico e institucional: champús para vehículos o alfombras, limpiadores para el cuarto de baño, incluidos los limpiadores de inodoros; así como productos auxiliares de limpieza tales como aditivos blanqueadores y tipos de "quitamanchas en barra" o de pretratamiento, composiciones cargadas de sustrato tales como hojas añadidas a la secadora. Se prefieren las composiciones y los métodos para limpiar y/o tratar tejidos y/o superficies duras, más preferiblemente tejidos. Las composiciones son preferiblemente composiciones usadas en un paso de pretratamiento o paso de lavado principal de un proceso de lavado, más preferiblemente para usar en un paso de lavado de tejidos.

[0343] Como se utiliza en la presente, el término "composición de limpieza y/o tratamiento de tejidos y/o superficies duras" es un subconjunto de composiciones de limpieza y tratamiento que incluye, a menos que se indique lo contrario, agentes de lavado granulosos o en forma de polvo multiusos o para "trabajos pesados", especialmente detergentes de limpieza; agentes de lavado multiusos líquidos, en gel o en forma de pasta, especialmente los tipos líquidos denominados para trabajos pesados; detergentes líquidos para tejidos finos; agentes de lavado de vajillas a mano o agentes de lavado de vajillas para trabajos ligeros, especialmente aquellos del tipo de alta formación de espuma; agentes de lavado de vajillas a máquina, incluidos los varios tipos de comprimidos, granulosos, líquidos y abrillantadores para uso doméstico e institucional; agentes líquidos de limpieza y desinfección, champús para vehículos o alfombras, limpiadores para el cuarto de baño, incluidos limpiadores de inodoros; composiciones de acondicionamiento de tejidos, incluidos suavizantes y/o refrescantes que pueden estar en forma líquida, sólida y/o de hoja para la secadora; así como productos auxiliares de limpieza tales como aditivos blanqueadores y tipos de "quitamanchas en barra" o de pretratamiento, composiciones cargadas de sustrato tales como hojas añadidas a la secadora. Todas tales composiciones que son aplicables pueden estar en forma estándar, concentrada o incluso altamente concentrada incluso hasta el punto en que tales composiciones pueden ser en cierto aspecto no acuosas.

Método de uso

[0344] Se divulgan métodos para limpiar cualquier superficie, incluido tratar un tejido o una superficie dura u otras superficies en el campo del cuidado de tejidos y/o doméstico. Se contempla que la limpieza como se describe puede ser tanto a pequeña escala como, por ejemplo, en hogares familiares, así como a gran escala como, por ejemplo, en entornos industriales y profesionales. El método comprende el paso de poner en contacto la superficie que se va a tratar en un paso de pretratamiento o un paso de lavado principal de un proceso de lavado, más preferiblemente para usar en un paso de lavado de tejidos o alternativamente para usar en el lavado de vajillas, incluyendo tanto el lavado de vajillas manual como el automatizado/mecánico. La variante de lipasa de la invención y otros componentes se añaden secuencialmente en el método para limpiar y/o tratar la superficie. Alternativamente, la variante de lipasa y otros componentes se añaden simultáneamente.

[0345] Como se utiliza en la presente, el lavado incluye, pero de manera no limitativa, el fregado y la agitación mecánica. El lavado se puede realizar con una composición de espuma como se describe en WO08/101958 y/o por aplicación de presión alternante (presión/vacío) como una adición o como una alternativa al fregado y la agitación mecánica. El secado de tales superficies o tejidos se puede realizar por cualquiera de los medios comunes empleados en entornos domésticos o industriales. Las composiciones de limpieza de la presente invención son ideales para usar en aplicaciones de lavado de ropa, así como de lavado de vajillas. Por consiguiente, se describe un método para limpiar un objeto, incluidos, pero de forma no limitativa, tejido, servicio de mesa, cubertería y utensilios de cocina. El método comprende los pasos de poner en contacto el objeto que se va a limpiar con una dicha composición de limpieza que comprende al menos un aspecto de la composición de limpieza, aditivo de limpieza o mezcla de los mismos de los Solicitantes. El tejido puede comprender casi cualquier tejido capaz de ser lavado en condiciones normales de uso institucional o de consumidores. La solución puede tener un pH de 8 a 10,5. Las composiciones se pueden emplear en concentraciones de 500 a 15.000 ppm en solución. Las temperaturas del agua varían típicamente de 5°C a 90°C. La proporción de agua a tejido es típicamente de 1:1 a 30:1.

[0346] Se describen los métodos para usar una variante de una lipasa original, variante que comprende sustituciones en las posiciones correspondientes a E1C y N233C del polipéptido maduro de SEQ ID NO: 2, tiene actividad lipásica y tiene al menos un 80% pero menos del 100% de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la lipasa original.

[0347] Se describe el uso de la composición que comprende una variante de una lipasa original como se define en la reivindicación 1 para limpiar un objeto.

[0348] La lipasa original puede ser una lipasa que es un polipéptido con una secuencia de aminoácidos que: (a) tiene al menos un 90 % de identidad con la lipasa de tipo salvaje derivada de la cepa DSM 4109 de *Humicola lanuginosa*; (b) en comparación con dicha lipasa de tipo salvaje, comprende una sustitución de un aminoácido eléctricamente neutro o cargado negativamente en la superficie de la estructura tridimensional dentro de 15 Å de E1 o Q249 con un aminoácido cargado positivamente; y (c) comprende una adición peptídica en el extremo C-terminal; y/o (d) reúne las limitaciones siguientes: (i) comprende un aminoácido negativo en la posición E210 de dicha lipasa de tipo salvaje; (ii) comprende un aminoácido cargado negativamente en la región correspondiente a las posiciones 90-101 de dicha lipasa de tipo salvaje; y (iii) comprende un aminoácido neutro o negativo en una posición correspondiente a la N94 de dicha lipasa de tipo salvaje y/o tiene una carga eléctrica neta negativa o neutra en la región correspondiente a las posiciones 90-101 de dicha lipasa de tipo salvaje. La lipasa original puede ser una lipasa que tiene actividad lipásica, tiene al menos un 80% pero menos del 100% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2 y comprende sustituciones en las posiciones correspondientes a T231R+N233R y al menos una o más (por ejemplo, varias) de D96E, D111A, D254S, G163K, P256T, G91T, D27R y G38A de la SEQ ID NO: 2. La lipasa original puede ser una que tenga la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 4 o la SEQ ID NO: 6. La lipasa original puede ser una que comprenda o consista en el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 6.

[0349] En un aspecto, la invención se refiere a un método para producir la composición, que comprende la adición conjunta de una variante de una lipasa original de la invención y un tensoactivo. Se describen métodos para limpiar una superficie, que comprende poner en contacto una mancha lipídica presente en la superficie que se va a limpiar con la composición de limpieza. Se describen métodos para hidrolizar un lípido presente en una suciedad y/o una mancha en una superficie, que comprende poner en contacto la suciedad y/o la mancha con la composición de limpieza. Se describe el uso de la composición en la hidrólisis de un éster de ácido carboxílico. Se describe el uso de la composición en la hidrólisis, la síntesis o la interesterificación de un éster. Se describe el uso de la composición para la fabricación de una formulación estable.

[0350] Se describen usos de una variante de una lipasa original de la invención. La lipasa original puede consistir en o comprender la SEQ ID NO: 2; la SEQ ID NO: 4; la SEQ ID NO: 6; o cualquier fragmento de las mismas con actividad lipásica. La variante según la invención se puede usar para la hidrólisis, la síntesis o la interesterificación de un éster; la hidrólisis de un éster de ácido carboxílico; hidrolizar un lípido, limpiar una superficie; y/o producir una composición detergente.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: ensayos

Ensayo de p-nitrofenilo (pNP):

[0351] La actividad hidrolítica de una lipasa se puede determinar mediante un ensayo cinético usando ésteres de acilo de p-nitrofenilo como sustrato.

[0352] Una solución madre de 100 mM en DMSO de los sustratos: butirato de p-nitrofenilo (C4), caproato de p-nitrofenilo (C6), caprato de p-nitrofenilo (C10), laurato de p-nitrofenilo (C12) y palmitato de p-nitrofenilo (C16) (todos de Sigma-Aldrich Danmark A/S, Kirkebjerg Allé 84, 2605 Brøndby; n.º de catálogo: C4: N-9876, C6: N-0502, C10: N-0252, C12: N-2002, C16: N-2752) se puede diluir a una concentración final de 1 mM 25 en el tampón de ensayo (50 mM de Tris; pH 7,7, TritonX-100 al 0,4%).

[0353] La lipasa de la invención, la lipasa original y los controles apropiados, por ejemplo, tampón (negativo), LipolaseTM & LipexTM (positivo) en 50 mM de Hepes; pH 8,0; 10 ppm de TritonX-100; +/-20 mM de CaCl₂, se pueden añadir a la solución de sustrato en las siguientes concentraciones finales: 0,01 mg/ml; 5x10⁻³ mg/ml; 2,5x10⁻⁴ mg/ml; y 1,25x10⁻⁴ mg/ml en placas NUNC de 96 pocillos (n.º de catálogo: 260836, Kamstrupvej 90, DK-4000, Roskilde). La liberación de p-nitrofenol por hidrólisis de acilo de p-nitrofenilo se puede monitorear a 405 nm durante 5 minutos en intervalos de 10 segundos en un Spectra max 190 (Molecular Devices GmbH, Bismarckring 39, 88400 Biberach an der Riss, Alemania). La actividad hidrolítica hacia uno o más sustratos de una variante puede compararse con la de la lipasa original.

