

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 807 603**

51 Int. Cl.:

<b>C07K 5/08</b>	(2006.01)	<b>C07K 5/09</b>	(2006.01)
<b>C07K 5/10</b>	(2006.01)		
<b>C07K 2/00</b>	(2006.01)		
<b>C11D 3/386</b>	(2006.01)		
<b>C07K 5/117</b>	(2006.01)		
<b>C07K 5/103</b>	(2006.01)		
<b>C07K 5/107</b>	(2006.01)		
<b>C07K 5/083</b>	(2006.01)		
<b>C12N 9/54</b>	(2006.01)		
<b>C12N 9/96</b>	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.03.2009 PCT/EP2009/053580**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **01.10.2009 WO09118375**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.03.2009 E 09724752 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020 EP 2271660**

54 Título: **Composiciones enzimáticas líquidas estabilizadas**

30 Prioridad:

**26.03.2008 EP 08153299**

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

**23.02.2021**

73 Titular/es:

**NOVOZYMES A/S (100.0%)  
Krogshøjvej 36  
2880 Bagsvaerd, DK**

72 Inventor/es:

**NIELSEN, LONE KIERSTEIN;  
FRIIS, ESBEN PETER;  
KNOETZEL, JUERGEN CARSTEN FRANZ;  
SIMONSEN, OLE;  
SOERENSEN, LOTTE RUGHOLM y  
MIKKELSEN, LISE MUNCH**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

ES 2 807 603 T3

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

**DESCRIPCIÓN**

Composiciones enzimáticas líquidas estabilizadas

**CAMPO DE LA INVENCION**

5 [0001] La presente invención se refiere a una composición líquida que comprende una subtilisina y un compuesto peptídico como un estabilizador para la subtilisina. También se refiere a un compuesto peptídico que es útil como estabilizador para las subtilisinas.

**ESTADO DE LA TÉCNICA**

10 [0002] Las proteasas de tipo subtilisina son bien conocidas en los detergentes acuosos líquidos, particularmente para usar en el lavado de ropa. Un problema generalmente encontrado en tales detergentes líquidos es la degradación por la subtilisina de otras enzimas de la composición y de la propia subtilisina. Consecuentemente, se reduce la estabilidad de la subtilisina y otras enzimas de la composición detergente líquida, dando como resultado un detergente líquido con un rendimiento de lavado reducido.

15 [0003] El estado de la técnica ha tratado extensamente con la mejora de la estabilidad de almacenamiento de las enzimas en los detergentes líquidos, por ejemplo, añadiendo varios inhibidores o estabilizadores de subtilisina. Se sabe que el ácido bórico y los ácidos borónicos inhiben reversiblemente las enzimas proteolíticas.

20 [0004] El uso de aldehídos peptídicos para estabilizar ciertas proteasas en detergentes líquidos se describe en la WO 94/04651, la WO 98/13458, la WO 98/13459, la WO 98/13460 y la WO 98/13462. Más específicamente, la WO94/04651 divulga el uso de los aldehídos peptídicos Phe-Gly-Ala-PheH y Phe-Gly-Ala-LeuH para estabilizar proteasas de tipo subtilisina. La WO94/04651 divulga también Leu-Leu-TyrH como un aldehído peptídico adecuado para estabilizar proteasas de tipo quimotripsina. Además, la WO94/04651 propone el metilcarbamato o la metilurea como un grupo protector N-terminal de los aldehídos peptídicos. La WO98/13460 divulga el uso de inhibidores de proteasas peptídicos, ya sea aldehídos o trifluorometilcetonas peptídicos, donde la cadena peptídica contiene 2-5 aminoácidos y el aldehído/la trifluorometilcetona deriva de los aminoácidos alanina, valina, isoleucina, leucina, fenilglicina, fenilalanina u homofenilalanina y donde el grupo de protección N-terminal es preferiblemente una sulfonamida o un amidofosfato.

25

[0005] La WO2007/141736, la WO2007/145963 y la WO2007/145964 revelan el uso de un inhibidor de proteasas peptídico reversible para estabilizar composiciones detergentes líquidas. La US2003/157088 describe composiciones que contienen enzimas estabilizadas con inhibidores.

[0006] La WO 96/41638 y la WO 2005/105826 revelan aldehídos y cetonas peptídicos.

**RESUMEN DE LA INVENCION**

30 [0007] La presente invención está definida por las reivindicaciones. Cualquier cuestión fuera del alcance de las reivindicaciones se proporciona solo como información. Los inventores han descubierto sorprendentemente que ciertos derivados de aldehídos o cetonas peptídicos son particularmente eficientes para estabilizar proteasas de tipo subtilisina en composiciones acuosas tales como detergentes líquidos, incluidos compuestos peptídicos con fenilalanina sustituida con OH como el residuo C-terminal.

35

[0008] Por consiguiente, la invención proporciona una composición líquida que comprende una subtilisina y un compuesto peptídico con la fórmula  $B_2-B_1-B_0-R$  donde:

- R es hidrógeno; y
  - $B_1$  es un residuo de aminoácido de alanina, cisteína, glicina, prolina, serina, treonina, valina, norvalina o norleucina;
- 40

[0009]  $B_0$  es un residuo de Tyr; y  $B_2$  es un único residuo de Gly, Arg o Leu con un grupo de protección N-terminal unido, o dos residuos de aminoácidos que comprenden un grupo de protección N-terminal acetilo (Ac).

