



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 275 265**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/57** (2006.01)  
**C11D 3/386** (2006.01)  
**C12N 9/54** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **94929758 .4**  
86 Fecha de presentación : **31.08.1994**  
87 Número de publicación de la solicitud: **0719339**  
87 Fecha de publicación de la solicitud: **03.07.1996**

54 Título: **Variantes de subtilisina BPN' con adsorción reducida e hidrólisis mejorada.**

30 Prioridad: **15.09.1993 US 121437**  
**11.08.1994 US 287461**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.06.2007**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.06.2007**

73 Titular/es: **THE PROCTER & GAMBLE COMPANY**  
**One Procter & Gamble Plaza**  
**Cincinnati, Ohio 45202, US**

72 Inventor/es: **Brode, Philip, Frederick, III;**  
**Barnett, Bobby, Lee y**  
**Rubingh, Donn, Nelton**

74 Agente: **Elzaburu Marquez, Alberto**

**ES 2 275 265 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

Variantes de subtilisina BPN' con adsorción reducida e hidrólisis mejorada.

### 5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a variantes enzimáticas novedosas útiles en numerosas composiciones limpiadoras, y a dichas composiciones limpiadoras.

### 10 **Antecedentes de la invención**

Las enzimas constituyen la clase más numerosa de proteínas naturales. Cada clase de enzima generalmente cataliza (acelera una reacción sin ser consumida) una clase diferente de reacción química. Una clase de enzimas conocidas como proteasas son conocidas por su capacidad de hidrolizar (romper un compuesto en dos o más compuestos más simples captando las partes H y OH de una molécula de agua en cada parte del enlace químico escindido) otras proteínas. Se ha aprovechado esta capacidad de hidrolizar proteínas incorporando proteasas naturales y proteasas manipuladas mediante ingeniería de proteínas como un aditivo para preparaciones detergentes para el lavado de ropa. Muchas de las manchas que se producen en las prendas de vestir son proteináceas y las proteasas de amplia especificidad pueden mejorar básicamente la eliminación de dichas manchas.

Desgraciadamente, el nivel de eficacia de estas proteínas en su entorno bacteriano natural frecuentemente no es igual en el entorno de lavado relativamente artificial. Específicamente, las características de las proteasas, tales como estabilidad térmica, estabilidad frente al pH, estabilidad oxidativa y especificidad por el sustrato no están necesariamente optimizadas para su uso fuera del entorno natural de la enzima.

La secuencia de aminoácidos de la proteasa determina las características de la proteasa. Un cambio en la secuencia de aminoácidos de la proteasa puede alterar las propiedades de la enzima en diverso grado, o incluso puede inactivar la enzima, dependiendo de la ubicación, naturaleza y/o magnitud del cambio en la secuencia de aminoácidos. Se han utilizado diversos métodos para alterar la secuencia de aminoácidos de las proteasas de tipo silvestre en un intento de mejorar sus propiedades y con el objetivo de aumentar la eficacia de la proteasa en el entorno de lavado. Estos métodos incluyen la alteración de la secuencia de aminoácidos para mejorar la estabilidad térmica y mejorar la estabilidad frente a la oxidación en condiciones bastante diversas.

A pesar de los diversos métodos descritos en la técnica, sigue existiendo la necesidad de nuevas variantes de proteasas eficaces útiles para la limpieza de una diversidad de superficies.

### **Objetos de la presente invención**

Es un objeto de la presente invención proporcionar variantes de la enzima subtilisina que tengan una capacidad de hidrólisis mejorada con respecto a la enzima de tipo silvestre.

También es un objeto de la presente invención proporcionar composiciones limpiadoras que comprendan estas variantes de la enzima subtilisina.

### 45 **Sumario**

La presente invención se refiere a una variante de subtilisina BPN' que comprende una secuencia de aminoácidos de tipo silvestre, caracterizada porque la secuencia de aminoácidos de tipo silvestre comprende una de las siguientes mutaciones específicas, en donde en primer lugar se indica el aminoácido original de tipo silvestre, en segundo lugar el número de posición y en tercer lugar el aminoácido sustituido:

- *mutación simple:*

55 Lys213Glu;

Ala216Glu;

Ala216Asp;

60 Ala216Gly;

Ser204Glu;

65 Val203Glu;

## ES 2 275 265 T3

### - *mutación doble:*

- Lys213Glu + Tyr217Leu;  
5 Ile205Leu + Ala216Glu;  
Ile205Leu + Ala216Asp;  
Pro210Ala + Gly215Thr;  
10 Lys213Glu + Ala216Glu;  
Tyr214Phe + Tyr217Asn;  
15 Gln206Glu + Ala216Glu;  
Ala216Glu + Tyr217Leu;  
Gln206Glu + Ala216Glu;  
20 Ala216Glu + Tyr217Leu;  
Gln206Glu + Tyr217Leu;  
25 Gln206Glu + Lys213Glu;

### - *mutación triple:*

- 30 Gln206Pro + Gly211Ala + Ala216Glu;  
Lys213Glu + Ala216glu + Tyr217Leu;  
Ile205Val + Pro210Ala + Lys213Glu;  
35 Gln206Glu + Ala216Glu + Tyr217Leu;  
Gln206Glu + Lys213Glu + Tyr217Leu;

40

### - *mutación cuádruple:*

- Pro210Ala + Lys213Glu + Ala216Glu + Tyr217 Leu;  
45 Gln206Glu + Lys213Glu + Ala216Glu + Tyr217Leu;  
Ser204Glu + Gln206Glu + Ala216Glu + Tyr217 Leu;

50

### - *mutación quíntuple:*

- Ile205Leu + Pro210Ala + Lys213Glu + Ala216Glu + Tyr217Leu; y  
55 Ser204Glu + Gln206Glu + Lys213Glu + Ala216Glu + Tyr217Leu,

60 caracterizada porque las variantes BPN' tienen una menor adsorción y una mayor capacidad de hidrólisis de un sustrato insoluble en comparación con la subtilisina BPN' de tipo silvestre. La presente invención también se refiere a una composición limpiadora seleccionada del grupo que consiste en una composición limpiadora para superficies duras, una composición para lavado de vajillas, una composición limpiadora oral, una composición limpiadora para dentaduras postizas y una composición limpiadora para lentes de contacto, caracterizada porque la composición limpiadora comprende dicha variante BPN' y un vehículo limpiador de superficies duras.

## **Descripción**

### 65 I. *Variantes de subtilisina*

Esta invención se refiere a las enzimas subtilisina, en particular la BPN', que han sido modificadas por mutación de varias secuencias de nucleótidos que codifican la enzima, modificando así la secuencia de aminoácidos de la enzima.

## ES 2 275 265 T3

Las enzimas subtilisina modificadas (en lo sucesivo, “variantes BPN’”) de la presente invención tienen una menor adsorción y una mayor capacidad de hidrólisis de un sustrato insoluble que la subtilisina de tipo silvestre. La presente invención también se refiere a los genes mutantes que codifican dichas variantes BPN’.

5 Las enzimas subtilisina de esta invención pertenecen a una clase de enzimas conocidas como proteasas. Una proteasa es un catalizador para la escisión de enlaces peptídicos. Un tipo de proteasa es una serina proteasa. Una serina proteasa se distingue por el hecho de que existe un residuo de serina esencial en el sitio activo.

10 La observación de que la velocidad de hidrólisis de sustratos solubles de una enzima aumenta con la concentración enzimática está bien documentada. Por lo tanto sería plausible que para los sustratos unidos a una superficie, tales como los que se encuentran en muchas aplicaciones de limpieza, aumentara la velocidad de hidrólisis al aumentar la concentración superficial. Se ha demostrado que este es el caso. (Brode, P.F. III and D.S. Rauch, Langmuir, “Subtilisin BPN’: Activity on an Immobilized Substrate”, vol. 8, págs. 1325-1329 [1992]). De hecho, se ha observado una dependencia lineal de la velocidad con la concentración superficial en sustratos insolubles cuando se varía la concentración superficial de la enzima. (Rubingh, D. N. and M. D. Bauer, “Catalysis of Hydrolysis of Proteases at the Protein-Solution Interface”, en Polymer Solution, Blends and Interfaces, Ed. de I. Noda y D. N. Rubingh, Elsevier, pág. 464 [1992]). Sorprendentemente, al intentar aplicar este principio en la búsqueda de variantes de proteasas que tuvieran una capacidad limpiadora mejor, no hemos observado que las enzimas que se adsorban más tengan un mayor rendimiento. De hecho, hemos observado que sorprendentemente se produce el caso contrario: una menor adsorción de una enzima a un sustrato provocaba un aumento de la hidrólisis del sustrato (es decir, mayor capacidad limpiadora).

20 Sin pretender imponer ninguna teoría, se cree que el mejor rendimiento, cuando se compara una variante con otra, se debe al hecho de que las enzimas que adsorben menos están también menos fuertemente unidas y, por consiguiente, son mucho más móviles sobre la superficie de la cual se quiere eliminar el sustrato proteico insoluble. Con concentraciones similares de la solución enzimática, esta mayor movilidad es suficiente para compensar cualquier ventaja conferida por la dispensación de una concentración más alta de la enzima sobre la superficie.