Ensayo de calorimetría diferencial de barrido (DSC):

[0354] La termoestabilidad de las variantes de lipasa se determinó por calorimetría diferencial de barrido (DSC) usando un calorímetro VP-Capillary Differential Scanning Calorimeter (MicroCal Inc., Piscataway, NJ, EE.UU.). La temperatura de desnaturalización térmica, T_d (°C), se tomó como la superior del pico de desnaturalización (pico endotérmico principal) en los termogramas (C_p vs. T) obtenidos después de calentar las soluciones enzimáticas

(aprox. 0,5 mg/ml) en tampón (50 mM Hepes pH 8) a una velocidad de calentamiento programada constante de 200 K/h.

5 [0355] Las soluciones de muestra y de referencia (aprox. 0,2 ml) se cargaron en el calorímetro (referencia: tampón sin enzima) desde condiciones de almacenamiento a 10°C y se preequilibraron térmicamente durante 20 minutos a 20°C antes del barrido DSC de 20°C a 100°C. Las temperaturas de desnaturalización se determinaron con una exactitud de aproximadamente +/-1°C.

[0356] La DSC se realizó también añadiendo 0,05 g/L de Relase (Novozymes A/S) y/o 1 mM de LAS.

Ensayos de estabilidad de almacenamiento:

10 [0357] **Protocolo A:** cepas de *Aspergillus oryzae* que producen la variante de lipasa se cultivaron durante 5 días a 37°C en medio SC 2x con maltosa al 2% sin agitación. El medio SC 2x es 15 g de base nitrogenada de levadura sin aminoácidos (Difco 291920), 22,6 g de ácido succínico (Merck 822260), 13,6 g + hidróxido sódico (Merck 106498), 11,2 g de casaminoácidos (ensayo vitamínico, Difco 228830) y 0,2 g de L-triptófano (Merck 108374) disueltos en 1 L de agua desionizada.

15 [0358] Se añadieron 10 uL del caldo de cultivo a 90 uL de composición detergente, se agitaron durante 10 minutos y se sellaron en recipientes de plástico pequeños. Para las condiciones de estrés C1, muestras con la composición detergente D0001 se almacenaron a -20°C en detergente D001 con cloruro de calcio al 0,02% (sin estrés) y en detergente D001 con cloruro de calcio al 0,02% y Relase 16L EXI (Novozymes) al 1,35% a 48°C (con estrés). Para las condiciones de estrés C2, muestras con la composición detergente D0001 se almacenaron a -20°C en detergente D001 con cloruro de calcio al 0,02% (sin estrés) y en detergente D001 con cloruro de calcio al 0,02% y Savinase Ultra 16L (Novozymes) al 1,35% a 35°C (con estrés). Para las condiciones de estrés C3, muestras con la composición detergente D0002 se almacenaron a -20°C en detergente D002 con cloruro de calcio al 0,02% (sin estrés) y en detergente D002 con cloruro de calcio al 0,02% y Relase 16L EXI (Novozymes) al 1,35% a 55°C (con estrés). Para las condiciones de estrés C4, muestras con la composición detergente D0002 se almacenaron a -20°C en detergente D002 con cloruro de calcio al 0,02% (sin estrés) y en detergente D002 con cloruro de calcio al 0,02% y Savinase 16L (Novozymes) al 1,35% a 35°C (con estrés). El tiempo de almacenamiento fue de 19 horas.

30 [0359] Después del almacenamiento, el posible líquido de condensación se recogió por centrifugación. A los 100 uL de muestra con estrés o sin estrés se añadieron 230 uL de tampón (0,1M de Tris-HCl; 9mM de CaCl₂; 0,0225% Brij-30; pH8,0 +0,85% 4-FBPA (31,5 g/l)), que corresponde a un factor de dilución de 3,3. Después de 10 minutos de agitación se diluyeron adicionalmente partes alícuotas de la muestra de 5 uL con el mismo tampón 60 veces. Luego una parte de esta dilución de lipasa se mezcló con cuatro partes de 0,5 mM de pNP-palmitato, 1 mM de cloruro de calcio, 100 mM de Tris (pH8,0), 6,5 mM de desoxicolato, 1,4 g/L de AOS y durante 30 minutos se midió espectrofotométricamente la liberación del cromóforo pNP. Esto se usó para determinar la actividad a través de la pendiente lineal inicial de la reacción.

35 [0360] La actividad residual (RA) se calculó como la proporción de las velocidades medidas de muestra con estrés frente a muestra sin estrés. La semivida ($T_{1/2}$) se calculó en función de la fórmula siguiente:

$$\text{Semivida} = \text{tiempo de estrés} * \ln(0,5)/\ln(\text{actividad residual})$$

[0361] El valor medio de la actividad residual y las semividas se calcularon basándose en de dos a cuatro réplicas.

[0362] El factor de mejora de la semivida (HIF) de las mutaciones específicas se calculó dividiendo la semivida de la variante de lipasa por la semivida de la lipasa original con la secuencia de la SEQ ID NO: 2.

40 [0363] **Protocolo B** (enzima purificada en detergente con proteasa): después de la titulación del sitio activo, las variantes de lipasa purificadas se diluyeron con un tampón (10 mM de ácido succínico + 2 mM de CaCl₂ + 0,02% Brij 35 ajustado a pH6,5) a la concentración especificada. Se añadieron 10 uL de la solución de 100 ppm de lipasa a 90 uL de la composición detergente, se agitó durante 10 minutos y se selló. Para las condiciones de estrés C1, muestras con la composición detergente D0001 se almacenaron a -20°C en detergente D001 con cloruro de calcio al 0,02% (sin estrés) y en detergente D001 con cloruro de calcio al 0,02% y Relase 16L EXI (Novozymes) al 1,35% a 48°C (con estrés). Para las condiciones de estrés C2, muestras con la composición detergente D0001 se almacenaron a -20°C en detergente D001 con cloruro de calcio al 0,02% (sin estrés) y en detergente D001 con cloruro de calcio al 0,02% y Savinase Ultra 16L (Novozymes) al 1,35% a 35°C (con estrés). Para las condiciones de estrés C3, muestras con la composición detergente D0002 se almacenaron a -20°C en detergente D002 con cloruro de calcio al 0,02% (sin estrés) y en detergente D002 con cloruro de calcio al 0,02% y Relase 16L EXI (Novozymes) al 1,35% a 55°C (con estrés). Para las condiciones de estrés C4, muestras con la composición

detergente D0002 se almacenaron a -20°C en detergente D002 con cloruro de calcio al 0,02% (sin estrés) y en detergente D002 con cloruro de calcio al 0,02% y Savinase 16L (Novozymes) al 1,35% a 35°C (con estrés). El tiempo de almacenamiento fue de 19 horas.

- 5 [0364] Después del almacenamiento, el posible líquido de condensación se recogió por centrifugación. A los 100 uL de muestra con estrés o sin estrés se añadieron 230 uL de tampón (0,1M de Tris-HCl; 9mM de CaCl₂; 0,0225% Brij-30; pH8,0 +0,85% 4-FBPA (31,5 g/l)), que corresponde a un factor de dilución de 3,3. Después de 10 minutos de agitación se diluyeron adicionalmente partes alícuotas de la muestra de 5 uL con el mismo tampón 60 veces. Luego una parte de esta dilución de lipasa se mezcló con cuatro partes de 0,5 mM de pNP-palmitato, 1 mM de cloruro de calcio, 100 mM de Tris (pH8,0), 6,5 mM de desoxicolato, 1,4 g/L de AOS y durante 30 minutos se midió espectrofotométricamente la liberación del cromóforo pNP. Esto se usó para determinar la actividad a través de la pendiente lineal inicial de la reacción.
- 10

[0365] La actividad residual (RA) se calculó como la proporción de las velocidades medidas de muestra con estrés frente a muestra sin estrés. La semivida ($T_{1/2}$) se calculó en función de la fórmula siguiente:

$$\text{Semivida} = \text{tiempo de estrés} * \ln(0,5)/\ln(\text{actividad residual})$$

- 15 [0366] El valor medio de la actividad residual y la semivida se calculó basándose en cuatro réplicas. El valor medio de la actividad residual y la semivida se calculó basándose en tres réplicas. El factor de mejora de la semivida (HIF) se calculó entre un par de variantes diferentes en una mutación única o una doble. El factor de mejora de la semivida es la semivida de la variante con la mutación única o doble extra dividida por la semivida de la variante que no la tiene.
- 20 [0367] **Detergentes:** la composición D001 es un detergente líquido AVA disponible comercialmente de Reckitt Benckiser. La composición D002 es un detergente modelo según se enumera a continuación.

