

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 809 509**

51 Int. Cl.:

C12N 9/54 (2006.01)

C11D 3/386 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.05.2012 PCT/US2012/036503**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.11.2012 WO12151480**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.05.2012 E 12722015 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2020 EP 2705145**

54 Título: **Composiciones y métodos que comprenden variantes de serina proteasa**

30 Prioridad:

05.05.2011 WO PCT/US2011/035319

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

04.03.2021

73 Titular/es:

**THE PROCTER & GAMBLE COMPANY (100.0%)
One Procter & Gamble Plaza
Cincinnati, OH 45202, US**

72 Inventor/es:

**SOUTER, PHILIP, FRANK;
MAGENNIS, EUAN, JOHN;
WARD, GLENN, STEVEN;
AMIN, NEELAM, S.;
AUGUSTYN, KATHERINE;
BASLER, JOSHUA, R.;
CASCÃO-PEREIRA, LUIS, GUSTAVO;
COLLIER, KATHERINE, D.;
CONCAR, EDWARD, M.;
ESTELL, DAVID, A.;
KELLIS, JAMES, T., JR.;
PISARCHIK, ALEXANDER;
POULOSE, AYROOKARAN, JOSEPH y
YAO, JIAN**

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 809 509 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 y métodos que comprenden variantes de serina proteasa

5 **Campo de la invención**

La presente invención proporciona productos de consumo que comprenden una variante de serina proteasa. Específicamente, la presente invención proporciona composiciones que comprenden una variante de serina proteasa que tiene una o más sustituciones en comparación con una serina proteasa de referencia. Además, la presente invención proporciona métodos para fabricar y utilizar dichos productos de consumo. La proteasa puede ser una variante de subtilisina.

Antecedentes de la invención

15 Aunque se sabe que las proteasas proporcionan una buena limpieza de las manchas (tales como sangre), dadas las tendencias de sostenibilidad y del consumidor hacia una disminución de las temperaturas de lavado, continúa creciendo la demanda de detergentes que proporcionan ventajas aceptables para el consumidor y sigue existiendo la necesidad de proporcionar composiciones que proporcionen limpieza y frescura. Aunque las serina proteasas se conocen desde hace mucho tiempo en la técnica de las enzimas industriales, por ejemplo, como se describe en los documentos
20 WO99/20727, WO2004/041979, WO91/00345, WO2009/149200, WO00/37627, WO2011/140364, WO2011/072099, WO2011/140316 y por Tindbaek y col, "Engineering a substrate-specific cold adapted subtilisin" en Protein Engineering, Design and Selection, Vol 17 (2004), páginas 149-156, existe una necesidad de proteasas de diseño que sean adecuadas para condiciones y usos concretos, y los inventores han descubierto que estas pueden ser de utilidad para ayudar a resolver la necesidad continuamente creciente de composiciones de limpieza y/o tratantes eficaces.

25

Resumen de la invención

En una realización, la presente invención incluye una composición de limpieza y/o tratamiento que comprende una variante de subtilisina aislada, en donde dicha variante de subtilisina es una forma madura que tiene una actividad proteolítica y en donde dicha variante de subtilisina tiene al menos 90 % de identidad de aminoácidos con la proteasa subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*, en donde dicha proteasa subtilisina GG36 de *Bacillus lentus* tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la Id. de sec. n.º 2, y en donde dicha variante de subtilisina comprende una secuencia de aminoácidos que comprende una de las combinaciones de sustituciones de aminoácidos seleccionadas de los listados posteriores (Listas 1-3) y en donde las posiciones de aminoácidos de la variante de subtilisina se numeran según la numeración de las correspondientes posiciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* BPN' mostrada en la Id. de sec. n.º 1; y un material adyuvante.

35

En cada realización relacionada anteriormente, la variante tiene limpieza mejorada en comparación con la proteasa GG36 que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la Id. de sec. n.º 2.

40

En algunas realizaciones, la presente invención incluye cualquiera de las variantes anteriores, en donde la carga neta total de la variante es 0, +1, +2, +3, +4, +5, -1, -2, -3, -4, o -5 con respecto a la carga neta total de la proteasa subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*.

45

En algunas realizaciones, la presente invención incluye composiciones que tienen al menos una de las variantes relacionadas anteriormente, en donde dicha composición es un producto para el cuidado de tejidos y del hogar.

En una realización adicional, la presente invención comprende un método para fabricar una composición como se ha descrito anteriormente que comprende obtener al menos una de las variantes relacionadas anteriormente y mezclarla con un material adyuvante o mezclas de los mismos.

50

En una realización adicional, la presente invención comprende un método para tratar una superficie, especialmente un tejido, que comprende poner en contacto la superficie con una solución acuosa que comprende al menos una de las variantes relacionadas anteriormente y un material adyuvante.

55

Breve descripción del listado de secuencias

La Fig. 1 proporciona una alineación de las proteasas de referencia maduras que incluyen: BPN' (Id de sec. n.º 1) y GG36 (Id de sec. n.º 2). Cada posición de aminoácido de cada variante de proteasa, más específicamente las variantes de subtilisina descritas en la presente descripción, incluida cada variante de proteasa de agua fría, está numerada según la numeración de la posición de aminoácido correspondiente en la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* (Id. de sec. n.º 1, que se muestra en la Figura 1, determinada por la alineación de la secuencia de aminoácidos de la variante de proteasa con la secuencia de aminoácidos de la proteasa subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*. Por tanto, salvo que se indique lo contrario en la presente descripción, las posiciones de sustitución se proporcionan con respecto a BPN'.

65

Descripción detallada de la invención

Definiciones

- 5 Salvo que se indique lo contrario, la preparación de la presente invención implica técnicas convencionales usadas comúnmente en biología molecular, ingeniería de proteínas, microbiología y ADN recombinante, que se encuentran dentro del conocimiento de la técnica. Tales técnicas son conocidas por aquellos con experiencia en la técnica y se describen en numerosos textos y trabajos de referencia bien conocidos por aquellos con experiencia en la técnica.
- 10 Salvo que se defina de cualquier otra manera en la presente descripción, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente descripción tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por el experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Los expertos en la técnica conocen muchos diccionarios técnicos. Aunque cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente descripción es útil en la preparación de la presente invención, algunos métodos y materiales adecuados se describen en la presente descripción. Por tanto, los términos inmediatamente definidos a continuación se describen más detalladamente en referencia a la especificación en su totalidad. También, como se usa en la presente descripción, los términos singulares “un”, “una”, “el” y “la” incluyen la referencia en plural salvo que el contexto lo indique claramente de cualquier otra manera. Los intervalos numéricos son inclusivos de los números que definen el intervalo. Salvo que se indique lo contrario, los ácidos nucleicos se escriben de izquierda a derecha, en orientación de 5' a 3'; las secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha en una orientación desde el amino al carboxilo, respectivamente. Debe entenderse que la presente invención no está limitada a la metodología, protocolos y reactivos concretos descritos, ya que estos pueden variar dependiendo del contexto en el que los utilicen los expertos en la técnica.
- 20 La preparación de la presente invención utiliza, salvo que se indique lo contrario, técnicas de purificación de proteínas, biología molecular, microbiología, ADN recombinante y secuenciación de proteínas convencionales, todas ellas comprendidas entre las capacidades de los expertos en la técnica.
- 25 Además, los encabezados proporcionados en la presente descripción no son limitaciones de los diferentes aspectos o realizaciones de la invención que se pueden obtener por referencia a la memoria descriptiva en su conjunto. Por tanto, los términos inmediatamente definidos a continuación se han definido más detalladamente en referencia a la memoria descriptiva en su conjunto. Sin embargo, para facilitar la comprensión de la invención, se han definido a continuación varios elementos.
- 30 Como se usa en la presente descripción, los términos “proteasa” y “proteínasa” se refieren a una proteína enzimática que tiene la capacidad de descomponer otras proteínas. Una proteasa tiene la capacidad de realizar la “proteólisis”, que inicia el catabolismo de la proteína mediante la hidrólisis de los enlaces peptídicos que unen los aminoácidos entre sí en un péptido o cadena polipeptídica que conforman la proteína. Esta actividad de una proteasa como enzima de digestión de proteínas se menciona como “actividad proteolítica”. Existen muchos procedimientos bien conocidos para medir la actividad proteolítica (Véase, p. ej., Kalisz, “Microbial Proteinases,” En: Fiechter (ed.), Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, (1988)). Por ejemplo, la actividad proteolítica puede dilucidarse mediante ensayos comparativos que analizan la capacidad de la proteasa respectiva para hidrolizar un sustrato comercial. Los sustratos ilustrativos útiles para el análisis de la proteasa o de la actividad proteolítica incluyen, pero no se limitan a, dimetil caseína (Sigma C-9801), colágeno bovino (Sigma C-9879), elastina bovina (Sigma E-1625) y queratina bovina (ICN Biomedical 902111). Los ensayos colorimétricos que usan estos sustratos son muy conocidos en la técnica (véase, p. ej., el documento WO 99/34011 y la patente US-6.376.450). El ensayo pNA (Véase, p. ej., Del Mar y col., Anal. Biochem. 99:316-320, [1979]) es también de utilidad para determinar la concentración de enzima activa en las fracciones recogidas durante la elución en gradiente. Este ensayo mide la velocidad a la que se libera p-nitroanilina a medida que la enzima hidroliza el sustrato sintético soluble, succinil-alanina-alanina-prolina-fenilalanina-p-nitroanilida (suc-AAPF-pNA). La velocidad de producción de color amarillo a partir de la reacción hidrolítica se determina a 410 nm en un espectrofotómetro y es proporcional a la concentración de enzimas activas. Además, se utilizan las mediciones de la absorbancia a 280 nanómetros (nm) para determinar la concentración total de proteína. El cociente enzima activa/proteína total proporciona la pureza de la enzima.
- 35 Como se usa en la presente descripción, el término “subtilisina” se refiere a cualquier miembro de la familia de la serina proteasa S8 que se describe en MEROPS - The Peptidase Data base (Véase, Rawlings y col., MEROPS: the peptidase database, Nucl Acids Res, 34 Database issue, D270-272 [2006]). Como se describe en dicho documento, la familia de la peptidasa S8 contiene la serina endopeptidasa subtilisina y sus homólogos (Rawlings y Barrett, Biochem J., 290:205-218, [1993]). La familia S8, también conocida como la familia de las subtilasas, es la segunda familia más grande de serina peptidasas. Se han determinado en la actualidad las estructuras terciarias de algunos miembros de la familia S8. Una estructura típica de una proteína S8 consiste en tres capas con una lámina β de siete hebras intercalada entre dos capas de hélices. La subtilisina (S08.001) es la estructura tipo del clan SB (SB). A pesar de la diferente estructura, los sitios activos de la subtilisina y la quimiotripsina (S01.001) se pueden superponer, lo que sugiere esta similitud es el resultado de una evolución convergente en lugar de divergente.
- 40 Como se usa en la presente descripción, las expresiones “variante de proteasa”, “proteasa variante”, “serina proteasa variante”, “variante de serina proteasa”, “variante de subtilisina”, “proteasa mutante” se utilizan en referencia a proteasas
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

que son similares a una proteasa de referencia (que puede ser una proteasa subtilisina natural), especialmente en su función, pero que tiene mutaciones en su secuencia de aminoácidos que las diferencian en su secuencia de la proteasa natural o de cualquier proteasa de referencia de partida (es decir, proteasa “precursora”) de la que se ha derivado la proteasa variante. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona “variantes de GG36”, (o “variantes de subtilisina GG36”) en donde las mutaciones están presentes en la secuencia de GG36 madura definida en la Id de sec. n.º2. Sin embargo, no se pretende que la proteasa de referencia esté limitada a ninguna secuencia de aminoácidos en particular. Además, se pretende que el término abarque variantes de una proteasa precursora en donde la secuencia de la proteasa precursora es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la Id de sec. n.º2.

Como se usa en la presente descripción, la expresión “variante de proteasa de agua fría” significa una variante de proteasa, más específicamente, variantes de subtilisina de una proteasa precursora, en donde la proteasa subtilisina GG36 de *B. lentus* tiene la secuencia de aminoácidos de la Id de sec. n.º2, en donde dicha variante de proteasa, más específicamente las variantes de subtilisina, tiene una o más de las siguientes características: a) un índice de rendimiento en el Método de ensayo 2 de al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2, de 1,1 a aproximadamente 10, de 1,1 a aproximadamente 8, o incluso de 1,1 a aproximadamente 5; b) un índice de rendimiento en el Método de ensayo 3 de al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2, de 1,1 a aproximadamente 10, de 1,1 a aproximadamente 8 o incluso de 1,1 a aproximadamente 5; c) un índice de rendimiento del método de ensayo 4 de al menos 1,0, al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2, de 1,0 a aproximadamente 10, de 1,0 a aproximadamente 8 o incluso de 1,0 a aproximadamente 5; y/o d) un índice de rendimiento en el Método de ensayo 6 de al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2, de 1,0 a aproximadamente 10, de 1,0 a aproximadamente 8 o incluso de 1,0 a aproximadamente 5; y/o e) índice de rendimiento en el Método de ensayo 7 de al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2, de 1,1 a aproximadamente 15, de 1,1 a aproximadamente 10 o incluso de 1,1 a aproximadamente 7. El Método de ensayo 2, el Método de ensayo 3, el Método de ensayo 4, el Método de ensayo 6 y el Método de ensayo 7 se describen explícitamente más adelante en la sección del Ejemplo 1 titulada “Métodos de ensayo”. Además, se pretende que el término abarque variantes de una proteasa precursora en donde la secuencia de la proteasa precursora es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la Id de sec. n.º2.

En algunas realizaciones de la presente invención, la proteasa precursora de la variante de proteasa (es decir, la proteasa de “referencia” o “de partida”) es una proteasa comercial, incluidas, aunque no de forma limitativa, las proteasas vendidas con los nombres comerciales SAVINASE®, POLARZYME®, KANNASE®, LIQUINASE®, LIQUINASE ULTRA®, SAVINASE ULTRA®, OVOZYME®, (de Novozymes A/S); MAXACAL®, PROPERASE®, PURAFECT®, FN3®, FN4® y PURAFECT OXP®, PURAFECT™, PURAFECT® PRIME, PURAMAX® (de Danisco US, Genencor Division); y las comercializadas por Henkel/ Kemira, concretamente BLAP (secuencia mostrada en la Figura 29 del documento US-5.352.604 con las siguientes mutaciones S99D + S101 R + S103A + V104I + G159S, denominada a continuación en la memoria como BLAP) y BLAP X (BLAP con S3T + V4I + V205I).

Como se usa en la presente descripción, la expresión “polipéptido variante” se refiere a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que difiere en al menos un resto de aminoácido de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido precursor o de referencia (que incluye, aunque no de forma limitativa, polipéptidos naturales).

Como se usa en la presente descripción, “el género *Bacillus*” incluye todas las especies comprendidas dentro del género “*Bacillus*,” tal como conocen los expertos en la técnica, que incluyen aunque no de forma limitativa *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. lentus*, *B. brevis*, *B. stearothermophilus*, *B. alkalophilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. clausii*, *B. halodurans*, *B. megaterium*, *B. coagulans*, *B. circulans*, *B. lautus*, y *B. thuringiensis*. Se reconoce que el género *Bacillus* continúa experimentando una reestructuración taxonómica. Por lo tanto, está previsto que el género incluya especies que se han reclasificado, que incluyen, aunque no de forma limitativa, organismos tales como *B. stearothermophilus*, que ahora se denomina “*Geobacillus stearothermophilus*”. La producción de endosporas resistentes en presencia de oxígeno se considera el rasgo característico del género *Bacillus*, aunque esta característica se aplica también a los géneros recientemente denominados *Alicyclobacillus*, *Amphibacillus*, *Aneurinibacillus*, *Anoxybacillus*, *Brevibacillus*, *Filobacillus*, *Gracilbacillus*, *Halobacillus*, *Paenibacillus*, *Salibacillus*, *Thermobacillus*, *Ureibacillus* y *Virgibacillus*.

Los términos “polinucleótido” y “ácido nucleico”, que se usan indistintamente en la presente descripción, se refieren a un polímero de cualquier longitud de monómeros de nucleótidos unidos covalentemente en una cadena. El ADN (ácido desoxirribonucleico), un polinucleótido que comprende desoxirribonucleótidos, y el ARN (ácido ribonucleico), un polímero de ribonucleótidos, son ejemplos de polinucleótidos o ácidos nucleicos que tienen una función biológica distintiva. Los polinucleótidos o ácidos nucleicos incluyen, pero no se limitan a, un ADN monocatenario, bicatenario o tricatenario, ADN genómico, ADNc, ARN, híbrido ADN-ARN o un polímero que comprende bases purina y pirimidina, u otras bases nucleotídicas naturales, modificadas química o bioquímicamente, no naturales o derivatizadas. Los siguientes son ejemplos no limitantes de polinucleótidos: genes, fragmentos de genes, fragmentos cromosómicos, etiqueta(s) de secuencia expresada (EST), exones, intrones, ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia (ARNt), ARN ribosómico (ARNr), ribozimas, ADN complementario (ADNc), polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos

ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácido nucleico e iniciadores. En algunas realizaciones, los polinucleótidos comprenden nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y análogos de nucleótidos, uracilo, otros azúcares y grupos de unión tales como fluororribosa y tioato, y ramas de nucleótidos. En una realización particular, una secuencia de nucleótidos está interrumpida por componentes no nucleotídicos.

Como se usa en la presente descripción, el término “mutación” se refiere a los cambios realizados en un aminoácido o secuencia de ácidos nucleicos de partida. Se prevé que el término abarca sustituciones, inserciones y deleciones.

Como se usa en la presente descripción, el término “vector” se refiere a una construcción de ácido nucleico usada para introducir o transferir ácido(s) nucleico(s) o polinucleótido(s) a una célula o tejido objetivo. Se usa típicamente un vector para introducir ADN extraño en otra célula o tejido. Un vector comprende generalmente una secuencia de ADN que es un transgén y una secuencia de polinucleótido más grande que sirve como “cadena principal” del vector. El vector sirve típicamente para transferir información genética, tal como el transgén insertado, a una célula o tejido objetivo para aislar, multiplicar o expresar la inserción en la célula o tejido objetivo. Los vectores incluyen plásmidos, vectores de clonación, bacteriófagos, virus (p. ej., vectores víricos), cósmidos, vectores de expresión, vectores lanzadera y similares. Un vector incluye, típicamente, un origen de replicación, un sitio de multiclonación y un marcador seleccionable. Típicamente, el término transfección se usa para hacer referencia al proceso de insertar un vector en una célula objetivo. Típicamente, la transfección de una célula con un vector vírico se denomina transducción. La presente invención incluye, en algunas realizaciones, un vector que comprende una secuencia de ADN que codifica una proteasa variante (p. ej., una proteasa variante precursora o madura) que está operativamente unida a una prosequencia adecuada (p. ej., secretora, secuencia de un péptido señal, etc.) que puede efectuar la expresión de la secuencia del ADN en un hospedador adecuado.

Como se usa en la presente descripción, las expresiones “casete de expresión”, “plásmido de expresión” o “vector de expresión” se refieren a una construcción de ácido nucleico o vector generado de forma recombinante o sintética para la expresión de un ácido nucleico de interés (p. ej., un ácido nucleico extraño) en una célula objetivo. El ácido nucleico de interés expresa de forma típica una proteína de interés. Un vector de expresión o casete de expresión comprende, típicamente, una secuencia de nucleótidos promotora que dirige o fomenta la expresión del ácido nucleico extraño. Además, el vector o casete de expresión incluye, típicamente, cualquier otro elemento de ácido nucleico especificado que permite la transcripción de un ácido nucleico particular en una célula objetivo. Un casete de expresión recombinante se puede incorporar en un plásmido, cromosoma, ADN mitocondrial, ADN plásmido, virus o fragmento de ácido nucleico. Algunos vectores de expresión tienen la capacidad de incorporar y expresar fragmentos de ADN heterólogo en una célula hospedadora. Muchos vectores de expresión procariotas y eucariotas están disponibles comercialmente. La selección de los vectores de expresión adecuados está comprendida en las capacidades de los expertos en la técnica. La selección de los vectores de expresión adecuados para la expresión de una proteína a partir de una secuencia de ácidos nucleicos incorporada al vector de expresión está comprendida entre las capacidades de los expertos en la técnica.

Una construcción de ADN es un segmento de ácido nucleico construido artificialmente que se puede introducir en una célula o tejido objetivo. Una construcción de ADN comprende típicamente una inserción de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de interés que se ha subclonado en un vector. El vector puede contener genes de resistencia a bacterias para el crecimiento en bacterias y un promotor para mejorar la expresión de la proteína de interés en un organismo. El ADN se puede generar *in vitro* mediante la PCR o cualesquiera otras técnicas adecuadas conocidas por los expertos en la técnica. En algunas realizaciones, la construcción de ADN comprende una secuencia de ácidos nucleicos de interés. En algunas realizaciones, la secuencia está operativamente unida a elementos adicionales tales como elementos de control (p. ej., promotores, etc.). La construcción de ADN puede también comprender un marcador de selección y puede también comprender una secuencia de llegada flanqueada por secuencias de homología. La construcción puede comprender otras secuencias no homólogas, agregadas a los extremos (p. ej., secuencias embutidoras o flancos). En algunas realizaciones, los extremos de la secuencia están cerrados de forma que la construcción de ADN forma un círculo cerrado. La secuencia de ácidos nucleicos de interés, que se ha incorporado a la construcción de ADN usando técnicas bien conocidas en la técnica, puede ser un ácido nucleico natural, mutante o modificado. En algunas realizaciones, la construcción de ADN comprende una o más secuencias de ácidos nucleicos que son homólogas del cromosoma de la célula hospedadora. En otras realizaciones, la construcción de ADN comprende una o más secuencias de nucleótidos no homólogas. Una vez que la construcción de ADN se ha ensamblado *in vitro*, se puede usar, por ejemplo, para: 1) insertar secuencias heterólogas dentro de una secuencia objetivo deseada de una célula hospedadora; y/o 2) mutagenizar una región del cromosoma del célula hospedadora (es decir, sustituir una secuencia endógena por una secuencia heteróloga); 3) eliminar genes diana; y/o 4) introducir un plásmido de replicación en el hospedador. “Construcción de ADN” se utiliza indistintamente en la presente descripción con “casete de expresión”:

Como se usa en la presente descripción, un “plásmido” se refiere a una molécula de ADN extracromosómico que tiene la capacidad de replicarse independientemente a partir del ADN cromosómico. Un plásmido es bicatenario (bc) y puede ser circular y se usa, típicamente, como un vector de clonación.

Como se usa en la presente descripción en el contexto de introducir una secuencia de ácido nucleico en una célula, el término “introducida” se refiere a cualquier método adecuado para transferir la secuencia de ácido nucleico a la célula. Dichos métodos de introducción incluyen, aunque no de forma limitativa, fusión de

protoplastos, transfección, transformación, electroporación, conjugación y transducción (véase, p. ej., Ferrari y col., "Genetics," en Hardwood y col. (eds.), Bacillus, Plenum Publishing Corp., pp. 57-72 [1989]).

5 La transformación se refiere a la alteración genética de una célula que resulta de la captación, incorporación genómica y expresión de material genético (p. ej., ADN).

10 Como se usa en la presente descripción, un ácido nucleico se "une operativamente" con otra secuencia de ácido nucleico cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor o intensificador se une operativamente a una secuencia codificante de nucleótidos si el promotor afecta la transcripción de la secuencia codificante. Un sitio de unión al ribosoma puede estar unido operativamente a una secuencia codificante si se encuentra posicionado de manera que facilita la traducción de la secuencia codificante. Típicamente, las secuencias de ADN "unidas operativamente" se encuentran contiguas. Sin embargo, no se requiere que los potenciadores se encuentren contiguos. La unión se lleva a cabo por unión en sitios de restricción adecuados. Si tales sitios no existen, es posible usar adaptadores o conectores de oligonucleótidos sintéticos de conformidad con la práctica convencional.

15 Como se usa en la presente descripción, el término "gen" se refiere a un polinucleótido (p. ej., un segmento de ADN) que codifica un polipéptido e incluye regiones anteriores y posteriores a las regiones codificantes así como secuencias intercaladas (intrones) entre segmentos codificantes individuales (exones).

20 Como se usa en la presente descripción, "recombinante", cuando se usa con referencia a una célula, indica, típicamente, que la célula se ha modificado mediante la introducción de una secuencia de ácidos nucleicos extraños o que la célula se deriva de una célula modificada de esa manera. Por ejemplo, una célula recombinante puede comprender un gen que no se encuentra en forma idéntica dentro de la forma natural (no recombinante) de la célula, o una célula recombinante puede comprender un gen natural (que se encuentra en la forma natural de la célula) pero que se ha modificado y se ha reintroducido en la célula. Una célula recombinante puede comprender un ácido nucleico endógeno para la célula que se ha modificado sin extraer el ácido nucleico de la célula; dichas modificaciones incluyen las obtenidas mediante sustitución génica, mutación específica del sitio, y técnicas relacionadas conocidas de los expertos en la técnica. La tecnología de ADN recombinante incluye técnicas para la producción de ADN recombinante *in vitro* y para la transferencia del ADN recombinante en células, en donde puede expresarse o propagarse para producir un polipéptido recombinante. "Recombinación", "recombinar" y "recombinado" con respecto a los polinucleótidos o ácidos nucleicos, se refieren, generalmente, al ensamblaje o combinación de dos o más cadenas o fragmentos de ácido nucleico o polinucleótidos para generar un polinucleótido o ácido nucleico nuevo. El polinucleótido o ácido nucleico recombinante se denomina, a veces, quimera. Un ácido nucleico o polipéptido es "recombinante" cuando es artificial o está modificado por ingeniería genética, o se ha derivado de una proteína o ácido nucleico artificial o modificado por ingeniería genética.

35 Como se usa en la presente descripción, el término "amplificación" de un ácido nucleico o gen se refiere a un proceso mediante el cual secuencias de ADN específicas se replican desproporcionadamente de forma que el ácido nucleico o gen amplificado aparece con un número de copias más alto que el que inicialmente estaba presente en el genoma. En algunas realizaciones, la selección de células por cultivo en presencia de un fármaco (p. ej., un inhibidor de una enzima que se puede inhibir) da como resultado la amplificación bien del gen endógeno que codifica el producto génico necesario para el crecimiento en presencia del fármaco o mediante amplificación de secuencias exógenas (es decir, la entrada) que codifican el ácido nucleico o el producto génico o ambos.

45 La "amplificación" es un caso especial de replicación de ácido nucleico que implica especificidad de molde. Esto contrasta con la replicación no específica de molde (es decir, replicación que es dependiente de molde pero no dependiente de un molde específico). La especificidad de molde se distingue en este punto de la fidelidad de replicación (es decir, síntesis de la secuencia polinucleotídica (p. ej., síntesis de la secuencia polinucleotídica correcta) y de especificidad de nucleótidos (ribonucleótido o desoxirribonucleótido). La especificidad de molde se describe frecuentemente en términos de especificidad de "objetivo". Las secuencias objetivo son "dianas" en el sentido que deberán clasificarse entre otros ácidos nucleicos. Las técnicas de amplificación se han diseñado fundamentalmente para esta clasificación.

50 Como se usa en la presente descripción, el término "cebador" se refiere a un oligonucleótido (un polímero de restos de nucleótidos) que se produce tanto naturalmente como en una digestión con restricción purificada o se produce sintéticamente, que puede actuar como un punto de inicio de la síntesis cuando se coloca en condiciones bajo las cuales se induce la síntesis de un producto de extensión del cebador que es complementario de una hebra de ácido nucleico (es decir, en presencia de nucleótidos y de un agente inductor tal como una ADN polimerasa y a una temperatura y pH adecuados). Preferentemente, el cebador es monocatenario para una eficacia de amplificación máxima, aunque alternativamente, puede ser bicatenario. Si es bicatenario, el cebador se trata en primer lugar para separar su hebras antes de usarse para preparar productos de extensión. En algunas realizaciones, el cebador es un oligodesoxirribonucleótido. El cebador debe ser lo suficientemente largo para cebar la síntesis de los productos de extensión en presencia del agente inductor. La longitud exacta de un cebador depende de una diversidad de factores, entre los que se incluyen la temperatura, la fuente del cebador, y el uso del método.

65 Como se usa en la presente descripción, el término "sonda" se refiere a un oligonucleótido, tanto de origen natural como purificado mediante una reacción de digestión o producido de forma sintética, recombinante o mediante amplificación por

PCR, que típicamente es capaz de hibridarse con otro oligonucleótido de interés. Una sonda puede ser monocatenaria o bicatenaria. Las sondas son útiles en la detección, identificación y aislamiento de secuencias génicas específicas. Se contempla que cualquier sonda utilizada en la presente invención se marque con cualquier “molécula indicadora,” de forma que se pueda detectar en cualquier sistema de detección que incluyen, aunque no de forma limitativa, sistemas de enzimas (p. ej., ELISA, así como un ensayo histoquímico basado en enzimas), fluorescentes, radioactivos y luminiscentes. No se pretende que la presente invención esté limitada a ningún sistema o marca de detección concretos.

Como se usa en la presente descripción, el término “objetivo”, cuando se usa en referencia a la reacción en cadena de la polimerasa, se refiere a la región del ácido nucleico a la que se unen los cebadores usados en la reacción en cadena de la polimerasa. Por lo tanto, se desea separar el “objetivo” de otras secuencias de ácidos nucleicos. Un segmento de “nucleótido” es una región de un ácido nucleico dentro de la secuencia de ácidos nucleicos objetivo.

Como se usa en la presente descripción, la expresión “polymerase chain reaction” (reacción en cadena de la polimerasa - PCR) se refiere a los métodos de las patentes US-4.683.195, 4.683.202 y 4.965.188, que incluyen métodos para aumentar la concentración de un segmento de una secuencia objetivo en una mezcla de ADN genómico sin clonación ni purificación. Este proceso para amplificar la secuencia diana es bien conocido en la técnica.

Como se usa en la presente descripción, la expresión “reactivos de amplificación” se refiere a aquellos reactivos (p. ej., trifosfatos de desoxirribonucleótido, tampón, etc.) necesarios para la amplificación, salvo los cebadores, molde de ácido nucleico, y la enzima de amplificación. De forma típica, los reactivos de amplificación junto con otros componentes de la reacción se introducen y se contienen en un recipiente de reacción (tubo de ensayo, micropocillo, etc.).

Como se usa en la presente descripción, la expresión “endonucleasa de restricción” o “enzima de restricción” se refiere a una enzima (p. ej., enzima bacteriana) que puede cortar el ADN bicatenario o monocatenario en o cerca de una secuencia específica de nucleótidos conocidos como un sitio de restricción. La secuencia de nucleótidos que comprende el sitio de restricción se reconoce y escinde por una endonucleasa de restricción o enzima de restricción dada, y es frecuentemente el sitio para insertar los fragmentos de ADN. Se puede diseñar mediante ingeniería genética un sitio de restricción dentro de un vector de expresión o una construcción de ADN.

“Recombinación homóloga” se refiere al intercambio de fragmentos de ADN entre dos moléculas de ADN o cromosomas emparejados en el sitio de las secuencias de nucleótidos idénticas o casi idénticas. En algunas realizaciones, la integración del cromosoma es una recombinación homóloga.

Se dice que un ácido nucleico o polinucleótido “codifica” un polipéptido si, en su estado natural o cuando se manipula por medio de métodos conocidos para los aquellos con experiencia en la técnica, puede transcribirse y/o traducirse para producir el polipéptido o un fragmento de este. Se dice, además, que la cadena no codificante de dicho ácido nucleico codifica la secuencia.

Como es conocido en la técnica, una secuencia de ADN se puede transcribir mediante una ARN polimerasa para producir una secuencia de ARN, pero una secuencia de ARN se puede transcribir inversamente mediante la transcriptasa inversa para producir una secuencia de ADN.

