

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 014 600**

51 Int. Cl.:

C11D 3/386 (2006.01)

C12N 9/54 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.12.2015 PCT/EP2015/078588**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.06.2016 WO16087619**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.12.2015 E 15804523 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2025 EP 3227425**

54 Título: **Composiciones de limpieza líquidas que comprenden variantes de proteasa**

30 Prioridad:

04.12.2014 EP 14196296

12.11.2015 EP 15194218

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.04.2025

73 Titular/es:

NOVOZYMES A/S (100.00%)

Krogshoejvej 36

2880 Bagsvaerd, DK

72 Inventor/es:

HANSEN, PETER KAMP;

FRIIS, ESBEN PETER;

BORCHERT, TORBEN VEDEL;

CHRISTENSEN, LARS LEHMANN HYLLING;

NIELSEN, JENS ERIK y

SILOW, MARIA BERGGAARD

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 3 014 600 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 de limpieza líquidas que comprenden variantes de proteasa

Referencia a una lista de secuencias

Esta solicitud contiene una Lista de Secuencias en forma legible informáticamente.

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

La presente invención se refiere a composiciones que comprenden variantes de proteasa adecuadas para el uso, p. ej., composiciones de limpieza o detergentes de pH alto, tales como composiciones detergentes para lavar la ropa y composiciones para lavar vajillas, incluyendo composiciones para lavavajillas automáticos.

10 Descripción de la técnica relacionada

En la industria de los detergentes, durante muchas décadas se han incluido enzimas en las formulaciones de lavado. Las enzimas usadas en estas formulaciones comprenden amilasas, celulasas, lipasas, manosidasas y proteasas, así como otras enzimas o mezclas de las mismas. Comercialmente, las enzimas más importantes son las proteasas. Muchas de las proteasas usadas tradicionalmente en los procedimientos de limpieza son proteasas alcalinas que tienen habitualmente un pH óptimo de alrededor de 9, por lo que son adecuadas para detergentes bastante alcalinos. Sin embargo, algunos detergentes líquidos particulares tienen un pH superior a 10 y estos detergentes no se han considerado previamente adecuados para enzimas debido a las condiciones muy duras y la baja estabilidad al almacenamiento de las enzimas resultante en estos detergentes. Además, las enzimas tienden a ser menos estables en detergentes líquidos, en particular cuando el contenido de agua es elevado.

20 Se ha descrito un número de variantes de proteasa útiles, muchas de las cuales tienen actividad, estabilidad y solubilidad mejoradas en diferentes detergentes.

Sin embargo, estas variantes no son adecuadas para detergentes de pH muy alto, ya que el entorno alcalino de estos detergentes haría que las enzimas se desintegraran y, así, reducirían su actividad después de un tiempo muy corto.

25 El documento US 2013/123162 se refiere a productos de consumo que comprenden proteasas, particularmente proteasas de agua fría y procedimientos para elaborar y usar estos productos.

El documento WO 2017/072117 se refiere a productos textiles y para el cuidado del hogar que comprenden una o más proteasas de agua fría y a procedimientos para elaborar y usar estos productos.

El documento WO 2016/001449 se refiere a variantes de sutilasa que exhiben un incremento de estabilidad y preferiblemente un rendimiento de lavado del mismo nivel o mejorado.

30 Sumario de la invención

La presente invención se refiere a variantes de proteasa estables en condiciones alcalinas y adecuadas para el uso en composiciones detergentes y de limpieza líquidas de pH alto que comprenden estas variantes.

35 En un primer aspecto, la presente invención se refiere a una composición de limpieza líquida que tiene pH 10 o superior, que comprende al menos 0,01% en peso de proteasa, donde la proteasa es una variante de una proteasa progenitora y donde la variante de proteasa tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 60% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y donde dicha variante de proteasa se caracteriza por tener una actividad residual al menos 10% superior que la proteasa progenitora cuando se mide después de 4 horas a 40°C en detergente líquido con pH 10 y/o tener un rendimiento de lavado mejorado o del mismo nivel en comparación con subtilisina 309 (SEQ ID NO: 2) sobre manchas de sangre/leche/tinta a 25°C.

40 En un segundo aspecto, la presente invención se refiere además a una composición de limpieza líquida que comprende:

(a) de 0% a 20% en peso, preferiblemente de 0,1% a 2,5% en peso, de un tensioactivo detergente;

(b) de 0,1% a 5% en peso de una variante de proteasa; y

45 (c1) de 20% a 95% en peso, preferiblemente de 40% a 95% en peso, más preferiblemente de aproximadamente 70% a aproximadamente 90% en peso, de agua; y/o

(c2) de 1% a 30% en peso de un sistema tamponador alcalino que comprende un silicato de metal alcalino o un hidróxido de metal alcalino o una mezcla de los mismos, para proporcionar un pH de aproximadamente 10 a 13,5, preferiblemente el pH es de aproximadamente 11 a 13,5.

Definiciones

El término "variante alélica" significa cualquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupan el mismo locus cromosómico. La variación alélica surge naturalmente a través de mutaciones y puede dar como resultado polimorfismo dentro de las poblaciones. Las mutaciones genéticas pueden ser sinónimas (sin cambios en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos alteradas. Una variante alélica de un polipéptido es un polipéptido codificado por una variante alélica de un gen.

El término "ADNc" significa una molécula de ADN que puede prepararse mediante 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 intrónicas 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 etapas, incluyendo el empalme, antes de aparecer como ARNm maduro empalmado.

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

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 natural (es decir, procedente del mismo gen) o extraña (es decir, procedente de un gen diferente) al polinucleótido que codifica la variante o naturales o extrañas entre sí. Estas secuencias de control incluyen, entre otras, un líder, una secuencia de poliadenilación, una secuencia propeptídica, un promotor, una secuencia de péptido señalizador y un terminador de la transcripción. Como mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor y señales de parada de la transcripción y la traducción. Las secuencias de control pueden estar provistas de conectores con el fin de introducir sitios de restricción específicos que faciliten la ligación de las secuencias de control con la región codificante del polinucleótido que codifica una variante.

El término "componente del detergente" se define en el presente documento para referirse a los tipos de productos químicos que pueden usarse en composiciones de limpieza tales como composiciones detergentes. Ejemplos de componentes de detergente son tensioactivos, hidrótrofos, adyuvantes, coadyuvantes, queladores o agentes quelantes, sistemas blanqueadores o componentes blanqueadores, polímeros, agentes matizadores de tejidos, acondicionadores de tejidos, potenciadores de espuma, supresores de agua jabonosa, dispersantes, inhibidores de la transferencia de tintes, agentes blanqueantes fluorescentes, perfumes, abrillantadores ópticos, bactericidas, fungicidas, agentes de suspensión de manchas, polímeros de liberación de manchas, agentes antirredepositantes, inhibidores o estabilizadores de enzimas, activadores de enzimas, antioxidantes y solubilizantes. La composición detergente puede comprender uno o más de cualquier tipo de componente de detergente.

El término "composición de limpieza" incluye "composición detergente" e incluye, a menos que se indique lo contrario, todas las formas de composiciones de limpieza tales como una barra, un comprimido homogéneo, un comprimido que tiene dos o más capas, una bolsa que tiene uno o más compartimentos, un polvo regular o compacto, un gel, un granulado, composiciones líquidas (p. ej. un líquido regular, compacto o concentrado), en pasta, en polvo, en aerosol o en comprimidos, incluyendo líquidos extrafuertes (HDL), detergentes líquidos para tejidos finos, detergentes para lavar la ropa líquidos y/o sólidos y detergentes para tejidos finos; formulaciones de limpieza de superficies duras para, p. ej., encimeras y ventanas de vidrio, madera, cerámica y metal; limpiadores de alfombras; limpiadores de hornos; ambientadores para tejidos; suavizantes para tejidos; quitamanchas de aplicación previa para materiales textiles y lavado de ropa, así como detergentes para lavado de vajillas tales como agentes para lavado de vajillas a mano, agentes para lavado de vajillas de uso ligero, agentes para lavado de vajillas a máquina; agentes de lavado de uso general o extrafuertes, agentes de lavado de uso general en forma líquida, de gel o de pasta, agentes de limpieza y desinfección líquidos, incluyendo los tipos de jabón de manos antibacteriano, barras limpiadoras, colutorios, limpiadores de dentaduras postizas, champús para automóviles o alfombras, limpiadores de baños; champús y enjuagues para el cabello; geles de ducha, baños de espuma; limpiadores de metales; así como auxiliares de limpieza tales como aditivos blanqueadores y del tipo "de barra" o pretratamiento. Las bolsas se pueden configurar como de uno o varios compartimentos. Puede tener cualquier forma, conformación y material que sea adecuado para contener la composición, p. ej. sin permitir la liberación de la composición desde la bolsa antes del contacto con el agua. La bolsa está hecha de una película soluble en agua que encierra un volumen interno. Dicho volumen interno se puede dividir en compartimentos de la bolsa. Las películas preferidas son materiales poliméricos, preferiblemente polímeros que se forman como una película o lámina. Los polímeros, copolímeros o derivados de los mismos preferidos son poliácridatos seleccionados y copolímeros de acrilato solubles en agua, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, dextrina sódica, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, maltodextrina, polimetacrilatos, lo más preferiblemente copolímeros de poli(alcohol vinílico) e hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC). Preferiblemente, el nivel de polímero en la película, por ejemplo PVA, es al menos aproximadamente 60%. El peso molecular promedio preferido será típicamente de aproximadamente 20.000 a aproximadamente 150.000. Las películas también pueden ser de composiciones mixtas que comprenden combinaciones de polímeros hidrolíticamente degradables e hidrosolubles, tales como polilactida y poli(alcohol vinílico) (conocido con la referencia comercial M8630 según se vende por MonoSol

LLC, Indiana, EE.UU.) más plastificantes como glicerol, etilenglicerol, propilenglicerol, sorbitol y mezclas de los mismos. Las bolsas pueden comprender una composición sólida de limpieza de la ropa o componentes parciales y/o una composición de limpieza líquida o componentes parciales separados por la película soluble en agua. El compartimento para componentes líquidos puede tener una composición diferente a la de los compartimentos que contienen sólidos: US2009/0011970 A1.

Los ingredientes (o componentes) del detergente pueden estar separados físicamente entre sí por compartimentos en bolsas solubles en agua o en diferentes capas de comprimidos. De ese modo, se puede evitar la interacción negativa durante el almacenamiento entre componentes. Diferentes perfiles de disolución de cada uno de los compartimentos también pueden dar lugar a una disolución retardada de componentes seleccionados en la solución de lavado.

La composición de limpieza (p. ej. composición de limpieza líquida) que se describe en el presente documento es adecuada para el uso en procedimientos de limpieza tales como lavado de ropa o limpieza de superficies duras incluyendo lavado de vajillas y limpieza industrial. Un procedimiento de lavado de ropa ejemplar se puede seleccionar de un grupo que consiste en: un procedimiento de lavado de ropa residencial, un procedimiento de lavado de ropa industrial y un procedimiento de lavado de ropa institucional.

Además de contener una variante de proteasa de la invención, la formulación detergente puede contener una o más enzimas adicionales (tales como perhidrolasas, amilasas, catalasas, celulasas (p. ej., endoglucanasas), cutinasas, haloperoxigenasas, lipasas, mananasas, pectinasas, pectina liasas, peroxidases, proteasas, ADNasas, xantanases y xiloglucanasas, o cualquier mezcla de las mismas), y/o componentes tales como tensioactivos, adyuvantes, queladores o agentes quelantes, un sistema de blanqueo o componentes de blanqueo, polímeros, acondicionadores para tejidos, potenciadores de espuma, supresores de agua jabonosa, colorantes, perfumes, inhibidores del pardeamiento, abrillantadores ópticos, bactericidas, fungicidas, agentes de suspensión de manchas, agentes anticorrosivos, inhibidores o estabilizadores de enzimas, activadores de enzimas, una transferasa o transferasas, enzimas hidrolíticas, oxidorreductasas, agentes azulantes y tintes fluorescentes, antioxidantes y solubilizantes.

El término "lavado de vajillas" se refiere a todas las formas de lavar la vajilla, p. ej., lavado de vajillas a mano o automático. El lavado de vajillas incluye, entre otros, la limpieza de todo tipo de vajilla, tal como platos, tazas, vasos, tazones, todo tipo de cubiertos tales como cucharas, cuchillos, tenedores y utensilios para servir, así como cerámica, plásticos tales como melamina, metales, porcelana, vidrio y materiales acrílicos.

El término "composición para lavado de vajillas" se refiere a todas las formas de composiciones para limpiar superficies duras. La presente invención no se limita a ningún tipo particular de composición para lavado de vajillas ni a ningún detergente particular.

El término "expresión" incluye cualquier etapa involucrada en la producción de una variante incluyendo, entre otros, transcripción, modificación postranscripcional, traducción, modificación postraducciona y secreción.

El término "vector de expresión" significa una molécula de ADN lineal o circular que comprende un polinucleótido que codifica una variante y está operativamente ligado a secuencias de control que proporcionan su expresión.

El término "limpieza de superficies duras" se define en el presente documento como limpieza de superficies duras donde las superficies duras pueden incluir suelos, mesas, paredes, techos, etc. así como superficies de objetos duros tales como automóviles (lavado de automóviles) y platos (lavavajillas). El lavado de vajillas incluye, entre otros, la limpieza de platos, tazas, vasos, tazones y cubiertos como cucharas, cuchillos, tenedores, utensilios para servir, cerámica, plásticos tales como melamina, metales, porcelana, vidrio y materiales acrílicos.

El término "célula anfitriona" significa cualquier tipo de célula que sea sensible a la transformación, transfección, transducción o similares con una construcción de ácido nucleico o un vector de expresión que comprende un polinucleótido de la presente invención. El término "célula anfitriona" abarca cualquier descendencia de una célula progenitora que no sea idéntica a la célula progenitora debido a mutaciones que se producen durante la replicación.

El término "propiedad mejorada" significa una característica asociada con una variante de proteasa que está mejorada en comparación con la proteasa progenitora. Estas propiedades mejoradas incluyen, entre otras, rendimiento de lavado, actividad de proteasa, perfil de actividad térmica, termoestabilidad, perfil de actividad de pH, estabilidad al pH, especificidad para sustratos/cofactores, propiedades superficiales mejoradas, especificidad para sustratos, especificidad para productos, incremento de la estabilidad, mejora de la estabilidad en condiciones de almacenamiento y estabilidad química.

El término "estabilidad" incluye estabilidad al almacenamiento y estabilidad durante el uso, p. ej. durante un procedimiento de lavado, y refleja la estabilidad de la variante de proteasa según la invención en función del tiempo, p. ej. cuánta actividad se retiene cuando la variante de proteasa se mantiene en solución, en particular en una solución detergente. La estabilidad está influenciada por muchos factores, p. ej. pH, temperatura, composición detergente, p. ej. cantidad de adyuvante, tensioactivos, etc. La estabilidad de la proteasa se puede medir usando el ensayo descrito en el ejemplo 3. El término "estabilidad mejorada" o "estabilidad incrementada" se define en el presente documento como una proteasa variante que presenta una estabilidad incrementada en soluciones, con relación a la estabilidad de la proteasa progenitora, p. ej. con relación a SEQ ID NO: 2.

En un aspecto particular de la invención, la estabilidad mejorada es una estabilidad mejorada en un detergente líquido que tiene un pH de 10 o superior. El término "estabilidad del detergente" o "estabilidad del detergente mejorada" es en particular una estabilidad mejorada de la actividad de proteasa cuando una variante de proteasa de la presente invención se mezcla en una formulación detergente líquida que tiene un pH de 10 o superior, y a continuación se almacena a una temperatura entre 15 y 50°C, p. ej., 20°C, 30°C o 40°C.

El término "rendimiento de lavado mejorado" se define en el presente documento como una variante de proteasa según la invención que presenta un rendimiento de lavado mejorado con relación al rendimiento de lavado de la proteasa progenitora, p. ej., por una eliminación incrementada de la suciedad. El término "rendimiento de lavado" incluye rendimiento de lavado en el lavado de ropa, pero también en el lavado de vajillas. El rendimiento de lavado se puede cuantificar según se describe en la definición de "rendimiento de lavado" en el presente documento.

El término "aislado" significa una sustancia en una forma o ambiente que no se presenta en la naturaleza. Ejemplos no limitativos de sustancias aisladas incluyen (1) cualquier sustancia no natural, (2) cualquier sustancia incluyendo, entre otros, cualquier enzima, variante, ácido nucleico, proteína, péptido o cofactor, que se elimina al menos parcialmente de uno o más o todos los constituyentes naturales con los que está asociada en la naturaleza; (3) cualquier sustancia modificada por la mano del hombre en relación con esa sustancia que se encuentra en la naturaleza; o (4) cualquier sustancia modificada incrementando la cantidad de la sustancia en relación con otros componentes con los que está asociada naturalmente (p. ej., múltiples copias de un gen que codifica la sustancia; uso de un promotor más fuerte que el promotor asociado naturalmente con el gen que codifica la sustancia). Una sustancia aislada puede estar presente en una muestra de caldo de fermentación.

El término "lavado de ropa" se refiere tanto a un lavado de ropa doméstico como a un lavado de ropa industrial y significa un procedimiento de tratamiento de materiales textiles y/o tejidos con una solución que contiene una composición detergente de la presente invención. El procedimiento de lavado de ropa se puede llevar a cabo, p. ej., usando una lavadora doméstica o industrial o se puede llevar a cabo a mano.

El término "polipéptido maduro" significa un polipéptido en su forma final después de la traducción y cualquier modificación postraduccional, tal como procesamiento N-terminal, truncamiento C-terminal, glucosilación, fosforilación, activación autocatalítica, etc. En un aspecto, el polipéptido maduro es los aminoácidos 1 a 269 de SEQ ID NO: 2 y 1 a 275 de SEQ ID NO: 1. Se sabe en la técnica que una célula anfitriona puede producir una mezcla de dos o más polipéptidos maduros diferentes (es decir, con un aminoácido C-terminal y/o N-terminal diferente) expresados por el mismo polinucleótido.

El término "secuencia codificante del polipéptido maduro" significa un polinucleótido que codifica un polipéptido maduro que tiene actividad de proteasa.

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

El término "ligado operativamente" significa una configuración en la que una secuencia de control está situada en una posición apropiada con respecto a la secuencia codificante de un polinucleótido de manera que la secuencia de control dirija la expresión de la secuencia codificante.

El término "progenitor" significa una proteasa en la que se ocasiona una alteración para producir las variantes de enzima de la presente invención. Se entenderá que en el presente contexto la expresión "que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica" se refiere a 100% de identidad de secuencia. En una realización particular el progenitor es una proteasa con al menos 60% de identidad, tal como al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 81%, al menos 82%, al menos 83%, al menos 84%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o 100% de identidad con un polipéptido de SEQ ID NO: 1 o 2.

El término "proteasa" se define en el presente documento como una enzima que hidroliza enlaces peptídicos. Incluye cualquier enzima perteneciente al grupo de enzimas EC 3.4 (incluyendo cada una de las trece subclases del mismo). El número EC se refiere a Enzyme Nomenclature 1992 de NC-IUBMB, Academic Press, San Diego, California, incluyendo los suplementos 1-5 publicados en *Eur. J. Biochem* 1223: 1-5 (1994); *Eur. J. Biochem* 232: 1-6 (1995); *Eur. J. Biochem* 237: 1-5 (1996); *Eur. J. Biochem* 250: 1-6 (1997); y *Eur. J. Biochem* 264: 610-650 (1999); respectivamente.

Las proteasas más ampliamente usadas en la industria de los detergentes, tales como el lavado de ropa y vajillas, son las serina proteasas o serina peptidasas que son un subgrupo de proteasas caracterizadas por tener una serina en el sitio activo, que forma un aducto covalente con el sustrato. Además, las subtilasas (y las serina proteasas) se caracterizan por tener dos residuos de aminoácido en el sitio activo aparte de la serina, a saber un residuo de histidina y un residuo de ácido aspártico. Subtilasa se refiere a un subgrupo de serina proteasa según Siezen y cols., 1991, *Protein Engng.* 4: 719-737 y Siezen y cols., 1997, *Protein Science* 6: 501-523. Las subtilasas se pueden dividir en 6 subdivisiones, es decir, la familia de las subtilisinas, la familia de las termitasas, la familia de las proteinasas K, la familia de las peptidasas lantibióticas, la familia de las kexinas y la familia de las pirolisinas. El término "actividad de proteasa" significa una actividad proteolítica (EC 3.4). Las proteasas utilizables en detergentes son principalmente

endopeptidasas (EC 3.4.21). Existen varios tipos de actividad de proteasa: Los tres tipos de actividad principales son: tipo tripsina, donde existe una escisión de sustratos amidados después de Arg o Lys en P1, tipo quimotripsina, donde se produce una escisión después de uno de los aminoácidos hidrófobos en P1, y tipo elastasa, con escisión después de una Ala en P1. Para los fines de la presente invención, la actividad de proteasa se determina según el ensayo de actividad de Suc-AAPF-pNA, según se describe en la sección Materiales y métodos posteriormente. En un aspecto, las variantes de proteasa de la presente invención tienen al menos 20%, p. ej., al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 100% de la actividad enzimática del polipéptido maduro de la enzima progenitora. En un aspecto particular, las variantes de proteasa de la presente invención tienen al menos 20%, p. ej., al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 100% de la actividad enzimática de un polipéptido de SEQ ID NO: 2.