30 Las mutaciones descritas en la presente memoria están diseñadas para cambiar (es decir, disminuir) la adsorción de la enzima a la suciedad unida a la superficie. En la BPN’, los aminoácidos de la posición 200 a la posición 220 forman un gran bucle exterior sobre la molécula de la enzima. Se ha descubierto que este bucle juega un papel significativo en la adsorción de la molécula de la enzima a un péptido unido a la superficie y las mutaciones específicas en este bucle tienen un efecto significativo sobre esta adsorción. Sin pretender imponer ninguna teoría, se cree que este bucle es importante para la adsorción de la molécula de BPN’ por al menos dos razones: En primer lugar, los aminoácidos que comprenden este bucle exterior pueden establecer contactos estrechos con cualquiera de las superficies a las cuales está expuesta la molécula. En segundo lugar, la proximidad de este bucle al sitio activo y al bolsillo de unión de la molécula de BPN’ es la responsable de la adsorción catalíticamente productiva de la enzima a los sustratos unidos a la superficie (suciedad peptídica/proteica).

40 En la presente memoria, “variante” significa una enzima que tiene una secuencia de aminoácidos que difiere de la del tipo silvestre.

En la presente memoria, “gen BPN’ mutante” significa un gen que codifica una variante BPN’.

45 En la presente memoria, “subtilisina BPN’ de tipo silvestre” se refiere a una enzima subtilisina representada por la SEC. n° 1. La secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN’ ha sido descrita también por Wells, J. A., E. Ferrari, D. J. Henner, D.A. Estell y E. Y. Chen, Nucleic Acids Research, vol. II, 7911-7925 (1983).

50 En la presente memoria, la expresión “secuencia de aminoácidos de tipo silvestre” abarca la SEC. n° 1 así como la SEC. n° 1 con modificaciones en la secuencia de aminoácidos en otras posiciones que no sean las 199-220.

55 En la presente memoria, “aminoácido más hidrófilo” se refiere a cualquier otro aminoácido con mayor hidrofili-  
cidad que un aminoácido que se presenta en la tabla de hidrofili-  
cidad creciente (véase Hopp, T.P. y Woods, K.R.,  
“Prediction of Protein Antigenic Determinants from Amino Acid Sequences”, Proceedings of the National Academy  
of Science USA, vol. 78, págs. 3824-3828, 1981, incorporado como referencia en la presente memoria).

60

65

# ES 2 275 265 T3

TABLA 1

	Aminoácido	Valor de hidrofiliicidad
5	Trp	-3,4
	Phe	-2,5
10	Tyr	-2,3
	Leu, Ile	-1,8
	Val	-1,5
15	Met	-1,3
	Cys	-1,0
20	Ala, His	-0,5
	Thr	-0,4
	Pro, Gly	-0,0
25	Gln, Asn	0,2
	Ser	0,3
30	Arg <sup>+</sup> , Lys <sup>+</sup> , Glu <sup>-</sup> , Asp <sup>-</sup>	3,0

La Tabla 1 también muestra los aminoácidos que llevan carga (esta característica está basada en un pH de aproximadamente 8-9). Los aminoácidos cargados positivamente son Arg y Lys, los aminoácidos cargados negativamente son Glu y Asp y el resto de los aminoácidos son neutros. En una realización preferida de la presente invención, el aminoácido que se sustituye es neutro o está cargado negativamente, más preferiblemente está cargado negativamente (es decir, Glu o Asp).

## A. Preparación de las variantes enzimáticas

### Ejemplo 1

#### *Genes BPN' mutantes*

Un fagémido (pSS-5) que contiene el gen de la subtilisina BPN' de tipo silvestre (Mitchinson, C. y J. A. Wells, [1989], "Protein Engineering of Disulfide Bonds in Subtilisin BPN'", *Biochemistry*, vol. 28, págs. 4807-4815) se transforma en la cepa CJ236 de *Escherichia coli unq* y se produce un molde de ADN monocatenaria que contiene uracilo utilizando el fago auxiliar VCSM13 (Kunkel, T.A., J.D. Roberts y R.A. Zakour, "Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection", *Methods in Enzymology*, vol. 154, págs. 367-382, [1987]; modificado por Yuckenberg, P.D., F. Witney, J. Geisselsoder y J. McClary, "Site-directed *in vitro* mutagenesis using uracil-containing DNA and phagemid vectors" *Directed Mutagenesis - A Practical Approach*, ed. M.J. McPherson, págs. 27-48, [1991]). Se utiliza una modificación de la mutagénesis dirigida al sitio con cebador único del método de Zoller y Smith (Zoller, M.J. y M. Smith, "Oligonucleotide-directed mutagenesis using M13-derived vectors: an efficient and general procedure for the production of point mutations in any fragment of DNA", *Nucleic acids research*, vol. 10, págs. 6487-6500, [1982]) para producir todos los mutantes (básicamente como ha sido descrito por Yuckenberg y *col.*, 1991, ver más arriba). Los oligonucleótidos se preparan utilizando un sintetizador de ADN 380B de Applied Biosystem Inc. Los productos de reacción de la mutagénesis se transforman en la cepa MM294 de *Escherichia coli* (American Type Culture Collection *E. Coli*. 33625). Todos los mutantes se confirman por secuenciación de ADN y el ADN aislado se transforma en la cepa de expresión BG2036 de *Bacillus subtilis* (Yang, M. Y., E. Ferrari y D. J. Henner, [1984], "Cloning of the Neutral Protease Gene of *Bacillus subtilis* and the Use of the Cloned Gene to Create an *In Vitro*-derived Deletion Mutation", *Journal of Bacteriology*, vol. 160, págs. 15-21). Para algunos de los mutantes se utiliza un pSS-5 modificado con una mutación por cambio de marco que produce un codón de terminación en el aminoácido 217 para obtener el molde de uracilo. Los oligonucleótidos se diseñan para restaurar el marco de lectura correcto en la posición 217 y también se codifican para sustituciones al azar en las posiciones 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219 y 220 (mezclas equimolares y/o variables de los cuatro nucleótidos para las tres bases en estos codones). Las mutaciones que corrigen el cambio de marco que produce un codón de terminación y dan lugar a una enzima funcional se identifican por su capacidad de digerir la caseína. Las sustituciones al azar se determinan por secuenciación del ADN.

## ES 2 275 265 T3

### Ejemplo 2

#### *Fermentación*

5 Las células de *Bacillus subtilis* (BE2036) que contienen un mutante de la subtilisina de interés se cultivan hasta una fase semilogarítmica en un litro de cultivo de caldo de LB-glucosa y se inoculan en un fermentador Biostat ED (B. Braun Biotech, Inc., Allentown, Pennsylvania) en un volumen total de 10 litros. El medio de fermentación contienen extracto de levadura, almidón, antiespumante, tampones y minerales traza (véase *Fermentation: A Practical Approach*, Ed. B. McNeil y L.M. Harvey, 1990). El caldo se mantiene a un pH constante de 7,0 durante el ciclo de fermentación.  
10 Se añade cloranfenicol para una selección por antibióticos del plásmido mutagenizado. Las células se cultivan durante la noche a 37°C hasta una  $A_{600}$  de aproximadamente 60 y se cosechan.

### Ejemplo 3

#### 15 *Purificación*

Para obtener la enzima pura el caldo de fermentación se pasa por las siguientes etapas: del caldo se retiran las células *Bacillus subtilis* por centrifugación y se clarifica eliminando las partículas finas con una membrana de corte de 100K. A continuación, se concentra en una membrana de corte de 10K y se realiza una diálisis de flujo para reducir la fuerza iónica y ajustar el pH a 5,5 utilizando un tampón MES 0,025M (ácido 2-*N*-morfolino)etanosulfónico). La enzima se purifica adicionalmente cargándola en una columna de cromatografía de intercambio catiónico o en una columna de cromatografía de adsorción por afinidad y eluyéndola de la columna con NaCl o un gradiente de propilenglicol (véase Scopes, R. K., *Protein Purification Principles and Practice*, Springer-Verlag, Nueva York [1984]).

25 Se utiliza el ensayo *pNA* (DeMar, E.G., C. Largman, J.W. Brodrick y M.C. Geokas, *Anal. Biochem.*, vol. 99, págs. 316-320, [1979]) para determinar la concentración de enzima activa en las fracciones recogidas durante la elución en gradiente. Este ensayo mide la velocidad a la que se libera la *p*-nitroanilina a medida que la enzima hidroliza el sustrato sintético soluble, succinil-alanina-alanina-prolina-fenilalanina-*p*-nitroanilida (sAAPF-*pNA*). La velocidad de producción del color amarillo debido a la reacción de hidrólisis se mide a 410 nm en un espectrofotómetro y es proporcional a la concentración de la enzima activa. Además, se utilizan las mediciones de la absorbancia a 280 nm para determinar la concentración total de proteína. La relación enzima activa/proteína total proporciona la pureza de la enzima y se utiliza para identificar las fracciones que se van a combinar para la solución madre.

