



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 273 417**

(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: **98921676 .7**

(86) Fecha de presentación : **02.06.1998**

(87) Número de publicación de la solicitud: **0985042**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **15.03.2000**

(54) Título: **Enzimas proteasas para eliminar la suciedad difícil y/o reducir la formación de manchas y películas y composiciones que las incorporan.**

(30) Prioridad: **04.06.1997 US 48550 P**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2007

(73) Titular/es: **Genencor International, Inc.**
925 Page Mill Road
Palo Alto, California 94304-1013, US

(72) Inventor/es: **Rai, Saroj;**
Correa, Paul, Elliott;
Zhu, Yong;
Graycar, Thomas, Paul y
Bott, Richard, Ray

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 273 417 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

Enzimas proteasas para eliminar la suciedad difícil y/o reducir la formación de manchas y películas y composiciones que las incorporan.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a enzimas proteasas para la limpieza enérgica y/o la reducción de motas y películas en varias composiciones y métodos para su uso, más particularmente a enzimas proteasas que son variantes de la carbonil-hidrolasa.

Fundamentos de la invención

Durante mucho tiempo se han usado varios tipos de enzimas en detergentes para la ropa para ayudar en la eliminación de ciertas manchas de los tejidos. Cada clase de enzima (amilasa, proteasa, etc.) cataliza generalmente una reacción química diferente. Por ejemplo, las enzimas proteasas son conocidas por su capacidad para hidrolizar (descomponer un compuesto en dos o más compuestos más simples) otras proteínas. Esta capacidad se ha aprovechado a través de la incorporación de enzimas proteasas existentes en la naturaleza o creadas por ingeniería genética a composiciones de detergentes para la ropa.

En los últimos años el uso de enzimas se ha investigado también para usar en composiciones para el lavado automático de la vajilla. Desafortunadamente, muchas enzimas, especialmente las enzimas proteasas, no se comportan bien en el ambiente de lavado. Específicamente, la estabilidad térmica, la estabilidad al pH, la estabilidad oxidativa y la especificidad de sustrato necesitan optimizarse para asegurar una eficiencia satisfactoria.

Para optimizar las características de la enzima proteasa, se emplea frecuentemente un cambio en la secuencia de aminoácidos. Un cambio en la secuencia de aminoácidos puede alterar las propiedades de la enzima en varios grados dependiendo de la localización, naturaleza, y/o magnitud del cambio en la secuencia de aminoácidos. Se han hecho varios intentos de alterar la secuencia de aminoácidos de enzimas proteasas en un intento de alterar sus propiedades, con el objetivo de aumentar la eficacia de la proteasa para usos en limpieza tales como en el ambiente de lavado.

Adicionalmente, el interés de los consumidores en composiciones para el lavado automático de la vajilla que suministren una limpieza enérgica de la comida está aumentando. Los productos lácteos horneados y los huevos han sido mucho tiempo difíciles de eliminar a través del lavado automático de la vajilla. Además, la formación de motas y películas en la cristalería es un problema común en el lavado automático de la vajilla. Más aún, los consumidores ahora desean menos lavado a mano o prelavado de la vajilla y más capacidad de limpieza suministrada por el lavavajillas automático. Por consiguiente, se mantiene la necesidad de composiciones que puedan suministrar una limpieza enérgica y/o una limpieza con reducción de las motas y películas sin formación de motas/películas. Más particularmente, se mantiene la necesidad de composiciones para el lavado automático de la vajilla que puedan suministrar una limpieza enérgica de la comida y una formación reducida de motas/películas a través de enzimas proteasas diseñadas para suministrar tales beneficios.

Técnica anterior

Los siguientes documentos contienen información que puede ser o no ser relevante para la presente invención:

El documento WO 95/10615 otorgado a Genencor International, Inc.; el documento WO 89/06270 otorgado a Novo Nordisk A/S; Kirk-Othmer, Encyclopedia of Chemical Technology, 4ª Ed., Vol. 9. Wiley 1994, páginas 567-620. titulado "Enzyme Applications-Industrial", Nielsen *et al.* Y las referencias ahí contenidas. Los documentos WO 95/10591 y WO 95/10592 otorgados a la Compañía Procter & Gamble. El documento WO 96/27671 (Genentech, Inc.) describe variantes de subtilisina para escindir proteínas de fusión con enlazadores que son sustratos básicos.

Compendio de la invención

Esta necesidad se satisface a través de la presente invención por medio de la cual se proporcionan composiciones que tienen una enzima proteasa capaz de una limpieza enérgica de la comida y una formación reducida de motas/películas. La enzima proteasa preferida es una variante de la carbonil-hidrolasa que tiene una secuencia de aminoácidos que no se encuentra en la naturaleza. La proteasa se crea por ingeniería para suministrar una limpieza enérgica y/o una reducción de las motas y películas y una formación reducida de motas y películas proporcionando a la proteasa una especificidad de tipo tripsina. Por tanto, la proteasa es muy eficaz sobre manchas lácteas tales como la leche y el queso y sobre manchas de yema de huevo y reduce significativamente la formación de motas y películas que tales manchas pueden causar en el proceso de lavado automático de la vajilla. La proteasa se deriva por reemplazamiento de una pluralidad de restos de aminoácido de una carbonil-hidrolasa precursora con diferentes aminoácidos. Adicionalmente, la proteasa preferida se crea por ingeniería genética para tener un nivel mayor de estabilidad al blanqueo. Además, las enzimas de la presente invención pueden proporcionar también una eliminación mejorada de las manchas en aplicaciones para lavandería.

Según una primera realización de la presente invención, se proporciona una composición para limpieza como se expone en la reivindicación 1. La composición para limpieza comprende:

(a) una cantidad eficaz de una enzima proteasa que es una variante de la subtilisina que tiene los aminoácidos 210I/76D/103A/104I/156E/166D en posiciones equivalentes a las posiciones de la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* que tiene la secuencia de aminoácidos como se expone en la Figura 3 (SEC ID N° 2).

(b) uno o más materiales coadyuvantes de la limpieza compatibles con la enzima proteasa.

La presente invención se refiere también a métodos para limpiar objetos necesitados de limpieza poniendo en contacto el objeto con una enzima proteasa que es una variante de la carbonil-hidrolasa como se describe en la presente memoria. La invención abarca por tanto un método para limpiar tejidos que comprende poner en contacto, preferiblemente con agitación, los tejidos con un líquido acuoso que contiene la enzima proteasa. El método puede llevarse a cabo a temperaturas por debajo de aproximadamente 60°C pero, por supuesto, es bastante eficaz a temperaturas de lavado de ropa cercanas al punto de ebullición. La presente invención se refiere también a un método para lavar la vajilla poniendo en contacto la pieza de la vajilla necesitada de limpieza con una enzima proteasa como se describe en la presente memoria. Los métodos de la presente invención incluyen también métodos para limpieza personal, comprendiendo los métodos poner en contacto la parte del cuerpo humano o de un animal inferior necesitado de limpieza con una enzima proteasa como se describe en la presente memoria.

Por consiguiente, la presente invención proporciona una composición para limpieza que tiene una enzima proteasa tipo subtilisina capaz de una limpieza enérgica, y/o una reducción de las motas y películas, particularmente una composición para el lavado automático de la vajilla que tiene una limpieza enérgica de manchas o comida.

Todos los porcentajes, relaciones y proporciones en la presente memoria son referidos a peso a menos que se indique otra cosa.

Breve descripción de los dibujos

Las Figs. 1A y 1B representan la secuencia de DNA y de aminoácidos de la subtilisina de *Bacillus lentus* (Sec. ID N° 6 y 7). La proteína subtilisina madura está codificada por los codones que comienzan en el codón GCG (334-336) que corresponde a Ala.

Las Figs. 2A y 2B representan la secuencia de aminoácidos de cuatro subtilisinas. La línea de arriba representa la secuencia de aminoácidos de la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* (denominada a veces también subtilisina BPN') (Sec. ID N° 2). La segunda línea representa la secuencia de aminoácidos de la subtilisina de *Bacillus subtilis* (Sec. ID N° 3). La tercera línea representa la secuencia de aminoácidos de la subtilisina de *B. licheniformis* (Sec. ID N° 4). La cuarta línea representa la secuencia de aminoácidos de la subtilisina de *Bacillus lentus* (denominada también subtilisina 309 en el documento PCT WO 89/06276) (Sec. ID N° 5). El símbolo* denota la ausencia de restos de aminoácido específicos en comparación con la subtilisina BPN'.

Las Figs. 3A-C representan la secuencia de DNA y aminoácidos para la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* y un mapa de restricción parcial de este gen (Sec. ID N° 1).

La Fig. 4 representa los restos de aminoácido conservados entre las subtilisinas de *Bacillus amyloliquefaciens* (BPN') y *Bacillus lentus* (salvaje).

Las Figs. 5A y 5B representan la secuencia de DNA y aminoácidos de una realización preferida de la invención (P210I/S156E/S166D/N76D/S103A/V104I) (Sec. ID N° 8 y 9). El DNA en esta figura se ha modificado por los métodos descritos para codificar aspartato en las posiciones 76 y 166, glutamato en la posición 156, alanina en la posición 103 y isoleucina en las posiciones 210 y 104. La proteína variante de subtilisina madura está codificada por los codones que comienzan en el codón GCG (334-336) que corresponde a Ala.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

Enzimas proteasas - La invención incluye enzimas proteasas tipo subtilisina que son variantes de la carbonil-hidrolasa no existentes en la naturaleza que tienen diferente actividad proteolítica, estabilidad, especificidad de sustrato, perfil de pH y/o característica de eficiencia en comparación con la carbonil-hidrolasa tipo subtilisina precursora de la que se deriva la secuencia de aminoácidos de la variante. Como se ha dicho anteriormente, las enzimas proteasas tipo subtilisina se diseñan para tener una especificidad de tipo tripsina, y preferiblemente también para ser estables al blanqueo. La carbonil-hidrolasa tipo subtilisina precursora puede ser una carbonil-hidrolasa existente en la naturaleza o una hidrolasa recombinante. Específicamente, tales variantes de la carbonil-hidrolasa tipo subtilisina tienen una secuencia de aminoácidos que no se encuentra en la naturaleza, que se deriva por reemplazamiento de una pluralidad de restos de aminoácido de una carbonil-hidrolasa tipo subtilisina precursora con diferentes aminoácidos. La pluralidad de restos de aminoácido de la enzima precursora corresponden a las posiciones expuestas en la reivindicación 1 en combinación con uno o más de los siguientes restos: +33, +62, +67, +100, +101, +107, +128, +129, +130, +132, +135, +158, +164, +167, +170, +209, +215, +217, +218, y +222, donde la posición numerada corresponde a la subtilisi-

na existente en la naturaleza de *Bacillus amyloliquefaciens* o a restos de aminoácido equivalentes en otras carbonil-hidrolasas o subtilisinas, tales como la subtilisina de *Bacillus lentus*.

Las secuencias de DNA variantes que codifican tales variantes de carbonil-hidrolasa o subtilisina se derivan de una secuencia de DNA precursora que codifica una enzima precursora existente en la naturaleza o recombinante. Las secuencias de DNA variantes se derivan modificando la secuencia de DNA precursora para codificar la sustitución de uno o más restos de aminoácido específicos codificados por la secuencia de DNA precursora. Aunque los restos de aminoácido identificados para su modificación en la presente memoria se identifican según la numeración aplicable a *B. amyloliquefaciens* (que se ha convertido en el método convencional para identificar posiciones de restos en todas las subtilisinas), la secuencia de DNA precursora preferida útil para la presente invención es la secuencia de DNA de *Bacillus lentus* como se muestra en la Fig. 1.

Las enzimas proteasas útiles en la presente invención abarcan la sustitución por cualquiera de los diecinueve L-aminoácidos existentes en la naturaleza en las posiciones de los restos de aminoácido designadas. Tales sustituciones pueden hacerse en cualquier subtilisina precursora (procariota, eucariota, de mamífero, etc.). A lo largo de esta solicitud se hace referencia a varios aminoácidos por medio de los códigos comunes de una letra o tres letras. Tales códigos se identifican en Dale, M.W. (1989), *Molecular Genetics of Bacteria*, John Wiley & Sons, Ltd., Apéndice B.

Preferiblemente, la sustitución a hacerse en cada una de las posiciones de los restos de aminoácido identificados incluye, pero sin limitarse a ellas, las sustituciones en la posición +210 incluyendo I, V, L, y A; sustituciones en las posiciones +33, +62, +76, +100, +101, +103, +104, +107, +128, +129, +130, +132, +135, +156, +158, +164, +166, +167, +170, +209, +215, +217, y +218 con D ó E; sustituciones en la posición 76 incluyendo D, H, E, G, F, K, P y N; sustituciones en la posición 103 incluyendo Q, T, D, E, Y, K, G, R y S; y sustituciones en la posición 104 incluyendo S, Y, I, L, M, A, W, D, T, G y V; y sustituciones en la posición 222 incluyendo S, C, A. Los aminoácido(s) preferido(s) específicamente con los que sustituir en cada posición dicha se designan a continuación en la Tabla 1. Aunque en la Tabla 1 se muestran aminoácidos específicos, debe entenderse que los restos identificados pueden sustituirse con cualquier aminoácido.

TABLA 1

Resto de Aminoácido	Aminoácido Preferido para Sustituir/Insertar
+210	I, V, L, A
+33, +62, +100, +101, +107	D, E
+128, +129, +130, +135	
+156, +158, +164, +166	
+167, +170, +209, +215	
+217 y +218	
+76	D, H
+103	A, Q, T, D, E, Y, K, G, R
+104	I, Y, S, L, A, T, G
+222	S, C, A

Las carbonil-hidrolasas son enzimas que hidrolizan compuestos que contienen enlaces



en los que X es oxígeno o nitrógeno. Incluyen carbonil-hidrolasas existentes en la naturaleza y carbonil-hidrolasas recombinantes. Las carbonil-hidrolasas existentes en la naturaleza incluyen principalmente hidrolasas, p.ej., hidrolasas peptídicas tales como subtilisinas o metaloproteasas. Las hidrolasas peptídicas incluyen la hidrolasa α -aminoacil-peptídica, hidrolasa peptidilaminoacídica, acilamino-hidrolasa, serina-carboxipeptidasa, metalocarboxipeptidasa, tiol-proteinasa, carboxilproteinasa y metaloproteinasa. Se incluyen las serina, metalo, tiol y ácido-proteasas, así como las endo- y exo-proteasas.

Las subtilisinas son carbonil-hidrolasas bacterianas o fúngicas que actúan generalmente para escindir enlaces peptídicos de proteínas o péptidos. Tal como se usa en la presente memoria, "subtilisina" significa una subtilisina existente en la naturaleza o una subtilisina recombinante. Se sabe que varias especies de microbios producen y a menudo secretan una serie de subtilisinas existentes en la naturaleza. Las secuencias de aminoácidos de los miembros de esta serie no son totalmente homólogas. Sin embargo, las subtilisinas en esta serie muestran el mismo tipo, o similar, de actividad proteolítica. Esta clase de serina-proteasas comparte una secuencia de aminoácidos común que define una triada catalítica que las distingue de la clase relacionada de serina-proteasas de tipo quimotripsina. Las subtilisinas y serina-proteasas relacionadas de tipo quimotripsina tienen ambas una triada catalítica que comprende aspartato, histidina y serina. En las proteasas relacionadas de tipo subtilisina el orden relativo de estos aminoácidos, leyendo desde el extremo amino al carboxi-terminal, es aspartato-histidina-serina. En las proteasas relacionadas de tipo quimotripsina el orden relativo, sin embargo, es histidina-aspartato-serina. Por tanto, la subtilisina en la presente memoria se refiere a una serina-proteasa que tiene la triada catalítica de las proteasas relacionadas de tipo subtilisina. Los ejemplos incluyen, pero sin limitarse a ellos, las subtilisinas identificadas en la Fig. 2 de la presente memoria.

"Subtilisina recombinante" se refiere a una subtilisina en la que la secuencia de DNA que codifica la subtilisina se modifica para producir una secuencia de DNA variante (o mutante) que codifica la sustitución, supresión o inserción de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la subtilisina existente en la naturaleza. Los métodos adecuados para producir tal modificación y que pueden combinarse con los descritos en la presente memoria, incluyen los descritos en la Patente de los EE.UU. N° 4.760.025, Patente de los EE.UU. N° 5.204.015 y Patente de los EE.UU. N° 5.185.258.