Composición de D002 (Contenido de componente activo en el ingrediente)	% en peso
Agua blanda	33,64
NaOH, gránulos (>99%)	1,75
Ácido alquilbencenosulfónico lineal (LAS) (97%)	12,00
Laureth sulfato de sodio (SLES) (28%)	17,63
Ácido graso de soja (>90%)	2,75
Ácido graso de coco (>90%)	2,75
AEO; alcohol etoxilado con 8 mol de EO; Lutensol TO 8 (~100%)	11,00
Trietanolamina (100%)	3,33
Na-citrato, dihidrato (100%)	2,00
DTMPA; ácido dietilentriaminopentakis(metilen)pentakis(fosfónico), sal de heptasodio (Dequest 2066 C) (~42% como sal Na7)	0,48
MPG (>98%)	6,00
EtOH, propan-2-ol (90/10%)	3,00
Glicerol (>99,5)	1,71
Formiato de sodio (>95%)	1,00
PCA (40% como sal de sodio)	0,46
Fenoxietanol	0,50

Rendimiento de lavado relativo, RP(lavado)

- 25 [0368] Se realizaron experimentos de lavado usando el ensayo Automatic Mechanical Stress Assay (AMSA) para valorar el rendimiento de lavado en el lavado de ropa. La placa de AMSA tiene un número de ranuras para soluciones de prueba y una tapa que comprime firmemente la muestra de lavado de ropa, el tejido que se va a lavar contra todas las aberturas de las ranuras. Durante el tiempo de lavado, la placa, las soluciones de prueba, el tejido y la tapa se agitan enérgicamente para poner la solución de prueba en contacto con el tejido y aplicar tensión

mecánica de una manera oscilante regular periódica. Para una descripción adicional véase la WO02/42740, especialmente el párrafo "Special method embodiments" en la página 23-24.

[0369] Los experimentos de lavado de ropa se realizaron usando las siguientes condiciones experimentales:

Detergentes:	3,3 g/L Detergente B; o 1,75 g/L Detergente X
Volumen de solución de prueba:	160 uL
Tiempo de lavado:	20 minutos
Temperatura:	30°C
Dosificación de lipasa:	0 ppm; o 0,35 ppm
Material de prueba:	Tejido de algodón EMPA221 manchado de crema de achiote (lavado con detergente B); o Tejido de algodón EMPA221 manchado de crema de cúrcuma (lavado con detergente X)

[0370] El manchado con crema de cúrcuma del tejido EMPA221 se realizó según la WO06/125437. El EMPA221 manchado con crema de achiote se produjo de la misma manera que el EMPA221 manchado de crema de cúrcuma salvo que se cambió la cúrcuma por achiote (A-320-WS obtenido de Chr. Hansen Natural Colors A/S Boege Allé 10-12, 2970 Hoersholm, Dinamarca). El EMPA221 se obtuvo de EMPA, Lerchenfeldstrasse 5; CH-9014, St. Gallen, Suiza.

[0371] La dureza del agua se ajustó a 5°dH o 15°dH por adición de CaCl_2 , MgCl_2 y NaHCO_3 ($\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}:\text{HCO}_3^- = 4:1:7,5$), cuando se lavó con detergente B y 12°dH ($\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}:\text{HCO}_3^- = 2:1:4,5$), cuando se lavó con detergente X.

Composición de detergente B	% en peso
NaOH, gránulos (>99%)	1,05
Ácido alquilbencenosulfónico lineal (LAS) (97%)	7,20
Laureth sulfato de sodio (SLES) (28%)	10,58
Ácido graso de soja (>90%)	2,75
Ácido graso de coco (>99%)	2,75
Alcohol etoxilado (AEO) con 8 mol de EO; Lutensol TO 8 (~100%)	6,60
Trietanolamina (100%)	3,33
Na-citrato, dihidrato (100%)	2,00
DTMPA; ácido dietilentriaminopentakis(metilen)pentakis(fosfónico), sal de heptasodio (Dequest 2066 C) (~42% como sal Na_7)	0,48
MPG (>98%)	6,00
EtOH, propan-2-ol (90/10%)	3,00
Glicerol (>99,5)	1,71
Formiato de sodio (>95%)	1,00
PCA (40% como sal de sodio)	0,46
Agua hasta	100

Composición de detergente X	% en peso
Ácido alquilbencenosulfónico lineal (LAS) (85%)	17,6
AEO; alcohol etoxilado con 7 mol de EO (99,5%)	2,0
carbonato de sodio (99,5%)	20,1
(di)silicato de sodio (80%)	12,4
zeolita A (80%)	15,0
sulfato de sodio (100%)	31,8

copoli(ácido acrílico/ácido maleico), sal de sodio (92%)	1,1
--	-----

[0372] El detergente B es un ejemplo de una composición detergente líquida mientras que el detergente X es un ejemplo de una composición detergente en polvo. Después del lavado, los tejidos se enjuagaron en agua del grifo y el exceso de agua se eliminó de los tejidos usando papel de filtro e inmediatamente después los tejidos se secaron a 100°C durante 15 min.

5 [0373] El rendimiento de lavado se midió como el cambio de color del tejido sucio lavado. La suciedad fue crema mezclada con achiote cuando se lava con el detergente B y crema mezclada con cúrcuma cuando se lava con el detergente X. El achiote contiene el colorante norbixina y la cúrcuma contiene el colorante curcumina. La norbixina al igual que la curcumina funcionan como indicadores de pH porque tienen un cambio de color dependiente del pH. La actividad lipásica lleva a liberar ácidos grasos libres de los acilglicéridos de la crema y esto lleva a la reducción del pH y, así, al cambio de color de los indicadores de pH norbixina o curcumina. Por lo tanto, el rendimiento de lavado de la lipasa puede expresarse como la extensión del cambio de color de la luz reflejada-emitida del tejido sucio lavado cuando se ilumina con luz blanca.

15 [0374] Se hicieron mediciones de color con un escáner de superficie plana profesional (EPSON EXPRESSION 11000XL, Atea A/S, Lautrupvang 6, 2750 Ballerup, Dinamarca), que se usó para capturar una imagen del tejido sucio lavado. Para extraer un valor para la intensidad de luz de las imágenes escaneadas, valores de píxeles de 24 bit de la imagen se convirtieron en valores para rojo, verde y azul (RGB).

[0375] El cambio de color debido a la actividad lipásica se mide como el cambio en la reflexión-emisión de luz verde (G) relativo al valor de intensidad de luz (Int) calculado sumando los valores de RGB juntos como vectores y luego tomando la longitud del vector resultante:

20
$$Int = \sqrt{R^2 + G^2 + B^2}$$

[0376] El rendimiento de lavado relativo (RP(lavado)) de una lipasa en relación con una lipasa de referencia se calcula como:

$$RP(lavado) = (G/Int(lipasa evaluada) - G/Int(sin enzima)) / (G/Int(lipasa de ref.) - G/Int(sin enzima)).$$

25 [0377] Se considera que una lipasa presenta un rendimiento de lavado mejorado, si tiene un rendimiento mejor que la referencia (RP(lavado) > 1). En el contexto de la presente invención, la enzima de referencia es la lipasa de tipo salvaje o la lipasa original, es decir, la lipasa de control sin las sustituciones E1C R233C.

Ensayo de barrido nanodiferencial de fluorescencia (NanoDSF)

30 [0378] Las mediciones de termoestabilidad se realizaron usando un instrumento de barrido nanodiferencial de fluorescencia (nanoDSF); Prometheus NT.48 (NanoTemper Technologies GmbH, Múnich, Alemania). Se usaron capilares de grado nanoDSF estándar (n.º de catálogo: PR-C002 NanoTemper Technologies). Las muestras de proteína purificada se cargaron en los capilares (cada muestra por triplicado) por acción capilar. Las intensidades de emisión a 330 y 350 nm fueron optimizadas modificando la potencia LED en el instrumento para obtener una señal de entre 3000 y 15000 recuentos de fluorescencia. La pendiente de temperatura usada para el despliegamiento térmico fue 3,3 grados Celsius por minuto de 20 a 95 grados Celsius. Los datos se analizaron usando el software PR.Control v1.11.2 suministrado por el fabricante. Típicamente, el máximo (o el mínimo) de pico positivo (o negativo) en el análisis de la primera derivada se tomó para representar la temperatura de desnaturalización térmica, Td (°C).

40 [0379] Las muestras se usaron directamente de los stocks purificados. Para determinar el efecto del agente reductor en las estabilidades térmicas, 250 mM de TCEP en 50 mM de HEPES, pH 8,0, se añadió a una concentración final de 0,5 mM a las muestras. Las muestras bajo condiciones reductoras y no reductoras se procesaron en paralelo.

Ejemplo 2: estabilidad

45 [0380] La estabilidad de una variante según la invención, la lipasa de referencia y una lipasa de la técnica anterior se determinaron según el ensayo de DSC descrito en el ejemplo 1. La temperatura de desnaturalización térmica para cada lipasa bajo varias condiciones se muestra en la tabla siguiente.

Tabla 2: temperatura de desnaturalización térmica, Td.

Lipasa	Sustituciones en la SEQ ID NO: 2	Td
De tipo salvaje	-	74,5
Lipasa de la técnica anterior	SPPCGRRP +E1* +E239C	72,4
Variante 1	E1C +N233C	75,1
Variante 2	E1C +T231 R +N233C	75,4
Variante 3	E1C +L227G +T231 R +N233C	78,0

[0381] Las variantes de lipasa de la invención muestran una estabilidad aumentada sobre la lipasa de la técnica anterior en las condiciones evaluadas. La estabilidad también se investigó en presencia de 0,05 g/L de Relase (Novozymes A/S) y/o 1 mM de LAS. La introducción de las sustituciones E1C+N233C resultó en una estabilidad aumentada en presencia de Relase y/o LAS.

Ejemplo 3: estabilidad

[0382] La estabilidad de una variante según la invención, la lipasa de referencia y una lipasa de la técnica anterior se determinaron según el ensayo de DSC descrito en el ejemplo 1. La temperatura de desnaturalización térmica para cada lipasa bajo varias condiciones se muestra en la tabla siguiente.