35 Para evitar la autólisis de la enzima durante el almacenamiento, se añade un peso igual de propilenglicol a las fracciones combinadas obtenidas de la columna de cromatografía. Una vez completado el procedimiento de purificación, la pureza de la solución madre de la enzima se verifica con SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con sulfato de dodecilo sódico) y se determina la concentración absoluta de la enzima mediante un método de valoración volumétrica del sitio activo utilizando un inhibidor de la tripsina de tipo II=T: clara de huevo de pavo adquirida a Sigma Chemical Company (St. Louis, Missouri). Los factores de conversión medidos mostrarán cuáles de los cambios hechos en la molécula de la enzima en las diversas posiciones producen una variante enzimática con mayor actividad, con respecto al tipo salvaje, frente al sustrato soluble *pNA*.

45 En la preparación para su uso, la solución madre de la enzima se eluye a través de una columna de exclusión por tamaño Sephadex-G25 (Pharmacia, Piscataway, New Jersey) para separar el propilenglicol y cambiar el tampón. El tampón MES de la solución madre de la enzima se cambia por un tampón Tris (Tris(hidroximetil-aminometano) 0,1 M que contiene  $\text{CaCl}_2$  0,01 M y el pH se ajusta a 8,6 con HCl. Todos los experimentos se llevan a cabo a pH 8,6 en tampón Tris atemperado a 25°C.

#### 50 *B. Variantes enzimáticas caracterizadas*

### Ejemplo 4

#### *Preparación de la superficie modelo*

55 Se utiliza un frasco de vidrio de porosidad controlada (CPG) de aminopropilo adquirido a CPG Inc. (Fairfield, New Jersey) como soporte para unir covalentemente el sustrato de sAAPF-*pNA* adquirido a Bachem, Inc. (Torrence, California). La reacción se lleva a cabo en dimetilsulfóxido y (clorhidrato de 1-etil-3-[3-(dimetilamino)propil] carbodiimida) (EDC) como agente acoplador. Una vez finalizada la reacción (controlada mediante el ensayo *pNA*), se elimina el exceso de disolvente y el CPG:sAAPF-*pNA* se aclara con dimetilsulfóxido (DMSO) y agua doblemente destilada. A continuación se seca en horno con purgado de  $\text{N}_2$  a aproximadamente 70°C. El esquema de reacción y la preparación del sustrato inmovilizado se realizan como se describe en Brode, P.F. III y D.S. Rauch, "Subtilisin BPN": Activity on an Immobilized Substrate," *Langmuir*, vol. 8, págs. 1325-1329, (1992).

65 La superficie del CPG tendrá  $62.000 \pm 7.000$  moléculas de *pNA*/ $\mu\text{m}^2$ . La superficie no variará con respecto al valor de 50,0  $\text{m}^2/\text{g}$  notificado por CPG Inc. para el CPG recibido. Esto sugiere que el procedimiento utilizado para añadir sAAPF-*pNA* al CPG no daña la estructura porosa (diámetro medio US 486 A).

## Ejemplo 5

*Ensayo de hidrólisis superficial*

5 Utilizando CPG:sAAPF-*p*NA, se puede medir la adsorción de una variante enzimática y la hidrólisis del péptido unido al CPG en un único experimento. Se añade un pequeño volumen de solución madre de la variante enzimática a un matraz que contiene tampón Tris y CPG:sAAPF-*p*NA que ha sido desgasificado. El matraz se agita en un agitador con acción de muñeca durante un período de 90 minutos durante el cual el agitador se para a diferentes intervalos de tiempo (por ejemplo, cada 2 minutos durante las primeras etapas de la hidrólisis de adsorción, p. ej., los 20 primeros minutos, y cada 10 minutos hacia el final del experimento). Se deja en reposo el CPG:sAAPF-*p*NA y se toma una muestra de la solución. Tanto el procedimiento experimental como el cálculo de la adsorción y la hidrólisis se llevan a cabo como describen Brode y *col.*, 1992, citado más arriba.

15 Se controla la estabilidad de todas las enzimas frente a la autólisis y durante el transcurso de este experimento no debería observarse una pérdida autolítica apreciable. Por consiguiente, la adsorción de la enzima se puede determinar midiendo el agotamiento de la solución. La diferencia entre la concentración inicial de la variante enzimática y la concentración medida en cada punto temporal proporciona la cantidad de variante enzimática adsorbida. La cantidad de *p*NA hidrolizado en la superficie se mide tomando una lectura de absorbancia en una alícuota de la muestra a 410 nm. La cantidad total de *p*NA hidrolizado se calcula añadiendo la cantidad muestreada y la cantidad que queda en el matraz. Este valor se corrige restando la cantidad de *p*NA que es hidrolizada por el tampón Tris a pH 8,6 cuando no hay presente enzima. Esta hidrólisis de la base es de 7% a 29% de la hidrólisis total, dependiendo de la eficacia de la enzima.

## Ejemplo 6

25

*Análisis cinético del sustrato soluble*

Las velocidades de hidrólisis del sustrato soluble sAAPF-*p*NA se controlan midiendo el aumento de adsorbancia en función del tiempo a 410 nm en un espectrofotómetro DU-70. La concentración de la enzima se mantiene constante y se prepara para que esté en el intervalo de 6-10 nanomolar mientras que la concentración del sustrato varía de 90-700  $\mu$ M de sAAPF-*p*NA en cada determinación cinética. Se mide la adsorbancia cada segundo durante un período de 900 segundos y los datos se transfieren a una hoja de cálculo Lotus™ (Lotus Development Corporation, Cambridge, Massachusetts). El análisis de los parámetros cinéticos se realiza mediante el análisis de Lineweaver Burk estándar en el cual los datos de la parte inicial del ciclo (generalmente el primer minuto) se ajustan a una recta de regresión para  $v_0$ . Los datos  $v_0$  y  $s_0$  se representan en la forma inversa estándar para obtener  $K_M$  y  $k_{cat}$ .

*C. Ejemplo de variantes BPN'*

40 En la Tabla 2 siguiente se presentan las variantes BPN' de la presente invención que tienen una menor adsorción y una mayor capacidad de hidrólisis de los sustratos unidos a la superficie. Al describir las mutaciones específicas se indica en primer lugar el aminoácido original de tipo silvestre, en segundo lugar el número de posición y en tercer lugar el aminoácido sustituido.

45

(Tabla pasa a página siguiente)

50

55

60

65

# ES 2 275 265 T3

TABLA 2

---

5	Ejemplo de variantes BPN'
	--Mutación simple--
	Lys213Glu
10	Ala216Glu
	Ala216Asp
	Ala216Gly
15	Ser204Glu
	Val203Glu
20	
	--Mutación doble--
	Lys213Glu + Tyr217Leu
25	Ile205Leu + Ala216Glu
	Ile205Leu + Ala216Asp
	Pro210Ala + Gly215Thr
30	Lys213Glu + Ala216Glu
	Tyr214Phe + Tyr217Asn
	Gln206Glu + Ala216Glu
35	Ala216Glu + Tyr217Leu
	Gln206Glu + Tyr217Leu
40	Gln206Glu + Lys213Glu
	--Mutación triple--
45	Gln206Pro + Gly211Ala + Ala216Glu
	Lys213Glu + Ala216Glu + Tyr217Leu
	Ile205Val + Pro210Ala + Lys213Glu
50	Gln206Glu + Ala216Glu + Tyr217Leu
	Gln206Glu + Lys213Glu + Tyr217Leu
55	
	--Mutación cuádruple--
60	
65	

---

Pro210Ala + Lys213Glu + Ala216Glu + Tyr217Leu

Gln206Glu + Lys213Glu + Ala216Glu + Tyr217Leu

Ser204Glu + Gln206Glu + Ala216Glu + Tyr217Leu

--Mutación quintuple --

Ile205Leu + Pro210Ala + Lys213Glu + Ala216Glu + Tyr217Leu

Ser204Glu + Gln206Glu + Lys213Glu + Ala216Glu + Tyr217Leu

---

## II. Composiciones limpiadoras

En otra realización de la presente invención, se incluye una cantidad eficaz de una o más variantes enzimáticas de la presente invención en composiciones útiles para limpiar diversas superficies en las cuales sea necesario eliminar manchas proteínicas. Dichas composiciones limpiadoras incluyen composiciones detergentes para limpiar superficies duras en una forma no limitada (p. ej., líquidas y granuladas); composiciones detergentes para limpiar tejidos, en una forma no limitada (p. ej., formulaciones granuladas, líquidas y en pastilla); composiciones para lavado de vajillas (en una forma no limitada); composiciones limpiadoras orales, en una forma no limitada (p. ej., formulaciones para dentífrico, pasta dental o colutorio); composiciones limpiadoras de dentaduras postizas, en una forma no limitada (p. ej., líquido, pastilla); y composiciones limpiadoras para lentillas de contacto, en una forma no limitada (p. ej., líquido, pastilla). En la presente memoria, "cantidad eficaz de la variante enzimática" se refiere a la cantidad de variante enzimática necesaria para alcanzar la actividad enzimática necesaria en la composición limpiadora específica. Dichas cantidades eficaces serán fácilmente determinadas por un experto en la técnica y dependen de muchos factores, tales como la variante enzimática utilizada, la aplicación de limpieza, la composición específica de la composición limpiadora y si se requiere una composición líquida o seca (p. ej., granulada, en pastilla) y similares. Preferiblemente las composiciones limpiadoras de la presente invención comprenden de aproximadamente 0,0001% a aproximadamente 10% de una o más variantes enzimáticas de la presente invención, más preferiblemente de aproximadamente 0,001% a aproximadamente 1%, más preferiblemente aún de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 0,1%. A continuación se describirán más detalladamente varios ejemplos de diversas composiciones limpiadoras en donde se pueden utilizar las variantes enzimáticas de la presente invención. Todas las partes, porcentajes y relaciones utilizados en la presente memoria son en peso, salvo que se indique lo contrario.