Un resto (aminoácido) de una carbonil-hidrolasa precursora es equivalente a un resto de la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* si es homólogo (esto es, correspondiente en la posición en la estructura primaria o terciaria), o bien análogo a un resto específico o porción de ese resto en la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* (esto es, que tiene la misma, o similar, capacidad funcional para combinarse, reaccionar o interactuar químicamente).

Para establecer la homología de la estructura primaria, la secuencia de aminoácidos de una carbonil-hidrolasa precursora se compara directamente con la secuencia primaria de la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* y particularmente con un conjunto de restos que se sabe son invariables en subtilisinas de las que se conoce la secuencia. La Fig. 4 en la presente memoria muestra los restos conservados entre la subtilisina de *B. amyloliquefaciens* y la subtilisina de *B. lentus*. Después de alinear los restos conservados, permitiendo las inserciones y supresiones necesarias para mantener el alineamiento (esto es, evitando la eliminación de restos conservados mediante supresión e inserción arbitraria), se definen los restos equivalentes a aminoácidos particulares en la secuencia primaria de la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*. El alineamiento de los restos conservados debería conservar preferiblemente el 100% de tales restos. Sin embargo, el alineamiento de más del 75% o tan poco como el 50% de los restos conservados es adecuado también para definir restos equivalentes. La conservación de la triada catalítica, Asp32/His64/Ser221 debería mantenerse.

Por ejemplo, en la Fig. 2 se alinean las secuencias de aminoácidos de la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* (carlsbergensis) y *Bacillus lentus* para proporcionar la máxima cantidad de homología entre las secuencias de aminoácidos. Una comparación de estas secuencias muestra que cada secuencia contiene varios restos conservados. Estos restos conservados (como entre BPN' y *B. lentus*) se identifican en la Fig. 4.

Estos restos conservados, por tanto, pueden usarse para definir los restos de aminoácido equivalentes correspondientes de la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* en otras carbonil-hidrolasas tales como la subtilisina de *Bacillus lentus* (Publicación PCTN° W0 89/06279 publicada el 13 de julio, 1989) y la enzima precursora de subtilisina preferida en la presente memoria. Estas secuencias de aminoácidos particulares se alinean en las Figs. 2A y 2B con la secuencia de la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* para producir la máxima homología de restos conservados. Como puede verse, hay varias supresiones en la secuencia de *Bacillus lentus* en comparación con la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*. Por tanto, por ejemplo, el aminoácido equivalente a Val165 en la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* en las otras subtilisinas es isoleucina en *B. lentus* y *B. licheniformis*.

Por tanto, por ejemplo, el aminoácido en la posición +210 es prolina (P) en ambas subtilisinas de *B. amyloliquefaciens* y *B. lentus*. En la variante de subtilisina preferida útil en la invención, sin embargo, el aminoácido equivalente al +210 en la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* está sustituido por isoleucina (I). En la Tabla II se proporciona una comparación de los restos de aminoácido preferidos identificados en la presente memoria para su sustitución frente a la sustitución preferida para cada una de tales posiciones.

TABLA II

		+210	+156	+166	+217	+76	+103
5	+104						
	<i>B. amyloliquefaciens</i> Y (salvaje)	P	E	G	Y	N	Q
10	<i>B. lentus</i> (salvaje) V	P	S	S	L	N	S
	Sustitución Más Preferida I/Y	I	E/D	E/D	E/D	D	A

15 Los restos equivalentes pueden definirse también determinando la homología a nivel de la estructura terciaria para una carbonil-hidrolasa precursora cuya estructura terciaria se haya determinado por cristalografía de rayos-x. Los restos equivalentes se definen como aquellos para los que las coordenadas atómicas de dos o más de los átomos de la cadena principal de un resto de aminoácido particular de la carbonil-hidrolasa precursora y la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* (N sobre N, CA sobre CA, C sobre C y O sobre O) están a 0,13 nm y preferiblemente a 0,1 nm después del alineamiento. El alineamiento se consigue después de haber orientado y posicionado el mejor modelo para dar el máximo solapamiento de coordenadas atómicas de los átomos de la proteína que no son hidrógeno de la carbonil-hidrolasa en cuestión con la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*. El mejor modelo es el modelo cristalográfico que proporciona el menor factor R para los datos de difracción experimentales a la mayor resolución disponible.

$$25 \text{ factor R} = \frac{\sum_h |\text{Fo(h)}| - |\text{Fc(h)}|}{\sum_h |\text{Fo(h)}|}$$

30 Los restos equivalentes que son funcionalmente análogos a un resto específico de la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* se definen como aquellos aminoácidos de las carbonil-hidrolasas precursoras que pueden adoptar una conformación tal que o bien alteran, o modifican o contribuyen a la estructura de la proteína, unión del sustrato o catálisis de manera definida y atribuida a un resto específico de la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*. Además, son aquellos restos de la carbonil-hidrolasa precursora (para la que se ha obtenido una estructura terciaria por cristalografía de rayos-x) que ocupan una posición análoga en la medida que, aunque los átomos de la cadena principal del resto dado puedan no satisfacer el criterio de equivalencia basado en ocupar una posición homóloga, las coordenadas atómicas de al menos dos de los átomos de la cadena lateral del resto están a 0,13 nm de los átomos de la cadena lateral correspondiente de la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens*. Las coordenadas de la estructura tridimensional de la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* se establecen en la Publicación EPO N° 0251446 y pueden usarse como se explica en términos generales anteriormente para determinar restos equivalentes a nivel de la estructura terciaria.

40 Algunos de los restos identificados para la sustitución, inserción o supresión son restos conservados, mientras que otros no lo son. En el caso de los restos que no son conservados, el reemplazamiento de uno o más aminoácidos está limitado a sustituciones que produzcan una variante que tenga una secuencia de aminoácidos que no se corresponda con una encontrada en la naturaleza. En el caso de los restos conservados, tales reemplazamientos no deberían dar como resultado una secuencia existente en la naturaleza. Las variantes de carbonil-hidrolasa útiles en la presente invención incluyen las formas maduras de las variantes de carbonil-hidrolasa, así como las pro-formas y prepro-formas de tales variantes de hidrolasa. Las prepro-formas son la construcción preferida, puesto que esto facilita la expresión, secreción y maduración de las variantes de carbonil-hidrolasa.

50 Los métodos y procedimientos para preparar las enzimas según la presente invención son conocidos y se describen en la Publicación PCT N° WO 95/10615.

55 Las enzimas de la presente invención tienen una especificidad de tipo tripsina. Esto es, las enzimas de la presente invención hidrolizan proteínas escindiendo de forma preferente los enlaces peptídicos de restos de aminoácido cargados, más específicamente restos tales como arginina y lisina, más que escindiendo de forma preferente los enlaces peptídicos de restos de aminoácido hidrófobos, más específicamente fenilalanina, triptófano y tirosina. Las enzimas que tienen este último perfil tienen una especificidad de tipo quimotripsina. La especificidad de sustrato, como se discute anteriormente, se ilustra mediante la acción de la enzima sobre dos sustratos sintéticos. Las proteasas que tienen una especificidad de tipo tripsina hidrolizan el sustrato sintético bVGR-pNA de forma preferente con respecto al sustrato sintético sucAAPF-pNA. Las enzimas proteasas de tipo quimotripsina, por el contrario, hidrolizan este último mucho más rápido que el primero. A los efectos de la presente invención, se empleó el siguiente procedimiento para definir la especificidad de tipo tripsina de las enzimas proteasas de la presente invención:

65 Se añade una cantidad fija de un tampón de glicina a un pH de 10 y a una temperatura de 25°C a un tubo de ensayo estándar de 10 mL. Se añaden 0,5 ppm de la enzima activa a ensayar al tubo de ensayo. Se añaden aproximadamente 1,25 mg del sustrato sintético por mL de solución tampón al tubo de ensayo. La mezcla se deja incubar durante 15 minutos a 25°C. Tras completarse el periodo de incubación, se añade un inhibidor enzimático, PMSF, a la mezcla a un nivel de 0,5 mg por mL de solución tampón. Se lee la absorbancia o valor de DO de la mezcla a una longitud de onda

de 410 nm. La absorbancia indica entonces la actividad de la enzima sobre el sustrato sintético. Cuanto mayor es la absorbancia, más alto es el nivel de actividad frente a ese sustrato.

- 5 Para determinar seguidamente la especificidad de una enzima individual, la absorbancia sobre las dos proteínas sustrato sintéticas puede convertirse en una relación específica. A los efectos de la presente invención, la relación se determina mediante la fórmula de especificidad:

$$[\text{actividad sobre sAAPF-pNA}]/[\text{actividad sobre bVGR-pNA}]$$

10

Una enzima que tiene una relación inferior a aproximadamente 10, más preferiblemente inferior a aproximadamente 5 y, lo más preferido, inferior a aproximadamente 2,5 puede considerarse entonces que muestra una actividad de tipo tripsina.

- 15 *Materiales Coadyuvantes de la Limpieza* - Las composiciones para limpieza de la presente invención comprenden también, además de la enzima proteasa descrita anteriormente en la presente memoria, uno o más materiales coadyuvantes de la limpieza compatibles con la enzima proteasa. El término “materiales coadyuvantes de la limpieza”, tal como se usa en la presente memoria, significa cualquier material líquido, sólido o gaseoso seleccionado para el tipo particular de composición para limpieza deseado y la forma del producto (p.ej., líquido; gránulo; composición de pulverización), materiales que son también compatibles con la enzima proteasa usada en la composición. La selección específica de los materiales coadyuvantes de la limpieza se realiza fácilmente considerando la superficie, objeto o tejido que se ha de limpiar, y la forma deseada de la composición para las condiciones de limpieza durante el uso (p.ej., mediante el uso de detergente de lavado). El término “compatible”, tal como se usa en la presente memoria, significa que los materiales de la composición para limpieza no reducen la actividad proteolítica de la enzima proteasa hasta tal punto que la proteasa no sea eficaz como se desea durante las situaciones de uso normal. Los materiales de composiciones para limpieza específicos se ejemplifican en detalle más adelante en la presente memoria.

- 20 Una cantidad eficaz de una o más enzimas proteasas descritas anteriormente se incluye en las composiciones útiles para limpiar una variedad de superficies necesitadas de una eliminación proteínica de las manchas. Tales composiciones para limpieza incluyen composiciones de detergentes para limpiar superficies duras, ilimitadas en forma (p.ej., líquido y granular); composiciones de detergentes para limpiar tejidos, ilimitadas en forma (p.ej., formulaciones granulares, líquidas o en pastilla); composiciones para lavado de vajillas (ilimitadas en forma e incluyendo tanto lavado automático de la vajilla líquido como granular); composiciones para limpieza oral, ilimitadas en forma (p.ej., formulaciones de dentífricos, pastas de dientes y enjuagues bucales); y composiciones para limpieza de dentaduras, ilimitadas en forma (p.ej., líquidas, comprimidos). Tal como se usa en la presente memoria, una “cantidad eficaz de enzima proteasa” se refiere a la cantidad de enzima proteasa descrita anteriormente en la presente memoria necesaria para conseguir la actividad enzimática necesaria en la composición para limpieza específica. Tales cantidades eficaces son fácilmente determinadas por alguien con una experiencia normal en la técnica y se basan en muchos factores, tales como la variante enzimática usada en particular, la aplicación para limpieza, la composición específica de la composición para limpieza, y si se requiere una composición líquida o seca (p.ej., granular o en pastilla), y similares.

- 30 Preferiblemente, las composiciones para limpieza de la presente invención comprenden desde aproximadamente un 0,0001% hasta aproximadamente un 10% de una o más enzimas proteasas, más preferiblemente desde aproximadamente un 0,001% hasta aproximadamente un 1%, más preferiblemente aún desde aproximadamente un 0,001% hasta aproximadamente un 0,1%. Preferiblemente también la enzima proteasa está presente en las composiciones en una cantidad suficiente para proporcionar una relación de mg de proteasa activa por 100 g de composición frente a ppm de O₂ teórico disponible (“AvO₂” de cualquier peroxiácido en el líquido de lavado, denominado en la presente memoria como la relación de Enzima a Blanqueador (relación E/B)), en el intervalo de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 20:1. Algunos ejemplos de varias composiciones para limpieza en las que pueden emplearse las enzimas proteasas se discuten con más detalle más adelante. También, las composiciones de la presente invención pueden incluir desde aproximadamente un 1% hasta aproximadamente un 99,9% en peso de la composición de los materiales coadyuvantes.

- 35 *Enzimas Detersivas Opcionales* - Las composiciones de detergentes de la presente memoria pueden contener también opcionalmente uno o más tipos de enzimas para detergentes. Tales enzimas pueden incluir proteasas, amilasas, celulasas y lipasas. Tales materiales son conocidos en la técnica y están comercialmente disponibles bajo tales marcas comerciales. Pueden incorporarse a las composiciones de detergentes líquidos no acuosos de la presente memoria en forma de suspensiones, “gránulos” o “perlas”. Otro tipo adecuado de enzima comprende aquellas en forma de suspensión de enzimas en tensioactivos no iónicos, p.ej., las enzimas comercializadas por Novo Nordisk con el nombre comercial “SL” o las enzimas microencapsuladas comercializadas por Novo Nordisk con el nombre comercial “LDP”. Las enzimas adecuadas y sus niveles de uso se describen en las Patentes de los EE.UU. Nos. 5.576.282, 5.705.464 y 5.710.115.

- 40 Para usar en la presente invención se prefieren especialmente las enzimas añadidas a las composiciones de la presente en forma de perlas enzimáticas convencionales. Tales perlas estarán generalmente en el intervalo de tamaños de aproximadamente 100 a aproximadamente 1000 micras, más preferiblemente de aproximadamente 200 a aproximadamente 800 micras y se resuspenderán por la fase líquida no acuosa de la composición. Se ha encontrado que las perlas en las composiciones de la presente invención, en comparación con otras formas enzimáticas, muestran una estabilidad enzimática especialmente deseable en términos de retención de actividad enzimática con el tiempo. Por tanto, las

composiciones que utilizan perlas enzimáticas no necesitan contener estabilizadores enzimáticos convencionales tal como debe hacerse frecuentemente cuando las enzimas se incorporan a detergentes líquidos acuosos.

“Enzimas deterativas”, tal como se usa en la presente memoria, significa cualquier enzima que tenga un efecto beneficioso en limpieza, eliminación de manchas o de otro tipo en una composición de detergente para lavandería, limpieza de superficies duras o para cuidado personal. Las enzimas deterativas preferidas son las hidrolasas tal como proteasas, amilasas y lipasas. Las enzimas preferidas para lavandería incluyen, pero sin limitarse a ellas, proteasas, celulasas, lipasas y peroxidasas. Para el lavado automático de la vajilla son muy preferidas las amilasas y/o proteasas, incluyendo tanto los tipos comercialmente disponibles actualmente como los tipos mejorados que, aunque son cada vez más compatibles con el blanqueo a través de mejoras sucesivas, retienen un grado de susceptibilidad a la desactivación por el blanqueo.

Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen, pero sin limitarse a ellas hemicelulasas, peroxidasas, proteasas, celulasas, xilanasas, lipasas, fosfolipasas, esterasas, cutinasas, pectinasas, queratinasas, reductasas, oxidasas, fenoloxidasas, lipoxigenasas, ligninasas, pululaninas, tannasas, pentosanasas, malanasas, β -glucanasas, arabinosidasas, hialuronidasas, condroitinasas, lacasa, y amilasas conocidas, o mezclas de las mismas.

Ejemplos de tales enzimas adecuadas se describen en las Patentes de los EE.UU. Nos. 5.705.464, 5.710.115, 5.576.282, 5.728.671 y 5.707.950.

Las proteasas particularmente útiles se describen en las publicaciones PCT: WO 95/30010 publicada el 9 de noviembre, 1995 por The Procter & Gamble Company; WO 95/30011 publicada el 9 de noviembre, 1995 por The Procter & Gamble Company; y WO 95/29979 publicada el 9 de noviembre, 1995 por The Procter & Gamble Company. Las proteasas adecuadas están comercialmente disponibles como ESPERASE®, ALCALASE®, DURAZYM® y SAVINASE® todas de Novo Nordisk A/S de Dinamarca, y como MAXATASE®, MAXACAL®, PROPEPASE® y MAXAPEM® todas de Gist-Brocades de Holanda.