[0010] La descripción proporciona además un compuesto peptídico con la fórmula  $B_2-B_1-B_0-R$  donde:

- R es hidrógeno,  $CH_3$ ,  $CX_3$ ,  $CHX_2$  o  $CH_2X$ , donde X es un átomo de halógeno; y

- B<sub>1</sub> es un único residuo de aminoácido.

[0011] B<sub>0</sub> puede ser un residuo de fenilalanina con un sustituyente OH en la posición *p* y/o en una posición *m*; y B<sub>2</sub> puede consistir en uno o más residuos de aminoácidos con benciloxicarbonilo como un grupo de protección N-terminal, o B<sub>2</sub> puede ser un residuo de Gly, Arg o Leu con un grupo de protección N-terminal unido.  
 5 Alternativamente, B<sub>0</sub> puede ser un único residuo de aminoácido, y B<sub>1</sub> puede ser un residuo de aminoácido pequeño, y B<sub>2</sub> puede ser un residuo de Gly, Arg o Leu con un grupo de protección N-terminal aromático unido.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

### Definiciones

[0012] Un "residuo de aminoácido" indica un grupo con una estructura como NH-CHR-CO- escrita con el N-terminal a la izquierda y el C-terminal a la derecha.

[0013] Los residuos de aminoácidos se abrevian usando abreviaturas estándares de una sola letra o de tres letras, incluidas las abreviaturas siguientes: alanina (A), fenilalanina (F), glicina (G), leucina (L), arginina (R), valina (V), triptófano (W), tirosina (Y). La abreviatura "Y-H" denota tirosinal, que significa que el extremo C-terminal del residuo de tirosina se convierte de un grupo carboxílico a un grupo aldehído. El tirosinal se puede preparar por procesos conocidos.

### Aminoácidos

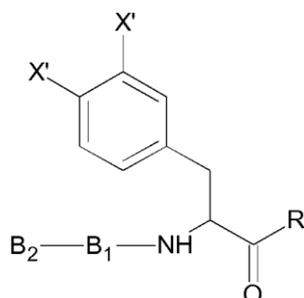
[0014] Cada residuo de aminoácido en B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> puede ser un aminoácido alfa o beta natural o de origen no natural con la estructura -NH-(CH(R))<sub>n</sub>-C(=O)-, donde n = 1-2 (preferiblemente 1) y R se selecciona de estructuras lineales o ramificadas y/o cicladas, sustituidas o no sustituidas de los grupos siguientes: alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>; fenilo; alquilarilo C<sub>7</sub>-C<sub>9</sub>; cicloalquilo C<sub>4</sub>-C<sub>8</sub>. Se incluyen tanto las formas L- como las -D de los aminoácidos.

[0015] El aminoácido puede ser un α-aminoácido tal como cualquiera de los aminoácidos de origen natural norvalina (Nva), norleucina (Nle), homofenilalanina (Hph) o fenilglicina (Pgl). El átomo de carbono α-amino puede estar en la configuración D o L.

### Compuesto peptídico

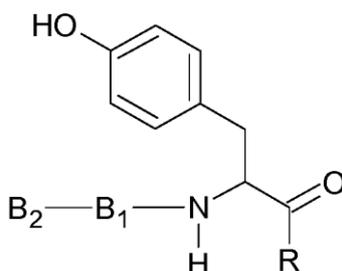
[0016] Una fenilalanina sustituida con OH tal como la tirosina es un aminoácido relativamente hidrófilo y su presencia en un péptido aumentará en general la solubilidad del péptido en comparación con aminoácidos más hidrófobos como la fenilalanina, la leucina, la alanina, la cisteína, la isoleucina, la metionina y la valina, que tienen todos un índice de hidropatía positivo en comparación con el índice de hidropatía negativo de la tirosina (Kyte y Doolittle (1982), J.Mol.Biol. 157 (1), págs. 105-132) (cuanto mayor es el índice de hidropatía, más hidrófobo es el aminoácido).

[0017] El compuesto peptídico puede tener la fórmula:



donde R es hidrógeno, CH<sub>3</sub>, CX<sub>3</sub>, CHX<sub>2</sub> o CH<sub>2</sub>X, donde X es un átomo de halógeno; X' es OH o H, donde al menos una X' es OH; B<sub>1</sub> es un único residuo de aminoácido; y B<sub>2</sub> es uno o más residuos de aminoácidos, donde B<sub>2</sub> comprende opcionalmente un grupo de protección N-terminal.

[0018] Así, B<sub>0</sub> (el residuo de aminoácido en el C-terminal) puede ser un residuo de tirosina (*p*-tirosina), *m*-tirosina o 3,4-dihidroxifenilalanina. Con un residuo de tirosina, el compuesto peptídico tiene la fórmula siguiente:



[0019] En un aspecto particular de la invención, el compuesto peptídico comprende solo 3 residuos de aminoácidos, incluido el residuo C-terminal. En este aspecto de la invención, la síntesis será más rentable y los compuestos han demostrado ser inhibidores altamente eficientes de la actividad enzimática. Preferiblemente, los compuestos peptídicos que tienen solo tres residuos de aminoácidos están protegidos por un grupo de protección N-terminal. Por consiguiente, en este aspecto la invención se refiere a compuestos donde B<sub>2</sub> es un único residuo de aminoácido que incluye un grupo de protección N-terminal.