Los términos “cepa hospedadora” y “célula hospedadora” se refieren a un hospedador adecuado para un vector de expresión que comprende una secuencia de ADN de interés. La secuencia de ADN de interés puede expresar una proteína de interés en la cepa hospedadora o la célula hospedadora.

Una “proteína” o “polipéptido” comprende una secuencia polimérica de residuos de aminoácidos. En la presente descripción, los términos “proteína” y “polipéptido” se usan indistintamente. A lo largo de la presente descripción se usan los códigos de una sola letra y de tres letras para aminoácidos como se define según IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). La letra X sola se refiere a cualquiera de los 20 aminoácidos. Además, se comprende que un polipéptido se puede codificar por más de una secuencia de nucleótidos debido a la degeneración del código genético. Las mutaciones se nombran mediante el código de una letra para el aminoácido parental, seguido de un número de posición de tres o dos dígitos y a continuación, el código de una letra para la variante del aminoácido. Por ejemplo, la mutación de glicina (G) en la posición 87 a serina (S) se representa como “G087S” o “G87S”. Las mutaciones múltiples se indican mediante la inserción de “-” entre las mutaciones. Las mutaciones en las posiciones 87 y 90 se representan como “G087S-A090Y” o “G87S-A90Y” o “G87S + A90Y” o “G087S + A090Y”. Para las deleciones se usa el código de una sola letra “Z”. Para una inserción con relación a la secuencia precursora, el código de una sola letra “Z” se encuentra a la izquierda del número de la posición. Para una delección, el código de una sola letra “Z” se encuentra a la derecha del número de la posición. Para inserciones, el número de la posición es el número de la posición antes del aminoácido o aminoácidos insertados, más 0,01 por cada aminoácido. Por ejemplo, una inserción de tres aminoácidos alanina (A), serina (S) y tirosina (Y) entre la posición 87 y la 88 se muestra como “Z087.01A-Z087.02S-Z087.03Y”. Por lo tanto, la combinación de todas las mutaciones mencionadas anteriormente más una delección en la posición 100 es: “G087S- Z087.01A-Z087.02S-Z087.03Y-A090Y-A100Z”.

Una “prosecuencia” o “secuencia de propéptidos” se refiere a una secuencia de aminoácidos entre la secuencia de péptido señal y la secuencia de proteasa madura que es necesaria para la secreción de la proteasa. La escisión de la prosecuencia o secuencia de propéptidos produce una proteasa activa madura.

5 El término “secuencia señal” o “péptido señal” se refiere a una secuencia de restos de aminoácidos que puede participar en la secreción o transporte directo de la forma madura o precursora de una proteína. La secuencia señal se localiza, típicamente, N-terminal a la secuencia de proteínas precursoras o maduras. La secuencia señal puede ser endógena o exógena. Una secuencia señal exógena ilustrativa comprende los primeros siete restos de aminoácidos de la secuencia señal a partir de la subtilisina de *Bacillus subtilis* fusionados al resto de la secuencia señal de la subtilisina de *Bacillus lentus* (ATCC 21536). Normalmente, en la proteína madura la secuencia señal está ausente. Una secuencia señal se desdobra, típicamente, de la proteína mediante una peptidasa señal después de transportar la proteína.

La expresión “secuencia señal híbrida” se refiere a secuencias señal en las que parte de la secuencia se obtiene a partir de la expresión del hospedador fusionada con la secuencia señal del gen a expresar. En algunas realizaciones se utilizan secuencias sintéticas.

El término forma “madura” de una proteína, polipéptido o péptido se refiere a la forma funcional de la proteína, polipéptido o péptido sin la secuencia del péptido señal y sin la secuencia del propéptido.

20 El término forma “precursora” de una proteína o péptido se refiere a una forma madura de la proteína que tiene una prosecuencia unida operativamente al término amino o carbonilo de la proteína. La forma precursora puede tener, además, una secuencia “señal” unida operativamente al término amino de la prosecuencia. El precursor puede tener, además, polipéptidos adicionales que participan en la actividad posterior a la traducción (p. ej., polipéptidos escindidos de la anterior para dejar la forma madura de una proteína o péptido).

25 La expresión “de tipo silvestre”, con referencia a una secuencia de aminoácidos o a una secuencia de ácidos nucleicos, indica que la secuencia de aminoácidos o la secuencia de ácidos nucleicos es una secuencia nativa o de origen natural. Como se utiliza en la presente memoria, la expresión “de origen natural” se refiere a cualquier elemento (p. ej., proteínas, aminoácidos o secuencias de ácidos nucleicos) que se encuentran en la naturaleza (es decir, no se han manipulado por medio de métodos recombinantes).

En la presente memoria, la expresión “de origen no natural” se refiere a cualquier cosa que no se encuentre en la naturaleza (p. ej., ácidos nucleicos recombinantes producidos en el laboratorio).

35 Como se usa en la presente descripción con respecto a las posiciones de residuos de aminoácidos, “correspondiente a” o “corresponde a” o “corresponde” se refiere a un residuo de aminoácido en la posición enumerada en una proteína o péptido o un residuo de aminoácido que es análogo, homólogo o equivalente a un residuo enumerado en una proteína o péptido. En la presente memoria, “región correspondiente” se refiere, generalmente, a una posición análoga en una proteína relacionada o en una proteína de referencia.

40 Las expresiones “derivado de” y “obtenido a partir de” se refieren no solamente a una proteasa producida o que pueda producirse por medio de una cepa del organismo en cuestión, sino también, a una proteína codificada por una secuencia de ADN aislada a partir de dicha cepa y producida en un organismo hospedador que contiene dicha secuencia de ADN. Además, la expresión se refiere a una proteasa codificada por una secuencia de ADN de origen sintético y/o de ADNc y que tiene las características de identificación de la proteasa en cuestión. Como ejemplo, “proteasas derivadas de *Bacillus*” se refiere a aquellas enzimas que tienen actividad proteolítica producidas de forma natural por *Bacillus*, además de serina proteasas como las producidas por fuentes de *Bacillus*, pero que a través del uso de técnicas de ingeniería genética son producidas por otros organismos no *Bacillus* transformados con un ácido nucleico que codifica las serina proteasas.

50 El término “idéntico” en el contexto de dos secuencias de ácidos nucleicos o polipéptidos se refiere a los restos en las dos secuencias que son los mismos cuando se alinean para obtener la correspondencia máxima, que se mide usando una de las siguientes comparaciones de secuencias o algoritmos de análisis.

55 En la presente memoria, “genes homólogos” se refiere a un par de genes de especies diferentes, pero por lo general relacionadas, que se corresponden entre sí y que son idénticas o muy similares entre sí. La expresión abarca genes que están separados por especiación (es decir, el desarrollo de nuevas especies) (p. ej., genes ortólogos), así como genes que han sido separados por duplicación genética (p. ej., genes parálogos).

60 En la presente memoria, “homología” se refiere a similitud o identidad de secuencia, siendo preferida identidad. La homología se puede determinar usando técnicas estándar conocidas en la técnica (véase, p. ej., Smith y Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 [1981]; Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 [1970]; Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 [1988]; programas informáticos tales como GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de software de Wisconsin Genetics (Genetics Computer Group, Madison, WI); y Devereux y col., Nucl. Acid Res. 12:387-395 [1984]). Un ejemplo de un algoritmo útil es PILEUP. PILEUP crea una alineación de múltiples secuencias a partir de un grupo de secuencias relacionadas usando alineamientos progresivos por pares. También puede representar un árbol que muestra las relaciones de agrupación usadas para crear el alineamiento. PILEUP usa una

simplificación del método de alineación progresiva de Feng y Doolittle (véase Feng y Doolittle, J. Mol. Evol. 35:351-360 [1987]). El método es similar al descrito por Higgins y Sharp (véase Higgins y Sharp, CABIOS 5:151-153 [1989]). Los parámetros útiles de PILEUP incluyen una ponderación de hueco por defecto de 3,00, una ponderación por longitud de hueco por defecto de 0,10 y huecos terminales ponderados. Otro ejemplo de un algoritmo útil es el algoritmo BLAST, descrito por Altschul y col., (véase Altschul y col., J. Mol. Biol. 215:403-410 [1990]; y Karlin y Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787 [1993]). Un programa BLAST especialmente útil es el programa WU-BLAST-2 (véase, Altschul y col., Meth. Enzymol. 266:460-480 [1996]). WU-BLAST-2 usa varios parámetros de búsqueda, la mayoría de los cuales se establecen en los valores por defecto. Los parámetros ajustables se ajustan con los valores siguientes: longitud de solapamiento =1, fracción de solapamiento = 0,125, umbral de palabra (T) = 11. Los parámetros HSP S y HSP S2 son valores dinámicos y son establecidos por el propio programa dependiendo de la composición de la secuencia particular y de la composición de la base de datos concreta contra la que se busca la secuencia de interés. Sin embargo, los valores pueden ajustarse para aumentar la sensibilidad.

El porcentaje de identidad de secuencia entre una secuencia de referencia y una secuencia de prueba de interés se puede determinar fácilmente por el experto en la técnica. El porcentaje de identidad compartido por las secuencias de polinucleótidos o polipéptidos se determina por comparación directa de la información de la secuencia entre las moléculas mediante alineación de las secuencias y determinación de la identidad por métodos conocidos en la técnica. Un ejemplo de un algoritmo que es adecuado para determinar la similitud de secuencia es el algoritmo BLAST, (véase, Altschul, y col., J. Mol. Biol., 215:403-410 [1990]). El software para realizar análisis BLAST está disponible públicamente a través del centro nacional de información biotecnológica. Este algoritmo implica en primer lugar, identificar high scoring sequence pairs (pares de secuencias de alta puntuación - HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta que coinciden o satisfacen alguna puntuación umbral T de valor positivo cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. Estos aciertos de la palabra vecina iniciales actúan como puntos de partida para encontrar HSP más largos que los contienen. Los aciertos de palabras se expanden en ambas direcciones a lo largo de cada una de las dos secuencias que se comparan, para que se pueda aumentar en lo que respecta a la puntuación de alineación acumulativa. La extensión de los aciertos de palabras se detiene cuando: la puntuación de alineación acumulativa se reduce en una cantidad X desde un valor máximo alcanzado; la puntuación acumulativa llega a cero o menos; o se alcanza el final de cualquier secuencia. Los parámetros del algoritmo BLAST, W, T y X determinan la sensibilidad y la velocidad de la alineación. El programa BLAST usa como valores por defecto una longitud de palabra (W) de 11, la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase, Henikoff y Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 [1992]) alineaciones (B) de 50, expectativa (E) de 10, M⁵, N⁻⁴ y una comparación de ambas cadenas.

El algoritmo BLAST realiza entonces un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, p. ej., Karlin y Altschul, anteriormente citado). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la cual una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos se produciría por casualidad. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a un ácido nucleico de la serina proteasa de la invención si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de ensayo con un ácido nucleico de la serina proteasa es inferior a aproximadamente 0,1, más preferiblemente, inferior a aproximadamente 0,01 y más preferiblemente inferior a aproximadamente 0,001. Cuando el ácido nucleico de prueba codifica un polipéptido de serina proteasa, se considera similar a un ácido nucleico de la serina proteasa especificada si la comparación da lugar a una probabilidad de suma más pequeña de menos de aproximadamente 0,5 y más preferiblemente de menos de aproximadamente 0,2.

El porcentaje "idéntico" o de "identidad" en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o de polipéptidos, se refiere a dos o más secuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de restos de ácidos nucleicos o restos de aminoácidos, respectivamente, que son iguales, cuando se comparan y se alinean en busca de la máxima similitud, como se determina usando un algoritmo de comparación de secuencias o mediante inspección visual. El "porcentaje de identidad de secuencia" o "% de identidad" o "% de identidad de secuencia" o "% de identidad de secuencia de aminoácidos" de una secuencia de aminoácidos objeto respecto de una secuencia de aminoácidos de referencia (es decir, de consulta), significa que la secuencia de aminoácidos objeto es idéntica (es decir, basándose en aminoácido por aminoácido) en un porcentaje especificado, a la secuencia de aminoácidos de consulta sobre una longitud de comparación, cuando se alinean las secuencias de manera óptima. Por lo tanto, 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos u 80 % de identidad con respecto a dos secuencias de aminoácidos, significa que el 80 % de los restos de aminoácidos de dos secuencias de aminoácidos alineadas de manera óptima son idénticos.

El "porcentaje de identidad de secuencia" o "% de identidad" o "% de identidad de secuencia" o "% de identidad de secuencia de nucleótidos" de una secuencia de ácidos nucleicos objeto respecto de una secuencia de ácidos nucleicos de referencia (es decir, de consulta), significa que la secuencia de ácidos nucleicos objeto es idéntica (es decir, basándose en nucleótido por nucleótido para una secuencia de polinucleótidos), en un porcentaje especificado, a la secuencia de consulta sobre una longitud de comparación, cuando se alinean las secuencias de manera óptima. Por lo tanto, 80 % de identidad de secuencia de nucleótidos u 80 % de identidad con respecto a dos secuencias de ácido nucleico, significa que el 80 % de los restos de nucleótidos en dos secuencias de ácido nucleico alineadas óptimamente son idénticos.

En algunas realizaciones, el porcentaje de identidad de secuencia o "% de identidad de secuencia" o "% de identidad" de una secuencia objeto respecto de una secuencia de consulta se puede calcular mediante la alineación

5 óptima de las dos secuencias y la comparación de las dos secuencias óptimamente alineadas sobre la longitud de comparación. Se determina el número de posiciones en la alineación óptima en las que aparecen restos idénticos en ambas secuencias, proporcionando de este modo el número de posiciones coincidentes y después, se divide el número de posiciones coincidentes entre el número total de posiciones de la longitud de comparación (que, salvo que se indique otra cosa, es la longitud de la secuencia de consulta). El número resultante se multiplica por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia de la secuencia en cuestión a la secuencia de consulta.

10 “Alineación óptima” u “óptimamente alineadas” se refiere a la alineación de dos (o más) secuencias que dan el mayor porcentaje de puntuación de identidad. Por ejemplo, el alineamiento óptimo de dos secuencias de proteínas se puede lograr mediante la alineación manual de las secuencias, de tal manera que se alinea entre sí el número máximo de restos de aminoácidos idénticos en cada secuencia o mediante el uso de programas o procedimientos de software descritos en la presente memoria o conocidos en la técnica. El alineamiento óptimo de dos secuencias de ácidos nucleicos se puede lograr mediante la alineación manual de las secuencias, de tal manera que el número máximo de restos de nucleótidos idénticos en cada secuencia están alineados entre sí o mediante el uso de programas o procedimientos de software descritos en la presente memoria o conocidos en la técnica.

15 En algunas realizaciones, dos secuencias de polipéptidos se consideran “óptimamente alineadas” cuando se alinean usando parámetros definidos, tales como una matriz de sustitución de aminoácidos definida, penalización por existencia de huecos (también denominado penalización por apertura de huecos) y penalización por extensión de huecos, a fin de lograr la mayor puntuación de similitud posible para ese par de secuencias. Con frecuencia, se usa la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase, Henikoff y Henikoff, anteriormente citado) como matriz de sustitución de puntuación por defecto en los algoritmos de alineación de secuencias de polipéptidos (p. ej., BLASTP). La penalización por existencia de hueco se impone por la introducción de un único hueco para un aminoácido en una de las secuencias alineadas y la penalización por extensión de hueco se impone para cada posición de los restos en el hueco. Los parámetros de alineación ejemplares empleados son: matriz de puntuación BLOSUM62, penalización por existencia de hueco = 11 y penalización por extensión de hueco = 1. La puntuación de alineación se define por las posiciones de los aminoácidos de cada secuencia en la que la alineación comienza y termina (p. ej., la ventana de alineación) y, opcionalmente, por la inserción de un hueco o múltiples huecos en una o ambas secuencias, a fin de lograr la puntuación de similitud más alta posible.

20 El alineamiento óptimo entre dos o más secuencias se puede determinar manualmente mediante inspección visual o mediante el uso de un ordenador, tal como, aunque no de forma limitativa por ejemplo, el programa BLASTP para secuencias de aminoácidos y el programa BLASTN para secuencias de ácidos nucleicos (véase, p. ej., Altschul y col., *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402 (1997); véase también, el sitio web del National Center for Biotechnology Information [Centro Nacional para la Información Biotecnológica - NCBI]).

25 Se puede decir que un polipéptido de interés es “sustancialmente idéntico” a un polipéptido de referencia si el polipéptido de interés comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 91 %, al menos aproximadamente 92 %, al menos aproximadamente 93 %, al menos aproximadamente 94 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 %, o al menos aproximadamente 99,5 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos del polipéptido de referencia. El porcentaje de identidad entre dos de dichos polipéptidos se puede determinar manualmente por inspección de las dos secuencias de polipéptidos alineadas óptimamente o mediante el uso de programas o algoritmos informáticos (p. ej., BLAST, ALIGN, CLUSTAL) usando parámetros estandarizados. Una indicación es que dos polipéptidos son sustancialmente idénticos si el primer polipéptido muestra reactividad cruzada inmunitariamente con el segundo polipéptido. Típicamente, los polipéptidos que se diferencian por las sustituciones de aminoácidos conservativas muestran reactividad cruzada inmunitariamente. Por lo tanto, un polipéptido es sustancialmente idéntico a un segundo polipéptido, por ejemplo, cuando los dos polipéptidos solamente se diferencian mediante una sustitución de aminoácidos conservativa o una o más sustituciones de aminoácidos conservativas.

30 Se puede decir que un polipéptido de interés es “sustancialmente idéntico” a un ácido nucleico de referencia si el ácido nucleico de interés comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 91 %, al menos aproximadamente 92 %, al menos aproximadamente 93 %, al menos aproximadamente 94 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 %, o al menos aproximadamente 99,5 % de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico de referencia. El porcentaje de identidad entre dos de dichos ácidos nucleicos se puede determinar manualmente por inspección de las dos secuencias de ácidos nucleicos alineadas óptimamente o mediante el uso de programas o algoritmos informáticos (p. ej., BLAST, ALIGN, CLUSTAL) usando parámetros estandarizados. Una indicación de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas de ácidos nucleicos se hibridan entre sí en condiciones rigurosas (p. ej., dentro de un intervalo de rigor medio a alto).

Un ácido nucleico o polinucleótido está “aislado” cuando está separado parcial o totalmente de otros componentes que incluyen, aunque no de forma limitativa, por ejemplo, otras proteínas, ácidos nucleicos, células, etc. De manera similar, un polipéptido, proteína o péptido está “aislado” cuando está separado parcial o totalmente de otros componentes que incluyen, aunque no de forma limitativa, por ejemplo, otras proteínas, ácidos nucleicos, células, etc. Sobre una base molar, una especie aislada es más abundante que otras especies en una composición. Por ejemplo, una especie aislada puede comprender al menos aproximadamente 50 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, aproximadamente 99 % o aproximadamente 100 % (sobre una base molar) de todas las especies macromoleculares presentes. Preferiblemente, la especie de interés se purifica hasta una homogeneidad esencial (es decir, las especies contaminantes no pueden detectarse en la composición con métodos de detección convencionales). La pureza y homogeneidad se pueden determinar con el uso de varias técnicas muy conocidas en la técnica, tales como electroforesis en gel de agarosa o poli(acrilamida de una muestra de ácido nucleico o proteína, seguida de visualización después de la transferencia. Si se desea puede usarse una técnica de alta resolución, tal como high performance liquid chromatography (cromatografía en líquido de alto rendimiento - HPLC) o un medio similar para la purificación del material.

El término “purificado”, tal como se aplica a los ácidos nucleicos o polipéptidos, denota generalmente un ácido nucleico o polipéptido que está esencialmente libre de otros componentes tal como se determina por medio de técnicas analíticas muy conocidas en la técnica (p. ej., un polipéptido o polinucleótido purificado forma una banda distinta en un gel electroforético, eluato cromatográfico y/o un medio sujeto a centrifugación en gradiente de densidad). Por ejemplo, un ácido nucleico o polipéptido que da lugar a esencialmente una banda en un gel electroforético está “purificado”. Un ácido nucleico o polipéptido purificado es al menos aproximadamente 50 % puro, usualmente, tiene al menos aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, aproximadamente 99 %, aproximadamente 99,5 %, aproximadamente 99,6 %, aproximadamente 99,7 %, aproximadamente 99,8 % o un porcentaje mayor de pureza (p. ej., porcentaje en peso sobre una base molar). En un sentido relacionado, la invención proporciona métodos para enriquecer composiciones en una o más moléculas de la invención, tales como uno o más polipéptidos o polinucleótidos para codificar polipéptidos para su uso en la invención. Una composición está enriquecida con respecto a una molécula cuando hay un incremento sustancial en la concentración de la molécula después de aplicar una técnica de purificación o de enriquecimiento. Un polipéptido o polinucleótido sustancialmente puro de la invención (p. ej., proteasa variante sustancialmente pura o polinucleótido que codifica una proteasa variante de la invención, respectivamente) comprenderá, de forma típica al menos aproximadamente 55 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, aproximadamente 99 %, aproximadamente 99,5 % o más en peso (en una base molar) de todas las especies macromoleculares de una composición en particular.

En un sentido relacionado, la variante de proteasa útil en la invención se puede proporcionar usando método para enriquecer composiciones en una o más moléculas de la invención, tal como uno o más polipéptidos de la invención (p. ej., una o más proteasas variantes de la invención) o uno o más ácidos nucleicos que codifican polipéptidos para usar en la invención (p. ej., uno o más ácidos nucleicos que codifican una o más proteasas variantes de la invención). Una composición está enriquecida con respecto a una molécula cuando hay un incremento sustancial en la concentración de la molécula después de aplicar una técnica de purificación o de enriquecimiento. Un polipéptido o polinucleótido sustancialmente puro comprenderá, de forma típica al menos aproximadamente 55 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, aproximadamente 99 %, aproximadamente 99,5 % o más en peso (en una base molar) de todas las especies macromoleculares de una composición en particular.

Como se usa en la presente descripción, la expresión “mutagénesis combinatoria” o “combinatoria” se refiere a métodos en los que se generan bibliotecas de variantes de ácidos nucleicos de una secuencia de ácido nucleico de referencia. En estas bibliotecas, las variantes contienen una o varias mutaciones seleccionadas de un conjunto predefinido de mutaciones. Los métodos también proporcionan medios para introducir mutaciones aleatorias que no forman parte del conjunto predefinido de mutaciones. Algunos de dichos métodos incluyen los definidos en la patente US-6.582.914. Algunos de dichos métodos de mutagénesis combinatoria incluyen y/o abarcan métodos llevados a la práctica mediante kits comerciales (p. ej., QUIKCHANGE® Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene), PCR fusión/extensión PCR).

Como se usa en la presente descripción, “tener propiedades mejoradas” usado junto con una proteasa variante se refiere a una proteasa variante con un lavado o capacidad limpiadora mejorada o potenciada, y/o una estabilidad mejorada o potenciada opcionalmente con una retención del lavado o capacidad limpiadora, con respecto a la correspondiente proteasa de referencia (p. ej., proteasa natural o de origen natural). Las propiedades mejoradas de una proteasa variante puede comprender un lavado o capacidad limpiadora mejorada y/o una estabilidad mejorada. En algunas realizaciones, la invención usa proteasas variantes que presentan una o más de las siguientes propiedades: capacidad limpiadora manual mejorada, capacidad limpiadora de vajilla manual o en lavavajillas mejorada, capacidad

limpiadora de vajilla en lavavajillas mejorada, capacidad limpiadora de ropa mejorada y/o estabilidad mejorada con respecto a una proteasa de referencia (p. ej., proteasa natural, tal como una subtilisina natural).

5 Como se usa en la presente descripción, el término “ensayo funcional” se refiere a un ensayo que proporciona una indicación de la actividad de una proteína. En algunas realizaciones, el término se refiere a sistemas de ensayo en los que se analiza una proteína para evaluar su potencial para funcionar en su capacidad usual. Por ejemplo, en el caso de enzimas, un ensayo funcional implica determinar la eficacia de la enzima para catalizar un reacción.

10 Como se usa en la presente descripción, la expresión “propiedad objetivo” se refiere a la propiedad del gen de partida que se va a alterar. No se pretende que la presente invención esté limitada a ninguna propiedad objetivo en particular. Sin embargo, en algunas realizaciones, la propiedad objetivo es la estabilidad de un producto génico (p. ej., resistencia a la desnaturalización, proteolisis u otros factores degradativos) mientras que, en otras realizaciones, el nivel de producción en un hospedador de producción se ve alterado.

15 El término “propiedad” o equivalentes gramaticales del mismo en el contexto de un ácido nucleico, como se utiliza en la presente memoria, se refiere a cualquier característica o atributo de un ácido nucleico que se puede seleccionar o detectar. Estas propiedades incluyen, aunque no de forma limitativa, una propiedad que afecta a la unión a un polipéptido, una propiedad transmitida a una célula que comprende un ácido nucleico en particular, una propiedad que afecta a la transcripción génica (p. ej., fortaleza del promotor, reconocimiento del promotor, regulación del promotor, función de potenciación), una propiedad que afecta al procesamiento del ARN (p. ej., corte y empalme de ARN, estabilidad del ARN, conformación del ARN y modificación posterior a la transcripción), una propiedad que afecta a la traducción (p. ej., nivel, regulación, unión del ARNm a las proteínas ribosómicas, modificación posteriores a la traducción). Por ejemplo, se puede alterar un sitio de unión de un factor de transcripción, polimerasa, factor de regulación, etc., de un ácido nucleico para producir características deseadas o para identificar características no deseadas.

25 El término “propiedad” o equivalentes gramaticales del mismo en el contexto de un polipéptido (incluidas las proteínas), como se utiliza en la presente memoria, se refiere a cualquier característica o atributo de un polipéptido que se puede seleccionar o detectar. Estas propiedades incluyen, aunque no de forma limitativa, estabilidad a la oxidación, especificidad de sustrato, actividad catalítica, actividad enzimática, estabilidad térmica, estabilidad frente a sustancias alcalinas, perfil de actividad con el pH, resistencia a la degradación proteolítica, cociente K_M , k_{cat} , k_{cat}/K_M , plegamiento de proteínas, inducción de una respuesta inmunitaria, capacidad de unirse a un ligando, capacidad de unirse a un receptor, capacidad de secretarse, capacidad para expresarse sobre la superficie de una célula, capacidad para oligomerizar, capacidad para señalar, capacidad para estimular la proliferación celular, capacidad para inhibir la proliferación celular, capacidad para inducir la apoptosis, capacidad para modificarse mediante fosforilación o glicosilación, y/o capacidad para tratar una enfermedad, etc.

35 Como se usa en la presente descripción, el término “cribado” tiene su significado habitual en la técnica. En un proceso de cribado ilustrativo, se proporciona un ácido nucleico mutante o polipéptido variante codificado por el mismo y se evalúa o determina una propiedad del ácido nucleico mutante o polipéptido variante, respectivamente. La propiedad determinante del ácido nucleico mutante o polipéptido variante se puede comparar con una propiedad del correspondiente ácido nucleico precursor (original) o con la propiedad del correspondiente polipéptido original, respectivamente.

40 Será evidente para el experto en la técnica que el procedimiento de cribado para obtener un ácido nucleico o proteína con una propiedad alterada dependerá de la propiedad del material de partida cuya modificación pretende facilitar la generación del ácido nucleico mutante. Por tanto, el técnico experto apreciará que la invención no esté limitada a ninguna propiedad específica a cribar y que la siguiente descripción de propiedades relacione solamente ejemplos ilustrativos. Los métodos para cribar una propiedad en particular se han descrito generalmente en la técnica. Por ejemplo, se puede medir la unión, el pH, la especificidad, etc., antes y después de la mutación, en donde un cambio indica una alteración. Preferentemente, los cribados se realizan con alto rendimiento, incluido el cribado simultáneo de múltiples muestras que incluye, aunque no de forma limitativa, ensayos que utilizan chips, expresión en fagos y múltiples sustratos y/o indicadores.

45 Como se usa en la presente descripción, en algunas realizaciones, un proceso de cribado abarca una o más etapas de selección en las que se han enriquecido variantes de interés a partir de una población de variantes. Los ejemplos de estas realizaciones incluyen la selección de variantes que transmiten una ventaja de crecimiento al organismo hospedador, así como la expresión en fagos o cualquier otro método de expresión, donde las variantes se pueden capturar a partir de una población de variantes basándose en sus propiedades de unión o catalíticas. En algunas realizaciones, una biblioteca de variantes se expone a estrés (p. ej., calor, desnaturalización) y, posteriormente, se identifican las variantes que siguen intactas mediante un cribado o un enriquecimiento por selección. Se pretende que el término abarque cualquier medio de selección adecuado. Por tanto, no se pretende que la presente invención esté limitada a ningún método de cribado en particular.

50 Las expresiones “secuencia modificada de ácidos nucleicos” y “gen modificado” se utiliza indistintamente en la presente memoria para referirse a una secuencia de ácido nucleico que incluye una delección, inserción o interrupción de la secuenciación del ácido nucleico de origen natural (es decir, natural). En algunas realizaciones, el producto de expresión de la secuencia modificada de ácidos nucleicos es una proteína truncada (p. ej., si la modificación es una delección o interrupción de la secuencia). En algunas realizaciones, la proteína truncada retiene la actividad biológica.

En realizaciones alternativas, el producto de expresión de la secuencia modificada de ácidos nucleicos es una proteína alargada (p. ej., modificaciones que comprenden una inserción en la secuencia de ácidos nucleicos). En algunas realizaciones, una inserción de nucleótidos en la secuencia de ácidos nucleicos produce una proteína truncada (p. ej., cuando la inserción da como resultado la formación de un codón de terminación). Por lo tanto, una inserción puede dar como resultado bien una proteína truncada o bien una proteína alargada como producto de expresión.

Una secuencia de ácidos nucleicos “mutante” se refiere de forma típica a una secuencia de ácidos nucleicos que tiene una alteración en al menos un codón que se produce en la secuencia natural de la célula hospedadora, de tal forma que el producto de expresión de la secuencia de ácidos nucleicos mutante es una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos alterada con respecto a la proteína natural. El producto de expresión puede tener una capacidad funcional alterada (p. ej., actividad enzimática potenciada).

Como se usa en la presente descripción, la expresión “alteración en la especificidad de sustrato” se refiere a cambios en la especificidad de sustrato de una enzima. En algunas realizaciones, un cambio en la especificidad de sustrato se define como un cambio en el valor de k_{cat} y/o K_m para un sustrato en particular, resultado de las mutaciones en la enzima o de la alteración en las condiciones de reacción. La especificidad de sustrato de una enzima se determina por comparación entre las eficacias catalíticas que presenta con diferentes sustratos. Estas determinaciones son especialmente útiles para evaluar la eficacia de enzimas mutantes, ya que generalmente se desea producir enzimas variantes que presenten relaciones de k_{cat}/K_m más altas para los sustratos de interés. Sin embargo, no se pretende que la presente invención esté limitada a ninguna composición de sustrato o a una especificidad de sustrato en particular.

Como se usa en la presente descripción, “propiedad de superficie” se utiliza en referencia a la carga electrostática, así como propiedades tales como la hidrofobicidad y la hidrofiliidad que presenta la superficie de una proteína.

Como se usa en la presente descripción, la expresión “carga neta” se define como la suma de todas las cargas presentes en una molécula. Se realizan “cambios de carga neta” en una molécula de proteína precursora para proporcionar una variante que tenga una carga neta que difiera de la que tiene la molécula precursora (es decir, la variante tiene una carga neta que no es la misma que la molécula precursora). Por ejemplo, la sustitución de un aminoácido neutro por un aminoácido cargado negativamente o un aminoácido cargado positivamente por un aminoácido neutro dará como resultado una carga neta de -1 con respecto a la molécula precursora. La sustitución de un aminoácido cargado positivamente por un aminoácido cargado negativamente da como resultado una carga neta de -2 con respecto al precursor. La sustitución de un aminoácido neutro por un aminoácido cargado positivamente o un aminoácido cargado negativamente de por un aminoácido neutro dará como resultado una carga neta de +1 con respecto a la precursora. La sustitución de un aminoácido cargado negativamente por un aminoácido cargado positivamente da como resultado una carga neta de +2 con respecto al precursor. La carga neta de una proteína precursora también se puede alterar por delección y/o inserción de aminoácidos cargados.