Además de las enzimas peroxidasas descritas en las Patentes de los EE.UU. Nos. 5.705.464, 5.710.115, 5.576.282, 5.728.671 y 5.707.950, otras enzimas peroxidasas adecuadas se describen en la solicitud de Patente Europea EP N° 96870013.8, archivada el 20 de febrero, 1996. También es adecuada la enzima lacasa.

Los intensificadores preferidos son fenotiazina y fenoxazina sustituidas y ácido 10-fenotiazinpropiónico (PPT), ácido 10-etilfenotiazin-4-carboxílico (EPC), ácido 10-fenoxazinpropiónico (POP) y 10-metilfenoxazina (descrita en WO 94/12621) y seringatos sustituidos (siringatos alquílicos sustituidos en C3-C5) y fenoles. Las fuentes preferidas de peróxido de hidrógeno son percarbonato o perborato de sodio.

Dichas peroxidasas se incorporan normalmente a la composición de detergente en niveles del 0,0001% al 2% de enzima activa en peso de la composición de detergente.

Otras enzimas preferidas que pueden incluirse en las composiciones de detergentes de la presente invención incluyen lipasas. Las enzimas lipasas adecuadas para uso en detergentes incluyen aquellas producidas por microorganismos del grupo *Pseudomonas*, tales como *Pseudomonas stutzeri* ATCC 19.154, como se describe en la Patente Británica 1.372.034. Las lipasas adecuadas incluyen aquellas que muestran una reacción cruzada inmunológica positiva con el anticuerpo de la lipasa, producido por el microorganismo *Pseudomonas fluorescent* IAM 1057. Esta lipasa está disponible en Amano Pharmaceutical Co. Ltd., Nagoya, Japón, bajo el nombre comercial Lipasa P “Amano,” denominada en lo sucesivo en la presente memoria “Amano-P”. Otras lipasas comerciales adecuadas incluyen Amano-CES, lipasas ex *Chromobacter viscosum*, p.ej. *Chromobacter viscosum* var. *lipolyticum* NRRLB 3673 de Toyo Jozo Co., Tagata, Japón; lipasas de *Chromobacter viscosum* de U.S. Biochemical Corp., EE.UU. y Disynth Co., Holanda, y lipasas ex *Pseudomonas gladioli*. Las lipasas especialmente adecuadas son lipasas tales como M1 LIPASE® y LIPOMAX® (Gist-Brocades) y LIPOLASE® y LIPOLASE ULTRA® (Novo) que se ha encontrado que son muy eficaces cuando se usan en combinación con las composiciones de la presente invención.

También son adecuadas las cutinasas [EC 3.1.1.50] que pueden considerarse como una clase especial de lipasa, a saber, lipasas que no requieren una activación interfacial. La adición de cutinasas a composiciones de detergentes se ha descrito en p.ej., el documento WO 88/09367 (Genencor).

Además de las lipasas anteriormente referenciadas, pueden incorporarse fosfolipasas a las composiciones de detergentes de la presente invención. Los ejemplos no limitantes de fosfolipasas adecuadas incluyeron: Fosfolipasa A1 EC 3.1.1.32; Fosfolipasa A2 EC 3.1.1.4; Lisofosfolipasa EC 3.1.1.5; Fosfolipasa C EC 3.1.4.3; Fosfolipasa D EC 3.1.4.4. Las fosfolipasas comercialmente disponibles incluyen LECITASE® de Novo Nordisk A/S de Dinamarca y Fosfolipasa A2 de Sigma. Cuando se incluyen fosfolipasas en las composiciones de la presente invención, se prefiere que se incluyan también amilasas. Sin desear vincularse a la teoría, se cree que la acción combinada de la fosfolipasa y la amilasa proporciona una eliminación de las manchas sustancial, especialmente sobre manchas y suciedades grasientas/aceitosas, almidonadas y muy coloreadas. Preferiblemente, la fosfolipasa y la amilasa, cuando están presentes, se incorporan en las composiciones de la presente invención en una proporción en peso de enzima pura entre 4500:1 y 1:5, más preferiblemente entre 50:1 y 1:1.

Las amilasas conocidas (α y/o β) pueden incluirse para eliminar las manchas a base de carbohidratos. El documento WO 94/02597, Novo Nordisk A/S publicado el 3 de febrero, 1994, describe composiciones para limpieza que incorporan amilasas mutantes. Véase también el documento WO 94/18314, Genencor, publicado el 18 de agosto, 1994 y el documento WO 95/10603, Novo Nordisk A/S, publicado el 20 de abril, 1995. Otras amilasas conocidas para usar en composiciones de detergentes incluyen ambas α - y β -amilasas. Las α -amilasas son conocidas en la técnica e incluyen las descritas en la Patente de los EE.UU. N° 5.003.257; EP 252.666; WO 91/00353; FR 2.676.456; EP 285.123; EP 525.610; EP 368.341; y la Memoria de Patente Británica N° 1.296.839 (Novo). Otras amilasas adecuadas son las amilasas de estabilidad intensificada incluyendo PURAFAC OX AM® descrita en el documento WO 94/18314, publicado el 18 de agosto, 1994 y el documento WO 96/05295, Genencor, publicado el 22 de febrero, 1996 y las variantes de amilasa de Novo Nordisk A/S, descritas en el documento WO 95/10603, publicado en abril 95.

Ejemplos de productos de α -amilasas comerciales son TERMAMYL®, BAN®, FUNGAMYL® y DURAMYL®, todos disponibles en Novo Nordisk A/S Dinamarca. El documento WO 95/26397 describe otras amilasas adecuadas: α -amilasas caracterizadas por tener una actividad específica al menos un 25% mayor que la actividad específica de TERMAMYL® en un intervalo de temperatura de 25°C a 55°C y a un valor de pH en el intervalo de 8 a 10, medida mediante el ensayo de actividad α -amilasa Phadebas®. Otras enzimas amilolíticas con propiedades mejoradas con respecto al nivel de actividad y la combinación de termoestabilidad y un mayor nivel de actividad se describen en el documento WO 95/35382.

Las enzimas anteriores pueden ser de cualquier origen adecuado, tal como de origen vegetal, animal, bacteriano, fúngico y de levaduras. Pueden usarse formas purificadas o no purificadas de estas enzimas. También están incluidos por definición los mutantes de enzimas nativas. Los mutantes pueden obtenerse p.ej., mediante ingeniería de proteínas y/o genética, modificaciones químicas y/o físicas de enzimas nativas. Una práctica común es asimismo la expresión de la enzima a través de organismos hospedantes en los que se ha clonado el material genético responsable de la producción de la enzima.

Dichas enzimas se incorporan normalmente a la composición de detergente en niveles del 0,0001% al 2% de enzima activa en peso de la composición de detergente. Las enzimas pueden añadirse como ingredientes individuales separados (perlas, granulados, líquidos estabilizados, etc. que contienen una enzima) o como mezclas de dos o más enzimas (p.ej., cogramulados).

Otros ingredientes de detergentes adecuados que pueden añadirse son eliminadores de la oxidación enzimática. Ejemplos de tales eliminadores de la oxidación enzimática son las tetraetilenpoliaminas etoxiladas.

Una gama de materiales enzimáticos y medios para su incorporación en composiciones de detergente sintéticas se describe también en los documentos WO 9307263 y WO 9307260 otorgados a Genencor International, WO 8908694 otorgado a Novo, y el documento U.S. 3.553.139, 5 de enero, 1971 otorgado a McCarty *et al.* Las enzimas se describen adicionalmente en el documento U.S. 4.101.457, Place *et al.*, 18 de julio, 1978, y en el documento U.S. 4.507.219, Hughes, 26 de marzo, 1985. Los materiales enzimáticos útiles para formulaciones de detergente líquidas, y su incorporación a tales formulaciones, se describen en el documento U.S. 4.261.868, Hora *et al.*, 14 de abril, 1981.

Estabilizantes Enzimáticos - Las enzimas para usar en detergentes pueden estabilizarse por varias técnicas. Las técnicas de estabilización de enzimas se describen y ejemplifican en los documentos U.S. 3.600.319, 17 de agosto, 1971, Gedge *et al.*, EP 199.405 y EP 200.586, 29 de octubre, 1986, Venegas. Los sistemas de estabilización enzimática se describen también, por ejemplo, en el documento U.S. 3.519.570. Un *Bacillus* útil, sp. AC 13, que proporciona proteasas, xilanasas y celulasas, se describe en el documento WO 9401532 otorgado a Novo. Las enzimas empleadas en la presente invención pueden estabilizarse mediante la presencia de fuentes solubles en agua de iones calcio y/o manganeso en las composiciones terminadas que proporcionan tales iones a las enzimas. Estabilizantes enzimáticos adecuados y niveles de uso se describen en las Patentes de los EE.UU. Nos. 5.705.464, 5.710.115 y 5.576.282.

Agentes Quelantes - Las composiciones de detergentes de la presente memoria pueden contener también opcionalmente un agente quelante que sirve para quelar los iones metálicos, p.ej., hierro y/o manganeso, en las composiciones de detergentes no acuosas de la presente memoria. Tales agentes quelantes sirven por tanto para formar complejos con impurezas metálicas en la composición que tenderían de otra manera a desactivar los componentes de la composición tales como el agente de blanqueo preoxigenado. Los agentes quelantes útiles pueden incluir aminocarboxilatos, fosfonatos, aminofosfonatos, agentes quelantes aromáticos sustituidos polifuncionalmente y mezclas de los mismos. Otros ejemplos de agentes quelantes adecuados y niveles de uso se describen en las Patentes de los EE.UU. Nos. 5.705.464, 5.710.115 y 5.576.282.

Mejoradores Orgánicos - Las composiciones de la presente memoria también opcionalmente, pero preferiblemente, contienen hasta aproximadamente un 50%, más preferiblemente desde aproximadamente un 1% hasta aproximadamente un 40%, incluso más preferiblemente desde aproximadamente un 5% hasta aproximadamente un 30% en peso de un material mejorador del detergente. No se pretende que queden excluidos, sin embargo, niveles inferiores o superiores de mejorador. Los mejoradores de detergente pueden incluirse opcionalmente en las composiciones de la presente memoria para ayudar en el control de la dureza mineral. Pueden usarse mejoradores inorgánicos así como orgánicos. Los mejoradores se usan típicamente en composiciones para lavado de tejidos para ayudar en la eliminación de manchas de partículas. Los mejoradores de detergente adecuados se describen en las Patentes de los EE.UU. Nos. 5.705.464, 5.710.115, 5.576.282, 4.321.165 y 4.284.532. Los mejoradores preferidos para usar en los detergentes

líquidos de la presente memoria se describen en las Patentes de los EE.UU. Nos. 5.705.464, 5.710.115, 5.576.282 y 4.284.532.

Mejoradores Inorgánicos - Las composiciones de detergentes de la presente memoria pueden contener también opcionalmente uno o más tipos de mejoradores de detergente inorgánicos además de los enumerados anteriormente en la presente memoria que funcionan también como fuentes de alcalinidad. Tales mejoradores inorgánicos opcionales pueden incluir, por ejemplo, aluminosilicatos tales como zeolitas. Las zeolitas de aluminosilicato, y su uso como mejoradores de detergente se discuten más completamente en Corkill *et al.*, Patente de los EE.UU. N° 4.605.509; expedida el 12 de agosto 1986, la descripción de la cual se incorpora a la presente memoria por referencia. También los silicatos a capas cristalinos, tales como los que se discuten en esta Patente de los EE.UU. 509, son adecuados para usar en las composiciones de detergentes de la presente memoria. Si se utilizan, los mejoradores de detergente inorgánicos opcionales pueden comprender desde aproximadamente un 2% hasta aproximadamente un 15% en peso de las composiciones de la presente memoria. Ejemplos adicionales de mejoradores inorgánicos se describen en las Patentes de los EE.UU. Nos. 5.705.464 y 5.710.115.

Tensioactivos - Los tensioactivos deteritivos incluidos en las composiciones de detergentes completamente formuladas proporcionadas por la presente invención comprenden al menos un 0,01%, preferiblemente desde aproximadamente un 0,5% hasta aproximadamente un 50%, en peso de la composición de detergente, dependiendo de los tensioactivos particulares usados y los efectos deseados. En una realización muy preferida, el tensioactivo deteritivo comprende desde aproximadamente un 0,5% hasta aproximadamente un 20% en peso de la composición.

El tensioactivo deteritivo puede ser no iónico, aniónico, anfótero, zwitteriónico, o catiónico, ejemplos no limitantes de los cuales se describen en las Patentes de los EE.UU. Nos. 5.707.950 y 5.576.282. Pueden usarse también mezclas de estos tensioactivos. Las composiciones de detergentes preferidas comprenden tensioactivos deteritivos aniónicos o mezclas de tensioactivos aniónicos con otros tensioactivos, especialmente tensioactivos no iónicos.

Ejemplos no limitantes de tensioactivos útiles en la presente memoria incluyen los alquil-bencenosulfonatos C₁₁-C₁₈ convencionales y alquil-sulfatos primarios, secundarios y aleatorios, los alquil-alcoxi-sulfatos C₁₀-C₁₈, los alquil-policlicósidos C₁₀-C₁₈ y sus policlicósidos sulfatados correspondientes, ésteres de ácidos grasos alfa-sulfonados C₁₂-C₁₈, alcoxilatos de alquilo C₁₂-C₁₈ y de alquil-fenol (especialmente etoxilatos y mezclas etoxi/propoxi), betaínas C₁₂-C₁₈ y sulfobetainas ("sultaínas"), óxidos de amina C₁₀-C₁₈, y similares. Otros tensioactivos útiles convencionales se enumeran en textos estándar.

Los tensioactivos particularmente preferidos en las composiciones preferidas para el lavado automático de la vajilla (ADD, del inglés "automatic dishwashing detergent") de la presente invención son los tensioactivos no iónicos que forman poca espuma (LFNI, del inglés "low foaming nonionic surfactants" que se describen en las Patentes de los EE.UU. Nos. 5.705.464 y 5.710.115. Los LFNI pueden estar presentes en cantidades desde un 0,01% hasta aproximadamente un 10% en peso, preferiblemente desde aproximadamente un 0,1% hasta aproximadamente un 10%, y más preferiblemente desde aproximadamente un 0,25% hasta aproximadamente un 4%. Los LFNI se usan más típicamente en ADDs debido a su acción de laminación por el agua mejorada (especialmente de vidrio) que confieren al producto ADD. Abarcan también materiales poliméricos no de silicona y no fosfatos ilustrados adicionalmente más adelante en la presente memoria, que se sabe que desespuman manchas de comida encontradas en el lavado automático de la vajilla.

Los LFNI preferidos incluyen tensioactivos alcoxilados no iónicos, especialmente etoxilatos derivados de alcoholes primarios, y sus mezclas con tensioactivos más sofisticados, tales como los polímeros de bloque inverso polioxipropileno/polioxietileno/polioxipropileno (PO/EO/PO) como se describe en las Patentes de los EE.UU. Nos. 5.705.464 y 5.710.115.

Los ADDs muy preferidos de la presente memoria en los que el LFNI está presente hacen uso de monohidroxi-alcohol etoxilado o alquil-fenol y adicionalmente comprenden un compuesto polimérico de bloque de polioxietileno, polioxipropileno como se describe en las Patentes de los EE.UU. Nos. 5.705.464 y 5.710.115.

Los LFNI que pueden usarse también incluyen aquellos tensioactivos no iónicos POLY-TERGENT® SLF-18 de Olin Corp., y cualquier LFNI biodegradable que tenga las propiedades de punto de fusión discutidas anteriormente en la presente memoria.

Éstos y otros tensioactivos no iónicos son bien conocidos en la técnica, estando descritos con más detalle en Kirk Othmer's Encyclopedia of Chemical Technology, 3ª Ed., Vol. 22, pp. 360-379, "Surfactants and Detergent Systems", incorporada por referencia a la presente memoria.

Se prefieren composiciones de ADD que comprenden tensioactivos mezclados en los que la formación de espuma jabonosa (estando ausente cualquier agente de silicona para el control de la espuma jabonosa) es inferior a 5 cm, preferiblemente inferior a 2,5 cm, determinado mediante la descripción que sigue.