El término "actividad de proteasa" significa una actividad proteolítica (EC 3.4). Las proteasas de la invención son endopeptidasas (EC 3.4.21). Existen varios tipos de actividad de proteasa: Los tres tipos de actividad principales son: tipo tripsina, donde existe una escisión de sustratos amidados después de Arg o Lys en P1, tipo quimotripsina, donde se produce una escisión después de uno de los aminoácidos hidrófobos en P1, y tipo elastasa, con escisión después de una Ala en P1. Para los fines de la presente invención, la actividad de proteasa se determina según el procedimiento descrito en "Materiales y métodos" posteriormente. Las variantes de proteasa de la presente invención tienen preferiblemente al menos 20%, p. ej., al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95% y al menos 100% de la actividad de proteasa de un polipéptido de SEQ ID NO: 2.

El término "actividad residual" significa en este contexto la actividad de proteasa que queda o restante después del almacenamiento y en particular después del almacenamiento en un detergente líquido. Cuando se mide la actividad residual, la actividad de la proteasa se mide en t_1 justo después de añadir la proteasa al detergente. La actividad residual se mide a continuación en t_2 después de un cierto período de almacenamiento, típicamente minutos o semanas. La variante de proteasa de la invención tiene preferiblemente una actividad residual de al menos 10% al menos 20%, p. ej., al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, o al menos 100% de la actividad de proteasa antes del almacenamiento (a t_1) en un detergente líquido de pH alto con pH 10, a una temperatura de 30°C y cuando se mide a $t = 4$ horas o más. Un detergente líquido de pH alto es en este contexto un detergente líquido con pH 10 o superior, y un detergente líquido de pH muy alto es en este contexto un detergente líquido con pH 12 o superior. Una variante de proteasa según la invención es preferiblemente más estable, es decir, tiene una actividad residual superior, después del almacenamiento en detergente líquido de pH alto (pH = 10 o más) en comparación con la proteasa progenitora, p. ej. una proteasa con SEQ ID NO 2 y/o una variante de proteasa según la invención es más estable, es decir, tiene una actividad residual superior, después del almacenamiento en detergente líquido, es decir, un detergente líquido que comprende 40% de agua o más, en comparación con la proteasa progenitora, p. ej. una proteasa con SEQ ID NO 2. Preferiblemente, la actividad residual de la variante de proteasa de la invención es al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, tal como al menos 50% superior en comparación con la actividad residual de la proteasa progenitora, p. ej. en comparación con SEQ ID NO 2, cuando se mide después de un almacenamiento de 4 horas a 30°C en un detergente líquido con pH 10 y/o un detergente líquido con al menos 40% de agua. Según se describe en el Ejemplo 3.

En particular, la estabilidad relativa de una variante de proteasa según la invención y su correspondiente proteasa progenitora son diferentes a pH alto, por encima de o a pH 10, de sus estabilidades relativas a pH neutro, por encima de o a pH 7.

La relación entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos se describe mediante el parámetro "identidad de secuencia". Para los fines de la presente invención, la identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos se determina usando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48: 443-453) según se ejecuta en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice y cols., 2000, *Trends Genet.* 16: 276-277), preferiblemente la versión 5.0.0 o posterior. Los parámetros usados son una penalización por apertura de hueco de 10, una penalización por extensión de hueco de 0,5 y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (versión de EMBOSS de BLOSUM62). El resultado de "identidad más larga" etiquetada por Needle (obtenido usando la opción -nobrief) se usa como porcentaje de identidad y se calcula como sigue:

$$(\text{Residuos idénticos} \times 100) / (\text{Longitud del alineamiento} - \text{Número total de huecos en el alineamiento})$$

Para los fines 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, anteriormente) según se ejecuta en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice y cols., 2000, anteriormente), preferiblemente la versión 5.0.0 o posterior. Los parámetros usados son una penalización por apertura de hueco de 10, una penalización por extensión de hueco de 0,5 y la matriz de sustitución EDNAFULL (versión de EMBOSS de NCBI NCU 4.4). El resultado de la "identidad más larga" etiquetada por Needle (obtenido usando la opción -nobrief) se usa como porcentaje de identidad y se calcula como sigue:

$$(\text{Desoxirribonucleótidos idénticos} \times 100) / (\text{Longitud del alineamiento} - \text{Número total de huecos en el alineamiento})$$

Las diferentes condiciones de rigurosidad se definen como sigue.

- El término "variante sustancialmente pura" significa una preparación que contiene como máximo 10%, como máximo 8%, como máximo 6%, como máximo 5%, como máximo 4%, como máximo 3%, como máximo 2%, como máximo 1% y como máximo 0,5% en peso de otro material polipeptídico con el que está asociada naturalmente o recombinantemente. Preferiblemente, la variante es al menos 92% pura, p. ej., al menos 94% pura, al menos 95% pura, al menos 96% pura, al menos 97% pura, al menos 98% pura, al menos 99%, al menos 99,5% pura y 100% pura en peso del material polipeptídico total presente en la preparación. Las variantes de la presente invención están preferiblemente en forma sustancialmente pura. Esto se puede conseguir, por ejemplo, preparando la variante mediante métodos recombinantes bien conocidos o mediante métodos de purificación clásicos.
- El término "polinucleótido sustancialmente puro" significa una preparación de polinucleótido libre de otros nucleótidos extraños o no deseados y en una forma adecuada para el uso dentro de sistemas de producción de polipéptidos genéticamente modificados. Así, un polinucleótido sustancialmente puro contiene como máximo 10%, como máximo 8%, como máximo 6%, como máximo 5%, como máximo 4%, como máximo 3%, como máximo 2%, como máximo 1% y como máximo 0,5% en peso de otro material polinucleotídico con el que está asociado naturalmente o recombinantemente. Sin embargo, un polinucleótido sustancialmente puro puede incluir regiones no traducidas 5' y 3' de origen natural, tales como promotores y terminadores. Se prefiere que el polinucleótido sustancialmente puro sea al menos 90% puro, p. ej., al menos 92% puro, al menos 94% puro, al menos 95% puro, al menos 96% puro, al menos 97% puro, al menos 98% puro, al menos 99% puro y al menos 99,5% puro en peso. Los polinucleótidos de la presente invención están preferiblemente en una forma sustancialmente pura.
- El término "material textil" significa cualquier material textil incluyendo hilos, productos intermedios de hilo, fibras, materiales no tejidos, materiales naturales, materiales sintéticos, así como tejidos hechos de estos materiales tales como prendas de vestir, paños y otros artículos). Cuando se usa el término tejido o prenda de vestir, se pretende incluir asimismo el término más amplio materiales textiles.
- El término "variante" significa un polipéptido que tiene actividad de proteasa que comprende una alteración, es decir, una sustitución, inserción y/o eliminación, en tres o más (p. ej., varias) posiciones. Una sustitución significa el reemplazo del aminoácido que ocupa una posición por un aminoácido diferente; una eliminación significa la retirada del aminoácido que ocupa una posición; y una inserción significa añadir uno o más (p. ej., varios) aminoácidos, p. ej., 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos adyacentes a e inmediatamente después del aminoácido que ocupa una posición. El término variante de proteasa puede ser una variante de una subtilasa progenitora, es decir, una variante de proteasa es una subtilasa que comprende alteraciones, es decir, una sustitución, inserción, y/o eliminación, en tres o más (p. ej., varias) posiciones en comparación con la proteasa progenitora.
- El término "rendimiento de lavado" se usa como la capacidad de una enzima para eliminar manchas presentes en el objeto a limpiar durante, p. ej., el lavado, tal como el lavado de ropa o la limpieza de superficies duras. La mejora en el rendimiento de lavado se puede cuantificar calculando el denominado valor de intensidad (Int) definido en el ensayo AMSA.
- El término "proteasa silvestre" significa una proteasa expresada por un organismo de origen natural, tal como una bacteria, arquea, levadura, hongo, planta o animal que se encuentra en la naturaleza. Un ejemplo de una subtilasa silvestre es la subtilisina savinasa, es decir, los aminoácidos 1 a 269 de SEQ ID NO: 2.
- Convenciones para la designación de variantes
- Para los fines de la presente invención, la subtilisina BPN' (la secuencia de aminoácidos 1-275 de SEQ ID NO: 1 (Siezen y cols., 1991, *Protein Eng.* 4: 719-737)) se usa para determinar el correspondiente residuo de aminoácido en otra proteasa. La secuencia de aminoácidos de otra proteasa se alinea con el polipéptido maduro divulgado en SEQ ID NO: 1 y, basándose en el alineamiento, se determina el número de posición del aminoácido correspondiente a cualquier residuo de aminoácido en el polipéptido divulgado en SEQ ID NO: 1 usando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48: 443-453) según se ejecuta en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice y cols., 2000, *Trends Genet.* 16: 276-277), preferiblemente la versión 5.0.0 o posterior. Los parámetros usados son una penalización por apertura de hueco de 10, una penalización por extensión de hueco de 0,5 y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (versión de EMBOSS de BLOSUM62).
- La identificación del residuo de aminoácido correspondiente en otra proteasa se puede determinar mediante un alineamiento de múltiples secuencias polipeptídicas usando varios programas informáticos incluyendo, entre otros, MUSCLE (comparación de múltiples secuencias mediante expectativas logarítmicas; versión 3.5 o posterior; Edgar, 2004, *Nucleic Acids Research* 32: 1792-1797), MAFFT (versión 6.857 o posterior; Katoh y Kuma, 2002, *Nucleic Acids Research* 30: 3059-3066; Katoh y cols., 2005, *Nucleic Acids Research* 33: 511-518; Katoh y Toh, 2007, *Bioinformatics* 23: 372374; Katoh y cols., 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 y cols., 1994, *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680), usando sus parámetros por defecto respectivos.

Cuando la otra enzima ha divergido del polipéptido maduro de SEQ ID NO: 1 de modo que la comparación tradicional

basada en secuencias no logre detectar 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 mayor sensibilidad en la búsqueda basada en secuencias usando programas de búsqueda que utilizan representaciones probabilísticas de familias de polipéptidos (perfiles) para buscar en bases de datos. Por ejemplo, el programa PSI-BLAST genera perfiles a través de un procedimiento iterativo de búsqueda en bases de datos y es capaz de detectar homólogos remotos (Atschul y cols., 1997, *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402). Se puede lograr una sensibilidad aún mayor si la familia o superfamilia del polipéptido tiene uno o más representantes en las bases de datos de estructuras de proteínas. Programas tales como GenTHREADER (Jones, 1999, *J. Mol. Biol.* 287: 797-815; McGuffin y Jones, 2003, *Bioinformatics* 19: 874-881) utilizan información procedente de una variedad de fuentes (PSI-BLAST, predicción de la estructura secundaria, perfiles de alineamiento estructural y potenciales de solvatación) como entrada a una red neuronal que predice el pliegue estructural de una secuencia interrogante. De forma similar, el método de Gough y cols., 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 de SCOP. Estos alineamientos se pueden usar a su vez para generar modelos de homología para el polipéptido, y se puede evaluar la precisión de estos modelos usando una variedad de herramientas desarrolladas con ese propósito.

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

Al describir las variantes de la presente invención, la nomenclatura descrita a continuación se adapta para facilitar la referencia. Se emplea la abreviatura de aminoácidos de una sola letra o de tres letras aceptada de la IUPAC.

Sustituciones: Para una sustitución de aminoácido se usa la siguiente nomenclatura: Aminoácido original, posición, aminoácido sustituido. Según esto, la sustitución de treonina en la posición 226 por alanina se denomina "Thr226Ala" o "T226A". Las mutaciones múltiples se separan por signos de adición ("+"), p. ej., "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. Una "X" que precede a una posición significa que puede sustituirse cualquier aminoácido original en la posición.

Eliminaciones: Para una eliminación de aminoácido se usa la siguiente nomenclatura: Aminoácido original, posición, *. Según esto, la eliminación de glicina en la posición 195 se denomina "Gly195*" o "G195*". Las eliminaciones múltiples se separan por signos de adición ("+"), p. ej., "Gly195*+Ser411" o "G195*+S411*".

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

	194	195	196
Subtilisina 309	A	- G -	L
	194	195	195a 195b 196
Variante	A	- G - K -	A - L

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

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

194 195 196
Subtilisina 309 A - G - L

a:

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

Estos casos serán evidentes para el experto y la indicación G195GG e indicaciones correspondientes para este tipo de inserciones se supone así que comprenden estas indicaciones degeneradas equivalentes.

5 Alteraciones múltiples: Las variantes que comprenden alteraciones múltiples están separadas por signos de adición ("+"), p. ej., "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. Alternativamente, las alteraciones múltiples pueden separarse por un espacio o una coma, p. ej., A170Y G195E o A170Y, G195E respectivamente.

10 Alteraciones diferentes: Cuando se pueden introducir alteraciones diferentes en una posición, las alteraciones diferentes se separan por una coma, p. ej., "Arg170Tyr,Glu" representa una sustitución de arginina en la posición 170 por tirosina o ácido glutámico. Así, "Tyr167Gly,Ala+Arg170Gly,Ala" designa las siguientes variantes:

"Tyr1 67Gly+Arg170Gly", "Tyr167Gly+Arg170Ala", "Tyr167Ala+Arg170Gly" y "Tyr167Ala+Arg170Ala".

Alternativamente, las diferentes alteraciones o sustituciones opcionales se pueden indicar entre corchetes o llaves, p. ej., Arg170[Tyr, Gly] o Arg170{Tyr, Gly} o abreviado R170 [Y,G] o R170{Y, G}.

Descripción detallada de la invención

15 Detergentes alcalinos que tienen un pH alto se usan ampliamente en la limpieza, tal como el lavado de vajillas y ropa. Los detergentes líquidos con pH elevado especialmente son comúnmente usados por los consumidores en Norteamérica. Las composiciones de limpieza de pH alto también se usan en procedimientos de limpieza industriales.

20 Los detergentes alcalinos son líquidos que tienen propiedades detergentes. El pH de estos detergentes varía habitualmente en pH de 9 a 12,5. Los detergentes de pH alto comprenden habitualmente componentes tales como tensioactivos, adyuvantes y componentes blanqueadores y, adicionalmente, también pueden contener una cantidad significativa de agua y álcalis tales como NaOH, TSP (fosfato trisódico), amoníaco, carbonato de sodio e hidróxido de potasio (KOH). Estos álcalis se añaden habitualmente en cantidades correspondientes a de 0,1 a 30 por ciento en peso (% p o % en peso).

25 Ejemplos de detergentes de pH alto comerciales incluyen, entre otros, Arm & Hammer (Church & Dwight), Surf Sparkling Ocean (Unilever), Clean Burst, SUN Triple Clean Tropical Breeze (productos SUN), Purex Free and Clear (Henkel) y Xtra Tropical Passion (Church & Dwight).

30 La adición de enzimas a detergentes es muy ventajosa ya que las actividades específicas de estas enzimas eliminan eficazmente manchas específicas de superficies tales como materiales textiles y cubiertos. Sin embargo, la dificultad de mantener una estabilidad enzimática aceptable en los detergentes líquidos de pH alto ha impedido durante muchos años la inclusión de enzimas en estos detergentes.

La presente invención se refiere a composiciones de limpieza líquidas de pH alto que comprenden variantes de proteasa estables alcalinas adecuadas para el uso en estas composiciones.

Un aspecto de la invención se refiere a una composición de limpieza líquida que comprende:

- (a) de 0% a 20% en peso, preferiblemente de 0,1% a 2,5% en peso, de un tensioactivo detergente;
- 35 (b) de 0,1% a 5% en peso de una variante de proteasa; y
- (c1) de 20% a 95% en peso, preferiblemente de 40% a 95% en peso, más preferiblemente de aproximadamente 70% a aproximadamente 90% en peso, de agua; y/o
- (c2) de 1% a 30% en peso de un sistema tamponador alcalino que comprende un silicato de metal alcalino o un hidróxido de metal alcalino o una mezcla de los mismos, para proporcionar un pH de 10 a 13,5; y
- 40 (d) opcionalmente, un inhibidor de proteasa, preferiblemente dicho inhibidor de proteasa es un inhibidor de proteasa de aldehído peptídico.

Las composiciones de la invención contienen preferiblemente sistemas tamponadores alcalinos para proporcionar un

pH de 10 o más. A fin de conseguir el pH alto, es necesario que esté presente un hidróxido de metal alcalino, especialmente hidróxido de sodio o potasio, normalmente en una cantidad de 0,1 a aproximadamente 30% en peso (porcentaje en peso, abreviado % p o % en peso) de la composición, y preferiblemente de 1,0 a 2,5%, o cantidades superiores de un silicato de metal alcalino adecuado tal como silicato metálico, según el pH deseado para el producto.

- 5 La composición de la invención contiene preferiblemente de 20% a 95% en peso, preferiblemente de 40% a 95% en peso, más preferiblemente de aproximadamente 70% a aproximadamente 90% en peso, de agua. Preferiblemente, de aproximadamente 75-80% en peso de agua, preferiblemente de aproximadamente 80-85% en peso de agua, preferiblemente de aproximadamente 70-75% en peso de agua, o preferiblemente de aproximadamente 75-80% en peso de agua. Preferiblemente, la composición de la invención comprende 20% en peso o más de agua, tal como al
- 10 menos 25% en peso, al menos 30% en peso, al menos 35% en peso, al menos 40% en peso, al menos 45% en peso, al menos 50% en peso, al menos 55% en peso, al menos 60% en peso, al menos 65% en peso, al menos 70% en peso, al menos 75% en peso, al menos 80% en peso, al menos 85% en peso, al menos 90% en peso o al menos 95% en peso o más, pero menos de 100% en peso de agua.

- 15 Las variantes de proteasa se pueden añadir a una composición de limpieza de pH alto según la invención en una cantidad correspondiente a 0,01-200 mg de proteína enzimática por litro de líquido de lavado, preferiblemente 0,05-50 mg de proteína enzimática por litro de líquido de lavado, en particular 0,1-10 mg de proteína enzimática por litro de líquido de lavado.

Una composición para el uso en un líquido de lavado de ropa puede incluir, por ejemplo, 0,1%-5% de variante de proteasa según la invención, en peso de la composición.

- 20 Una composición para uso en un lavavajillas automático (ADW), por ejemplo, puede incluir 0,0001%-50%, tal como 0,001%-30%, tal como 0,01%-20%, tal como 0,5-15%, de proteína enzimática, en peso de la composición.

- Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición de limpieza líquida que tiene pH 10 o superior, que comprende al menos 0,01% en peso de proteasa, donde la proteasa es una variante de una proteasa progenitora, donde la variante de proteasa tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 60% de identidad de secuencia
- 25 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, donde la variante de proteasa comprende tres o más sustituciones correspondientes a las sustituciones X3V, X9D, X9E, X18S, X43R, X43K, X49T, X61D, X76D, X115W, X120T, X120V, X120D, X182D, X182E, X185E, X185D, X188E, X188D, X194P, X205I, X206L, X209W, X216V, X217M, X218T, X222S, X255E, X255D, X256D, X256E, X259D, X259E, X260A, X260E, X260D, X261M, X261W, X262E y X262D de BPN' (SEQ ID NO: 1) y donde dicha variante de proteasa se caracteriza por tener una actividad residual al menos 10%
- 30 superior que la proteasa progenitora cuando se mide después de 4 horas a 40°C en detergente líquido con pH 10 y/o tener un rendimiento de lavado mejorado o del mismo nivel que la subtilisina 309 (SEQ ID NO: 2) sobre manchas de sangre/leche/tinta a 25°C.

- Las variantes de proteasa añadidas a una composición de limpieza según la invención presentan semividas que se mejoran hasta el punto de permitir el almacenamiento y uso de proteasas en composiciones de limpieza líquidas de
- 35 pH alto (pH>10,0), tales como detergentes. Además, las variantes de proteasa presentan un rendimiento de lavado significativo en líquidos de pH alto y, por lo tanto, se abre la posibilidad de mejorar el rendimiento de lavado de detergentes líquidos de pH alto y/o reducir la concentración de detergente presente en estas formulaciones detergentes para conseguir el mismo rendimiento de lavado. Además, las variantes de proteasa presentan un rendimiento de lavado significativo en líquidos de pH alto y, por lo tanto, se abre la posibilidad de mejorar el rendimiento
- 40 de lavado de detergentes líquidos de pH alto y/o reducir la concentración de proteasa presente en estas formulaciones detergentes para conseguir el mismo rendimiento de lavado.