Las expresiones “térmicamente estable” y “termoestable” y “termoestabilidad” se refieren a proteasas que retienen una cantidad especificada de actividad enzimática tras su exposición a temperaturas especificadas durante un periodo de tiempo dado en condiciones prevalentes durante los procesos proteolíticos, de hidrólisis, de limpieza u otros procesos de la invención, mientras dura su exposición a las temperaturas alteradas. “Temperaturas alteradas” abarca temperaturas aumentadas o disminuidas. En algunas realizaciones, las proteasas retienen al menos aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, o aproximadamente 99 % de actividad proteolítica tras su exposición a temperaturas alteradas durante un periodo de tiempo dado, por ejemplo, al menos aproximadamente 60 minutos, aproximadamente 120 minutos, aproximadamente 180 minutos, aproximadamente 240 minutos, aproximadamente 300 minutos, etc.

La expresión “estabilidad potenciada” en el contexto de una proteasa estable frente a la oxidación, presencia de quelantes, al calor y/o el pH se refiere a una mayor actividad proteolítica retenida con el tiempo en comparación con otras proteasas (p. ej., proteasas subtilisina) y/o naturales.

La expresión “estabilidad disminuida” en el contexto de una proteasa estable frente a la oxidación, presencia de quelantes, al calor y/o el pH se refiere a una menor actividad proteolítica retenida con el tiempo en comparación con otras proteasas (p. ej., proteasas subtilisina) y/o naturales.

El término “actividad de limpieza” se refiere a una capacidad limpiadora obtenida mediante una proteasa variante o proteasa de referencia en condiciones que prevalecen durante el proceso proteolítico, de hidrólisis, limpieza u otro proceso de la invención. En algunas realizaciones, el capacidad limpiadora de una proteasa variante o proteasa de referencia puede determinarse con el uso de diversos ensayos para limpieza de una o más manchas diversas sensibles a las enzimas en un artículo o superficie (p. ej., una mancha de alimentos, pasto, sangre, tinta, leche, aceite y/o proteína de huevo). Para determinar el rendimiento de limpieza de una proteasa variante o de referencia se puede exponer la mancha en el artículo o superficie a una o varias condiciones de lavado estándar y evaluar el nivel de eliminación de la mancha con el uso de diversas metodologías cromatográficas, espectrofotométricas u otras metodologías cuantitativas. Los ejemplos de ensayos y métodos de limpieza se conocen en la técnica e

incluyen, pero no se limitan a, los descritos en el documento WO 99/34011 y en la patente US-6.605.458, así como en los ensayos y métodos de limpieza incluidos en los ejemplos proporcionados más adelante.

5 La expresión “cantidad eficaz limpiadora” de una proteasa variante o proteasa de referencia se refiere a la cantidad de proteasa que logra el nivel deseado de actividad enzimática en una composición de limpieza específica. Un experto en la técnica puede dilucidar fácilmente tales cantidades eficaces y se basan en varios factores, tales como la proteasa particular usada, la aplicación de limpieza, la composición específica de la composición de limpieza y si se requiere una composición líquida o seca (p. ej., granular, tableta, barra), etc.

10 La expresión “material adyuvante” se refiere a cualquier material líquido, sólido o gaseoso incluido en la composición de limpieza y/o tratante que no sea una proteasa variante de la invención. En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención incluyen uno o más materiales adyuvantes de limpieza. Cada material adyuvante de limpieza se selecciona, típicamente, según el tipo y forma particulares de la composición de limpieza (p. ej., líquido, gránulos, polvos, barra, pasta, aerosol, tableta, gel, espuma u otra composición). Preferiblemente, cada material adicional de limpieza es compatible con la enzima proteasa usada en la composición.

15 La expresión “capacidad potenciada” en el contexto de la actividad de limpieza se refiere a una actividad de limpieza aumentada o mayor de cierta enzima sobre determinadas manchas sensibles a enzimas tales como de huevo, leche, pasto, tinta, aceite y/o sangre, según se determina por evaluación normal después de un ciclo de lavado y/o múltiples ciclos de lavado convencionales.

20 La expresión “capacidad disminuida” en el contexto de la actividad de limpieza se refiere a una actividad de limpieza disminuida o menor de cierta enzima sobre determinadas manchas sensibles a enzimas tales como de huevo, leche, pasto o sangre, según se determina por evaluación normal después de un ciclo de lavado convencional.

25 La expresión “capacidad comparativa” en el contexto de la actividad de limpieza de una proteasa variante de la invención se refiere a al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 91 %, al menos aproximadamente 92 %, al menos aproximadamente 93 %, al menos aproximadamente 94 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 %, al menos aproximadamente 99,5 % de la actividad de limpieza de una proteasa comparativa o de referencia (p. ej., proteasas comerciales) que incluyen, aunque no de forma limitativa, por ejemplo, la proteasa OPTIMASE™ (Genencor), los productos de proteasa PURAFECT™ (Genencor), la proteasa SAVINASE™ (Novozymes), variantes BPN' (Véase, p. ej., la patente US- Re 34.606), RELASE™, DURAZYME™, EVERLASE™, la proteasa KANNASE™ (Novozymes), MAXACAL™, MAXAPEM™, las proteasas PROPERASE™ (Genencor; véanse también las patentes US-Re 34.606 y las patentes 5.700.676; 5.955.340; 6.312.936; y 6.482.628) y los productos de proteasa variante de *B. lentus* (p. ej., los descritos en los documentos WO 92/21760, WO 95/23221 y/o WO 97/07770). La capacidad limpiadora se puede determinar mediante comparación de las proteasas variantes de la presente invención con proteasas subtilisina de referencia en diversos ensayos de lavado relativos a manchas sensibles a enzimas tales como grasa, sangre, tinta, aceite y/o leche, tal como se determina por metodologías espectrofotométricas o analíticas habituales después de condiciones de ciclo de lavado convencionales.

40 En la presente memoria, la expresión “producto de consumo” significa producto para el cuidado de tejidos y del hogar. En la presente memoria, la expresión “producto para el cuidado de tejidos y del hogar” o “producto para el cuidado de tejidos y uso doméstico” incluye productos generalmente destinados a ser usados o consumidos en la forma en la que se venden y que son para tratar tejidos, superficies duras y cualesquiera otras superficies, y sistemas de limpieza para el cuidado y limpieza de superficies inanimadas, así como productos acondicionadores de tejidos y otros productos diseñados específicamente para el cuidado y mantenimiento de tejidos y productos para el cuidado del aire, que incluyen: cuidado del aire incluidos ambientadores y sistemas de liberación de perfume, cuidado del coche, cuidado de mascotas, cuidado del ganado, cuidado personal, cuidado de joyas, lavado de la vajilla, acondicionamiento de tejidos (incluidos suavizado y/o refrescado), detergente para el lavado de ropa, aditivo y/o cuidado de aclarado y de lavado de ropa, composiciones de limpieza de pre-tratamiento, limpieza y/o tratamiento de superficies duras, incluidos limpiadores para suelos y tazas de inodoro, limpiadores y/o tratamientos para vidrios, limpiadores y/o tratamientos para azulejos, limpiadores y/o tratamientos para cerámica y otros limpiadores para uso del consumidor o institucional. En algunas realizaciones, los productos para el cuidado de tejidos y del hogar son adecuados para su uso sobre heridas y/o la piel. “Productos para el cuidado de tejidos y del hogar” incluye productos para el consumidor e institucionales.

50 Como se usa en la presente descripción, la expresión “productos no para el cuidado de tejidos y del hogar” se refiere a composiciones que se añaden a otras composiciones para producir un producto final que puede ser un producto para el cuidado de tejidos y del hogar.

60 Como se usa en la presente descripción, la expresión “composición de limpieza institucional” se refiere a productos adecuados para usar en instituciones que incluyen, aunque no de forma limitativa, colegios, hospitales, fábricas, tiendas, corporaciones, edificios, restaurantes, complejos y edificios de oficinas, plantas de procesamiento y/o manufactureras, hospitales veterinarios, granjas de producción intensiva, ranchos de producción, etc.

65

Como se usa en la presente descripción, la expresión “composición de limpieza y/o tratante” es un subconjunto de productos para el cuidado tejidos y del hogar que incluye, salvo que se indique lo contrario, composiciones adecuadas para limpieza y/o tratamiento de artículos. Dichos productos incluyen, aunque no de forma limitativa, productos para el tratamiento de tejidos, superficies duras y cualquier otra superficie en el campo del cuidado de tejidos y del hogar, que incluye: cuidado del aire incluidos ambientadores y sistemas de liberación de perfume, cuidado del automóvil, lavado de vajilla, acondicionado de tejidos (incluidos suavizado y/o refrescado), detergente para el lavado de ropa, aditivos para el lavado de ropa y el aclarado y/o el cuidado de la misma, limpieza y/o tratamiento de superficies duras, incluidos limpiadores para suelos y tazas de inodoro, agentes de lavado multiuso en forma granular o en polvo o de “limpieza intensiva”, especialmente detergentes de limpieza; agentes para el lavado líquidos, en forma de gel o pasta universales, especialmente los tipos líquidos denominados de limpieza intensiva; detergentes líquidos para tejidos delicados; agentes para el lavado manual de vajillas o agentes para el lavado de vajillas de acción suave, especialmente los de tipo muy espumante; agentes para el lavado en lavavajillas, incluidos los diversos tipos en pastilla, granulado, líquido y coadyuvante de aclarado para uso doméstico e institucional: champús para automóviles o moquetas, limpiadores para cuartos de baño, incluidos limpiadores de inodoros; así como sustancias auxiliares de limpieza, tales como aditivos blanqueantes y “barras antimanchas” o de tipo tratamiento previo, productos cargados de sustratos tales como toallitas añadidas a la secadora de ropa.

Por tanto, como se usa en la presente memoria, “composición de limpieza” o “formulación de limpieza” de la invención se refiere a cualquier composición de la invención útil para desprender o eliminar un compuesto (p. ej., un compuesto no deseado de un objeto, elemento o superficie a limpiar que incluyen, aunque no de forma limitativa, por ejemplo, una tela, artículo de tela, artículo de vajilla, artículo de cristalería, lentes de contacto, otros sustratos sólidos, cabello (champú) (incluido pelo humano o de animal), piel (jabón o/y crema), dientes (colutorios, pastas dentífricas), superficie de un artículo u objeto (p. ej., superficies duras, tales como la superficie dura de una mesa, encimera, pared, artículo de mobiliario, piso, techo, artículo que no sea vajilla, artículo que no sea de cubertería y cristalería, etc.), filtros, membranas (p. ej., membranas de filtración que incluyen aunque no de forma limitativa membranas de ultrafiltración), etc. El término abarca cualquier material y/o compuesto añadido seleccionado para el tipo concreto de composición de limpieza deseada y la forma del producto (p. ej., líquido, gel, gránulo, pulverización u otra composición), siempre que la composición sea compatible con la proteasa y el resto de enzimas usadas en la composición. La selección específica de los materiales de las composiciones de limpieza se prepara fácilmente considerando la superficie, objeto, artículo o tejido que se ha de limpiar y la forma deseada de la composición para las condiciones de limpieza durante el uso.

Las composiciones de limpieza y formulaciones de limpieza incluyen cualquier composición adecuada para limpiar, blanquear, desinfectar y/o esterilizar cualquier objeto, artículo y/o superficie. Dichas composiciones y formulaciones incluyen, aunque no de forma limitativa por ejemplo, composiciones líquidas y/o sólidas, que incluyen composiciones de limpieza o deterativas (p. ej., composiciones de limpieza y/o deterativas en forma líquida, de gel, pastilla, gránulo y/o sólida así como composiciones detergentes para telas delicadas; composiciones y formulaciones de limpieza para superficies duras, tales como para vidrio, madera, cerámica y mostradores y ventanas metálicos; limpiadores para alfombras; limpiadores para hornos; refrescantes de tejidos; suavizantes de tejidos; y textiles, composiciones de limpieza o deterativas para refuerzo del lavado de ropa, composiciones de aditivos para lavado de ropa, y composiciones para pretratamiento de manchas en el lavado de ropa; composición para lavado de vajillas que incluyen composiciones para lavado de vajillas manual o en lavavajillas (p. ej., detergentes para lavado de vajillas “a mano” o “manuales”) composiciones para lavavajillas (p. ej., “detergentes para lavavajillas automáticos”).

Composición de limpieza o formulaciones de limpieza, como se utiliza en la presente memoria, incluyen salvo que se indique lo contrario, agentes para el lavado granulados o en polvo universales o de limpieza intensiva, especialmente detergentes de limpieza; agentes de limpieza líquidos, granulados, en gel, sólidos o en forma de pasta universales, especialmente los tipos denominados detergente heavy-duty liquid (líquido para limpieza intensiva - HDL) o heavy-duty powder detergent (detergente en polvo para limpieza intensiva - HDD); detergentes líquidos para tejidos delicados; agentes para el lavado manual o a mano de vajillas, incluidos los de tipo muy espumante; lavado manual o a mano de vajillas, lavado de vajillas en lavavajillas, o agentes de lavado para vajilla o cubertería y cristalería, incluidos los varios tipos en forma de pastilla, polvo, sólido, granulado, líquido, gel y adyuvante de aclarado para uso doméstico e institucional; agentes líquidos para limpieza y desinfección, incluidos los tipos antibacterianos para lavado a mano, pastillas para limpieza, colutorios, limpiadores de dentaduras postizas, champús para coches, champús para moquetas, limpiadores de baños; champús para el cabello y/o enjuagues para el cabello para seres humanos y otros animales; geles de ducha y baños espumantes y limpiadores de metales; así como sustancias auxiliares de limpieza tales como aditivos blanqueantes y los tipos “barra antimanchas” o para pretratamiento. En algunas realizaciones, las composiciones granuladas están en forma “compacta”; en algunas realizaciones, las composiciones líquidas están en forma “concentrada”.

Como se usa en la presente descripción, “composiciones para limpiar telas” incluyen composiciones detergentes para lavar ropa a mano o en una máquina que incluyen composiciones aditivas para lavar ropa y composiciones adecuadas para usar en el remojo y/o tratamiento previo de telas manchadas (p. ej., prendas de vestir, ropa blanca y otros materiales textiles).

Como se usa en la presente descripción, las “composiciones para limpiar artículos no tejidos” incluyen composiciones de limpieza de superficies no textiles (es decir, no tejidos) que incluyen, aunque no de forma limitativa, por ejemplo,

composiciones detergentes para lavado de vajilla a mano o manual o en máquina lavaplatos automática, composiciones de limpieza oral, composiciones de limpieza de dentaduras postizas y composiciones de aseo personal.

En la presente memoria, la expresión “composición limpiadora y/o tratante para telas y/o superficies duras” es un subgrupo de composiciones limpiadoras y tratantes que incluye, salvo que se indique lo contrario, agentes para el lavado granulados o en polvo universales o “de limpieza intensiva”, especialmente detergentes de limpieza; agentes para el lavado líquidos, en forma de gel o pasta universales, especialmente los tipos líquidos denominados de limpieza intensiva; detergentes líquidos para tejidos delicados; agentes para el lavado manual de vajillas o agentes para el lavado de vajillas de acción suave, especialmente los de tipo muy espumante; agentes para el lavado en lavavajillas, incluidos los diversos tipos en pastilla, granulado, líquido y coadyuvante de aclarado para uso doméstico e institucional; agentes líquidos para limpieza y desinfección, champús para coches o moquetas, limpiadores de baño incluidos limpiadores de inodoros; productos de acondicionamiento de tejidos incluidos suavizantes y/o agentes refrescantes que pueden estar en forma líquida, sólida y/o toallitas para la secadora de ropa; así como sustancias auxiliares de limpieza, tales como aditivos blanqueantes y “barras antimanchas” o de tipo tratamiento previo, productos cargados de sustratos tales como toallitas añadidas a la secadora de ropa. Todos estos productos que se pueden aplicar pueden estar en forma estándar, concentrada o incluso altamente concentrada, hasta tal punto que dichos productos en algún aspecto determinado pueden no ser acuosos.

Como se usa en la presente descripción, el término “composición detergente” o “formulación detergente” se usa con referencia a una composición prevista para usar en un medio de lavado para la limpieza de objetos manchados o sucios, que incluyen objetos o artículos tejidos y/o no tejidos particulares. Dichas composiciones de la presente invención no están limitadas a ninguna composición o formulación detergente en particular. Sin embargo, en algunas realizaciones, los detergentes de la invención comprenden al menos una proteasa variante de la invención y, además, uno o más tensoactivos, transferasas, enzimas hidrolíticas, oxidorreductasas, aditivos reforzantes de la detergencia (p. ej., una sal reforzante de la detergencia), agentes blanqueadores, activadores del blanqueador, agentes azulantes, tintes fluorescentes, inhibidores de endurecimiento, agentes enmascarantes, activadores de enzimas, antioxidantes y/o solubilizantes. En algunos casos una sal reforzante de la detergencia es una mezcla de una sal de silicato y una sal de fosfato, preferiblemente, con más silicato (p. ej., metasilicato sódico) que fosfato (p. ej., tripolifosfato sódico). Algunas composiciones de la invención, tales como, aunque no de forma limitativa, las composiciones de limpieza o composiciones detergentes, no contienen ningún fosfato (p. ej., sal de fosfato o agente reforzante de la detergencia de tipo fosfato).

Como se usa en la presente descripción, el término “blanqueo” se refiere al tratamiento de un material (p. ej., tela, ropa, pulpa, etc.) o superficie durante el tiempo suficiente y/o en las condiciones adecuadas de pH y/o temperatura para conseguir un abrillantamiento (p. ej., blanqueo) y/o limpieza del material. Los ejemplos de sustancias químicas adecuadas para el blanqueo incluyen, aunque no de forma limitativa, por ejemplo, ClO_2 , H_2O_2 , perácidos, NO_2 , etc.

Como se usa en la presente descripción, “capacidad limpiadora” de una proteasa (p. ej., una proteasa variante de la invención) se refiere a la contribución de una proteasa variante al lavado que proporciona una capacidad limpiadora adicional al detergente en comparación con el detergente sin la adición de la proteasa variante a la composición. La capacidad limpiadora se compara en condiciones de lavado relevantes. En algunos sistemas experimentales, otros factores relevantes tales como la composición detergente, la concentración de jabonaduras, la dureza del agua, la mecánica del lavado, el tiempo, el pH y/o la temperatura, se pueden controlar de forma que se imiten las condiciones típicas de una aplicación doméstica en un cierto segmento del mercado (p. ej., lavado de vajillas a mano o manual, lavado de vajilla en lavavajillas, limpieza de vajillas, limpieza de cubertería y cristalería, limpieza de telas, etc.).

La expresión “condiciones de lavado relevantes” se usa en la presente descripción para indicar las condiciones, especialmente la temperatura del lavado, el tiempo, la mecánica del lavado, la concentración de jabonaduras, el tipo de detergente y la dureza del agua, que se usan realmente en hogares en un segmento del mercado de detergente para lavado manual de vajillas, lavado en lavavajillas o para lavado de ropa.

La expresión “capacidad limpiadora mejorada” se usa para indicar que se obtiene un mejor resultado final en la eliminación de manchas en condiciones de lavado relevantes, o que se requiere menos proteasa variante, en una base de peso, para obtener el mismo resultado final con relación a la proteasa natural o precursora de partida correspondiente.

Como se usa en la presente descripción, el término “desinfectar” se refiere a eliminar los contaminantes de las superficies, así como inhibir o matar los microbios en las superficies de artículos. No se pretende que la presente descripción esté destinada a limitarse a ninguna superficie, elemento o contaminante(s) microbios en particular a eliminar.

La forma “compacta” de las composiciones de limpieza de la presente descripción se refleja mejor por densidad y en términos de composición, por la cantidad de carga de sal inorgánica. Las sales inorgánicas de relleno son ingredientes convencionales de composiciones de detergentes en forma de polvo. En composiciones convencionales de detergentes, las sales de relleno están presentes en cantidades sustanciales, típicamente, de aproximadamente 17 a aproximadamente 35 % en peso de la composición total. En contraste, en composiciones compactas, la sal de relleno se encuentra presente en cantidades que no exceden aproximadamente el 15 % de la composición total. En algunas realizaciones, la sal de relleno se encuentra presente en cantidades que no exceden aproximadamente 10 % o, con mayor preferencia, aproximadamente 5 %, en peso de la composición. En

algunas realizaciones, las sales inorgánicas de relleno se seleccionan de sales álcali y de metal de tierra alcalina de sulfatos y cloruros. En algunas realizaciones, la sal de relleno es sulfato de sodio.

La posición de un resto de aminoácido en una secuencia de aminoácidos dada se numera de forma típica, en la presente memoria, usando la numeración de la posición del correspondiente resto de aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la subtilisina de *B. amyloliquefaciens* BPN' mostrada en la Id de sec. n.º 1. La secuencia de aminoácidos de la subtilisina de *B. amyloliquefaciens* BPN' de la Id de sec. n.º 1 sirve de esta forma como secuencia de referencia. Una secuencia de aminoácidos dada, tal como una secuencia de aminoácidos de una proteasa variante descrita en la presente descripción se puede alinear con una secuencia BPN' (Id de sec. n.º 1) usando un algoritmo de alineamiento como se describe en la presente descripción, y un resto de aminoácido que de la secuencia de aminoácidos dada que se alinee (preferiblemente que se alinee óptimamente) con un resto de aminoácido de la secuencia BPN' se puede numerar por comodidad de uso por referencia al correspondiente resto de aminoácido en la secuencia de la subtilisina BPN'. Alternativamente, si las posiciones de los restos de aminoácidos en las secuencias de la proteasa variante de subtilisina se numeran usando la numeración real de las posiciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de GG36 (Id de sec. n.º 2), y no por referencia a las correspondientes posiciones de aminoácidos en la secuencia BPN' tras el alineamiento, la proteasa variante de subtilisina se puede describir como una proteasa variante de la proteasa GG36 mostrada en la Id de sec. n.º 2

Generalmente, la nomenclatura utilizada en la presente descripción y en muchos de los procedimientos de laboratorio usados en cultivo celular, genética molecular, química de ácidos nucleicos, y química de proteínas, descritos a continuación, son bien conocidos y habitualmente empleados por los expertos en la técnica. Los métodos para la producción y manipulación de métodos de ácidos nucleicos recombinantes, síntesis de ácidos nucleicos, métodos de cultivo de células e incorporación de transgenes (p. ej., transfección, electroporación) son conocidos por el experto en la técnica y se describen en numerosos textos estandarizados. La síntesis de oligonucleótidos y las etapas de purificación se realizan típicamente según las especificaciones. Las técnicas y los procedimientos se realizan generalmente según métodos convencionales bien conocidos en la técnica y se proporcionan diversas referencias generales a lo largo de este documento. Se considera que los procedimientos de dichos documentos son bien conocidos de los expertos en la técnica y se proporcionan para la comodidad del lector.

Polipéptidos para su uso en la invención

La presente invención comprende una o más variantes de proteasas, es decir, polipéptidos novedosos, que se pueden denominar colectivamente como "polipéptidos para usar en la invención". Los polipéptidos para usar en la invención incluyen polipéptidos de variantes de proteasas aislados, recombinantes, sustancialmente puros o de origen no natural que incluyen, por ejemplo, polipéptidos de variantes de subtilisina que tienen actividad enzimática (p. ej., actividad proteolítica). En algunas realizaciones, el polipéptido, tal como una variante de subtilisina, o una variante de GG36 que tiene la secuencia de la Id de sec. n.º 2, tiene una capacidad limpiadora mejorada en comparación con el precursor, p. ej., la proteasa GG36 que tiene la secuencia de la Id de sec. n.º 2. En algunas realizaciones, el polipéptido es útil en aplicaciones de limpieza y se puede incorporar a composiciones de limpieza que son útiles en métodos para limpiar un artículo o una superficie (p. ej., la superficie de un artículo) que requiera limpieza.

En algunas realizaciones, una proteasa variante para usar en la invención comprende una "subtilisina variante". En algunas realizaciones, la invención usa una proteasa variante de "*Bacillus sp.*". En algunas realizaciones, la invención usa una subtilisina variante de "*Bacillus sp.*". En algunas realizaciones, la invención usa una variante de subtilisina aislada. En algunas realizaciones, la invención usa una variante de subtilisina aislada de la proteasa subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*, en donde dicha proteasa subtilisina GG36 de *Bacillus lentus* comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la Id de sec. n.º 2.

En cualquiera de las realizaciones anteriores, la invención puede incluir una proteasa variante aislada, recombinante, sustancialmente pura o de origen no natural que tenga actividad proteolítica, cuyo polipéptido comprende una secuencia polipeptídica que tiene al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 86 %, al menos aproximadamente 87 %, al menos aproximadamente 88 %, al menos aproximadamente 89 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 91 %, al menos aproximadamente 92 %, al menos aproximadamente 93 %, al menos aproximadamente 94 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 %, al menos aproximadamente 99,5 %, o 100 % de identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos que codifican las proteasas variantes proporcionadas en la presente descripción.

Como se ha indicado anteriormente, los polipéptidos de variantes de proteasas tienen actividades enzimáticas (p. ej., actividades proteolíticas) y, por lo tanto, son útiles en aplicaciones de limpieza que incluyen, aunque no de forma limitativa, métodos para limpiar artículos de vajilla, artículos de vajilla de mesa, telas y artículos que tienen superficies duras (p. ej., la superficie dura de una mesa, encimera, pared, artículo de mobiliario, piso, techo, etc.). Las composiciones de limpieza ilustrativas que comprenden uno o más polipéptidos de variantes de proteasas se describen más adelante. La actividad enzimática (p. ej., actividad proteasa) de un polipéptido de variante de proteasa esencial en la presente invención se puede determinar fácilmente mediante el uso de procedimientos muy conocidos de los expertos en la técnica. Los ejemplos que se presentan más adelante describen métodos para

evaluar la actividad enzimática, capacidad limpiadora y/o capacidad de lavado. El rendimiento de las proteasas variantes de la invención para eliminar manchas (p. ej., una mancha proteica), para limpiar superficies duras o para limpiar ropa, vajilla o artículo(s) de cubertería y cristalería se puede determinar fácilmente con el uso de procedimientos bien conocidos en la técnica mediante el uso de procedimientos que se definen en los ejemplos.

Un polipéptido esencial para la presente invención puede someterse a varios cambios, tales como una o más inserciones, deleciones y/o sustituciones de aminoácidos, ya sean conservadoras o no conservadoras, que incluyen aquellas donde tales cambios no alteran sustancialmente la actividad enzimática del polipéptido. Similarmente, un ácido nucleico de la invención puede someterse, además, a varios cambios, tales como una o más sustituciones de uno o más ácidos nucleicos en uno o más codones, de manera que un codón particular codifica el mismo aminoácido o uno distinto, lo que resulta ya sea en una variación silenciosa (p. ej., una mutación en una secuencia de nucleótidos da como resultado una mutación silenciosa en la secuencia de aminoácidos, por ejemplo, cuando la mutación en el ácido nucleico no altera el aminoácido codificado) o una variación no silenciosa, una o más deleciones de uno o más ácidos nucleicos (o codones) en la secuencia, una o más adiciones o inserciones de uno o más ácidos nucleicos (o codones) en la secuencia y/o escisión de uno o más truncamientos de uno o más ácidos nucleicos (o codones) en la secuencia. Muchos de estos cambios en la secuencia de ácido nucleico pueden no alterar sustancialmente la actividad enzimática de la proteasa variante codificada resultante en comparación con la proteasa variante codificada por la secuencia de ácido nucleico original. Un ácido nucleico de la invención puede modificarse, además, para incluir uno o más codones que facilitan la expresión óptima en un sistema de expresión (p. ej., un sistema de expresión bacteriana), mientras que, si se desea, el codón o codones continúan con la codificación del aminoácido o aminoácidos.

En algunas realizaciones, la presente invención comprende un género de polipéptidos que comprenden polipéptidos de variantes de proteasas que tienen la actividad enzimática deseada (p. ej., actividad proteasa o actividad de capacidad limpiadora) que comprenden secuencias que tienen las sustituciones de aminoácidos descritas en la presente descripción y que también comprenden una o más sustituciones de aminoácidos adicionales, tales como sustituciones conservativas y no conservativas, en donde el polipéptido presenta, mantiene o mantiene aproximadamente la actividad enzimática deseada (p. ej., actividad proteasa o actividad subtilisina, como se refleja en la actividad o capacidad limpiadora de la proteasa variante). Las sustituciones de aminoácidos de conformidad con la presente invención pueden incluir, pero no se limitan a, una o más sustituciones no conservadoras y/o una o más sustituciones conservadoras de aminoácidos. Una sustitución conservadora de restos de aminoácidos implica, típicamente, intercambiar un elemento dentro de una clase funcional de restos de aminoácidos por un residuo que pertenece a la misma clase funcional (los restos de aminoácidos idénticos se consideran funcionalmente homólogos o se conservan al calcular el porcentaje de homología funcional). Una sustitución conservadora de aminoácidos implica, típicamente, sustituir un aminoácido en una secuencia de aminoácidos con un aminoácido funcionalmente similar. Por ejemplo, la alanina, glicina, serina y treonina son funcionalmente similares y, por lo tanto, pueden funcionar como sustituciones conservadoras de aminoácidos entre sí. El ácido aspártico y el ácido glutámico pueden funcionar como sustituciones conservadoras entre sí. La asparagina y la glutamina pueden funcionar como sustituciones conservadoras entre sí. La arginina, lisina e histidina pueden funcionar como sustituciones conservadoras entre sí. La isoleucina, leucina, metionina y valina pueden funcionar como sustituciones conservadoras entre sí. La fenilalanina, la tirosina y el triptófano pueden funcionar como sustituciones conservadoras entre sí.

Se puede prever otros grupos de sustituciones conservadoras de aminoácidos. Por ejemplo, los aminoácidos pueden agruparse por función, estructura química o composición similar (p. ej., ácidos, básicos, alifáticos, aromáticos, que contienen azufre). Por ejemplo, un grupo alifático puede comprender: glicina (G), alanina (A), valina (V), leucina (L), isoleucina (I). Otros grupos que contienen aminoácidos considerados como sustituciones conservadoras entre sí incluyen: aromáticos: fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W); con contenido de azufre: metionina (M), cisteína (C); Básicos: arginina (R), lisina (K), histidina (H); Ácidos: ácido aspártico (D), ácido glutámico (E); restos no polares no cargados, Cisteína (C), Metionina (M) y Prolina (P); restos hidrófilos no cargados: serina (S), treonina (T), asparagina (N) y glutamina (Q). Otros grupos de aminoácidos son muy conocidos por aquellos con experiencia en la técnica y se describen en varios libros de texto estándar. El listado de una secuencia de polipéptidos de la presente descripción, en conjunto con los grupos de sustitución mencionados anteriormente, proporciona un listado explícito de todas las secuencias de polipéptidos sustituidas conservadoramente.

En las clases de residuos de aminoácidos que se describieron anteriormente existen sustituciones más conservadoras que, además o alternativamente pueden ser adecuadas. Los grupos de conservación para sustituciones más conservadoras incluyen: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina y asparagina-glutamina. Por lo tanto, por ejemplo, en algunas realizaciones, la invención proporciona un polipéptido de proteasa variante aislado o recombinante (p. ej., subtilisina variante) que tiene actividad proteolítica, comprendiendo dicho polipéptido de proteasa variante una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, aproximadamente 99 %, o aproximadamente 99,5 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la Id de sec. n.º 2. No se espera que una sustitución conservativa de un aminoácido por otro en una proteasa variante de la invención altere significativamente la actividad enzimática o la capacidad limpiadora de la proteasa variante. La actividad enzimática o la actividad de capacidad limpiadora de la proteasa resultante se puede determinar fácilmente con el uso de ensayos estandarizados y de los ensayos descritos en la presente descripción.