El equipamiento útil para estas mediciones es: un Lavavajillas Whirlpool (modelo 900) equipado con una puerta transparente de plexiglás, recogida de datos con un ordenador IBM con Software Labview y Excel, un sensor de proximidad (Newark Corp. - modelo 95F5203) que usa una interfase SCXI, y una regla de plástico.

Los datos se recogen como sigue. El sensor de proximidad se fija a la bandeja inferior del lavavajillas sobre un soporte metálico. El sensor está encarado hacia abajo, hacia el brazo giratorio del lavavajillas del fondo de la máquina (distancia aproximadamente 2 cm desde el brazo giratorio). Cada paso del brazo giratorio es medido por el sensor de proximidad y registrado. Los pulsos registrados por el ordenador se convierten en rotaciones por minuto (RPM) del brazo inferior contando los pulsos en un intervalo de 30 segundos. La velocidad de giro del brazo es directamente proporcional a la cantidad de espuma jabonosa en la máquina y la bomba del lavavajillas (esto es, cuanto más espuma jabonosa producida, más lenta es la rotación del brazo).

La regla de plástico se sujeta a la bandeja inferior del lavavajillas y va hasta el suelo de la máquina. Al final del ciclo de lavado, se mide la altura de la espuma jabonosa usando la regla de plástico (vista a través de la puerta transparente) y se registra como la altura de la espuma jabonosa.

El siguiente procedimiento se sigue para evaluar composiciones de ADD con relación a la producción de espuma jabonosa así como para evaluar tensioactivos no iónicos con relación a su utilidad. (Para la evaluación separada del tensioactivo no iónico, se usa una fórmula base de ADD, tal como polvo Cascade, junto con los tensioactivos no iónicos que se añaden separadamente en viales de vidrio a la máquina lavavajillas).

Primero, la máquina se llena con agua (ajustar el agua para una temperatura y dureza apropiadas) y se procede a un ciclo de enjuague. Se monitorizan las RPM a lo largo del ciclo (aproximadamente 2 min) sin que se añada producto ADD alguno (o tensioactivos) (una comprobación de control de calidad para asegurarse que la máquina está funcionando apropiadamente). Cuando la máquina empieza a llenarse para el ciclo de lavado, el agua se ajusta otra vez para la temperatura y dureza, y seguidamente se añade el producto ADD en el fondo de la máquina (en el caso de los tensioactivos evaluados separadamente, la fórmula base de ADD se añade primero al fondo de la máquina y seguidamente se añaden los tensioactivos colocando los viales de vidrio que contienen los tensioactivos invertidos en e la bandeja superior de la máquina). Las RPM se monitorizan seguidamente a lo largo del ciclo de lavado. Al final del ciclo de lavado, la altura de la espuma jabonosa se registra usando la regla de plástico. La máquina se llena nuevamente con agua (ajustar el agua para una temperatura y dureza apropiadas) y se pone en funcionamiento para otro ciclo de enjuague. Se monitorizan las RPM a lo largo de este ciclo.

Se calcula un valor de RPM promedio para el primer enjuague, lavado principal, y enjuague final. El % de eficiencia de RPM se calcula seguidamente dividiendo las RPM promedio para los tensioactivos a ensayar por las RPM promedio del sistema de control (formulación base de ADD sin el tensioactivo no iónico). La eficiencia de RPM y las mediciones de la altura de la espuma jabonosa se usan para dimensionar el perfil global de espuma jabonosa del tensioactivo.

Agentes de Blanqueo - Las fuentes de peróxido de hidrógeno se describen con detalle en Kirk Othmer's Encyclopedia of Chemical Technology, 4ª Ed. (1992, John Wiley & Sons), Vol. 4, pp. 271-300 "Bleaching Agents (Survey)" incorporada a la presente memoria por referencia, e incluyen las formas variadas de perborato de sodio y percarbonato de sodio, incluyendo varias formas revestidas y modificadas. Una "cantidad eficaz" de una fuente de peróxido de hidrógeno es cualquier cantidad capaz de mejorar de forma medible la eliminación de manchas (especialmente manchas de té) de vajilla sucia comparada con una composición libre de una fuente de peróxido de hidrógeno, cuando la vajilla sucia la lava el consumidor en un lavavajillas automático doméstico en presencia de álcali.

De manera más general, una fuente de peróxido de hidrógeno en la presente memoria puede ser cualquier compuesto o mezcla conveniente que, en condiciones de uso por el consumidor, proporcione una cantidad eficaz de peróxido de hidrógeno. Los niveles pueden variar ampliamente y están usualmente en el intervalo de aproximadamente un 0,1% hasta aproximadamente un 70%, más típicamente desde aproximadamente un 0,5% hasta aproximadamente un 30%, en peso de las composiciones de ADD de la presente memoria.

La fuente preferida de peróxido de hidrógeno usada en la presente memoria puede ser cualquier fuente conveniente, incluyendo peróxido de hidrógeno propiamente dicho. Por ejemplo, perborato, p.ej., perborato de sodio (cualquier hidrato pero preferiblemente el mono- o tetra-hidrato), carbonato de sodio peroxihidratado o sales de percarbonato equivalentes, pirofosfato de sodio peroxihidratado, urea peroxihidratada, o peróxido de sodio pueden usarse en la presente invención. También son útiles las fuentes de oxígeno disponible tales como un blanqueador de persulfato (p.ej., OXONE, fabricado por DuPont). Se prefieren particularmente perborato de sodio monohidratado y percarbonato de sodio. Pueden usarse también mezclas de cualesquier fuentes de peróxido de hidrógeno convenientes.

Un blanqueador de percarbonato preferido comprende partículas secas que tienen un tamaño de partícula medio en el intervalo de aproximadamente 500 micrómetros hasta aproximadamente 1000 micrómetros, siendo no más de aproximadamente un 10% en peso de dichas partículas más pequeñas que aproximadamente 200 micrómetros, y siendo no más de aproximadamente un 10% en peso de dichas partículas más grandes que aproximadamente 1250 micrómetros. Opcionalmente, el percarbonato puede revestirse con un silicato, borato o tensioactivos solubles en agua. El percarbonato está disponible de varias fuentes comerciales tales como FMC, Solvay y Tokai Denka.

Aunque no se prefiera para las composiciones de ADD de la presente invención que comprenden enzimas deterativas, las composiciones de la presente invención pueden comprender también, como agente de blanqueo, un material de blanqueo de tipo cloro. Tales agentes son bien conocidos en la técnica, e incluyen por ejemplo dicloroisocianurato de sodio ("NaDCC").

Aunque las composiciones de ADD eficaces de la presente memoria pueden comprender sólo el tensioactivo no iónico y el mejorador, las composiciones de ADD completamente formuladas típicamente comprenderán también otros materiales adyuvantes de detergentes para el lavado automático de la vajilla para mejorar o modificar su eficiencia. Estos materiales se seleccionan como apropiados para las propiedades requeridas de una composición para el lavado automático de la vajilla. Por ejemplo, se desea una baja formación de motas y películas - las composiciones preferidas tienen grados de formación de motas y películas de 3 o inferiores, preferiblemente inferiores a 2, y, lo más preferido, inferiores a 1, medido mediante el ensayo estándar de la Sociedad Americana para Ensayos y Materiales ("ASTM", del inglés "The American Society for Testing and Materials") D3556-85 (Reaprobado en 1989) "Standard Test Method for Deposition on Glassware During Mechanical Dishwashing".

- (a) *Activadores del Blanqueo* - Preferiblemente, el componente de blanqueo con peróxígeno en la composición se formula con un activador (precursor de perácido). El activador está presente en niveles desde aproximadamente un 0,01% hasta aproximadamente un 15%, preferiblemente desde aproximadamente un 0,5% hasta aproximadamente un 10%, más preferiblemente desde aproximadamente un 1% hasta aproximadamente un 8%, en peso de la composición. Los activadores preferidos se seleccionan del grupo que consiste en tetraacetiletilendiamina (TAED), benzoilcaprolactama (BzCL), 4-nitrobenzoilcaprolactama, 3-clorobenzoilcaprolactama, benzoiloxibencenosulfonato (BOBS), nonanoiloxibencenosulfonato (NOBS), benzoato de fenilo (PhBz), decanoiloxibencenosulfonato (C₁₀-OBS), benzoilvalerolactama (BZVL), octanoiloxibencenosulfonato (C₈-OBS), ésteres perhidrolizables y mezclas de los mismos, más preferiblemente benzoilcaprolactama y benzoilvalerolactama. Los activadores del blanqueo particularmente preferidos en el intervalo de pH de aproximadamente 8 a aproximadamente 9,5 son aquellos seleccionados porque tienen un grupo saliente OBS ó Vi-.

Los activadores del blanqueo preferidos son los que se describen en las Patentes de los EE.UU. Nos. 5.698.504, 5.695.679, 5.686.014, 5.130.045 y 4.412.934, y las solicitudes de patentes en tramitación junto con la presente U.S. Nos. de Serie 08/064.624, 08/064.623, 08/064.621, 08/064.562, 08/064.564, 08/082.270 y la solicitud en tramitación junto con la presente de M. Bums, A. D. Willey, R. T. Hartshorn, C. K. Ghosh, titulada "Bleaching Compounds Comprising Peroxyacid Activators Used With Enzymes" y que tiene un N° de Serie U.S. 08/133.691 (P&G Case 4890R), todas las cuales se incorporan a la presente memoria por referencia.

La relación en moles del compuesto blanqueador con peróxígeno (como AvO) frente a activador del blanqueo en la presente invención está generalmente en el intervalo de al menos 1:1, preferiblemente de aproximadamente 20:1 a aproximadamente 1:1, más preferiblemente de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 3:1. Pueden incluirse también activadores cuaternarios sustituidos. Las presentes composiciones de detergentes comprenden preferiblemente un activador del blanqueo sustituido cuaternario (QSBA, del inglés "quaternary substituted bleach activator") o un perácido sustituido cuaternario (QSP, del inglés "quaternary substituted peracid"); más preferiblemente, el primero. Las estructuras de QSBA preferidas se describen adicionalmente en los documentos en tramitación junto con la presente U.S. Nos. de Serie 08/298.903, 08/298.650, 08/298.906 y 08/298.904 archivados el 31 de agosto, 1994, ahora respectivamente Patentes de los EE.UU. Nos. 5.686.015, 5.460.747, 5.584.888 y 5.578.136, incorporados a la presente memoria por referencia.

Los activadores del blanqueo muy preferidos útiles en la presente invención están sustituidos con amida como se describe en las Patentes de los EE.UU. Nos. 5.698.504, 5.695.679 y 5.686.014. Los ejemplos preferidos de tales activadores del blanqueo incluyen: (6-octanamidocaproil)oxibencenosulfonato, (6-nonanamidocaproil)oxibencenosulfonato, (6-decanamidocaproil)oxibencenosulfonato y mezclas de los mismos.

Otros activadores útiles, descritos en las Patentes de los EE.UU. Nos. 5.698.504, 5.695.679, 5.686.014 y 4.966.723, incluyen activadores de tipo benzoxazina, tales como un anillo C₆H₄ con el que se condensa en las posiciones 1,2 un resto -C(O)OC(R¹)=N-. Dependiendo del activador y la aplicación precisa, pueden obtenerse buenos resultados de blanqueo a partir de sistemas de blanqueo que tienen un pH de uso de aproximadamente 6 a aproximadamente 13, preferiblemente de aproximadamente 9,0 a aproximadamente 10,5. Típicamente, por ejemplo, se usan activadores con restos que atraen electrones para intervalos de pH cercanos a la neutralidad o por debajo de la neutralidad. Pueden usarse álcalis y agentes de tamponamiento para asegurar tal pH.

Los activadores acil-lactámicos, como se describen en las Patentes de los EE.UU. Nos. 5.698.504, 5.695.679 y 5.686.014, son muy útiles en la presente invención, especialmente las acil-caprolactamas (véase por ejemplo el documento WO 94-28102 A) y acil-valerolactamas (véase la Patente de los EE.UU. N° 5.503.639).

- (b) *Peróxidos Orgánicos, especialmente Peróxidos de Diacilo* - Éstos se ilustran exhaustivamente en Kirk Othmer, Encyclopedia of Chemical Technology, Vol. 17, John Wiley and Sons, 1982 en las páginas 27-90 y especialmente en las páginas 63-72, todas incorporadas a la presente memoria por referencia. Si se usa un peróxido de diacilo, será preferiblemente uno que ejerza un impacto adverso mínimo sobre la formación de motas/películas.

- (c) *Catalizadores del Blanqueo que contienen Metales* - Las composiciones y métodos de la presente invención utilizan catalizadores del blanqueo que contienen metales que son eficaces para usar en composiciones de ADD. Se prefieren catalizadores del blanqueo que contienen manganeso y cobalto.

Un tipo de catalizador del blanqueo que contiene metales es un sistema catalizador que comprende un catión de un metal de transición de actividad catalítica de blanqueo definida, tal como los cationes cobre, hierro, titanio, rutenio, wolframio, molibdeno, o manganeso, un catión de metal auxiliar que tenga muy poca o ninguna actividad catalítica de blanqueo, tal como los cationes zinc o aluminio, y un secuestrador que tenga unas constantes de estabilidad definidas para los cationes catalíticos y auxiliares, particularmente ácido etilendiaminotetracético, etilendiaminotetra(ácido metilfosfónico) y sales solubles en agua de los mismos. Tales catalizadores se describen en la Patente de los EE.UU. N° 4.430.243.

Si se desea, las composiciones de la presente memoria pueden catalizarse por medio de un compuesto de manganeso. Tales compuestos y niveles de uso son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, los catalizadores a base de manganeso descritos en la Patente de los EE.UU. N° 5.576.282, Patente de los EE.UU. 5.246.621, Patente de los EE.UU. 5.244.594; Patente de los EE.UU. 5.194.416; Patente de los EE.UU. 5.114.606; y las Publicaciones de Solicitud de Patentes Europeas Nos. 549.271A1, 549.272A1, 544.440A2, y 544.490A1; Los ejemplos preferidos de estos catalizadores incluyen $\text{Mn}^{\text{IV}}_2(\text{u-O})_3(1,4,7\text{-trimetil-1,4,7-triazaciclono-nano})_2(\text{PF}_6)_2$, $\text{Mn}^{\text{III}}_2(\text{u-O})_1(\text{u-OAc})_2(1,4,7\text{-trimetil-1,4,7-triazaciclono-nano})_2(\text{ClO}_4)_2$, $\text{Mn}^{\text{IV}}_4(\text{u-O})_6(1,4,7\text{-triazaciclono-nano})_4(\text{ClO}_4)_4$, $\text{Mn}^{\text{III}}\text{Mn}^{\text{IV}}_4(\text{u-O})_1(\text{u-OAc})_2\text{-}(1,4,7\text{-trimetil-1,4,7-triazaciclono-nano})_2(\text{ClO}_4)_3$, $\text{Mn}^{\text{IV}}(1,4,7\text{-trimetil-1,4,7-triazaciclono-nano})\text{-(OCH}_3)_3(\text{PF}_6)$, y mezclas de los mismos. Otros catalizadores del blanqueo a base de metales incluyen los descritos en la Patente de los EE.UU. 4.430.243 y la Patente de los EE.UU. 5.114.611. El uso de manganeso con varios ligandos que forman complejos para intensificar el blanqueo se señala también en las siguientes Patentes de los EE.UU.: 4.728.455; 5.284.944; 5.246.612; 5.256.779; 5.280.117; 5.274.147; 5.153.161; y 5.227.084.

Los catalizadores del blanqueo de cobalto útiles en la presente invención son conocidos, y se describen, por ejemplo en las Patentes de los EE.UU. Nos. 5.597.936, 5.595.967, 5.703.030 y M. L. Tobe, "Base Hydrolysis of Transition-Metal Complexes", *Adv. Inorg. Bioinorg. Mech.*, (1983), 2, páginas 1-94. Los catalizadores de cobalto más preferidos útiles en la presente invención son sales de acetato de pentaamina y cobalto que tienen la fórmula $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{OAc}] \text{Ty}$, en la que "OAc" representa un resto de acetato y "Ty" es un anión, y especialmente el cloruro de acetato de pentaamina y cobalto, $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{OAc}]\text{Cl}_2$; así como $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{OAc}](\text{OAc})_2$; $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{OAc}](\text{PF}_6)_2$; $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{OAc}](\text{SO}_4)$; $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{OAc}](\text{BF}_4)_2$; y $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{OAc}](\text{NO}_3)_2$ (en la presente memoria "PAC").