Variantes de proteasa adecuadas para las composiciones de limpieza líquidas de la presente invención se pueden seleccionar del grupo que consiste en:

S9E+N43R+G61E+N76D+G115W+H120V+A194P+Q206L+S259D+L262E;
 S9E+N43R+N76D+A194P+V205I+Q206L+S259D+N261W+L262E;
 S9E+N43R+N76D+A194P+V205I+Q206L+Y209W+S259D+N261W+L262E;
 S9E+N43R+N76D+Q182E+A194P+V205I+Q206L+S259D+N261W+L262E;
 S9E+N43R+N76D+Q182E+A194P+V205I+Q206L+Y209W+S259D+N261W+L262E;
 S9E+N43R+N76D+A194P+V205I+Q206L+Y209W+S216V+L262E;
 S9E+N43R+N76D+A194P+V205I+Q206L+Y209W+S216V+M222S+L262E;
 S9E+N43R+N76D+A194P+Q206L+T255E+S256D+S259D+T260E+N261W+L262E;
 S9E+N43R+N76D+N117H+H120D+A194P+Q206L+S259D+L262E;
 S9E+N43R+N76D+A194P+Q206L+S256D+S259D+N261W+L262E;
 S9E+N43R+N76D+A194P+V205I+Q206L+S256D+S259D+N261W+L262E;
 S9E+N18S+N43R+N76D+G115W+H120V+A194P+V205I+Q206L+S259D+L262E;
 S9E+N43R+N76D+G115W+H120V+A194P+V205I+Q206L+S259D+L262E;
 S9E+N43R+N76D+A194P+Q206L+Y209W+S259D+N261W+L262E;
 S9E+N43R+N76D+Q182E+A194P+V205I+Q206L+Y209W+S256D+S259D+N261W+L262E;
 S9E+N43R+N76D+S188E+A194P+V205I+Q206L+Y209W+S216V+L262E;
 S9E+N76D+G115W+G160P+Q182E+V205I+Q206L+Y209W+S256D+N261W+L262E;
 S9E+N76D+G115W+G160P+Q182E+V205I+Q206L+Y209W+S256D+T260E+N261W+L262E;
 S9E+N43R+N76D+H120T+A194P+Q206L+S256D+S259D+N261W+L262E;
 S9E+N43R+N76D+H120T+A194P+V205I+Q206L+Y209W+S216V+L262E;
 S9E+N76D+G160P+Q182E+V205I+Q206L+Y209W+S256D+N261W+L262E;
 S9E+N43R+N76D+Q182E+A194P+V205I+Q206L+S259D+N261W+L262E;
 S9E+N76D+V205I+Q206L+Y209W+S256D+N261W+L262E;
 S9E+N76D+Q182E+V205I+Q206L+Y209W+S256D+N261W+L262E;
 S9E+N43R+N76D+Q182E+A194P+V205I+Q206L+S259D+N261W+L262E+*275aH;
 S9E+N43R+N76D+N185E+S188E+A194P+Q206L+Y209W+S259D+L262E;
 S9E+N43R+N76D+Q182E+N185E+S188E+A194P+Q206L+Y209W+S259D+L262E;
 S9E+N43R+N76D+N185E+A194P+V205I+Q206L+Y209W+S216V+L262E;
 S9E+N43R+N76D+A194P+V205I+Q206L+Y209W+S216V+N261M+L262E;
 S9E+N43R+I72A+N76D+A194P+Q206L+L262E;
 S9E+N43R+I72A+N76D+A194P+Q206L+S259D+L262E;
 S9E+N43R+N76D+A194P+V205I+Q206L+L262E;
 S9E+N43R+N76D+A194P+V205I+Q206L+S259D+L262E;
 S9E+N43R+N76D+A158E+A194P+N204D+V205I+Q206L+Y209W+S212G+S216V+L262E;
 S9E+N43R+N76D+A158E+G160P+V205I+Q206L+Y209W+S259D+N261W+L262E;
 S9E+N43R+N76D+A158E+G160P+A194P+N204D+V205I+Q206L+Y209W+S212G+S216V+L262E;
 S9E+N43R+N76D+A158E+G160P+S161E+A194P+N204D+V205I+Q206L+Y209W+S216V+L262E+*275aH+*275bH;
 S9E+N43R+N76D+A158E+G160P+S161E+A194P+N204D+V205I+Q206L+Y209W+L262E;
 S9E+N43R+N76D+A158E+G160P+S161E+A194P+N204D+V205I+Q206L+Y209W+S212G+S216V+L262E+*275aH+*275bH;
 S9E+N43R+N76D+A158E+G160P+S161E+A194P+N204D+V205I+Q206L+Y209W+S212G+L262E;
 S9E+N43R+N76D+A158E+A194P+V205I+Q206L+Y209W+S259D+N261W+L262E;
 S9E+N43R+N76D+A158E+G160P+S161E+A194P+N204D+V205I+Q206L+Y209W+S212G+L262E+*275aH+*275bH;

ES 3 014 600 T3

S9E+N43R+N76D+A158E+G160P+S161E+A194P+N204D+V205I+Q206L+Y209W+L262E;
 S9E+N43R+N76D+A158E+G160P+S161E+A194P+N204D+V205I+Q206L+Y209W+S212G+
 S216V+L262E+*275aH+*275bH;
 S9E+N43R+N76D+A158E+G160P+S161E+A194P+N204D+V205I+Q206L+Y209W+S212G+
 L262E;
 S9E+N43R+N76D+A158E+A194P+V205I+Q206L+Y209W+S259D+N261W+L262E;
 S9E+N43R+N76D+A158E+G160P+S161E+A194P+N204D+V205I+Q206L+Y209W+S212G+
 L262E+*275aH+*275bH;
 S9E+N43R+N76D+A158E+G160P+S161E+A194P+N204D+V205I+Q206L+Y209W+S216V+
 L262E;
 S9E+N43R+N76D+A158E+G160P+S161E+A194P+Q206L+Y209W+S259D+L262E+*275aH+
 *275bH;
 S9E+N43R+N76D+A158E+G160P+S161E+A194P+V205I+Q206L+Y209W+S212G+S216V+
 L262E;
 S9E+N43R+N76D+A158E+S161E+V205I+Q206L+Y209W+S259D+N261W+L262E;
 S9E+N43R+N76D+A158E+G160P+S161E+V205I+Q206L+Y209W+S259D+N261W+L262E;
 S9E+N43R+N76D+A158E+S161E+A194P+N204D+V205I+Q206L+Y209W+S212G+S216V+
 L262E;
 S9E+N43R+N76D+G160P+V205I+Q206L+Y209W+S259D+N261W+L262E;
 S9E+N43R+N76D+A194P+N204D+V205I+Q206L+Y209W+S212G+S216V+S259D+N261W+
 L262E;
 S9E+N43R+N76D+A194P+Q206L+Y209W+L262E;
 S9E+N43R+N76D+A194P+Q206L+Y209W+S256D+S259D+N261W+L262E;
 S9E+N43R+N76D+A194P+Q206L+Y209W+T255E+S256D+S259D+T260E+N261W+L262E;
 S9E+N43R+N76D+V205I+Q206L+Y209W+S259D+N261W+L262E;
 S9E+N43R+N76D+G115W+H120V+A194P+Q206L+Y209W+S259D+L262E;
 S9E+N43R+N76D+G115W+H120V+P129D+A194P+Q206L+Y209W+S259D+L262E;
 S9E+N43R+N76D+G160P+A194P+N204D+V205I+Q206L+Y209W+S212G+S216V+L262E;
 S9E+N43R+N76D+G160P+S161E+A194P+N204D+V205I+Q206L+Y209W+S212G+S216V+
 L262E;
 S9E+N43R+N76D+G160P+S161E+A194P+N204D+V205I+Q206L+Y209W+S212G+S216V+
 L262E+*275aH+*275bH;
 S9E+N43R+N76D+N204D+V205I+Q206L+Y209W+S259D+N261W+L262E;
 S9E+N43R+N76D+G160P+S161E+V205I+Q206L+Y209W+S259D+N261W+L262E;
 S9E+N43R+N76D+H120V+Q182E+A194P+V205I+Q206L+Y209W+S256D+N261W+L262E+
 *275aH+*275bH;
 S9E+N43R+N76D+V205I+Q206L+Y209W+S216V+S259D+N261W+L262E;
 S9E+N43R+N76D+S161E+V205I+Q206L+Y209W+S259D+N261W+L262E;
 S9E+N43R+N76D+P131+A194P+Q206L+Y209W+S259D+L262E;
 S9E+N43R+N76D+S161E+A194P+N204D+V205I+Q206L+Y209W+S212G+S216V+L262E+
 *275aH+*275bH;
 S9E+N43R+N76D+V205I+Q206L+Y209W+S212G+S259D+N261W+L262E; and
 S9E+N43R+N76D+N204D+V205I+Q206L+Y209W+S212G+S216V+S259D+N261W+L262E.

En algunas realizaciones preferidas, las composiciones de limpieza proporcionadas en el presente documento se
 5 formulan de modo que tengan un pH de aproximadamente 10 a aproximadamente 13,5, de aproximadamente 10 a
 aproximadamente 13, de aproximadamente 10 a aproximadamente 12,5, de aproximadamente 10 a aproximadamente
 12, de aproximadamente 10 a aproximadamente 11,5, de aproximadamente 10 a aproximadamente 11, de

aproximadamente 10 a aproximadamente 10,5. En algunas realizaciones preferidas, la composición de limpieza líquida se formula de modo que ese pH sea de aproximadamente 10 a aproximadamente 13,5. En otras realizaciones preferidas, la composición de limpieza líquida se formula de modo que el pH sea de aproximadamente 12 a 13,5.

5 Las variantes de proteasa de la presente invención tienen estabilidad mejorada en la composición de limpieza líquida a pH 10 y superior en comparación con la proteasa progenitora tal como una proteasa con SEQ ID NO: 2. Esto hace que estas variantes sean adecuadas para el uso en detergentes líquidos de pH alto para, p. ej., el lavado de ropa o el lavado de vajillas.

10 En una realización, la variante de proteasa tiene estabilidad mejorada, en particular estabilidad de almacenamiento mejorada en una composición de limpieza líquida de pH alto, en comparación con la proteasa progenitora. En una realización preferida, la variante de proteasa tiene estabilidad mejorada, en particular estabilidad de almacenamiento mejorada, y un rendimiento de lavado del mismo nivel o mejorado en comparación con la proteasa progenitora.

15 En una realización, la variante de proteasa tiene una estabilidad al almacenamiento mejorada en un detergente líquido de pH alto, y un rendimiento de lavado del mismo nivel o mejorado en comparación con la proteasa progenitora, donde la estabilidad al almacenamiento se puede medir usando un 'ensayo de estabilidad al almacenamiento acelerado' y el rendimiento de lavado se puede medir usando el ensayo de estrés mecánico automático (AMSA).

20 En una realización, la variante de proteasa tiene al menos 60% pero menos de 100% de identidad de secuencia con la proteasa progenitora. En una realización, la variante de proteasa tiene al menos 70% pero menos de 100% de identidad de secuencia con la proteasa progenitora. En una realización, la variante de proteasa tiene al menos 75% pero menos de 100% de identidad de secuencia con la proteasa progenitora. En una realización, la variante de proteasa tiene al menos 80% pero menos de 100% de identidad de secuencia con la proteasa progenitora. En una realización, la variante de proteasa tiene al menos 85% pero menos de 100% de identidad de secuencia con la proteasa progenitora. En una realización, la variante de proteasa tiene al menos 90% pero menos de 100% de identidad de secuencia con la proteasa progenitora. En una realización, la variante de proteasa tiene al menos 93% pero menos de 100% de identidad de secuencia con la proteasa progenitora. En una realización, la variante de proteasa tiene al menos 95% pero menos de 100% de identidad de secuencia con la proteasa progenitora. En una realización, la variante de proteasa tiene al menos 96% pero menos de 100% de identidad de secuencia con la proteasa progenitora. En una realización, la variante de proteasa tiene al menos 97% pero menos de 100% de identidad de secuencia con la proteasa progenitora. En una realización, la variante de proteasa tiene al menos 98% pero menos de 100% de identidad de secuencia con la proteasa progenitora.

30 En una realización, la variante tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 60% idéntica a SEQ ID NO: 1, p. ej., al menos 60%, tal como al menos 70%, tal como al menos 80%, tal como al menos 90%, tal como al menos 95% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

35 En otra realización, la variante tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 60% idéntica a SEQ ID NO: 2, p. ej., al menos 60%, tal como al menos 70%, tal como al menos 80%, tal como al menos 90%, tal como al menos 95% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

En un aspecto, el número total de alteraciones en la proteasa progenitora está entre 3 y 30, preferiblemente entre 3 y 20, más preferiblemente entre 3 y 15, aún más preferiblemente entre 3 y 10, lo más preferiblemente entre 3 y 8 alteraciones. En otro aspecto, el número total de alteraciones en la proteasa progenitora es 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 o 30 alteraciones.

40 La proteasa progenitora o precursora puede ser cualquier proteasa o incluso más preferiblemente cualquier subtilasa según se define posteriormente. La proteasa progenitora es preferiblemente una proteasa que tiene al menos 60% de identidad con SEQ ID NO: 2 pero el progenitor puede ser cualquier serina proteasa. Una serina proteasa es una enzima que cataliza la hidrólisis de enlaces peptídicos y en la que hay un residuo de serina esencial en el sitio activo (White, Handler y Smith, 1973 "Principles of Biochemistry", quinta edición, McGraw-Hill Book Company, Nueva York, págs. 271-272). Las serina proteasas bacterianas tienen pesos moleculares en el intervalo de 20.000 a 45.000 daltons. Son inhibidas por el fluorofosfato de diisopropilo. Hidrolizan ésteres terminales simples y tienen una actividad similar a la quimotripsina eucariótica, también una serina proteasa. Un progenitor aún más preferido es una proteasa alcalina, que cubre un subgrupo, que refleja el pH alto óptimo de algunas de las serina proteasas, de pH 9,0 a 11,0 (para una revisión, véase Priest, 1977, *Bacteriological Rev.* 41: 71 1-753).

50 La proteasa progenitora puede ser una subtilasa que es un subgrupo de las serina proteasas que ha sido propuesto por Siezen y cols., 1991, *Protein Eng.* 4:719-737 y Siezen y cols., 1997, *Protein Science* 6:501-523. Se definen mediante análisis de homología de más de 170 secuencias de aminoácidos de serina proteasas anteriormente denominadas proteasas de tipo subtilisina. Anteriormente, una subtilisina se definía a menudo como una serina proteasa producida por bacterias grampositivas u hongos, y según Siezen y cols. ahora es un subgrupo de subtilasas. 55 Se ha identificado una amplia variedad de subtilasas y se ha determinado la secuencia de aminoácidos de un número de subtilasas. Para una descripción más detallada de estas subtilasas y sus secuencias de aminoácidos se hace referencia a Siezen y cols. (1997). La subtilisina es, como se ha mencionado, un subgrupo de subtilasas que son serina proteasas de la familia S8, en particular de la subfamilia S8A, según se define en la base de datos de MEROPS

- (merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/famsum?family=S8). Ejemplos de subtilisinas son subtilisina BPN' (SEQ ID NO: 1) y subtilisina 309 (SEQ ID NO: 2) que tienen los números de MEROPS S08.034 y S08.003, respectivamente. Una proteasa progenitora también puede ser una subtilasa aislada de una fuente natural, donde se han realizado modificaciones posteriores (tales como un reemplazo o reemplazos de la cadena o las cadenas laterales de los aminoácidos, una sustitución o sustituciones, una eliminación o eliminaciones y/o una inserción o inserciones conservando la característica de una subtilasa. Además, una proteasa progenitora puede ser una subtilasa que ha sido preparada mediante la técnica de barajado de ADN, tal como la descrita por Ness y cols., 1999, *Nature Biotechnology*, 17: 893-896.
- Alternativamente, el término "proteasa progenitora" puede denominarse "proteasa precursora" y se usa para describir la proteasa de partida en la que se realizan mutaciones para obtener la variante de la invención. La proteasa progenitora es preferiblemente de los subgrupos de subtilisina.
- Un subgrupo de las subtilasas, I-S1 o subtilisinas "verdaderas", incluye las subtilisinas "clásicas", tales como subtilisina 168 (BSS168), subtilisina BPN', subtilisina Carlsberg (ALCALASE®, Novozymes A/S) y subtilisina DY (BSSDY). BPN' es subtilisina BPN' procedente de *B. amyloliquefaciens*, la subtilisina BPN' tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. Un subgrupo adicional de las subtilasas, I-S2 o subtilisinas muy alcalinas, es reconocido por Siezen y cols. (anteriormente). Las proteasas del subgrupo I-S2 se describen como subtilisinas muy alcalinas e incluyen enzimas tales como subtilisina PB92 (BAALKP) (MAXACAL®, Genencor International Inc.), subtilisina 147 (BLS147) (ESPERASE®, Novozymes A/S), elastasa alcalina YaB (BSEYAB) y subtilisina 309 (SAVINASE®, Novozymes A/S) que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2.
- La homología entre dos secuencias de aminoácidos se describe en este contexto mediante el parámetro "identidad" para los fines de la presente invención, el grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina usando el algoritmo de Needleman-Wunsch según se describe anteriormente. El resultado de la práctica habitual es, además del alineamiento de aminoácidos, el cálculo del "porcentaje de identidad" entre las dos secuencias.
- Basándose en esta descripción, es práctica habitual para un experto en la técnica identificar subtilasas homólogas adecuadas, que pueden modificarse según la invención.
- La proteasa progenitora puede ser un polipéptido que tenga al menos 60% de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID NO: 1, p. ej., al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o 100%, que tienen actividad de proteasa. En un aspecto, la secuencia de aminoácidos del progenitor difiere hasta en 10 aminoácidos, p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, del polipéptido de SEQ ID NO: 1. En otro aspecto, el progenitor comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.
- La proteasa progenitora puede ser un polipéptido que tenga al menos 60% de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID NO: 2, p. ej., al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o 100%, que tienen actividad de proteasa. En un aspecto, la secuencia de aminoácidos del progenitor difiere hasta en 10 aminoácidos, p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, del polipéptido de SEQ ID NO: 2. En otro aspecto, el progenitor comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.
- La proteasa progenitora puede ser un polipéptido híbrido en el que una región de un polipéptido está fusionada al extremo N o el extremo C de una región de otro polipéptido.
- La proteasa progenitora puede obtenerse a partir de microorganismos de cualquier género. Para los fines de la presente invención, el término "obtenido a partir de", según se usa en el presente documento en relación con una fuente dada significará que el progenitor codificado por un polinucleótido es producido por la fuente o por una cepa en la que ha sido insertado el polinucleótido procedente de la fuente. En un aspecto, el progenitor se secreta extracelularmente.
- El progenitor puede ser una proteasa bacteriana. Por ejemplo, el progenitor puede ser un polipéptido de bacterias grampositivas tal como una proteasa de *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Geobacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Oceanobacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* o *Streptomyces*, o un polipéptido de bacterias gramnegativas tal como una proteasa de *Campylobacter*, *E. coli*, *Flavobacterium*, *Fusobacterium*, *Helicobacter*, *Ilyobacter*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Salmonella* o *Ureaplasma*.
- En un aspecto, el progenitor es una proteasa de *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* o *Bacillus thuringiensis*.
- Las cepas de estas especies están fácilmente accesibles para el público en un número de colecciones de cultivos, tales como the American Type Culture Collection (ATCC), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS) y Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center (NRRL).

El progenitor puede identificarse y obtenerse a partir de otras fuentes, incluyendo microorganismos aislados de la naturaleza (p. ej., suelo, compost, agua, etc.) o muestras de ADN obtenidas directamente de materiales naturales (p. ej., suelo, compost, agua, etc.) usando las sondas mencionadas anteriormente. Las técnicas para aislar microorganismos y ADN directamente de hábitats naturales son bien conocidas en la técnica. A continuación, se puede obtener un polinucleótido que codifica un progenitor cribando de forma similar un ADN genómico o una biblioteca de ADNc de otro microorganismo o una muestra de ADN mixta. Una vez que se ha detectado con la sonda o las sondas un polinucleótido que codifica un progenitor, el polinucleótido se puede aislar o clonar utilizando técnicas que son conocidas por los expertos normales en la técnica (véase, p. ej., Sambrook y cols., 1989, anteriormente).

Una variante de proteasa estable a pH alto según la invención se puede preparar mediante un método, que comprende las etapas de:

(a) introducir en una proteasa progenitora tres o más sustituciones X3V, X9D, X9E, X18S, X43R, X43K, X49T, X61D, X76D, X115W, X120T, X120D, X182D, X182E, X185E, X185D, X188E, X188D, X194P, X205I, X206L, X209W, X216V, X217M, X218T, X222S, X255E, X255D, X256D, X256E, X259D, X259E, X260A, X260E, X260D, X261M, X261W, X262E y X262D, donde una sustitución es X262E, donde las posiciones corresponden a las posiciones de SEQ ID NO: 1, y

(b) recuperar la variante.

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

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

La mutagénesis dirigida al sitio se puede efectuar *in vitro* mediante PCR que implica el uso de cebadores oligonucleotídicos que contienen la mutación deseada. La mutagénesis dirigida al sitio también se puede realizar *in vitro* mediante mutagénesis por inserción de un casete que implica la escisión mediante una enzima de restricción en un sitio en el plásmido que comprende un polinucleótido que codifica el progenitor y la posterior ligación de un oligonucleótido que contiene la mutación en el polinucleótido. Habitualmente, 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 ligen entre sí. Véase, p. ej., Scherer y Davis, 1979, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4949-4955; y Barton y cols., 1990, *Nucleic Acids Res.* 18: 7349-4966.

La mutagénesis dirigida al sitio también se puede efectuar *in vivo* mediante métodos conocidos en la técnica. Véanse, p. ej., el documento US 2004/0171154; Storici y cols., 2001, *Nature Biotechnol.* 19: 773-776; Kren y cols., 1998, *Nat. Med.* 4: 285-290; y Calissano y Macino, 1996, *Fungal Genet. Newslett.* 43: 15-16.

Cualquier procedimiento de mutagénesis dirigida al sitio se puede usar en la presente invención. Existen muchos estuches comerciales disponibles que se pueden usar para preparar variantes.

La construcción de genes sintéticos implica la síntesis *in vitro* de una molécula polinucleotídica diseñada, para codificar un polipéptido de interés. La síntesis de genes se puede realizar utilizando un número de técnicas, tales como la tecnología basada en múltiples micromatrices descrita por Tian y cols. (2004, *Nature* 432: 1050-1054) y tecnologías similares en las que los oligonucleótidos se sintetizan y se montan sobre matrices microfluídicas fotoprogramables.

Se pueden realizar y probar sustituciones, eliminaciones y/o inserciones de aminoácidos individuales o múltiples usando métodos conocidos de mutagénesis, recombinación y/o barajado, seguidos de un procedimiento de cribado pertinente, tales como los divulgados por Reidhaar-Olson y Sauer, 1988, *Science* 241: 53-57; Bowie y Sauer, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2152-2156; el documento WO 95/17413; o el documento WO 95/22625. Otros métodos que se pueden usar incluyen PCR propensa a error, presentación en fagos (p. ej., Lowman y cols., 1991, *Biochemistry* 30: 10832-10837; el documento US 5.223.409; el documento WO 92/06204) y mutagénesis dirigida regionalmente (Derbyshire y cols., 1986, *Gene* 46: 145; Ner y cols., 1988, *DNA* 7: 127).