[0020] En un aspecto preferido de la invención, el compuesto peptídico es un aldehído que comprende solo 3 residuos de aminoácidos, donde B<sub>2</sub> se selecciona entre arginina, glicina y leucina que comprenden un grupo de protección N-terminal. Cuando el compuesto peptídico es un aldehído que comprende solo 3 residuos de aminoácidos, B<sub>2</sub> se selecciona preferiblemente entre arginina y glicina que comprenden un grupo de protección N-terminal.

[0021] En otro aspecto de la invención, el compuesto peptídico comprende al menos cuatro residuos de aminoácidos. Preferiblemente, los compuestos peptídicos que tienen al menos cuatro residuos de aminoácidos están protegidos por un grupo de protección N-terminal. Por consiguiente, en este aspecto la invención se refiere a compuestos donde B<sub>2</sub> es al menos dos residuos de aminoácidos que comprenden un grupo de protección N-terminal.

[0022] En un aspecto preferido, cuando el compuesto peptídico comprende al menos cuatro residuos de aminoácidos, B<sub>2</sub> comprende un residuo de aminoácido N-terminal que tiene una cadena lateral no polar. En una forma de realización más particular, el segundo residuo de aminoácido de B<sub>2</sub>, contado a partir de la unión a B<sub>1</sub>, tiene una cadena lateral no polar. En una forma de realización aún más particular, el compuesto peptídico comprende cuatro residuos de aminoácidos donde el residuo de aminoácido N-terminal que tiene una cadena lateral no polar se selecciona entre glicina, leucina, fenilalanina, tirosina y triptófano. Preferiblemente, el residuo de aminoácido N-terminal comprende además un grupo de protección N-terminal.

[0023] Se prefiere que B<sub>1</sub> sea un residuo de aminoácido pequeño. Más preferiblemente, B<sub>1</sub> es alanina o valina. En este contexto, los siguientes se considera que son aminoácidos pequeños: alanina, cisteína, glicina, prolina, serina, treonina, valina, norvalina, norleucina.

[0024] El compuesto peptídico puede ser un aldehído donde R es hidrógeno, B<sub>1</sub> es un único aminoácido, seleccionado preferiblemente entre aminoácidos pequeños tales como valina y alanina, B<sub>2</sub> comprende al menos dos residuos de aminoácidos y donde al menos uno de dichos dos residuos de aminoácidos se selecciona entre fenilalanina, glicina y leucina, y donde el segundo residuo de aminoácido de B<sub>2</sub> tiene una cadena lateral no polar seleccionada entre fenilalanina, glicina, leucina, tirosina y triptófano. Preferiblemente, B<sub>2</sub> comprende un grupo de protección N-terminal acetilo (Ac), que proporciona, entre otros, los compuestos de aldehído peptídico Ac-FGAY-H, Ac-LGAY-H, Ac-YGAY-H, Ac-FGVY-H y Ac-WLVY-H. Preferiblemente, los compuestos según este aspecto de la invención comprenden menos de 10 residuos de aminoácidos, tal como 9, 8, 7, 6, 5 o, más preferiblemente, 4 residuos de aminoácidos.

[0025] En otro aspecto, el compuesto peptídico puede ser un aldehído tripeptídico donde R es hidrógeno, B<sub>1</sub> es un único aminoácido seleccionado entre aminoácidos pequeños, por ejemplo, valina y alanina, B<sub>2</sub> comprende un residuo de aminoácido seleccionado entre arginina, glicina y leucina. Preferiblemente, B<sup>2</sup> comprende un grupo de protección N-terminal seleccionado entre benciloxicarbonilo (Z) y acetilo (Ac), que proporciona, entre otros, los compuestos de aldehído peptídico Z-RAY-H, Z-GAY-H, Z-RVY-H, Z-LVY-H y Ac-GAY-H. Según este aspecto, el grupo de protección N-terminal benciloxicarbonilo (Z) es el más preferido.

[0026] En un aspecto preferido, donde el compuesto peptídico comprende al menos cuatro residuos de aminoácidos, B<sup>2</sup> comprende un residuo de aminoácido N-terminal con una cadena lateral no polar. En el contexto de la presente invención, por "aminoácidos con cadena lateral no polar" se entiende un aminoácido o residuo de

aminoácido seleccionado del grupo que comprende: fenilalanina, tirosina, triptófano, isoleucina, leucina, metionina, valina, alanina, prolina, glicina, norvalina o norleucina.

5 [0027] Los aldehídos peptídicos particularmente preferidos de la presente invención incluyen Z-RAY-H, Ac-GAY-H, Z-GAY-H, Z-RVY-H, Z-LVY-H, Ac-LGAY-H, Ac-FGAY-H, Ac-YGAY-H, Ac-FGVY-H o Ac-WLVY-H, donde Z es benciloxicarbonilo y Ac es acetilo.

### Grupo protector N-terminal

[0028] El grupo protector N-terminal puede ser cualquier grupo protector aminoterminal que se pueda emplear en la síntesis de péptidos. Gross y Meinhoffer, eds., *The Peptides*, Vol. 3; 3-88 (1981), Academic Press, Nueva York 1981, divulga numerosos grupos protectores de amina adecuados.

10 [0029] Los ejemplos de grupos adecuados incluyen formilo, acetilo, benzoilo, trifluoroacetilo, fluorometoxicarbonilo, metoxisuccinilo, grupos protectores de uretanos aromáticos, tales como, benciloxicarbonilo; y grupos protectores de uretanos alifáticos, tales como *t*-butiloxicarbonilo o adamantiloxicarbonilo, *p*-metoxibencilcarbonilo (MOZ), bencilo (Bn), *p*-metoxibencilo (PMB) o *p*-metoxifenilo (PMP).