Estos catalizadores de cobalto se preparan fácilmente por procedimientos conocidos, tal como se enseña por ejemplo en las Patentes de los EE.UU. Nos. 5.597.936, 5.595.967, 5.703.030, en el artículo de Tobe y las referencias citadas en él, y en la Patente de los EE.UU. 4.810.410, otorgada a Diakun *et al.*, expedida el 7 de marzo, 1989, *J. Chem. Ed.* (1989), 66 (12), 1043-45; *The Synthesis and Characterization of Inorganic Compounds*, W.L. Jolly (Prentice-Hall; 1970), pp. 461-3; *Inorg. Chem.*, 18, 1497-1502 (1979); *Inorg. Chem.*, 21, 2881-2885 (1982); *Inorg. Chem.*, 18, 2023-2025 (1979); *Inorg. Synthesis*, 173-176 (1960); y *Journal of Physical Chemistry*, 56, 22-25 (1952).

Los catalizadores del blanqueo útiles en las composiciones para el lavado automático de la vajilla y en las composiciones de detergente en polvo concentrado pueden seleccionarse también como apropiadas para la presente invención. Para ver ejemplos de catalizadores del blanqueo adecuados véase la Patente de los EE.UU. 4.246.612 y la Patente de los EE.UU. 5.227.084.

Como cuestión práctica, y no con carácter limitante, las composiciones y procedimientos de limpieza de la presente memoria pueden ajustarse para proporcionar del orden de al menos una parte por cien millones de la especie activa catalizadora del blanqueo en el medio de lavado acuoso, y proporcionará preferiblemente desde aproximadamente 0,01 ppm hasta aproximadamente 25 ppm, más preferiblemente desde aproximadamente 0,05 ppm hasta aproximadamente 10 ppm, y, lo más preferido, desde aproximadamente 0,1 ppm hasta aproximadamente 5 ppm, de la especie catalizadora del blanqueo en el líquido de lavado. Para obtener tales niveles en el líquido de lavado de un proceso de lavado automático, las composiciones típicas de la presente memoria comprenderán desde aproximadamente un 0,0005% hasta aproximadamente un 0,2%, más preferiblemente desde aproximadamente un 0,004% hasta aproximadamente un 0,08%, de catalizador del blanqueo, especialmente catalizadores de manganeso o cobalto, en peso de las composiciones para limpieza.

Variación del pH y Tamponamiento - Muchas composiciones de detergente de la presente memoria estarán tamponadas, esto es, son relativamente resistentes a la caída del pH en presencia de manchas ácidas. Sin embargo, otras composiciones de la presente memoria pueden tener excepcionalmente una baja capacidad de tamponamiento, o pueden estar sustancialmente no tamponadas. Las técnicas para controlar o variar el pH a niveles de utilización recomendados incluye más generalmente el uso no sólo de tampones, sino también de álcalis, ácidos, sistemas para producir un salto en el pH, recipientes de dos compartimentos, etc., y son bien conocidas por los expertos en la técnica.

Las composiciones de ADD preferidas de la presente memoria comprenden un componente ajustador del pH seleccionado de sales inorgánicas alcalinas solubles en agua y mejoradores orgánicos o inorgánicos solubles en agua como se describe en las Patentes de los EE.UU. Nos. 5.705.464 y 5.710.115.

Silicatos Solubles en Agua - Las presentes composiciones de detergentes para el lavado automático de la vajilla pueden comprender adicionalmente silicatos solubles en agua como se describe en las Patentes de los EE.UU. Nos. 5.705.464 y 5.710.115.

Agentes para el Cuidado del Material - Las composiciones de ADD preferidas pueden contener uno o más agentes para el cuidado del material que son eficaces como inhibidores de la corrosión y/o ayudantes anti-deslustre como se describe también en las Patentes de los EE.UU. Nos. 5.705.464, 5.710.115 y 5.646.101. Cuando están presentes, tales materiales protectores se incorporan preferiblemente en bajos niveles, p.ej., desde aproximadamente un 0,01% hasta aproximadamente un 5% de la composición de ADD.

Otros Materiales - Los ingredientes deteritivos o coadyuvantes incluidos opcionalmente en la presentes composiciones pueden incluir uno o más materiales para ayudar o intensificar la eficiencia de la limpieza, el tratamiento del sustrato a ser limpiado, o diseñarse para mejorar la estética de las composiciones. Los coadyuvantes que pueden incluirse también en las composiciones de la presente invención, en sus niveles convencionales establecidos en la técnica para su uso (generalmente, los materiales coadyuvantes comprenden, en total, desde aproximadamente un 30% hasta aproximadamente un 99,9%, preferiblemente desde aproximadamente un 70% hasta aproximadamente un 95%, en peso de las composiciones), incluyen otros ingredientes activos tales como mejoradores no fosfatos, quelantes, enzimas, supresores de la espuma jabonosa, polímeros dispersantes (p.ej., de BASF Corp. o Rohm & Haas), motas coloreadas, agentes para el cuidado de la plata, anti-deslustre y/o anti-corrosión, colorantes, agentes de relleno, germicidas, fuentes de alcalinidad, hidrotropos, anti-oxidantes, agentes estabilizantes de enzimas, perfumes, agentes de solubilización, excipientes, ayudantes del proceso, pigmentos, y agentes de control del pH como se describe en las Patentes de los EE.UU. Nos. 5.705.464, 5.710.115, 5.698.504, 5.695.679, 5.686.014 y 5.646.101.

Los siguientes ejemplos no limitantes ilustran adicionalmente las composiciones de ADD de la presente invención.

Ejemplo 1

Ingredientes:	% en Peso	
	A	B
Tripolifosfato de sodio (STPP)	24,0	45
Carbonato de sodio	20,0	13,5
Silicato 2.Or hidratado	15	13,5
Tensioactivos no iónicos	2,0	2,0
Polímero ¹	4,0	--
Proteasa ² (4% activa)	0,83	0,83
Amilasa (0,8% activa)	0,5	0,5
Perborato monohidratado (15,5% AvO activo) ³	14,5	14,5
Catalizador de cobalto ⁴	0,008	--
Peróxido de dibenzoilo (18% activo)	4,4	4,4
Agua, sulfato de sodio y misc.	Equilibrar	Equilibrar

¹ Terpolímero seleccionado de ácido acrílico al 60%/ácido maleico al 20%/acrilato de etilo al 20%, o bien ácido acrílico al 70%/ácido maleico al 10%/acrilato de etilo al 20%.

² Una variante tipo carbonil-hidrolasa de la subtilisina de *B. amyloliquefaciens* con las sustituciones de aminoácidos 210I/76D/103A/104I/156E/166D.

³ Disponible en DeGussa Copr. El nivel de AvO de la fórmula de arriba es 2,2%

⁴ Nitrato de pentaaminaacetatocobalto(III) preparado como se describe anteriormente en la presente memoria; puede reemplazarse por MnTACN.

ES 2 273 417 T3

Las ADDs de los ejemplos de composiciones de detergentes para lavar la vajilla anteriores se usan para lavar vasos manchados de leche, cubertería manchada de almidón, queso, huevo o comida para bebés, cargando la vajilla manchada en un aparato lavavajillas automático doméstico y lavando usando ciclos de lavado fríos, con picos a 60°C, o bien uniformemente a 45-50°C con una concentración de producto de las composiciones ejemplificadas de aproximadamente 1000 a aproximadamente 8000 ppm, con excelentes resultados.

Ejemplo 2

Las fórmulas de detergentes para lavar la vajilla líquidos de acción ligera se preparan como sigue:

Ingrediente	Composición		
	A	B	C
	% en Peso		
Tensioactivo	32,0	29,50	30,75
Etanol	4,00	4,00	4,00
Citrato de amonio	0,06	0,06	0,06
Cloruro de magnesio	3,32	3,32	3,32
Sulfato de amonio	0,08	0,08	0,08
Peróxido de hidrógeno	200 ppm	200 ppm	200 ppm
Perfume	0,18	0,18	0,18
Proteasa ¹	0,50	0,50	0,50
Agua y menores	----- Equilibrar -----		

¹ Una variante tipo carbonil-hidrolasa de la subtilisina de *B. amylo-liquefaciens* con las sustituciones de aminoácidos 210I/76D/103A/104I/156E/166D.

Habiendo descrito la invención en detalle con referencia a las realizaciones preferidas y los ejemplos, quedará claro para los expertos en la técnica que pueden hacerse varios cambios y modificaciones sin salirse del alcance de la invención y la invención no se considera limitada a lo que se describe en la memoria descriptiva.

REIVINDICACIONES

1. Una composición para limpieza que comprende:

(a) una cantidad eficaz de enzima proteasa que es una variante de la subtilisina que tiene los aminoácidos 210I/76D/103A/104I/156E/166D en posiciones equivalentes a las posiciones de la subtilisina de *Bacillus amylo-quefaciens* que tiene la secuencia de aminoácidos como se expone en la Figura 3 (SEC ID N° 2);

(b) uno o más materiales coadyuvantes de la limpieza compatibles con la enzima proteasa.

2. Una composición para limpieza según la Reivindicación 1 en la que dicha composición para limpieza es una composición de detergente para el lavado de la vajilla que comprende:

(a) del 5% al 90% en peso de la composición de un mejorador;

(b) del 0,1% al 15% en peso de la composición de un tensioactivo detergente;

(c) del 0,1% al 10% en peso de la composición de dicha enzima proteasa.

(d) opcionalmente, del 0,1% al 40% en peso de la composición de un agente de blanqueo; y

(e) materiales coadyuvantes de la limpieza.

3. Las composiciones según cualquiera de las Reivindicaciones 1-2 en las que los materiales coadyuvantes de la limpieza se seleccionan del grupo que consiste en tensioactivos, disolventes, tampones, enzimas, agentes de desprendimiento de suciedad, agentes de eliminación de suciedad de arcilla, agentes dispersantes, abrillantadores, supresores de la espuma jabonosa, suavizantes de tejidos, potenciadores de espuma jabonosa, estabilizantes enzimáticos, mejoradores, agentes de blanqueo, colorantes, perfumes, y mezclas de los mismos.

4. La composición según cualquiera de las Reivindicaciones 1-3 que comprende además desde aproximadamente un 5% hasta aproximadamente un 50% de un mejorador seleccionado del grupo que consiste en zeolitas, policarboxilatos, silicatos a capas, fosfatos; y mezclas de los mismos.

5. Las composiciones según cualquiera de las Reivindicaciones 1-4 en las que los materiales coadyuvantes de la limpieza comprenden al menos un agente de blanqueo.

6. Las composiciones según la Reivindicación 5 en las que el agente de blanqueo se selecciona del grupo que consiste en percarbonatos, perboratos, y mezclas de los mismos, y que opcionalmente comprenden además al menos un activador del blanqueo.

7. Las composiciones según cualquiera de las Reivindicaciones 1-6 en las que la composición incluye además al menos una enzima detergente seleccionada del grupo que consiste en celulasas, lipasas, amilasas, fosfolipasas, proteasas, peroxidases y mezclas de las mismas.

8. Un método para limpiar tejidos, comprendiendo dicho método poner en contacto el tejido necesitado de limpieza con la composición según cualquiera de las Reivindicaciones 1 y 3-7.

9. Un método para limpiar la vajilla, comprendiendo dicho método poner en contacto la pieza de la vajilla necesitada de limpieza con una composición según cualquiera de las Reivindicaciones 1-7.

10. Un método para la limpieza personal, comprendiendo dicho método poner en contacto la parte del cuerpo humano o de animal inferior necesitada de limpieza con una composición según cualquiera de las Reivindicaciones 1 y 3-7.

11. Un método para proporcionar beneficios mejorados de formación de motas y películas en el lavado automático de la vajilla que comprende poner en contacto una pieza de vajilla necesitada de limpieza con una composición según cualquiera de las Reivindicaciones 1-7.

ES 2 273 417 T3

10 30 50
 ATGAAGAAACCGTTGGGGAAAATTGTCGCAAGCACCGCACTACTCATTCTGTTGCTTTT
 MetLysLysProLeuGlyLysIleValAlaSerThrAlaLeuLeuIleSerValAlaPhe
 70 90 110
 AGTTCATCGATCGCATCGGCTGCTGAAGAGCAAAAGAAAAATATTTAATTGGCTTTAAT
 SerSerSerIleAlaSerAlaAlaGluGluAlaLysGluLysTyrLeuIleGlyPheAsn
 130 150 170
 GAGCAGGAAGCTGTCAGTCAGTTTGTAGAACAAAGTAGAGGCAAATGACGAGGTCGCCATT
 GluGlnGluAlaValSerGluPheValGluGlnValGluAlaAsnAspGluValAlaIle
 190 210 230
 CTCTCTGAGGAAGAGGAAGTCGAAATTGAATTGCTTCATGAATTTGAAACGATTCTGTT
 LeuSerGluGluGluGluValGluIleGluLeuLeuHisGluPheGluThrIleProVal
 250 270 290
 TTATCCGTTCAAGTTAAGCCAGAGATGTGGACGCGCTTGAAGTCCAGCGATTCT
 LeuSerValGluLeuSerProGluAspValAspAlaLeuGluLeuAspProAlaIleSer
 310 330 350
 TATATTGAAGAGGATGCAGAAGTAACGACAATGGCGCAATCAGTGCCATGGGGAATTAGC
 TyrIleGluGluAspAlaGluValThrThrMetAlaGlnSerValProTrpGlyIleSer
 370 390 410
 CGTGTCAGAGCCCCAGCTGCCCATTAACCGTGGATTGACAGGTTCTGGTGTAAGAGTTGCT
 ArgValGlnAlaProAlaAlaHisAsnArgGlyLeuThrGlySerGlyValLysValAla
 430 450 470
 GTCCTCGATACAGGTATTTCCACTCATCCAGACTTAAATATTCGTGGTGGCGCTAGCTTT
 ValLeuAspThrGlyIleSerThrHisProAspLeuAsnIleArgGlyGlyAlaSerPhe
 490 510 530
 GTACCAGGGGAACCATCCACTCAAGATGGGAATGGGCATGGCACGCATGTGGCCGGGACG
 ValProGlyGluProSerThrGlnAspGlyAsnGlyHisGlyThrHisValAlaGlyThr
 550 570 590
 ATTGCTGCTTTAAACAATTGCGATTGGCGTTCTTGGCGTAGCGCCGAGCGCGGAAGTATAC
 IleAlaAlaLeuAsnAsnSerIleGlyValLeuGlyValAlaProSerAlaGluLeuTyr
 610 630 650
 GCTGTTAAGTATTAGGGCGAGCGGTTTCAGGTTTCGGTCAGCTCGATTGCCCAAGGATTG
 AlaValLysValLeuGlyAlaSerGlySerGlySerValSerSerIleAlaGlnGlyLeu
 670 690 710
 GAATGGGCAGGGAACAATGGCATGCACGTTGCTAATTTGAGTTTAGGAAGCCCTTCGCCA
 GluTrpAlaGlyAsnAsnGlyMetHisValAlaAsnLeuSerLeuGlySerProSerPro
 730 750 770
 AGTGCCACACTTGAGCAAGCTGTTAATAGCGCGACTTCTAGAGGCGTTCTTGTTGTACCG
 SerAlaThrLeuGluGlnAlaValAsnSerAlaThrSerArgGlyValLeuValValAla
 790 810 830
 GCATCTGGGAATTCAGGTGCAGGCTCAATCAGCTATCCGGCCCGTTATGCGAACGCAATG
 AlaSerGlyAsnSerGlyAlaGlySerIleSerTyrProAlaArgTyrAlaAsnAlaMet
 850 870 890
 GCAGTCGGAGCTACTGACCAAAACAACAACCGCCAGCTTTTCACAGTATGCCCGACGG
 AlaValGlyAlaThrAspGlnAsnAsnAsnArgAlaSerPheSerGlnTyrGlyAlaGly