Las variaciones sustituidas de forma conservativa en una secuencia polipeptídica de la invención (p. ej., las proteasas variantes de la invención) incluyen sustituciones en un pequeño porcentaje, a veces en menos de aproximadamente 25 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 14 %, aproximadamente 13 %, aproximadamente 12 %, aproximadamente 11 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 9 %, aproximadamente 8 %, aproximadamente 7 %, o aproximadamente 6 % de los aminoácidos de la secuencia polipeptídica, o menos de aproximadamente 5 %, aproximadamente 4 %, aproximadamente 3 %, aproximadamente 2 %, o aproximadamente 1 %, de los aminoácidos de la secuencia polipeptídica, por un aminoácido seleccionado de forma conservativa entre el mismo grupo de sustitución conservativo.

5
10
15 Como se describe de forma más detallada en otra parte de la presente descripción y en los Ejemplos proporcionados en la presente descripción, los polipéptidos para usar en la invención pueden tener capacidades de limpieza que se pueden comparar con las proteasas conocidas, incluidas las subtilisinas preferidas. Las proteasas subtilisina conocidas ilustrativas incluyen, aunque no de forma limitativa, por ejemplo, subtilisina GG36 de *B. lentus*, subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens*, subtilisina BPN'-Y217L de *B. amyloliquefaciens* y PB92 de *B. clausii*. La secuencia de aminoácidos de la proteína subtilisina GG36 madura de *B. lentus*:

AQSVPWGISRVQAPAAHNRGLTGSQVAVLDTGISTHPDLNIRGGASVFPGEPTQDGNHGHGTHVAGTIAALNNS
IGVLGVAPSAELYAVKVLGASGSGSVSSIAQGLEWAGNNGMHVANLSLGSPPSATLEQAVNSATSARGVLVVAASG
NSGAGSISYPARYANAMAVGATDQNNNRASFQYAGGLDIVAPGVNVQSTYPGSTYASLNGTSMATPHVAGAAAL
20
VKQKNPSWSNVQIRNHL
KNTATSLGSTNLYGSGLVNAEAATR (Id. de sec. n.º:2)

La secuencia de aminoácidos de la proteína subtilisina BPN' madura de *B. amyloliquefaciens* es:

25
30 AQSVPYGVVSIKAPALHSQGYTGSNVKVAVIDSGIDSSHPDLKVAGGASMPSETNPFQDNNSHGTHVAGTVAALN
NSIGVLGVAPSASLYAVKVLGADGSGQYSWIINGIEWAIANNMMDVINMSLGGPSGSAALKAAVDKAVASGVVVAAA
GNEGTSQSSSTVGYPGKYPSVIAVGAVDSSNQRASFSSVGPPELDVMAPGVSIQSTLPGNKYGAYNGTSMASPHVA
GAAALILSKHPNWTNTQVRSSL
ENTTTKLGDSFYGKGLINVQAAAQ (Id. de sec. n.º:1)

La presente invención puede comprender una variante de subtilisina aislada, en donde dicha variante de subtilisina es una forma madura que tiene actividad proteolítica y que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende una combinación de sustituciones de aminoácidos en posiciones seleccionadas de la siguiente lista (Listas 1 a 3):

35 T022A-S103A-V104I-N116L-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F,
T022A-S101G-V104I-N116L-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F,
T022A-S101G-S103A-V104I-N116L-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F,
T022A-S101G-S103A-V104I-N116L-G159D-S188D-Q245R-N248D-E271F,
T022A-S101G-S103A-V104I-N116L-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F,
40 T022A-S101G-S103A-V104I-N116L-G159D-S188D-A232V-Q245R -E271F,
T022A-S101G-S103A-V104I-N116L-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F,
T022A-T033S-S101G-S103A-V104I-N116L-G159D-S188D-T213A-A232V-Q245R-N248D-E271F,
T022A-V068A-S101G-S103A-V104I-N116L-G159D-S188D-T213A-A232V-Q245R-N248D-E271F,
T022A-S101G-S103A-V104I-N116L-G159D-S188D-T213A-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-S101G-S103A-
45 V104I-N116L-S128L-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F,
T022A-V068A-S101G-S103A-V104I-N116L-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F, (**Lista 1**); o en donde dicha
variante de subtilisina es una forma madura que tiene actividad proteolítica y que comprende una secuencia de
aminoácidos que comprende una combinación de sustituciones de aminoácidos en posiciones seleccionadas de:

50 T022A-S101G-S103A-V104I-N116L-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D,
T022A-N076D-S101G-S103A-V104I-I107V-N123S-P129E-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F-A272V,
T022A-S024R-N076D-S101G-S103A-V104I-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F,
T022A-S024G-N076D-S078N-S101G-S103A-V104I-S128A-G159D-S188D-L217Q-A232V-Q245R-N248D-E271F,
T022A-S078N-G097S-S101G-S103A-V104I-G159D-S188D- T022A-S101G-S103A-V104I-N116L-S128L-G159D-
55 S188D-T213A-A232V-Q245R-N248D-E271F,
T022A-N062D-S101G-S103A-V104I-N116L-G159D-S188D-T213A-A232V-Q245R-N248D-E271F, 70, línea 15 ab(**Lista
2**); o en donde dicha variante de subtilisina es una forma madura que tiene actividad proteolítica y que comprende una
secuencia de aminoácidos que comprende una combinación de sustituciones de aminoácidos en posiciones
seleccionadas de: T022A-T033S-S101G-S103A-V104I-N116L-S128L-G159D-S188D-A232V-Q245R-
60 N248D-E271F,
T022A-T033S-S101G-S103A-V104I-N116L-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F,
T022A-T033S-S101G-S103A-V104I-N116L-S128L-G159D-S188D-T213A-A232V-Q245R-N248D-E271F, (**Lista 3**).

La presente invención además puede comprender una variante de subtilisina aislada de la proteasa subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*, como se ha relacionado anteriormente, en donde dicha variante de subtilisina tiene al

menos 95 % de identidad de aminoácidos con dicha proteasa subtilisina GG36 de *Bacillus lentus* que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la Id de sec. n.º 2.

5 La presente invención además puede comprender una variante de subtilisina aislada de la proteasa subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*, como se ha relacionado anteriormente, en donde dicha variante de subtilisina tiene al menos 98 % de identidad de aminoácidos con dicha proteasa subtilisina GG36 de *Bacillus lentus* que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la Id de sec. n.º 2.

10 La presente invención además puede comprender una variante de subtilisina aislada de la proteasa subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*, como se ha relacionado anteriormente, en donde dicha variante de subtilisina tiene al menos 99 % de identidad de aminoácidos con dicha proteasa subtilisina GG36 de *Bacillus lentus* que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la Id de sec. n.º 2.

15 La presente invención además puede comprender cualquiera de las variantes de subtilisina aisladas anteriormente relacionadas, en donde la carga neta total de la variante es 0, +1, +2, +3, +4, +5, -1, -2, -3, -4 o -5 con respecto a la carga neta total de la proteasa subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*. En algunas realizaciones, la carga neta total se obtiene mediante una o más sustituciones seleccionadas de: A001E, V004E, R010H/A, Q012E, A015D, N018D, R019H/S, V026D, K027E, N043D, R045C/T/S/P, S049D, V051E, G061E, N062D/E, N076D, N077D, S078D, S087D, A098E, S101D, S106E, G115E, G118D, N123D, S128D, P129E, S130D/E, S132D, A158E, G159D/E, S160D, S166D, R170T, N183D, N184D, N185E, R186H, S188D/E, A194E, A200D, Y209E, A215D, N204D, S212D, L217D/E, N218D, A230E, K235F, N237D, K237E, N238D, S240D, N243D, Q245D, R247L, N248D/E, K251C, N263D, N269D/E, A272D, A273E, R275H/S, A001R, V004R, Q012R, P014R, H017R, N018R/K, G020K/R, T022R/K, S024R/K, G025R, D032I, D041K/L/N, N043R/K, G046R, A048R, F050R/K, P055R, S056R/K, T057R, Q059K, G061R, N076K, S078R, P086R, S087R, E089G/P/I, G097R, S099R, Q109R, G115R, G118R, S132K, S144R, G159R/K, D181C/S/T, L196K, N204K, Q206R, K235R, Q236R/K, K237R, N238R, S240R, W241R, S242R/K, V244R, Q245R/K, N248R, H249R, N252R/K, S256R, G258R, T260K, N269R/K, y/o E271F/H/T/L/W/R/S/I/A/G/V, y en donde las posiciones de aminoácidos de la variante de proteasa, más específicamente las variantes de subtilisina, se han numerado según la numeración de las correspondientes posiciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada en la Id. de sec. n.º 1.

30 La presente invención también puede comprender variantes de proteasa aisladas, más específicamente variantes de subtilisina, en donde dicha variante de proteasa, más específicamente variantes de subtilisina, tiene al menos una o incluso dos o más mutaciones cargadas seleccionadas del grupo que consiste en A001E, V004E, R010H/A, Q012E, A015D, N018D, R019H/S, V026D, K027E, N043D, R045C/T/S/P, S049D, V051E, G061E, N062D/E, N076D, N077D, S078D, S087D, A098E, S101D, S106E, G115E, G118D, N123D, S128D, P129E, S130D/E, S132D, A158E, G159D/E, S160D, S166D, R170T, N183D, N184D, N185E, R186H, S188D/E, A194E, A200D, Y209E, A215D, N204D, S212D, L217D/E, N218D, A230E, K235F, N237D, K237E, N238D, S240D, N243D, Q245D, R247L, N248D/E, K251C, N263D, N269D/E, A272D, A273E, y/o R275H/S, teniendo preferiblemente una carga de 0, -1, -2, -3, -4 o -5, preferiblemente 0, -1, -2 o -3, con la máxima preferencia -1 o -2 con respecto a la enzima de la Id de sec. n.º 1. Dichas variantes de proteasa, más específicamente variantes de subtilisina, también pueden incluir cualquiera de las variantes relacionadas en la solicitud.

45 La presente invención también puede comprender variantes de proteasa aisladas, más específicamente variantes de subtilisina, en donde dicha variante de proteasa, más específicamente variantes de subtilisina tiene una o dos o más mutaciones cargadas seleccionadas del grupo que consiste en A001R, V004R, Q012R, P014R, H017R, N018R/K, G020K/R, T022R/K, S024R/K, G025R, D032I, D041K/L/N, N043R/K, G046R, A048R, F050R/K, P055R, S056R/K, T057R, Q059K, G061R, N076K, S078R, P086R, S087R, E089G/P/I, G097R, S099R, Q109R, G115R, G118R, S132K, S144R, G159R/K, D181C/S/T, L196K, N204K, Q206R, K235R, Q236R/K, K237R, N238R, S240R, W241R, S242R/K, V244R, Q245R/K, N248R, H249R, N252R/K, S256R, G258R, T260K, N269R/K, y/o E271F/H/T/L/W/R/S/I/A/G/V, teniendo preferiblemente una carga de 0, +1, +2, +3, +4 o +5, preferiblemente +1, +2 o +3, con la máxima preferencia +2 con respecto a la enzima de la Id de sec. n.º 1. Dichas variantes de proteasa, más específicamente variantes de subtilisina, también pueden incluir cualquiera de las variantes relacionadas en la solicitud.

55 En algunas realizaciones, cualquiera de las variantes de subtilisina aislada anteriormente relacionada se puede incorporar a una composición detergente adecuada para su adición a agua para preparar una solución de lavado que tiene baja fuerza iónica o baja concentración de detergente. Por lo tanto, en un aspecto preferido de la invención, estas variantes formarán parte de una composición detergente que se añade al agua, ya sea para un proceso de lavado a mano o a máquina, de forma típica en una lavadora, para formar una solución de lavado, cuya conductividad es de aproximadamente 0,1 mS/cm a aproximadamente 3 mS/cm, de aproximadamente 0,3 mS/cm a aproximadamente 2,5 mS/cm o incluso de aproximadamente 0,5 mS/cm a aproximadamente 2 mS/cm. Las variantes preferidas para usar en baja fuerza iónica o baja concentración de detergente se selecciona entre las variantes de cualquiera de las listas 1, 2 o 3, preferiblemente 2 anterior.

65 Sin pretender imponer ninguna teoría, se cree que estas mutaciones para conseguir una carga neta deseada, proporcionan un mejor rendimiento global de la proteasa asegurando una carga óptima de la molécula en condiciones de baja fuerza iónica, o soluciones de lavado que comprenden una baja concentración de detergente,

es solo mediante la combinación cuidadosa de determinadas mutaciones, de las cuales estas son preferidas, que se pueden obtener dichas proteasas preferidas.

En algunas realizaciones, cualquiera de las variantes de subtilisina aislada anteriormente relacionada se puede incorporar a una composición detergente adecuada para su adición a agua para preparar una solución de lavado que tiene elevada fuerza iónica o elevada concentración de detergente. Por lo tanto, en un aspecto preferido de la invención, estas variantes formarán parte de una composición detergente que se añade al agua, ya sea para un proceso de lavado a mano o a máquina, de forma típica en una lavadora, para formar una solución de lavado, cuya conductividad es de aproximadamente 3 mS/cm a aproximadamente 30 mS/cm, de aproximadamente 3,5 mS/cm a aproximadamente 20 mS/cm o incluso de aproximadamente 4 mS/cm a aproximadamente 10 mS/cm.

Preferiblemente, estas proteasas forman parte de una composición detergente que se añade al agua, ya sea para un proceso de lavado a mano o a máquina, de forma típica en una lavadora, para formar una solución de lavado, cuya conductividad es de aproximadamente 3 mS/cm a aproximadamente 30 mS/cm, de aproximadamente 3,5 mS/cm a aproximadamente 20 mS/cm o incluso de aproximadamente 4 mS/cm a aproximadamente 10 mS/cm.

Sin pretender imponer ninguna teoría, se cree que estas mutaciones para conseguir una carga neta deseada, proporcionan un mejor rendimiento global de la proteasa en condiciones de alta fuerza iónica o de alta concentración de detergente. Es solo mediante la combinación cuidadosa de determinadas mutaciones, de las cuales estas son preferidas, que se pueden obtener dichas proteasas preferidas.

La presente invención además puede comprender cualquiera de las variantes de subtilisina aisladas anteriormente relacionadas que tienen una o más de las siguientes características: a) un índice de rendimiento en el método de ensayo 2 de al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2, de 1,1 a aproximadamente 10, de 1,1 a aproximadamente 8, o incluso de 1,1 a aproximadamente 5; b) un índice de rendimiento en el Método de ensayo 3 de al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2, de 1,1 a aproximadamente 10, de 1,1 a aproximadamente 8 o incluso de 1,1 a aproximadamente 5; c) un índice de rendimiento del método de ensayo 4 de al menos 1,0, al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2, de 1,0 a aproximadamente 10, de 1,0 a aproximadamente 8 o incluso de 1,0 a aproximadamente 5; y/o d) un índice de rendimiento en el método de ensayo 6 de al menos 1,0, al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2, de 1,0 a aproximadamente 10, de 1,0 a aproximadamente 8 o incluso de 1,0 a aproximadamente 5; y/o e) índice de rendimiento en el Método de ensayo 7 de al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2, de 1,1 a aproximadamente 15, de 1,1 a aproximadamente 10 o incluso de 1,1 a aproximadamente 7. El Método de ensayo 2, el Método de ensayo 3, el Método de ensayo 4, el Método de ensayo 6 y el Método de ensayo 7 se describen explícitamente más adelante en la sección del Ejemplo 1 titulada "Métodos de ensayo".

Ácidos nucleicos para codificar polipéptidos para usar en la invención

En la presente descripción se describen ácidos nucleicos aislados, que no son de origen natural, o recombinantes (también denominados en la presente descripción como "polinucleótidos"), que se pueden denominar colectivamente como "ácidos nucleicos para codificar polipéptidos para usar en la invención" o "polinucleótidos para codificar polipéptidos para usar en la invención", que codifican polipéptidos para usar en la invención. Los ácidos nucleicos para codificar polipéptidos para usar en la invención, que incluyen todos los que se describen a continuación, son útiles en la producción recombinante (p. ej., expresión) de polipéptidos para usar en la invención, típicamente, a través de la expresión de un vector de expresión plasmídico que comprende una secuencia que codifica el polipéptido de interés o fragmento del mismo. Según se describe anteriormente, los polipéptidos incluyen polipéptidos de variantes de proteasas que incluyen polipéptidos de variantes de subtilisina que tienen actividad enzimática (p. ej., actividad proteolítica) que son útiles en aplicaciones de limpieza y composiciones de limpieza para limpiar un artículo o una superficie (p. ej., la superficie de un artículo) que requiere limpieza.

En la presente descripción se describen ácidos nucleicos aislados, recombinantes, sustancialmente puros o de origen no natural que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica cualquier polipéptido (que incluye cualquier proteína de fusión, etc.) de la invención descrito anteriormente en la sección titulada "polipéptidos para usar en la invención" y en cualquier otro sitio de la presente descripción. También se describe en la presente descripción un ácido nucleico aislado, recombinante, sustancialmente puro o de origen no natural que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una combinación de dos o más polipéptidos de la invención descritos anteriormente y en cualquier otro lugar de la presente descripción.

También se describe un ácido nucleico aislado, recombinante, sustancialmente puro o de origen no natural que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica una proteasa variante para usar en la presente invención que tiene actividad proteolítica, comprendiendo dicha proteasa variante (p. ej., subtilisina variante) una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de aminoácidos de la Id de sec. n.º 2 en no más de 50, no más de 40, no más de 30, no más de 25, no más de 20, no más de 19, no más de 18, no más de 17, no más de 16, no más de 15, no más de

14, no más de 13, no más de 12, no más de 11, no más de 10, no más de 9, no más de 8, no más de 7, no más de 6, no más de 5, no más de 4, no más de 3, no más de 2, o no más de 1 resto(s) de aminoácidos, en donde las posiciones de los aminoácidos de la subtilisina variante están numerados según la numeración de las correspondientes posiciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada en la Id de sec. n.º 1 como se determina mediante el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de una proteasa variante con la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*.

En la presente descripción se describen ácidos nucleicos que codifican una variante de subtilisina aislada, en donde dicha variante de subtilisina es una forma madura que tiene actividad proteolítica y que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende una combinación de sustituciones de aminoácidos en posiciones seleccionadas de la **Lista 1**, y en donde las posiciones de aminoácidos de la variante de subtilisina están numeradas según la numeración de las correspondientes posiciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada en la Id de sec. n.º 1.

En la presente descripción se describen ácidos nucleicos que codifican una variante de subtilisina aislada, en donde dicha variante de subtilisina es una forma madura que tiene actividad proteolítica y que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende una combinación de sustituciones de aminoácidos en posiciones seleccionadas de la **Lista 2**, y en donde las posiciones de aminoácidos de la variante de subtilisina están numeradas según la numeración de las correspondientes posiciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada en la Id de sec. n.º 1.

En la presente descripción se describen ácidos nucleicos que codifican una variante de subtilisina aislada, en donde dicha variante de subtilisina es una forma madura que tiene actividad proteolítica y que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende una combinación de sustituciones de aminoácidos en posiciones seleccionadas de la **Lista 3**, y en donde las posiciones de aminoácidos de la variante de subtilisina están numeradas según la numeración de las correspondientes posiciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada en la Id de sec. n.º 1.

En la presente descripción se describen ácidos nucleicos que codifican cualquiera de las variantes de subtilisina anteriormente aisladas, en donde la variante de subtilisina es una variante de proteasa de la proteasa subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*, en donde dicha proteasa subtilisina GG36 de *Bacillus lentus* comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la Id de sec. n.º 2.

En la presente descripción se describen ácidos nucleicos que codifican una variante de subtilisina aislada de la proteasa subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*, como se ha relacionado anteriormente, en donde dicha variante de subtilisina tiene al menos 90 % de identidad de aminoácidos con dicha proteasa subtilisina GG36 de *Bacillus lentus* que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la Id de sec. n.º 2.

En la presente descripción se describen ácidos nucleicos que codifican una variante de subtilisina aislada de la proteasa subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*, como se ha relacionado anteriormente, en donde dicha variante de subtilisina tiene al menos 95 % de identidad de aminoácidos con dicha proteasa subtilisina GG36 de *Bacillus lentus* que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la Id de sec. n.º 2.

En la presente descripción se describen ácidos nucleicos que codifican una variante de subtilisina aislada de la proteasa subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*, como se ha relacionado anteriormente, en donde dicha variante de subtilisina tiene al menos 98 % de identidad de aminoácidos con dicha proteasa subtilisina GG36 de *Bacillus lentus* que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la Id de sec. n.º 2.

En la presente descripción se describen ácidos nucleicos que codifican una variante de subtilisina aislada de la proteasa subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*, como se ha relacionado anteriormente, en donde dicha variante de subtilisina tiene al menos 99 % de identidad de aminoácidos con dicha proteasa subtilisina GG36 de *Bacillus lentus* que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la Id de sec. n.º 2.

La presente invención proporciona además ácidos nucleicos que codifican cualquiera de las variantes de subtilisina aisladas anteriormente relacionadas, en donde la carga neta total de la variante es 0, +1, +2, +3, +4, +5, -1, -2, -3, -4 o -5 con respecto a la carga neta total de la proteasa subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*. En algunas realizaciones, la carga neta total se obtiene mediante una o más sustituciones seleccionadas de: A001E, V004E, R010H/A, Q012E, A015D, N018D, R019H/S, V026D, K027E, N043D, R045C/T/S/P, S049D, V051E, G061E, N062D/E, N076D, N077D, S078D, S087D, A098E, S101D, S106E, G115E, G118D, N123D, S128D, P129E, S130D/E, S132D, A158E, G159D/E, S160D, S166D, R170T, N183D, N184D, N185E, R186H, S188D/E, A194E, A200D, Y209E, A215D, N204D, S212D, L217D/E, N218D, A230E, K235F, N237D, K237E, N238D, S240D, N243D, Q245D, R247L, N248D/E, K251C, N263D, N269D/E, A272D, A273E, R275H/S, A001R, V004R, Q012R, P014R, H017R, N018R/K, G020K/R, T022R/K, S024R/K, G025R, D032I, D041K/L/N, N043R/K, G046R, A048R, F050R/K, P055R, S056R/K, T057R, Q059K, G061R, N076K, S078R, P086R, S087R, E089G/P/I, G097R, S099R, Q109R, G115R, G118R, S132K, S144R, G159R/K, D181C/S/T, L196K, N204K, Q206R, K235R, Q236R/K, K237R, N238R, S240R, W241R, S242R/K, V244R, Q245R/K, N248R, H249R, N252R/K, S256R, G258R, T260K, N269R/K o E271F/H/T/L/W/R/S/I/A/G/V, y en donde las posiciones de aminoácidos de

la variante de proteasa se han numerado según la numeración de las correspondientes posiciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada en la Id. de sec. n.º1.

5 La presente invención proporciona además ácidos nucleicos que codifican variantes de proteasa aisladas, más específicamente variantes de subtilisina, en donde dicha variante de proteasa tiene al menos una o incluso dos o más mutaciones cargadas seleccionadas del grupo que consiste en A001E, V004E, R010H/A, Q012E, A015D, N018D, R019H/S, V026D, K027E, N043D, R045C/T/S/P, S049D, V051E, G061E, N062D/E, N076D, N077D, S078D, S087D, A098E, S101D, S106E, G115E, G118D, N123D, S128D, P129E, S130D/E, S132D, A158E, G159D/E, S160D, S166D, R170T, N183D, N184D, N185E, R186H, S188D/E, A194E, A200D, Y209E, A215D, N204D, S212D, L217D/E, N218D, 10 A230E, K235F, N237D, K237E, N238D, S240D, N243D, Q245D, R247L, N248D/E, K251C, N263D, N269D/E, A272D, A273E, y/o R275H/S, teniendo preferiblemente una carga de 0, -1, -2, -3, -4 o -5, preferiblemente 0, -1, -2 o -3, con la máxima preferencia -1 o -2 con respecto a la enzima de la Id de sec. n.º1. Dichas variantes de proteasa, más específicamente variantes de subtilisina, también pueden incluir cualquiera de las variantes relacionadas en la solicitud.

15 La presente invención también proporciona variantes de proteasa aisladas, más específicamente variantes de subtilisina, en donde dicha variante de proteasa tiene una o dos o más mutaciones cargadas seleccionadas del grupo que consiste en A001R, V004R, Q012R, P014R, H017R, N018R/K, G020K/R, T022R/K, S024R/K, G025R, D032I, D041K/L/N, N043R/K, G046R, A048R, F050R/K, P055R, S056R/K, T057R, Q059K, G061R, N076K, S078R, P086R, S087R, E089G/P/I, G097R, S099R, Q109R, G115R, G118R, S132K, S144R, G159R/K, D181C/S/T, L196K, 20 N204K, Q206R, K235R, Q236R/K, K237R, N238R, S240R, W241R, S242R/K, V244R, Q245R/K, N248R, H249R, N252R/K, S256R, G258R, T260K, N269R/K, y/o E271F/H/T/L/W/R/S//A/G/V y/o N269R, teniendo preferiblemente una carga de 0, +1, +2, +3, +4 o +5, preferiblemente +1, +2 o +3, con la máxima preferencia +2 con respecto a la enzima de la Id de sec. n.º1. Dichas variantes de proteasa, más específicamente variantes de subtilisina, también pueden incluir cualquiera de las variantes relacionadas en la solicitud.

25 Como se indica en la presente descripción, las variantes de proteasa de agua fría adecuadas, o variantes de subtilisina, son variantes de una proteasa precursora, siendo la secuencia de dicha proteasa precursora al menos 97 %, al menos 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la Id. de sec. n.º1, teniendo dicha variante de proteasa una o más de las siguientes características:

30 a) índice de rendimiento en el Método de ensayo 2 de al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2, de 1,1 a aproximadamente 10, de 1,1 a aproximadamente 8 o incluso de 1,1 a aproximadamente 5; b) un índice de rendimiento en el Método de ensayo 3 de al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2, de 1,1 a aproximadamente 10, de 1,1 a aproximadamente 8 o incluso de 1,1 a aproximadamente 5; c) un índice de rendimiento del método de ensayo 4 de al menos 1,0, al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2, de 1,0 a aproximadamente 10, de 1,0 a aproximadamente 8 o incluso de 1,0 a aproximadamente 5; y/o d) un índice de rendimiento en el método de ensayo 6 de al menos 1,0, al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2, de 1,0 a aproximadamente 10, de 1,0 a aproximadamente 8 o incluso de 1,0 a aproximadamente 5; y/o e) índice de rendimiento en el Método de ensayo 7 de al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2, de 1,1 a aproximadamente 15, de 1,1 a aproximadamente 10 o incluso de 1,1 a aproximadamente 7. El Método de ensayo 2, el Método de ensayo 3, el 35 Método de ensayo 4, el Método de ensayo 6 y el Método de ensayo 7 se describen explícitamente más adelante en la sección del Ejemplo 1 titulada "Métodos de ensayo". Todas las mutaciones citadas en la presente descripción utilizan el esquema de numeración BPN' que se muestra en la Figura 1. En algunas realizaciones, la variantes citadas en la presente descripción se refieren a variantes que tienen secuencias de aminoácidos comparadas con la secuencia de aminoácidos de la Id de sec. n.º2, usando el esquema de numeración BPN'.

50 En algunas realizaciones, las anteriores variantes de proteasa de agua fría de alta fuerza iónica, más específicamente, las variantes de subtilisina forman parte de una composición detergente que se diluye en agua, típicamente dentro de una lavadora de ropa, para formar una solución de lavado de detergente para lavado de ropa cuya conductividad es de aproximadamente 3 mS/cm a aproximadamente 30 mS/cm, de aproximadamente 3,5 mS/cm a aproximadamente 20 mS/cm o incluso de aproximadamente 4 mS/cm a aproximadamente 10 mS/cm.

La carga de las variantes de proteasa de agua fría, más específicamente las variantes de subtilisina, se expresa con respecto a la proteasa subtilisina GG36 de *B. lentus* natural que tiene la secuencia de aminoácidos de la Id. de sec. n.º2. Los aminoácidos que confieren una sola carga negativa son D y E y los que confieren una única carga positiva son R, H y K. Cualquier cambio de aminoácido en comparación con la Id. de sec. n.º2 que cambia una carga se usa para calcular la carga de la variante de proteasa de agua fría. Por ejemplo, la introducción de una mutación de carga negativa a partir de una posición neutra de tipo silvestre, añadirá una carga neta de -1 a la variante de proteasa de agua fría, mientras que la introducción de una mutación de carga negativa (D o E) a partir de un resto de aminoácido positivo de tipo silvestre (R, H o K) añadirá una carga neta de -2. Sumando los 60 cambios de carga de todos los restos de aminoácidos que son diferentes para la variante de proteasa de agua fría en comparación con la proteasa de la subtilisina GG36 de *B. lentus* natural que tiene la secuencia de aminoácidos

de la Id. de sec. n.º 2, proporciona el cambio de carga de la variante de proteasa de agua fría. Sin pretender imponer ninguna teoría, se cree que el intervalo de cargas preferido para proteasas de agua fría a usar en soluciones detergentes de lavado de ropa de baja conductividad es de -5, -4, -3, -2, -1, 0, particularmente -2, -1; el intervalo de cargas preferido para proteasas de agua fría a usar en soluciones detergentes de lavado de ropa de alta conductividad es de +5, +4, +3, +2, +1, 0, particularmente +2, +1. Al seleccionar correctamente la carga, se puede obtener de forma inesperada una mejora de los niveles de capacidad limpiadora en agua fría. Las "soluciones detergentes para el lavado de ropa de baja conductividad" se definen por tener una conductividad de aproximadamente 0,1 mS/cm a aproximadamente 3 mS/cm, de aproximadamente 0,3 mS/cm a aproximadamente 2,5 mS/cm o incluso de aproximadamente 0,5 mS/cm a aproximadamente 2 mS/cm. Las "soluciones detergentes para el lavado de ropa de alta conductividad" se definen por tener una conductividad de aproximadamente 3 mS/cm a aproximadamente 30 mS/cm, de aproximadamente 3,5 mS/cm a aproximadamente 20 mS/cm o incluso de aproximadamente 4 mS/cm a aproximadamente 10 mS/cm. Se pretende que los ejemplos anteriores sean no limitativos. Una vez que se han combinado las mutaciones para optimizar el comportamiento en agua fría, la carga de la enzima también se puede equilibrar mediante mutaciones en posiciones adicionales.

En algunas realizaciones, la invención proporciona una proteasa variante aislada, recombinante, sustancialmente pura o de origen no natural (p. ej., subtilisina variante) que tiene actividad proteolítica, comprendiendo dicha proteasa variante una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de aminoácidos mostrada en la Id de sec. n.º 2 en no más de 50, no más de 45, no más de 40, no más de 35, no más de 30, no más de 25, no más de 20, no más de 19, no más de 18, no más de 17, no más de 16, no más de 15, no más de 14, no más de 13, no más de 12, no más de 11, no más de 10, no más de 9, o no más de 8 restos de aminoácidos, en donde las posiciones de los aminoácidos están numerados según la numeración de las correspondientes posiciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada en la Id de sec. n.º 1, como se determina mediante el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de una proteasa variante con la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*.