Tabla 3A:

Lipasa	Sustituciones en la SEQ ID NO: 2	Td
De tipo salvaje	-	74,5
Variante 7	E1C D27R N33K G38A F51V D96E K98E N101D D111A G163K H198S E210K Y220F T231R N233C D254S P256T	80,6

Tabla 3B:

Lipasa	Sustituciones en la SEQ ID NO: 2	Td
Control	T231R N233R	74,2
Variante 2	E1C T231R N233C	75,4
Variante 3	E1C L227G T231R N233C	78,1

Tabla 3C:

Lipasa	Sustituciones en la SEQ ID NO: 2	Td
Control	T231R	74,4
Control 8	V2K D27R N33K G38A F51V D96E D111A G163K T231 R D254S P256T	75,4
Variante 8	E1C V2K D27R N33K G38A F51V D96E D111A G163K T231 R N233C D254S P256T	78,1
Control 9	D27R N33K G38A F51V S54T E56K D96E K98I D111A G163K T231R D254S P256T	81,8
Variante 9	E1C D27R N33K G38A F51V S54T E56K D96E K98I D111A G163K T231R N233C D254S P256T	84,8
Control 4	D27R N33K G38A F51V D96E K98I D111A G163K H198S Y220F T231R D254S P256T	78,8
Variante 4	E1C D27R N33K G38A F51V D96E K98I D111A G163K H198S Y220F T231R N233C D254S P256T	82,4

Ejemplo 4: estabilidad de almacenamiento

[0383] Se evaluaron variantes que comprenden las sustituciones E1C N233C según el protocolo A como se describe en el ejemplo 1. Se realizaron comparaciones con una lipasa correspondiente sin las sustituciones E1C N233C para mostrar el efecto de la sustitución doble.

ES 2 797 725 T3

Tabla 4 : estabilidad mejorada

Estrés	HIF	Act. res. (%)	Semivida (Hora)	Mutaciones de variantes comparadas
C2	2,2	A: 15 B: 42	A: 7 B: 15	A: T231R N233R B: E1C T231R N233C
C1	>1,2	A: <5 B: 8	A: <4 B: 5	A: D27R N33K G38A F51V S54T E56K D96E K98I D111A G163K T231R N233R D254S P256T A257I B: E1C D27R N33K G38A F51V S54T E56K D96E K98I D111A G163K T231R N233C D254S P256T A257I
C2	>35,1	A: <5 B: 92	A: <4 B: 154	A: D27R N33K G38A F51V S54T E56K D96E K98I D111A G163K T231R N233R D254S P256T A257I B: E1C D27R N33K G38A F51V S54T E56K D96E K98I D111A G163K T231R N233C D254S P256T A257I
C4	3,3	A: 61 B: 86	A: 26 B: 87	A: D27R N33K G38A F51V S54T E56K D96E K98I D111A G163K T231R N233R D254S P256T A257I B: E1C D27R N33K G38A F51V S54T E56K D96E K98I D111A G163K T231R N233C D254S P256T A257I
C1	>1,6	A: <5 B: 16	A: <4 B: 7	A: D27R N33K G38A F51V E56K L69R D96E K98E D111A G163K T231R N233R D254S P256T A257I B: E1C D27R N33K G38A F51V E56K L69R D96E K98E D111A G163K R179L T231R N233C D254S P256T A257I
C2	>36,0	A: <5 B: 92	A: <4 B: 158	A: D27R N33K G38A F51V E56K L69R D96E K98E D111A G163K T231R N233R D254S P256T A257I B: E1C D27R N33K G38A F51V E56K L69R D96E K98E D111A G163K R179L T231R N233C D254S P256T A257I
C4	2,1	A: 63 B: 80	A: 28 B: 60	A: D27R N33K G38A F51V E56K L69R D96E K98E D111A G163K T231R N233R D254S P256T A257I B: E1C D27R N33K G38A F51V E56K L69R D96E K98E D111A G163K R179L T231R N233C D254S P256T A257I
C1	>11,0	A: <5 B: 76	A: <4 B: 48	A: D27R N33K G38A F51V D96E K98I D111A G163K H198S Y220F T231R N233R D254S P256T B: E1C D27R N33K G38A F51V D96E K98I D111A G163K H198S Y220F T231R N233C D254S P256T
C2	21,3	A: 76 B: 99	A: 48 B: 1024	A: D27R N33K G38A F51V D96E K98I D111A G163K H198S Y220F T231R N233R D254S P256T B: E1C D27R N33K G38A F51V D96E K98I D111A G163K H198S Y220F T231R N233C D254S P256T
C3	>3,3	A: <5 B: 40	A: <4 B: 15	A: D27R N33K G38A F51V D96E K98I D111A G163K H198S Y220F T231R N233R D254S P256T B: E1C D27R N33K G38A F51V D96E K98I D111A G163K H198S Y220F T231R N233C D254S P256T
C4	1,4	A: 87 B: 91	A: 96 B: 138	A: D27R N33K G38A F51V D96E K98I D111A G163K H198S Y220F T231R N233R D254S P256T B: E1C D27R N33K G38A F51V D96E K98I D111A G163K H198S Y220F T231R N233C D254S P256T
C1	>15,6	A: <5 B: 82	A: <4 B: 68	A: D27R N33K G38A F51V D96E K98E N101D D111A T123V G163K H198S E210K Y220F T231R N233R D254S P256T B: E1C D27R N33K G38A F51V D96E K98E N101D D111A T123V G163K H198S E210K Y220F T231R N233C D254S P256T
C2	6,9	A: 79 B: 97	A: 56 B: 387	A: D27R N33K G38A F51V D96E K98E N101D D111A T123V G163K H198S E210K Y220F T231R N233R D254S P256T B: D27R D111A E1C N33K G38A F51V D96E K98E N101D T123V G163K H198S E210K Y220F T231R N233C D254S P256T

C3	>3,4	A: <5 B: 42	A: <4 B: 15	A: D27R N33K G38A F51V D96E K98E N101D D111A T123V G163K H198S E210K Y220F T231R N233R D254S P256T B: D27R D111A E1C N33K G38A F51V D96E K98E N101D T123V G163K H198S E210K Y220F T231R N233C D254S P256T
C4	2,2	A: 82 B: 92	A: 67 B: 150	A: D27R N33K G38A F51V D96E K98E N101D D111A T123V G163K H198S E210K Y220F T231R N233R D254S P256T B: E1C D27R N33K G38A F51V D96E K98E N101D D111A T123V G163K H198S E210K Y220F T231R N233C D254S P256T
C1	>3,3	A: <5 B: 40	A: <4 B: 14	A: D27R N33K G38A F51V D96E K98E N101D D111A G163K H198S E210K Y220F T231R N233R D254S P256T B: E1C D27R N33K G38A F51V D96E K98E N101D D111A G163K H198S E210K Y220F T231R N233C D254S P256T
C3	>2,2	A: <5 B: 25	A: <4 B: 9	A: D27R N33K G38A F51V D96E K98E N101D D111A G163K H198S E210K Y220F T231R N233R D254S P256T B: E1C D27R N33K G38A F51V D96E K98E N101D D111A G163K H198S E210K Y220F T231R N233C D254S P256T
C1	1,8	A: 55 B: 71	A: 22 B: 39	A: D27R G38A F51V L69R D96E K98E D111A G163K E210K T231R N233R D254S P256T B: E1C D27R G38A F51V L69R D96E K98E D111A G163K E210K T231R N233C D254S P256T
C3	1,4	A: 46 B: 58	A: 17 B: 24	A: D27R G38A F51V L69R D96E K98E D111A G163K E210K T231R N233R D254S P256T B: E1C D27R G38A F51V L69R D96E K98E D111A G163K E210K T231R N233C D254S P256T
C1	1,6	A: 56 B: 69	A: 23 B: 35	A: D27R N33K G38A F51V S54T E56K D96E K98I D111A G163K T231R N233R D254S P256T B: E1C D27R N33K G38A F51V S54T E56K D96E K98I D111A G163K T231R N233C D254S P256T
C3	1,2	A: 43 B: 50	A: 16 B: 19	A: D27R N33K G38A F51V S54T E56K D96E K98I D111A G163K T231R N233R D254S P256T B: E1C D27R N33K G38A F51V S54T E56K D96E K98I D111A G163K T231R N233C D254S P256T

Ejemplo 5: estabilidad de almacenamiento

[0384] Se evaluaron variantes que comprenden las sustituciones E1C N233C según el protocolo B como se describe en el ejemplo 1. Se realizaron comparaciones con una lipasa correspondiente sin las sustituciones E1C N233C para mostrar el efecto de la sustitución doble.

5

Tabla 5: estabilidad mejorada.