FIG. 1A

ES 2 273 417 T3

```

          910          930          950
CTTGACATTGTGGCACCAGGTGTAAACGTGCAGAGCACATACCCAGGTTCAACCTATGCC
LeuAspIleValAlaProGlyValAsnValGlnSerThrTyrProGlySerThrTyrAla

          970          990          1010
AGCTTAAACGGTACATCCATGGCTACTCCTCATGTTGCAGGTGCAGCAGCCCTTGTTAAA
SerLeuAsnGlyThrSerMetAlaThrProHisValAlaGlyAlaAlaAlaLeuValLys

          1030          1050          1070
CAAAAGAACCCATCTTGGTCCAATGTACAAATCCGCAATCATCTAAAGAATACGGCAACG
GlnLysAsnProSerTrpSerAsnValGlnIleArgAsnHisLeuLysAsnThrAlaThr

          1090          1110          1130
AGCTTAGGAAGCACGAACCTTGTATGGAAGCGGACTTGTCAATGCAGAAGCGGCAACACGC
SerLeuGlySerThrAsnLeuTyrGlySerGlyLeuValAsnAlaGluAlaAlaThrArg

```

FIG. 2A

Comparación de las secuencias de la subtilisina de:

B. amyloliquefaciens

B. subtilis

B. licheniformis

B. lentus

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

FIG. 2A

161 SS ST ST ST * 170 P G K Y P S V I A V G A V D S S N Q R A S F S S V G P E L D V M A
SS ST ST ST * 180 V G A V D S S N Q R A S F S S V G P E L D V M A
ST ST ST ST * 190 V G A V D S S N Q R A S F S S V G P E L D V M A
* * * I S Y P A R Y A N A M A V G A T D Q N N R R A S F S S V G P E L D V M A
201 P G V S I Q S T L P G N K Y G A Y N G T S M A S P H V A G A A A L I L S K H P N
P G V S I Q S T L P G N K Y G A Y N G T S M A S P H V A G A A A L I L S K H P N
P G A G V Y S T Y P G S T Y A S L N G T S M A S P H V A G A A A L I L S K H P N
P G V N V Q S T Y P G S T Y A S L N G T S M A S P H V A G A A A L I L S K H P N
241 W T N T Q V R S S L E N T T T K L G D S F Y Y G K G L I N V Q A A A Q
W T N A Q V R D R L E S T A T Y L G N S F Y Y G K G L I N V Q A A A Q
L S A S Q V R N R L S S T A T Y L G S S F Y Y G K G L I N V E A A A Q
W S N V Q I R N H L K N T A T S L G S T N L Y G S G L V N A E A A T R

FIG. 2B

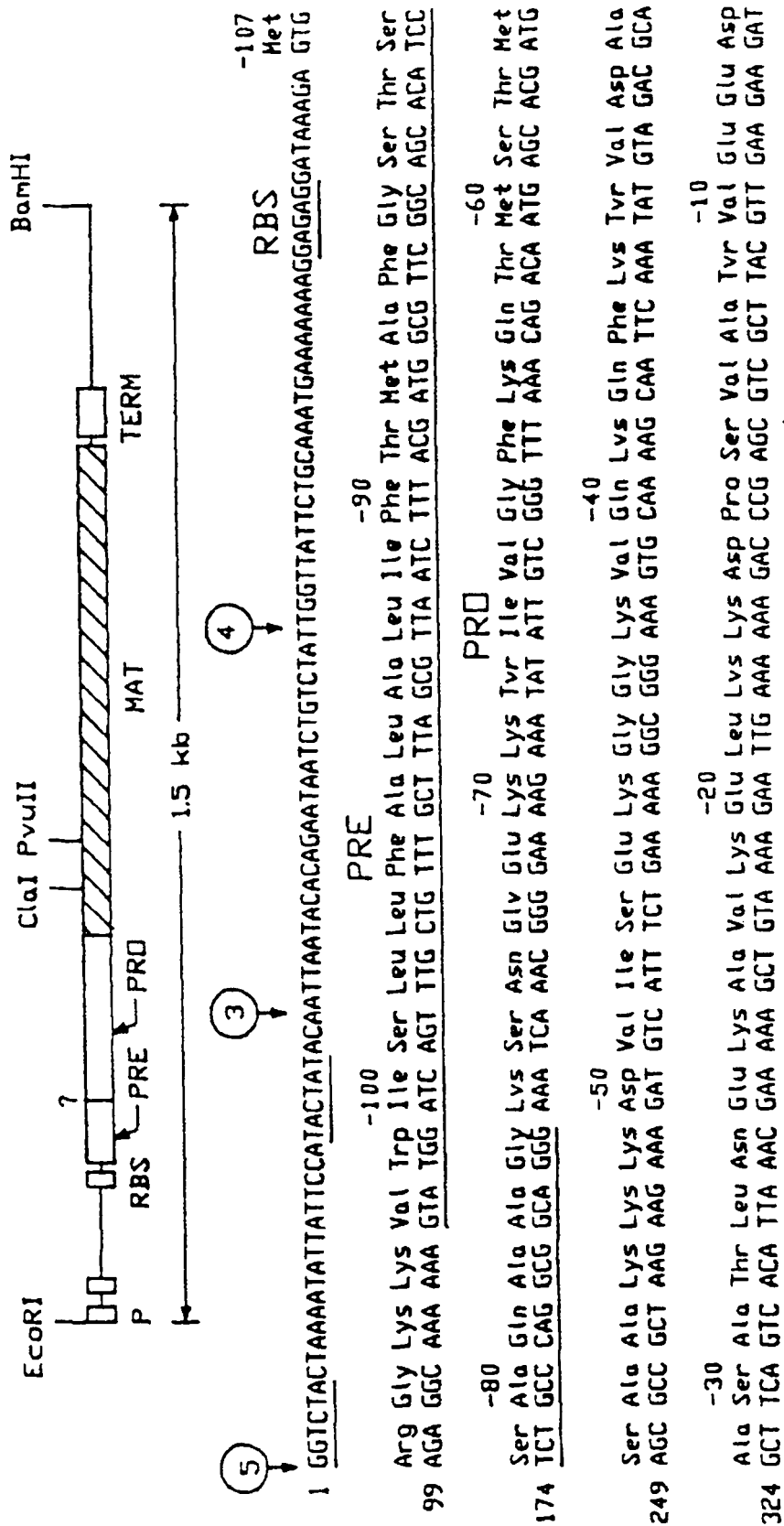


FIG. 3A

His Bal Ala His Ala Tyr Ala Gln Ser Val Pro Tyr Gly Val Ser Gln Ile Lys Ala Pro Ala Leu His Ser Gln
 399 CAC GTA GCA CAT GCG TCC GCG CAG TCC CCT TAC GGC GTA TCA CAA ATT AAA GCC CCT GCT CTG CAC TCT CAA
 20
 Gly Tyr Thr Gly Ser Asn Val Lys Val Ala Val Ile Asp Ser Gly Ile Asp Ser Ser His Pro Asn Leu Lys Val
 474 GGC TAC ACT GGA TCA AAT GTT AAA GTA GCG GTT ATC GAC AGC GGT ATC GAT TCT TCT CAT CCT GAT TTA AAG GTA
 30
 Ala Gly Gly Ala Ser Met Val Pro Ser Glu Thr Asn Pro Phe Gln Asp Asn Asn Ser His Gly Thr His Val Ala
 549 GCA AGC GGA GCC AGC ATG GTT CCT TCT GAA ACA AAT CCT TTC CAA GAC AAC AAC TCT CAC GGA ACT CAC GTT GCC
 50
 Gly Thr Val Ala Ala Leu Asn Ser Ile Gly Val Leu Gly Val Ala Pro Ser Ala Ser Leu Tyr Ala Val Lys
 624 GGC ACA GTT GCG GCT CTT AAT AAC TCA ATC GGT GTA TTA GGC GTT GCG CCA AGC GCA TCA CTT TAC GCT GTA AAA
 80
 Val Leu Gly Ala Asp Gly Ser Gly Gln Tyr Ser Trp Ile Ile Asn Gly Ile Glu Trp Ala Ile Ala Asn Asn Met
 699 GTT CTC GGT GCT GAC GGT TCC GGC CAA TAC AGC TGG ATC ATT AAC GGA ATC GAG TGG GCG ATC GCA AAC AAT ATC
 110
 Asp Ala 100
 Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly Pro Ser Gly Ser Ala Ala Leu Lys Ala Ala Val Asp Lys Ala Val Ala
 120
 Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly Pro Ser Gly Ser Ala Ala Leu Lys Ala Ala Val Asp Lys Ala Val Ala
 774 GAC GTT ATT AAC ATG AGC CTC GGC GGA CCT TCT GGT TCT GCT GCT TTA AAA GCG GCA GTT GAT AAA GCC GTT GCA
 130
 Ser Gly Val Val Val Val Ala Ala Ala Gly Asn Glu Gly Thr Ser Gly Ser Ser Thr Val Gly Tyr Pro Gly
 849 TCC GGC GTC GTA GTC GTT GCG GCA GCC GGT AAC GAA GGC ACT TCC GGC AGC TCA AGC ACA GTG GGC TAC CCT GGT
 150
 Ser Thr 160

FIG. 3B

```

170      Lvs Tyr Pro Ser Val Ile Ala Val Glv Ala Val Asp Ser Ser Asn Gln Arp Ala Ser Phe Ser Vsl Glv Pro
924 AAA TAC CCT TCT GTC ATT GCA GTA GGC GCT GTT GAC AGC AGC AAC CAA AGA GCA TCT TTC TCA AGC GTA GGA CCT

      200      210      240
Glu Leu Asp Val Met Ala Pro Gly Val Ser Ile Gln Ser Thr Leu Pro Gly Asn Lvs Tyr Gly Ala Tyr Asn Glv
999 GAG CTT GAT GTC ATG GCA CCT GGC GTA TCT ATC CAA AGC ACG CTT CCT GGA AAC AAA TAC GGG GCG TAC AAC GGT

      220      230      260
Thr Ser Met Ala Ser Pro His Val Ala Gly Aal Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lvs His Pro Asn Trp Thr Asn Thr
1074 ACG TCA ATG GCA TCT CCG CAC GGT GGC GGA GCG GCT GCT TTG ATT CTT TCT TCT AAG CAC CCG AAC TGG ACA AAC ACT

      250 Gln
Gln Val Aro Ser Ser Leu Glu Asn Thr Thr Thr Lvs Leu Gly Asp Ser Phe Tyr Tyr Gly Lvs Glv Leu Ile Asn
1149 CAA GTC CGC AGC AGT TTA GAA AAC ACC ACT ACA AAA CTT GGT GAT TCT TCT TTG TAC TAT GGA AAA GGG CTG ATC AAC

      270      275
Val Gln Ala Ala Ala Gln DC
1224 GTA CAA GCG GCA GCT CAG TAA  AACATAAAAAACCGGCCCTTGGCCCCCGGGTTTTTATTTATTTTCTTCCTCCGCAIGTTCATCCGCTC

1316 ATAATCGACGGATGGCTCCCTCTGAAAATTTTAACGAGAAACGGCGGGTTGACCCGGCTCAGTCCCGTAACGGCCAACCTCCIGAAACGCTCAATCGCC

1416 CTTCCTGGGTTTCGGGTCAGCTCAATGCCATAACGGTCTGGGGGGGTTTTTCTTGATACCGGGGAGACGGGCATTCGTAAICGGATC

```

TERM

FIG. 3C

RESTOS CONSERVADOS EN LAS SUBTILISINAS DE
BACILLUS AMYLOLYQUEFACIENS

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

FIG. 4

ES 2 273 417 T3

ATG AAG AAA CCG TCG GGG AAA ATT GTC GCA AGC ACC GCA CTA CTC ATT Met Lys Lys Pro Leu Gly Lys Ile Val Ala Ser Thr Ala Leu Leu Ile -111-110 -105 -100	43
TCT GTT GCT TTT AGT TCA TCG ATC GCA TCG GCT GCT GAA GAA GCA AAA Ser Val Ala Phe Ser Ser Ser Ile Ala Ser Ala Ala Glu Glu Ala Lys -95 -90 -85 -80	96
GAA AAA TAT TTA ATT GGC TTT AAT GAG CAG GAA GCT GTC AGT GAG TTT Glu Lys Tyr Leu Ile Gly Phe Asn Glu Gln Glu Ala Val Ser Glu Phe -75 -70 -65	144
GTA GAA CAA GTA GAG GCA AAT GAC GAG GTC GCC ATT CTC TCT GAG GAA Val Glu Gln Val Glu Ala Asn Asp Glu Val Ala Ile Leu Ser Glu Glu -60 -55 -50	192
GAG GAA GTC GAA ATT GAA TTG CTT CAT GAA TTT GAA ACG ATT CCT GTT Glu Glu Val Glu Ile Glu Leu Leu His Glu Phe Glu Thr Ile Pro Val -45 -40 -35	240
TTA TCC GTT GAG TTA AGC CCA GAA GAT GTG GAC GCG CTT GAA CTC GAT Leu Ser Val Glu Leu Ser Pro Glu Asp Val Asp Ala Leu Glu Leu Asp -30 -25 -20	288
CCA GCG ATT TCT TAT ATT GAA GAG GAT GCA GAA GTA ACG ACA ATG GCG Pro Ala Ile Ser Tyr Ile Glu Glu Asp Ala Glu Val Thr Thr Met Ala -15 -10 -5 1	336
CAA TCA GTG CCA TGG GGA ATT AGC CGT GTG CAA GCC CCA GCT GCC CAT Gln Ser Val Pro Trp Gly Ile Ser Arg Val Gln Ala Pro Ala Ala His 5 10 15	384
AAC CGT GGA TTG ACA GGT TCT GGT GTA AAA GTT GCT GTC CTC GAT ACA Asn Arg Gly Leu Thr Gly Ser Gly Val Lys Val Ala Val Leu Asp Thr 20 25 30	432
GGT ATT TCC ACT CAT CCA GAC TTA AAT ATT CGT GGT GGC GCT AGC TTT Gly Ile Ser Thr His Pro Asp Leu Asn Ile Arg Gly Gly Ala Ser Phe 35 40 45	480
GTA CCA GGG GAA CCA TCC ACT CAA GAT GGG AAT GGG CAT GGC ACG CAT Val Pro Gly Glu Pro Ser Thr Gln Asp Gly Asn Gly His Gly Thr His 50 55 60 65	528
GTG GCC GGG ACG ATT GCT GCT TTA GAC AAC TCG ATT GGC GTT CTT GGC Val Ala Gly Thr Ile Ala Ala Leu Asp Asn Ser Ile Gly Val Leu Gly 70 75 80	576
GTA GCG CCG AGC GCG GAA CTA TAC GCT GTT AAA GTA TTA GGG GCG AGC Val Ala Pro Ser Ala Glu Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Gly Ala Ser 85 90 95	624
GGT TCA GGC GCC ATC AGC TCG ATT GCC CAA GGA TTG GAA TGG GCA GCG Gly Ser Gly Ala Ile Ser Ser Ile Ala Gln Gly Leu Glu Trp Ala Gly 100 105 110	672

FIG. 5A

ES 2 273 417 T3

AAC AAT GGC ATG CAC GTT GCT AAT TTG AGT TTA GGA AGC CCT TCG CCA Asn Asn Gly Met His Val Ala Asn Leu Ser Leu Gly Ser Pro Ser Pro 115 120 125	720
AGT GCC ACA CTT GAG CAA GCT GTT AAT AGC GCG ACT TCT AGA GGC GTT Ser Ala Thr Leu Glu Gln Ala Val Asn Ser Ala Thr Ser Arg Gly Val 130 135 140 145	768
CTT GTT GTA GCG GCA TCT GGG AAT GAA GGT GCA GGC TCA ATC GAC TAT Leu Val Val Ala Ala Ser Gly Asn Glu Gly Ala Gly Ser Ile Asp Tyr 150 155 160	816
CCG GCC CGT TAT GCG AAC GCA ATG GCA GTC GGA GCT ACT GAC CAA AAC Pro Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Met Ala Val Gly Ala Thr Asp Gln Asn 165 170 175	864
AAC AAC CGC GCC AGC TTT TCA CAG TAT GGC GCA GGG CTT GAC ATT GTC Asn Asn Arg Ala Ser Phe Ser Gln Tyr Gly Ala Gly Leu Asp Ile Val 180 185 190	912
GCA CCA GGT GTA AAC GTG CAG AGC ACA TAC CCA ATT TCA ACG TAT GCC Ala Pro Gly Val Asn Val Gln Ser Thr Tyr Pro Ile Ser Thr Tyr Ala 195 200 205	960
AGC TTA AAC GGT ACA TCG ATG GCT ACT CCT CAT GTT GCA GGT GCA GCA Ser Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Ala Ala 210 215 220 225	1008
GCC CTT GTT AAA CAA AAG AAC CCA TCT TGG TCC AAT GTA CAA ATC CGC Ala Leu Val Lys Gln Lys Asn Pro Ser Trp Ser Asn Val Gln Ile Arg 230 235 240	1056
AAT CAT CTA AAG AAT ACG GCA ACG AGC TTA GGA AGC ACG AAC TTG TAT Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr Ser Leu Gly Ser Thr Asn Leu Tyr 245 250 255	1104
GGA AGC GGA CTT GTC AAT GCA GAA GCG GCA ACA CGC Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg 260 265	1140