En la presente memoria, "composiciones limpiadoras no adecuadas para tejidos" incluyen composiciones limpiadoras para superficies duras, composiciones para lavado de vajillas, composiciones limpiadoras orales, composiciones limpiadoras de dentaduras postizas y composiciones limpiadoras para lentillas de contacto.

### A. Composiciones limpiadoras para superficies duras, vajillas y tejidos

Las enzimas de la presente invención se pueden usar en cualquier composición detergente donde se desee una alta formación de jabonaduras y una buena eliminación del sustrato insoluble. Por tanto, las variantes enzimáticas de la presente invención se pueden usar con diversos ingredientes convencionales para proporcionar limpiadores de superficies duras, composiciones para lavado de vajillas y composiciones para lavado de tejidos totalmente formuladas y similares. Dichas composiciones pueden estar en la forma de líquidos, gránulos, pastillas y similares. Dichas composiciones se pueden formular como detergentes "concentrados" modernos que contienen hasta 30%-60% en peso de tensioactivos.

Las composiciones limpiadoras de la presente invención pueden opcionalmente, y preferiblemente, contener diversos tensioactivos aniónicos, no iónicos, de ion híbrido, etc. Dichos tensioactivos están presentes de forma típica a niveles de aproximadamente 5% a aproximadamente 35% de las composiciones.

Ejemplos no limitativos de tensioactivos útiles en la presente invención incluyen los alquil C<sub>11</sub>-C<sub>18</sub> bencenosulfonatos convencionales y alquilsulfatos primarios y aleatorios, los alquil C<sub>10</sub>-C<sub>18</sub> sulfatos (2,3) secundarios de fórmulas CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>(CHOSO<sub>3</sub><sup>-</sup>M<sup>+</sup>)CH<sub>3</sub> y CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>y</sub>(CHOSO<sub>3</sub><sup>-</sup>M<sup>+</sup>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> en donde x e (y+1) son números enteros de al menos aproximadamente 7, preferiblemente de al menos aproximadamente 9 y M es un catión hidrosoluble, especialmente sodio, los alquilalcoxi C<sub>10</sub>-C<sub>18</sub> sulfatos (especialmente los etoxi sulfatos EO 1-5), alquil C<sub>10</sub>-C<sub>18</sub> alcoxi carboxilatos (especialmente los etoxi carboxilatos EO 1-5), los alquil C<sub>10</sub>-C<sub>18</sub> poliglicósidos y sus correspondientes poliglicósidos sulfatados, ésteres C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub> de ácido graso alfa sulfonados, alquil y alquil C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub> fenol alcoxilatos (especialmente etoxilatos y mixtos etoxi/propoxi), betaínas C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub> y sulfobetaínas ("sultaínas"), óxidos de amina C<sub>10</sub>-C<sub>18</sub> y similares. Los alquil alcoxi sulfatos (AES) y los alquil alcoxi carboxilatos (AEC) son los preferidos en la presente invención. (También se prefiere el uso de dichos tensioactivos junto con los tensioactivos de tipo óxido de amina, betaína o sultaína anteriormente mencionados, dependiendo del deseo del formulador). Otros tensioactivos convencionales útiles se describen en los textos estándar. Los tensioactivos especialmente útiles incluyen las N-metil C<sub>10</sub>-C<sub>18</sub> glucamidas descritas en la patente US-5.194.639, concedida a Connor y col. el 16 de marzo de 1993.

## ES 2 275 265 T3

En las composiciones de la presente invención se puede incluir una amplia variedad de otros ingredientes útiles en las composiciones limpiadoras detergentes, incluyendo otros ingredientes activos, vehículos, hidrotropos, mejoradores del proceso, tintes o pigmentos, disolventes para formulaciones líquidas, etc. Si se desea un aumento adicional de la formación de jabonaduras, se pueden incorporar a las composiciones reforzadores de la formación de las jabonaduras, como las alcohol C<sub>10</sub>-C<sub>16</sub> amidas, de forma típica a niveles de aproximadamente 1% a aproximadamente 10%. Las monoetanol y dietanol C<sub>10</sub>-C<sub>14</sub> amidas ilustran una clase típica de dichos reforzadores de la formación de las jabonaduras. También es ventajoso el uso de dichos reforzadores de formación de las jabonaduras con un adyuvante de alta formación de jabonaduras y tensioactivos tales como los óxidos de amina, las betaínas y las sultaínas mencionadas anteriormente. Si se desea, se pueden añadir sales de magnesio solubles, tales como MgCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub> y similares a niveles, de forma típica, de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 2%, para proporcionar una formación de las jabonaduras adicional.

Las composiciones detergentes líquidas de la presente invención pueden contener agua y otros disolventes como vehículos. Son adecuados los alcoholes primarios o secundarios de bajo peso molecular, por ejemplo metanol, etanol, propanol e isopropanol. Los alcoholes monohídricos son preferidos para disolver los tensioactivos, aunque también se pueden usar polioles tales como los que contienen de aproximadamente 2 a aproximadamente 6 átomos de carbono y de aproximadamente 2 a aproximadamente 6 grupos hidroxilo (p. ej., 1,3-propanodiol, etilenglicol, glicerina y 1,2-propanodiol). Las composiciones pueden contener de aproximadamente 5% a aproximadamente 90%, de forma típica de aproximadamente 10% a aproximadamente 50%, de dichos vehículos.

Las composiciones detergentes de la presente invención estarán preferiblemente formuladas de modo que durante el uso en operaciones de limpieza acuosa el agua de lavado tendrá un pH entre aproximadamente 6,8 y aproximadamente 11,0. Los productos terminados están, por lo tanto, formulados de forma típica en este intervalo. Las técnicas para el control del pH en los niveles de uso recomendados incluyen el uso de tampones, álcalis, ácidos, etc. y son bien conocidas por los expertos en la técnica.

A la hora de formular las composiciones limpiadoras para superficies duras y las composiciones limpiadoras para tejidos de la presente invención, el formulador podría desear emplear diversos aditivos reforzantes de la detergencia a niveles de aproximadamente 5% a aproximadamente 50%, en peso. Los aditivos reforzantes de la detergencia típicos incluyen las zeolitas de 1-10 micrómetros, policarboxilatos tales como los citratos y oxidisuccinatos, silicatos laminares, fosfatos, y similares. Otros aditivos reforzantes de la detergencia convencionales figuran en los formularios convencionales.

Igualmente, el formulador podría desear utilizar diversas enzimas adicionales, tales como celulasas, lipasas, amilasas y proteasas en dichas composiciones, de forma típica a niveles de aproximadamente 0,001% a aproximadamente 1%, en peso. En la técnica de los detergentes para lavado de ropa son bien conocidas diversas enzimas deterativas y para el cuidado de tejidos.

En dichas composiciones se pueden utilizar diversos compuestos blanqueantes, tales como percarbonatos, perboratos y similares, de forma típica a niveles de aproximadamente 1% a aproximadamente 15%, en peso. Si se desea, dichas composiciones pueden contener también activadores del blanqueador, tales como tetraacetil etilendiamina, nonaoiloxibenceno sulfonato y similares, los cuales son también conocidos en la técnica. Los niveles de uso oscilan de forma típica de aproximadamente 1% a aproximadamente 10%, en peso.

En dichas composiciones pueden utilizarse diversos agentes para liberar la suciedad, especialmente del tipo oligoéster aniónico, diversos agentes quelantes, especialmente los amino fosfonatos y etilendiaminodisuccinatos, diversos agentes eliminadores de la suciedad arcillosa, especialmente tetraetilenpentamina etoxilada, diversos agentes dispersantes, especialmente poliacrilatos y poliaspartatos, diversos abrillantadores, especialmente abrillantadores aniónicos, varios supresores de las jabonaduras, especialmente siliconas y alcoholes secundarios, diversos suavizantes de tejidos, especialmente arcillas tipo esmectita y similares, a niveles que oscilan de aproximadamente 1% a aproximadamente 35%, en peso. Los formularios convencionales y las patentes publicadas contienen múltiples descripciones detalladas y estos materiales convencionales.

En las composiciones limpiadoras de la presente invención también se pueden utilizar estabilizantes enzimáticos. Dichos estabilizantes enzimáticos incluyen propilenglicol (preferiblemente de aproximadamente 1% a aproximadamente 10%), formiato sódico (preferiblemente de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 1%) y formiato cálcico (preferiblemente de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 1%).