Los métodos de mutagénesis/barajado se pueden combinar con métodos de cribado automatizados de alto rendimiento para detectar la actividad de polipéptidos mutagenizados clonados expresados por células anfitrionas (Ness y cols., 1999, *Nature Biotechnology* 17: 893-896). Las moléculas de ADN mutagenizadas que codifican polipéptidos activos pueden recuperarse de las células anfitrionas y secuenciarse rápidamente usando métodos estándar en la técnica. Estos métodos permiten la determinación rápida de la importancia de los residuos de aminoácido individuales en un polipéptido.

La construcción de genes semisintéticos se efectúa combinando aspectos de la construcción de genes sintéticos y/o mutagénesis dirigida al sitio y/o mutagénesis aleatoria y/o barajado. La construcción semisintética se caracteriza por un procedimiento que utiliza fragmentos de polinucleótidos que se sintetizan, en combinación con técnicas de PCR. De este modo, se pueden sintetizar *de novo* regiones definidas de genes, mientras que otras regiones se pueden amplificar usando cebadores mutagénicos específicos de sitio, mientras que otras regiones más se pueden someter a

amplificación por PCR propensa a errores o a amplificación por PCR no propensa a errores. A continuación, las subsecuencias polinucleotídicas se pueden barajar.

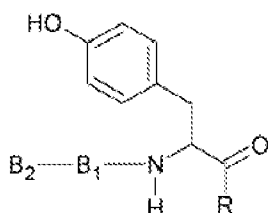
Las composiciones de limpieza líquidas según la invención comprenden, además de las proteasas según la invención, componentes adicionales tales como los componentes no limitativos indicados posteriormente. La elección de los componentes puede incluir, para el cuidado de los tejidos, la consideración del tipo de tejido a limpiar, el tipo y/o grado de suciedad, la temperatura a la que va a tener lugar la limpieza y la formulación del producto detergente.

En una realización particular, la composición de limpieza líquida de pH alto comprende una variante de proteasa de la invención y uno o más componentes de detergente, tales como tensioactivos, hidrótrofos, adyuvantes, coadyuvantes, queladores o agentes quelantes, un sistema blanqueador o componentes de blanqueo, polímeros, agentes matizadores de tejidos, acondicionadores para tejidos, potenciadores de espuma, supresores de agua jabonosa, dispersantes, inhibidores de la transferencia de tintes, agentes blanqueantes fluorescentes, perfumes, abrillantadores ópticos, bactericidas, fungicidas, agentes de suspensión de manchas, polímeros de liberación de manchas, agentes antirredespositantes, inhibidores o estabilizadores de enzimas, activadores de enzimas, antioxidantes y solubilizantes.

Las variantes de proteasa de la composición de limpieza de la invención se pueden estabilizar usando agentes estabilizantes e inhibidores de proteasas convencionales, p. ej., un poliol como propilenglicol o glicerol, un azúcar o alditol, diferentes sales como NaCl; KCl; ácido láctico, ácido fórmico, ácido bórico o un derivado de ácido bórico, p. ej., un éster de borato aromático, o un derivado de ácido fenilborónico tal como ácido 4-formilfenilborónico (p. ej. como en el documento WO96/41859), o un aldehído peptídico tal como aldehídos o análogos de aldehído di-, tri- o tetrapeptídicos (ya sea de la forma B1-B0-R en la que R es H, CH₃, CX₃, CHX₂ o CH₂X (X=halógeno), B0 es un único residuo de aminoácido (preferiblemente con una cadena lateral alifática o aromática opcionalmente sustituida); y B1 consiste en uno o más residuos de aminoácido (preferiblemente uno, dos o tres), que comprende opcionalmente un grupo de protección N-terminal (p. ej. como en los documentos WO2009/118375, WO2013/004635), o como se describe en los documentos WO2005/105826, WO 2009/118375, WO 98/13459 o un inhibidor de proteasa de tipo proteínico tal como RASI, BASI, WASI (inhibidores bifuncionales de α-amilasa/subtilisina de arroz, cebada y trigo) (p. ej. como en el documento WO2009/095425) o Cl2 o SSI.

Por otra parte, el uso de aldehídos peptídicos para estabilizar ciertas proteasas en detergentes líquidos se ha divulgado en las publicaciones PCT WO94/04651 y WO98/13460. Más específicamente, el documento WO94/04651 divulga el uso de los aldehídos peptídicos Phe-Gly-Ala-PheH y Phe-Gly-Ala-LeuH para estabilizar proteasas de tipo subtilisina. Para estabilizar proteasas de tipo quimotripsina, el documento WO94/04651 divulga Leu-Leu-TyrH como un aldehído peptídico adecuado. Por otra parte, el documento WO 94/04651 propone el carbamato de metilo o la metilurea como grupo protector N-terminal de los aldehídos peptídicos. El documento WO98/13460 divulga el uso de inhibidores de proteasas peptídicos, ya sean aldehídos o trifluorometilcetonas peptídicos, donde la cadena peptídica contiene 2-5 aminoácidos y el aldehído/la trifluorometilcetona se deriva de los aminoácidos alanina, valina, isoleucina, leucina, fenilglicina, fenilalanina u homofenilalanina y donde el grupo protector N-terminal es preferiblemente una sulfonamida o un amidofosfato. Como ejemplo, se puede utilizar CH₃SO₂Phe-Gly-Ala-LeuH.

En otra realización, un compuesto de la fórmula general I:



donde R se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, CH₃, CX₃, CHX₂, CH₂X, donde X es un átomo de halógeno, B1 es un único residuo de aminoácido y B2 es uno o más residuos de aminoácido, comprendiendo B2 opcionalmente un grupo protector N-terminal, siempre que si B1 es leucina entonces B2 no pueda ser leucina; puede usarse para estabilizar y/o inhibir una variante de proteasa de la presente invención.

En otra realización, un inhibidor de proteasa es un compuesto peptídico de la fórmula B2-B1-B0-R en la que:

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 único residuo de aminoácido; y

B2 consiste en uno o más residuos de aminoácido, comprendiendo opcionalmente un grupo protector N-terminal.

Dicho inhibidor de proteasa de la fórmula B2-B1-B0-R que se describe anteriormente se puede usar como un inhibidor

de proteasa opcional en el sentido la presente invención (p. ej. en combinación con o como parte de cualquier realización de la presente invención según se divulga en el presente documento)

Así, en otra realización, la invención se refiere a una composición de limpieza líquida que tiene un pH 10 o superior, que comprende:

- 5 (a) al menos 0,01% en peso de proteasa, donde la proteasa es una variante de una proteasa progenitora y donde la variante de proteasa tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 60% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y donde dicha variante de proteasa se caracteriza por tener una actividad residual al menos 10% superior que la proteasa progenitora cuando se mide después de 4 horas a 40°C en detergente líquido con pH 10;
- 10 (b) opcionalmente, un inhibidor de proteasa, preferiblemente dicho inhibidor de proteasa es un inhibidor de proteasa de aldehído peptídico, más preferiblemente dicho inhibidor de proteasa es un compuesto de la fórmula general I, donde R se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, CH₃, CX₃, CHX₂, CH₂X, donde X es un átomo de halógeno, B1 es un único residuo de aminoácido y B2 es uno o más residuos de aminoácido, comprendiendo B2 opcionalmente un grupo protector N-terminal, siempre que si B1 es leucina entonces B2 no pueda ser leucina.

15 En otra realización, la invención se refiere a una composición de limpieza líquida que comprende:

- (a) de 20% a 95% en peso, preferiblemente de 40% a 95% en peso, más preferiblemente de aproximadamente 70% a aproximadamente 90% en peso, de agua;
- (b) al menos 0,01% en peso de proteasa, donde la proteasa es una variante de una proteasa progenitora y donde la variante de proteasa tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 60% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y donde dicha variante de proteasa se caracteriza por tener una actividad residual al menos 10% superior que la proteasa progenitora cuando se mide después de 4 horas a 40°C en detergente líquido con pH 10;
- 20 (c) opcionalmente, un inhibidor de proteasa, preferiblemente dicho inhibidor de proteasa es un inhibidor de proteasa de aldehído peptídico, más preferiblemente dicho inhibidor de proteasa es un compuesto de la fórmula general I, donde R se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, CH₃, CX₃, CHX₂, CH₂X, donde X es un átomo de halógeno, B1 es un único residuo de aminoácido y B2 es uno o más residuos de aminoácido, comprendiendo B2 opcionalmente un grupo protector N-terminal, siempre que si B1 es leucina entonces B2 no pueda ser leucina.
- 25

En otra realización, la invención se refiere a una composición de limpieza líquida que comprende:

- (a) de 0% a 20% en peso, preferiblemente de 0,1% a 2,5% en peso, de un tensioactivo detergente;
- 30 (b) de 0,1% a 5% en peso de una variante de proteasa; y
- (c1) de 20% a 95% en peso, preferiblemente de 40% a 95% en peso, más preferiblemente de aproximadamente 70% a aproximadamente 90% en peso, de agua; y/o
- (c2) de 1% a 30% en peso de un sistema tamponador alcalino que comprende un silicato de metal alcalino o un hidróxido de metal alcalino o una mezcla de los mismos, para proporcionar un pH de aproximadamente 11 a 13,5, preferiblemente el pH es de aproximadamente 12 a 13,5;
- 35 (d) opcionalmente, un inhibidor de proteasa, preferiblemente dicho inhibidor de proteasa es un inhibidor de proteasa de aldehído peptídico, más preferiblemente dicho inhibidor de proteasa es un compuesto de la fórmula general I, donde R se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, CH₃, CX₃, CHX₂, CH₂X, donde X es un átomo de halógeno, B1 es un único residuo de aminoácido y B2 es uno o más residuos de aminoácido, comprendiendo B2 opcionalmente un grupo protector N-terminal, siempre que si B1 es leucina entonces B2 no pueda ser leucina.
- 40

En dicha realización, (c1) y (c2) se pueden usar como alternativas o en combinación entre sí.

La composición se puede formular como se describe, p. ej., en los documentos WO 92/19709, WO 92/19708 y US 6.472.364. En algunas realizaciones, las enzimas empleadas en el presente documento se estabilizan mediante la presencia de fuentes solubles en agua de iones cinc (II), calcio (II) y/o magnesio (II) en las composiciones terminadas que proporcionan estos iones a las enzimas, así como otros iones metálicos (p. ej., bario (II), escandio (II), hierro (II), manganeso (II), aluminio (III), estaño (II), cobalto (II), cobre (II), níquel (II) y oxovanadio (IV).

También se puede incorporar una variante de proteasa de la presente invención en las formulaciones detergentes divulgadas en el documento WO 97/07202, que se incorpora a la presente como referencia.

Una composición de limpieza líquida de la invención se caracteriza por tener un pH alto (a pH 10 o superior). La composición de limpieza líquida de pH alto puede comprender además una gran cantidad de agua.

En un aspecto preferido de la invención, la composición de limpieza líquida comprende:

- (a) de 0% a 20% en peso, preferiblemente 0,1% a 2,5% en peso, de un tensioactivo detergente;
- (b) de 40% a 95% en peso, preferiblemente de aproximadamente 70% a aproximadamente 90% en peso, de agua;
- (c) de 1% a 30% en peso de un sistema tamponador alcalino que comprende un silicato de metal alcalino o un hidróxido de metal alcalino o una mezcla de los mismos, para proporcionar un pH de aproximadamente 11 a 13,5; y
- (d) de 0,1% a 5% en peso de una variante de proteasa.

Los tensioactivos pueden ser aniónicos y/o catiónicos y/o iniónicos y/o semipolares y/o dipolares, o una mezcla de los mismos. En una realización particular, la composición de limpieza incluye una mezcla de uno o más tensioactivos iniónicos y uno o más tensioactivos aniónicos. El tensioactivo o los tensioactivos están típicamente presentes en un nivel de aproximadamente 0,1% a 60% en peso, tal como de aproximadamente 1% a aproximadamente 40%, o de aproximadamente 3% a aproximadamente 20%, o de aproximadamente 3% a aproximadamente 10%. Cuando se incluyen en una composición de limpieza según la invención, los tensioactivos contendrán habitualmente de aproximadamente 1% a aproximadamente 40% en peso, tal como de aproximadamente 1% a aproximadamente 20%, preferiblemente de aproximadamente 0% a aproximadamente 5% en peso. Ejemplos no limitativos de tensioactivos aniónicos incluyen sulfatos y sulfonatos, en particular, alquilbencenosulfonatos lineales (LAS), isómeros de LAS, alquilbencenosulfonatos ramificados (BABS), fenilalcanosulfonatos, α -olefinsulfonatos (AOS), olefinsulfonatos, alquenosulfonatos, alcano-2,3-diilbis(sulfatos), hidroxialcanosulfonatos y disulfonatos, alquilsulfatos (AS) tales como dodecilsulfato de sodio (SDS), alcohol graso-sulfatos (FAS), alcohol primario-sulfatos (PAS), alcoholesulfatos (AES o AEOS o FES, también conocidos como alcoholesulfatos o alcohol graso-etersulfatos), alcano secundario-sulfonatos (SAS), parafinsulfonatos (PS), estersulfonatos, ésteres glicéricos de ácidos grasos sulfonados, ésteres metílicos de ácidos grasos sulfonados en α (α -SFMe o SES), incluyendo metilestersulfonato (MES), ácido alquil- o alquensulfónico, ácido dodecenil/tetradecenilsulfónico (DTSA), derivados de ácido graso de aminoácidos, diésteres y monoésteres de ácido sulfosulfónico o jabón, y combinaciones de los mismos.

Cuando se incluye, la composición de limpieza según la invención habitualmente contendrá de aproximadamente 0% a aproximadamente 10% en peso de un tensioactivo catiónico. Ejemplos no limitativos de tensioactivos catiónicos incluyen alquildimetilbetainolaminocuat (ADMEAQ), bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), cloruro de dimetildistearilamonio (DSDMAC) y alquilbencildimetilamonio, compuestos de alquil-amonio cuaternario, compuestos de amonio cuaternario alcoxilado (AQA), y combinaciones de los mismos.

Ejemplos no limitativos de tensioactivos iniónicos incluyen etoxilatos de alcohol (AE o AEO), propoxilatos de alcohol, alcoholes grasos propoxilados (PFA), ésteres alquílicos de ácidos grasos alcoxilados, tales como ésteres alquílicos de ácidos grasos etoxilados y/o propoxilados, etoxilatos de alquilfenol (APE), etoxilatos de nonilfenol (NPE), 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 polihidroxialquilados, o derivados *N*-acílicos, *N*-alquílicos de glucosamina (glucamidas, GA, o glucamida de ácidos grasos, FAGA), así como productos disponibles con los nombres comerciales SPAN y TWEEN, y combinaciones de los mismos.

Ejemplos no limitativos de tensioactivos semipolares incluyen óxidos de amina (AO) tales como óxido de alquildimetilamina, óxido de *N*-(cocoalquil)-*N,N*-dimetilamina y óxido de *N*-(seboalquil)-*N,N*-bis(2-hidroxiethyl)amina, alcanolamidas de ácidos grasos y alcanolamidas de ácidos grasos etoxilados, y combinaciones de los mismos.

Ejemplos no limitativos de tensioactivos dipolares incluyen betaína, alquildimetilbetaína, sulfobetaína, y combinaciones de las mismas.

Tensioactivos particularmente preferidos incluyen LAS, MES, alcoholesulfato, alcohol laurílico etoxilado o dodecilsulfonato de sodio.

Una composición de limpieza líquida de pH alto según la invención contiene típicamente al menos 20% en peso y hasta 95% en peso de agua, tal como hasta aproximadamente 70% en peso de agua, hasta aproximadamente 65% en peso de agua, hasta aproximadamente 55% en peso de agua, hasta aproximadamente 45% en peso de agua, hasta aproximadamente 35% en peso de agua. Otros tipos de líquidos, incluyendo, entre otros, alcoholes, aminas, dioles, éteres y polioles, se pueden incluir en la composición de limpieza líquida. La composición de limpieza puede contener 0-30% de disolvente orgánico.

La composición de limpieza también puede contener un hidrótrofo que es un compuesto que solubiliza compuestos hidrófobos en soluciones acuosas (o, por el contrario, sustancias polares en un entorno apolar). Típicamente, los hidrótrofos tienen caracteres tanto hidrófilos como hidrófobos (las denominadas propiedades anfílicas que se conocen en los tensioactivos); sin embargo, la estructura molecular de los hidrótrofos generalmente no favorece la autoagregación espontánea, véase, p. ej., la revisión de Hodgdon y Kaler, 2007, *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 12: 121-128. Los hidrótrofos no presentan una concentración crítica por encima de la cual se produce la autoagregación como se encuentra en los tensioactivos y lípidos que forman mesofases micelares, laminares u otras bien definidas. En cambio, muchos hidrótrofos muestran un proceso de agregación de tipo continuo en el que los

tamaños de los agregados crecen a medida que se incrementa la concentración. Sin embargo, muchos hidrótropos alteran el comportamiento de fase, la estabilidad y las propiedades coloidales de sistemas que contienen sustancias de carácter polar y apolar, incluyendo mezclas de agua, aceite, tensioactivos y polímeros. Los hidrótropos se usan clásicamente en industrias que van desde la farmacéutica, la del cuidado personal y la alimentaria hasta aplicaciones técnicas. El uso de hidrótropos en composiciones de limpieza permite, por ejemplo, formulaciones más concentradas de tensioactivos (como en el procedimiento de compactación de detergentes líquidos eliminando agua) sin inducir fenómenos no deseados tales como separación de fases o alta viscosidad. La composición de limpieza según la invención puede contener 0-5% en peso, tal como de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5%, o de aproximadamente 3% a aproximadamente 5% en peso, de un hidrótropo. Se puede utilizar cualquier hidrótropo conocido en la técnica para uso en detergentes. Ejemplos no limitativos de hidrótropos incluyen bencenosulfonato de sodio, p-toluenosulfonato de sodio (STS), xilenosulfonato de sodio (SXS), cumenosulfonato de sodio (SCS), cimenosulfonato de sodio, óxidos de amina, alcoholes y poliglicólicos, hidroxinaftoato de sodio, hidroxinaftalenosulfonato de sodio, etilhexilsulfato de sodio y combinaciones de los mismos. La composición de limpieza según la invención puede contener aproximadamente 0-65% en peso, tal como de aproximadamente 5% a aproximadamente 45%, de un adyuvante o coadyuvante del detergente, o una mezcla de los mismos. En un detergente para lavado de vajillas, el nivel de adyuvante es típicamente de 40-65%, en particular 50-65%. Los adyuvantes y queladores suavizan, p. ej., el agua de lavado eliminando los iones metálicos del líquido. El adyuvante y/o coadyuvante puede ser particularmente un agente quelante que forma complejos hidrosolubles con Ca y Mg. Se puede utilizar cualquier adyuvante y/o coadyuvante conocido en la técnica para su uso en detergentes para el lavado de ropa. Ejemplos no limitativos de adyuvantes incluyen zeolitas, difosfatos (pirofosfatos), trifosfatos tales como trifosfato de sodio (STP o STPP), carbonatos tales como carbonato de sodio, silicatos solubles tales como metasilicato de sodio, silicatos estratificados (p. ej., SKS-6 de Hoechst), etanolaminas tales como 2-aminoetan-1-ol (MEA), dietanolamina (DEA, también conocida como iminodietanol), trietanolamina (TEA, también conocida como 2,2',2''-nitrilotrietanol) y carboximetilululina (CMI), y combinaciones de los mismos.

La composición de limpieza según la invención también puede contener 0-20% en peso, tal como de aproximadamente 5% a aproximadamente 10% en peso, de un coadyuvante del detergente, o una mezcla de los mismos. La composición detergente puede incluir un coadyuvante solo o en combinación con un adyuvante, por ejemplo un adyuvante de zeolita. Ejemplos no limitativos de coadyuvantes incluyen homopolímeros de poliácridatos o copolímeros de los mismos, tales como poli(ácido acrílico) (PAA) o copoli(ácido acrílico/ácido maleico) (PAA/PMA). Ejemplos no limitativos adicionales incluyen citrato, queladores tales como aminocarboxilatos, aminopolicarboxilatos y fosfonatos, y ácido alquil- o alquénilsuccínico. 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 metilglicinodiacético (MGDA), ácido glutámico-ácido *N,N*-diacético (GLDA), ácido 1-hidroxietano-1,1-difosfónico (HEDP), etilendiaminotetra-(ácido metilfosfónico) (EDTMPA), dietilentriaminopentaquis(ácido metilfosfónico) (DTPMPA o DTPMP), 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 -alanino-*N,N*-diacético (α -ALDA), ácido serino-*N,N*-diacético (SEDA), ácido isoserino-*N,N*-diacético (ISDA), ácido fenilalanino-*N,N*-diacético (PHDA), ácido antranílico-ácido *N,N*-diacético (ANDA), ácido sulfanílico-ácido *N,N*-diacético (SLDA), ácido taurino-*N,N*-diacético (TUDA) y ácido sulfometil-*N,N*-diacético (SMDA), *N,N,N'*-triacetato de *N*-(2-hidroxietil)etilendiamina (HEDTA), dietanoglicina (DEG), dietilentriaminopenta(ácido metilfosfónico) (DTPMP), aminotris(ácido metilfosfónico) (ATMP), y combinaciones y sales de los mismos. Adyuvantes y/o coadyuvantes ejemplares adicionales se describen, p. ej., en los documentos WO 2009/102854 y US 5.977.053

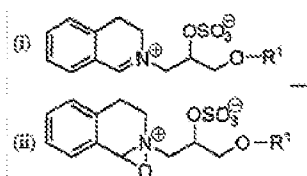
La composición de limpieza según la invención puede contener 0-50% en peso, tal como de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 25%, de un sistema blanqueador. Los sistemas de blanqueo eliminan la decoloración a menudo mediante oxidación, y muchos blanqueadores también tienen fuertes propiedades bactericidas y se usan para desinfectar y esterilizar. Puede utilizarse cualquier sistema blanqueador conocido en la técnica para el uso en detergentes para el lavado de ropa. Componentes adecuados de sistemas de blanqueo incluyen catalizadores de blanqueo, hipoclorito, fotoblanqueadores, activadores del blanqueo, fuentes de peróxido de hidrógeno tales como percarbonato de sodio y perboratos de sodio, perácidos preformados y mezclas de los mismos.