FIG. 5B

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTES: Rai, Saroj
Correa, Paul E.
Zhu, Yong
Graycar, Thomas P.
Bott, Richard R.
- 10 (ii) TÍTULO DE LA INVENCION: Enzimas proteasas para eliminar la suciedad difícil y/o reducir la formación de manchas y películas y composiciones que las incorporan
- (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 9
- 15 (iv) DIRECCIÓN PARA LA CORRESPONDENCIA:
(A) DESTINATARIO: The Procter & Gamble Company
(B) CALLE: 11810 East Miami River Road
20 (C) CIUDAD: Ross
(D) ESTADO: OH
(E) PAÍS: USA
25 (F) ZIP: 45061
- (v) FORMATO LEGIBLE POR ORDENADOR:
(A) TIPO DE MEDIO: disquete
(B) ORDENADOR: IBM PC compatible
30 (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
(D) APLICACIÓN: PatentIn Release #1.0, Versión #1.30
- (vi) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL:
35 (A) NÚMERO DE SOLICITUD:
(B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 4 de junio de 1997
(C) CLASIFICACIÓN:
- 40 (viii) INFORMACIÓN SOBRE EL AGENTE/REPRESENTANTE:
(A) NOMBRE: Bolam, Brian M.
(B) NÚMERO DE REGISTRO: 37.513
45 (C) REFERENCIA/NÚMERO DE EXPEDIENTE: 6689P
- (ix) INFORMACIÓN PARA TELECOMUNICACIÓN:
(A) TELÉFONO: 513/627-2457
50 (B) TELEFAX: 513/627-0318

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:1:

- 55 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 1497 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) CATENARIEDAD: simple
60 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:1:
- 65

ES 2 273 417 T3

	GGTCTACTAA AATATTATTC CATACTATAC AATTAATACA CAGAATAATC TGTCTATTGG	60
	TTATTCTGCA AATGAAAAAA AGGAGAGGAT AAAGAGTGAG AGGCAAAAAA GTATGGATCA	120
5	GTITGCTGTT TGCTTTAGCG TTAATCTTTA CGATGGCGTT CGGCAGCACA TCCTCTGCCC	180
	AGGCGGCAGG GAAATCAAAC GGGGAAAAGA AATATATTGT CGGGTTTAAA CAGACAATGA	240
	GCACGATGAG GCCTGCTAAG AAGAAAGATG TCATTTCTGA AAAAGGCGGG AAAGTGCAAA	300
10	AGCAATTCAA ATATGTAGAC GCAGCTTCAG TCACATTAAA CGAAAAAGCT GTAAAAGAAT	360
	TGAAAAAGA CCCGAGCGTC GCTTACGTTG AAGAAGATCA CGTAGCACAT GCGTACGCGC	420
15	AGTCCGTGCC TTACGGCGTA TCACAAATTA AAGCCCCTGC TCTGCACTCT CAAGGCTACA	480
	CTGGATCAAA TGTTAAAGTA GCGGTTATCG ACAGCGGTAT CGATTCTTCT CATCCTGATT	540
	TAAAGGTAGC AAGCGGAGCC AGCATGGTTC CTTCTGAAAC AAATCCTTTC CAAGACAACA	600
20	ACTCTCACGG AACTCACGTT GCCGGCACAG TTGCGGCTCT TAATAACTCA ATCGGTGTAT	660
	TAGGCGTTGC GCCAAGCGCA TCACTTTACG CTGTAAAAGT TCTCGGTGCT GACGGTCCG	720
	GCCAATACAG CTGGATCATT AACGGAATCG AGTGGGCGAT CGCAACAAT ATGGACGTTA	780
25	TTAACATGAG CCTCGGCGGA CCTTCTGGTT CTGCTGCTTT AAAAGCGGCA GTTGATAAAG	840
	CCGTTGCATC CGGCGTCGTA GTCGTTGCGG CAGCCGGTAA CGAAGGCACT TCCGGCAGCT	900
30	CAAGCACAGT GGGCTACCCT GGTAAATACC CTTCTGTCAT TGCAGTAGGC GCTGTTGACA	960
	GCAGCAACCA AAGAGCATCT TTCTCAAGCG TAGGACCTGA GCTTGATGTC ATGGCACCTG	1020
	GCGTATCTAT CCAAAGCACG CTTCTGGAA ACAATAACGG GGCGTACAAC GGTACGTCAA	1080
35	TGGCATCTCC GCACGTTGCC GGAGCGGCTG CTTTGATTCT TTCTAAGCAC CCGAACTGGA	1140
	CAAACTCA AGTCCGCAGC AGTTTAGAAA ACACCACTAC AAAACTTGGT GATTCTTTGT	1200
	ACTATGGAAA AGGGCTGATC AACGTACAAG CGGCAGCTCA GTAAAACATA AAAAACCGGC	1260
40	CTTGGCCCCG CCGGTTTTTT ATTATTTTTC TTCCTCCGCA TGTTCAATCC GCTCCATAAT	1320
	CGACGGATGG CTCCTCTGA AATTTTAAC GAGAAACGGC GGGTTGACCC GGCTCAGTCC	1380
	CGTAACGGCC AACTCCTGAA ACGTCTCAAT CGCCGCTTCC CGGTTTCCGG TCAGCTCAAT	1440
45	GCCATAACGG TCGGCGGCGT TTTCTGATA CCGGGAGACG GCATTGTA TCGGATC	1497

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 275 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CATENARIEDAD: simple

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:2:

ES 2 273 417 T3

[illegible]

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:3:

55 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 275 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

60 (C) CATENARIEDAD: simple

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

65 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:3:

ES 2 273 417 T3

	Ala Gln Ser Val	Pro Tyr Gly Ile	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 Asn Val	Arg Gly Gly Ala	
	35	40	45		
10	Ser Phe Val Pro	Ser Glu Thr Asn	Pro Tyr Gln Asp	Gly Ser Ser His	
	50	55	60		
	Gly Thr His Val	Ala Gly Thr Ile	Ala Ala Leu Asn	Asn Ser Ile Gly	
	65	70	75	80	
15	Val Leu Gly Val	Ser Pro Ser Ala	Ser Leu Tyr Ala	Val Lys Val Leu	
	85	90	95		
	Asp Ser Thr Gly	Ser Gly Gln Tyr	Ser Trp Ile Ile	Asn Gly Ile Glu	
	100	105	110		
20	Trp Ala Ile Ser	Asn Asn Met Asp	Val Ile Asn Met	Ser Leu Gly Gly	
	115	120	125		
	Pro Thr Gly Ser	Thr Ala Leu Lys	Thr Val Val Asp	Lys Ala Val Ser	
25	130	135	140		
	Ser Gly Ile Val	Val Ala Ala Ala	Gly Asn Glu Gly	Ser Ser Gly	
	145	150	155	160	
	Ser Thr Ser Thr	Val Gly Tyr Pro	Ala Lys Tyr Pro	Ser Thr Ile Ala	
30	165	170	175		
	Val Gly Ala Val	Asn Ser Ser Asn	Gln Arg Ala Ser	Phe Ser Ser Ala	
	180	185	190		
35	Gly Ser Glu Leu	Asp Val Met Ala	Pro Gly Val Ser	Ile Gln Ser Thr	
	195	200	205		
	Leu Pro Gly Gly	Thr Tyr Gly Ala	Tyr Asn Gly Thr	Ser Met Ala Thr	
	210	215	220		
40	Pro His Val Ala	Gly Ala Ala Ala	Leu Ile Leu Ser	Lys His Pro Thr	
	225	230	235	240	
	Trp Thr Asn Ala	Gln Val Arg Asp	Arg Leu Glu Ser	Thr Ala Thr Tyr	
45	245	250	255		
	Leu Gly Asn Ser	Phe Tyr Tyr Gly	Lys Gly Leu Ile	Asn Val Gln Ala	
	260	265	270		
50	Ala Ala Gln				
	275				

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:4:

- | | |
|----|--|
| 55 | (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA: |
| | (A) LONGITUD: 274 aminoácidos |
| | (B) TIPO: aminoácido |
| 60 | (C) CATENARIEDAD: simple |
| | (D) TOPOLOGÍA: lineal |
| | (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína |
| 65 | (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:4: |

ES 2 273 417 T3

	Ala Gln Thr Val Pro Tyr Gly Ile Pro Leu Ile Lys Ala Asp Lys Val
	1 5 10 15
5	Gln Ala Gln Gly Phe Lys Gly Ala Asn Val Lys Val Ala Val Leu Asp
	20 25 30
	Thr Gly Ile Gln Ala Ser His Pro Asp Leu Asn Val Val Gly Gly Ala
	35 40 45
10	Ser Phe Val Ala Gly Glu Ala Tyr Asn Thr Asp Gly Asn Gly His Gly
	50 55 60
	Thr His Val Ala Gly Thr Val Ala Ala Leu Asp Asn Thr Thr Gly Val
	65 70 75 80
15	Leu Gly Val Ala Pro Ser Val Ser Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Asn
	85 90 95
	Ser Ser Gly Ser Gly Ser Tyr Ser Gly Ile Val Ser Gly Ile Glu Trp
	100 105 110
20	Ala Thr Thr Asn Gly Met Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly Ala
	115 120 125
	Ser Gly Ser Thr Ala Met Lys Gln Ala Val Asp Asn Ala Tyr Ala Arg
	130 135 140
25	Gly Val Val Val Val Ala Ala Ala Gly Asn Ser Gly Asn Ser Gly Ser
	145 150 155 160
	Thr Asn Thr Ile Gly Tyr Pro Ala Lys Tyr Asp Ser Val Ile Ala Val
	165 170 175
	Gly Ala Val Asp Ser Asn Ser Asn Arg Ala Ser Phe Ser Ser Val Gly
	180 185 190
35	Ala Glu Leu Glu Val Met Ala Pro Gly Ala Gly Val Tyr Ser Thr Tyr
	195 200 205
	Pro Thr Asn Thr Tyr Ala Thr Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Ser Pro
	210 215 220
40	
	His Val Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lys His Pro Asn Leu
	225 230 235 240
45	Ser Ala Ser Gln Val Arg Asn Arg Leu Ser Ser Thr Ala Thr Tyr Leu
	245 250 255
	Gly Ser Ser Phe Tyr Tyr Gly Lys Gly Leu Ile Asn Val Glu Ala Ala
	260 265 270
50	Ala Gln

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:5:

- 55 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 269 aminoácidos
 - (B) TIPO: aminoácido
 - (C) CATENARIEDAD: simple
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína
- 65 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:5:

ES 2 273 417 T3

1 Ala Gln Ser Val Pro Trp Gly Ile Ser Arg Val Gln Ala Pro Ala Ala
 5 5 10 15
 20 His Asn Arg Gly Leu Thr Gly Ser Gly Val Lys Val Ala Val Leu Asp
 25 30
 35 Thr Gly Ile Ser Thr His Pro Asp Leu Asn Ile Arg Gly Gly Ala Ser
 40 45
 50 Phe Val Pro Gly Glu Pro Ser Thr Gln Asp Gly Asn Gly His Gly Thr
 55 60
 65 His Val Ala Gly Thr Ile Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly Val Leu
 70 75 80
 85 Gly Val Ala Pro Ser Ala Glu Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Gly Ala
 90 95
 100 Ser Gly Ser Gly Ser Val Ser Ser Ile Ala Gln Gly Leu Glu Trp Ala
 105 110
 115 Gly Asn Asn Gly Met His Val Ala Asn Leu Ser Leu Gly Ser Pro Ser
 120 125
 130 Pro Ser Ala Thr Leu Glu Gln Ala Val Asn Ser Ala Thr Ser Arg Gly
 135 140
 145 Val Leu Val Val Ala Ala Ser Gly Asn Ser Gly Ala Gly Ser Ile Ser
 150 155 160
 165 Tyr Pro Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Met Ala Val Gly Ala Thr Asp Gln
 170 175
 180 Asn Asn Asn Arg Ala Ser Phe Ser Gln Tyr Gly Ala Gly Leu Asp Ile
 185 190
 195 Val Ala Pro Gly Val Asn Val Gln Ser Thr Tyr Pro Gly Ser Thr Tyr
 200 205
 210 Ala Ser Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Ala
 215 220
 225 Ala Ala Leu Val Lys Gln Lys Asn Pro Ser Trp Ser Asn Val Gln Ile
 230 235 240
 245 Arg Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr Ser Leu Gly Ser Thr Asn Leu
 250 255
 260 Tyr Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg
 265

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 1140 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CATENARIEDAD: simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) UBICACIÓN: 1..1140

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:6:

ES 2 273 417 T3

	ATG AAG AAA CCG TTG GGG AAA ATT GTC GCA AGC ACC GCA CTA CTC ATT	48
	Met Lys Lys Pro Leu Gly Lys Ile Val Ala Ser Thr Ala Leu Leu Ile	
	1 5 10 15	
5	TCT GTT GCT TTT AGT TCA TCG ATC GCA TCG GCT GCT GAA GAA GCA AAA	96
	Ser Val Ala Phe Ser Ser Ser Ile Ala Ser Ala Ala Glu Glu Ala Lys	
	20 25 30	
10	GAA AAA TAT TTA ATT GGC TTT AAT GAG CAG GAA GCT GTC AGT GAG TTT	144
	Glu Lys Tyr Leu Ile Gly Phe Asn Glu Gln Glu Ala Val Ser Glu Phe	
	35 40 45	
15	GTA GAA CAA GTA GAG GCA AAT GAC GAG GTC GCC ATT CTC TCT GAG GAA	192
	Val Glu Gln Val Glu Ala Asn Asp Glu Val Ala Ile Leu Ser Glu Glu	
	50 55 60	
20	GAG GAA GTC GAA ATT GAA TTG CTT CAT GAA TTT GAA ACG ATT CCT GTT	240
	Glu Glu Val Glu Ile Glu Leu Leu His Glu Phe Glu Thr Ile Pro Val	
	65 70 75 80	
25	TTA TCC GTT GAG TTA AGC CCA GAA GAT GTG GAC GCG CTT GAA CTC GAT	288
	Leu Ser Val Glu Leu Ser Pro Glu Asp Val Asp Ala Leu Glu Leu Asp	
	85 90 95	
30		
35		
40		
45		
50		
55		
60		
65		