### 1. Composiciones limpiadoras para superficies duras

En la presente memoria "composición limpiadora para superficies duras" se refiere a composiciones detergentes líquidas y granuladas para limpiar superficies duras como suelos, paredes, baldosas de cuartos de baño y similares. Las composiciones limpiadoras para superficies duras de la presente invención comprenden una cantidad eficaz de una o más variantes enzimáticas de la presente invención, preferiblemente de aproximadamente 0,001% a aproximadamente 10%, más preferiblemente de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 5%, más preferiblemente aún de aproximadamente 0,05% a aproximadamente 1%, en peso de enzima activa de la composición. Además de comprender una o más variantes enzimáticas de la presente invención, dichas composiciones limpiadoras para superficies duras comprenden de forma típica un tensioactivo y un aditivo reforzante de la detergencia secuestrante hidrosoluble. Sin

## ES 2 275 265 T3

embargo, en determinados productos especializados, como limpiadores para pulverizar ventanas, los tensioactivos a veces no son utilizados ya que éstos pueden dejar un residuo de película o vetas en la superficie del cristal.

5 El componente tensioactivo, cuando está presente, puede comprender una cantidad tan pequeña como 0,1% de las composiciones de la presente invención, aunque las composiciones contendrán de aproximadamente 0,25% a aproximadamente 10%, más preferiblemente de aproximadamente 1% a aproximadamente 5%, de tensioactivo.

10 De forma típica las composiciones contendrán de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 50% de un aditivo reforzante de la detergencia, preferiblemente de aproximadamente 1% a aproximadamente 10%.

10 Preferiblemente el pH debería estar en el intervalo de aproximadamente 8 a 12. En caso de que sea necesario un ajuste, se pueden usar agentes para ajustar el pH convencionales, tales como hidróxido sódico, carbonato sódico o ácido clorhídrico.

15 Los disolventes se pueden incluir en las composiciones. Los disolventes útiles incluyen, aunque no de forma limitativa, glicol éteres tales como dietilenglicol monohexil éter, dietilenglicol monobutil éter, etilenglicol monobutil éter, etilenglicol monohexil éter, propilenglicol monobutil éter, dipropilenglicol monobutil éter y dioles, tales como 2,2,4-trimetil-1,3-pentanodiol y 2-etil-1,3-hexanodiol. Cuando se usan, dichos disolventes están presentes de forma típica a niveles de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 15%, preferiblemente de aproximadamente 3% a aproximadamente 11%.

25 Además, en las presentes composiciones se pueden usar disolventes muy volátiles como el isopropanol o el etanol para facilitar una evaporación más rápida de la composición en las superficies si estas no se aclaran después de la aplicación de la composición "pura" sobre la superficie. Cuando se usan, los disolventes volátiles están presentes de forma típica a niveles de aproximadamente 2% a aproximadamente 12% en las composiciones.

La realización de composición limpiadora para superficies duras de la presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos.

30 Ejemplos 7-12

### *Composiciones limpiadoras líquidas para superficies duras*

Componente	Ejemplo n°					
	7	8	9	10	11	12
Lys213Glu	0,05	0,50	0,02	0,03	0,10	0,03
Ile205Leu + Ala216Asp	-	-	-	-	0,20	0,02
Na <sub>2</sub> DIDA*	-	-	2,90	2,90	-	-
EDTA**	-	-	-	-	2,90	2,90
Citrato de Na	1,95	-	1,95	-	1,95	-
Alquil C <sub>12</sub> benceno sulfonato sódico	-	2,20	-	2,20	-	2,20
Alquil C <sub>12</sub> sulfato sódico	-	2,20	-	2,20	-	2,20
C <sub>12</sub> (etoxi)*** sulfato sódico	-	0,50	-	0,50	-	0,50
Óxido de dimetil C <sub>12</sub> amina	1,30	-	1,30	-	1,30	-
Cumensulfonato de Na	6,30	6,30	6,30	6,30	6,30	6,30
Hexil Carbitol***	Resto hasta el 100%					

\* N-dietilenglicol-N,N-iminodiacetato disódico

\*\* Ácido etilendiamino<sub>4</sub> diacético Na

65 \*\*\* Dietilenglicol monohexil éter

\*\*\*\* Todas las fórmulas ajustadas a pH 7

## ES 2 275 265 T3

En los ejemplos 7-10, las variantes BPN' presentadas en la Tabla 2, entre otras, están sustituidas por Lys213Glu, con resultados prácticamente similares.

En los ejemplos 11-12, cualquier combinación de las variantes BPN' presentadas en la Tabla 2, entre otras, están sustituidas por Lys213Glu y Ile205Leu + Ala216Asp, con resultados prácticamente similares.

Ejemplos 13-18

10 *Composiciones de pulverización para limpiar superficies duras y eliminar el moho doméstico*

Componente	Ejemplo n°					
	13	14	15	16	17	18
Lys213Glu + Tyr217Leu	0,50	0,05	0,60	0,30	0,20	0,30
Ala216Glu	-	-	-	-	0,30	0,10
Octilsulfato sódico	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Dodecilsulfato sódico	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
Hidróxido de sodio	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80
Silicato (Na)	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
Perfume	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35
Agua	Resto hasta el 100%					

El pH del producto es aproximadamente 7.

En los ejemplos 13-16, las variantes BPN' mostradas en la Tabla 2, entre otras, están sustituidas por Lys213Glu + Tyr217Leu, con resultados prácticamente similares.

En los ejemplos 17-18, cualquier combinación de las variantes BPN' mostradas en la Tabla 2, entre otras, están sustituidas por Lys213Glu + Tyr217Leu y Ala216Glu, con resultados prácticamente similares.

### 2. Composiciones para lavado de vajillas

En otra realización de la presente invención, las composiciones para lavado de vajillas comprenden una o más variantes enzimáticas de la presente invención. En la presente memoria, "composición para lavado de vajillas" se refiere a todas las formas de composiciones para limpiar platos, incluyendo de forma no excluyente, las formas granuladas y líquidas. La realización de la composición para lavado de vajillas de la presente invención está ilustrada por los ejemplos que se presentan a continuación.

Ejemplos 19-24

50 *Composición para lavado de vajillas*

Componente	Ejemplo n°					
	19	20	21	22	23	24
Glu206Pro + Gly211Ala + Ala216Glu	0,05	0,50	0,20	0,40	0,10	0,03
Ile205Leu + Ala216Asp	-	-	-	-	0,40	0,02
N-metil C <sub>12</sub> -C <sub>14</sub> glucamida	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90
C <sub>12</sub> etoxi (1) sulfato	12,00	12,00	12,00	12,00	12,00	12,00

## ES 2 275 265 T3

	Ácido 2-metil undecanoico	4,50	4,50	4,50	4,50	4,50	4,50
	C <sub>12</sub> etoxi (2) carboxilato	4,50	4,50	4,50	4,50	4,50	4,50
5	Alcohol C <sub>12</sub> etoxilado (4)	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
	Óxido de C <sub>12</sub> amina	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
	Cumensulfonato sódico	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
	Etanol	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
10	Mg <sup>++</sup> (como MgCl <sub>2</sub> )	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
	Ca <sup>++</sup> (como CaCl <sub>2</sub> )	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
	Agua	Resto hasta el 100%					

15 El pH del producto se ajusta a 7.

En los ejemplos 19-22, las variantes BPN' mostradas en la Tabla 2, entre otras, están sustituidas por Gln206Pro + Gly211Ala + Ala216Glu, con resultados prácticamente similares.

20 En los ejemplos 23-24, cualquier combinación de las variantes BPN' mostradas en la Tabla 2, entre otras, están sustituidas por Gln206Pro + Gly211Ala + Ala216Glu e Ile205Leu + Ala216Asp, con resultados prácticamente similares.

### 25 3. Composiciones limpiadoras de tejidos

En otra realización de la presente invención, las composiciones limpiadoras de tejidos comprenden una o más variantes enzimáticas de la presente invención. En la presente memoria, "composición limpiadora de tejidos" se refiere a todas las formas de composiciones detergentes para limpiar tejidos, incluyendo de forma no excluyente, formas granuladas, líquidas y en pastilla.

#### 30 a. Composiciones limpiadoras de tejidos granuladas

35 Las composiciones limpiadoras de tejidos granuladas de la presente invención contienen una cantidad eficaz de una o más variantes enzimáticas de la presente invención, preferiblemente de aproximadamente 0,001% a aproximadamente 10%, más preferiblemente de aproximadamente 0,005% a aproximadamente 5%, más preferiblemente de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 1%, en peso de enzima activa de la composición. Además de una o más variantes enzimáticas, las composiciones limpiadoras de tejidos granuladas comprenden al menos un tensioactivo, uno o más aditivos reforzantes de la detergencia y en algunos casos, un agente blanqueante.

40 La realización de composición limpiadora de tejidos granulada de la presente invención está ilustrada por los siguientes ejemplos.