Estrés	HIF	Act. res. (%)	Semivida (Hora)	Mutaciones de variantes comparadas
C2	1,5	A: 12 B: 25	A: 6 B: 9	A: - B: E1C N233C
C4	1,4	A: 16 B: 27	A: 7 B: 10	A: B: E1C N233C
C2	1,3	A: 5 B: 10	A: 4 B: 6	A: T231R N233R B: E1C T231R N233C
C4	1,2	A: 22 B: 28	A: 9 B: 10	A: T231R N233R B: E1C T231R N233C

C1	4,0	A: 23 B: 69	A: 9 B: 36	A: D27R G38A F51V L69R D96E K98E D111A G163K E210K T231R N233R D254S P256T B: E1C D27R G38A F51V L69R D96E K98E D111A G163K E210K T231R N233C D254S P256T
C2	8,9	A: 46 B: 92	A: 17 B: 151	A: D27R G38A F51V L69R D96E K98E D111A G163K E210K T231R N233R D254S P256T B: E1C D27R G38A F51V L69R D96E K98E D111A G163K E210K T231R N233C D254S P256T
C3	1,4	A: 50 B: 60	A: 19 B: 26	A: D27R G38A F51V L69R D96E K98E D111A G163K E210K T231R N233R D254S P256T B: E1C D27R G38A F51V L69R D96E K98E D111A G163K E210K T231R N233C D254S P256T
C1	>2,1	A: <5 B: 24	A: <4 B: 9	A: D27R N33K G38A F51V D96E K98I D111A G163K H198S Y220F T231R N233R D254S P256T B: E1C D27R N33K G38A F51V D96E K98I D111A G163K H198S Y220F T231R N233C D254S P256T
C3	>3,2	A: <5 B: 39	A: <4 B: 14	A: D27R N33K G38A F51V D96E K98I D111A G163K H198S Y220F T231R N233R D254S P256T B: E1C D27R N33K G38A F51V D96E K98I D111A G163K H198S Y220F T231R N233C D254S P256T
C1	1,9	A: 62 B: 78	A: 27 B: 53	A: D27R N33K G38A F51V S54T E56K D96E K98I D111A G163K T231R N233R D254S P256T B: E1C D27R N33K G38A F51V S54T E56K D96E K98I D111A G163K T231R N233C D254S P256T
C3	1,5	A: 44 B: 57	A: 16 B: 23	A: D27R N33K G38A F51V S54T E56K D96E K98I D111A G163K T231R N233R D254S P256T B: E1C D27R N33K G38A F51V S54T E56K D96E K98I D111A G163K T231R N233C D254S P256T
C1	>8,0	A: <5 B: 69	A: <4 B: 35	A: D27R N33K G38A F51V D96E K98E N101D D111A T123V G163K H198S E210K Y220F T231R N233R D254S P256T B: E1C D27R N33K G38A F51V D96E K98E N101D D111A T123V G163K H198S E210K Y220F T231R N233C D254S P256T
C2	2,6	A: 58 B: 81	A: 24 h B: 62 h	A: D27R N33K G38A F51V D96E K98E N101D D111A T123V G163K H198S E210K Y220F T231R N233R D254S P256T B: E1C D27R N33K G38A F51V D96E K98E N101D D111A T123V G163K H198S E210K Y220F T231R N233C D254S P256T
C3	>3,2	A: <5 B: 39	A: <4 h B: 14 h	A: D27R N33K G38A F51V D96E K98E N101D D111A T123V G163K H198S E210K Y220F T231R N233R D254S P256T B: E1C D27R N33K G38A F51V D96E K98E N101D D111A T123V G163K H198S E210K Y220F T231R N233C D254S P256T

Ejemplo 6: rendimiento de lavado

[0385] El rendimiento de lavado relativo, RP(lavado), de una lipasa de la técnica anterior y variantes según la invención se estudió con el método descrito en el ejemplo 1 usando el detergente B y se comparó con el RP(lavado) de la lipasa de tipo salvaje.

5 Tabla 6: rendimiento de lavado mejorado sobre las lipasas de tipo salvaje y de la técnica anterior.

Lipasa	Sustituciones en la SEQ ID NO: 2	RP(lavado)
De tipo salvaje	-	1,00
De la técnica anterior	SPPCGRRP +E1* +E239C	0,57
Variante 1	E1C +N233C	1,50
Variante 2	E1C +T231 R +N233C	1,72

Variante 3	E1C +L227G +T231 R +N233C	1,85
------------	---------------------------	------

Ejemplo 7: rendimiento de lavado

[0386] El rendimiento de lavado relativo, RP(lavado), de variantes según la invención se estudió con el método descrito en el ejemplo 1 usando un detergente líquido, detergente B (Det B), o un detergente en polvo, detergente X (Det X), y se comparó con el RP(lavado) de la lipasa original correspondiente, es decir, la lipasa de control sin las sustituciones E1C+N233C.

Tabla 7: rendimiento de lavado mejorado sobre la lipasa original.

Lipasa	Sustituciones en la SEQ ID NO: 2	RP(lavado) (Det. B 15°dH)	RP(lavado) (Det. B 5°dH)	RP(lavado) (Det. X 12°dH)
De tipo salvaje	-	1,00	-	-
Variante 1	E1C N233C	1,50	-	-
Control 4	D27R N33K G38A F51V D96E K98I D111A G163K H198S Y220F T231R N233R D254S P256T	1,00	1,00	1,00
Variante 4	E1C D27R N33K G38A F51V D96E K98I D111A G163K H198S Y220F T231R N233C D254S P256T	1,03	3,37	1,88
Control 5	V2K D27R N33K G38A F51V D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T A257I	1,00	1,00	1,00
Variante 5	E1C V2K D27R N33K G38A F51V D96E D111A G163K T231R N233C D254S P256T A257I	1,61	2,12	1,35

Ejemplo 8: efecto de un agente reductor sobre la estabilidad

[0387] La estabilidad de una variante según la invención, la lipasa original, es decir, la lipasa de control sin las sustituciones E1C+N233C, y una lipasa de la técnica anterior se determinó conforme al ensayo de NanoDSF descrito en el ejemplo 1. La temperatura de desnaturalización térmica para cada lipasa en ausencia y en presencia de un agente reductor (TCEP) se muestra en la tabla siguiente.

Tabla 8: estabilidad mejorada en presencia y en ausencia de un agente reductor.

Lipasa	Sustituciones en la SEQ ID NO: 2	Td (°C)	DE	Td TCEP (°C)	DE
De tipo salvaje	-	69,2	1,7	65,3	1,2
De la técnica anterior	SPPCGRRP +E1* +E239C	69,7	0,3	60,6	0,8
De tipo salvaje	-	69,2	1,7	65,3	1,2
Variante 1	E1C N233C	72,7	0,7	64,0	0,1
Control 4	D27R N33K G38A F51V D96E K98I D111A G163K H198S Y220F T231R N233R D254S P256T	71,5	0,2	67,4	0,3
Variante 4	E1C D27R N33K G38A F51V D96E K98I D111A G163K H198S Y220F T231R N233C D254S P256T	81,0	0,7	71,1	0,9
Control 5	V2K D27R N33K G38A F51V D96E D111A G163K T231R N233R D254S P256T A257I	63,5	0,1	58,5	0,1
Variante 5	E1C V2K D27R N33K G38A F51V D96E D111A G163K T231R N233C D254S P256T A257I	66,2	0,2	60,3	0,1

ES 2 797 725 T3

Control 6	D27R G38A F51V L69R D96E K98E D111A G163K E210K T231R D254S P256T	77,2	0,2	70,5	0,4
Variante 6	E1C D27R G38AF51V L69R D96E K98E D111A G163K E210K T231R N233C D254S P256T	78,6	0,2	71,3	0,2

LISTADO DE SECUENCIAS

[0388]

<110> Novozymes A/S

5 <120> Composiciones detergentes, variantes de lipasa y polinucleótidos que codifican las mismas

<130> 12818-WO-PCT

10 <160> 6

<170> Versión de PatentIn 3.5

<210> 1

15 <211> 918

<212> ADN

<213> Thermomyces lanuginosus

20 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(873)

<220>

25 <221> sig_peptide

<222> (1)..(66)

<220>

30 <221> mat_peptide

<222> (67)..()