Los ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de la invención pueden producirse con el uso de cualquier síntesis adecuada, manipulación y/o técnicas de aislamiento, o combinaciones de estas. Por ejemplo, un polinucleótido de la invención se puede producir con el uso de técnicas estándar de síntesis de ácido nucleico, tales como las técnicas de síntesis en fase sólida que son muy conocidas para aquellos con experiencia en la técnica. En dichas técnicas, los fragmentos de hasta 50 o más bases de nucleótidos se sintetizan, típicamente, después, se unen (p. ej., por métodos de unión enzimática o química, o por métodos de recombinación mediada por la polimerasa) para formar esencialmente cualquier secuencia de ácido nucleico continua deseada. La síntesis de los ácidos nucleicos que codifican polipéptidos para usar en la invención también se puede facilitar por cualquier método adecuado conocido en la técnica que incluye, aunque no de forma limitativa, síntesis química con el uso del método de fosforamida clásico (véase, p. ej., Beaucage y col. *Tetrahedron Letters* 22:1859-69 [1981]); o el método descrito por Matthes y col. (véase, Matthes y col., *EMBO J.* 3:801-805 [1984], como se practica, típicamente, en métodos de síntesis automáticos. Los ácidos nucleicos que codifican polipéptidos para usar en la invención también se pueden producir con el uso de un sintetizador automático de ADN. Se pueden solicitar ácidos nucleicos personalizados a una gran diversidad de fuentes comerciales (p. ej., The Midland Certified Reagent Company, the Great American Gene Company, Operon Technologies Inc. y DNA2.0). En la técnica se conocen otras técnicas para sintetizar ácidos nucleicos y principios relacionados (véase, p. ej., Itakura y col., *Ann. Rev. Biochem.* 53:323 [1984]; e Itakura y col., *Science* 198:1056 [1984]).

Como se indicó anteriormente, las técnicas de ADN recombinante útiles en la modificación de ácidos nucleicos son muy conocidas en la técnica. Por ejemplo, técnicas, tales como digestión con endonucleasas de restricción, unión, transcripción inversa y producción de ADNc y reacción en cadena de la polimerasa (p. ej., PCR) son conocidas por los expertos en la técnica que las usan fácilmente. Los nucleótidos de la invención también se pueden obtener por cribado de bibliotecas de ADNc (p. ej., bibliotecas de ADNc generadas usando técnicas de mutagénesis habitualmente utilizadas en la técnica, incluidas las descritas en la presente descripción) usando una o más sondas de oligonucleótidos que se pueden hibridar a nucleótidos, o que pueden amplificar polinucleótidos mediante la PCR, que codifican uno o más polipéptidos de variantes de proteasas de la invención. Los procedimientos para evaluar y aislar clones de ADNc y los procedimientos de amplificación de PCR son muy conocidos por los expertos en la técnica y se describen en referencias estándar conocidas para aquellos con experiencia en la técnica. Algunos ácidos nucleicos que codifican polipéptidos para usar en la invención se pueden obtener alterando una cadena principal de polinucleótidos de origen natural (p. ej., que codifica una enzima o proteasa precursora) mediante, por ejemplo, un procedimiento de mutagénesis conocido (p. ej., mutagénesis dirigida al sitio, mutagénesis de saturación del sitio y recombinación *in vitro*).

Métodos para preparar proteasas variantes modificadas de la invención

En la técnica se conocen diversos métodos adecuados para generar polinucleótidos modificados para codificar polipéptidos para usar en la invención que codifiquen proteasas variantes de la invención que incluyen, aunque no de forma limitativa, por ejemplo, mutagénesis de saturación del sitio, mutagénesis de detección, mutagénesis de inserción, mutagénesis de delección, mutagénesis aleatoria, mutagénesis dirigida al sitio y evolución dirigida, además de varios métodos recombinantes diferentes. Los métodos para fabricar polinucleótidos y proteínas modificados (p. ej., proteasas variantes) incluyen metodologías de intercambio de ADN, métodos basados en la

recombinación no homóloga de genes, tal como ITCHY (Véase, Ostermeier y col., 7:2139-44 [1999]), SCRACHY (Véase, Lutz y col. 98:11248-53 [2001]), SHIPREC (Véase, Sieber y col., 19:456-60 [2001]), y NRR (Véase, Bittker y col., 20:1024-9 [2001]; Bittker y col., 101:7011-6 [2004]), y métodos que se basan en el uso de oligonucleótidos para insertar mutaciones aleatorias y dirigidas, deleciones y/o inserciones (Véanse, Ness y col., 20:1251-5 [2002]; Coco y col., 20:1246-50 [2002]; Zha y col., 4:34-9 [2003]; Glaser y col., 149:3903-13 [1992]).

Vectores células y métodos para producir proteasas variantes de la invención

En la presente descripción se describen vectores aislados o recombinantes que comprenden al menos un polinucleótido de la invención descrito en la presente descripción (p. ej., un polinucleótido que codifica una proteasa variante de la invención descrito en la presente descripción), vectores de expresión o casetes de expresión aislados o recombinantes que comprenden al menos un ácido nucleico o polinucleótido de la invención, construcciones de ADN aislados, sustancialmente puros o recombinantes que comprenden al menos un ácido nucleico o polinucleótido de la invención, células aisladas o recombinantes que comprenden al menos un polinucleótido de la invención, cultivos celulares que comprenden células que comprenden al menos un polinucleótido de la invención, cultivos celulares que comprenden al menos un ácido nucleico o polinucleótido de la invención y composiciones que comprenden uno o más de tales vectores, ácidos nucleicos, vectores de expresión, casetes de expresión, construcciones de ADN, células, cultivos celulares o cualquier combinación o mezcla de los mismos.

En algunas realizaciones, la invención proporciona células recombinantes que comprenden al menos un vector (p. ej., vector de expresión o construcción de ADN) de la invención que comprende al menos un ácido nucleico o polinucleótido de la invención. Algunas de estas células recombinantes se transforman o transfectan con el al menos único vector. Tales células se mencionan, típicamente, como células hospedadoras. Algunas de estas células comprenden células bacterianas que incluyen, aunque no de forma limitativa, células de *Bacillus sp.*, tales como células de *B. subtilis*. La invención proporciona, además, células recombinantes (p. ej., células hospedadoras recombinantes) que comprenden al menos una proteasa variante de la invención.

En algunas realizaciones, la invención proporciona un vector que comprende un ácido nucleico o polinucleótido de la invención. En algunas realizaciones, el vector es un vector de expresión o casete de expresión en el que una secuencia de polinucleótidos de la invención que codifica una proteasa variante de la invención se une operativamente a uno o más segmentos de ácido nucleico adicionales requeridos para una expresión génica eficaz (p. ej., un promotor unido operativamente al polinucleótido de la invención que codifica una proteasa variante de la invención). Un vector puede incluir un terminador de transcripción y/o un gen de selección, tal como un gen de resistencia a antibióticos que permite el mantenimiento de cultivo continuo de células hospedadoras infectadas por plásmidos mediante el crecimiento en medios que contienen antimicrobianos.

Un vector de expresión puede derivarse de ADN de plásmidos o viral o, en realizaciones alternativas, contiene elementos de ambos. Los vectores ilustrativos incluyen, aunque no de forma limitativa pXX, pC194, pJH101, pE194, pHP13 (Véase, Harwood y Cutting [eds.], Capítulo 3, Molecular Biological Methods for *Bacillus*, John Wiley & Sons [1990]; los plásmidos de replicación adecuados para *B. subtilis* incluyen los relacionadas en la pág. 92; Véase también, Perego, Integrational Vectors for Genetic Manipulations in *Bacillus subtilis*, en Sonenshein y col., [eds.] *Bacillus subtilis* and Other Gram-Positive Bacteria: Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics, American Society for Microbiology, Washington, D.C. [1993], págs. 615-624).

Para la expresión y producción de una proteína de interés (p. ej., proteasa variante) en una célula, al menos un vector de expresión que comprende al menos una copia de un polinucleótido que codifica la proteasa modificada, y que comprende preferiblemente múltiples copias, se transforma en la célula en condiciones adecuadas para la expresión de la proteasa. En algunas realizaciones de la presente invención, una secuencia de polinucleótidos que codifica la proteasa variante (además de otras secuencias incluidas en el vector) se integra en el genoma de la célula hospedadora, mientras que en otras realizaciones, un vector plasmídico que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica la proteasa variante permanece como un elemento extracromosómico autónomo dentro de la célula. La presente invención proporciona tanto elementos extracromosómicos de ácido nucleico como secuencias de nucleótidos entrantes que se integran en el genoma de la célula hospedadora. Los vectores descritos en la presente descripción son útiles para la producción de las proteasas variantes de la invención. En algunas realizaciones, una construcción de polinucleótidos que codifica la proteasa variante está presente en un vector de integración que facilita la integración y, opcionalmente, la amplificación del polinucleótido que codifica la proteasa variante en el cromosoma del hospedador. Los ejemplos de sitios para integración son conocidos por aquellos con experiencia en la técnica. En algunas realizaciones, un promotor que es el promotor natural de la proteasa precursora seleccionada realiza la transcripción de un polinucleótido que codifica una proteasa variante de la invención. En otras realizaciones, el promotor es heterólogo para la proteasa precursora, pero es funcional en la célula hospedadora. Específicamente, los ejemplos de promotores adecuados para usar en células hospedadoras incluyen, aunque no de forma limitativa, por ejemplo, los promotores amyE, amyQ, amyL, pstS, sacB, pSPAC, pAprE, pVeg, pHpall, el promotor del gen de la amilasa maltogénica de *B. stearothermophilus*, el gen de la amilasa de *B. amyloliquefaciens* (BAN), el gen de la proteasa alcalina de *B. subtilis*, el gen de la proteasa alcalina de *B. clausii*, el gen de la xilosidasa de *B. pumilis*, cryIIIA de *B. thuringiensis* y el gen de la alfa-amilasa de *B. licheniformis*. Los promotores adicionales incluyen, aunque no de

forma limitativa, el promotor A4, así como los promotores P_R o P_L del fago lambda y los promotores lac, trp o tac de *E. coli*.

Las proteasas variantes de la presente invención pueden producirse en células hospedadoras de cualquier microorganismo gram positivo adecuado que incluye bacterias y hongos. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la proteasa variante se produce en células hospedadoras de origen fúngico y/o bacteriano. En algunas realizaciones, las células hospedadoras son *Bacillus sp.*, *Streptomyces sp.*, *Escherichia sp.* o *Aspergillus sp.* En algunas realizaciones, las proteasas variantes se producen mediante células hospedadoras de *Bacillus sp.* Los ejemplos de células hospedadoras de *Bacillus sp.* útiles en la producción de los polipéptidos de las proteasas variantes de la invención incluyen, aunque no de forma limitativa, a *B. licheniformis*, *B. lentus*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. lentus*, *B. brevis*, *B. stearothermophilus*, *B. alkalophilus*, *B. coagulans*, *B. circulans*, *B. pumilis*, *B. thuringiensis*, *B. clausii*, y *B. megaterium*, así como otros organismos dentro del género *Bacillus*. En algunas realizaciones, las células hospedadoras de *B. subtilis* se usan para la producción de las proteasas variantes. Las patentes US-5.264.366 y US-4.760.025 (RE 34.606) describen varias cepas hospedadoras de *Bacillus* que pueden usarse para producir las proteasas variantes de la invención, aunque es posible usar otras cepas adecuadas.

Las diversas cepas bacterianas industriales que pueden usarse para producir las proteasas variantes de la invención incluyen cepas de *Bacillus sp.* no recombinantes (es decir, naturales), además de variantes de las cepas y/o cepas recombinantes de origen natural. En algunas realizaciones, la cepa hospedadora es una cepa recombinante, en donde un polinucleótido que codifica un polipéptido de interés se ha introducido en el hospedador. En algunas realizaciones, la cepa hospedadora es una cepa hospedadora de *B. subtilis* y, especialmente, una cepa hospedadora de *Bacillus subtilis* recombinante. Se conocen numerosas cepas de *B. subtilis* entre las que se incluyen, aunque no de forma limitativa, las cepas 1A6 (ATCC 39085), 168 (1A01), SB19, W23, Ts85, B637, PB1753 a PB1758, PB3360, JH642, 1A243 (ATCC 39,087), ATCC 21332, ATCC 6051, MI113, DE100 (ATCC 39,094), GX4931, PBT 110 y PEP 211 (Véase, p. ej., Hoch y col., *Genetics* 73:215–228 [1973]; Véanse también las patentes US-4.450.235 y US-4.302.544 y el documento EP 0134048). El uso de *B. subtilis* como células hospedadoras para la expresión es bien conocido en la técnica (Véanse, p. ej., Palva y col., *Gene* 19:81–87 [1982]; Fahnestock y Fischer, *J. Bacteriol.*, 165:796–804 [1986]; y Wang y col., *Gene* 69:39–47 [1988]).

En algunas realizaciones, la célula hospedadora de *Bacillus* es una *Bacillus sp.* que incluye una mutación o delección en al menos uno de los siguientes genes, *degU*, *degS*, *degR* y *degQ*. En algunas realizaciones, la mutación es en un gen *degU* y, más preferiblemente, la mutación es *degU(Hy)32* (véanse, p. ej., Msadek y col., *J. Bacteriol.* 172:824–834 [1990]; y Olmos y col., *Mol. Gen. Genet.* 253:562–567 [1997]). Una cepa hospedadora adecuada es una *Bacillus subtilis* que tiene una mutación *degU32(Hy)*. En algunas realizaciones, el hospedador de *Bacillus* comprende una mutación o delección en *scoC4* (véase, p. ej., Caldwell y col., *J. Bacteriol.* 183:7329–7340 [2001]); *spolIE* (véase, p. ej., Arigoni y col., *Mol. Microbiol.* 31:1407–1415 [1999]); y/u *oppA* u otros genes del operón *opp* (véase, p. ej., Perego y col., *Mol. Microbiol.* 5:173–185 [1991]). Ciertamente, se contempla que cualquier mutación en el operón *opp* que produce el mismo fenotipo que una mutación en el gen *oppA* será de utilidad en algunas realizaciones de la cepa alterada de *Bacillus* de la invención. En algunas realizaciones, estas mutaciones se producen solas, mientras que en otras realizaciones se encuentran combinaciones de mutaciones. En algunas realizaciones, una cepa de célula hospedadora de *Bacillus* alterada que puede usarse para producir una proteasa variante de la invención es una cepa hospedadora de *Bacillus* que ya incluye una mutación en uno o más de los genes mencionados anteriormente. Adicionalmente, son útiles las células hospedadoras de *Bacillus sp.* que comprenden una mutación o mutaciones y/o delecciones de los genes de la proteasa endógena. En algunas realizaciones, la célula hospedadora de *Bacillus* comprende una delección de los genes *aprE* y *nprE*. En otras realizaciones, la célula hospedadora de *Bacillus sp.* comprende una delección de 5 genes de proteasa, mientras que, en otras realizaciones la célula hospedadora de *Bacillus sp.* comprende una delección de 9 genes de proteasa (véase, p. ej., la publicación de solicitud de patente US-2005/0202535).

Las células hospedadoras se transforman con al menos un ácido nucleico que codifica al menos una proteasa variante de la invención usando cualquier método adecuado conocido en la técnica. Tanto si el ácido nucleico se incorpora a un vector como si se utiliza sin la presencia de ADN plasmídico, se introduce de forma típica en un microorganismo, en algunas realizaciones, preferiblemente una célula de *E. coli* o una célula de *Bacillus* competente. Los métodos para introducir un ácido nucleico (p. ej., ADN) en células de *Bacillus* o de *E. coli* que usan construcciones o vectores de ADN plasmídico y que transforman dichas construcciones o vectores de ADN plasmídico en dichas células son muy conocidos. En algunas realizaciones, los plásmidos se aíslan posteriormente de las células de *E. coli* y se transforman en células de *Bacillus*. Sin embargo, no es esencial usar microorganismos intermedios, tales como *E. coli* y, en algunas realizaciones, una construcción o vector de ADN se introduce directamente en un hospedador de *Bacillus*.

Los expertos en la técnica conocen métodos adecuados para introducir las secuencias de ácido nucleico o de polinucleótidos de la invención en células de *Bacillus* (véase, p. ej., Ferrari y col., “*Genetics*” en Harwood y col. [eds.], *Bacillus*, Plenum Publishing Corp. [1989], pp. 57–72; Saunders y col., *J. Bacteriol.* 157:718–726 [1984]; Hoch y col., *J. Bacteriol.* 93:1925–1937 [1967]; Mann y col., *Current Microbiol.* 13:131–135 [1986]; Holubova, *Folia Microbiol.* 30:97 [1985]; Chang y col., *Mol. Gen. Genet.* 168:11–115 [1979]; Vorobjeva y col., *FEMS Microbiol. Lett.* 7:261–263 [1980]; Smith y col., *Appl. Env. Microbiol.* 51:634 [1986]; Fisher y col., *Arch. Microbiol.* 139:213–217 [1981]; y McDonald, *J. Gen. Microbiol.* 130:203 [1984]). Ciertamente, tales métodos como la transformación, que incluye la transformación y congresión de protoplastos, transducción y fusión de protoplastos, son muy conocidos y adecuados para usar en la

presente invención. Los métodos de transformación se usan para introducir una construcción o vector ADN que comprende un ácido nucleico que codifica una proteasa variante de la presente invención en una célula hospedadora. Los métodos conocidos en la técnica para transformar células de *Bacillus* incluyen métodos tales como la transformación de marcadores de rescate de plásmidos, que implica la absorción de un plásmido donante por células competentes que portan un plásmido residente parcialmente homólogo (véanse, Contente y col., *Plasmid* 2:555-571 [1979]; Haima y col., *Mol. Gen. Genet.* 223:185-191 [1990]; Weinrauch y col., *J. Bacteriol.* 154:1077-1087 [1983]; y Weinrauch y col., *J. Bacteriol.* 169:1205-1211 [1987]). En este método el plásmido donante entrante se recombina con la región homóloga del plásmido "auxiliar" residente en un proceso que se asemeja a la transformación cromosómica.

Además de los métodos usados comúnmente, en algunas realizaciones, las células hospedadoras se transforman directamente con una construcción o vector de ADN que comprende un ácido nucleico que codifica una proteasa variante de la invención (es decir, no se usa una célula intermedia para amplificar o procesar de cualquier otra manera la construcción o vector de ADN antes de su introducción en la célula hospedadora). La introducción de la construcción de ADN o vector de la invención en la célula hospedadora incluye aquellos métodos físicos y químicos conocidos en la técnica para introducir una secuencia de ácido nucleico (p. ej., una secuencia de ADN) en una célula hospedadora sin la inserción en un plásmido o vector. Tales métodos incluyen, pero no se limitan a, la precipitación con cloruro cálcico, electroporación, ADN puro, liposomas y similares. En realizaciones adicionales las construcciones o vectores de ADN se cotransforman con un plásmido sin insertarse en el plásmido. En otras realizaciones se elimina un marcador selectivo de la cepa alterada de *Bacillus* por métodos conocidos en la técnica (véanse Stahl y col., *J. Bacteriol.* 158:411-418 [1984]; y Palmeros y col., *Gene* 247:255 - 264 [2000]).

En algunas realizaciones, las células transformadas de la presente invención se cultivan en medios con nutrientes convencionales. Las condiciones de cultivo específicas adecuadas, tales como temperatura, pH y similares son conocidas por aquellos con experiencia en la técnica y se describen bien en la literatura científica. En algunas realizaciones, la invención proporciona un cultivo (p. ej., un cultivo celular) que comprende al menos una proteasa variante o al menos un ácido nucleico de la invención. Además, se proporcionan composiciones que comprenden al menos un ácido nucleico, vector o construcción de ADN de la invención.

En algunas realizaciones, las células hospedadoras transformadas con al menos una secuencia de polinucleótidos que codifica al menos una proteasa variante de la invención se cultivan en un medio con nutrientes adecuados en condiciones que permiten la expresión de la proteasa de la presente invención, después de lo cual la proteasa resultante se recupera del cultivo. El medio usado para cultivar las células comprende cualquier medio convencional adecuado para cultivar las células hospedadoras, tal como los medios mínimos o complejos que contienen los suplementos adecuados. Los medios adecuados están disponibles de proveedores comerciales o pueden prepararse según recetas publicadas (véase, p. ej., los catálogos de la American Type Culture Collection). En algunas realizaciones, la proteasa producida por las células se recupera del medio de cultivo con procedimientos convencionales que incluyen, aunque no de forma limitativa, por ejemplo, separar las células hospedadoras del medio por centrifugación o filtración, precipitar los componentes proteicos del sobrenadante o filtrado por medio de una sal (p. ej., sulfato de amonio), purificación cromatográfica (p. ej., intercambio de iones, filtración de gel, afinidad, etc.). En la presente invención puede usarse cualquier método adecuado para recuperar o purificar una proteasa variante.

En algunas realizaciones, una proteasa variante producida por una célula hospedadora recombinante se secreta en el medio de cultivo. Puede usarse una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio que facilita la purificación para facilitar la purificación de proteínas solubles. Un vector o construcción de ADN que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica una proteasa variante puede también comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio que facilita la purificación para facilitar la purificación de la serina proteasa variante (véase, p. ej., Kroll y col., *DNA Cell Biol.* 12:441-53 [1993]). Tales dominios que facilitan la purificación incluyen, aunque no de forma limitativa, por ejemplo, péptidos quelantes de metales, tales como módulos de histidina-triptófano que permiten la purificación sobre metales inmovilizados (véase, Porath, *Protein Expr. Purif.* 3:263-281 [1992]), dominios de proteína A que permiten la purificación sobre inmunoglobulina inmovilizada y el dominio usado en el sistema de purificación por extensión/afinidad FLAGS (p. ej., dominios de proteína A comercializados por Immunex Corp., Seattle, WA). La inclusión de una secuencia enlazadora escindible, tal como el Factor XA o la enteroquinasa (p. ej., secuencias comercializadas por Invitrogen, San Diego, CA) entre el dominio de purificación y la proteína heteróloga es útil, además, para facilitar la purificación.

Son bien conocidos los ensayos para detectar y medir la actividad enzimática de una enzima, tal como una proteasa variante de la invención. Además, varios ensayos para detectar y medir la actividad de las proteasas (p. ej., proteasas variantes de la invención) son también conocidos de los expertos en la técnica. Particularmente, existen ensayos para determinar la actividad de las proteasas basados en la liberación de péptidos solubles en ácido a partir de caseína o hemoglobina, medida como absorbancia a 280 nm o, colorimétricamente, con el uso del método Folin, conocido para aquellos con experiencia en la técnica. Otros ensayos ilustrativos implican la solubilización de sustratos cromogénicos (véase, p. ej., Ward, "Proteinases", en Fogarty (ed.), *Microbial Enzymes and Biotechnology*, Applied Science, Londres, [1983], págs. 251-317). Otros ensayos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, el ensayo de succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-para nitroanilida (suc-AAPF-pNA) y el ensayo de la sal sódica de 2,4,6-trinitrobenzenosulfonato (ensayo de TNBS). Numerosas referencias adicionales conocidas de los expertos en la

técnica proporcionan métodos adecuados (véase, p. ej., Wells y col., *Nucleic Acids Res.* 11:7911-7925 [1983]; Christianson y col., *Anal. Biochem.* 223:119-129 [1994]; y Hsia y col., *Anal. Biochem.* 242:221-227 [1999]).

Es posible usar diversos métodos para determinar el nivel de producción de una proteasa madura (p. ej., proteasas variantes maduras de la presente invención) en una célula hospedadora. Tales métodos incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, métodos que usan anticuerpos policlonales o monoclonales específicos para la proteasa. Los métodos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, los ensayos inmunosorbentes ligados a enzimas (ELISA), radioinmunoensayos (RIA), inmunoensayos fluorescentes (FIA) y clasificación de células activada por fluorescencia (FACS). Estos y otros ensayos son muy conocidos en la técnica (véase, p. ej., Maddox y col., *J. Exp. Med.* 158:1211 [1983]).

En algunas otras realizaciones, la invención proporciona métodos para preparar o producir una proteasa variante madura de la invención. Una proteasa variante madura no incluye un péptido señal o una secuencia de propéptido. Algunos métodos comprenden preparar o producir una proteasa variante de la invención en una célula hospedadora bacteriana recombinante, tal como, por ejemplo, una célula de *Bacillus sp.* (p. ej., una célula de *B. subtilis*). En algunas realizaciones, la invención proporciona un método para producir una proteasa variante de la invención comprendiendo el método cultivar una célula hospedadora recombinante que comprende un vector de expresión recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica una proteasa variante de la invención en condiciones que favorecen la producción de la proteasa variante. Algunos de esos métodos comprenden, además, recuperar la proteasa variante del cultivo.

En algunas realizaciones, la invención proporciona métodos para producir una proteasa variante de la invención, comprendiendo los métodos: (a) introducir un vector de expresión recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica una proteasa variante de la invención en una población de células (p. ej., células bacterianas, tales como células de *B. subtilis*); y (b) cultivar las células en un medio de cultivo en condiciones que llevan a la producción de la proteasa variante codificada por el vector de expresión. Algunos de tales métodos comprenden, además, (c) aislar la proteasa variante de las células o del medio de cultivo.

Productos para el cuidado de las telas y el hogar

En algunas realizaciones, las variantes de proteasa, más específicamente variantes de subtilisina de la presente invención se pueden usar en composiciones que comprenden un material auxiliar y una variante de proteasa, en donde la composición es un producto para el cuidado de telas y del hogar.

En algunas realizaciones, las composiciones de productos para el cuidado de las telas y el hogar comprenden al menos una variante de subtilisina, en donde dicha variante de subtilisina es una forma madura que tiene actividad proteolítica y que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende una combinación de sustituciones de aminoácidos en posiciones seleccionadas de la **Lista 1-3**, y en donde las posiciones de aminoácidos de la variante de subtilisina están numeradas según la numeración de las correspondientes posiciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada en la Id de sec. n.º 1.

La presente invención proporciona además cualquiera de las variantes de subtilisina anteriormente aisladas, en donde la variante de subtilisina es una variante de proteasa de la proteasa subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*, en donde dicha proteasa subtilisina GG36 de *Bacillus lentus* comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la Id de sec. n.º 2.

En algunas realizaciones, las composiciones de productos para el cuidado de las telas y del hogar comprenden al menos una variante de proteasa subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*, en donde dicha proteasa subtilisina GG36 de *Bacillus lentus* comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la Id de sec. n.º 2, y en donde dicha proteasa GG36 es una forma madura que tiene actividad proteolítica y comprende una secuencia de aminoácidos que comprende una combinación de sustituciones de aminoácidos seleccionadas de la **Lista 1-3**, y en donde las posiciones de aminoácidos de la variante de nucleasa están numeradas según la numeración de las correspondientes posiciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada en la Id de sec. n.º 1.

En algunas realizaciones, las composiciones de productos para el cuidado de las telas y del hogar comprenden cualquiera de las variantes de subtilisina aisladas anteriormente relacionadas, en donde la carga neta total de la variante es 0, +1, +2, +3, +4, +5, -1, -2, -3, -4 o -5 con respecto a la carga neta total de la proteasa subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*. En algunas realizaciones, la carga neta total se obtiene mediante una o más sustituciones seleccionadas de: A001E, V004E, R010H/A, Q012E, A015D, N018D, R019H/S, V026D, K027E, N043D, R045C/T/S/P, S049D, V051E, G061E, N062D/E, N076D, N077D, S078D, S087D, A098E, S101D, S106E, G115E, G118D, N123D, S128D, P129E, S130D/E, S132D, A158E, G159D/E, S160D, S166D, R170T, N183D, N184D, N185E, R186H, S188D/E, A194E, A200D, Y209E, A215D, N204D, S212D, L217D/E, N218D, A230E, K235F, N237D, K237E, N238D, S240D, N243D, Q245D, R247L, N248D/E, K251C, N263D, N269D/E, A272D, A273E, R275H/S, A001R, V004R, Q012R, P014R, H017R, N018R/K, G020K/R, T022R/K, S024R/K, G025R, D032I, D041K/L/N, N043R/K, G046R, A048R, F050R/K, P055R, S056R/K, T057R, Q059K, G061R, N076K, S078R, P086R, S087R, E089G/P/I, G097R, S099R, Q109R, G115R, G118R, S132K, S144R, G159R/K, D181C/S/T, L196K, N204K, Q206R, K235R, Q236R/K, K237R, N238R, S240R, W241R, S242R/K, V244R, Q245R/K, N248R, H249R, N252R/K, S256R, G258R, T260K, N269R/K o E271F/H/T/L/W/R/S//A/G/V, y en donde las posiciones de aminoácidos de la

variante de proteasa se han numerado según la numeración de las correspondientes posiciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada en la Id. de sec. n.º1.

5 En algunas realizaciones, la una o más variantes de subtilisina de las composiciones de productos para el cuidado de las telas y del hogar se derivan de una subtilisina precursora que está comercialmente disponible (p. ej., SAVINASE®, POLARZYME®, KANNASE®, LIQUINASE®, LIQUINASE ULTRA®, SAVINASE ULTRA®, o OVOZYME® de Novozymes A/S); MAXACAL®, PROPERASE®, PURAFECT®, FN3®, FN4® y PURAFECT OXP®, PURAFECT™, PURAFECT® PRIME o PURAMAX® de Genencor International) y las comercializadas por Henkel/ Kemira, especialmente BLAP (secuencia mostrada en la Figura 29 de la patente US-5.352.604 con las siguientes mutaciones S99D + S101 R + S103A + V104I + G159S, denominada a continuación en la memoria como BLAP) y BLAP X (BLAP con S3T + V4I + V205I).

15 En algunas realizaciones, las composiciones de productos para el cuidado de las telas y del hogar comprenden al menos una variante de proteasa cuyo precursor tiene actividad proteolítica, en donde la proteasa variante comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de aminoácidos mostrada en la Id de sec. n.º2 en no más de 50, no más de 40, no más de 35, no más de 30, no más de 25, no más de 20, no más de 19, no más de 18, no más de 17, no más de 16, no más de 15, no más de 14, no más de 13, no más de 12, no más de 11, no más de 10, no más de 9, o no más de 8 restos de aminoácidos, en donde las posiciones de los aminoácidos están numeradas según la numeración de las correspondientes posiciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada en la Id de sec. n.º1, como se determina mediante el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de una proteasa variante con la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*.

Composiciones limpiadoras y/o tratantes

25 En algunas realizaciones, el producto de consumo que comprende una composición de limpieza y/o tratante, comprende al menos una variante de proteasa, especialmente una variante de subtilisina y al menos un material adyuvante. En algunas realizaciones, estos adicionales se incorporan, por ejemplo, para ayudar o mejorar el rendimiento de limpieza, para tratamiento del sustrato que se va a limpiar, o modificar la estética de la composición de limpieza como es el caso con perfumes, colorantes, tintes o lo similar. Se entiende que tales complementos son adicionales a las proteasas variantes de la presente invención. La naturaleza exacta de estos componentes adicionales y los niveles de incorporación de estos dependerán de la forma física de la composición y la naturaleza de la operación de limpieza para la cual se usan. Los materiales adyuvantes para limpieza y/o tratantes se pueden seleccionar entre uno o más de la lista que incluye, aunque no de forma limitativa, tensioactivos, aditivos reforzantes de la detergencia, blanqueadores, activadores del blanqueador, catalizadores del blanqueador, otras enzimas, sistemas estabilizantes de enzimas, quelantes, polímeros para la liberación de la suciedad, agentes de transferencia de colorantes, dispersantes, supresores de las jabonaduras, tintes, perfumes, colorantes, sales de carga, hidrótrofos, fotoactivadores, agentes fluorescentes, acondicionadores de tejidos, suavizantes de tejidos, tensioactivos hidrolizables, conservantes, antioxidantes, agentes antiacortamiento, agentes antiarrugas, germicidas, fungicidas, motas de color, agentes para el cuidado de artículos de plata, antideslustre y/o anticorrosión, fuentes de alcalinidad, agentes solubilizantes, portadores, auxiliares de procesamiento, pigmentos y agentes para el control del pH, un encapsulado que comprende un perfume, un agente matizador, tensioactivos, agentes reforzadores de la detergencia, agentes quelantes, agentes inhibidores de la transferencia de tintes, dispersantes, enzimas adicionales, estabilizadores de enzimas, materiales catalíticos, activadores del blanqueador, peróxido de hidrógeno, fuentes de peróxido de hidrógeno, perácidos preformados, agentes dispersantes poliméricos, agentes para eliminación/antirredpósito de la suciedad arcillosa, abrillantadores, supresores de las jabonaduras, tintes, perfumes, agentes elastizantes de la estructura, disolventes y mezclas de los mismos (véanse, por ejemplo, las patentes US-6.610.642, 6.605.458, 5.705.464, 5.710.115, 5.698.504, 5.695.679, 5.686.014 y 5.646.101). Algunas realizaciones de los materiales específicos de la composición de limpieza se ilustran en detalle más abajo. En realizaciones en las cuales los materiales adyuvantes de limpieza y/o tratamiento no sean compatibles con las proteasas variantes de la presente invención en las composiciones de limpieza, se usan, entonces, métodos adecuados para mantener los materiales adyuvantes de limpieza y la o las proteasas separados (es decir, no en contacto entre sí) hasta que la combinación de los dos componentes sea apropiada. Tales métodos de separación incluyen cualquier método adecuado conocido en la técnica (p. ej., cápsulas de gelatina, encapsulación, pastillas, separación física, etc.).