Ejemplos 25-28

#### 45 Composiciones limpiadoras de tejidos granuladas

Componente	Ejemplo n°			
	25	26	27	28
50 Ala216Asp	0,10	0,20	0,03	0,05
Ala216Gly	-	-	0,02	0,05
55 Alquil C <sub>13</sub> benceno sulfonato lineal	22,00	22,00	22,00	22,00
Fosfato (como tripolifosfatos de sodio)	23,00	23,00	23,00	23,00
Carbonato sódico	23,00	23,00	23,00	23,00
60 Silicato sódico	14,00	14,00	14,00	14,00
Zeolita	8,20	8,20	8,20	8,20
Quelante (ácido dietilentriamino- pentaacético)	0,40	0,40	0,40	0,40
65 Sulfato sódico	5,50	5,50	5,50	5,50
Agua	Resto hasta el 100%			

## ES 2 275 265 T3

En los ejemplos 25-26, las variantes BPN' mostradas en la Tabla 2, entre otras, están sustituidas por Ala216Asp, con resultados prácticamente similares.

En los ejemplos 27-28, cualquier combinación de las variantes BPN' mostradas en la Tabla 2, entre otras, están sustituidas por Ala216Asp y Ala216Gly, con resultados prácticamente similares.

Ejemplos 29-32

### 10 Composiciones limpiadoras de tejidos granuladas

Componente	Ejemplo n°			
	29	30	31	32
Lys213Glu + Ala216Glu + Tyr217Leu	0,10	0,20	0,03	0,05
Ile205Val + Pro210Ala + Lys213Glu	-	-	0,02	0,05
Alquil C <sub>12</sub> benceno sulfonato	12,00	12,00	12,00	12,00
Zeolita A (1-10 micrómetros)	26,00	26,00	26,00	26,00
Ácido 2-butyl octanoico	4,00	4,00	4,00	4,00
Alquil C <sub>12</sub> -C <sub>14</sub> sulfato secundario (2,3), sal sódica	5,00	5,00	5,00	5,00
Citrato sódico	5,00	5,00	5,00	5,00
Abrillantador óptico	0,10	0,10	0,10	0,10
Sulfato sódico	17,00	17,00	17,00	17,00
Agua y componentes minoritarios	Resto hasta el 100%			

En los ejemplos 29-30, las variantes BPN' mostradas en la Tabla 2, entre otras, están sustituidas por Lys213Glu + Ala216Glu + Tyr217Leu, con resultados prácticamente similares.

En los ejemplos 31-32, cualquier combinación de las variantes BPN' mostradas en la Tabla 2, entre otras, están sustituidas por Lys213Glu + Ala216Glu + Tyr217Leu e Ile205Val + Pro210Ala + Lys213Glu, con resultados prácticamente similares.

### b. Composiciones limpiadoras de tejidos líquidas

Las composiciones limpiadoras de tejidos líquidas de la presente invención comprenden una cantidad eficaz de una o más variantes enzimáticas de la presente invención, preferiblemente de aproximadamente 0,005% a aproximadamente 5%, más preferiblemente de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 1%, en peso de enzima activa de la composición. Dichas composiciones limpiadoras de tejidos líquidas comprenden además de forma típica un tensioactivo aniónico, un ácido graso, un aditivo reforzante de la detergencia hidrosoluble y agua.

La realización de la composición limpiadora de tejidos líquida de la presente invención está ilustrada por los siguientes ejemplos.

## ES 2 275 265 T3

Ejemplos 33-37

### *Composiciones limpiadoras de tejidos líquidas*

Componente	Ejemplo n°				
	33	34	35	36	37
Pro210Ala + Gly215Thr	0,05	0,03	0,30	0,03	0,10
Pro210Ala + Lys213Glu + Ala216Glu + Tyr217Leu	-	-	-	0,01	0,20
Alquil C <sub>12</sub> -C <sub>14</sub> sulfato, Na	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00
Ácido 2-butiloctanoico	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Citrato sódico	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Alcohol C <sub>10</sub> etoxilado (3)	13,00	13,00	13,00	13,00	13,00
Monoetanolamina	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50
Agua/propilenglicol/etanol (100:1:1)	resto hasta el 100%				

En los ejemplos 33-35 las variantes BPN' mostradas en la Tabla 2, entre otras, están sustituidas por Pro210Ala + Gly215Thr, con resultados prácticamente similares.

En los ejemplos 36-37, cualquier combinación de las variantes BPN' mostradas en la Tabla 2, entre otras, están sustituidas por Pro210Ala + Gly215Thr y Pro210Ala + Lys213Glu + Ala216Glu + Tyr217Leu, con resultados prácticamente similares.

### *c. Composiciones limpiadoras de tejidos en pastilla*

Las composiciones limpiadoras de tejidos en pastilla de la presente invención adecuadas para el lavado a mano de tejidos manchados contienen una cantidad eficaz de una o más variantes enzimáticas de la presente invención, preferiblemente de aproximadamente 0,001% a aproximadamente 10%, más preferiblemente de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 1%, en peso de la composición.

La realización de la composición limpiadora de tejidos en pastilla de la presente invención está ilustrada por los siguientes ejemplos.

Ejemplos 38-41

### *Composiciones limpiadoras de tejidos en pastilla*

Componente	Ejemplo n°			
	38	39	40	41
Lys213Glu + Ala216Glu	0,3	-	0,1	0,02
Tyr214Phe + Tyr217Asn	-	-	0,4	0,03
Alquil C <sub>12</sub> -C <sub>16</sub> sulfato, Na	20,0	20,0	20,0	20,0
N-metil-C <sub>12</sub> -C <sub>14</sub> glucamida	5,0	5,0	5,0	5,00
Alquil C <sub>11</sub> -C <sub>13</sub> benceno sulfonato, Na	10,0	10,0	10,0	10,00
Carbonato sódico	25,0	25,0	25,0	25,00
Pirofosfato sódico	7,0	7,0	7,0	7,00
Tripolifosfato sódico	7,0	7,0	7,0	7,00
Zeolita A (0,1-0,10 µ)	5,0	5,0	5,0	5,00
Carboximetilcelulosa	0,2	0,2	0,2	0,20

## ES 2 275 265 T3

	0,2	0,2	0,2	0,20
Poliacrilato (PM 1400)				
Monoetanolamida de coco	5,0	5,0	5,0	5,00
5 Abrillantador, perfume	0,2	0,2	0,2	0,20
CaSO <sub>4</sub>	1,0	1,0	1,0	1,00
MgSO <sub>4</sub>	1,0	1,0	1,0	1,00
10 Agua	4,0	4,0	4,0	4,00
Carga*	Resto hasta el 100%			

15 \* Se puede seleccionar de materiales adecuados tales como CaCO<sub>3</sub>, talco, arcilla, silicatos y similares.

20 En los ejemplos 38-39 las variantes BPN' mostradas en la Tabla 2, entre otras, están sustituidas por Lys213Glu + Ala216Glu, con resultados prácticamente similares.

En los ejemplos 40-41, cualquier combinación de las variantes BPN' mostradas en la Tabla 2, entre otras, están sustituidas por Lys213Glu + Ala216Glu y Tyr214Phe + Tyr217Asn, con resultados prácticamente similares.

### 25 B. Otras composiciones limpiadoras

Además de las composiciones limpiadoras de superficies duras, de vajillas y de tejidos descritas más arriba, se pueden incorporar una o más variantes enzimáticas de la presente invención a otras muchas composiciones limpiadoras cuando se desee la hidrólisis de un sustrato insoluble. Dichas composiciones limpiadoras adicionales incluyen, aunque no de forma limitativa, composiciones limpiadoras orales, composiciones limpiadoras de dentaduras postizas y composiciones limpiadoras para lentillas de contacto.

#### 1. Composiciones limpiadoras orales

35 En otra realización de la presente invención, se incluye una cantidad farmacéuticamente aceptable de una o más variantes enzimáticas de la presente invención en composiciones útiles para eliminar las manchas proteináceas en dientes o dentaduras postizas. En la presente memoria, "composiciones limpiadoras orales" se refiere a dentífricos, pastas dentales, geles dentales, polvos dentales, colutorios, pulverizadores bucales, geles bucales, chicles, gominolas, bolsitas, pastillas, biogeles, pastas profilácticas, soluciones para el tratamiento dental y similares. Preferiblemente, las composiciones limpiadoras orales de la presente invención comprenden de aproximadamente 0,0001% a aproximadamente 20% de una o más variantes enzimáticas de la presente invención, más preferiblemente de aproximadamente 0,001% a aproximadamente 10%, más preferiblemente aún de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 5%, en peso de la composición y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En la presente memoria, "farmacéuticamente aceptable" significa que los fármacos, medicamentos o ingredientes inertes que describe el término son adecuados para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales inferiores sin provocar una toxicidad, incompatibilidad, inestabilidad, irritación, respuesta alérgica inadecuada, y similares, y con una relación ventaja/riesgo razonable.

De forma típica, los componentes vehículo para la limpieza oral farmacéuticamente aceptables de los componentes limpiadores orales de las composiciones limpiadoras orales comprenderán generalmente de aproximadamente 50% a aproximadamente 99,99%, preferiblemente de aproximadamente 65% a aproximadamente 99,99%, más preferiblemente de aproximadamente 65% a aproximadamente 99%, en peso de la composición.