Algunos ejemplos no limitativos de catalizadores de blanqueo que pueden usarse en las composiciones de la presente invención incluyen catalizadores de oxalato de manganeso, acetato de manganeso, manganeso-colágeno, amina de cobalto y catalizadores de triazaciclononano de manganeso (MnTACN); particularmente preferidos son los complejos de manganeso con 1,4,7-trimetil-1,4,7-triazaciclononano (Me₃-TACN) o 1,2,4,7-tetrametil-1,4,7-triazaciclononano (Me₄-TACN), en particular Me₃-TACN, tales como el complejo dinuclear de manganeso [(Me₃-TACN)₂Mn(O)₃Mn(Me₃-TACN)](PF₆)₂, y [2,2',2''-nitrilotris(etano-1,2-diilazaniiliden)-*k*N-metanililiden]trifenolato-*k*3O]manganeso(III). Los catalizadores de blanqueo también pueden ser otros compuestos metálicos, tales como complejos de hierro o cobalto.

Perácidos preformados adecuados incluyen, entre otros, ácidos y sales peroxicarboxílicos, ácidos y sales percarbónicos, ácidos y sales perimídicos, ácidos y sales peroximonosulfúricos, por ejemplo, Oxone (R), y mezclas de los mismos. Ejemplos no limitativos de sistemas blanqueadores incluyen sistemas blanqueadores basados en peróxido, que pueden comprender, por ejemplo, una sal inorgánica, incluyendo sales de metales alcalinos tales como

sales sódicas de perborato (habitualmente mono- o tetrahidrato), sales de percarbonato, persulfato, perfosfato, persilicato, en combinación con un activador del blanqueador formador de perácidos. El término activador del blanqueo se refiere en el presente documento a un compuesto que reacciona con un blanqueador peroxigenado como peróxido de hidrógeno para formar un perácido. El perácido así formado constituye el blanqueador activado. Activadores del blanqueo adecuados para ser usados en el presente documento incluyen aquellos que pertenecen a la clase esteramidas, imidas o anhídridos. Ejemplos adecuados son tetracetiletilendiamina (TAED), 4-[(3,5,5-trimetilhexanoil)oxi]bencenosulfonato de sodio (ISONOBS), ácido diperoxidodecanoico, 4-(dodecanoiloxi)bencenosulfonato (LOBS), 4-(decanoiloxi)bencenosulfonato, 4-(decanoiloxi)benzoato (DOBS), 4-(nonanoiloxi)bencenosulfonato (NOBS), y/o los divulgados en el documento WO 98/17767. En el documento EP 624154 se divulgó una familia particular de activadores del blanqueo y, particularmente, citrato de acetiltriethyl (ATC). El ATC o un triglicérido de cadena corta como la triacetina tiene la ventaja de que es respetuoso con el medio ambiente ya que finalmente se degrada en ácido cítrico y alcohol. Por otra parte, el citrato de acetiltriethyl y la triacetina tienen una buena estabilidad hidrolítica en el producto durante el almacenamiento y son un activador del blanqueo eficaz. Finalmente, el ATC proporciona una buena capacidad adyuvante al aditivo para el lavado de ropa. Alternativamente, el sistema blanqueador puede comprender peroxiácidos de, por ejemplo, tipo amida, imida o sulfona. El sistema blanqueador también puede comprender perácidos tales como ácido 6-(ftalimido)peroxihexanoico (PAP). El sistema blanqueador también puede incluir un catalizador del blanqueo.

En algunas realizaciones, el componente de blanqueo puede ser un catalizador orgánico seleccionado del grupo que consiste en catalizadores orgánicos que tienen la siguiente fórmula:



(iii) y mezclas de los mismos; donde cada R^1 es independientemente un grupo alquilo ramificado que contiene de 9 a 24 carbonos o un grupo alquilo lineal que contiene de 11 a 24 carbonos, preferiblemente cada R^1 es independientemente un grupo alquilo ramificado que contiene de 9 a 18 carbonos o un grupo alquilo lineal que contiene de 11 a 18 carbonos, más preferiblemente cada R^1 se selecciona independientemente 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 isopentadecilo. Otros sistemas de blanqueo ejemplares se describen, p. ej., en los documentos WO 2007/087258, WO 2007/087244, WO 2007/087259 y WO 2007/087242. Fotoblanqueadores adecuados pueden ser, por ejemplo, ftalocianina de cinc sulfonada.

Un agente blanqueador particular es el hipoclorito tal como el hipoclorito de sodio (NaClO). El hipoclorito se estabiliza con un pH alto y, además, el hipoclorito es antibacteriano. En general, una composición de limpieza según la invención contiene 3-8% de hipoclorito de sodio y 0,01-0,05% de hidróxido de sodio; el hidróxido de sodio se usa para retardar la descomposición del hipoclorito de sodio en cloruro de sodio y clorato de sodio. Es posible que el hipoclorito no forme parte de una fórmula detergente sino de un producto separado añadido durante el procedimiento de lavado.

En un aspecto de la invención, una composición de limpieza de pH alto de la invención no comprende ningún agente blanqueador, es decir, la composición de limpieza puede estar libre de blanqueador.

La composición de limpieza según la invención puede contener 0-10% en peso, tal como 0,5-5%, 2-5%, 0,5-2% o 0,2-1% de un polímero. Puede utilizarse cualquier polímero conocido en la técnica para uso en detergentes. El polímero puede funcionar como coadyuvante según se mencionó anteriormente, o puede proporcionar propiedades antirredespositantes, de protección de fibras, de liberación de manchas, de inhibición de la transferencia de tinte, de limpieza de grasa y/o antiespumantes. Algunos polímeros pueden tener más de una de las propiedades mencionadas anteriormente y/o más de uno de los motivos mencionados posteriormente. Polímeros ejemplares incluyen (carboximetil)celulosa (CMC), poli(alcohol vinílico) (PVA), poli(vinilpirrolidona) (PVP), poli(etilenglicol) o poli(óxido de etileno) (PEG), poli(etilenimina) etoxilada, carboximetilulnulina. (CMI), y policarboxilatos tales como PAA, PAA/PMA, poli(ácido aspártico) y copolímeros de metacrilato de laurilo/ácido acrílico, CMC modificada hidrófobamente (HM-CMC) y siliconas, copolímeros de ácido tereftálico y glicoles oligoméricos, copolímeros de poli(tereftalato de etileno) y poli(tereftalato de oxietano) (PET-POET), PVP, poli(vinilimidazol) (PVI), poli(N-óxido de vinilpiridina) (PVPO o PVPNO) y polivinilpirrolidona-vinilimidazol (PVPVI). Polímeros ejemplares adicionales incluyen policarboxilatos sulfonados, poli(óxido de etileno) y poli(óxido de propileno) (PEO-PPO) y etoxisulfato de dicuaturnio. Otros polímeros ejemplares se divulgan, p. ej., en el documento WO 2006/130575. También se contemplan sales de los polímeros mencionados anteriormente. Las composiciones de limpieza de la presente invención también pueden incluir agentes matizadores de tejidos tales como tintes o pigmentos, que cuando se formulan en composiciones detergentes pueden depositarse sobre un tejido cuando el tejido se pone en contacto con un líquido de lavado que comprende las composiciones detergentes y altera así el tono del tejido a través de absorción/reflexión de la luz visible. Los agentes blanqueantes fluorescentes emiten al menos algo de luz visible. Por el contrario, los agentes matizadores de tejidos alteran el tono de una superficie ya que absorben al menos una porción del espectro de luz visible. Agentes matizadores de tejidos

adecuados incluyen tintes y conjugados de tinte-arcilla, y también pueden incluir pigmentos. Tintes adecuados incluyen tintes micromoleculares y tintes poliméricos. Tintes micromoleculares adecuados incluyen tintes micromoleculares seleccionados del grupo que consiste en tintes que se encuentran en las clasificaciones del Colour 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 de los mismos, por ejemplo según se describe en los documentos WO 2005/003274, WO 2005/003275, WO 2005/003276 y EP 1876226 (incorporados en el presente documento como referencia). La composición detergente comprende preferiblemente de aproximadamente 0,00003% en peso a aproximadamente 0,2% en peso, de aproximadamente 0,00008% en peso a aproximadamente 0,05% en peso, o incluso de aproximadamente 0,0001% en peso a aproximadamente 0,04% en peso de agente matizador de tejidos. La composición puede comprender de 0,0001% en peso a 0,2% en peso de agente matizador de tejidos, esto puede preferirse especialmente cuando la composición está en forma de una bolsa de dosis unitaria. Agentes matizadores adecuados también se divulgan, p. ej., en los documentos WO 2007/087257 y WO 2007/087243.

La composición de limpieza según la invención puede comprender una o más enzimas (adicionales) tales como una amilasa, perhidrolasa, arabinasa, carbohidrasa, celulasa (p. ej., endoglucanasa), cutinasa, galactanasa, haloperoxigenasa, lipasa, mananasa, oxidasa, p. ej., lacasa y/o peroxidasa, pectinasa, pectina liasas, proteasa, ADNasas, xilanasas, xantanasa y xiloglucanasa.

En general, las propiedades de la enzima o las enzimas seleccionadas deben ser compatibles con el detergente (es decir, pH óptimo, compatibilidad con otros ingredientes enzimáticos y no enzimáticos, etc.), y la enzima o las enzimas deben estar presentes en cantidades eficaces.

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

Celulasas especialmente adecuadas son las celulasas alcalinas o neutras que tienen beneficios para el cuidado del color. Celulasas disponibles comercialmente incluyen Celluzyme™ y Carezyme™ (Novozymes A/S), Clazinas™ y Puradax HA™ (Genencor International Inc.) y KAC-500 (B)™ (Kao Corporation).

La composición puede comprender una o más proteasas adicionales incluyendo las de origen bacteriano, fúngico, vegetal, viral o animal, p. ej., de origen vegetal o microbiano. Se prefiere el origen microbiano. Se incluyen mutantes modificados químicamente o modificados con proteínas. Puede ser una proteasa alcalina, tal como una serina proteasa o una metaloproteasa. Una serina proteasa puede ser, por ejemplo, de la familia S1, tal como tripsina, o de la familia S8, tal como subtilisina. Una proteasa metaloproteasa puede ser, por ejemplo, una termolisina de, p. ej., la familia M4 u otra metaloproteasa, tales como las de las familias M5, M7 o M8.

Ejemplos de metaloproteasas son la metaloproteasa neutra que se describe en el documento WO 2007/044993 (Genencor Int.), tales como las derivadas de *Bacillus amyloliquefaciens*.

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

Lipasas y cutinasas adecuadas incluyen las de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen enzimas mutantes modificadas químicamente o manipuladas con proteínas. Ejemplos incluyen lipasa de *Thermomyces*, p. ej., de *T. lanuginosus* (anteriormente denominada *Humicola lanuginosa*) que se describe en los documentos EP 258068 y EP 305216, cutinasa de *Humicola*, p. ej., *H. insolens* (documento WO 96/13580), lipasa de cepas de *Pseudomonas* (algunas de ellas ahora renombradas como *Burkholderia*), p. ej., *P. alcaligenes* o *P. pseudoalcaligenes* (documento EP 218272), *P. cepacia* (documento EP 331376), *P. sp.* cepa SD705 (documentos WO 95/06720 y WO 96/27002), *P. wisconsinensis* (documento WO 96/12012), lipasas de *Streptomyces* tipo GDSL (documento WO 2010/065455), cutinasa de *Magnaporthe grisea* (documento WO 2010/107560), cutinasa de *Pseudomonas mendocina* (documento US 5.389.536), lipasa de *Thermobifida fusca* (documento WO 2011/084412), lipasa de *Geobacillus stearothermophilus* (documento WO 2011/084417), lipasa de *Bacillus subtilis* (documento WO 2011/084599) y lipasa de *Streptomyces griseus* (documento WO 2011/150157) y *S. pristinaespiralis* (documento WO 2012/137147). Productos de lipasa comerciales preferidos incluyen Lipolase™, Lipex™, Lipoplex™ y Lipoclean™ (Novozymes A/S), Lumafast (originalmente de Genencor) y Lipomax (originalmente de Gist-Brocades).

Otros ejemplos más son las lipasas a las que a veces se hace referencia como aciltransferasas o perhidrolasas, p. ej., aciltransferasas con homología con lipasa A de *Candida antarctica* (documento WO 2010/111143), aciltransferasa de

Mycobacterium smegmatis (documento WO 2005/056782), perhidrolasas de la familia CE 7 (documento WO 2009/067279), 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 (documento WO 2010/100028).

5 Amilasas adecuadas pueden ser una α -amilasa o una glucoamilasa y pueden ser de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen mutantes modificados químicamente o manipulados con proteínas. Amilasas disponibles comercialmente son Duramyl™, Termamyl™, Fungamyl™ Stainzyme™, Stainzyme Plus™ Natalase™, Liquozyme X y BAN™ (de Novozymes A/S) y Rapidase™, Purastar™/Effectenz™, Powerase, Preferenz S1000, Preferenz S100 y Preferenz S110 (de Genencor International Inc./DuPont).

10 Peroxidasas/oxidasas adecuadas incluyen las de origen vegetal, bacteriano o fúngico. Se incluyen mutantes modificados químicamente o manipulados con proteínas. Ejemplos de peroxidasas útiles incluyen peroxidasas de *Coprinus*, p. ej., de *C. cinereus*, y variantes de los mismos, como las descritas en los documentos WO 93/24618, WO 95/10602 y WO 98/15257.

Peroxidasas disponibles comercialmente incluyen Guardzyme™ (Novozymes A/S).

15 La enzima o las enzimas detergentes se pueden incluir en la composición de limpieza añadiendo aditivos separados que contienen una o más enzimas, o añadiendo un aditivo combinado que comprende todas estas enzimas. Un aditivo de detergente de la invención, es decir, un aditivo separado o un aditivo combinado, puede formularse, por ejemplo, como un granulado, un líquido, una suspensión, etc. Formulaciones de aditivos de detergentes preferidas son granulados, en particular granulados no pulverulentos, líquidos, en particular líquidos estabilizados, o suspensiones.

20 También se puede utilizar cualquier componente detergente conocido en la técnica para el uso en composiciones de limpieza de ropa. Otros componentes de detergentes opcionales incluyen agentes anticorrosivos, agentes antiencogimiento, agentes antirredespositantes de manchas, agentes antiarrugamiento, bactericidas, aglutinantes, inhibidores de la corrosión, disgregantes/agentes de disgregación, tintes, estabilizadores de enzimas (incluyendo ácido bórico, boratos, CMC, y/o polioles tales como propilenglicol), acondicionadores para tejidos, incluyendo arcillas, rellenos/auxiliares de procesamiento, agentes blanqueantes fluorescentes/abrillantadores ópticos, potenciadores de la espuma, reguladores de la espuma (agua jabonosa), perfumes, agentes de suspensión de manchas, suavizantes, supresores de agua jabonosa, inhibidores del deslustre, y agentes absorbentes, solos o en combinación. Se puede utilizar cualquier ingrediente conocido en la técnica para uso en detergentes para el lavado de ropa. La elección de estos ingredientes está dentro de la capacidad del experto.

30 Las composiciones de limpieza de la presente invención también pueden contener dispersantes. Materiales orgánicos hidrosolubles adecuados incluyen los ácidos homo- o copoliméricos o sus sales, en los que el poli(ácido carboxílico) comprende al menos dos radicales carboxilo separados entre sí por no más de dos átomos de carbono. Dispersantes adecuados se describen, por ejemplo, en Powdered Detergents, Surfactant science series volumen 71, Marcel Dekker, Inc.

35 Las composiciones de limpieza de la presente invención también pueden incluir uno o más agentes inhibidores de la transferencia de tintes. Agentes inhibidores de la transferencia de tintes poliméricos adecuados incluyen, entre otros, polímeros de polivinilpirrolidona, polímeros de poli(N-óxido de amina), copolímeros de N-vinilpirrolidona y N-vinilimidazol, poliviniloxazolidonas y polivinilimidazoles o mezclas de los mismos. Cuando están presentes en una composición determinada, los agentes inhibidores de la transferencia de tintes pueden estar presentes a niveles de aproximadamente 0,0001% a aproximadamente 10%, de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 5% o incluso de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 3% en peso de la composición.

40 Las composiciones de limpieza de la presente invención también contendrán preferiblemente componentes adicionales que puedan teñir los artículos que se limpian, tales como un agente blanqueante fluorescente o abrillantadores ópticos. Cuando esté presente, el abrillantador está preferiblemente a un nivel de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 0,5%. Cualquier agente blanqueante fluorescente adecuado para el uso en una
45 composición detergente para el lavado de ropa se puede usar en la composición de la presente invención. Los agentes blanqueantes fluorescentes más comúnmente usados son los que pertenecen a las clases de derivados de ácido diaminoestilbenosulfónico, derivados de diarilpirazolina y derivados de bisfenilidestirilo. Ejemplos del tipo de derivado del ácido diaminoestilbenosulfónico de agentes blanqueantes fluorescentes incluyen las sales sódicas de: 4,4'-bis-(2-dietanolamino-4-anilino-s-triazin-6-ilamino)estilbeno-2,2'-disulfonato; 4,4'-bis-(2,4-dianilino-s-triazin-6-ilamino)estilbeno-2,2'-disulfonato; 4,4'-bis-(2-anilino-4(N-metil-N-2-hidroxiethylamino)-s-triazin-6-ilamino)estilbeno-2,2'-disulfonato, 4,4'-bis-(4-fenil-2,1,3-triazol-2-il)estilbeno-2,2'-disulfonato; 4,4'-bis-(2-anilino-4(1-metil-2-hidroxiethylamino)-s-triazin-6-ilamino)estilbeno-2,2'-disulfonato y 2-(estilbil-4"-nafto-1,2':4,5)-1,2,3-triazol-2"-sulfonato. Agentes
50 blanqueantes fluorescentes preferidos son Tinopal DMS y Tinopal CBS disponibles de Ciba-Geigy AG, Basilea, Suiza. Tinopal DMS es la sal disódica de 4,4'-bis-(2-morfolino-4-anilino-s-triazin-6-ilamino)estilbenodisulfonato. Tinopal CBS es la sal disódica de 2,2'-bis-(fenilestirilo)disulfonato. También se prefieren los agentes blanqueantes fluorescentes es Parawhite KX disponible comercialmente, suministrado por Paramount Minerals and Chemicals, Mumbai, India. Otros agentes fluorescentes adecuados para el uso en la invención incluyen las 1-3-diarilpirazolininas y las 7-alquilaminocumarinas. Niveles de abrillantador fluorescente adecuados incluyen niveles inferiores de aproximadamente 0,01, de 0,05, de aproximadamente 0,1 o incluso de aproximadamente 0,2% en peso hasta niveles

superiores de 0,5 o incluso 0,75% en peso.

Las composiciones de limpieza de la presente invención también pueden incluir uno o más polímeros de liberación de manchas que ayudan a eliminar manchas de tejidos tales como tejidos a base de algodón y poliéster, en particular la eliminación de manchas hidrófobas de tejidos a base de poliéster. Los polímeros de liberación de manchas pueden ser, por ejemplo, polímeros a base de tereftalato, polivinilcaprolactama y copolímeros relacionados, iónicos o aniónicos, copolímeros de injerto de vinilo, poliamidas de poliéster, véase, por ejemplo, el Capítulo 7 de Powdered Detergents, Surfactant science series volumen 71, Marcel Dekker, Inc. Otro tipo de polímeros de liberación de manchas son polímeros de limpieza de grasa alcoxilados anfífilos que comprenden una estructura central y una pluralidad de grupos alcoxilato ligados a esa estructura central. La estructura central puede comprender una estructura de polialquilénimina o una estructura de polialcanolamina según se describe en detalle en el documento WO 2009/087523 (incorporado en el presente documento como referencia). Por otra parte, los copolímeros de injerto aleatorios son polímeros de liberación de manchas adecuados. Copolímeros de injerto adecuados se describen con más detalle en los documentos WO 2007/138054, WO 2006/108856 y WO 2006/113314 (incorporados en el presente documento como referencia). Otros polímeros de liberación de manchas son estructuras polisacáridicas sustituidas, especialmente estructuras celulósicas sustituidas tales como derivados de celulosa modificada tales como los descritos en los documentos EP 1867808 o WO 03/040279 (ambos se incorporan en el presente documento como referencia). Polímeros celulósicos adecuados incluyen celulosa, éteres de celulosa, ésteres de celulosa, amidas de celulosa y mezclas de los mismos. Polímeros celulósicos adecuados incluyen celulosa modificada aniónicamente, celulosa modificada iónicamente, celulosa modificada catiónicamente, celulosa modificada dipolarmente y mezclas de las mismas. Polímeros celulósicos adecuados incluyen metilcelulosa, carboximetilcelulosa, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, estercarboximetilcelulosa y mezclas de las mismas.