15 [0030] Preferiblemente, el grupo de protección N-terminal de la presente invención se selecciona entre formilo, acetilo, benzoilo, uretanos aromáticos o alifáticos, más preferiblemente acetilo o benciloxicarbonilo. Cuando el compuesto peptídico comprende tres aminoácidos, el grupo de protección N-terminal es preferiblemente un uretano aromático o alifático o un grupo de protección N-terminal aromático, particularmente benciloxicarbonilo (Cbz), *p*-metoxibencilcarbonilo (MOZ), bencilo (Bn), *p*-metoxibencilo (PMB) o *p*-metoxifenilo (PMP), más preferiblemente benciloxicarbonilo. Cuando el compuesto peptídico comprende cuatro o más aminoácidos, se prefiere que el grupo  
20 de protección N-terminal sea formilo, acetilo o benzoilo, más preferiblemente acetilo.

### Composición líquida

[0031] En una forma de realización preferida, los compuestos peptídicos de la presente invención se usan para estabilizar o inhibir subtilisinas en composiciones líquidas, que pueden además comprender un tensioactivo y otras enzimas.

25 [0032] En un aspecto, la invención se refiere además al uso de un compuesto tal como se ha definido anteriormente para estabilizar y/o inhibir enzimas, incluida una proteasa de tipo subtilisina. En un aspecto preferido, las enzimas se estabilizan y/o inhiben en detergentes líquidos. La adición del compuesto peptídico al detergente líquido puede aumentar la detergencia.

30 [0033] La composición líquida puede ser una composición enzimática que comprende una subtilisina y opcionalmente una segunda enzima. La segunda enzima puede ser cualquier enzima disponible comercialmente, en particular una enzima seleccionada del grupo que consiste en proteasas, amilasas, lipasas, celulasas, mananasas, oxidoreductasas, liasas y cualquier mezcla de las mismas. También se incluyen mezclas de enzimas de la misma clase (por ejemplo, proteasas). La composición enzimática también puede incluir otros estabilizadores, por ejemplo un poliol tal como glicerol o propilenglicol, por ejemplo en una cantidad de 25-75 % en peso.

35 [0034] La cantidad de enzima usada en la composición líquida varía según el tipo de enzima(s) y el tipo de composición. En una composición tal como un detergente líquido, la cantidad de cada enzima será típicamente 0,04-80 micro-M, en particular 0,2-30 micro-M, especialmente 0,4-20 micro-M (generalmente 1-2000 mg/l, en particular 5-750 mg/l, especialmente 10-500 mg/l), calculada como proteína enzimática pura. En una composición tal como un concentrado enzimático, la cantidad de cada enzima será típicamente 0,01-20 mM, en particular 0,04-  
40 10 mM, especialmente 0,1-5 mM (generalmente 0,3-500 g/l, en particular 1-300 g/l, especialmente 3-150 g/l), calculada como proteína enzimática pura.

[0035] Las enzimas se incorporan normalmente en composiciones detergentes con niveles suficientes para proporcionar un efecto en el lavado, que conocerá la persona experta en la materia. Normalmente esto estaría en el rango de 0,0001 % (p/p) a 5 % (p/p). Las cantidades típicas están en el rango de 0,01 % a 1 % en peso de la  
45 composición detergente líquida. La proporción molar de estabilizador o inhibidor enzimático según la invención respecto a proteasa es al menos 1:1 o 1,5:1 y es inferior a 1000:1, más preferiblemente inferior a 500:1, aún más preferiblemente de 100:1 a 2:1 o de 20:1 a 2:1, o, más preferiblemente, la proporción molar es de 10:1 a 3:1.

[0036] En un aspecto particular, la invención se refiere a una composición que comprende de un 1 a un 95% en peso de tensioactivo(s) detergente(s), de un 0,0001 a un 5% en peso de una subtilisina y de un 0,00001 a un 1% en peso de un inhibidor peptídico tal como se ha definido anteriormente. En una forma de realización más particular,  
50

la invención se refiere a una composición que comprende de un 2 a un 60% en peso de tensioactivo(s) detergente(s), de un 0,0005 a un 1% en peso de una subtilisina y de un 0,00005 a un 0,2% en peso de un inhibidor peptídico tal como se ha definido anteriormente. En una forma de realización aún más particular, la invención se refiere a una composición que comprende de un 3 a un 50% en peso de tensioactivo(s) detergente(s), de un 0,001 a un 0,5% en peso de una subtilisina y de un 0,0001 a un 0,1% en peso de un inhibidor peptídico tal como se ha definido anteriormente.

### Subtilisina

[0037] La subtilisina puede ser de origen animal, vegetal o microbiano, incluidos mutantes modificados química o genéticamente. Puede ser una proteasa serínica, preferiblemente una proteasa microbiana alcalina. Son ejemplos las proteasas de tipo subtilisina del grupo I-S definido por Siezen et al. (Protein Engineering, 1991, vol. 4, n.º 7, págs. 719-737). Ejemplos de subtilisinas son aquellas derivadas de *Bacillus*, por ejemplo, subtilisina Novo, subtilisina Carlsberg, subtilisina BPN', subtilisina 309, subtilisina 147 y subtilisina 168 (descritas en la WO 89/06279). Se describen ejemplos en la WO 1998/020115, la WO 01/44452, la WO 01/58275, la WO 01/58276, la WO 2003/006602 y la WO 2004/099401.