55 En algunas realizaciones, composición de limpieza y/o tratante comprende al menos una variante de proteasa que comprende, además, al menos una proteasa no inmunoequivalente adicional seleccionada de subtilisinas (EC 3.4.21.62); proteasas de tipo tripsina o de tipo quimiotripsina; metaloproteasas; y mezclas de los mismos.

60 En algunas realizaciones, las composiciones de limpieza y/o tratantes que comprenden al menos una variante de proteasas comprenden, además, al menos una proteasa no inmunoequivalente adicional seleccionada de: subtilisinas (EC 3.4.21.62) derivadas de *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus* y *B. gibsonii*; tripsina proteasas y/o quimiotripsina proteasas de *Cellomonas*; metaloproteasas derivadas de *Bacillus amyloliquefaciens*; y mezclas de los mismos.

65 En algunas realizaciones, las composiciones de limpieza y/o tratantes que comprenden al menos una variante de proteasa comprenden, además, una enzima adicional seleccionada de hemicelulasas, peroxidadas, proteasas, celulasas, celobiosa deshidrogenasas, xiloglucanasas, xilanasas, lipasas, fosfolipasas, esterases, cutinasas,

pectinasas, mananasas, pectato liasas, queratinasas, reductasas, oxidasas, fenoloxidasas, lipoxigenasas, ligninasas, pululanadas, tanasas, pentosanasas, liquenasas glucanasas, arabinosidasas, hialuronidasas, condroitinasas, lacasas, amilasas y mezclas de las mismas.

5 En algunas realizaciones, las composiciones de limpieza y/o tratantes comprenden al menos una variante de proteasa que comprende, además, al menos una enzima adicional seleccionada de lipasas del primer lavado; alfa-amilasas; celulasas bacterianas de limpieza; y mezclas de los mismos.

10 En algunas realizaciones, las composiciones de limpieza y/o tratantes que comprenden al menos una variante de proteasa comprenden, además, al menos uno de lo siguiente: un encapsulado que comprende un perfume comprende una microcápsula de perfume; un agente de matizado que comprende un material seleccionado de tintes básicos, ácidos, hidrófobos, directos y poliméricos y tintes conjugados que tienen una longitud de onda de absorción máxima de 550 nm a 650 nm y mezclas de los mismos; un tensioactivo detergente que comprende un material seleccionado de tensioactivos detergentes aniónicos, tensioactivos detergentes no iónicos, tensioactivos detergentes catiónicos, tensioactivos detergentes de ion híbrido y tensioactivos detergentes anfóteros y mezclas de los mismos; un aditivo reforzante de la detergencia que comprende un material seleccionado de zeolitas, fosfatos y mezclas de los mismos; una sal de silicato que comprende un material seleccionado de silicato de sodio, silicato de potasio y mezclas de los mismos; un abrillantador que comprende un material seleccionado de abrillantadores solubles en agua fría y mezclas de los mismos; un polímero de carboxilato que comprende un material seleccionado de copolímero aleatorio de maleato/acrilato u homopolímero de poliácido acrílico y mezclas de los mismos; un polímero para la liberación de la suciedad que comprende un material seleccionado de copolímeros de tereftalato y mezclas de los mismos; un polímero celulósico que comprende un material seleccionado de alquilcelulosa, alquilcelulosa, carboxialquilcelulosa, alquilcarboxialquilcelulosa y mezclas de los mismos; un catalizador del blanqueador que comprende un material seleccionado de cationes iminio y poliones iminio; iones híbridos de iminio; aminas modificadas; óxidos de amina modificados; N-sulfonil iminas; N-fosfonil iminas; N-acil iminas; dióxidos de tiadiazol; perfluoroiminas; cetonas azucaradas cíclicas y mezclas de las mismas; un activador del blanqueador que comprende un material seleccionado de dodecanoil oxibenceno sulfonato, decanoil oxibenceno sulfonato, ácido decanoil oxibenceno o sus sales, 3,5,5-trimetil hexanoiloxibenceno sulfonato, tetraacetil etilendiamina (TAED), nonanoiloxibenceno sulfonato (NOBS) y mezclas de los mismos; una fuente de peróxido de hidrógeno que comprende un material seleccionado de sales perhidratadas inorgánicas, incluidas las sales de metales alcalinos tales como sales sódicas de perborato (usualmente mono o tetra-hidrato), sales de percarbonato, de persulfato, de perfosfato, de persulfato y mezclas de las mismas; un quelante que comprende un material seleccionado de DTPA (ácido dietileno-triamino-pentaacético), HEDP (ácido hidroxietano difosfónico), DTPMP (ácido dietileno-triamino penta(metilenfosfónico)), ácido etilendiamino disuccínico (EDDS), sal disódica hidratada del ácido 1,2-dihidroxibenceno-3,5-disulfónico, derivados de dichos quelantes; y mezclas de los mismos.

40 En algunas realizaciones, las composiciones de limpieza y/o tratantes que comprenden al menos una variante de proteasa comprenden un agente tonalizador seleccionado del grupo que consiste en tintes; conjugados de tinte-arcilla que comprenden al menos un tinte catiónico básico y una arcilla de esmectita; y mezclas de los mismos.

En algunas realizaciones, las composiciones de limpieza y/o tratantes que comprenden al menos una variante de proteasa comprenden al menos un agente tonalizador seleccionado de tintes de molécula pequeña y tintes poliméricos y mezclas de los mismos opcionalmente con una arcilla de esmectita.

45 En algunas realizaciones, las composiciones de limpieza y/o tratantes que comprenden al menos una variante de proteasa se proporcionan en dosis unitaria monocompartimentales o multicompartimentales. En algunas realizaciones, la composición es una dosis unitaria multicompartimental, en donde la variante de proteasa está en un compartimento diferente al de cualquier fuente de peróxido de hidrógeno y/o quelante y/o enzima adicional.

50 En algunas realizaciones, las composiciones de limpieza y/o tratantes que comprenden al menos una variante de proteasa comprenden uno o más de los siguientes ingredientes (basándose en el peso de la composición total): de aproximadamente 0,0005 % en peso a aproximadamente 0,1 % en peso, de aproximadamente 0,001 % en peso a aproximadamente 0,05 % en peso, o incluso de aproximadamente 0,002 % en peso a aproximadamente 0,03 % en peso de dicha variante de proteasa; y uno o más de los siguientes: de aproximadamente 0,00003 % en peso a aproximadamente 0,1 % en peso de agente tonalizador de telas; de aproximadamente 0,001 % en peso a aproximadamente 5 % en peso de cápsulas de perfume; de aproximadamente 0,001 % en peso a aproximadamente 1 % en peso de abrillantadores solubles en agua fría; de aproximadamente 0,00003 % en peso a aproximadamente 0,1 % en peso de catalizadores del blanqueador; de aproximadamente 0,00003 % en peso a aproximadamente 0,1 % en peso de lipasas de primer lavado; de aproximadamente 0,00003 % en peso a aproximadamente 0,1 % en peso de celulasas bacterianas de limpieza; y/o de aproximadamente 0,05 % en peso a aproximadamente 20 % en peso de tensioactivos no iónicos de Guerbet.

60 En algunas realizaciones, la composición de limpieza y/o tratante es un detergente líquido para lavado de ropa, un detergente para lavar platos.

65

Se pretende que la limpieza y/o tratamiento se proporcione de cualquier forma adecuada, que incluye un fluido o sólido. El producto de limpieza y/o tratante puede estar en forma de una bolsa de dosis unitaria, especialmente cuando está en forma de líquido y, de forma típica, el producto de limpieza y/o tratante está al menos parcialmente o incluso completamente, encerrado por una bolsa soluble en agua. Además, en algunas realizaciones de los productos de limpieza y/o tratantes que comprende al menos una variante de proteasa, la limpieza y/o tratamiento puede tener cualquier combinación de parámetros y/o características anteriormente detallados. Salvo que se indique otra cosa, todos los niveles de componentes o composición proporcionados en el presente documento se hacen en referencia al nivel activo de dicho componente o composición, y excluyen las impurezas, por ejemplo, disolventes residuales o subproductos, que pueden estar presentes en las fuentes comerciales. Los pesos de los componentes de enzimas se basan en la proteína activa total. Todos los porcentajes y relaciones se calculan en peso, a menos que se indique de cualquier otra manera. Todos los porcentajes y relaciones se calculan basados en la composición total a menos que se indique de cualquier otra manera. En las composiciones detergentes ilustrativas, los niveles de enzimas se expresan por enzima pura en peso de la composición total y salvo que se indique lo contrario, los ingredientes del detergente se expresan en peso de las composiciones totales.

Las composiciones de limpieza de la presente invención se utilizan ventajosamente, por ejemplo, en aplicaciones de lavado de ropa, limpieza de superficies duras, aplicaciones de lavado de vajillas así como aplicaciones cosméticas tales como dentaduras postizas, dientes, cabello y piel. Además, debido a las únicas ventajas de eficacia mejorada en soluciones de temperatura más baja, las enzimas de la presente invención se adecuan, idealmente, para las aplicaciones para el lavado de ropa. Además, las enzimas de la presente invención son útiles en composiciones en gránulos y líquidas.

La presente invención también proporciona productos aditivos de limpieza que comprenden las variantes de proteasa descritas y un material adyuvante. En algunas realizaciones, se usan las aplicaciones para limpieza con soluciones a baja temperatura. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona productos aditivos de limpieza que incluyen al menos una enzima de la presente invención y que son idealmente adecuados para incluirse en un proceso de lavado cuando se desea obtener una eficacia de blanqueamiento adicional. Dichas instancias incluyen, pero no se limitan a, aplicaciones para limpieza con solución a baja temperatura. En algunas realizaciones, el producto aditivo se encuentra en su forma más simple, una o más proteasas. En algunas realizaciones, el aditivo se empaqueta en forma de dosis para añadirlo a un proceso de limpieza. En algunas realizaciones, el aditivo se empaqueta en forma de dosificación para añadirlo a un proceso de limpieza, en donde se emplea una fuente de peróxigeno y se desea una mayor eficacia blanqueadora. Toda forma de unidad de dosis simple adecuada puede usarse con la presente invención e incluye, pero no se limita a, pastillas, tabletas, cápsulas de gel u otras unidades de dosis simples tales como polvos o líquidos medidos previamente. En algunas realizaciones, se incluyen materiales portadores o cargas para aumentar el volumen de dichas composiciones. Los materiales portadores o cargas adecuados incluyen, pero no se limitan a, varias sales de sulfato, carbonato y silicato así como además talco, arcilla y similares. Los materiales portadores o cargas adecuados para composiciones líquidas incluyen, pero no se limitan a, agua o alcoholes secundarios y primarios de bajo peso molecular que incluyen polialcoholes y dioles. Los ejemplos de dichos alcoholes incluyen, pero no se limitan, a metanol, etanol, propanol e isopropanol. En algunas realizaciones, las composiciones contienen de aproximadamente 5 % a aproximadamente 90 % de dichos materiales. Las cargas ácidas pueden usarse para reducir el pH. Alternativamente, en algunas realizaciones, el aditivo para limpieza incluye ingredientes adicionales, como se describe en mayor detalle más abajo.

Las presentes composiciones de limpieza y aditivos de limpieza requieren una cantidad eficaz de al menos una de las variantes de proteasa, más específicamente variantes de subtilisina proporcionadas en la presente descripción, solas o junto con otras proteasas y/o enzimas adicionales. El nivel de enzima necesario se consigue mediante la adición de una o más variantes de proteasa, más específicamente variantes de subtilisina de la presente invención. Típicamente, las presentes composiciones de limpieza comprenden al menos aproximadamente 0,0001 por ciento en peso, de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 10, de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 1 o de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,1 por ciento en peso de al menos uno de las proteasas variantes de la presente invención.

Las composiciones de limpieza descritas en la presente descripción se formulan de forma típica de modo que, durante el uso en operaciones de limpieza en medio acuoso, el agua de lavado tenga un pH de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 11,5, o incluso de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 10,5. Las formulaciones de producto líquido se formulan, típicamente, para tener un pH neto de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 9,0, o incluso de aproximadamente 3 a aproximadamente 5. Los productos granulares para el lavado de ropa se formulan, típicamente, para tener un pH de aproximadamente 9 a aproximadamente 11. Las técnicas para controlar el pH a niveles de uso recomendados incluyen el uso de reguladores, álcalis, ácidos, etc. y son conocidos por los expertos en la técnica.

Las "composiciones de limpieza de bajo pH" tienen típicamente un pH neto de aproximadamente 3 a aproximadamente 5, y están típicamente exentas de tensioactivos que se hidrolizan en ese entorno de pH. Dichos tensioactivos incluyen tensioactivos de tipo alquilsulfato de sodio que comprenden al menos un resto de óxido de etileno o incluso de aproximadamente 1 a aproximadamente 16 moles de óxido de etileno. Dichas composiciones de limpieza típicamente comprenden una cantidad suficiente de un modificador del pH, tal como hidróxido sódico, monoetanolamina o ácido clorhídrico, para proporcionar a dicha composición de limpieza un pH neto de aproximadamente 3 a aproximadamente 5. Dichas composiciones típicamente comprenden al menos una enzima estable en medio ácido. En algunas

realizaciones, las composiciones son líquidas, mientras que en otras realizaciones, son sólidas. El pH de dichas composiciones líquidas se miden típicamente como pH neto. El pH de dichas composiciones sólidas se mide como una solución de sólidos al 10 % de dicha composición, en donde el disolvente es agua destilada. En estas realizaciones, todas las mediciones de pH se toman a 20 °C, salvo que se indique lo contrario.

En algunas realizaciones, cuando la una o más proteasas variantes se utiliza(n) en una composición granulada o líquida, se prefiere que la proteasa variante esté en forma de una partícula encapsulada para proteger la proteasa variante del resto de componentes de la composición granulada durante el almacenamiento. Adicionalmente, la encapsulación también es un medio para controlar la disponibilidad de la proteasa variante durante el proceso de limpieza. En algunas realizaciones, la encapsulación mejora el rendimiento de la una o más proteasas variantes y/o enzimas adicionales. En este sentido, las proteasas variantes de la presente invención se encapsulan con cualquier material de encapsulación conocido en la técnica. En algunas realizaciones, el material de encapsulación encapsula típicamente al menos una parte del catalizador de la una o más proteasas variantes de la presente invención. Típicamente, el material de encapsulación es soluble en agua y/o dispersable en agua. En algunas realizaciones, el material de encapsulación tiene una temperatura de transición vítrea (Tg) de 0 °C o mayor. La temperatura de transición vítrea se describe en mayor detalle en la patente núm. WO 97/11151. El material de encapsulación se selecciona, típicamente, del grupo que consiste en carbohidratos, gomas naturales o sintéticas, quitina, quitosana, celulosa y derivados de celulosa, silicatos, fosfatos, boratos, alcohol polivinílico, polietilenglicol, ceras de parafina, y combinaciones de estos. Cuando el material de encapsulación es un carbohidrato, este se selecciona, típicamente, de monosacáridos, oligosacáridos, polisacáridos, y combinaciones de estos. En algunas realizaciones típicas, el material de encapsulación es un almidón (véase, p. ej., el documento EP 0 922 499, y las patentes US-4.977.252, US-5.354.559 y US-5.935.826). En algunas realizaciones, el material de encapsulación puede ser una microesfera hecha de plástico como por ejemplo termoplásticos, acrilonitrilo, metacrilonitrilo, poliácrolonitrilo, polimetacrilonitrilo y mezclas de los mismos; las microesferas comerciales útiles incluyen, aunque no de forma limitativa, las suministradas por EXPANCEL® (Stockviksverken, Suecia), y PM 6545, PM 6550, PM 7220, PM 7228, EXTENDOSPHERES®, LUXSIL®, Q-CEL® y SPHERICEL® (PQ Corp., Valley Forge, PA).

En la presente descripción, las proteasas variantes para usar en la presente invención son especialmente útiles en la industria de la limpieza e incluyen, aunque no de forma limitativa, detergentes para el lavado de ropa y vajilla. Estas aplicaciones colocan a las enzimas bajo varias tensiones ambientales. Las composiciones de la invención proporcionan ventajas con respecto a muchos productos que contienen enzimas usados actualmente, debido a su estabilidad en diversas condiciones.

Claramente, existe una variedad de condiciones para lavado que incluyen la variación de formulaciones de detergentes, volúmenes de agua para lavado, temperaturas del agua para lavado y períodos de tiempo de lavado, a los cuales se exponen las proteasas involucradas en el lavado. Adicionalmente, las formulaciones detergentes usadas en distintas áreas geográficas tienen distintas concentraciones de sus componentes relevantes presentes en el agua de lavado. Por ejemplo, los detergentes europeos tienen, de forma típica, aproximadamente 4500-5000 ppm de componentes de detergente en el agua de lavado, mientras que los detergentes japoneses tienen, de forma típica, aproximadamente 667 ppm de componentes de detergente en el agua de lavado. En Norteamérica, particularmente, en los EE. UU., los detergentes tienen, de forma típica, aproximadamente 975 ppm de componentes de detergente presentes en el agua de lavado.

Un sistema con concentración detergente baja incluye detergentes en donde menos de aproximadamente 800 ppm de los componentes detergentes están presentes en el agua de lavado. Los detergentes japoneses se consideran, de forma típica, sistemas con concentración detergente baja debido a que tienen aproximadamente 667 ppm de componentes detergentes presentes en el agua de lavado.

Una concentración media de detergente incluye detergentes en donde los componentes de detergente en el agua de lavado se encuentran presentes entre aproximadamente 800 ppm y aproximadamente 2000 ppm. Los detergentes de Norteamérica se consideran, generalmente, sistemas con concentración detergente media debido a que tienen aproximadamente 975 ppm de componentes detergentes presentes en el agua de lavado. Brasil tiene, de forma típica, aproximadamente 1500 ppm de componentes detergentes presentes en el agua de lavado.

Un sistema con concentración de detergente alta incluye detergentes en donde más de aproximadamente 2000 ppm de los componentes detergentes están presentes en el agua de lavado. Generalmente, se considera que los detergentes europeos son sistemas con concentración de detergente alta debido a que tienen aproximadamente 4500-5000 ppm de componentes detergentes en el agua de lavado.

Los detergentes latinoamericanos son, generalmente, mejoradores de detergente de fosfato con contenido alto de espuma y la concentración de los detergentes usados en Latinoamérica puede ser tanto media como alta debido a que se encuentran en el intervalo de 1500 ppm a 6000 ppm de componentes detergentes en el agua de lavado. Como se mencionó anteriormente, Brasil tiene, de forma típica, aproximadamente 1500 ppm de componentes detergentes presentes en el agua de lavado. Sin embargo, otras regiones con mejoradores de detergente de fosfato con contenido alto de espuma no limitadas a otros países de América Latina, pueden tener sistemas con concentración de detergente alta de hasta aproximadamente 6000 ppm de componentes detergentes presentes en el agua de lavado.

En vista de lo anterior, es evidente que las concentraciones de composiciones detergentes en las soluciones típicas de lavado en todo el mundo varían de menos de aproximadamente 800 ppm de composición detergente (“regiones con concentración baja de detergente”), por ejemplo, aproximadamente 667 ppm en Japón, hasta entre aproximadamente 800 ppm y aproximadamente 2000 ppm (“regiones con concentración media de detergente”), por ejemplo, aproximadamente 975 ppm en los EE. UU. y aproximadamente 1500 ppm en Brasil hasta más de aproximadamente 2000 ppm (“regiones con concentración alta de detergente”), por ejemplo, de aproximadamente 4500 ppm a aproximadamente 5000 ppm en Europa y aproximadamente 6000 ppm en regiones con mejoradores de fosfato con contenido alto de espuma.

Las concentraciones de las soluciones de lavado típicas se determinan empíricamente. Por ejemplo, en los EE. UU. una lavadora automática típica soporta un volumen de aproximadamente 64,4 l de solución de lavado. Por consiguiente, para obtener una concentración de aproximadamente 975 ppm de detergente dentro de la solución de lavado se debe agregar aproximadamente 62.79 g de composición detergente a los 64,4 l de solución de lavado. Esta cantidad es la cantidad típica que determina el consumidor en el agua de lavado con el uso de la taza medidora provista con el detergente.

Como ejemplo adicional, las distintas regiones usan temperaturas de lavado diferentes. En Japón, la temperatura del agua de lavado es, de forma típica, inferior a la temperatura que se usa en Europa. Por ejemplo, la temperatura del agua de lavado en Norteamérica y Japón es, de forma típica entre aproximadamente 10 y aproximadamente 30 °C (p. ej., aproximadamente 20 °C), mientras que la temperatura del agua de lavado en Europa es, de forma típica, entre aproximadamente 30 y aproximadamente 60 °C (p. ej., aproximadamente 40 °C). Sin embargo, con el propósito de ahorrar energía, muchos consumidores ahora realizan el lavado con agua fría. Además, en algunas otras regiones, el agua fría se usa, de forma típica, para el lavado de ropa, así como además en aplicaciones para el lavado de vajilla. En algunas realizaciones, el “lavado con agua fría” de la presente invención usa un “detergente para agua fría” adecuado para lavar a temperaturas de aproximadamente 10 °C a aproximadamente 40 °C o de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 30 °C o de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 25 °C, además de todas las otras combinaciones dentro del intervalo de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 35 °C y todos los intervalos dentro de 10 °C a 40 °C.

Como un ejemplo adicional, las distintas geografías tienen, de forma típica, durezas del agua diferentes. La dureza del agua se describe, usualmente, en términos de los granos por galón de mezcla Ca^{2+}/Mg^{2+} . La dureza es una medida de la cantidad de calcio (Ca^{2+}) y magnesio (Mg^{2+}) en el agua. La mayor parte del agua en los EE. UU. es dura, pero el grado de dureza varía. El agua moderadamente dura (60-120 ppm) a dura (121-181 ppm) tiene de 60 a 181 partes por millón (partes por millón convertidas a granos por galón de EE. UU. es núm. de ppm dividido por 17,1 equivalente a granos por galón) de minerales de dureza.

Agua	Granos por galón	Partes por millón
Blanda	inferior a 1,0	inferior a 17
Ligeramente dura	de 1,0 a 3,5	de 17 a 60
Moderadamente dura	de 3,5 a 7,0	de 60 a 120
Dura	de 7,0 a 10,5	de 120 a 180
Muy dura	superior a 10,5	superior a 180

La dureza del agua en Europa es, de forma típica, mayor de aproximadamente 10,5 (por ejemplo de aproximadamente 10,5 a aproximadamente 20,0) granos por galón de mezcla Ca^{2+}/Mg^{2+} (p. ej., aproximadamente 15 granos por galón de mezcla Ca^{2+}/Mg^{2+}). La dureza del agua en Norteamérica es, de forma típica, superior a la dureza del agua japonesa, pero inferior a la dureza del agua en Europa. Por ejemplo, la dureza del agua en Norteamérica puede estar entre aproximadamente 3 y aproximadamente 10 granos, de aproximadamente 3 a aproximadamente 8 granos o de aproximadamente 6 granos. La dureza del agua en Japón es, de forma típica, inferior a la dureza del agua en Norteamérica, usualmente, inferior a aproximadamente 4, por ejemplo, aproximadamente 3 granos por galón de mezcla Ca^{2+}/Mg^{2+} .

En consecuencia, en algunas realizaciones, la presente invención proporciona productos de consumo o composiciones de limpieza y/o tratantes que comprenden proteasas variantes que muestran una capacidad limpiadora sorprendente en al menos un conjunto de condiciones de lavado (p. ej., temperatura del agua, dureza del agua y/o concentración de detergente). En algunas realizaciones, las proteasas variantes de la presente invención son comparables en cuanto a su capacidad limpiadora respecto de otras proteasas de subtilisina. En algunas realizaciones, las proteasas variantes de la presente invención muestran una mejor capacidad limpiadora en comparación con las proteasas de subtilisina comercializadas actualmente. Por lo tanto, en algunas realizaciones de la presente invención, las proteasas variantes proporcionadas en la presente descripción muestran una estabilidad oxidativa mejorada, estabilidad térmica mejorada, capacidades de limpieza mejoradas en diversas condiciones y/o estabilidad quelante mejorada. Adicionalmente, las proteasas variantes de la presente invención son útiles en composiciones de limpieza que no incluyen detergentes, ya sea solos o en combinación con mejoradores y estabilizadores.

En algunas realizaciones de la presente invención, las composiciones de limpieza comprenden al menos una de las proteasas variantes definidas a un nivel de aproximadamente 0,00001 % a aproximadamente 10 % en peso de la composición y el resto (p. ej., de aproximadamente 99,999 % a aproximadamente 90,0 %) comprende materiales adyuvantes en peso de la composición. En algunas otras realizaciones de la presente invención, las composiciones de limpieza de la presente invención comprenden al menos una proteasa variante en un nivel de aproximadamente 0,0001 % a aproximadamente 10 %, de aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 5 %, de aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 2 %, de aproximadamente 0,005 % a aproximadamente 0,5 % en peso de la composición y la csp de la composición de limpieza (p. ej., de aproximadamente 99,9999 % a aproximadamente 90,0 %, de aproximadamente 99,999 % a aproximadamente 98 %, de aproximadamente 99,995 % a aproximadamente 99,5 % en peso) comprende materiales adyuvantes de limpieza.

En algunas realizaciones, las composiciones de limpieza de la presente invención comprenden una o más enzimas adicionales de detergente que proporcionan beneficios en el rendimiento de limpieza y/o cuidado de las telas y/o lavado de la vajilla. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen, aunque no de forma limitativa, hemicelulasas, celulasas, peroxidadas, proteasas, xilanasas, lipasas, fosfolipasas, estereras, cutinasas, pectinasas, pectato liasas, mananasas, queratinasas, reductasas, oxidasas, fenoloxidasas, lipoxigenasas, ligninasas, pululaninas, tannanas, pentosanasas, malanasas, β -glucanasas, arabinosidasas, hialuronidasa, condroitinasas, lacasas y amilasas, o cualesquiera combinaciones o mezclas de los mismos. En algunas realizaciones, se usa una combinación de enzimas (es decir, un "cóctel") que comprende enzimas convencionales aplicables tales como proteasa, lipasa, cutinasa y/o celulasa junto con amilasa.

Además de las variantes de proteasa, más específicamente variantes de subtilisina proporcionadas en la presente descripción, cualquier otra proteasa adecuada es útil en las composiciones de la presente invención. Las proteasas adecuadas incluyen las de origen animal, vegetal o microbiano. En algunas realizaciones, se usan proteasas microbianas. En algunas realizaciones, se incluyen mutantes modificados química o genéticamente. En algunas realizaciones, la proteasa es una proteasa de serina, preferiblemente, una proteasa microbiana alcalina o una proteasa del tipo tripsina. Los ejemplos de proteasas alcalinas incluyen subtilisinas, especialmente, aquellas derivadas de *Bacillus* (p. ej., subtilisina, *lentus*, *amyloliquefaciens*, subtilisina Carlsberg, subtilisina 309, subtilisina 147 y subtilisina 168). Los ejemplos adicionales incluyen las proteasas mutantes descritas en las patentes de los EE. UU. RE-34.606; 5.955.340; 5.700.676, 6.312.936 y 6.482.628. Los ejemplos de proteasas adicionales incluyen, aunque no de forma limitativa, tripsina (p. ej., de origen porcino o bovino) y la proteasa de *Fusarium* descrita en el documento WO 89/06270. En algunas realizaciones, las proteasas comerciales de utilidad en la presente invención incluyen, aunque no de forma limitativa MAXATASE®, MAXACAL™, MAXAPEM™, OPTICLEAN®, OPTIMASE®, PROPERASE®, PURAFECT®, PURAFECT® OXP, PURAMAX™, EXCELLASE™ y PURAFAST™ (Genencor); ALCALASE®, SAVINASE®, PRIMASE®, DURAZYME™, POLARZYME®, OVOZYME®, KANNASE®, LIQUANASE®, NEUTRASE®, RELASE® y ESPERASE® (Novozymes); BLAP™ y variantes de BLAP™ (Henkel Kommanditgesellschaft auf Aktien, Duesseldorf, Alemania), y KAP (subtilisina de *B. alkalophilus*; Kao Corp., Tokio, Japón). Se describen diversas proteasas en los documentos WO95/23221 y WO 92/21760, en la publicación de patente US-2008/0090747 y en las patentes US-5.801.039, 5.340.735, 5.500.364, 5.855.625, US-RE-34.606, 5.955.340, 5.700.676, 6.312.936 y 6.482.628 y varias otras patentes. En algunas realizaciones adicionales, las metaloproteasas son de utilidad en la presente invención, que incluyen aunque no de forma limitativa la metaloproteasa neutra descrita en el documento WO 07/044993.

Adicionalmente, cualquier lipasa adecuada es útil en la presente invención. Las lipasas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, aquellas de origen bacteriano o fúngico. Los mutantes modificados química o genéticamente están incluidos en la presente invención. Los ejemplos de lipasas útiles incluyen la lipasa de *Humicola lanuginosa* (Véase, p. ej., documentos EP 258 068 y EP 305 216), lipasa de *Rhizomucor miehei* (Véase, p. ej., el documento EP 238 023), lipasa de *Candida*, tal como la lipasa de *C. antarctica* (p. ej., la lipasa de *C. antarctica* A o B; Véase, p. ej., el documento EP 214 761), lipasas de *Pseudomonas* tales como lipasa de *P. alcaligenes* y la lipasa de *P. pseudoalcaligenes* (Véase, p. ej., el documento EP 218 272), lipasa de *P. cepacia* (Véase, p. ej., el documento EP 331 376), lipasa de *P. stutzeri* (Véase, p. ej., el documento GB 1.372.034), lipasa de *P. fluorescens*. lipasa de *Bacillus* (p. ej., lipasa de *B. subtilis* [Dartois y col., Biochem. Biophys. Acta 1131:253-260 [1993]]; lipasa de *B. stearothermophilus* [Véase, p. ej., el documento JP 64/744992]; y lipasa de *B. pumilus* [Véase, p. ej., el documento WO 91/16422]).

Además, varias lipasas clonadas son útiles en algunas realizaciones de la presente invención que incluyen, aunque no de forma limitativa, la lipasa de *Penicillium camembertii* (véase, Yamaguchi y col., Gene 103:61-67 [1991]), la lipasa de *Geotricum candidum* (véase Schimada y col., J. Biochem., 106:383-388 [1989]) y varias lipasas de *Rhizopus* tales como la lipasa de *R. delemar* (véase Hass y col., Gene 109:117-113 [1991]), una lipasa de *R. niveus* (Kugimiya y col., Biosci. Biotech. Biochem. 56:716-719 [1992]) y lipasa de *R. oryzae*.

Otros tipos de enzimas lipolíticas tales como cutinasas son útiles, además, en algunas realizaciones de la presente invención e incluyen, aunque no de forma limitativa, la cutinasa derivada de *Pseudomonas mendocina* (véase, el documento WO 88/09367) y la cutinasa derivada de *Fusarium solani pisi* (véase, el documento WO 90/09446).