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

Otros materiales auxiliares adecuados incluyen, entre otros, agentes antiencogimiento, agentes antiarrugamiento, bactericidas, aglutinantes, vehículos, tintes, estabilizadores de enzimas, suavizantes de tejidos, cargas, reguladores de la espuma, hidrótrofos, perfumes, pigmentos, sudóricos, disolventes y estructurantes para detergentes líquidos y/o agentes elastificantes de la estructura.

La composición de limpieza de la invención se puede formular en bolsas que se pueden configurar como compartimentos únicos o múltiples. Puede tener cualquier forma, conformación y material que sea adecuado para contener la composición, p. ej., sin permitir la liberación de la composición desde la bolsa antes del contacto con el agua. La bolsa está hecha de una película hidrosoluble que encierra un volumen interno. El volumen interno se puede dividir en compartimentos de la bolsa. Películas preferidas son materiales poliméricos, preferiblemente polímeros que se forman como una película o lámina. Polímeros, copolímeros o derivados de los mismos preferidos son poliácridatos seleccionados y copolímeros de acrilato hidrosolubles, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, dextrina sódica, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, maltodextrina, polimetacrilatos, lo más preferiblemente copolímeros de poli(alcohol vinílico) e hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC). Preferiblemente, el nivel de polímero en la película, por ejemplo PVA, es al menos aproximadamente 60%. El peso molecular promedio preferido será típicamente de aproximadamente 20.000 a aproximadamente 150.000. Las películas también pueden ser de composiciones mixtas que comprenden combinaciones de polímeros hidrolíticamente degradables e hidrosolubles tales como polilactida y poli(alcohol vinílico) (conocido con la referencia comercial M8630 vendido por Chris Craft In. Prod. de Gary, Indiana, EE. UU.) más plastificantes como glicerol, etilenglicerol, propilenglicol, sorbitol y mezclas de los mismos. Las bolsas pueden comprender una composición detergente sólida para el lavado de ropa o componentes parciales y/o una composición de limpieza líquida o componentes parciales separados por la película hidrosoluble. El compartimento para componentes líquidos puede tener una composición diferente a la de los compartimentos que contienen sólidos. Véase, p. ej., el documento US 2009/0011970.

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

La presente invención también se dirige a métodos para usar las composiciones de limpieza según la invención en el lavado de materiales textiles y tejidos, tales como el lavado de ropa doméstico y el lavado de ropa industrial. Estos métodos incluyen métodos para usar las composiciones según la invención o composiciones de las mismas en la limpieza de superficies duras tales como suelos, mesas, paredes, techos, etc., así como superficies de objetos duros tales como automóviles (lavado de automóviles) y vajillas (lavado de vajillas).

Las variantes de proteasa de la presente invención se pueden añadir a y así convertirse en un componente de la composición de limpieza de pH alto según la invención. Así, un aspecto de la invención se refiere al uso de una variante de proteasa en un procedimiento de limpieza a pH alto tal como el lavado de ropa y/o la limpieza de superficies duras

a un pH igual o superior a pH 10.

Una composición de limpieza de la presente invención se puede formular, por ejemplo, como una composición detergente para lavado de ropa a mano o a máquina que incluye una composición de aditivos para el lavado de ropa adecuada para el pretratamiento de tejidos manchados y una composición suavizante de tejidos añadida al enjuague, o se puede formular como una composición detergente para el uso en operaciones generales de limpieza de superficies duras del hogar, o se puede formular para operaciones de lavado de vajillas a mano o a máquina.

El procedimiento de limpieza o el procedimiento de cuidado de materiales textiles puede ser, por ejemplo, un procedimiento de lavado de ropa, un procedimiento de lavado de vajilla o limpieza de superficies duras tales como azulejos de baño, suelos, superficies de mesas, desagües, fregaderos y lavabos. Los procedimientos de lavado de ropa pueden ser, por ejemplo, lavado de ropa doméstico, pero también pueden ser lavado de ropa industrial. Por otra parte, la invención se refiere a un procedimiento para el lavado de tejidos y/o prendas de vestir donde el procedimiento comprende tratar los tejidos con una solución de lavado que contiene una composición de limpieza de pH alto según la invención, y al menos una variante de proteasa de la invención. El procedimiento de limpieza o un procedimiento de cuidado de materiales textiles se puede llevar a cabo, por ejemplo, en un procedimiento de lavado a máquina, en un procedimiento de lavado a mano o en un procedimiento de eliminación de manchas previo. La solución de lavado puede ser, por ejemplo, una solución de lavado acuosa que contiene una composición de limpieza.

La invención trata además del uso de composiciones de limpieza de la invención en procedimientos de eliminación de manchas proteínicas. Las manchas proteínicas pueden ser manchas tales como manchas de comida, p. ej., papillas, sebo, cacao, huevo, sangre, leche, tinta, hierba o una combinación de los mismos.

Una realización preferida trata de un método de limpieza, comprendiendo el método las etapas de: poner en contacto un objeto con una composición de limpieza de pH alto que comprende una variante de proteasa de la invención en condiciones adecuadas para la limpieza del objeto. En una realización preferida, la composición de limpieza se usa en un procedimiento de lavado de ropa o lavado de vajillas.

Otra realización más se refiere a un método para eliminar manchas de tejido o vajilla que comprende poner en contacto el tejido o la vajilla con una composición de limpieza de pH alto que comprende una proteasa de la invención en condiciones adecuadas para la limpieza del objeto.

También se contemplan composiciones y métodos para tratar tejidos (p. ej., para desapestar un material textil) usando la composición de limpieza de la invención. La composición de limpieza de pH alto se puede usar en cualquier método de tratamiento de tejidos que sea bien conocido en la técnica (véase, p. ej., el documento US 6.077.316). Por ejemplo, en un aspecto, el tacto y la apariencia de un tejido se mejoran mediante un método que comprende poner en contacto el tejido con una proteasa en una solución. En un aspecto, el tejido se trata con la solución bajo presión.

La composición de limpieza de pH alto de la presente invención es adecuada para su uso en aplicaciones de lavado de ropa con líquidos y de superficies duras con líquidos, incluyendo lavado de vajillas y lavado de automóviles. Por consiguiente, la presente invención incluye un método para el lavado de un tejido o el lavado de una superficie dura. El método comprende las etapas de poner en contacto el tejido/la vajilla a limpiar con una solución que comprende la composición de limpieza de pH alto según la invención. El tejido puede comprender cualquier tejido capaz de lavarse en condiciones normales de uso por parte del consumidor. La superficie dura puede comprender cualquier vajilla como cacharros, cubertería, cerámica, plásticos tales como melamina, metales, porcelana, vidrio, materiales acrílicos u otras superficies duras como automóviles, suelos, etc. La solución tiene preferiblemente un pH de aproximadamente 9 a aproximadamente 13,5. Las composiciones se pueden emplear en concentraciones de aproximadamente 100 ppm, preferiblemente de 500 ppm a aproximadamente 15.000 ppm en solución. Las temperaturas del agua varían típicamente de aproximadamente 5°C a aproximadamente 95°C, incluyendo aproximadamente 10°C, aproximadamente 15°C, aproximadamente 20°C, aproximadamente 25°C, aproximadamente 30°C, aproximadamente 35°C, aproximadamente 40°C, aproximadamente 45°C, aproximadamente 50°C, aproximadamente 55°C, aproximadamente 60°C, aproximadamente 65°C, aproximadamente 70°C, aproximadamente 75°C, aproximadamente 80°C, aproximadamente 85°C y aproximadamente 90°C. La proporción de agua a tejido es típicamente de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 30:1.

En algunas realizaciones preferidas, las composiciones de limpieza de pH alto proporcionadas en el presente documento se formulan típicamente de manera que, durante el uso en operaciones de limpieza acuosas, el agua de lavado tenga un pH de aproximadamente 10 a aproximadamente 13,5, incluso de aproximadamente 11 a aproximadamente 13,5. En algunas realizaciones preferidas, los productos líquidos para lavado de ropa se formulan para tener un pH de aproximadamente 12 a aproximadamente 13,5. Técnicas para controlar el pH a los niveles de uso recomendados incluyen el uso de tampones, ácidos, álcalis, etc., y son bien conocidas por los expertos en la técnica. En el contexto de la presente invención, se usan álcalis para ajustar el pH de aproximadamente 10 a 13,5.

EJEMPLOS

Materiales y métodos

Ensayo de actividad de Suc-AAPF-pNA

La actividad proteolítica se puede determinar mediante un método que emplea Suc-AAPF-PNA como sustrato. Suc-AAPF-PNA es una abreviatura de N-Succinil-Alanina-Alanina-Prolina-Fenilalanina-p-Nitroanilida y es un péptido bloqueado que puede escindirse mediante endoproteasas. Después de la escisión se libera una molécula de PNA libre que tiene un color amarillo y así puede medirse mediante espectrofotometría visible a una longitud de onda de 405 nm. El sustrato Suc-AAPF-PNA es fabricado por Bachem (nº de catálogo L1400, disuelto en DMSO).

La muestra de proteasa a analizar se diluye en tampón para actividad residual (Tris 100 mM pH 8,6). El ensayo se realiza transfiriendo 30 µl de muestras de enzima diluida a una placa de microvaloración de 96 pocillos y añadiendo 70 µl de solución de trabajo de sustrato (0,72 mg/ml en Tris 100 mM, pH 8,6). La solución se mezcló a temperatura ambiente y la absorción se mide cada 20 segundos a lo largo de 5 minutos a una DO 405 nm.

La pendiente (absorbancia por minuto) de la curva de absorción dependiente del tiempo es directamente proporcional a la actividad de la proteasa en cuestión bajo el conjunto de condiciones dado. La muestra de proteasa se diluye hasta un nivel en el que la pendiente era lineal.

Ejemplo 1 : Preparación y expresión de variantes de proteasa

Lo siguiente resume la mutación y la introducción de un casete de expresión en *Bacillus subtilis*. Todas las manipulaciones del ADN se realizaron mediante PCR (p. ej., Sambrook y cols.; Molecular Cloning; Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Se usaron construcciones de *B. subtilis* recombinantes que codifican variantes de proteasa para inocular matraces para agitación que contenían un medio rico (p. ej., 100 g/l de sacarosa (nº cat. de Danisco 109-0429), 40 g/l de corteza de soja (harina de soja), 10 g/l de Na₂HPO₄·12H₂O (nº de cat. de Merck 6579), 0,1 ml/l de replace-Dowfax63N10 (Dow). Típicamente, el cultivo dura 4 días a 30°C removiendo con 220 rpm.

Ejemplo 2: Purificación de variantes de proteasa

El caldo de cultivo se centrifugó a 26000 x g durante 20 minutos y el sobrenadante se decantó cuidadosamente del precipitado. El sobrenadante se filtró a través de una unidad de filtración Nalgene de 0,2 µm a fin de eliminar el resto de las células anfitrionas de *Bacillus*. El pH en el filtrado de 0,2 µm se ajustó hasta pH 8 con base de Tris 3 M y el filtrado con pH ajustado se aplicó a una columna MEP Hypercel (Pall Corporation) equilibrada en Tris/HCl 20 mM, CaCl₂ 1 mM, pH 8, 0. Después de lavar la columna con el tampón de equilibrio, la columna se eluyó por etapas con CH₃COOH 20 mM/NaOH, CaCl₂ 1 mM, pH 4,5. Se analizó la actividad de proteasa de las fracciones de la columna usando el ensayo de Suc-AAPF-pNA a pH 9 y las fracciones de los picos se mezclaron. El pH de la mezcla procedente de la columna MEP Hypercel se ajustó hasta pH 6 con CH₃COOH al 20% (v/v) o base de Tris 3 M y la mezcla de pH ajustado se diluyó con agua desionizada hasta la misma conductividad que MES 20 mM/NaOH, CaCl₂ 2 mM, pH 6,0. La mezcla diluida se aplicó a una columna SP-Sepharose® Fast Flow (GE Healthcare) equilibrada en MES 20 mM/NaOH, CaCl₂ 2 mM, pH 6,0. Después de lavar la columna con el tampón de equilibrio, la variante de proteasa se eluyó con un gradiente lineal de NaCl (0 --> 0,5 M) en el mismo tampón en cinco volúmenes de columna. Se analizó la actividad de proteasa de las fracciones de la columna usando el ensayo de Suc-AAPF-pNA a pH 9 y las fracciones activas se analizaron mediante SDS-PAGE. Las fracciones, en las que sólo se observaba una banda en el gel de SDS-PAGE teñido con Coomassie, se mezclaron como preparación purificada y se usaron para experimentos adicionales.

Ejemplo 3: Ensayo acelerado de estabilidad al almacenamiento

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

Todas las muestras de proteasa purificadas se diluyeron hasta concentraciones de 0,2 y 0,1 mg/ml basándose en la absorbancia a 280 nm y el coeficiente de extinción teórico usando Triton X-100 al 0,01%. Para cada variante se incluyeron 2 pocillos con alta concentración de proteasa y 2 pocillos con baja concentración. Como referencia se incluyó savinasa (SEQ ID NO 2) o una variante de proteasa estabilizada en cada placa de microvaloración. Se mezclaron 30 µl de muestra de proteasa con 270 µl de detergente (Surf Sparkling Ocean, DC-2014-0009) en el pocillo de una placa de microvaloración (Nunc U96 PP 0,5 ml) usando una barra magnética (en una estación de pipeteo Zephyr (Caliper LifeSciences) durante 30 minutos). A continuación, se transfirieron 20 µl de esta mezcla a otra placa de microvaloración (Nunc U96 PP 0,5 ml con barras magnéticas añadidas) y se mezclaron con 150 µl de Tris 100 mM pH 8,6 (al menos 5 min en Zephyr). Se transfirieron 30 µl de esta dilución a una Nunc F 96-MTP y, después de la adición de 70 µl de solución de sustrato, se determinó la actividad inicial de la muestra sin estrés midiendo la absorbancia a 405 nm cada 20 s durante 5 min. (en un SpectraMax Plus). Después del sellado, la placa de detergente se incubó a 50°C y pH 11 en un Thermomixer Eppendorf (sin agitación). Después de 1, 3-4 y 23-24 horas de incubación, se retiraron muestras de 20 µl y se midió la actividad residual de la muestra estresada como con la actividad inicial sin estrés.

Se supuso que la disminución en la actividad durante la incubación con detergente era exponencial. Se encontraron las semividas (T_{1/2}) a partir de la regresión lineal de Log(actividad) frente al tiempo de incubación. La savinasa (SEQ ID NO 2) tiene una semivida muy corta en las condiciones de este experimento y por lo tanto los efectos de las mutaciones se midieron con relación a una variante de proteasa ya estabilizada.

ES 3 014 600 T3

Estabilidad al almacenamiento acelerada a 40°C de variantes T_{1/2} IF: Efecto de mejora de la semivida de mutaciones simples

Mutación G61E

S9E+N43R+N76D+G115W+H120V+A194P+Q206L+S259D+L262E, T_{1/2}: 0.9

S9E+N43R+G61E+N76D+G115W+H120V+A194P+Q206L+S259D+L262E, T_{1/2}: 4.8

5 Mutación Y209W

S9E+N43R+N76D+A194P+V205I+Q206L+S259D+N261W+L262E, T_{1/2}: 4.5

S9E+N43R+N76D+A194P+V205I+Q206L+Y209W+S259D+N261W+L262E, T_{1/2}: 13.0

S9E+N43R+N76D+Q182E+A194P+V205I+Q206L+S259D+N261W+L262E, T_{1/2}: 4.6

S9E+N43R+N76D+Q182E+A194P+V205I+Q206L+Y209W+S259D+N261W+L262E, T_{1/2}: 12.4

Mutación M222S

S9E+N43R+N76D+A194P+V205I+Q206L+Y209W+S216V+L262E, T_{1/2}: 12.0

S9E+N43R+N76D+A194P+V205I+Q206L+Y209W+S216V+M222S+L262E, T_{1/2}: 14.5

Mutación V205I

S9E+N43R+N76D+A194P+Q206L+T255E+S256D+S259D+T260E+N261W+L262E, T_{1/2}: 5.0

S9E+N43R+N76D+A194P+V205I+Q206L+T255E+S256D+S259D+T260E+N261W+L262E,
T_{1/2}: 1.2

S9E+N43R+N76D+N117H+H120D+A194P+Q206L+S259D+L262E, T_{1/2}: 5.0

S9E+N43R+N76D+N117H+H120D+A194P+V205I+Q206L+S259D+L262E, T_{1/2}: 1.6

S9E+N43R+N76D+A194P+Q206L+S256D+S259D+N261W+L262E, T_{1/2}: 3.0

S9E+N43R+N76D+A194P+V205I+Q206L+S256D+S259D+N261W+L262E, T_{1/2}: 6.6

S9E+N18S+N43R+N76D+G115W+H120V+A194P+Q206L+S259D+L262E, T_{1/2}: 1.0

S9E+N18S+N43R+N76D+G115W+H120V+A194P+V205I+Q206L+S259D+L262E, T_{1/2}: 4.6

10 S9E+N43R+N76D+G115W+H120V+A194P+Q206L+S259D+L262E, T_{1/2}: 0.9

S9E+N43R+N76D+G115W+H120V+A194P+V205I+Q206L+S259D+L262E, T_{1/2}: 5.0

S9E+N43R+N76D+A194P+Q206L+Y209W+S259D+N261W+L262E, T_{1/2}: 9.9

S9E+N43R+N76D+A194P+V205I+Q206L+Y209W+S259D+N261W+L262E, T_{1/2}: 13.0

Mutación S256D

ES 3 014 600 T3

S9E+N43R+N76D+A194P+V205I+Q206L+S259D+N261W+L262E, T1/2: 4.5

S9E+N43R+N76D+A194P+V205I+Q206L+S256D+S259D+N261W+L262E, T1/2: 6.6

S9E+N43R+N76D+Q182E+A194P+V205I+Q206L+Y209W+S259D+N261W+L262E, T1/2: 12.4

S9E+N43R+N76D+Q182E+A194P+V205I+Q206L+Y209W+S256D+S259D+N261W+L262E,

T1/2: 13.3

Mutación S188E

S9E+N43R+N76D+A194P+V205I+Q206L+Y209W+S216V+L262E, T1/2: 12.0

S9E+N43R+N76D+S188E+A194P+V205I+Q206L+Y209W+S216V+L262E, T1/2: 13.7

Mutación T260E

S9E+N76D+G115W+G160P+Q182E+V205I+Q206L+Y209W+S256D+N261W+L262E,

T1/2: 13.5

S9E+N76D+G115W+G160P+Q182E+V205I+Q206L+Y209W+S256D+T260E+N261W+L262E,

T1/2: 15.1

5

Mutación H120T

S9E+N43R+N76D+A194P+Q206L+S256D+S259D+N261W+L262E, T1/2: 3.0

S9E+N43R+N76D+H120T+A194P+Q206L+S256D+S259D+N261W+L262E, T1/2: 5.4

S9E+N43R+N76D+A194P+V205I+Q206L+Y209W+S216V+L262E, T1/2: 12.0

S9E+N43R+N76D+H120T+A194P+V205I+Q206L+Y209W+S216V+L262E, T1/2: 12.2

Mutación G160P

S9E+N76D+Q182E+V205I+Q206L+Y209W+S256D+N261W+L262E, T1/2: 13.2

S9E+N76D+G160P+Q182E+V205I+Q206L+Y209W+S256D+N261W+L262E, T1/2: 14.3

10 Mutación Q182E

S9E+N43R+N76D+A194P+V205I+Q206L+S259D+N261W+L262E, T1/2: 4.5

S9E+N43R+N76D+Q182E+A194P+V205I+Q206L+S259D+N261W+L262E, T1/2: 4.6

S9E+N76D+V205I+Q206L+Y209W+S256D+N261W+L262E, T1/2: 12.3

S9E+N76D+Q182E+V205I+Q206L+Y209W+S256D+N261W+L262E, T1/2: 13.2

S9E+N43R+N76D+A194P+V205I+Q206L+S259D+N261W+L262E+*275aH, T1/2: 4.2

S9E+N43R+N76D+Q182E+A194P+V205I+Q206L+S259D+N261W+L262E+*275aH, T1/2: 4.6

S9E+N43R+N76D+N185E+S188E+A194P+Q206L+Y209W+S259D+L262E, T1/2: 11.5

S9E+N43R+N76D+Q182E+N185E+S188E+A194P+Q206L+Y209W+S259D+L262E, T1/2: 14.0

Mutación N185E

S9E+N43R+N76D+A194P+V205I+Q206L+Y209W+S216V+L262E, T1/2: 12.0

S9E+N43R+N76D+N185E+A194P+V205I+Q206L+Y209W+S216V+L262E, T1/2: 12.4

Mutación N261M

S9E+N43R+N76D+A194P+V205I+Q206L+Y209W+S216V+L262E, T1/2: 12.0

S9E+N43R+N76D+A194P+V205I+Q206L+Y209W+S216V+N261M+L262E, T1/2: 12.7

Mutación S259D

S9E+N43R+I72A+N76D+A194P+Q206L+L262E, T1/2: 6.0

S9E+N43R+I72A+N76D+A194P+Q206L+S259D+L262E, T1/2: 7.2

S9E+N43R+N76D+A194P+V205I+Q206L+L262E, T1/2: 6.0

S9E+N43R+N76D+A194P+V205I+Q206L+S259D+L262E, T1/2: 6.5

5

Ejemplo 4: Resultados del lavado a escala completa para las proteasas de la invención

El rendimiento de lavado de las proteasas de la invención se probó en un lavado a escala completa. El rendimiento de lavado se probó sobre 22 manchas diferentes a una respuesta de dosificación en detergente líquido para el lavado de ropa.