[0038] Los ejemplos de proteasas disponibles comercialmente (peptidasas) incluyen Kannase™, Everlase™, Esperase™, Alcalase™, Neutrase™, Durazym™, Savinase™, Ovozyme™, Liquanase™, Polarzyme™, Pyrase™, tripsina pancreática NOVO (PTN), Bio-Feed™ Pro y Clear-Lens™ Pro (todas disponibles de Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca). Otras proteasas disponibles comercialmente incluyen Ronozyme™ Pro, Maxatase™, Maxacal™, Maxapem™, Opticlean™, Properase™, Purafact™, Purafact Ox™ y Purafact Prime™ (disponibles de Genencor International Inc., Gist-Brocades, BASF o DSM Nutritional Products).

### Segunda enzima

[0039] Además de una subtilisina, la composición líquida puede comprender una segunda enzima seleccionada del grupo que consiste en amilasas, lipasas, celulasas, mananasas, oxidorreductasas y liasas; se prefiere particularmente una composición líquida donde la segunda enzima sea una lipasa.

[0040] Las amilasas adecuadas (alfa y/o beta) incluyen aquellas de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen mutantes modificados química o genéticamente. Las amilasas incluyen, por ejemplo, una alfa-amilasa de *B. licheniformis*, descrita en la GB 1,296,839. Amilasas disponibles comercialmente son Duramyl™, Termamyl™, Stainzyme™, Stainzyme Plus™, Termamyl Ultra™, Fungamyl™ y BAN™ (disponibles de Novozymes A/S) y Rapidase™, Maxamyl P™, Purastar y Purastar OxAm (disponibles de Gist-Brocades y Genencor Inc.).

[0041] Las celulasas adecuadas pueden ser de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen mutantes modificados química o genéticamente. Puede ser una celulasa fúngica de *Humicola insolens* (US 4,435,307) o de *Trichoderma*, por ejemplo *T. reesei* o *T. viride*. Se describen ejemplos de celulasas en la EP 0 495 257. Las celulasas disponibles comercialmente incluyen Carezyme™, Celluzyme™, Celluclean™, Celluclast™ y Endolase™ (disponibles de Novozymes), Puradax, Puradax HA y Puradax EG (disponibles de Genencor).

[0042] Las oxidorreductasas adecuadas incluyen una peroxidasa o una oxidasa tal como una lacasa. Se incluyen mutantes modificados química o genéticamente. La peroxidasa puede ser de origen vegetal, bacteriano o fúngico. Son ejemplos las peroxidasas derivadas de una cepa de *Coprinus*, por ejemplo, *C. cinerius* o *C. macrorhizus*, o de una cepa de *Bacillus*, por ejemplo, *B. pumilus*, particularmente la peroxidasa según la WO 91/05858. Las lacasas adecuadas en este caso incluyen aquellas de origen bacteriano o fúngico. Son ejemplos las lacasas de *Trametes*, por ejemplo, *T. villosa* o *T. versicolor*, o de una cepa de *Coprinus*, por ejemplo, *C. cinereus*, o de una cepa de *Myceliophthora*, por ejemplo, *M. thermophila*.

[0043] Las enzimas lipolíticas adecuadas incluyen una lipasa o una cutinasa de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen mutantes modificados química o genéticamente. Los ejemplos incluyen una lipasa de *Thermomyces lanuginosus* (*Humicola lanuginosa*) descrita en la EP 258 068 y la EP 305 216, una lipasa de *Rhizomucor miehei*, por ejemplo, como se describe en la EP 238 023, una lipasa de *Candida*, tal como una lipasa *C. antarctica*, por ejemplo, la lipasa *C. antarctica* A o B descrita en la EP 214 761, una lipasa de *Fusarium oxysporum* (WO 98/26057), una lipasa de *Pseudomonas* tal como una lipasa de *P. pseudoalcaligenes* y *P. alcaligenes*, por ejemplo, como se describe en la EP 218 272, una lipasa de *P. cepacia*, por ejemplo, como se describe en la EP 331 376, una lipasa de *P. stutzeri*, por ejemplo, como se describe en la BP 1,372,034, una lipasa de *P. fluorescens*, una lipasa de *Bacillus*, por ejemplo, una lipasa de *B. subtilis* (Dartois et al., (1993), Biochemica et Biophysica acta 1131, 253-260), una lipasa de *B. stearothermophilus* (JP 64/744992), una lipasa de *B. pumilus* (WO 91/16422), una lipasa de *Penicillium camembertii* (Yamaguchi et al., (1991), Gene 103, 61-67), la lipasa de *Geotrichum candidum* (Shimada, Y. et al., (1989), J. Biochem. 106, 383-388) y varias lipasas de *Rhizopus*, tales como una lipasa de *R. delemar* (Hass, M.J et al., (1991), Gene 109, 117-113), una lipasa de *R. niveus* (Kugimiya et al., (1992), Biosci. Biotech. Bio-

chem. 56, 716-719) y una lipasa de *R. oryzae*. Ejemplos adicionales son la cutinasa de *Pseudomonas mendocina* (WO 88/09367), la cutinasa de *Fusarium solani pisi* (WO 90/09446) y la cutinasa de *Humicola insolens* (WO 2001/092502). La enzima lipolítica puede ser una variante de lipasa, por ejemplo, como se describe en la WO 2000/060063.