<400> 1

35 atg agg agc tcc ctt gtg ctg ttc ttt gtc tct gcg tgg acg gcc ttg

48

Met Arg Ser Ser Leu Val Leu Phe Phe Val Ser Ala Trp Thr Ala Leu
-20 -15 -10

40 gcc agt cct att cgt cga gag gtc tcg cag gat ctg ttt aac cag ttc

96

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

45 aat ctc ttt gca cag tat tct gca gcc gca tac tgc gga aaa aac aat

144

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

50 gat gcc cca gct ggt aca aac att acg tgc acg gga aat gcc tgc ccc

192

ES 2 797 725 T3

	Asp	Ala	Pro	Ala	Gly	Thr	Asn	Ile	Thr	Cys	Thr	Gly	Asn	Ala	Cys	Pro
				30					35					40		
5	gag	gta	gag	aag	gcg	gat	gca	acg	ttt	ctc	tac	tcg	ttt	gaa	gac	tct
	240															
	Glu	Val	Glu	Lys	Ala	Asp	Ala	Thr	Phe	Leu	Tyr	Ser	Phe	Glu	Asp	Ser
			45					50					55			
10	gga	gtg	ggc	gat	gtc	acc	ggc	ttc	ctt	gct	ctc	gac	aac	acg	aac	aaa
	288															
	Gly	Val	Gly	Asp	Val	Thr	Gly	Phe	Leu	Ala	Leu	Asp	Asn	Thr	Asn	Lys
		60					65					70				
15	ttg	atc	gtc	ctc	tct	ttc	cgt	ggc	tct	cgt	tcc	ata	gag	aac	tgg	atc
	336															
	Leu	Ile	Val	Leu	Ser	Phe	Arg	Gly	Ser	Arg	Ser	Ile	Glu	Asn	Trp	Ile
	75					80					85					90
20	ggg	aat	ctt	aac	ttc	gac	ttg	aaa	gaa	ata	aat	gac	att	tgc	tcc	ggc
	384															
	Gly	Asn	Leu	Asn	Phe	Asp	Leu	Lys	Glu	Ile	Asn	Asp	Ile	Cys	Ser	Gly
					95					100					105	
25	tgc	agg	gga	cat	gac	ggc	ttc	act	tcg	tcc	tgg	agg	tct	gta	gcc	gat
	432															
	Cys	Arg	Gly	His	Asp	Gly	Phe	Thr	Ser	Ser	Trp	Arg	Ser	Val	Ala	Asp
				110					115					120		
30	acg	tta	agg	cag	aag	gtg	gag	gat	gct	gtg	agg	gag	cat	ccc	gac	tat
	480															
	Thr	Leu	Arg	Gln	Lys	Val	Glu	Asp	Ala	Val	Arg	Glu	His	Pro	Asp	Tyr
			125					130					135			
35	cgc	gtg	gtg	ttt	acc	gga	cat	agc	ttg	ggc	ggc	gca	ttg	gca	act	gtt
	528															
	Arg	Val	Val	Phe	Thr	Gly	His	Ser	Leu	Gly	Gly	Ala	Leu	Ala	Thr	Val
		140					145					150				
40	gcc	gga	gca	gac	ctg	cgt	gga	aat	ggg	tat	gat	atc	gac	gtg	ttt	tca
	576															
	Ala	Gly	Ala	Asp	Leu	Arg	Gly	Asn	Gly	Tyr	Asp	Ile	Asp	Val	Phe	Ser
	155					160				165						170
45	tat	ggc	gcc	ccc	cga	gtc	gga	aac	agg	gct	ttt	gca	gaa	ttc	ctg	acc
	624															
	Tyr	Gly	Ala	Pro	Arg	Val	Gly	Asn	Arg	Ala	Phe	Ala	Glu	Phe	Leu	Thr
					175				180						185	
50	gta	cag	acc	ggc	gga	aca	ctc	tac	cgc	att	acc	cac	acc	aat	gat	att
	672															
	Val	Gln	Thr	Gly	Gly	Thr	Leu	Tyr	Arg	Ile	Thr	His	Thr	Asn	Asp	Ile
				190					195					200		
55	gtc	cct	aga	ctc	ccg	ccg	cgc	gaa	ttc	ggc	tac	agc	cat	tct	agc	cca
	720															
	Val	Pro	Arg	Leu	Pro	Pro	Arg	Glu	Phe	Gly	Tyr	Ser	His	Ser	Ser	Pro
			205					210					215			

ES 2 797 725 T3

gag tac tgg atc aaa tct gga acc ctt gtc ccc gtc acc cga aac gat
 768
 5 Glu Tyr Trp Ile Lys Ser Gly Thr Leu Val Pro Val Thr Arg Asn Asp
 220 225 230
 atc gtg aag ata gaa ggc atc gat gcc acc ggc ggc aat aac cag cct
 816
 10 Ile Val Lys Ile Glu Gly Ile Asp Ala Thr Gly Gly Asn Asn Gln Pro
 235 240 245 250
 aac att ccg gat atc cct gcg cac cta tgg tac ttc ggg tta att ggg
 864
 15 Asn Ile Pro Asp Ile Pro Ala His Leu Trp Tyr Phe Gly Leu Ile Gly
 255 260 265
 aca tgt ctt tagtggccgg cgcggctggg tccgactcta gcgagctcga gatct
 918
 20 Thr Cys Leu
 <210> 2
 <211> 291
 <212> PRT
 25 <213> Thermomyces lanuginosus
 <400> 2
 30 Met Arg Ser Ser Leu Val Leu Phe Phe Val Ser Ala Trp Thr Ala Leu
 -20 -15 -10
 Ala Ser Pro Ile Arg Arg Glu Val Ser Gln Asp Leu Phe Asn Gln Phe
 -5 -1 1 5 10
 35 Asn Leu Phe Ala Gln Tyr Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Gly Lys Asn Asn
 15 20 25
 40 Asp Ala Pro Ala Gly Thr Asn Ile Thr Cys Thr Gly Asn Ala Cys Pro
 30 35 40
 45 Glu Val Glu Lys Ala Asp Ala Thr Phe Leu Tyr Ser Phe Glu Asp Ser
 45 50 55
 50 Gly Val Gly Asp Val Thr Gly Phe Leu Ala Leu Asp Asn Thr Asn Lys
 60 65 70
 55 Leu Ile Val Leu Ser Phe Arg Gly Ser Arg Ser Ile Glu Asn Trp Ile
 75 80 85 90
 Gly Asn Leu Asn Phe Asp Leu Lys Glu Ile Asn Asp Ile Cys Ser Gly

ES 2 797 725 T3

	95	100	105
5	Cys Arg Gly His Asp Gly Phe Thr Ser Ser Trp Arg Ser Val Ala Asp 110 115 120		
10	Thr Leu Arg Gln Lys Val Glu Asp Ala Val Arg Glu His Pro Asp Tyr 125 130 135		
15	Arg Val Val Phe Thr Gly His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Val 140 145 150		
20	Ala Gly Ala Asp Leu Arg Gly Asn Gly Tyr Asp Ile Asp Val Phe Ser 155 160 165 170		
25	Tyr Gly Ala Pro Arg Val Gly Asn Arg Ala Phe Ala Glu Phe Leu Thr 175 180 185		
30	Val Gln Thr Gly Gly Thr Leu Tyr Arg Ile Thr His Thr Asn Asp Ile 190 195 200		
35	Val Pro Arg Leu Pro Pro Arg Glu Phe Gly Tyr Ser His Ser Ser Pro 205 210 215		
40	Glu Tyr Trp Ile Lys Ser Gly Thr Leu Val Pro Val Thr Arg Asn Asp 220 225 230		
45	Ile Val Lys Ile Glu Gly Ile Asp Ala Thr Gly Gly Asn Asn Gln Pro 235 240 245 250		
50	Asn Ile Pro Asp Ile Pro Ala His Leu Trp Tyr Phe Gly Leu Ile Gly 255 260 265		
55	Thr Cys Leu		
	<210> 3		
	<211> 1017		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Construcción sintética		
	<220>		
	<221> CDS		

ES 2 797 725 T3

```

<222> (1)..(1017)

<220>
<221> sig
5 <222> (1)..(66)

<220>
<221> sig_peptide
<222> (1)..(66)
10

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

15 <400> 3

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

gcc agt cct ata cgt aga gag gtc tcg cag gat ctg ttt aac cag ttc
96
Ala Ser Pro Ile Arg Arg Glu Val Ser Gln Asp Leu Phe Asn Gln Phe
25      -5      -1 1      5      10

aat ctc ttt gca cag tat tca gct gcc gca tac tgc gga aaa aac aat
144
Asn Leu Phe Ala Gln Tyr Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Gly Lys Asn Asn
30      15      20      25

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

gag gta gag aag gcg gat gca acg ttt ctc tac tcg ttt gaa gac tct
240
Glu Val Glu Lys Ala Asp Ala Thr Phe Leu Tyr Ser Phe Glu Asp Ser
40      45      50      55

gga gtg ggc gat gtc acc ggc ttc ctt gct ctc gac aac acg aac aaa
288
Gly Val Gly Asp Val Thr Gly Phe Leu Ala Leu Asp Asn Thr Asn Lys
45      60      65      70

ttg atc gtc ctc tct ttc cgt ggc tct cgt tcc ata gag aac tgg atc
336
Leu Ile Val Leu Ser Phe Arg Gly Ser Arg Ser Ile Glu Asn Trp Ile
50      75      80      85      90

gcg aat ctt aac ttc tgg ttg aaa aaa ata aat gac att tgc tcc ggc
384
Ala Asn Leu Asn Phe Trp Leu Lys Lys Ile Asn Asp Ile Cys Ser Gly
55      95      100      105

```

ES 2 797 725 T3

tgc agg gga cat gac ggc ttc act tcg tcc tgg agg tct gta gcc gat
 432
 Cys Arg Gly His Asp Gly Phe Thr Ser Ser Trp Arg Ser Val Ala Asp
 110 115 120
 5
 acg tta agg cag aag gtg gag gat gct gtg agg gag cat ccc gac tat
 480
 Thr Leu Arg Gln Lys Val Glu Asp Ala Val Arg Glu His Pro Asp Tyr
 125 130 135
 10
 cgc gtg gtg ttt acc gga cat agc ttg ggt ggt gca ttg gca act gtt
 528
 Arg Val Val Phe Thr Gly His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Val
 140 145 150
 15
 gcc gga gca gac ctg cgt gga aat ggg tat gat atc gac gtg ttt tca
 576
 Ala Gly Ala Asp Leu Arg Gly Asn Gly Tyr Asp Ile Asp Val Phe Ser
 155 160 165 170
 20
 tat ggc gcc ccc cga gtc gga aac agg gct ttt gca gaa ttc ctg acc
 624
 Tyr Gly Ala Pro Arg Val Gly Asn Arg Ala Phe Ala Glu Phe Leu Thr
 175 180 185
 25
 gta cag acc ggc gga aca ctc tac cgc att acc cac acc aat gat att
 672
 Val Gln Thr Gly Gly Thr Leu Tyr Arg Ile Thr His Thr Asn Asp Ile
 190 195 200
 30
 gtc cct cga ctc ccg ccg cgc gaa ttc ggt tac agc cat tct agc cca
 720
 Val Pro Arg Leu Pro Pro Arg Glu Phe Gly Tyr Ser His Ser Ser Pro
 205 210 215
 35
 gag tac tgg atc aaa tct gga acc ctt gtc ccc gtc acc cga aac gat
 768
 Glu Tyr Trp Ile Lys Ser Gly Thr Leu Val Pro Val Thr Arg Asn Asp
 220 225 230
 40
 atc gtg aag ata gaa ggc atc gat gcc acc ggc ggc aat aac cag cct
 816
 Ile Val Lys Ile Glu Gly Ile Asp Ala Thr Gly Gly Asn Asn Gln Pro
 235 240 245 250
 45
 aac att ccg gat atc cct gcg cac ctg tgg tac ttc cag gcg act gac
 864
 Asn Ile Pro Asp Ile Pro Ala His Leu Trp Tyr Phe Gln Ala Thr Asp
 255 260 265
 50
 gcc tgt aac gct ggt ggc ttc tct tgg cga cga tac aga agc gcc gag
 912
 Ala Cys Asn Ala Gly Gly Phe Ser Trp Arg Arg Tyr Arg Ser Ala Glu
 270 275 280
 55
 agc gtc gac aag agg gcc acc atg act gat gcc gag ctt gag aag aag
 960