ES 2 273 417 T3

	CCA GCG ATT TCT TAT ATT GAA GAG GAT GCA GAA GTA ACG ACA ATG GCG Pro Ala Ile Ser Tyr Ile Glu Glu Asp Ala Glu Val Thr Thr Met Ala 100 105 110	336
5	CAA TCA GTG CCA TGG GGA ATT AGC CGT GTG CAA GCC CCA GCT GCC CAT Gln Ser Val Pro Trp Gly Ile Ser Arg Val Gln Ala Pro Ala Ala His 115 120 125	384
10	AAC CGT GGA TTG ACA GGT TCT GGT GTA AAA GTT GCT GTC CTC GAT ACA Asn Arg Gly Leu Thr Gly Ser Gly Val Lys Val Ala Val Leu Asp Thr 130 135 140	432
15	GGT ATT TCC ACT CAT CCA GAC TTA AAT ATT CGT GGT GGC GCT AGC TTT Gly Ile Ser Thr His Pro Asp Leu Asn Ile Arg Gly Gly Ala Ser Phe 145 150 155 160	480
	GTA CCA GGG GAA CCA TCC ACT CAA GAT GGG AAT GGG CAT GGC ACG CAT Val Pro Gly Glu Pro Ser Thr Gln Asp Gly Asn Gly His Gly Thr His 165 170 175	528
20	GTG GCC GGG ACG ATT GCT GCT TTA AAC AAT TCG ATT GGC GTT CTT GGC Val Ala Gly Thr Ile Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly Val Leu Gly 180 185 190	576
25	GTA GCG CCG AGC GCG GAA CTA TAC GCT GTT AAA GTA TTA GGG GCG AGC Val Ala Pro Ser Ala Glu Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Gly Ala Ser 195 200 205	624
30	GGT TCA GGT TCG GTC AGC TCG ATT GCC CAA GGA TTG GAA TGG GCA GGG Gly Ser Gly Ser Val Ser Ile Ala Gln Gly Leu Glu Trp Ala Gly 210 215 220	672
	AAC AAT GGC ATG CAC GTT GCT AAT TTG AGT TTA GGA AGC CCT TCG CCA Asn Asn Gly Met His Val Ala Asn Leu Ser Leu Gly Ser Pro Ser Pro 225 230 235 240	720
35	AGT GCC ACA CTT GAG CAA GCT GTT AAT AGC GCG ACT TCT AGA GGC GTT Ser Ala Thr Leu Glu Gln Ala Val Asn Ser Ala Thr Ser Arg Gly Val 245 250 255	768
40	CTT GTT GTA GCG GCA TCT GGG AAT TCA GGT GCA GGC TCA ATC AGC TAT Leu Val Val Ala Ala Ser Gly Asn Ser Gly Ala Gly Ser Ile Ser Tyr 260 265 270	816
	CCG GCC CGT TAT GCG AAC GCA ATG GCA GTC GGA GCT ACT GAC CAA AAC Pro Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Met Ala Val Gly Ala Thr Asp Gln Asn 275 280 285	864
45	AAC AAC CGC GCC AGC TTT TCA CAG TAT GGC GCA GGG CTT GAC ATT GTC Asn Asn Arg Ala Ser Phe Ser Gln Tyr Gly Ala Gly Leu Asp Ile Val 290 295 300	912
50	GCA CCA GGT GTA AAC GTG CAG AGC ACA TAC CCA GGT TCA ACG TAT GCC Ala Pro Gly Val Asn Val Gln Ser Thr Tyr Pro Gly Ser Thr Tyr Ala 305 310 315 320	960
55	AGC TTA AAC GGT ACA TCG ATG GCT ACT CCT CAT GTT GCA GGT GCA GCA Ser Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Ala Ala 325 330 335	1008
60	GCC CTT GTT AAA CAA AAG AAC CCA TCT TGG TCC AAT GTA CAA ATC CGC Ala Leu Val Lys Gln Lys Asn Pro Ser Trp Ser Asn Val Gln Ile Arg 340 345 350	1056
	AAT CAT CTA AAG AAT ACG GCA ACG AGC TTA GGA AGC ACG AAC TTG TAT Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr Ser Leu Gly Ser Thr Asn Leu Tyr 355 360 365	1104
65	GGA AGC GGA CTT GTC AAT GCA GAA GCG GCA ACA CGC Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg 370 375 380	1140

ES 2 273 417 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 380 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:7:

```

Met Lys Lys Pro Leu Gly Lys Ile Val Ala Ser Thr Ala Leu Leu Ile
 1           5           10           15

Ser Val Ala Phe Ser Ser Ser Ile Ala Ser Ala Ala Glu Glu Ala Lys
 20           25           30

Glu Lys Tyr Leu Ile Gly Phe Asn Glu Gln Glu Ala Val Ser Glu Phe
 35           40           45

Val Glu Gln Val Glu Ala Asn Asp Glu Val Ala Ile Leu Ser Glu Glu
 50           55           60

Glu Glu Val Glu Ile Glu Leu Leu His Glu Phe Glu Thr Ile Pro Val
 65           70           75           80

Leu Ser Val Glu Leu Ser Pro Glu Asp Val Asp Ala Leu Glu Leu Asp
 85           90           95

Pro Ala Ile Ser Tyr Ile Glu Glu Asp Ala Glu Val Thr Thr Met Ala
100           105           110

Gln Ser Val Pro Trp Gly Ile Ser Arg Val Gln Ala Pro Ala Ala His
115           120           125

Asn Arg Gly Leu Thr Gly Ser Gly Val Lys Val Ala Val Leu Asp Thr
130           135           140

Gly Ile Ser Thr His Pro Asp Leu Asn Ile Arg Gly Gly Ala Ser Phe
145           150           155           160

Val Pro Gly Glu Pro Ser Thr Gln Asp Gly Asn Gly His Gly Thr His
165           170           175

Val Ala Gly Thr Ile Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly Val Leu Gly
180           185           190

```

ES 2 273 417 T3

Val Ala Pro Ser Ala Glu Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Gly Ala Ser
 195 200 205
 Gly Ser Gly Ser Val Ser Ser Ile Ala Gln Gly Leu Glu Trp Ala Gly
 210 215 220
 Asn Asn Gly Met His Val Ala Asn Leu Ser Leu Gly Ser Pro Ser Pro
 225 230 235 240
 Ser Ala Thr Leu Glu Gln Ala Val Asn Ser Ala Thr Ser Arg Gly Val
 245 250 255
 Leu Val Val Ala Ala Ser Gly Asn Ser Gly Ala Gly Ser Ile Ser Tyr
 260 265 270
 Pro Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Met Ala Val Gly Ala Thr Asp Gln Asn
 275 280 285
 Asn Asn Arg Ala Ser Phe Ser Gln Tyr Gly Ala Gly Leu Asp Ile Val
 290 295 300
 Ala Pro Gly Val Asn Val Gln Ser Thr Tyr Pro Gly Ser Thr Tyr Ala
 305 310 315 320
 Ser Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Ala Ala
 325 330 335
 Ala Leu Val Lys Gln Lys Asn Pro Ser Trp Ser Asn Val Gln Ile Arg
 340 345 350
 Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr Ser Leu Gly Ser Thr Asn Leu Tyr
 355 360 365
 Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg
 370 375 380

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 1140 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CATENARIEDAD: simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) UBICACIÓN: 1..1140

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: péptido_mat
- (B) UBICACIÓN: 334..1140

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:8:

ATG AAG AAA CCG TTG GGG AAA ATT GTC GCA AGC ACC GCA CTA CTC ATT
 Met Lys Lys Pro Leu Gly Lys Ile Val Ala Ser Thr Ala Leu Leu Ile
 -111-110 -105 -100

48

ES 2 273 417 T3

	TCT GTT GCT TTT AGT TCA TCG ATC GCA TCG GCT GCT GAA GAA GCA AAA	96
	Ser Val Ala Phe Ser Ser Ser Ile Ala Ser Ala Ala Glu Glu Ala Lys	
	-95 -90 -85 -80	
5	GAA AAA TAT TTA ATT GGC TTT AAT GAG CAG GAA GCT GTC AGT GAG TTT	144
	Glu Lys Tyr Leu Ile Gly Phe Asn Glu Gln Glu Ala Val Ser Glu Phe	
	-75 -70 -65	
10	GTA GAA CAA GTA GAG GCA AAT GAC GAG GTC GCC ATT CTC TCT GAG GAA	192
	Val Glu Gln Val Glu Ala Asn Asp Glu Val Ala Ile Leu Ser Glu Glu	
	-60 -55 -50	
15	GAG GAA GTC GAA ATT GAA TTG CTT CAT GAA TTT GAA ACG ATT CCT GTT	240
	Glu Glu Val Glu Ile Glu Leu Leu His Glu Phe Glu Thr Ile Pro Val	
	-45 -40 -35	
20	TTA TCC GTT GAG TTA AGC CCA GAA GAT GTG GAC GCG CTT GAA CTC GAT	288
	Leu Ser Val Glu Leu Ser Pro Glu Asp Val Asp Ala Leu Glu Leu Asp	
	-30 -25 -20	
25	CCA GCG ATT TCT TAT ATT GAA GAG GAT GCA GAA GTA ACG ACA ATG GCG	336
	Pro Ala Ile Ser Tyr Ile Glu Glu Asp Ala Glu Val Thr Thr Met Ala	
	-15 -10 -5 1	
30	CAA TCA GTG CCA TGG GGA ATT AGC CGT GTG CAA GCC CCA GCT GCC CAT	384
	Gln Ser Val Pro Trp Gly Ile Ser Arg Val Gln Ala Pro Ala Ala His	
	5 10 15	
35	AAC CGT GGA TTG ACA GGT TCT GGT GTA AAA GTT GCT GTC CTC GAT ACA	432
	Asn Arg Gly Leu Thr Gly Ser Gly Val Lys Val Ala Val Leu Asp Thr	
	20 25 30	
40	GGT ATT TCC ACT CAT CCA GAC TTA AAT ATT CGT GGT GGC GCT AGC TTT	480
	Gly Ile Ser Thr His Pro Asp Leu Asn Ile Arg Gly Gly Ala Ser Phe	
	35 40 45	
45	GTA CCA GGG GAA CCA TCC ACT CAA GAT GGG AAT GGG CAT GGC ACG CAT	528
	Val Pro Gly Glu Pro Ser Thr Gln Asp Gly Asn Gly His Gly Thr His	
	50 55 60 65	
50	GTG GCC GGG ACG ATT GCT GCT TTA GAC AAC TCG ATT GGC GTT CTT GGC	576
	Val Ala Gly Thr Ile Ala Ala Leu Asp Asn Ser Ile Gly Val Leu Gly	
	70 75 80	
55	GTA GCG CCG AGC GCG GAA CTA TAC GCT GTT AAA GTA TTA GGG GCG AGC	624
	Val Ala Pro Ser Ala Glu Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Gly Ala Ser	
	85 90 95	
60	GGT TCA GGC GCC ATC AGC TCG ATT GCC CAA GGA TTG GAA TGG GCA GGG	672
	Gly Ser Gly Ala Ile Ser Ser Ile Ala Gln Gly Leu Glu Trp Ala Gly	
	100 105 110	
65	AAC AAT GGC ATG CAC GTT GCT AAT TTG AGT TTA GGA AGC CCT TCG CCA	720
	Asn Asn Gly Met His Val Ala Asn Leu Ser Leu Gly Ser Pro Ser Pro	
	115 120 125	
70	AGT GCC ACA CTT GAG CAA GCT GTT AAT AGC GCG ACT TCT AGA GGC GTT	768
	Ser Ala Thr Leu Glu Gln Ala Val Asn Ser Ala Thr Ser Arg Gly Val	
	130 135 140 145	

ES 2 273 417 T3

	CTT GTT GTA GCG GCA TCT GGG AAT GAA GGT GCA GGC TCA ATC GAC TAT	816
	Leu Val Val Ala Ala Ser Gly Asn Glu Gly Ala Gly Ser Ile Asp Tyr	
	150 155 160	
5	CCG GCC CGT TAT GCG AAC GCA ATG GCA GTC GGA GCT ACT GAC CAA AAC	864
	Pro Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Met Ala Val Gly Ala Thr Asp Gln Asn	
	165 170 175	
10	AAC AAC CGC GCC AGC TTT TCA CAG TAT GGC GCA GGG CTT GAC ATT GTC	912
	Asn Asn Arg Ala Ser Phe Ser Gln Tyr Gly Ala Gly Leu Asp Ile Val	
	180 185 190	
15	GCA CCA GGT GTA AAC GTG CAG AGC ACA TAC CCA ATT TCA ACG TAT GCC	960
	Ala Pro Gly Val Asn Val Gln Ser Thr Tyr Pro Ile Ser Thr Tyr Ala	
	195 200 205	
20	AGC TTA AAC GGT ACA TCG ATG GCT ACT CCT CAT GTT GCA GGT GCA GCA	1008
	Ser Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Ala Ala	
	210 215 220 225	
25	GCC CTT GTT AAA CAA AAG AAC CCA TCT TGG TCC AAT GTA CAA ATC CGC	1056
	Ala Leu Val Lys Gln Lys Asn Pro Ser Trp Ser Asn Val Gln Ile Arg	
	230 235 240	
30	AAT CAT CTA AAG AAT ACG GCA ACG AGC TTA GGA AGC ACG AAC TTG TAT	1104
	Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr Ser Leu Gly Ser Thr Asn Leu Tyr	
	245 250 255	
35	GGA AGC GGA CTT GTC AAT GCA GAA GCG GCA ACA CGC	1140
	Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg	
	260 265	

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 380 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:9:

45	Met Lys Lys Pro Leu Gly Lys Ile Val Ala Ser Thr Ala Leu Leu Ile	-111 -110 -105 -100
	Ser Val Ala Phe Ser Ser Ser Ile Ala Ser Ala Ala Glu Glu Ala Lys	-95 -90 -85 -80
50	Glu Lys Tyr Leu Ile Gly Phe Asn Glu Gln Glu Ala Val Ser Glu Phe	-75 -70 -65
	Val Glu Gln Val Glu Ala Asn Asp Glu Val Ala Ile Leu Ser Glu Glu	-60 -55 -50
55	Glu Glu Val Glu Ile Glu Leu Leu His Glu Phe Glu Thr Ile Pro Val	-45 -40 -35
60	Leu Ser Val Glu Leu Ser Pro Glu Asp Val Asp Ala Leu Glu Leu Asp	-30 -25 -20

ES 2 273 417 T3

	Pro	Ala	Ile	Ser	Tyr	Ile	Glu	Glu	Asp	Ala	Glu	Val	Thr	Thr	Met	Ala	
	-15					-10					-5					1	
5	Gln	Ser	Val	Pro	Trp	Gly	Ile	Ser	Arg	Val	Gln	Ala	Pro	Ala	Ala	His	
				5					10					15			
	Asn	Arg	Gly	Leu	Thr	Gly	Ser	Gly	Val	Lys	Val	Ala	Val	Leu	Asp	Thr	
			20					25					30				
10	Gly	Ile	Ser	Thr	His	Pro	Asp	Leu	Asn	Ile	Arg	Gly	Gly	Ala	Ser	Phe	
		35					40					45					
	Val	Pro	Gly	Glu	Pro	Ser	Thr	Gln	Asp	Gly	Asn	Gly	His	Gly	Thr	His	
		50				55					60					65	
15	Val	Ala	Gly	Thr	Ile	Ala	Ala	Leu	Asp	Asn	Ser	Ile	Gly	Val	Leu	Gly	
					70					75					80		
	Val	Ala	Pro	Ser	Ala	Glu	Leu	Tyr	Ala	Val	Lys	Val	Leu	Gly	Ala	Ser	
				85					90					95			
20	Gly	Ser	Gly	Ala	Ile	Ser	Ser	Ile	Ala	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ala	Gly	
			100				105						110				
	Asn	Asn	Gly	Met	His	Val	Ala	Asn	Leu	Ser	Leu	Gly	Ser	Pro	Ser	Pro	
25			115				120					125					
	Ser	Ala	Thr	Leu	Glu	Gln	Ala	Val	Asn	Ser	Ala	Thr	Ser	Arg	Gly	Val	
		130				135					140					145	
	Leu	Val	Val	Ala	Ala	Ser	Gly	Asn	Glu	Gly	Ala	Gly	Ser	Ile	Asp	Tyr	
30				150					155						160		
	Pro	Ala	Arg	Tyr	Ala	Asn	Ala	Met	Ala	Val	Gly	Ala	Thr	Asp	Gln	Asn	
				165				170						175			
35	Asn	Asn	Arg	Ala	Ser	Phe	Ser	Gln	Tyr	Gly	Ala	Gly	Leu	Asp	Ile	Val	
			180				185						190				
	Ala	Pro	Gly	Val	Asn	Val	Gln	Ser	Thr	Tyr	Pro	Ile	Ser	Thr	Tyr	Ala	
		195				200					205						
40	Ser	Leu	Asn	Gly	Thr	Ser	Met	Ala	Thr	Pro	His	Val	Ala	Gly	Ala	Ala	
		210				215					220					225	
	Ala	Leu	Val	Lys	Gln	Lys	Asn	Pro	Ser	Trp	Ser	Asn	Val	Gln	Ile	Arg	
45				230					235					240			
	Asn	His	Leu	Lys	Asn	Thr	Ala	Thr	Ser	Leu	Gly	Ser	Thr	Asn	Leu	Tyr	
				245				250						255			
50	Gly	Ser	Gly	Leu	Val	Asn	Ala	Glu	Ala	Ala	Thr	Arg					
			260				265										