Las lipasas solubles adicionales incluyen lipasas comerciales tales como M1 LIPASE™, LUMA FAST™ y LIPOMAX™ (Genencor); LIPEX®, LIPOLASE® y LIPOLASE® ULTRA (Novozymes); y LIPASE P™ "Amano" (Amano Pharmaceutical Co. Ltd., Japón).

- En algunas realizaciones de la presente invención, las composiciones de limpieza de la presente invención comprenden, además, lipasas en un nivel de aproximadamente 0,00001 % a aproximadamente 10 % de lipasa adicional en peso de la composición y la csp de los materiales adicionales de limpieza en peso de la composición.
- 5 En otras realizaciones de la presente invención, las composiciones de limpieza de la presente invención comprenden, además, lipasas en un nivel de aproximadamente 0,0001 % a aproximadamente 10 %, de aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 5 %, de aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 2 %, de aproximadamente 0,005 % a aproximadamente 0,5 % de lipasa en peso de la composición.
- 10 En algunas realizaciones de la presente invención, cualquier amilasa adecuada es útil para la presente invención. En algunas realizaciones puede usarse, además, cualquier amilasa (p. ej., alfa y/o beta) adecuada para usar en soluciones alcalinas. Las amilasas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, aquellas de origen bacteriano o fúngico. En algunas realizaciones se incluyen mutantes modificados química o genéticamente. Las amilasas útiles en la presente invención, incluyen, aunque no de forma limitativa, α -amilasas obtenidas de *B. licheniformis* (véase, p. ej., el documento GB 1.296.839). Las amilasas disponibles comercialmente útiles en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, DURAMYL®, TERMAMYL®, FUNGAMYL®, STAINZYME®, STAINZYME PLUS®, STAINZYME ULTRA® y BAN™ (Novozymes), así como POWERASE™, RAPIDASE® y MAXAMYL® P (Genencor).
- 15 En algunas realizaciones de la presente invención, las composiciones de limpieza de la presente invención comprenden, además, amilasas en un nivel de aproximadamente 0,00001 % a aproximadamente 10 % de amilasa adicional en peso de la composición y la csp de los materiales adicionales de limpieza en peso de la composición. En otras realizaciones de la presente invención, las composiciones de limpieza de la presente invención comprenden, además, amilasas en un nivel de aproximadamente 0,0001 % a aproximadamente 10 %, de aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 5 %, de aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 2 %, de aproximadamente 0,005 % a aproximadamente 0,5 % de amilasa en peso de la composición.
- 20 En otras realizaciones, cualquier celulosa adecuada es útil en las composiciones de limpieza de la presente invención. Las celulasas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, aquellas de origen bacteriano o fúngico. En algunas realizaciones se incluyen mutantes modificados química o genéticamente. Las celulasas adecuadas incluyen, aunque no de forma limitativa, celulasas de *Humicola insolens* (véase, p. ej., la patente US-4.435.307). Las celulasas especialmente adecuadas son las celulasas que tienen beneficios de cuidado de los colores (véase, p. ej., el documento EP 0 495 257). Las celulasas comerciales que son útiles en la presente invención incluyen, aunque no de forma limitativa, CELLUZYME®, CAREZYME® (Novozymes) y KAC-500(B)™ (Kao Corporation). En algunas realizaciones, las celulasas se incorporan como partes o fragmentos de celulasas naturales maduras o celulasas variantes, en donde una parte del extremo N se elimina (véase, p. ej., la patente US-5.874.276). En algunas realizaciones, las composiciones de limpieza de la presente invención comprenden, además, celulasas en un nivel de aproximadamente 0,00001 % a aproximadamente 10 % de celulosa adicional en peso de la composición y la csp de los materiales adicionales de limpieza en peso de la composición. En otras realizaciones de la presente invención, las composiciones de limpieza de la presente invención comprenden, además, celulasas en un nivel de aproximadamente 0,0001 % a aproximadamente 10 %, de aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 5 %, de aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 2 %, de aproximadamente 0,005 % a aproximadamente 0,5 % de celulosa en peso de la composición.
- 30 Cualquier mananasa adecuada útil en las composiciones detergentes es, además, útil en la presente invención. Las mananasas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, las de origen bacteriano o fúngico. En algunas realizaciones se incluyen mutantes modificados química o genéticamente. Se conoce varias mananasas que son útiles en la presente invención (véanse, p. ej., las patentes US-6.566.114, la patente US-6.602.842 y la patente US-6.440.991). En algunas realizaciones, las composiciones de limpieza de la presente invención comprenden, además, mananasas en un nivel de aproximadamente 0,00001 % a aproximadamente 10 % de mananasa adicional en peso de la composición y la csp de los materiales adicionales de limpieza en peso de la composición. En algunas realizaciones de la presente invención, las composiciones de limpieza de la presente invención comprenden, además, mananasas en un nivel de aproximadamente 0,0001 % a aproximadamente 10 %, de aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 5 %, de aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 2 %, de aproximadamente 0,005 % a aproximadamente 0,5 % de mananasa en peso de la composición.
- 35 En algunas realizaciones se usan peroxidadas junto con peróxido de hidrógeno o una fuente del mismo (p. ej., un percarbonato, perborato o persulfato) en las composiciones de la presente invención. En algunas realizaciones alternativas, las oxidasas se usan en combinación con oxígeno. Ambos tipos de enzimas se usan para el "blanqueamiento de la solución" (es decir, prevenir la transferencia de tinte de textiles desde una tela teñida a otra tela cuando las telas se lavan juntas en una solución de lavado), preferiblemente, junto con un agente de mejoramiento (véanse, p. ej., los documentos WO 94/12621 y WO 95/01426). Las peroxidadas/oxidasas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, aquellas de origen vegetal, bacteriano o fúngico. En algunas realizaciones se incluyen mutantes modificados química o genéticamente. En algunas realizaciones, las composiciones de limpieza de la presente invención comprenden, adicionalmente, enzimas peroxidada y/u oxidada en un nivel de aproximadamente 0,00001 % a aproximadamente 10 % de peroxidada y/u oxidada adicional en peso de la composición y la csp de los materiales adicionales de limpieza en peso de la composición. En otras realizaciones de la presente invención, las composiciones de limpieza de la presente invención
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

comprenden, además, enzimas peroxidasa y/u oxidasa en un nivel de aproximadamente 0,0001 % a aproximadamente 10 %, de aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 5 %, de aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 2 %, de aproximadamente 0,005 % a aproximadamente 0,5 % de enzimas peroxidasa y/u oxidasa en peso de la composición.

5 En algunas realizaciones, se usan enzimas adicionales que incluyen, aunque no de forma limitativa, perhidrolasas (véase, p. ej., el documento WO 05/056782). Además, en algunas realizaciones, las mezclas de las enzimas mencionadas anteriormente están incluidas en la presente invención, particularmente, una o más proteasas, amilasas, lipasas, mananastas adicionales, y/o al menos una celulasa. Ciertamente, se contempla que varias mezclas de estas enzimas son
10 útiles en la presente invención. Se contempla, además, que los niveles de variación de la una o más proteasas variantes y de una o más enzimas adicionales pueden ser, independientemente, de hasta aproximadamente 10 %, siendo el resto de la composición de limpieza materiales adyuvantes de limpieza. La selección específica de materiales adyuvantes de limpieza se realiza fácilmente teniendo en cuenta la superficie, elemento o tela que se va a limpiar y la forma deseada de la composición para las condiciones de limpieza durante el uso (p. ej., mediante el uso de detergente para lavado).

15 En algunas realizaciones, una cantidad eficaz de una o más proteasas variantes proporcionadas en la presente descripción se incluye en las composiciones útiles para limpiar diversas superficies que requieren la limpieza de manchas proteicas. Dichas composiciones de limpieza incluyen composiciones de limpieza para dichas aplicaciones, tales como limpieza de superficies duras, telas y vajilla. Ciertamente, en algunas realizaciones, la presente invención proporciona composiciones de limpieza de telas, mientras que en otras realizaciones, la presente invención proporciona composiciones
20 de limpieza de material no tejido. Notablemente, la presente invención proporciona, además, composiciones de limpieza adecuadas para el cuidado personal que incluye el cuidado oral (que incluyen dentífricos, pastas dentales, enjuagues bucales, etc., así como además composiciones de limpieza de dentaduras postizas), cuidado de la piel, y composiciones de limpieza para el pelo. Se pretende que la presente invención abarque composiciones detergentes en cualquier forma (es decir, en forma líquida, granulada, en barra, semisólidas, geles, emulsiones, pastillas, cápsulas, etc.).

25 Como ejemplo, varias composiciones de limpieza donde son de utilidad las proteasas variantes de la presente invención se describen con mayor detalle a continuación. En algunas realizaciones en las cuales las composiciones de limpieza de la presente invención se formulan como composiciones adecuadas para uso en los métodos de lavado en lavadoras automáticas, las composiciones de la presente invención contienen, preferiblemente, al menos un tensioactivo y al menos
30 un compuesto mejorador, así como uno o más materiales adicionales de limpieza, preferiblemente, seleccionados de compuestos poliméricos orgánicos, agentes blanqueadores, enzimas adicionales, reductores de espuma, dispersantes, dispersantes de jabón de cal, agentes de suspensión y antired deposición de la suciedad e inhibidores de corrosión. En algunas realizaciones, las composiciones para lavado de ropa contienen, además, agentes suavizantes (es decir, como materiales adyuvantes de limpieza adicionales). Las composiciones de la presente invención son útiles, además, en
35 productos aditivos para detergentes en forma sólida o líquida. Dichos productos aditivos están destinados a complementar y/o mejorar el rendimiento de las composiciones de detergentes convencionales y pueden añadirse en cualquier etapa del proceso de limpieza. En algunas realizaciones, la densidad de las composiciones detergentes para lavado de ropa en la presente invención varía de aproximadamente 400 a aproximadamente 1200 g/litro, mientras en otras realizaciones, varía de aproximadamente 500 a aproximadamente 950 g/litro de composición medida a 20 °C.

40 En realizaciones formuladas como composiciones para uso en métodos manuales para lavado de vajilla, las composiciones de la invención contienen, preferiblemente, al menos un tensioactivo y, preferiblemente, al menos un material adicional de limpieza seleccionado de compuestos poliméricos orgánicos, agentes para mejorar la espuma, iones metálicos del grupo II, disolventes, hidrótrofos y enzimas adicionales.

45 En algunas realizaciones, varias composiciones de limpieza tales como aquellas proporcionadas en la patente US-6.605.458 se usan con las proteasas variantes de la presente invención. Por lo tanto, en algunas realizaciones, las composiciones que comprenden al menos una proteasa variante de la presente invención son una composición de limpieza granulada compacta para telas, mientras que en otras realizaciones, la composición es una composición de
50 limpieza granulada para telas útil para el lavado de telas de color, en otras realizaciones, la composición es una composición de limpieza granulada para telas que proporciona suavidad a través de la capacidad limpiadora, en realizaciones adicionales, la composición es una composición de limpieza líquida para limpieza intensiva para telas. En algunas realizaciones, las composiciones que comprenden al menos una proteasa variante de la presente invención son composiciones de limpieza para telas como las descritas en las patentes US-6.610.642 y US-6.376.450. Adicionalmente,
55 las proteasas variantes de la presente invención se usan en composiciones detergentes granuladas para lavado de ropa específicamente útiles en las condiciones de lavado de Europa o de Japón (véase, p. ej., la patente US-6.610.642).

60 En algunas realizaciones alternativas, la presente invención proporciona composiciones de limpieza para superficies duras que comprenden al menos una proteasa variante proporcionada en la presente descripción. Por lo tanto, en algunas realizaciones, las composiciones que comprenden al menos una proteasa variante de la presente invención es una composición de limpieza para superficies duras, tales como las composiciones descritas en las patentes US-6.610.642, US-6.376.450 y US-6.376.450.

65 En otras realizaciones adicionales, la presente invención proporciona composiciones para el lavado de vajillas que comprenden al menos una proteasa variante proporcionada en la presente descripción. Por lo tanto, en algunas realizaciones, las composiciones que comprenden al menos una proteasa variante de la presente

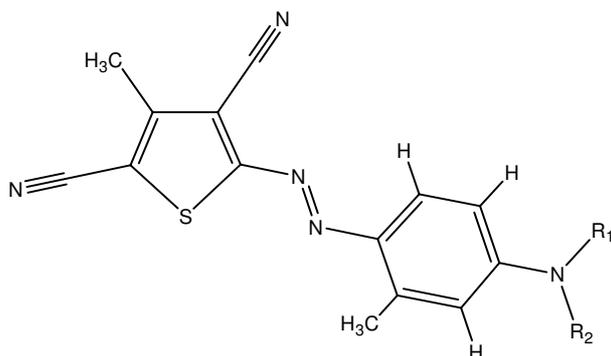
invención es una composición de limpieza para superficies duras, tales como las de las patentes US-6.610.642 y US-6.376.450. En algunas realizaciones adicionales más, la presente invención proporciona composiciones para el lavado de vajillas que comprenden al menos una proteasa variante proporcionada en la presente descripción. En algunas realizaciones adicionales más, las composiciones que comprenden al menos una proteasa variante de la presente invención comprenden composiciones para el cuidado bucal, tales como las descritas en las patentes US-6.376.450 y US-6.376.450. Las formulaciones y descripciones de los compuestos y materiales adyuvantes de limpieza contenidos en las patentes US-6.376.450, 6.605.458, 6.605.458 y 6.610.642 anteriormente mencionadas son útiles con las proteasas variantes proporcionadas en la presente descripción.

Las composiciones de limpieza de la presente invención se formulan en cualquier forma adecuada y se preparan mediante cualquier proceso escogido por el formulador, cuyos ejemplos no limitativos se describen en las patentes US-5.879.584; 5.691.297; 5.574.005; 5.569.645; 5.565.422; 5.516.448; 5.489.392 y 5.486.303. Cuando se prefiere una composición de limpieza de pH bajo, el pH de dicha composición se ajusta mediante la adición de un material tal como monoetanolamina o un material ácido tal como HCl.

Las composiciones de limpieza descritas en la presente descripción son de utilidad para limpiar un sitio (p. ej., una superficie, artículo, vajilla o tela). Típicamente, al menos una parte del sitio se contacta con una realización de la presente composición de limpieza, en forma pura o diluida en un líquido de lavado y, después, opcionalmente, el sitio se lava y/o se enjuaga. Para los propósitos de la presente invención, el "lavado" incluye, pero no se limita a, restregado y agitación mecánica. En algunas realizaciones, las composiciones de limpieza se usan, típicamente, en concentraciones de aproximadamente 500 ppm a aproximadamente 15,000 ppm en solución. Cuando el disolvente de lavado es agua, la temperatura del agua está comprendida típicamente de aproximadamente 5 °C a aproximadamente 90 °C y, cuando el sitio comprende un tejido, la relación másica entre agua y tejido es, típicamente, de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 30:1.

Se proporcionan a continuación más detalles relativos a los adyuvantes de limpieza y/o tratamiento: **Agentes de matizado de tejidos.** Aunque no se prefiere incorporar tintes tonalizadores de tejidos adicionales, además del tinte azoico de tiofeno, la composición puede comprender uno o más agentes matizadores de tejidos adicionales. Los agentes de matizado de tejidos incluyen tintes, conjugados de tinte-arcilla y pigmentos. Los tintes adecuados incluyen los que se depositan más sobre tejidos de algodón en comparación con la deposición sobre tejidos sintéticos tales como poliéster y/o nailon. Otros tintes adecuados incluyen los que se depositan más sobre fibras sintéticas, tales como poliéster y/o nailon en comparación con el algodón. Los tintes adecuados incluyen pequeñas moléculas de tinte y moléculas poliméricas. Los tintes de moléculas pequeñas adecuados incluyen tintes de pequeñas moléculas seleccionados del grupo compuesto por tintes que se encuentran en las clasificaciones de índice de color (C.I.) de Direct Blue, Direct Red, Direct Violet, Acid Blue, Acid Red, Acid Violet, Basic Blue, Basic Violet y Basic Red, o mezclas de los mismos. Entre los ejemplos de tintes de moléculas pequeñas figuran los seleccionados del grupo que consiste en los números de Colour Index (Society of Dyers and Colourists [Sociedad de maestros tinteros y coloristas], Bradford, Reino Unido) Direct Violet 9, Direct Violet 35, Direct Violet 48, Direct Violet 51, Direct Violet 66, Direct Violet 99, Direct Blue 1, Direct Blue 71, Direct Blue 80, Direct Blue 279, Acid Red 17, Acid Red 73, Acid Red 88, Acid Red 150, Acid Violet 15, Acid Violet 17, Acid Violet 24, Acid Violet 43, Acid Red 52, Acid Violet 49, Acid Violet 50, Acid Blue 15, Acid Blue 17, Acid Blue 25, Acid Blue 29, Acid Blue 40, Acid Blue 45, Acid Blue 75, Acid Blue 80, Acid Blue 83, Acid Blue 90 y Acid Blue 113, Acid Black 1, Basic Violet 1, Basic Violet 3, Basic Violet 4, Basic Violet 10, Basic Violet 35, Basic Blue 3, Basic Blue 16, Basic Blue 22, Basic Blue 47, Basic Blue 66, Basic Blue 75, Basic Blue 159, pequeños tintes de moléculas seleccionadas del grupo que consiste en los números de Colour Index (Society of Dyers and Colourists [Sociedad de maestros tinteros y coloristas], Bradford, Reino Unido) Acid Violet 17, Acid Violet 43, Acid Red 52, Acid Red 73, Acid Red 88, Acid Red 150, Acid Blue 25, Acid Blue 29, Acid Blue 45, Acid Blue 113, Acid Black 1, Direct Blue 1, Direct Blue 71. Se pueden preferir los tintes de moléculas pequeñas Direct Violet. Se pueden preferir tintes seleccionados del grupo que consiste en Acid Violet 17, Direct Blue 71, Direct Violet 51, Direct Blue 1, Acid Red 88, Acid Red 150, Acid Blue 29, Acid Blue 113 o mezclas de estos.

Los tintes poliméricos adecuados incluyen tintes poliméricos seleccionados del grupo que consiste en polímeros que contienen cromógenos unidos covalentemente (conjugados de tinte-polímero) y polímeros con cromógenos copolimerizados en la cadena principal del polímero y mezclas de estos, y tintes poliméricos seleccionados del grupo que consiste en colorantes persistentes en los tejidos comercializados con el nombre de Liquitint® (Milliken, Spartanburg, South Carolina, EE. UU.), conjugados de tinte poliméricos formados a partir de, al menos, un tinte reactivo y un polímero seleccionado del grupo que consiste en polímeros que comprenden un resto seleccionado del grupo que consiste en un resto hidroxilo, un resto amina primaria, resto amina secundaria, un resto tiol y mezclas de estos. En otro aspecto adicional, los tintes poliméricos adecuados incluyen tintes poliméricos seleccionados del grupo que consiste en Liquitint® (Milliken, Spartanburg, South Carolina, EE. UU.) Violet CT, carboximetilcelulosa (CMC) conjugada con un tinte Reactive Blue, Reactive Violet o Reactive Red como, por ejemplo, CMC conjugado con los tintes de nombre, según el código C.I. Reactive Blue 19, comercializado por Megazyme, Wicklow, Irlanda, con el nombre de producto AZO-CM-CELLULOSE, código de producto S-ACMC, colorantes poliméricos de trifenilmetano alcoxlado, colorantes poliméricos de tiofeno alcoxlado, y mezclas de los mismos. Los tintes matizadores adicionales preferidos engloban los agentes blanqueantes que se encuentran en WO 08/87497 A1. Estos agentes de blanqueamiento se pueden caracterizar por la siguiente estructura (I):



(I)

5 donde R₁ y R₂ se seleccionan independientemente de: a) [(CH₂CR'HO)_x(CH₂CR''HO)_yH], y donde R' se selecciona del grupo que consiste en H, CH₃, CH₂O(CH₂CH₂O)_zH y mezclas de estos; donde R'' se selecciona del grupo que consiste en H, CH₂O(CH₂CH₂O)_zH, y mezclas de los mismos; en donde x + y ≤ 5; en donde y ≥ 1; y en donde z = 0 a 5;

b) R₁ = alquilo, arilo o arilalquilo y R₂ = [(CH₂CR'HO)_x(CH₂CR''HO)_yH]

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

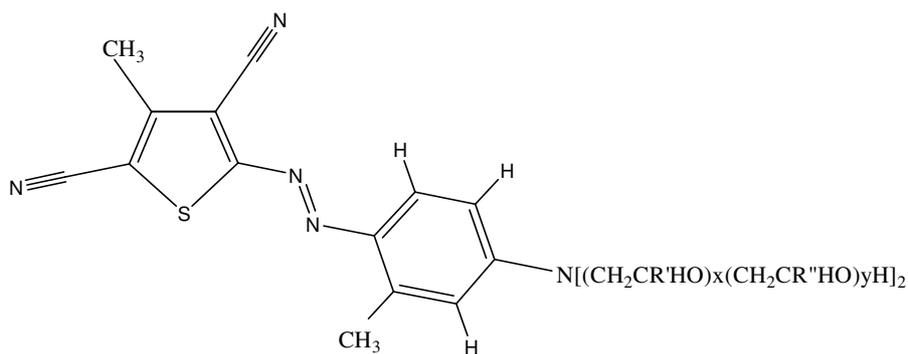
c) R₁ = [CH₂CH (OR₃)CH₂OR₄] y R₂ = [CH₂CH (O R₃)CH₂O R₄]

15 donde R₃ se selecciona del grupo que consiste en H, (CH₂CH₂O)_zH y mezclas de estos; y en la que z = 0 a 10;

donde R₄ es seleccionado del grupo que consiste en alquilo (C₁-C₁₆), grupos arilo, y mezclas de estos; y

20 d) en donde R₁ y R₂ se pueden seleccionar independientemente del producto de adición de amina del óxido de estireno, glicidilmetiléter, isobutilglicidiléter, isopropilglicidiléter, t-butilglicidiléter, 2-etilhexilglicidiléter y glicidilhexadeciléter, seguido de la adición de 1 a 10 unidades de óxido de alquileno.

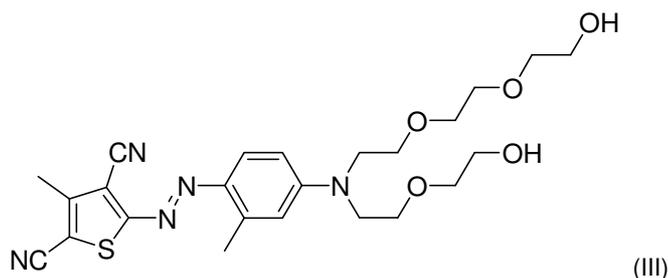
25 Un agente matizador de tejidos adicional preferido que se puede incorporar en las composiciones de la invención puede caracterizarse por la siguiente estructura (II):



(II)

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

Otro tinte matizador adicional preferido puede caracterizarse por la siguiente estructura (III):



Este tinte es, de forma típica, una mezcla de compuestos que tiene un promedio de 3-10 grupos EO, preferiblemente 5 grupos EO por molécula.

Tintes tonalizadores adicionales son los que se describen en USPN 2008 34511 A1 (Unilever). Un agente preferido es "Solvent Violet 13".

Los conjugados de tinte-arcilla adecuados incluyen conjugados de tinte-arcilla seleccionados del grupo que comprende, al menos, un tinte catiónico/básico y una arcilla de tipo esmectita, y mezclas de los mismos. En otro aspecto, los conjugados de tinte-arcilla adecuados incluyen conjugados de tinte-arcilla seleccionados del grupo que consiste en un tinte catiónico/básico seleccionado del grupo que consiste en C.I. Basic Yellow, del 1 al 108, C.I. Basic Orange, del 1 al 69, C.I. Basic Red, del 1 al 118, C.I. Basic Violet, del 1 al 51, C.I. Basic Blue, del 1 al 164, C.I. Basic Green, del 1 al 14, C.I. Basic Brown, del 1 al 23; C.I. Basic Black, del 1 al 11; y una arcilla seleccionada del grupo que consiste en arcilla de tipo montmorillonita, arcilla de tipo hectorita, arcilla de tipo saponita y mezclas de los mismos. En otro aspecto adicional, los conjugados de arcilla-tinte adecuados incluyen conjugados de arcilla-tinte seleccionados del grupo que consiste en: conjugado de montmorillonita Basic Blue B7 C.I. 42595, conjugado de montmorillonita Basic Blue B9 C.I. 52015, conjugado de montmorillonita Basic Violet V3 C.I. 42555, conjugado de montmorillonita Basic Green G1 C.I. 42040, conjugado de montmorillonita Basic Red R1 C.I. 45160, conjugado de montmorillonita C.I. Basic Black 2, conjugado de hectorita Basic Blue B7 C.I. 42595, conjugado de hectorita Basic Blue B9 C.I. 52015, conjugado de hectorita Basic Violet V3 C.I. 42555, conjugado de hectorita Basic Green G1 C.I. 42040, conjugado de hectorita Basic Red R1 C.I. 45160, conjugado de hectorita C.I. Basic Black 2, conjugado de saponita Basic Blue B7 C.I. 42595, conjugado de saponita Basic Blue B9 C.I. 52015, conjugado de saponita Basic Violet V3 C.I. 42555, conjugado de saponita Basic Green G1 C.I. 42040, conjugado de saponita Basic Red R1 C.I. 45160, conjugado de saponita C.I. Basic Black 2 conjugado y mezclas de los mismos.

Los pigmentos adecuados incluyen pigmentos seleccionados del grupo que consiste en flavantrona, indantrona, indantrona clorada que contiene de 1 a 4 átomos de cloro, pirantrona, dicloropirantrona, monobromodicloropirantrona, dibromodicloropirantrona, tetrabromopirantrona, diimida del ácido perilen-3,4,9,10-tetracarboxílico, donde los grupos imida pueden estar no sustituidos o sustituidos por alquilo C₁-C₃ o un radical fenilo o heterocíclico, y donde los radicales fenilo y heterocíclicos pueden, de forma adicional, llevar sustituyentes que no confieran solubilidad en agua, amidas del ácido antrapirimidincarboxílico, violantrona, isoviolantrona, pigmentos de tipo dioxazina, ftalocianina de cobre, que pueden contener hasta 2 átomos de cloro por molécula, ftalocianina de policloro-cobre o ftalocianina de polibromocloro-cobre que contiene hasta 14 átomos de bromo por molécula y mezclas de los mismos. Son especialmente preferidos los pigmentos Blues 15 a 20, especialmente los pigmentos Blue 15 y/o 16. Otros pigmentos adecuados incluyen los seleccionados del grupo que consiste en Ultramarine Blue (C.I. Pigment Blue 29), Ultramarine Violet (C.I. Pigment Violet 15) y mezclas de los mismos. En US-7.208.459 B2 se describen agentes de matizado adecuados.

Encapsulados. La composición puede comprender un encapsulado. En un aspecto, un encapsulado comprende un núcleo, una envoltura que tiene una superficie interior y una superficie exterior, encapsulando dicha envoltura dicho núcleo. El núcleo puede comprender cualquier adyuvante para el cuidado durante el lavado de la ropa, aunque de forma típica el núcleo puede comprender material seleccionado del grupo que consiste en perfumes; abrillantadores; tintes; repelentes de insectos; siliconas; ceras; agentes saborizantes; vitaminas; agentes suavizantes de tejidos; agentes para el cuidado de la piel, en un aspecto, parafinas; enzimas; agentes antibacterianos; blanqueadores; estimulantes sensoriales; y mezclas de los mismos; y dicha envoltura puede comprender un material seleccionado del grupo que consiste en polietilenos; poliamidas; poli(alcoholes vinílicos), conteniendo de forma opcional otros comonomeros; poliestirenos; poliisoprenos; policarbonatos; poliésteres; poliacrilatos; aminoplastos, en un aspecto, dicho aminoplasto puede comprender poliureas, poliuretano, y/o poliureauretano, en un aspecto, dicha poliurea puede comprender polioximetilenurea y/o melamina formaldehído; poliolefinas; polisacáridos, en un aspecto dicho polisacárido puede comprender alginato y/o quitosana; gelatina; goma laca; resinas epoxi; polímeros de vinilo; compuestos inorgánicos insolubles en agua; silicona; y mezclas de los mismos. Los encapsulados preferidos comprenden perfume. Los encapsulados preferidos comprenden una envoltura, que puede comprender melamina formaldehído y/o melamina formaldehído reticulada. Se describe que los encapsulados preferidos comprenden un material de núcleo y una envoltura, rodeando dicha envoltura al menos parcialmente dicho material de núcleo. Al menos 75 %, 85 % o incluso 90 % de dichos encapsulados puede tener una resistencia a la fractura de 0,2 MPa a 10 MPa, y una fuga del agente beneficioso de 0 % a 20 %, o incluso menos de 10 % o 5 % basado en el agente beneficioso inicial encapsulado total. Se prefieren aquellos en los que al menos 75 %, 85 % o incluso 90 % de dichos

encapsulados pueden tener (i) un tamaño de partículas de 1 micrómetro a 80 micrómetros, de 5 micrómetros a 60 micrómetros, de 10 micrómetros a 50 micrómetros, o incluso de 15 micrómetros a 40 micrómetros, y/o (ii) al menos 75 %, 85 % o incluso 90 % de dichos encapsulados puede tener un espesor de pared de la partícula de 30 nm a 250 nm, de 80 nm a 180 nm, o incluso de 100 nm a 160 nm. Se pueden emplear eliminadores de formaldehído con los encapsulados, por ejemplo, en una suspensión acuosa de cápsulas y/o añadirse a una composición antes, durante o después de añadir los encapsulados a dicha composición. Las cápsulas adecuadas se pueden preparar siguiendo las enseñanzas de USPA 2008/0305982 A1; y/o de USPA 2009/0247449 A1. Alternativamente, las cápsulas adecuadas se pueden adquirir de Appleton Papers Inc. de Appleton, Wisconsin EE. UU.

En un aspecto preferido, la composición puede comprender un auxiliar de deposición, preferiblemente, además de los encapsulados. Los auxiliares de deposición preferidos se seleccionan del grupo que consiste en polímeros catiónicos y no iónicos. Los polímeros adecuados incluyen almidones catiónicos, hidroxietilcelulosa catiónica, polivinilformaldehído, goma de algarrobo, mananos, xiloglucanos, goma tamarindo, tereftalato de polietileno y polímeros que contienen metacrilato de dimetilaminoetil, opcionalmente con uno o más monómeros seleccionados del grupo que comprende ácido acrílico y acrilamida.

Perfume. Las composiciones preferidas de la invención comprenden perfume. De forma típica, la composición comprende un perfume que comprende una o más materias primas de perfume seleccionadas del grupo que se describe en WO08/87497. Sin embargo, se puede usar cualquier perfume útil en una composición para el cuidado de la ropa. Un método preferido para incorporar perfume a las composiciones de la invención es mediante una partícula de perfume encapsulada que comprende bien un compuesto hidroxílico soluble en agua o melamina formaldehído o poli(alcohol vinílico) modificado. En un aspecto, el encapsulado comprende (a) una matriz sólida al menos parcialmente soluble en agua que comprende uno o más compuestos hidroxílicos solubles en agua, preferiblemente almidón; y (b) un aceite perfumado encapsulado por la matriz sólida. En un aspecto adicional, el perfume puede estar precomplejado con una poliamina, preferiblemente una polietilenimina, para formar una base de Schiff.

Polímeros. La composición puede comprender uno o más polímeros. Los ejemplos son carboximetilcelulosa opcionalmente modificada, poli(vinil-pirrolidona), poli(etilenglicol), poli(alcohol vinílico), poli(vinilpiridina-N-óxido), poli(vinilimidazol), policarboxilatos, tales como poli(acrilatos), copolímeros de ácido maleico/acrílico y copolímeros de metacrilato de laurilo/ácido acrílico.