ES 2 797 725 T3

Ser Val Asp Lys Arg Ala Thr Met Thr Asp Ala Glu Leu Glu Lys Lys
285 290 295

5 ctg aac tct tat gtc cag atg gat aag gag tat gtg aag aat aac cag
1008

Leu Asn Ser Tyr Val Gln Met Asp Lys Glu Tyr Val Lys Asn Asn Gln
300 305 310

10 gcc cgc tct
1017
Ala Arg Ser
315

15 <210> 4
<211> 339
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Construcción sintética

<400> 4

25 Met Arg Ser Ser Leu Val Leu Phe Phe Val Ser Ala Trp Thr Ala Leu
-20 -15 -10

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 797 725 T3

Thr Leu Arg Gln Lys Val Glu Asp Ala Val Arg Glu His Pro Asp Tyr
 125 130 135
 5
 Arg Val Val Phe Thr Gly His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Val
 140 145 150
 10
 Ala Gly Ala Asp Leu Arg Gly Asn Gly Tyr Asp Ile Asp Val Phe Ser
 155 160 165 170
 15 Tyr Gly Ala Pro Arg Val Gly Asn Arg Ala Phe Ala Glu Phe Leu Thr
 175 180 185
 20 Val Gln Thr Gly Gly Thr Leu Tyr Arg Ile Thr His Thr Asn Asp Ile
 190 195 200
 25 Val Pro Arg Leu Pro Pro Arg Glu Phe Gly Tyr Ser His Ser Ser Pro
 205 210 215
 Glu Tyr Trp Ile Lys Ser Gly Thr Leu Val Pro Val Thr Arg Asn Asp
 220 225 230
 30 Ile Val Lys Ile Glu Gly Ile Asp Ala Thr Gly Gly Asn Asn Gln Pro
 235 240 245 250
 35 Asn Ile Pro Asp Ile Pro Ala His Leu Trp Tyr Phe Gln Ala Thr Asp
 255 260 265
 40 Ala Cys Asn Ala Gly Gly Phe Ser Trp Arg Arg Tyr Arg Ser Ala Glu
 270 275 280
 45 Ser Val Asp Lys Arg Ala Thr Met Thr Asp Ala Glu Leu Glu Lys Lys
 285 290 295
 Leu Asn Ser Tyr Val Gln Met Asp Lys Glu Tyr Val Lys Asn Asn Gln
 300 305 310
 50 Ala Arg Ser
 315
 55 <210> 5
 <211> 878
 <212> ADN

ES 2 797 725 T3

```

<213>  Secuencia artificial

<220>
<223>  Construcción sintética
5

<220>
<221>  CDS
<222>  (1)..(873)
10

<220>
<221>  sig_peptide
<222>  (1)..(66)

15

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

<400>  5
20
atg agg agc tcc ctt gtg ctg ttc ttt gtc tct gcg tgg acg gcc ttg
48
Met Arg Ser Ser Leu Val Leu Phe Phe Val Ser Ala Trp Thr Ala Leu
      -20                -15                -10

25
gcc agt cct ata cgt aga gag gtc tcg cag gat ctg ttt aac cag ttc
96
Ala Ser Pro Ile Arg Arg Glu Val Ser Gln Asp Leu Phe Asn Gln Phe
   -5                -1  1                5                10

30
aat ctc ttt gca cag tat tct gca gcc gca tac tgc gga aaa aac aat
144
Asn Leu Phe Ala Gln Tyr Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Gly Lys Asn Asn
      15                20                25

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

40
gag gta gag aag gcg gat gca acg ttt ctc tac tcg ttt gaa gac tct
240
Glu Val Glu Lys Ala Asp Ala Thr Phe Leu Tyr Ser Phe Glu Asp Ser
      45                50                55

45
gga gtg ggc gat gtc acc ggc ttc ctt gct ctc gac aac acg aac aaa
288
Gly Val Gly Asp Val Thr Gly Phe Leu Ala Leu Asp Asn Thr Asn Lys
      60                65                70

50
ttg atc gtc ctc tct ttc cgt ggc tct cgt tcc ata gag aac tgg atc
336
Leu Ile Val Leu Ser Phe Arg Gly Ser Arg Ser Ile Glu Asn Trp Ile
      75                80                85                90

55
ggg aat ctt aac ttc gag ttg aaa gaa ata aat gac att tgc tcc ggc
384

```

ES 2 797 725 T3

	Gly	Asn	Leu	Asn	Phe	Glu	Leu	Lys	Glu	Ile	Asn	Asp	Ile	Cys	Ser	Gly	
					95					100					105		
5	tgc	agg	gga	cat	gcc	ggc	ttc	act	tcg	tcc	tgg	agg	tct	gta	gcc	gat	
	432																
	Cys	Arg	Gly	His	Ala	Gly	Phe	Thr	Ser	Ser	Trp	Arg	Ser	Val	Ala	Asp	
				110					115					120			
10	acg	tta	agg	cag	aag	gtg	gag	gat	gct	gtg	agg	gag	cat	ccc	gac	tat	
	480																
	Thr	Leu	Arg	Gln	Lys	Val	Glu	Asp	Ala	Val	Arg	Glu	His	Pro	Asp	Tyr	
			125					130					135				
15	cgc	gtg	gtg	ttt	acc	gga	cat	agc	ttg	ggc	ggc	gca	ttg	gca	act	gtt	
	528																
	Arg	Val	Val	Phe	Thr	Gly	His	Ser	Leu	Gly	Gly	Ala	Leu	Ala	Thr	Val	
		140					145					150					
20	gcc	gga	gca	gac	ctg	cgt	gga	aat	aag	tat	gat	atc	gac	gtg	ttt	tca	
	576																
	Ala	Gly	Ala	Asp	Leu	Arg	Gly	Asn	Lys	Tyr	Asp	Ile	Asp	Val	Phe	Ser	
	155					160					165					170	
25	tat	ggc	gcc	ccc	cga	gtc	gga	aac	agg	gct	ttt	gca	gaa	ttc	ctg	acc	
	624																
	Tyr	Gly	Ala	Pro	Arg	Val	Gly	Asn	Arg	Ala	Phe	Ala	Glu	Phe	Leu	Thr	
					175					180					185		
30	gta	cag	acc	ggc	gga	aca	ctc	tac	cgc	att	acc	cac	acc	aat	gat	att	
	672																
	Val	Gln	Thr	Gly	Gly	Thr	Leu	Tyr	Arg	Ile	Thr	His	Thr	Asn	Asp	Ile	
				190					195					200			
35	gtc	cct	aga	ctc	ccg	ccg	cgc	gaa	ttc	ggc	tac	agc	cat	tct	agc	cca	
	720																
	Val	Pro	Arg	Leu	Pro	Pro	Arg	Glu	Phe	Gly	Tyr	Ser	His	Ser	Ser	Pro	
			205					210					215				
40	gaa	tac	tgg	atc	aaa	tct	gga	acc	ctt	gtc	ccc	gtc	cgg	cga	cga	gac	
	768																
	Glu	Tyr	Trp	Ile	Lys	Ser	Gly	Thr	Leu	Val	Pro	Val	Arg	Arg	Arg	Asp	
		220					225					230					
45	atc	gtg	aag	ata	gaa	ggc	atc	gat	gcc	acc	ggc	ggc	aat	aac	cag	cct	
	816																
	Ile	Val	Lys	Ile	Glu	Gly	Ile	Asp	Ala	Thr	Gly	Gly	Asn	Asn	Gln	Pro	
	235					240					245					250	
50	aac	att	ccg	tcc	atc	acc	gcg	cac	cta	tgg	tac	ttc	ggg	tta	att	ggg	
	864																
	Asn	Ile	Pro	Ser	Ile	Thr	Ala	His	Leu	Trp	Tyr	Phe	Gly	Leu	Ile	Gly	
					255					260					265		
55	aca	tgt	ctt	tagtg													
	878																
	Thr	Cys	Leu														

ES 2 797 725 T3

<210> 6
 <211> 291
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Construcción sintética
 10 <400> 6