Los componentes vehículo farmacéuticamente aceptables y los componentes opcionales que se pueden incluir en las composiciones limpiadoras orales de la presente invención son bien conocidos por los expertos en la técnica. Una amplia variedad de tipos de composición, componentes vehículo y componentes opcionales útiles en las composiciones limpiadoras orales se describen en la patente US-5.096.700, concedida a Seibel el 17 de marzo de 1992; la patente US-5.028.414, concedida a Sampathkumar el 2 de julio de 1991, y la patente US-5.028.415, concedida a Benedict, Bush y Sunberg el 2 de julio de 1991.

60 La realización de composición limpiadora oral de la presente invención está ilustrada por los siguientes ejemplos.

65

## ES 2 275 265 T3

Ejemplos 42-45

### *Composición dentífrica*

	Componente	Ejemplo n°			
		42	43	44	45
5					
10	Ile205Leu + Pro210Ala + Lys213Glu + Ala216Glu + Tyr217Leu	2,000	3,500	1,500	2,000
	Sorbitol (solución acuosa al 70%)	35,000	35,000	35,000	35,000
	PEG-6*	1,000	1,000	1,000	1,000
15	Abrasivo dental de sílice**	20,000	20,000	20,000	20,000
	Fluoruro sódico	0,243	0,243	0,243	0,243
	Dióxido de titanio	0,500	0,500	0,500	0,500
20	Sacarina sódica	0,286	0,286	0,286	0,286
	Alquilsulfato sódico (solución acuosa al 27,9%)	4,000	4,000	4,000	4,000
25	Sabor	1,040	1,040	1,040	1,040
	Polímero de carboxivinilo***	0,300	0,300	0,300	0,300
	Carragenina****	0,800	0,800	0,800	0,800
30	Agua	Resto hasta el 100%			

\* PEG-6 = polietilenglicol que tiene un peso molecular de 600.

\*\* Sílice precipitado identificado como Zeodent 119 comercializado por J.M. Huber.

\*\*\* Carbopol comercializado por B.F. Goodrich Chemical Company.

\*\*\*\* Carragenina tipo lota comercializada por Hercules Chemical Company.

En los ejemplos 42-45 las variantes BPN' mostradas en la Tabla 2, entre otras, están sustituidas por Ile205Leu + Pro210Ala + Lys213Glu + Ala216Glu + Tyr217Leu, con resultados prácticamente similares.

Ejemplos 46-49

### *Composición para colutorio*

	Componente	Ejemplo n°			
		46	47	48	49
45					
50	Ala216Gly	3,00	7,50	1,00	5,00
	Alcohol SDA 40	8,00	8,00	8,00	8,00
	Sabor	0,08	0,08	0,08	0,08
55	Emulsionante	0,08	0,08	0,08	0,08
	Fluoruro sódico	0,05	0,05	0,05	0,05
	Glicerina	10,00	10,00	10,00	10,00
60	Edulcorante	0,02	0,02	0,02	0,02
	Ácido benzoico	0,05	0,05	0,05	0,05
	Hidróxido de sodio	0,20	0,20	0,20	0,20
65	Tinte	0,04	0,04	0,04	0,04
	Agua	Resto hasta el 100%			

## ES 2 275 265 T3

En los ejemplos 46-49, las variantes BPN' mostradas en la Tabla 2, entre otras, están sustituidas por Ala216Gly, con resultados prácticamente similares.

Ejemplos 50-53

*Composición en forma de gominola*

Componente	Ejemplo n°			
	50	51	52	53
Tyr214Phe + Tyr217Asn	0,01	0,03	0,10	0,02
Sorbitol	17,50	17,50	17,50	17,50
Manitol	17,50	17,50	17,50	17,50
Almidón	13,60	13,60	13,60	13,60
Edulcorante	1,20	1,20	1,20	1,20
Sabor	11,70	11,70	11,70	11,70
Color	0,10	0,10	0,10	0,10
Jarabe de maíz	Resto hasta el 100%			

En los ejemplos 50-53, las variantes BPN' mostradas en la Tabla 2, entre otras, están sustituidas por Tyr214Phe + Tyr217Asn, con resultados prácticamente similares.

Ejemplos 54-57

*Composición en forma de chicle*

Componente	Ejemplo n°			
	54	55	56	57
Ile205Val + Pro210Ala + Lys213Glu	0,03	0,02	0,10	0,05
Cristales de sorbitol	38,44	38,40	38,40	38,40
Base de goma de Paloja-T*	20,00	20,00	20,00	20,00
Sorbitol (solución acuosa al 70%)	22,00	22,00	22,00	22,00
Manitol	10,00	10,00	10,00	10,00
Glicerina	7,56	7,56	7,56	7,56
Sabor	1,00	1,00	1,00	1,00

\* Suministrado por L.A. Dreyfus Company.

En los ejemplos 54-57, las variantes BPN' mostradas en la Tabla 2, entre otras, están sustituidas por Ile205Val + Pro210Ala + Lys213Glu, con resultados prácticamente similares.

### 2. Composiciones limpiadoras de dentaduras postizas

En otra realización de la presente invención, las composiciones limpiadoras de dentaduras postizas para limpiar dentaduras postizas fuera de la cavidad oral comprenden una o más variantes enzimáticas de la presente invención. Dichas composiciones limpiadoras de dentaduras postizas comprenden una cantidad eficaz de una o más variantes enzimáticas de la presente invención, preferiblemente de aproximadamente 0,0001% a aproximadamente 50% de una o más variantes enzimáticas de la presente invención, más preferiblemente de aproximadamente 0,001% a aproximadamente 35%, más preferiblemente aún de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 20%, en peso de la composición y un vehículo limpiador de dentaduras postizas. En la técnica se conocen diversos formatos de composición limpiadora para dentaduras postizas tales como pastillas efervescentes y similares (véase por ejemplo la patente US-5.055.305,

## ES 2 275 265 T3

Young), las cuales son generalmente adecuadas para la incorporación de una o más variantes enzimáticas de la presente invención para eliminar manchas proteináceas de las dentaduras postizas.

La realización de composición limpiadora para dentaduras postizas de la presente invención está ilustrada por los siguientes ejemplos.

Ejemplos 58-61

*Pastilla efervescente bicapa para la limpieza de dentaduras postizas*

Componente	Ejemplo n°			
	58	59	60	61
<u>Capa ácida</u>				
Ala216Glu	1,0	1,5	0,01	0,05
Ácido tartárico	24,0	24,0	24,00	24,00
Carbonato sódico	4,0	4,0	4,00	4,00
Ácido sulfámico	10,0	10,0	10,00	10,00
PEG 20.000	4,0	4,0	4,00	4,00
Bicarbonato sódico	24,5	24,5	24,50	24,50
Persulfato potásico	15,0	15,0	15,00	15,00
Pirofosfato sódico	7,0	7,0	7,00	7,00
Sílice pirogénico	2,0	2,0	2,00	2,00
TAED*	7,0	7,0	7,00	7,00
Oleilsulfosuccinato de ricino	0,5	0,5	0,50	0,50
Sabor	1,0	1,0	1,00	1,00
<u>Capa alcalina</u>				
Perborato sódico monohidratado	32,0	32,0	32,00	32,00
Bicarbonato sódico	19,0	19,0	19,00	19,00
EDTA	3,0	3,0	3,00	3,00
Tripolifosfato sódico	12,0	12,0	12,00	12,00
PEG 20.000	2,0	2,0	2,00	2,00
Persulfato potásico	26,0	26,0	26,00	26,00
Carbonato sódico	2,0	2,0	2,00	2,00
Sílice pirogénico	2,0	2,0	2,00	2,00
Tinte/sabor	2,0	2,0	2,00	2,00

\* Tetraacetiletildiamina

En los ejemplos 58-61, las variantes BPN' mostradas en la Tabla 2, entre otras, están sustituidas por Ala216Glu, con resultados prácticamente similares.

### 3. Composiciones limpiadoras para lentillas de contacto

En otra realización de la presente invención, las composiciones limpiadoras para lentillas de contacto comprenden una o más variantes enzimáticas de la presente invención. Dichas composiciones limpiadoras para lentillas de contacto comprenden una cantidad eficaz de una o más variantes enzimáticas de la presente invención, preferiblemente de

## ES 2 275 265 T3

aproximadamente 0,01% a aproximadamente 50% de una o más variantes enzimáticas de la presente invención, más preferiblemente de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 20%, más preferiblemente aún de aproximadamente 1% a aproximadamente 5%, en peso de la composición y un vehículo para la limpieza de lentillas de contacto. En la técnica son bien conocidos diversos formatos de composiciones limpiadoras para lentillas de contacto, tales como pastillas, líquidos y similares (véase por ejemplo, US-4.863.627, concedida a Davies, Meaken y Rees el 5 de septiembre de 1989; US-Re. 32.672, concedida de nuevo a Huth, Lam y Kirai el 24 de mayo de 1988; US-4.609.493, concedida a Schafer el 2 de septiembre de 1986; US-4.690.793, concedida a Ogunbiyi y Smith el 1 de septiembre de 1987; US-4.614.549, concedida Ogunbiyi, Riedhammer y Smith el 30 de septiembre de 1986, y US-4.285.738, concedida a Ogata el 25 de agosto de 1981), las cuales son generalmente adecuadas para la incorporación de una o más variantes enzimáticas de la presente invención para eliminar las manchas proteináceas de lentillas de contacto.