- 10 Después de lavar y enjuagar, las muestras de tela se extendieron en posición horizontal y se dejaron secar al aire a temperatura ambiente durante la noche. Todos los lavados se evaluaron el día después del lavado. Las evaluaciones de la reflectancia de la luz de las muestras de tela se realizaron usando un espectrofotómetro de reflectancia Macbeth Color Eye 7000 con una abertura muy pequeña. Las mediciones se realizaron sin UV en la luz incidente y se extrajo la remisión a 460 nm. Las mediciones se realizaron sobre muestras de tela sin lavar y lavadas. La muestra de tela de prueba a medir se colocó encima de otra muestra de tela del mismo tipo y color.
- 15

El cálculo del efecto de la enzima se realizó tomando las mediciones de las muestras de tela lavadas con enzimas y restando las mediciones de las lavadas sin enzima para cada mancha, $\Delta\text{Rem}_{\text{enzima}}$. El rendimiento de lavado se expresa como Δ valor de remisión (ΔRem). Los experimentos se efectuaron con la composición detergente y las muestras de tela en las condiciones experimentales especificadas en la Tabla 21 a continuación.

20 Tabla 21: Condiciones experimentales para experimentos de lavado de ropa a gran escala

Dosificación de detergente	Purex (Henkel) 45 g/lavado Arm & Hammer (C&D) 45 g/lavado Xtra (C&D) 45 g/lavado TripleClean (SUN) 45 g/lavado ALL Free & Clear (SUN) 45 g/lavado
Volumen de la solución de prueba	63 l
pH	según está
Tiempo de lavado	12 min de lavado principal, 2 enjuagues
Temperatura	30/15°C
Dureza del agua	6,7°dH
Concentración de proteasa	0,25, 0,5, 1% en peso
Muestras de tela	

La dureza del agua se ajustó hasta 6,7°dH mediante la adición de CaCl_2 , MgCl_2 y NaHCO_3 ($\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}:\text{CO}_3^{2-} = 3:1:6$) al sistema de prueba.

ES 3 014 600 T3

Tabla 22: Δ valor de remisión de detergente que comprende proteasas en comparación con detergente sin proteasa a 15°C en All Free & Clear (Las enzimas probadas eran las siguientes:

1: S9E+N43R+N76D+V205I+Q206L+Y209W+S259D+N261W+L262E;

2: S9E+N43R+N76D+H120V+Q182E+A194P+V205I+Q206L+Y209W+S256D+N261W+L262E+*275aH+*275bH;

3: S3V+N76D+H120V+Q182E+N185E+S188E+V205I+Q206L+Y209W+S216V+S256D+N261W+L262E):

Δ (frente al blanco)

Dosis de enzima %	0,25%			0,50%			1,00%		
Enzimas	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Doble aplicación de sangre de oveja 108KC ACD	0,3	0,9	0,5	1,3	0,3	1,3	1,1	1,6	0,8
Sangre, muy endurecida	0,7	0,3	0,8	1,6	1,7	1,0	1,4	2,2	1,1
Sangre, poco endurecida (Algodón/Poliéster)	-0,7	2,0	-1,7	-0,8	-0,1	2,5	1,2	-0,8	0,9
Sangre envejecida CS-01	-0,9	-0,1	-0,2	-1,0	-0,1	-0,6	0,6	-0,3	-0,3
Sangre EMPA111	-0,3	0,3	-0,5	-0,4	-0,6	-0,3	-0,3	0,4	-0,2
062KC Frotado en hierba	0,7	1,5	0,7	1,3	0,1	1,2	0,7	2,5	1,0
062PE Frotado en hierba	1,2	0,4	-0,2	2,0	-0,5	0,2	0,7	1,5	0,7
Hierba exprimida C-H039	0,5	0,9	0,9	0,8	-0,2	0,5	0,6	1,3	0,4
Extracto de Hierba CS-08	-0,2	-0,2	0,1	-0,1	0,1	0,0	0,1	-0,4	0,3
Hierba EMPA164	0,6	0,5	-0,2	0,8	0,7	-0,2	0,9	0,4	0,6
Hierba, algodón	-0,1	0,6	0,0	0,3	0,0	0,7	0,7	1,4	0,9
Hierba NZ Hierba CN	0,9	0,6	-0,6	-0,3	1,1	0,9	1,0	0,8	1,3
Extracto de Hierba PCS-8	0,2	0,1	-0,1	-0,2	-0,1	0,0	0,0	0,0	0,2
C-05 BMI	0,0	0,6	-0,3	0,9	0,3	1,1	0,6	1,2	1,6
EMPA 116 BMI ®	0,4	-0,6	0,4	1,7	1,3	1,3	2,8	2,4	1,7
EMPA 117BMI (P/C)	0,4	1,2	-0,2	2,3	0,9	1,8	3,7	3,1	3,1
Leche Choc. 038KC	0,5	0,0	0,4	0,5	-0,4	0,9	0,0	0,4	1,1
Leche Choc. PC-03/negro de carbono	0,6	0,2	0,0	1,1	0,4	0,5	1,5	1,1	1,1
Huevo 051KC	0,0	-0,1	0,2	-0,3	0,0	0,0	0,5	0,0	0,0
Huevo entero W10N	1,4	0,9	1,0	1,8	1,6	1,5	2,2	2,1	2,0
Salsa marrón de French's (contiene proteína de trigo, extracto de ternera)	0,7	0,6	0,3	1,1	0,7	0,4	0,9	0,7	0,6
Paté de carne KC-H172	0,8	2,2	0,3	2,1	0,8	2,1	1,9	2,2	0,8

ES 3 014 600 T3

Tabla 23: Δ valor de remisión de detergente que comprende proteasas en comparación con detergente sin proteasa a 30°C en All Free & Clear (Las enzimas probadas en "Resultados (Enzimas-Blanco)" eran las siguientes:

1: S9E+N43R+N76D+V205I+Q206L+Y209W+S259D+N261W+L262E;

2: S9E+N43R+N76D+Q182E+A194P+V205I+Q206L+Y209W+S256D+S259D+N261W+ L262E;

3: S9E+N43R+N76D+H120V+Q182E+A194P+V205I+Q206L+Y209W+S256D+N261W+L262E+*275aH+*275bH;

4: S3V+N76D+H120V+Q182E+N185E+S188E+V205I+Q206L+Y209W+S216V+S256D+N261W+L262E);

All Free and Clear 30°C

	Resultados (Enzimas-Blanco)	Ref: Blanco del detergente							
		0,50%				1%			
		1	2	3	4	1	2	3	4
Sangre	Doble aplicación de sangre de oveja 108KC ACD	3,3	2,8	2,5	2,2	4,5	4,0	4,0	3,2
	Sangre, muy endurecida	1,9	1,1	1,4	0,9	3,3	1,8	2,4	1,4
	Sangre, poco endurecida (Algodón/Poliéster)	1,6	1,3	2,0	0,9	1,9	2,1	2,4	1,8
	Sangre envejecida CS-01	1,7	2,2	2,8	2,0	3,5	3,2	3,7	2,3
	Sangre EMPA111	1,4	2,2	1,9	1,9	2,8	2,9	3,2	2,7
Hierba	062KC Frotado en hierba	2,3	2,5	1,9	1,5	4,2	3,3	2,6	3,2
	Hierba exprimida C-H039	0,4	0,3	0,8	0,0	0,2	0,3	0,8	0,5
	Extracto de Hierba CS-08	0,2	0,0	-0,1	-0,1	0,4	0,1	0,2	0,2
	Extracto de Hierba PCS-8	0,3	0,3	0,7	0,2	0,9	0,5	0,5	0,7
	Hierba EMPA164	1,3	1,0	0,9	0,8	1,8	0,6	1,3	0,8
	Hierba en algodón	2,7	1,8	3,1	1,8	3,7	3,1	3,0	2,4
	Hierba NZ	3,6	4,5	3,6	3,4	5,5	4,1	5,0	4,0
BMI	C-05 BMI	3,7	3,7	4,1	3,4	7,2	6,6	6,9	5,4
	EMPA 116 BMI (C)	6,4	7,0	6,3	5,9	8,2	8,5	7,7	7,7
	EMPA 117 BMI (P/C)	9,3	9,6	9,2	8,0	12,7	12,8	1 3,3	1 1,5
Cacao	Leche Choc. 038KC	1,5	1,5	1,9	1,8	2,6	2,3	1,4	1,6
	Leche Choc. PC-03/negro de carbono	3,4	2,9	3,0	2,7	4,7	4,8	4,3	3,9
Huevo	Huevo 051KC	2,9	2,9	2,9	2,5	3,2	3,0	3,0	2,9
	Huevo entero W10N	4,0	4,2	4,4	4,1	5,5	5,3	5,4	5,3
Mancha de comida	Paté de carne KC-H172	3,8	3,0	4,2	3,6	5,1	5,1	6,3	5,4
	Salsa marrón de French's	1,4	1,2	1,5	0,9	1,5	1,3	1,5	1,3

ES 3 014 600 T3

Tabla 24: Δ valor de remisión de detergente que comprende proteasas en comparación con detergente sin proteasa a 30°C en todos los Arm & Hammer (Las enzimas probadas eran las siguientes:

1: S9E+N43R+N76D+V205I+Q206L+Y209W+S259D+N261W+L262E;

2: S9E+N43R+N76D+H120V+Q182E+A194P+V205I+Q206L+Y209W+S256D+N261W+L262E+*275aH+*275bH;

3: S3V+N76D+H120V+Q182E+N185E+S188E+V205I+Q206L+Y209W+S216V+S256D+N261W+L262E);

Δ (frente al blanco) Detergente Arm & Hammer

Dosis de enzima %	0,25%			0,50%			1,00%		
Enzimas	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Doble aplicación de sangre de oveja 108KC ACD	0,09	0,84	0,92	1,70	0,81	0,64	1,57	2,47	1,39
Sangre, muy endurecida	1,74	1,12	0,82	2,42	1,50	0,86	2,57	3,34	1,45
Sangre, poco endurecida (Algodón/Poliéster)	5,18	3,54	3,78	6,79	7,91	6,99	6,96	1,01	3,04
Sangre envejecida CS-01	0,84	0,20	-0,18	0,25	0,20	-0,14	2,16	-0,03	0,38
Sangre EMPA111	0,27	0,60	-0,16	0,74	0,88	0,24	2,05	1,35	1,21
062KC Frotado en hierba	1,03	2,81	0,40	1,23	-0,18	1,08	2,94	2,73	0,24
062PE Frotado en hierba	2,45	1,14	0,64	1,62	2,88	1,88	2,25	1,75	0,53
Hierba exprimida C-H039	0,78	1,35	0,65	0,32	1,01	1,29	0,91	0,92	0,25
Extracto de Hierba CS-08	0,11	0,16	0,49	0,31	0,23	0,37	0,20	0,18	0,15
Hierba EMPA164	0,27	0,24	0,11	0,65	-0,28	0,20	0,55	0,85	-0,18
Hierba, algodón	0,52	0,73	0,12	0,94	0,89	0,35	0,99	1,25	0,75
Hierba NZ Hierba CN	2,12	1,33	0,31	1,91	1,50	1,31	2,41	2,88	1,31
Extracto de Hierba PCS-8	0,34	0,03	0,27	0,58	0,39	0,13	0,59	0,32	0,40
C-05 BMI	0,96	1,47	-0,78	0,79	0,97	0,29	2,83	2,53	1,85
EMPA 116 BMI ®	3,54	2,67	1,93	5,35	4,24	3,45	6,71	6,27	4,81
EMPA 117BMI (P/C)	5,03	4,31	3,95	8,11	6,62	6,10	9,96	8,48	6,74
Leche Choc. 038KC	2,69	2,43	2,94	3,36	2,24	4,28	3,22	3,43	3,70
Leche Choc. PC-03/negro de carbono	1,77	2,04	1,26	2,66	2,28	1,67	3,79	3,13	2,57
Huevo 051KC	0,96	0,84	0,63	2,08	1,38	1,10	2,54	2,32	2,28
Huevo entero W10N	2,05	2,31	2,12	3,23	3,25	3,11	4,14	3,71	3,62
Salsa marrón de French's (contiene proteína de trigo, extracto de ternera)	0,83	0,87	0,79	0,86	0,90	0,65	0,97	1,06	0,80
Paté de carne KC-H172	3,48	3,46	3,43	4,23	4,36	3,64	5,65	5,66	3,85

ES 3 014 600 T3

Tabla 25: Δ valor de remisión de detergente que comprende proteasas en comparación con detergente sin proteasa a 30°C en Purex (Las enzimas probadas eran las siguientes:

1: S9E+N43R+N76D+V205I+Q206L+Y209W+S259D+N261W+L262E;

2: S9E+N43R+N76D+H120V+Q182E+A194P+V205I+Q206L+Y209W+S256D+N261W+L262E+*275aH+*275bH;

3: S3V+N76D+H120V+Q182E+N185E+S188E+V205I+Q206L+Y209W+S216V+S256D+N261W+L262E);

5 Purex

Dosis de enzima %	0,25%			0,50%			1,00%		
Enzimas	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Doble aplicación de sangre de oveja 108KC ACD	0,55	0,42	0,51	1,55	1,33	0,68	1,79	1,36	1,42
Sangre, muy endurecida	0,51	0,17	0,30	0,77	0,45	0,39	1,50	0,99	0,56
Sangre, poco endurecida (Algodón/Poliéster)	-2,95	-1,96	-2,89	3,62	5,20	-2,08	6,98	5,58	-1,45
Sangre envejecida CS-01	0,54	-0,58	-0,30	1,02	-0,08	-0,39	1,96	1,84	0,48
Sangre EMPA111	0,11	0,43	0,26	0,51	1,00	-0,62	1,16	1,07	1,37
062KC Frotado en hierba	1,82	1,77	2,05	1,77	1,37	1,04	1,78	2,22	1,73
062PE Frotado en hierba	3,31	3,69	2,40	4,40	3,25	3,66	5,56	5,31	3,98
Hierba exprimida C-H039	-0,44	0,81	0,09	0,48	0,29	0,06	0,40	0,89	-0,09
Extracto de Hierba CS-08	-0,55	-0,15	-0,28	-0,14	-0,05	-0,16	-0,13	-0,89	-0,10
Hierba EMPA164	1,16	0,98	0,75	1,24	1,44	0,98	1,12	1,48	0,66
Hierba, algodón	0,91	1,18	1,39	1,37	1,34	1,08	2,18	2,22	1,67
Hierba NZ Hierba CN	1,61	1,85	1,68	2,77	2,12	1,19	3,55	3,32	1,86
Extracto de Hierba PCS-8	0,67	0,60	0,47	1,07	0,46	0,21	0,82	0,58	0,49
C-05 BMI	0,65	-0,33	0,37	2,33	1,44	0,12	3,94	2,38	2,32
EMPA 116 BMI ®	3,02	3,10	3,46	5,10	5,12	3,19	7,53	6,87	4,95
EMPA 117 BMI (P/C)	3,75	4,98	4,87	6,94	5,97	5,60	9,59	8,81	8,43
Leche Choc. 038KC	-0,22	-0,12	1,93	1,23	1,64	1,21	1,59	1,92	1,07
Leche Choc. PC-03/negro de carbono	0,98	1,17	1,26	2,20	2,07	1,46	3,75	3,34	2,47
Huevo 051KC	0,74	0,33	0,59	1,78	1,17	1,04	2,29	2,27	1,99
Huevo entero W10N	1,91	1,85	1,97	2,88	2,65	2,33	3,81	3,48	3,33

ES 3 014 600 T3

Dosis de enzima %	0,25%			0,50%			1,00%		
Salsa marrón de French's (contiene proteína de trigo, extracto de ternera)	0,70	0,52	0,14	0,87	0,64	0,44	0,82	0,62	0,73
Paté de carne KC-H172	2,80	3,27	3,31	4,16	4,56	4,52	5,37	6,30	5,41

Tabla 26: Δ valor de remisión de detergente que comprende proteasas en comparación con detergente sin proteasa a 30°C en Sun Triple Clean (Las enzimas probadas eran las siguientes:

1: S9E+N43R+N76D+V205I+Q206L+Y209W+S259D+N261W+L262E;

2: S9E+N43R+N76D+H120V+Q182E+A194P+V205I+Q206L+Y209W+S256D+N261W+L262E+*275aH+*275bH;

3: S3V+N76D+H120V+Q182E+N185E+S188E+V205I+Q206L+Y209W+S216V+S256D+N261W+L262E);

5 Δ (frente al blanco) Detergente Sun Triple Clean

Dosis de enzima%	0,25%			0,50%			1,00%		
Enzimas	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Doble aplicación de sangre de oveja 108KC ACD	1,94	1,03	0,20	1,67	2,12	1,57	2,19	2,65	1,54
Sangre, muy endurecida	-0,43	-0,73	-1,39	0,06	-0,20	-0,83	0,63	-0,11	-0,65
Sangre, poco endurecida (Algodón/Poliéster)	2,48	0,77	0,29	2,65	3,21	2,79	5,52	2,33	2,16
Sangre envejecida CS-01	-0,02	-0,11	-0,52	0,92	0,28	-0,29	0,88	1,55	0,03
Sangre EMPA111	0,57	0,40	-0,29	1,29	0,78	0,69	1,56	1,65	0,73
062KC Frotado en hierba	1,13	1,58	0,06	1,89	1,90	0,50	2,48	2,61	1,12
062PE Frotado en hierba	2,43	1,78	1,58	2,29	2,46	1,74	3,37	2,61	1,36
Hierba exprimida C-H039	1,19	1,76	1,36	1,17	1,24	1,39	1,64	1,78	1,07
Extracto de Hierba CS-08	0,11	-0,19	-0,33	-0,14	-0,15	-0,13	0,25	0,37	0,00
Hierba EMPA164	0,17	0,28	0,07	0,50	0,13	0,18	-0,11	0,33	0,27
Hierba, algodón	0,85	0,89	0,79	1,26	1,63	0,81	1,83	1,58	1,36
Hierba NZ Hierba CN	1,32	1,25	0,85	2,55	1,72	1,38	2,91	2,93	1,64
Extracto de Hierba PCS-8	0,06	-0,04	-0,10	0,20	-0,08	-0,01	0,11	-0,05	-0,10
C-05 BMI	1,48	0,62	1,18	2,30	2,42	1,41	4,07	3,26	2,22
EMPA 116 BMI(©)	4,09	3,18	2,96	5,89	4,27	3,85	6,78	6,05	5,24

ES 3 014 600 T3

Dosis de enzima%	0,25%			0,50%			1,00%		
EMPA 117 BMI (P/C)	4,03	3,97	3,68	6,41	6,35	5,28	8,96	8,25	5,95
Leche Choc. 038KC	2,48	0,83	1,55	2,24	2,01	3,11	2,63	3,20	2,68
Leche Choc. PC-03/negro de carbono	1,63	1,40	1,28	2,18	2,08	1,88	3,77	3,29	2,36
Huevo 051KC	0,35	0,12	0,20	1,14	0,95	0,66	2,14	2,27	1,75
Huevo entero W10N	1,41	1,31	1,24	2,25	2,16	2,04	3,07	1,20	2,55
Salsa marrón de French's (contiene proteína de trigo, extracto de ternera)	0,72	0,72	0,54	0,93	0,63	0,73	1,00	0,90	0,82
Paté de carne KC-H172	2,72	2,62	1,68	3,04	3,95	3,03	4,18	4,69	4,91

Tabla 27: Δ valor de remisión de detergente que comprende proteasas en comparación con detergente sin proteasa a 30°C en Xtra. Las enzimas probadas incluían las siguientes:

1: S9E+N43R+N76D+V205I+Q206L+Y209W+S259D+N261W+L262E;

2: S9E+N43R+N76D+H120V+Q182E+A194P+V205I+Q206L+Y209W+S258D+N261W+L262E+*275aH+*275bH;

3: S3V+N76D+H120V+Q182E+N185E+S188E+V205I+Q206L+Y209W+S216V+S258D+N261W+L262E;

5 Δ (frente al blanco) Detergente Xtra

Dosis de enzima %	0,25%			0,50%			1,00%		
Enzimas	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Doble aplicación de sangre de oveja 108KC ACD	1,56	1,16	0,96	2,34	2,07	1,48	2,74	3,03	2,29
Sangre, muy endurecida	0,34	0,24	-0,31	0,97	0,08	-0,13	1,31	1,40	0,35
Sangre, poco endurecida (Algodón/Poliéster)	5,55	3,96	4,28	6,05	3,89	0,93	5,47	4,80	2,77
Sangre envejecida CS-01	0,32	0,71	0,66	1,96	1,66	1,04	2,82	2,25	1,88
Sangre EMPA111	0,78	0,46	0,42	1,53	1,50	1,17	1,78	2,51	1,73
062KC Frotado en hierba	0,00	1,03	1,30	2,00	1,29	0,85	1,86	2,81	1,59
062PE Frotado en hierba	2,74	2,39	2,46	5,43	2,10	2,41	2,83	5,13	3,53
Hierba exprimida C-H039	0,49	0,08	0,80	0,60	0,00	0,74	1,23	1,34	0,38
Extracto de Hierba CS-08	0,13	0,24	-0,12	0,35	0,11	-0,49	0,30	0,38	0,73
EMPA164 Hierba	0,37	0,51	0,08	0,82	0,50	-0,16	0,71	1,08	0,44
Hierba, algodón	1,40	1,11	0,06	1,74	1,03	0,63	1,44	1,97	1,03

ES 3 014 600 T3

Dosis de enzima %	0,25%			0,50%			1,00%		
Hierba NZ Hierba CN	1,43	1,43	1,05	2,42	1,61	1,22	3,24	3,19	2,25
Extracto de Hierba PCS-8	1,06	0,99	0,64	0,81	0,66	-0,11	0,90	0,98	0,73
C-05 BMI	1,58	0,92	0,93	2,32	1,65	0,35	3,00	2,31	1,98
EMPA 116 BMI ©	3,33	3,12	2,10	4,86	4,55	3,62	6,97	7,02	5,47
EMPA 117 BMI (P/C)	4,04	3,94	3,37	7,11	5,29	4,31	8,36	8,75	6,84
Leche Choc. 038KC	0,91	1,09	1,64	2,85	1,50	1,89	2,89	2,72	2,10
Leche Choc. PC-03/negro de carbono	1,73	1,26	1,10	2,45	1,81	1,47	3,19	3,75	2,89
Huevo 051KC	0,91	0,59	0,45	1,90	1,37	1,03	2,49	2,89	2,32
Huevo entero W10N	2,42	2,16	2,09	3,22	2,98	2,78	4,00	3,79	3,82
Salsa marrón de French's (contiene proteína de trigo, extracto de ternera)	0,98	0,97	0,68	0,97	0,73	0,58	1,12	1,08	0,93
Paté de carne KC-H172	1,12	2,20	0,83	3,75	3,18	2,40	3,96	4,68	4,16

Ejemplo 5: Prueba de variantes de subtilisina 309 en minilavado

El rendimiento de lavado de las proteasas de la invención se probó usando detergente líquido para lavar la ropa sobre una mancha técnica usando el sistema de minilavado.