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

ES 2 797 725 T3

	155		160		165		170									
5	Tyr	Gly	Ala	Pro	Arg	Val	Gly	Asn	Arg	Ala	Phe	Ala	Glu	Phe	Leu	Thr
					175					180					185	
10	Val	Gln	Thr	Gly	Gly	Thr	Leu	Tyr	Arg	Ile	Thr	His	Thr	Asn	Asp	Ile
				190					195					200		
15	Val	Pro	Arg	Leu	Pro	Pro	Arg	Glu	Phe	Gly	Tyr	Ser	His	Ser	Ser	Pro
			205					210					215			
20	Glu	Tyr	Trp	Ile	Lys	Ser	Gly	Thr	Leu	Val	Pro	Val	Arg	Arg	Arg	Asp
	220						225					230				
25	Ile	Val	Lys	Ile	Glu	Gly	Ile	Asp	Ala	Thr	Gly	Gly	Asn	Asn	Gln	Pro
	235					240					245					250
30	Asn	Ile	Pro	Ser	Ile	Thr	Ala	His	Leu	Trp	Tyr	Phe	Gly	Leu	Ile	Gly
					255					260					265	
	Thr	Cys	Leu													

REIVINDICACIONES

1. Variante de una lipasa original, variante que comprende sustituciones en las posiciones correspondientes a E1C y N233C del polipéptido maduro mostrado como los aminoácidos numerados del 1 al 269 de la SEQ ID NO: 2, tiene actividad lipásica y tiene al menos un 80% pero menos del 100% de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la lipasa original mostrado como los aminoácidos numerados del 1 al 269 de la SEQ ID NO: 2, donde la variante tiene una estabilidad mejorada en relación con la lipasa original.
2. Variante según la reivindicación 1, donde el polipéptido tiene al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98% o al menos un 99%, pero menos del 100% de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 2.
3. Variante según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, que comprende además una o más (por ejemplo, varias) sustituciones en las posiciones correspondientes a las posiciones: 2, 4, 8, 11, 15, 27, 33, 38, 43, 48, 51, 54, 56, 57, 58, 60, 69, 71, 83, 86, 91, 92, 94, 96, 97, 98, 99, 101, 111, 123, 150, 152, 163, 176, 179, 187, 188, 189, 198, 199, 200, 210, 216, 220, 224, 225, 227, 228, 229, 231, 236, 238, 239, 246, 249, 254, 255, 256, 257, 260, 263, 264, 265, 266, 267, 269 de la SEQ ID NO: 2.
4. Variante según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la sustitución corresponde a V2K, Q4R, Q4V, N8R, N11R, Q15C, D27G, D27R, N33K, N33Q, G38A, E43C, D48C, F51V, S54T, E56K, D57G, S58A, V60K, V60S, L69R, N71C, S83T, I86V, G91A, G91N, G91Q, N92D, N94K, N94R, D96E, D96G, D96L, D96W, L97M, K98E, K98I, K98Q, E99K, E99N, N101D, N101S, D111A, T123V, A150G, A152G, G163K, V176L, R179L, V187Y, V187W, Q188R, T189Y, T189W, H198S, T199R, N200R, E210K, E210Q, S216P, Y220F, S224R, G225R, L227G, L227R, V228R, P229R, T231R, V236R, I238C, E239C, G246C, Q249R, D254S, I255G, P256K, P256T, P256V, A257I, A257V, W260C, G263Q, L264A, I265T, G266D, T267A, L269N, L269V de la SEQ ID NO: 2.
5. Variante según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende o consiste en un conjunto de sustituciones en las posiciones correspondientes a la SEQ ID NO: 2 seleccionadas de:
- a. E1C D27R N33K G38A F51V S54T E56K D96E K98I D111A G163K N233C D254S P256T;
 - b. E1C V2K D27G N33K G38A F51V D96E D111A G163K N233C D254S P256T;
 - c. E1C V2K D27R N33K G38A F51V D96E D111A G163K Q188R N233C D254S P256T;
 - d. E1C D27R G38A G91A N92D D96L K98Q D111A G163K N233C D254S P256T;
 - e. E1C D27R G38A G91N N94R D96E D111A G163K S216P L227G N233C D254S P256T;
 - f. E1C T231R N233C;
 - g. E1C T231R N233C Q249R D254S;
 - h. E1C G225R T231R N233C;
 - i. E1C Q15C E43C T231R N233C;
 - j. E1C L227R T231R N233C;
 - k. E1C P229R T231R N233C;
 - l. E1C L227G T231R N233C;
 - m. E1C E99N N101S T231R N233C;
 - n. E1C L227G T231R N233C D254S;
 - o. E1C E210K L227G T231R N233C;
 - p. E1C D27R N33K G38A F51V D96E K98E N101D D111A G163K H198S E210K Y220F T231R N233C D254S P256T;
 - q. E1C D27R N33K G38A F51V S54T E56K D57G L69R D96E K98I D111A A152G G163K T231R N233C D254S P256T;
 - r. E1C V187Y T189Y L227G T231R N233C;
 - s. E1C D27R N33K G38A F51V D96E K98E N101D D111A T123V G163K H198S E210K Y220F T231R N233C D254S P256T;
 - t. E1C V60K I86V A150G E210K L227G T231R N233C P256K;
 - u. E1C V187W T189W L227G T231R N233C;
 - v. E1C N94K D96L L227G T231R N233C;
 - w. E1C G91A N92D D96L K98Q L227G T231R N233C;
 - x. E1C N8R L227G T231R N233C;
 - y. E1C L227G V228R T231R N233C;
 - z. E1C Q4R L227G T231R N233C;
 - aa. E1C N11R L227G T231R N233C;
 - bb. E1C S224R L227G T231R N233C;
 - cc. E1C L227G T231R N233C V236R;
 - dd. E1C N200R L227G T231R N233C;
 - ee. E1C T199R L227G T231R N233C;
 - ff. E1C V2K D27R N33K G38A F51V D96E D111A G163K T231R N233C D254S P256T;

- gg. E1C D27R N33K G38A F51V S54T E56K D96E K98I D111A G163K T231R N233C D254S P256T;
 hh. E1C D27R N33K G38A F51V D96E K98I D111A G163K H198S Y220F T231R N233C D254S P256T;
 ii. E1C D27R N33K G38A F51V E56K L69R D96E K98E D111A G163K R179L T231R N233C D254S P256T A257I;
 5 jj. E1C V2K D27R N33K G38A F51V D96E D111A G163K T231R N233C D254S P256T A257I;
 kk. E1C D27R N33K G38A F51V S54T E56K D96E K98I D111A G163K T231R N233C D254S P256T A257I;
 ll. E1C D27R N33K G38A F51V S54T E56K D57G D96E K98I D111A G163K T231R N233C D254S I255G P256T A257V L269V;
 mm. E1C V2K D27R N33K G38A F51V L69R D96E K98E D111A G163K V176L E210K L227G T231R N233C
 10 D254S P256T;
 nn. E1C D27R N33K G38A F51V D96E K98E N101D D111A T123V G163K H198S E210K Y220F T231R N233C D254S P256T;
 oo. E1C D27R N33K G38A F51V D96E K98E N101D D111A T123V G163K H198S E210K Y220F T231R N233C D254S P256T;
 15 pp. E1C D27R G38A F51V L69R D96E K98E D111A G163K E210K T231R N233C D254S P256T; y
 qq. E1C N11R D27R N33K D48C F51V L69R N71C E87Q K98E N101R T143A E210K G225R L227G P229R T231R N233C Q249R P250R D254S I255G P256K.
6. Variante según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde la estabilidad se selecciona del grupo que consiste en termoestabilidad, estabilidad en presencia de enzimas proteolíticas, estabilidad en presencia de tensoactivo, estabilidad en composiciones detergentes, estabilidad bajo condiciones de almacenamiento.
 20
7. Composición que comprende la variante según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 y un tensoactivo o sistema tensoactivo donde el tensoactivo se selecciona de tensoactivos no iónicos, tensoactivos aniónicos, tensoactivos catiónicos, tensoactivos anfólicos, tensoactivos zwitteriónicos, tensoactivos no iónicos semipolares y sus mezclas derivadas.
8. Método para la fabricación de una composición que comprende un paso de añadir la variante según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 a la composición.
 25
9. Polinucleótido que codifica la variante según cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
10. Constructo de ácido nucleico que comprende el polinucleótido según la reivindicación 9.
11. Vector de expresión que comprende el polinucleótido según la reivindicación 9.
12. Célula huésped que comprende el polinucleótido según la reivindicación 9, el constructo de ácido nucleico según la reivindicación 10 o el vector de expresión según la reivindicación 11.
 30
13. Método para producir una variante de lipasa, que comprende: (a) cultivar la célula huésped de la reivindicación 12 bajo condiciones adecuadas para la expresión de la variante; y (b) recuperar la variante.
14. Método para obtener una variante de lipasa, que comprende la introducción en una lipasa original de una sustitución en las posiciones correspondientes a E1C y N233C del polipéptido maduro mostrado como los aminoácidos numerados del 1 al 269 de la SEQ ID NO: 2, donde la variante tiene actividad lipásica y tiene al menos un 80% pero menos del 100% de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la lipasa original mostrado como los aminoácidos numerados del 1 al 269 de la SEQ ID NO: 2; donde la variante tiene una estabilidad mejorada en relación con la lipasa original; y la recuperación de la variante.
 35