La realización de composición limpiadora para lentillas de contacto de la presente invención está ilustrada por los siguientes ejemplos.

15 Ejemplos 62-65

### *Solución limpiadora enzimática para lentillas de contacto*

Componente	Ejemplo n°			
	62	63	64	65
Ile205Leu + Ala216Asp	0,01	0,5	0,1	2,0
Glucosa	50,00	50,0	50,0	50,0
Tensioactivo no iónico (copolímero de polioxietileno-polioxipropileno)	2,00	2,0	2,0	2,0
Tensioactivo aniónico (polioxietileno-alkilfeniléter sódico -éster sulfúrico)	1,00	1,0	1,0	1,0
Cloruro sódico	1,00	1,0	1,0	1,0
Bórax	0,30	0,3	0,3	0,3
Agua	Resto hasta el 100%			

En los ejemplos 62-65, las variantes BPN' mostradas en la Tabla 2, entre otras, están sustituidas por Ile205Leu + Ala216Asp, con resultados prácticamente similares.

REIVINDICACIONES

1 Una variante BPN' que comprende una secuencia de aminoácidos de tipo silvestre, **caracterizada** porque la  
 5 secuencia de aminoácidos de tipo silvestre comprende una de las siguientes mutaciones específicas, en donde se indica  
 en primer lugar el aminoácido original de tipo silvestre, en segundo lugar el número de posición y en tercer lugar el  
 aminoácido sustituido:

- *mutación simple:*

10 Lys213Glu;  
 Ala216Glu;  
 15 Ala216Asp;  
 Ala216Gly;  
 Ser204Glu;  
 20 Val203Glu;

- *mutación doble:*

25 Lys213Glu + Tyr217Leu;  
 Ile205Leu + Ala216Glu;  
 30 Ile205Leu + Ala216Asp;  
 Pro210Ala + Gly215Thr;  
 Lys213Glu + Ala216Glu;  
 35 Tyr214Phe + Tyr217Asn;  
 Gln206Glu + Ala216Glu;  
 40 Ala216Glu + Tyr217Leu;  
 Gln206Glu + Tyr217Leu;  
 Gln206Glu + Lys213Glu;

- *mutación triple:*

45 Gln206Pro + Gly211Ala + Ala216Glu;  
 50 Lys213Glu + Ala216glu + Tyr217Leu;  
 Ile205Val + Pro210Ala + Lys213Glu;  
 55 Gln206Glu + Ala216Glu + Tyr217Leu;  
 Gln206Glu + Lys213Glu + Tyr217Leu;

- *mutación cuádruple:*

60 Pro210Ala + Lys213Glu + Ala216Glu + Tyr217Leu;  
 Gln206Glu + Lys213Glu + Ala216Glu + Tyr217Leu;  
 65 Ser204Glu + Gln206Glu + Ala216Glu + Tyr217Leu;

## ES 2 275 265 T3

- *mutación quintuple*:

Ile205Leu + Pro210Ala + Lys213Glu + Ala216Glu + Tyr217Leu; y

5 Ser204Glu + Gln206Glu + Lys213Glu + Ala216Glu + Tyr217Leu,

**caracterizada** porque las variantes BPN' tienen una menor adsorción y una mayor capacidad de hidrólisis de un sustrato insoluble que la subtilisina BPN' de tipo silvestre.

10 2. Una composición limpiadora seleccionada del grupo que consiste en una composición limpiadora para superficies duras, una composición para lavado de vajillas, una composición limpiadora oral, una composición limpiadora para dentaduras postizas y una composición limpiadora para lentillas de contacto, **caracterizada** porque la composición limpiadora comprende la variante BPN' de la reivindicación 1 y un vehículo limpiador para superficies duras.

15 3. Una composición limpiadora para superficies duras que comprende la variante BPN' de la reivindicación 1 y un vehículo limpiador para superficies duras.

4. Una composición limpiadora para tejidos que comprende una variante BPN' de la reivindicación 1.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

# ES 2 275 265 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

### (1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE:
- (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: SERINA PROTEASA CON MENOR ADSORCIÓN Y MAYOR CAPACIDAD DE HIDRÓLISIS
- 10 (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 1
- (iv) DIRECCIÓN PARA LA CORRESPONDENCIA:
- (A) DESTINATARIO: THE PROCTER & GAMBLE COMPANY
  - 15 (B) DIRECCIÓN: 11810 EAST MIAMI RIVER ROAD
  - (C) CIUDAD: ROSS
  - (D) ESTADO: OH
  - (E) PAÍS: EE.UU.

20 (F) CÓDIGO POSTAL: 45061
- (v) FORMA LEGIBLE POR EL ORDENADOR:
- (A) TIPO MEDIO: Disquete
  - 25 (B) ORDENADOR: PC compatible con IBM
  - (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
  - (D) SOFTWARE: PatentIn Release nº 1.0, Versión 1.25
- 30 (vi) DATOS ACTUALES DE SOLICITUD:
- (A) NÚMERO DE SOLICITUD:
  - (B) FECHA DE PRESENTACIÓN:
  - 35 (C) CLASIFICACIÓN:
- (vii) DATOS SOBRE EL APODERADO/AGENTE:
- (A) NOMBRE: CORSTANJE, BRAHM J.
  - 40 (B) NÚMERO DE REGISTRO: 34.804
- (ix) DATOS DE CONTACTO:
- (A) TELÉFONO: 513-627-2858
  - 45 (B) FAX: 513-627-0260

### (2) INFORMACIÓN DE LA SEC. nº 1:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- 50 (A) LONGITUD: 275 aminoácidos
  - (B) TIPO: aminoácido
  - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína
- 55 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. nº 1:
- 60
- 65

## ES 2 275 265 T3

	Ala	Gln	Ser	Val	Pro	Tyr	Gly	Val	Ser	Gln	Ile	Lys	Ala	Pro	Ala	Leu
	1				5					10					15	
5	His	Ser	Gln	Gly	Tyr	Thr	Gly	Ser	Asn	Val	Lys	Val	Ala	Val	Ile	Asp
			20					25						30		
	Ser	Gly	Ile	Asp	Ser	Ser	His	Pro	Asp	Leu	Lys	Val	Ala	Gly	Gly	Ala
10			35					40					45			
	Ser	Met	Val	Pro	Ser	Glu	Thr	Asn	Pro	Phe	Gln	Asp	Asn	Asn	Ser	His
		50					55					60				
15	Gly	Thr	His	Val	Ala	Gly	Thr	Val	Ala	Ala	Leu	Asn	Asn	Ser	Ile	Gly
	65					70					75				80	
	Val	Leu	Gly	Val	Ala	Pro	Ser	Ala	Ser	Leu	Tyr	Ala	Val	Lys	Val	Leu
20					85					90					95	
	Gly	Ala	Asp	Gly	Ser	Gly	Gln	Tyr	Ser	Trp	Ile	Ile	Asn	Gly	Ile	Glu
				100					105					110		
25	Trp	Ala	Ile	Ala	Asn	Asn	Met	Asp	Val	Ile	Asn	Met	Ser	Leu	Gly	Gly
			115					120					125			
	Pro	Ser	Gly	Ser	Ala	Ala	Leu	Lys	Ala	Ala	Val	Asp	Lys	Ala	Val	Ala
30							130						140			
	Ser	Gly	Val	Val	Val	Val	Ala	Ala	Ala	Gly	Asn	Glu	Gly	Thr	Ser	Gly
35	145					150					155					160
	Ser	Ser	Ser	Thr	Val	Gly	Tyr	Pro	Gly	Lys	Tyr	Pro	Ser	Val	Ile	Ala
				165						170					175	
40	Val	Gly	Ala	Val	Asp	Ser	Ser	Asn	Gln	Arg	Ala	Ser	Phe	Ser	Ser	Val
				180					185					190		
	Gly	Prop	Glu	Leu	Asp	Val	Met	Ala	Pro	Gly	Val	Ser	Ile	Gln	Ser	Thr
45				195					200					205		
	Leu	Pro	Gly	Asn	Lys	Tyr	Gly	Ala	Tyr	Asn	Gly	Thr	Ser	Met	Ala	Ser
50				210				215					220			
	Pro	His	Val	Ala	Gly	Ala	Ala	Ala	Leu	Ile	Leu	Ser	Lys	His	Pro	Asn
	225				230						235				240	
55	Trp	Thr	Asn	Thr	Gln	Val	Arg	Ser	Ser	Leu	Glu	Asn	Thr	Thr	Thr	Lys
				245						250					255	
	Leu	Gly	Asp	Ser	Phe	Tyr	Tyr	Gly	Lys	Gly	Leu	Ile	Asn	Val	Gln	Ala
60				260					265					270		
	Ala	Ala	Gln													
65				275												