- 5 Tabla 28: El experimento de lavado se efectúa en las condiciones experimentales especificadas a continuación:

Detergente	Detergente disponible comercialmente Tixan - YPE
Dosis de detergente	2 g/l
pH	Según está (es decir, no ajustado)
Dureza del agua	8,4 ^o dH.
Conc. de enzima	Ejemplo 20-40-80 nM
Volumen de la solución de prueba	50 ml
Material de prueba	Sangre/leche/tinta EMPA117 EH en algodón/poliéster extracalentado
Temperatura	25°C
Tiempo de lavado	20 min de remojo + 18 min de lavado principal
Tiempo de enjuague	10 min
Sistema de prueba	Continuamente, el material textil manchado se saca de y se introduce en las soluciones de prueba, 50 veces por minuto (tiempo fuera 0,29 s, tiempo dentro 0,29 s, tiempo de elevación 0,17). Las soluciones de prueba se guardan en vasos de precipitados de vidrio de 125 ml. Después del lavado, continuamente, los materiales textiles se sacan de y se introducen en agua del grifo, 50 veces por minuto (tiempo fuera 0,5 s, tiempo dentro 5 s, tiempo de elevación 0,5).

Los materiales de prueba se obtuvieron de EMPA Testmaterials AG Mövenstrasse 12, CH-9015 St. Gallen, Suiza.

Posteriormente los materiales textiles se secaron al aire y se midió el rendimiento de lavado como el brillo del color de estos materiales textiles. El brillo también se puede expresar como Remisión (R), que es una medida de la luz reflejada

o emitida por el material de prueba cuando se ilumina con luz blanca. La remisión (R) de los materiales textiles se midió a 460 nm usando un espectrofotómetro visible Zeiss MCS 521. Las mediciones se realizaron según el protocolo del fabricante.

- 5 El cálculo del efecto enzimático se realizó tomando las mediciones de muestras de tela lavadas con enzimas y restando las mediciones de las lavadas sin enzima para cada mancha, ΔR_{enzima} .

Los experimentos se realizaron según se describe en el ensayo de minilavado para el método de lavado de ropa con la composición detergente y las muestras de tela en las condiciones experimentales que se especifican en la Tabla 29 a continuación.

Tabla 29: Condiciones experimentales para experimentos de minilavado de ropa

Dosificación de detergente	YPE, 2 g/l
Volumen de la solución de prueba	50 ml
pH	Según está
Tiempo de lavado	20 min remojo + 18 min lavado principal
Temperatura	25°C
Dureza del agua	8,4°dH
Concentración de proteasa	0-20-40-80 nM
Muestra de tela	EMPA 117 EH

10

La dureza del agua se ajustó hasta 8,4°dH mediante la adición de CaCl_2 , MgCl_2 y NaHCO_3 ($\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}:\text{CO}_3 = 2:1:4,5$) al sistema de prueba. Después del lavado, los materiales textiles se enjuagaron en agua del grifo y se secaron.

Tabla 30: Rendimiento relativo de las proteasas variantes de subtilisina 309 en comparación con un detergente con subtilisina 309 (SEQ ID NO: 2) a 25°C

Enzima	20 nM	40 nM	80 nM
Subtilisina 309 (SEQ ID NO: 2)	1.0	1.0	1.0
S9E+N43R+N76D+A158E+A194P+N204D+V205I+Q206L+Y209W+S212G+S216V+L262E	1.1	1.3	1.1
S9E+N43R+N76D+A158E+G160P+V205I+Q206L+Y209W+S259D+N261W+L262E	1.1	1.5	1.5
S9E+N43R+N76D+A158E+G160P+A194P+N204D+V205I+Q206L+Y209W+S212G+S216V+L262E	1.1	1.2	1.3
S9E+N43R+N76D+A158E+G160P+S161E+A194P+N204D+V205I+Q206L+Y209W+S216V+L262E+*275aH+*275bH	0.9	1.1	1.1
S9E+N43R+N76D+A158E+G160P+S161E+A194P+N204D+V205I+Q206L+Y209W+L262E	0.8	1.0	1.1
S9E+N43R+N76D+A158E+G160P+S161E+A194P+N204D+V205I+Q206L+Y209W+S212G+S216V+L262E+*275aH+*275bH	0.8	0.9	1.3
S9E+N43R+N76D+A158E+G160P+S161E+A194P+N204D+V205I+Q206L+Y209W+S212G+L262E	1.0	1.2	1.4
S9E+N43R+N76D+A158E+A194P+V205I+Q206L+Y209W+S259D+N261W+L262E	0.9	1.3	1.5
S9E+N43R+N76D+A158E+G160P+S161E+A194P+N204D+V205I+Q206L+Y209W+S212G+L262E+*275aH+*275bH	0.7	0.9	1.0
S9E+N43R+N76D+A158E+G160P+S161E+A194P+N204D+V205I+Q206L+Y209W+S216V+L262E	1.1	1.2	1.3
S9E+N43R+N76D+A158E+G160P+S161E+A194P+Q206L+Y209W+S259D+L262E+*275aH+*275bH	0.9	0.8	1.1
S9E+N43R+N76D+A158E+G160P+S161E+A194P+V205I+Q206L+Y209W+S212G+S216V+L262E	1.2	1.2	1.3
S9E+N43R+N76D+A158E+S161E+V205I+Q206L+	0.8	1.2	1.4

ES 3 014 600 T3

Y209W+S259D+N261W+L262E			
S9E+N43R+N76D+A158E+G160P+S161E+V205I+Q206L+Y209W+S259D+N261W+L262E	0.7	1.1	1.1
S9E+N43R+N76D+A158E+S161E+A194P+N204D+V205I+Q206L+Y209W+S212G+S216V+L262E	1.0	1.2	1.1
S9E+N43R+N76D+G160P+V205I+Q206L+Y209W+S259D+N261W+L262E	1.1	1.3	1.3
S9E+N43R+N76D+A194P+N204D+V205I+Q206L+Y209W+S212G+S216V+S259D+N261W+L262E	1.1	1.1	1.1
S9E+N43R+N76D+A194P+Q206L+Y209W+L262E	1.1	1.1	1.1
S9E+N43R+N76D+A194P+Q206L+Y209W+S256D+S259D+N261W+L262E	0.9	0.9	1.0
S9E+N43R+N76D+A194P+Q206L+Y209W+T255E+S256D+S259D+T260E+N261W+L262E	1.1	1.1	1.2
S9E+N43R+N76D+V205I+Q206L+Y209W+S259D+N261W+L262E	1.1	1.3	1.2
S9E+N43R+N76D+G115W+H120V+A194P+Q206L+Y209W+S259D+L262E	0.9	1.0	1.1
S9E+N43R+N76D+G115W+H120V+P129D+A194P+Q206L+Y209W+S259D+L262E	0.8	1.0	0.9
S9E+N43R+N76D+G160P+A194P+N204D+V205I+Q206L+Y209W+S212G+S216V+L262E	1.3	1.4	1.2
S9E+N43R+N76D+G160P+S161E+A194P+N204D+V205I+Q206L+Y209W+S212G+S216V+L262E	1.1	1.4	1.3
S9E+N43R+N76D+G160P+S161E+A194P+N204D+V205I+Q206L+Y209W+S212G+S216V+L262E+*275aH+*275bH	1.4	1.5	1.5
S9E+N43R+N76D+N204D+V205I+Q206L+Y209W+S259D+N261W+L262E	1.0	1.1	1.4
S9E+N43R+N76D+G160P+S161E+V205I+Q206L+Y209W+S259D+N261W+L262E	1.1	1.2	1.3
S9E+N43R+N76D+H120V+Q182E+A194P+V205I+Q206L+Y209W+S256D+N261W+L262E+*275aH+*275bH	1.0	1.1	1.1
S9E+N43R+N76D+V205I+Q206L+Y209W+S216V+S259D+N261W+L262E	0.8	1.0	1.2

ES 3 014 600 T3

S9E+N43R+N76D+S161E+V205I+Q206L+Y209W+S259D+N261W+L262E	0.9	1.0	1.5
S9E+N43R+N76D+P131I+A194P+Q206L+Y209W+S259D+L262E	1.5	1.4	1.4
S9E+N43R+N76D+H120V+Q182E+A194P+V205I+Q206L+Y209W+S256D+N261W+L262E+*275aH+*275bH	0.9	1.0	1.2
S9E+N43R+N76D+S161E+A194P+N204D+V205I+Q206L+Y209W+S212G+S216V+L262E+*275aH+*275bH	0.9	1.2	1.2
S9E+N43R+N76D+V205I+Q206L+Y209W+S212G+S259D+N261W+L262E	1.0	1.2	1.5
S9E+N43R+N76D+N204D+V205I+Q206L+Y209W+S212G+S216V+S259D+N261W+L262E	1.1	1.2	1.3

Los resultados de la Tabla 30 muestran que las variantes de subtilisina 309 mostraban un rendimiento de lavado mejorado o del mismo nivel en comparación con la subtilisina 309 (SEQ ID NO: 2) sobre sangre/leche/tinta a 25°C

REIVINDICACIONES

1. Una composición de limpieza líquida que tiene pH 10 o superior, que comprende al menos 0,01% en peso de proteasa, donde la proteasa es una variante de una proteasa progenitora que tiene al menos 60% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, donde la variante de proteasa comprende tres o más sustituciones seleccionadas de X3V, X9D, X9E, X18S, X43R, X43K, X49T, X61D, X76D, X115W, X120T, X120V, X120D, X182D, X182E, X185E, X185D, X188E, X188D, X194P, X205I, X206L, X209W, X216V, X217M, X218T, X222S, X255E, X255D, X256D, X256E, X259D, X259E, X260A, X260E, X260D, X261M, X261W y X262E, donde una sustitución es X262E, donde las posiciones corresponden a las posiciones de BPN' (SEQ ID NO: 1), donde la variante de proteasa tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 60% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y donde dicha variante de proteasa se caracteriza por tener una actividad residual al menos 10% superior que la proteasa progenitora cuando se mide después de 4 horas a 40°C en detergente líquido con pH 10 y/o tener un rendimiento de lavado mejorado o del mismo nivel en comparación con subtilisina 309 (SEQ ID NO: 2) sobre manchas de sangre/leche/tinta a 25°C; y donde la variante comprende un conjunto de sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en:

S9E+N43R+G61E+N76D+G115W+H120V+A194P+Q206L+S259D+L262E;
 S9E+N43R+N76D+A194P+V205I+Q206L+S259D+N261W+L262E;
 S9E+N43R+N76D+A194P+V205I+Q206L+Y209W+S259D+N261W+L262E;
 S9E+N43R+N76D+Q182E+A194P+V205I+Q206L+S259D+N261W+L262E;
 S9E+N43R+N76D+Q182E+A194P+V205I+Q206L+Y209W+S259D+N261W+L262E;
 S9E+N43R+N76D+A194P+V205I+Q206L+Y209W+S216V+L262E;
 S9E+N43R+N76D+A194P+V205I+Q206L+Y209W+S216V+M222S+L262E;
 S9E+N43R+N76D+A194P+Q206L+T255E+S256D+S259D+T260E+N261W+L262E;
 S9E+N43R+N76D+N117H+H120D+A194P+Q206L+S259D+L262E;
 S9E+N43R+N76D+A194P+Q206L+S256D+S259D+N261W+L262E;
 S9E+N43R+N76D+A194P+V205I+Q206L+S256D+S259D+N261W+L262E;
 S9E+N18S+N43R+N76D+G115W+H120V+A194P+V205I+Q206L+S259D+L262E;
 S9E+N43R+N76D+G115W+H120V+A194P+V205I+Q206L+S259D+L262E;
 S9E+N43R+N76D+A194P+Q206L+Y209W+S259D+N261W+L262E;
 S9E+N43R+N76D+Q182E+A194P+V205I+Q206L+Y209W+S256D+S259D+N261W+L262E;
 S9E+N43R+N76D+S188E+A194P+V205I+Q206L+Y209W+S216V+L262E;
 S9E+N76D+G115W+G160P+Q182E+V205I+Q206L+Y209W+S256D+N261W+L262E;
 S9E+N76D+G115W+G160P+Q182E+V205I+Q206L+Y209W+S256D+T260E+N261W+L262E;
 S9E+N43R+N76D+H120T+A194P+Q206L+S256D+S259D+N261W+L262E;
 S9E+N43R+N76D+H120T+A194P+V205I+Q206L+Y209W+S216V+L262E;
 S9E+N76D+G160P+Q182E+V205I+Q206L+Y209W+S256D+N261W+L262E;

15

S9E+N43R+N76D+Q182E+A194P+V205I+Q206L+S259D+N261W+L262E;
 S9E+N76D+V205I+Q206L+Y209W+S256D+N261W+L262E;
 S9E+N76D+Q182E+V205I+Q206L+Y209W+S256D+N261W+L262E;
 S9E+N43R+N76D+Q182E+A194P+V205I+Q206L+S259D+N261W+L262E+*275aH;
 S9E+N43R+N76D+N185E+S188E+A194P+Q206L+Y209W+S259D+L262E;
 S9E+N43R+N76D+Q182E+N185E+S188E+A194P+Q206L+Y209W+S259D+L262E;
 S9E+N43R+N76D+N185E+A194P+V205I+Q206L+Y209W+S216V+L262E;
 S9E+N43R+N76D+A194P+V205I+Q206L+Y209W+S216V+N261M+L262E;
 S9E+N43R+I72A+N76D+A194P+Q206L+L262E;
 S9E+N43R+I72A+N76D+A194P+Q206L+S259D+L262E;
 S9E+N43R+N76D+A194P+V205I+Q206L+L262E;
 S9E+N43R+N76D+A194P+V205I+Q206L+S259D+L262E;
 S9E+N43R+N76D+A158E+A194P+N204D+V205I+Q206L+Y209W+S212G+S216V+L262E;
 S9E+N43R+N76D+A158E+G160P+V205I+Q206L+Y209W+S259D+N261W+L262E;
 S9E+N43R+N76D+A158E+G160P+A194P+N204D+V205I+Q206L+Y209W+S212G+S216V+
 L262E;
 S9E+N43R+N76D+A158E+G160P+S161E+A194P+N204D+V205I+Q206L+Y209W+S216V+
 L262E+*275aH+*275bH;
 S9E+N43R+N76D+A158E+G160P+S161E+A194P+N204D+V205I+Q206L+Y209W+L262E;
 S9E+N43R+N76D+A158E+G160P+S161E+A194P+N204D+V205I+Q206L+Y209W+S212G+
 S216V+L262E+*275aH+*275bH;
 S9E+N43R+N76D+A158E+G160P+S161E+A194P+N204D+V205I+Q206L+Y209W+S212G+
 L262E;
 S9E+N43R+N76D+A158E+A194P+V205I+Q206L+Y209W+S259D+N261W+L262E;
 S9E+N43R+N76D+A158E+G160P+S161E+A194P+N204D+V205I+Q206L+Y209W+S212G+
 L262E+*275aH+*275bH;
 S9E+N43R+N76D+A158E+G160P+S161E+A194P+N204D+V205I+Q206L+Y209W+S216V+
 L262E;
 S9E+N43R+N76D+A158E+G160P+S161E+A194P+Q206L+Y209W+S259D+L262E+*275aH+
 *275bH;
 S9E+N43R+N76D+A158E+G160P+S161E+A194P+V205I+Q206L+Y209W+S212G+S216V+
 L262E;
 S9E+N43R+N76D+A158E+S161E+V205I+Q206L+Y209W+S259D+N261W+L262E;
 S9E+N43R+N76D+A158E+G160P+S161E+V205I+Q206L+Y209W+S259D+N261W+L262E;
 S9E+N43R+N76D+A158E+S161E+A194P+N204D+V205I+Q206L+Y209W+S212G+S216V+
 L262E;
 S9E+N43R+N76D+G160P+V205I+Q206L+Y209W+S259D+N261W+L262E;

S9E+N43R+N76D+A194P+N204D+V205I+Q206L+Y209W+S212G+S216V+S259D+N261W+L262E;
 S9E+N43R+N76D+A194P+Q206L+Y209W+L262E;
 S9E+N43R+N76D+A194P+Q206L+Y209W+S256D+S259D+N261W+L262E;
 S9E+N43R+N76D+A194P+Q206L+Y209W+T255E+S256D+S259D+T260E+N261W+L262E;
 S9E+N43R+N76D+V205I+Q206L+Y209W+S259D+N261W+L262E;
 S9E+N43R+N76D+G115W+H120V+A194P+Q206L+Y209W+S259D+L262E;
 S9E+N43R+N76D+G115W+H120V+P129D+A194P+Q206L+Y209W+S259D+L262E;
 S9E+N43R+N76D+G160P+A194P+N204D+V205I+Q206L+Y209W+S212G+S216V+L262E;
 S9E+N43R+N76D+G160P+S161E+A194P+N204D+V205I+Q206L+Y209W+S212G+S216V+L262E;
 S9E+N43R+N76D+G160P+S161E+A194P+N204D+V205I+Q206L+Y209W+S212G+S216V+L262E+*275aH+*275bH;
 S9E+N43R+N76D+N204D+V205I+Q206L+Y209W+S259D+N261W+L262E;
 S9E+N43R+N76D+G160P+S161E+V205I+Q206L+Y209W+S259D+N261W+L262E;
 S9E+N43R+N76D+H120V+Q182E+A194P+V205I+Q206L+Y209W+S256D+N261W+L262E+*275aH+*275bH;
 S9E+N43R+N76D+V205I+Q206L+Y209W+S216V+S259D+N261W+L262E;
 S9E+N43R+N76D+S161E+V205I+Q206L+Y209W+S259D+N261W+L262E;
 S9E+N43R+N76D+P131+A194P+Q206L+Y209W+S259D+L262E;
 S9E+N43R+N76D+S161E+A194P+N204D+V205I+Q206L+Y209W+S212G+S216V+L262E+*275aH+*275bH;
 S9E+N43R+N76D+V205I+Q206L+Y209W+S212G+S259D+N261W+L262E; y
 S9E+N43R+N76D+N204D+V205I+Q206L+Y209W+S212G+S216V+S259D+N261W+L262E.

2. La composición de limpieza líquida según la reivindicación 1, en la que la proteasa progenitora tiene al menos 65% de identidad de secuencia, p. ej. al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID NO: 2; o donde la proteasa progenitora comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.
3. La composición de limpieza líquida según la reivindicación 1 o 2, en la que dicho pH es de 10 a 13,5, tal como de 12 a 13,5.
4. La composición de limpieza líquida según la reivindicación 1 o 2, en la que el pH es de 11 a 13.
5. La composición de limpieza líquida según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la variante tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 70% idéntica a SEQ ID NO: 2, p. ej., al menos 80%, tal como al menos 90%, tal como al menos 95% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.
6. La composición de limpieza líquida según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende:
 - (a) de 0% a 20% en peso, preferiblemente de 0,1% a 2,5% en peso, de un tensioactivo detergente;
 - (b) de 0,1% a 5% en peso de la variante de proteasa;
 - (c1) de 20% a 95% en peso, preferiblemente de 40% a 95% en peso, más preferiblemente de 70% a 90% en peso, de agua; y/o
 - (c2) de 1% a 30% en peso de un sistema tamponador alcalino que comprende un silicato de metal alcalino o un hidróxido de metal alcalino o una mezcla de los mismos, para proporcionar un pH de 10 a 13,5, preferiblemente de 11 a 13,5.
7. La composición de limpieza según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende una o más enzimas adicionales seleccionadas del grupo que consiste en perhidrolasas, amilasas, catalasas, celulasas (p. ej.,

endoglucanasas), cutinasas, haloperoxigenasas, lipasas, mananasas, pectinasas, pectina liasas, peroxidadas, proteasas, ADNasas, xantanasas y xiloglucanasas, o cualquier mezcla de las mismas.

8. La composición de limpieza según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende un inhibidor de proteasa.

5 9. La composición de limpieza según la reivindicación 8, que comprende un inhibidor de proteasa de aldehído peptídico.

10. Uso de la composición de limpieza líquida según cualquiera de las reivindicaciones precedentes en un procedimiento de limpieza tal como lavado de ropa o limpieza de superficies duras incluyendo lavado de vajillas y limpieza industrial.

10 11. El uso según la reivindicación 10, en el que el procedimiento de lavado de ropa se selecciona del grupo que consiste en: un procedimiento de lavado de ropa residencial, un procedimiento de lavado de ropa industrial y un procedimiento de lavado de ropa institucional.