5 [0044] Los ejemplos de lipasas disponibles comercialmente incluyen Lipex™, Lipoprime™, Lipopan™, Lipopan F™, Lipopan Xtra™, Lipolase™, Lipolase™ Ultra, Lipozyme™, Palatase™, Resinase™ □ Novozym™ 435 y Lecitase™ (todas disponibles de Novozymes A/S). Otras lipasas disponibles comercialmente incluyen Lumafast™ (lipasa de *Pseudomonas mendocina* de Genencor International Inc.); Lipomax™ (lipasa de *Ps. pseudoalcaligenes* Gist-Brocades/Genencor Int. Inc.); y las enzimas lipasa de *Bacillus* sp. de Solvay. Hay disponibles lipasas adicionales de otros proveedores, tal como la lipasa P "Amano" (Amano Pharmaceutical Co. Ltd.).

[0045] Las mananastas adecuadas incluyen aquellas de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen mutantes modificados química o genéticamente. Los ejemplos de mananastas disponibles comercialmente incluyen Mannaway™ (producto de Novozymes) y MannaStar (producto de Genencor).

15 [0046] Las liasas adecuadas incluyen aquellas de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen mutantes modificados química o genéticamente. Los ejemplos de liasas incluyen una pectato liasa y una pectina liasa. Ejemplos de liasas disponibles comercialmente son Pectawash™ y Pectaway™ (productos de Novozymes).

[0047] La presente invención se describe adicionalmente mediante los ejemplos siguientes.

**EJEMPLOS**

**Ejemplo 1**

20 [0048] Varios aldehídos peptídicos fueron producidos por una empresa de síntesis personalizada de péptidos, todos con una pureza >80%. Los aldehídos peptídicos se disolvieron en DMSO a una concentración de 10 mg/ml antes de usar.

[0049] Se preparó un detergente líquido modelo para probar los varios estabilizadores:

Base de detergente:

Componente	% p/p
Alquiletoxisulfato de sodio (C9-15, 2EO)	6,0
Dodecibencenosulfonato de sodio	3,0
Toluenosulfonato de sodio	3,0
Ácido oleico	2,0
Alcohol etoxilato primario (C12-15, 7EO)	3,0
Alcohol etoxilato primario (C12-15, 3EO)	2,5
Etanol	0,5
Monopropilenglicol	2,0
Citrato trisódico 2H <sub>2</sub> O	4,0
Trietanolamina	0,4
Agua desionizada	Hasta el 100%
pH ajustado a 8,5 con NaOH	

25 [0050] Se preparó un detergente de referencia con enzimas:

Detergente A:

Componente	% p/p
Base de detergente	99,0
Proteasa (Savinase 16.0 LEX)	0,5
Lipasa (Lipex 100L)	0,5

[0051] Además se prepararon los siguientes detergentes con estabilizadores de la invención, todas las muestras normalizadas respecto a 100 g de detergente:

ID del detergente	Detergente A	Estabilizador (a partir de una solución de 10 mg/ml)	Exceso molar de inhibidor con respecto a la proteasa
B1	100 g	1,3 mg Z-RAY-H	3
B2	100 g	2,2 mg Z-RAY-H	5
B3	100 g	4,4 mg Z-RAY-H	10
C1	100 g	2,8 mg Ac-GAY-H	10
C2	100 g	7,0 mg Ac-GAY-H	25
D1	100 g	1,8 mg Z-GAY-H	5
D2	100 g	3,6 mg Z-GAY-H	10
E1	100 g	1,4 mg Z-RVY-H	3
E2	100 g	2,3 mg Z-RVY-H	5
E3	100 g	4,6 mg Z-RVY-H	10
F1	100 g	1,3 mg Z-LVY-H	3
F2	100 g	2,1 mg Z-LVY-H	5
F3	100 g	4,3 mg Z-LVY-H	10
G1	100 g	1,1 mg Ac-LGAY-H	3
G2	100 g	1,9 mg Ac-LGAY-H	5
G3	100 g	3,7 mg Ac-LGAY-H	10
H1	100 g	0,6 mg Ac-FGAY-H	1,5
H2	100 g	1,2 mg Ac-FGAY-H	3
H3	100 g	2 mg Ac-FGAY-H	5
H4	100 g	4 mg Ac-FGAY-H	10
H5	100 g	10 mg Ac-FGAY-H	25
I1	100 g	1,2 mg Ac-YGAY-H	3
I2	100 g	2,1 mg Ac-YGAY-H	5
I3	100 g	4,2 mg Ac-YGAY-H	10
J1	100 g	1,3 mg Ac-FGVY-H	3
J2	100 g	2,1 mg Ac-FGVY-H	5
J3	100 g	4,3 mg Ac-FGVY-H	10
K1	100 g	1,5 mg Ac-WLVY-H	3
K2	100 g	2,5 mg Ac-WLVY-H	5
K3	100 g	5,1 mg Ac-WLVY-H	10

5 [0052] Los detergentes se colocaron en vasos cerrados a 35°C y 40°C. Se midió la actividad residual de lipasa y proteasa (por comparación con una referencia almacenada a -18°C) en tiempos diferentes, usando métodos analíticos enzimáticos estándares (proteasa medida por hidrólisis de *N,N*-dimetilcaseína a 40°C, pH 8,3, y lipasa medida por hidrólisis de valerato de *p*-nitrofenilo a 40°C, pH 7,7). En la tabla siguiente, 3x denota un exceso molar de 3 del inhibidor en comparación con la proteasa, etc.

Detergente	Actividad residual de proteasa 1 semana 40°C	Actividad residual de lipasa 1 semana 35°C
A (referencia)	11%	3%
B1 (Z-RAY-H, 3x)	49%	12%
B2 (Z-RAY-H, 5x)	69%	37%
B3 (Z-RAY-H, 10x)	79%	63%
C1 (Ac-GAY-H, 10x)	59%	

C2 (Ac-GAY-H, 25x)	73%	62%
D1 (Z-GAY-H, 5x)	55%	22%
D2 (Z-GAY-H, 10x)	77%	49%
E1 (Z-RVY-H, 3x)	54%	21%
E2 (Z-RVY-H, 5x)	67%	36%
E3 (Z-RVY-H, 10x)	80%	61%
F1 (Z-LVY-H, 3x)	32%	7%
F2 (Z-LVY-H, 5x)	43%	15%
F3 (Z-LVY-H, 10x)	59%	33%
G1 (Ac-LGAY-H, 3x)	62%	33%
G2 (Ac-LGAY-H, 5x)	82%	56%
G3 (Ac-LGAY-H, 10x)	90%	66%
H1 (Ac-FGAY-H, 1,5x)	24%	4%
H2 (Ac-FGAY-H, 3x)	42%	12%
H3 (Ac-FGAY-H, 5x)	78%	63%
H4 (Ac-FGAY-H, 10x)	91%	72%
H5 (Ac-FGAY-H, 25x)	93%	72%
I1 (Ac-YGAY-H, 3x)	53%	14%
I2 (Ac-YGAY-H, 5x)	90%	66%
I3 (Ac-YGAY-H, 10x)	88%	75%
J1 (Ac-FGVY-H, 3x)	62%	48%
J2 (Ac-FGVY-H, 5x)	82%	66%
J3 (Ac-FGVY-H, 10x)	96%	70%
K1 (Ac-WLVY-H, 3x)	26%	3%
K2 (Ac-WLVY-H, 5x)	35%	8%
K3 (Ac-WLVY-H, 10x)	53%	18%

[0053] Los resultados demuestran que los aldehídos peptídicos de tirosinal son estabilizadores de proteasa muy eficientes.

### Ejemplo 2

[0054] Se preparó el siguiente detergente de referencia con enzimas:

5

Detergente L:

Componente	% p/p
Base de detergente del ej. 1	98,5
Proteasa (Savinase 16.0 LEX)	0,5
Lipasa (Lipex 100L)	0,5
Amilasa (Stainzyme 12L)	0,5

[0055] Se preparó el detergente siguiente con estabilizador según la invención y se normalizó respecto a 100 g de detergente:

ID del detergente	Detergente L	Estabilizador (a partir de una solución de 10 mg/ml)	Exceso molar de inhibidor con respecto a la proteasa
M	100 g	2 mg Ac-FGAY-H	5

5 [0056] Los detergentes se colocaron en vasos cerrados a 25°C y 35°C. Se midió la actividad residual de lipasa, amilasa y proteasa (por comparación con una referencia almacenada a -18°C) en tiempos diferentes (sem = semanas), usando métodos analíticos enzimáticos estándares (proteasa medida por hidrólisis de *N,N*-dimetilcaseína a 40°C, pH 8,3, lipasa medida por hidrólisis de valerato de *p*-nitrofenilo a 40°C, pH 7,7, y amilasa medida por hidrólisis de 4,6-etiliden-(G<sub>7</sub>) *p*-nitrofenil-(G<sub>1</sub>)- $\alpha$ ,D-maltoheptaósido a 37°C, pH 7,35).

% actividad residual	Actividad residual de proteasa		Actividad residual de lipasa		Actividad residual de amilasa		
	Detergente	4sem35°C	13sem25°C	4sem35°C	13sem25°C	4sem35°C	13sem25°C
L (referencia)		35%	62%	1%	2%	34%	42%
M (Ac-FGAY-H, 5x)		91%	100%	16%	71%	70%	88%

[0057] Se puede observar que el aldehído peptídico de tirosinal mejora significativamente la estabilidad de almacenamiento de la proteasa, la lipasa y la amilasa en un detergente líquido.

### Ejemplo 3

10 [0058] Los aldehídos peptídicos Z-GAF-H, Z-GAL-H y Z-GAY-H fueron producidos por síntesis peptídica, todos con una pureza >80%. Los aldehídos peptídicos se disolvieron en DMSO a una concentración de 10 mg/ml antes de usar.

[0059] Se preparó el siguiente detergente N con enzimas:

Componente	% p/p
Alquiletoxosulfato de sodio (C9-15, 2EO)	20,0
Toluenosulfonato de sodio	3,0
Ácido oleico	4,0
Alcohol etoxilato primario (C12-15, 7EO)	2,5
Alcohol etoxilato primario (C12-15, 3EO)	2,0
Etanol	2,1
Carbonato de sodio	4,5
Citrato trisódico 2H <sub>2</sub> O	5,0
Agua desionizada	Hasta el 99%
pH ajustado a 8,0 con NaOH	
Proteasa (Savinase 16.0 LEX)	0,5
Lipasa (Lipex 100L)	0,5

[0060] Se prepararon los detergentes siguientes con estabilizador y se normalizaron respecto a 100 g de detergente:

ID del detergente	Detergente N	Estabilizador (a partir de una solución de 10 mg/ml)	Exceso molar de inhibidor con respecto a la proteasa
P (referencia)	100 g	ninguno	0
Q1	100 g	0,16 mg Z-GAL-H	0,5
Q2	100 g	0,31 mg Z-GAL-H	1,0
Q3	100 g	0,62 mg Z-GAL-H	2,0
Q4	100 g	1,6 mg Z-GAL-H	5,0
R1	100 g	0,17 mg Z-GAF-H	0,5
R2	100 g	0,34 mg Z-GAF-H	1,0
R3	100 g	0,68 mg Z-GAF-H	2,0
R4	100 g	1,7 mg Z-GAF-H	5,0
S1	100 g	0,18 mg Z-GAY-H	0,5

## ES 2 807 603 T3

S2	100 g	0,35 mg Z-GAY-H	1,0
S3	100 g	0,71 mg Z-GAY-H	2,0
S4	100 g	1,8 mg Z-GAY-H	5,0

[0061] Los detergentes se colocaron en vasos cerrados a 40°C. Se midió la actividad residual de proteasa (por comparación con una referencia almacenada a -18°C) después de 1 semana, usando métodos analíticos enzimáticos estándares (proteasa medida por hidrólisis de *N,N*-dimetilcaseína a 40°C, pH 8,3).

[0062] % de actividad residual de proteasa después de 1 semana a 40°C:

<b>Exceso molar de inhibidor con respecto a la proteasa</b>	<b>Det. N (referencia)</b>	<b>Det. N +Z-GAL-H</b>	<b>Det. N +Z-GAF-H</b>	<b>Det. N +Z-GAY-H</b>
0	7% (P)			
0,5		12% (Q1)	11% (R1)	13% (S1)
1		17% (Q2)	18% (R2)	28% (S2)
2		31% (Q3)	28% (R3)	41% (S3)
5		42% (Q4)	44% (R4)	65% (S4)

- 5 [0063] Los resultados demuestran que los tres aldehídos peptídicos son eficientes para estabilizar la proteasa. El aldehído peptídico de tirosinal Z-GAY-H resultó ser el más eficiente ya que requiere solo aproximadamente la mitad del exceso molar de inhibidor con respecto a la proteasa para alcanzar las mismas actividades residuales que los otros aldehídos peptídicos.

**REIVINDICACIONES**

1. Aldehído peptídico con la fórmula B<sup>2</sup>-B<sup>1</sup>-B<sup>0</sup>-H, donde:
  - H es hidrógeno;
  - B<sup>0</sup> es un residuo de Tyr;
  - 5 B<sup>1</sup> es un residuo de aminoácido de alanina, cisteína, glicina, prolina, serina, treonina, valina, norvalina o norleucina; y
  - B<sup>2</sup> es un único residuo de Gly, Arg o Leu con un grupo de protección N-terminal unido, o dos residuos de aminoácidos que comprenden un grupo de protección N-terminal acetilo (Ac).
2. Aldehído peptídico según la reivindicación 1, donde B<sup>1</sup> es un residuo de Ala o Val.
- 10 3. Aldehído peptídico según la reivindicación 1 o 2, donde B<sup>2</sup> es un único residuo de Gly, Arg o Leu con un grupo de protección N-terminal unido.
4. Aldehído peptídico según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde B<sup>2</sup> es un único residuo con benciloxicarbonilo (Cbz) unido.
- 15 5. Aldehído peptídico según la reivindicación 1 o 2, donde B<sup>2</sup> consiste en dos residuos de aminoácidos que comprenden un grupo de protección N-terminal acetilo (Ac).
6. Aldehído peptídico según la reivindicación 5, donde un residuo en B<sup>2</sup> es Phe, Gly o Leu y el segundo residuo en B<sup>2</sup> es Phe, Gly, Leu, Tyr o Trp.
7. Aldehído peptídico según la reivindicación 1, donde:
  - B<sup>1</sup> es un residuo de Ala o Val; y
  - 20 B<sup>2</sup> es un único residuo de Gly, Arg o Leu con benciloxicarbonilo (Cbz) unido.
8. Aldehído peptídico según la reivindicación 1, donde:
  - B<sup>1</sup> es un residuo de Ala o Val; y
  - B<sup>2</sup> consiste en dos residuos de aminoácidos que comprenden un grupo de protección N-terminal acetilo (Ac), del cual un residuo es Phe, Gly o Leu y el segundo residuo es Phe, Gly, Leu, Tyr o Trp.
- 25 9. Aldehído peptídico con la fórmula Z-RAY-H, Ac-GAY-H, Z-GAY-H, Z-RVY-H, Z-LVY-H, Ac-LGAY-H, Ac-FGAY-H, Ac-YGAY-H, Ac-FGVY-H o Ac-WLVY-H, donde Z es benciloxicarbonilo y Ac es acetilo.
10. Aldehído peptídico según la reivindicación 9, que es Z-RAY-H, Z-GAY-H, Z-RVY-H o Z-LVY-H, donde Z es benciloxicarbonilo.
- 30 11. Composición líquida que comprende una subtilisina y el aldehído peptídico según cualquiera de las reivindicaciones 1-10.
12. Composición líquida según la reivindicación 11, que es una composición detergente líquida que comprende además un tensioactivo.