La composición puede comprender uno o más polímeros limpiadores anfífilos tales como el compuesto que tiene la siguiente estructura general: bis((C₂H₅O)(C₂H₄O)_n)(CH₃)-N⁺-C_xH_{2x}-N⁺-(CH₃)-bis((C₂H₅O)(C₂H₄O)_n), donde n = de 20 a 30, y x = de 3 a 8, o variantes sulfatadas o sulfonadas del mismo. En un aspecto, este polímero está sulfatado o sulfonado para proporcionar un polímero de suspensión de suciedad de ion híbrido.

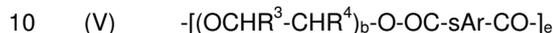
La composición comprende preferiblemente polímeros limpiadores de grasa alcoxilados anfífilos, que tienen propiedades hidrófobas e hidrófilas equilibradas, de manera que retiran partículas de grasa de los tejidos y superficies. Los polímeros limpiadores de grasa anfífilos alcoxilados anfífilos preferidos comprenden una estructura de núcleo y una pluralidad de grupos alcoxilados unidos a dicha estructura de núcleo. Estos pueden comprender polialquileniminas alcoxiladas, preferiblemente que tienen un bloque de óxido de polietileno interno y un bloque de óxido de polipropileno externo. De forma típica, estos pueden incorporarse a las composiciones de la invención en cantidades de 0,005 a 10 % en peso, generalmente, de 0,5 a 8 % en peso.

Los policarboxilatos alcoxilados, tales como los preparados a partir de poli(acrilatos), son útiles en la presente memoria para proporcionar un comportamiento adicional de eliminación de la grasa. Dichos materiales se describen en WO 91/08281 y WO 90/01815. Químicamente, estos materiales comprenden poli(acrilatos) que tienen una cadena lateral etoxi por cada 7-8 unidades acrilato. Las cadenas laterales tienen la fórmula -(CH₂CH₂O)_m (CH₂)_nCH₃ en donde m es 2-3 y n es 6-12. Las cadenas secundarias están unidas mediante éster a una "estructura principal" de poli(acrilato) para proporcionar una estructura de tipo polímero "comb". El peso molecular puede variar, pero típicamente está en el intervalo de aproximadamente 2000 a aproximadamente 50.000. Dichos policarboxilatos alcoxilados pueden comprender de aproximadamente 0,05 % a aproximadamente 10 %, en peso de las composiciones de la presente invención.

Las mezclas de tensioactivos auxiliares y otros ingredientes adyuvantes son particularmente adecuadas para usar con un copolímero de injerto anfífilo. El(Los) copolímero(s) de injerto anfífilo(s) preferido(s) comprenden (i) una cadena principal de poli(etilenglicol); y (ii) al menos un resto colgante seleccionado de poli(acetato de vinilo), poli(alcohol vinílico) y mezclas de los mismos. Un copolímero de injerto anfífilo preferido es Sokalan HP22, suministrado por BASF. Los polímeros adecuados incluyen copolímeros de injerto aleatorio, preferiblemente un copolímero de poli(óxido de etileno) injertado con poli(acetato de vinilo) que tiene una cadena principal de poli(óxido de etileno) y múltiples cadenas laterales de poli(acetato de vinilo). El peso molecular de la cadena principal del poli(óxido de etileno) es, preferiblemente, de aproximadamente 6.000 y la relación de peso del poli(óxido de etileno) a acetato de polivinilo es de aproximadamente 40 a 60 y no hay más de 1 punto de injerto por 50 unidades de óxido de etileno. De forma típica, estos se incorporan a las composiciones de la invención en cantidades de 0,005 a 10 % en peso, más habitualmente de 0,05 a 8 % en peso. Preferiblemente la composición comprende uno o más polímeros de carboxilato, tal como un copolímero aleatorio de maleato/acrilato o un homopolímero de poli(acrilato). En un aspecto, en polímero de carboxilato es un homopolímero de

poliacrilato que tiene un peso molecular de 4000 Da a 9000 Da, o de 6000 Da a 9000 Da. De forma típica, estos se incorporan a las composiciones de la invención en cantidades de 0,005 a 10 % en peso, o de 0,05 a 8 % en peso.

5 Preferiblemente, la composición comprende uno o más polímeros para liberación de la suciedad. Los ejemplos incluyen polímeros para la liberación de la suciedad que tienen la estructura que se define mediante una de las siguientes Fórmulas (IV), (V) o (VI):



en donde:

15 a, b y c son de 1 a 200;

d, e y f son de 1 a 50;

Ar es un fenileno sustituido en 1,4;

sAr es fenileno sustituido en 1,3, sustituido en la posición 5 con SO_3Me ;

20 Me es Li, K, Mg/2, Ca/2, Al/3, amonio, mono-, di-, tri-, o tetraalquilamonio en donde los grupos alquilo son alquilo $\text{C}_1\text{-C}_{18}$ o hidroxialquilo $\text{C}_2\text{-C}_{10}$, o mezclas de los mismos;

R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 y R^6 se seleccionan independientemente de H o n-alquilo o iso-alquilo $\text{C}_1\text{-C}_{18}$; y

R^7 es un grupo alquilo $\text{C}_1\text{-C}_{18}$ lineal o ramificado, o un grupo alquenilo $\text{C}_2\text{-C}_{30}$ lineal o ramificado, o un grupo cicloalquilo con 5 a 9 átomos de carbono, o un grupo arilo $\text{C}_8\text{-C}_{30}$, o un grupo arilalquilo de $\text{C}_6\text{-C}_{30}$.

25 Los polímeros para la liberación de la suciedad adecuados son los polímeros para la liberación de la suciedad de poliéster tales como los polímeros Repel-o-tex, incluidos Repel-o-tex SF, SF-2 y SRP6 suministrados por Rhodia. Otros polímeros de liberación de suciedad adecuados incluyen los polímeros Texcare, incluidos Texcare SRA100, SRA300, SRN100, SRN170, SRN240, SRN300 y SRN325 comercializados por Clariant. Otros polímeros para la liberación de la suciedad adecuados son los polímeros Marloquest tales como Marloquest SL suministrados por Sasol.

30 Preferiblemente, la composición comprende uno o más polímeros celulósicos, incluidos los seleccionados de alquilcelulosa, alquilalcoialquilcelulosa, carboxialquilcelulosa, alquilcarboxialquilcelulosa. Los polímeros celulósicos preferidos se seleccionan del grupo que comprende carboximetilcelulosa, metilcelulosa, metil hidroxietilcelulosa, metil carboximetilcelulosa, y mezclas de los mismos. En un aspecto, la carboximetilcelulosa tiene un grado de sustitución de carboximetilo de 0,5 a 0,9 y un peso molecular de 100.000 Da a 300.000 Da.

35 **Enzimas.** Preferiblemente, la composición comprende una o más enzimas. Las enzimas preferidas proporcionan ventajas de capacidad limpiadora y/o cuidado de tejidos. Los ejemplos de enzimas adecuados incluyen, aunque no de forma limitativa, hemicelulasas, peroxidasas, proteasas, celulasas, xilanasas, lipasas, fosfolipasas, esterases, cutinasas, pectinasas, mananasas, pectato liasas, queratinasas, reductasas, oxidasas, fenoloxidasas, lipoxigenasas, ligninasas, pululanasas, tannasas, pentosanasas, malanasas, β -glucanasas, arabinosidasas, hialuronidasa, condroitinasa, lacasa, y amilasas, o mezclas de los mismos. Una combinación típica es un cóctel enzimático que puede comprender, por ejemplo, una proteasa y lipasa en conjunción con amilasa. Si están presentes en la composición, las enzimas adicionales anteriormente mencionadas pueden estar presentes a niveles de

40 aproximadamente 0,00001 % a aproximadamente 2 %, de aproximadamente 0,0001 % a aproximadamente 1 % o, incluso, de aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 0,5 % de proteína enzimática en peso de la composición.

Proteasas. Preferiblemente, la composición comprende una o más proteasas. Las proteasas adecuadas incluyen metaloproteasas y serina proteasas, incluidas serina proteasas neutras o alcalinas, tales como subtilisinas (EC 3.4.21.62). Las proteasas adecuadas incluyen las de origen animal, vegetal o microbiano. En un aspecto, dicha proteasa adecuada puede ser de origen microbiano. Las proteasas adecuadas incluyen mutantes modificados

50 química o genéticamente de las proteasas adecuadas anteriormente mencionadas. En un aspecto, la proteasa adecuada puede ser una serina proteasa, tal como una proteasa alcalina microbiana o/y una proteasa de tipo tripsina. Los ejemplos de proteasas neutras o alcalinas adecuadas incluyen:

55 (a) subtilisinas (EC 3.4.21.62), incluidas las derivadas de *Bacillus*, tales como *Bacillus lentus*, *B. alkalophilus*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus* y *Bacillus gibsonii* descritas en los documentos US-6.312.936 B1, US-5.679.630, US-4.760.025, US-7.262.042 y WO09/021867.

(b) proteasas de tipo tripsina o de tipo quimotripsina, tales como tripsina (p. ej., de origen porcino o bovino) incluidas la proteasa de *Fusarium* descrita en el documento WO 89/06270 y las proteasas de quimotripsina derivadas de *Cellomonas* descritas en los documentos WO 05/052161 y WO 05/052146.

60 (c) metaloproteasas, incluidas las derivadas de *Bacillus amyloliquefaciens* descritas en el documento WO 07/044993A2.

Las proteasas preferidas incluyen las derivadas de *Bacillus gibsonii* o *Bacillus lentus*.

65 Las enzimas proteasas adecuadas comerciales incluyen las que se venden con los nombres comerciales Alcalase®, Savinase®, Primase®, Durazym®, Polarzyme®, Kannase®, Liqunase®, Liqunase Ultra®, Savinase Ultra®,

Ovozyme®, Neutrase®, Everlase® y Esperase® por Novozymes A/S (Dinamarca), las que se venden con el nombre comercial Maxatase®, Maxacal®, Maxapem®, Properase®, Purafect®, Purafect Prime®, Purafect Ox®, FN3®, FN4®, Excellase® y Purafect OXP® por Genencor International, las que se venden con el nombre comercial Opticlean® y Optimase® por Solvay Enzymes, las comercializadas por Henkel/ Kemira, especialmente BLAP (secuencia mostrada en la Figura 29 de US-5.352.604 con las siguientes mutaciones S99D + S101 R + S103A + V104I + G159S, denominada a continuación como BLAP), BLAP R (BLAP con S3T + V4I + V199M + V205I + L217D), BLAP X (BLAP con S3T + V4I + V205I) y BLAP F49 (BLAP con S3T + V4I + A194P + V199M + V205I + L217D) - todas de Henkel/Kemira; y KAP (subtilisina de *Bacillus alkalophilus* con las mutaciones A230V + S256G + S259N) de Kao.

10 **Amilasas.** Preferiblemente, la composición puede comprender una amilasa. Las alfa-amilasas adecuadas incluyen las de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen los mutantes modificados química o genéticamente (variantes). Una alfa-amilasa alcalina preferida se deriva de una cepa de *Bacillus*, tal como *Bacillus licheniformis*,
 15 *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, u otro *Bacillus sp.*, tal como *Bacillus sp.* NCIB 12289, NCIB 12512, NCIB 12513, DSM 9375 (USP 7.153.818) DSM 12368, DSMZ n.º 12649, KSM AP1378 (WO 97/00324), KSM K36 o KSM K38 (EP 1.022.334). Las amilasas preferidas incluyen:

(a) las variantes descritas en los documentos WO 94/02597, WO 94/18314, WO96/23874 y WO 97/43424, especialmente las variantes con sustituciones en una o más de las siguientes posiciones respecto de la enzima enumerada como Id. de sec. n.º 2 en el documento WO 96/23874: 15, 23, 105, 106, 124, 128, 133, 154, 156, 181, 188, 190, 197, 202, 208, 209, 243, 264, 304, 305, 391, 408 y 444.

20 (b) las variantes descritas en USP 5.856.164 y WO99/23211, WO96/23873, WO00/60060 y WO06/002643, especialmente las variantes con una o más sustituciones en las siguientes posiciones respecto de la enzima AA560 listada como Id. de sec. n.º 12 en WO06/002643:

25 26, 30, 33, 82, 37, 106, 118, 128, 133, 149, 150, 160, 178, 182, 186, 193, 203, 214, 231, 256, 257, 258, 269, 270, 272, 283, 295, 296, 298, 299, 303, 304, 305, 311, 314, 315, 318, 319, 339, 345, 361, 378, 383, 419, 421, 437, 441, 444, 445, 446, 447, 450, 461, 471, 482, 484, preferiblemente que contienen también las deleciones de D183* y G184*.

(c) las variantes que presentan al menos 90 % de identidad con la Id. de sec. n.º 4 en WO06/002643, la enzima natural procedente de *Bacillus SP722*, especialmente las variantes con deleciones en las posiciones 183 y 184 y las variantes descritas en WO 00/60060.

30 (d) las variantes que muestran al menos 95 % de identidad con la enzima de tipo silvestre procedente de *Bacillus sp.*707 (Id. de sec. n.º: 7 del documento US-6.093.562), especialmente las que comprenden una o más de las siguientes mutaciones M202, M208, S255, R172, y/o M261. Preferiblemente dicha amilasa comprende una o más de M202L, M202V, M202S, M202T, M202I, M202Q, M202W, S255N y/o R172Q. Son especialmente preferidas aquellas que comprenden las mutaciones M202L o M202T.

35 (e) las variantes descritas en WO 09/149130, preferiblemente las que presentan al menos 90 % de identidad con la Id. de sec. n.º 1 o Id. de sec. n.º 2 en WO 09/149130, la enzima natural de *Geobacillus Stearothermophilus* o una versión truncada de la misma.

Las alfa-amilasas comercialmente disponibles adecuadas incluyen DURAMYL®, LIQUEZYME®, TERMAMYL®,
 40 TERMAMYL ULTRA®, NATALASE®, SUPRAMYL®, STAINZYME®, STAINZYME PLUS®, FUNGAMYL® y BAN® (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca), KEMZYM® AT 9000 Biozym Biotech Trading GmbH Wehlstrasse 27b A-1200 Wien Austria, RAPIDASE®, PURASTAR®, ENZYSE®, OPTISIZE HT PLUS®, POWERASE® y PURASTAR OXAM® (Genencor International Inc., Palo Alto, California) y KAM® (Kao, 14-10 Nihonbashi Kayabacho, 1-chome, Chuo-ku Tokyo 103-8210, Japón). En un aspecto, las amilasas adecuadas incluyen
 45 NATALASE®, STAINZYME® y STAINZYME PLUS® y mezclas de las mismas.

Lipasas. Preferiblemente, la invención comprende una o más lipasas, incluidas "lipasas de primer ciclo", tales como las descritas en las patentes US-6.939.702 B1 y US-PA 2009/0217464. Las lipasas preferidas son lipasas de primer lavado. En una realización de la invención, la composición comprende una lipasa de primer lavado. Las lipasas de primer lavado incluyen una lipasa que es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que: (a) tiene una identidad de, al
 50 menos, 90 % con la lipasa natural derivada de la cepa DSM 4109 de *Humicola lanuginosa*; (b) comparada con dicha lipasa natural, comprende una sustitución de un aminoácido eléctricamente neutro o con carga negativa en la superficie de la estructura tridimensional en 15A de E1 o Q249 con un aminoácido cargado positivamente; y (c) comprende una adición de péptido en el extremo C; y/o (d) comprende una adición de péptido en el extremo N y/o (e) satisface las siguientes limitaciones: i) comprende un aminoácido negativo en la posición E210 de dicha lipasa natural; ii) comprende un
 55 aminoácido cargado negativamente en la región correspondiente a las posiciones 90-101 de dicha lipasa natural; y iii) comprende un aminoácido neutro o cargado negativamente en una posición correspondiente a N94 de dicha lipasa natural y/o tiene una carga eléctrica neta negativa o neutra en la región correspondiente a las posiciones 90-101 de dicha lipasa natural. Se prefieren variantes de la lipasa natural procedente de *Thermomyces lanuginosus* que comprende una o más de las mutaciones T231R y N233R. La secuencia natural tiene los 269 aminoácidos (aminoácidos 23 – 291) del número de registro Swissprot Swiss-Prot O59952 (derivada de *Thermomyces lanuginosus* (*Humicola lanuginosa*)). Las lipasas preferidas incluirían las comercializadas con el nombre comercial Lipex® y Lipolex® y Lipoclean®.

Endoglucanasas. Otras enzimas preferidas incluyen endoglucanasas derivadas de microorganismos con actividad endo-beta-1,4-glucanasa (E.C. 3.2.1.4), que incluye un polipéptido bacteriano endógeno para un miembro del género
 65 *Bacillus* que tiene una secuencia con una identidad de al menos 90 %, 94 %, 97 % e incluso del 99 % con la secuencia

de aminoácidos Id. de sec. n.º 2 en US-7.141.403B2) y mezclas de los mismos. Las endoglucanasas adecuadas se venden con los nombres comerciales Celluclean® y Whitezyme® (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca).

5 **Pectato liasas.** Otras enzimas preferidas incluyen las pectato liasas comercializadas con los nombres comerciales Pectawash®, Pectaway®, Xpect® y mananasas comercializadas con los nombres comerciales Mannaway® (todas de Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca), y Purabrite® (Genencor International Inc., Palo Alto, California).

10 **Agentes blanqueantes.** Puede ser preferible que la composición comprenda uno o más agentes blanqueantes. Los agentes blanqueantes adecuados que no sean catalizadores del blanqueador incluyen, fotoblanqueadores, activadores del blanqueador, peróxido de hidrógeno, fuentes de peróxido de hidrógeno, perácidos preformados y mezclas de los mismos. En general, cuando se utiliza un agente blanqueante, las composiciones de la presente invención pueden comprender de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 50 % o incluso de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 25 % de agente blanqueante o mezclas de agentes blanqueantes en peso de la composición sujeto. Ejemplos de agentes blanqueantes adecuados incluyen:

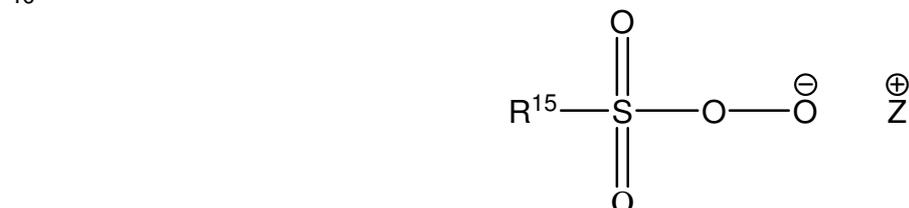
15 (1) fotoblanqueantes, por ejemplo, ftalocianina de cinc sulfonada, ftalocianinas de aluminio sulfonada, tintes de xanteno y mezclas de los mismos;

20 (2) perácidos formados previamente: Los perácidos formados previamente adecuados incluyen, aunque no de forma limitativa, compuestos seleccionados del grupo que consiste en perácidos formados previamente o sales de los mismos, de forma típica, sales y ácidos percarboxílicos, sales y ácidos percarbónicos, sales y ácidos perimidicos, sales y ácidos peroximonosulfúricos, por ejemplo, Oxone®, y mezclas de los mismos. Los ejemplos adecuados incluyen ácidos peroxicarboxílicos o sales de los mismos, o ácidos peroxisulfónicos o sales de los mismos. Las sales de ácido peroxicarboxílico típicas adecuadas para su uso en la presente memoria tienen una estructura química correspondiente a la siguiente fórmula química:



30 en donde: R¹⁴ se selecciona entre grupos alquilo, aralquilo, cicloalquilo, arilo o heterocíclicos; el grupo R¹⁴ puede ser lineal o ramificado, sustituido o no sustituido; que tiene, cuando el perácido es hidrófobo, de 6 a 14 átomos de carbono, o de 8 a 12 átomos de carbono y, cuando el perácido es hidrófilo, menos de 6 átomos de carbono o incluso menos de 4 átomos de carbono e Y es cualquier contraión adecuado que consiga una neutralidad de carga eléctrica, preferiblemente Y se selecciona de hidrógeno, sodio o potasio. Preferiblemente, R¹⁴ es un alquilo C₆₋₉ lineal o ramificado, sustituido o no sustituido. Preferiblemente, el peroxiácido o sal del mismo se selecciona de ácido peroxihexanoico, ácido peroxiheptanoico, ácido peroxioctanoico, ácido peroxinonanoico, ácido peroxidecanoico, cualquier sal de los mismos, o cualquier combinación de los mismos. Los peroxiácidos especialmente preferidos son los ácidos ftalimidoperoxialcanoicos, en particular el ácido ε-ftalimidoperoxihexanoico (PAP). Preferiblemente, el peroxiácido o sal del mismo tiene un punto de fusión en el intervalo de 30 °C a 60 °C.

40 El peroxiácido preformado o sal del mismo también puede ser un ácido peroxisulfónico o sal del mismo, que tiene de forma típica una estructura química correspondiente a la siguiente fórmula general:



en donde: R¹⁵ se selecciona de entre grupos alquilo, aralquilo, cicloalquilo, arilo o heterocíclicos; el grupo R¹⁵ puede ser lineal o ramificado, sustituido o no sustituido; y Z es cualquier contraión adecuado que consiga una neutralidad de carga eléctrica, preferiblemente Z se selecciona de hidrógeno, sodio o potasio. Preferiblemente, R¹⁵ es un alquilo C₄₋₁₄ lineal o ramificado, sustituido o no sustituido, preferiblemente alquilo C₆₋₁₄. Preferiblemente dichos componentes blanqueadores pueden estar presentes en las composiciones de la invención en una cantidad de 0,01 a 50 %, con máxima preferencia de 0,1 % a 20 %.

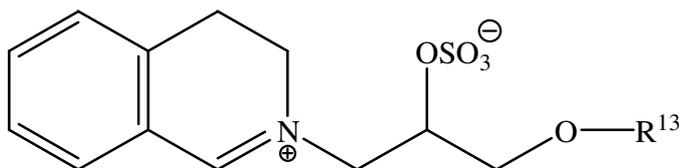
50 (3) fuentes de peróxido de hidrógeno, por ejemplo, sales inorgánicas perhidratadas, incluidas sales de metal alcalino tales como sales sódicas de perborato (habitualmente monohidratado o tetrahidratado), sales percarbonato, persulfato, perfosfato, persilicato y mezclas de las mismas. En un aspecto de la invención, las sales inorgánicas perhidratadas se seleccionan del grupo que consiste en sales sódicas de perborato, percarbonato y mezclas de las mismas. Cuando se utilizan, las sales inorgánicas perhidratadas están de forma típica presentes en cantidades de 0,05 % a 40 % en peso, o de 1 % a 30 % en peso, de la composición general de limpieza y/o tratante y, de forma típica, se incorporan a estas composiciones de limpieza y/o tratantes como un sólido cristalino que se puede recubrir. Los recubrimientos adecuados incluyen sales inorgánicas tales como silicato de metal alcalino, sales carbonato o borato o mezclas de las mismas o materiales orgánicos tales como polímeros, ceras, aceites o jabones grasos solubles o dispersables en agua; y

(4) activadores del blanqueador que tienen R-(C=O)-L en donde R es un grupo alquilo, de forma opcional ramificado, que tiene, cuando el activador del blanqueador es hidrófobo, de 6 a 14 átomos de carbono, o de 8 a 12 átomos de carbono y, cuando el activador del blanqueador es hidrófilo, menos de 6 átomos de carbono o incluso menos de 4 átomos de carbono; y L es un grupo saliente. Ejemplos de grupos salientes adecuados son ácido benzoico y derivados del mismo - especialmente bencenosulfonato. Los activadores del blanqueador adecuados incluyen dodecanoil oxibenceno sulfonato, decanoil oxibenceno sulfonato, ácido decanoiloxibenzoico o sales del mismo, 3,5,5-trimetilhexanoiloxibenceno sulfonato, tetraacetil etilendiamina (TAED) y nonanoiloxibenceno sulfonato (NOBS). Los activadores del blanqueador adecuados también se describen en WO 98/17767. Aunque puede emplearse cualquier activador del blanqueador adecuado, en un aspecto de la invención, la composición sujeto puede comprender NOBS, TAED o mezclas de los mismos.

(5) Catalizadores del blanqueador. Las composiciones de la presente invención también pueden incluir uno o más catalizadores del blanqueador capaces de aceptar un átomo de oxígeno procedente de un peroxiácido y/o sal del mismo, y de transferir el átomo de oxígeno a un sustrato oxidable. Los catalizadores del blanqueador adecuados incluyen, aunque no de forma limitativa, cationes y poliiones de iminio; iones híbridos de iminio; aminas modificadas; óxidos de amina modificados; N-sulfonil iminas; N-fosfonil iminas; N-acil iminas; dióxidos de tiadiazol; perfluoroiminas; cetonas azucaradas cíclicas y alfa aminocetonas y mezclas de las mismas. Las alfa aminocetonas adecuadas son, por ejemplo, las descritas en WO 2012/000846 A1, WO 2008/015443 A1, y WO 2008/014965 A1. Las mezclas adecuadas se describen en USPA 2007/0173430 A1.

Sin pretender imponer ninguna teoría, los inventores creen que el control de la electrofilicidad e hidrofobicidad de la forma anteriormente descrita permite que el ingrediente blanqueador se suministre sustancialmente solamente a las zonas del tejido que sean más hidrófobas, y que contengan suciedad rica en electrones, incluidos cromatóforos visibles, que son susceptibles al blanqueo mediante oxidantes muy electrófilos.

En un aspecto, el catalizador del blanqueador tiene una estructura que corresponde a la fórmula general siguiente:



en donde R¹³ se selecciona del grupo que consiste en 2-etilhexilo, 2-propilheptilo, 2-butiloctilo, 2-pentilnonilo, 2-hexildecilo, n-dodecilo, n-tetradecilo, n-hexadecilo, n-octadecilo, iso-nonilo, iso-decilo, iso-tridecilo e iso-pentadecilo;

(6) La composición puede comprender preferiblemente complejos de metales catalíticos. Un tipo de catalizador de blanqueo preferido que contiene metal es un sistema catalizador que comprende un catión de metal de transición con una actividad catalítica de blanqueo definida, tales como los cationes cobre, hierro, titanio, rutenio, tungsteno, molibdeno o manganeso, un catión auxiliar de metal que tenga poca o ninguna actividad catalítica de blanqueo, tales como cationes cinc o aluminio, y un secuestrante que tiene constantes de estabilidad definida para los cationes catalíticos y de metal auxiliares, particularmente el ácido etilendiamina-tetraacético, el etilendiaminatetra (ácido metileno-fosfónico) y sales solubles en agua de los mismos. Dichos catalizadores se divulgan en el documento US-4.430.243.

Si se desea, las composiciones de la presente memoria pueden catalizarse mediante un compuesto de manganeso. Dichos compuestos y sus niveles de uso son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, los catalizadores basados en manganeso divulgados en el documento US-5.576.282.

Se conocen catalizadores del blanqueador de tipo cobalto útiles en la presente invención, y se describen, por ejemplo, en las patentes US-5.597.936; US-5.595.967. Estos catalizadores de tipo cobalto se preparan fácilmente mediante procedimientos conocidos como los descritos, por ejemplo, en las patentes US-5.597.936 y US-5.595.967.

Las composiciones de la presente memoria también pueden incluir de manera adecuada un complejo de metal de transición de ligandos tales como bispidonas (documento WO 05/042532 A1) y/o ligandos rígidos macropolicíclicos -abreviados como "MRL". Como cuestión práctica, y no de forma limitante, las composiciones y procesos de la presente memoria se pueden ajustar para proporcionar del orden de al menos una parte por cien millones de MRL activo, especies en el medio de lavado acuoso, y de forma típica proporcionan de aproximadamente 0,005 ppm a aproximadamente 25 ppm, de aproximadamente 0,05 ppm a aproximadamente 10 ppm, o incluso de aproximadamente 0,1 ppm a aproximadamente 5 ppm, del MRL en la solución de lavado.

Los metales de transición adecuados en los catalizadores de metales de transición del blanqueo de la presente invención incluyen, por ejemplo, manganeso, hierro y cromo. MRL adecuados incluyen 5,12-dietil-1,5,8,12-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecano.

Los MRL de metal de transición adecuados se preparan fácilmente mediante procedimientos conocidos tales como los descritos, por ejemplo, en WO 00/32601 y US-6.225.464.

Si está presente, la fuente de peróxido de hidrógeno/perácido y/o el activador del blanqueador está generalmente presente en la composición en una cantidad de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 60 % en peso, de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 40 % en peso o incluso de aproximadamente 0,6 a aproximadamente 10 % en peso, basado en la composición de limpieza y/o tratante. Pueden utilizarse uno o más perácidos hidrófobos o precursores de los mismos junto con uno o más perácidos hidrófilos o precursores de los mismos.

De forma típica, la fuente de peróxido de hidrógeno y el activador del blanqueador se incorporarán conjuntamente. Las cantidades de fuente de peróxido de hidrógeno y perácido o activador del blanqueador pueden ser seleccionadas de manera que la relación molar entre oxígeno disponible (de la fuente de peróxido) y perácido sea de 1:1 a 35:1 o incluso de 2:1 a 10:1.

Tensioactivo. Preferiblemente, la composición comprende un tensioactivo o sistema tensioactivo. El tensioactivo puede seleccionarse de tensioactivos no iónicos, aniónicos, catiónicos, anfóteros, de ion híbrido, tensioactivos no iónicos semipolares y mezclas de los mismos. Las composiciones preferidas comprenden una mezcla de tensioactivos/sistema tensioactivo. Los sistemas tensioactivos preferidos comprenden uno o más tensioactivos aniónicos, con máxima preferencia junto con un cotensioactivo, con máxima preferencia, un tensioactivo no iónico y/o anfótero y/o de ion híbrido. Los sistemas tensioactivos preferidos comprenden tensioactivo aniónico y no iónico, preferiblemente, en relaciones de peso de 90:1 a 1:90. En algunos casos, se prefiere una relación de peso de tensioactivo aniónico a no iónico de al menos 1:1. Sin embargo, puede preferirse una relación inferior a 10:1. Cuando está presente, el nivel total de tensioactivo es, preferiblemente, de 0,1 % a 60 %, de 1 % a 50 % o incluso de 5 % a 40 % en peso de la composición.

Preferiblemente, la composición comprende un tensioactivo detergente aniónico, preferiblemente, tensioactivos de sulfato y/o sulfonato. Los ejemplos preferidos incluyen alquilbenceno sulfonatos, alquilsulfatos, y alquilsulfatos alcoxilados. Los sulfonatos preferidos son alquilbenceno sulfonatos C₁₀₋₁₃. Se puede obtener alquilbenceno sulfonato (LAS) adecuado, mediante sulfonación del alquilbenceno lineal (LAB) comercial; los LAB adecuados incluyen LAB con bajo contenido en 2-fenilo, tales como los suministrados por Sasol bajo el nombre comercial Isochem® o los suministrados por Petresa bajo el nombre comercial Petrelab®, otros LAB adecuados incluyen LAB con alto contenido en 2-fenilo, tales como los suministrados por Sasol bajo el nombre comercial Hyblene®. Un tensioactivo detergente aniónico es un alquilbenceno sulfonato que se obtiene mediante el proceso catalizado DETAL, aunque también pueden ser adecuadas otras rutas sintéticas, como HF. En un aspecto, se usa una sal de magnesio de LAS.

Los tensioactivos detergentes de tipo sulfato preferidos incluyen alquilsulfato, de forma típica alquilsulfato C₈₋₁₈ o, predominantemente, alquilsulfato C₁₂. Otro alquilsulfato preferido es sulfato alquilalcoxilado, preferiblemente un sulfato alquilalcoxilado C₈₋₁₈. Preferiblemente, el grupo alcoxilante es un grupo etoxilante. De forma típica, el alquilsulfato alcoxilado puede tener un grado promedio de alcoxilación de 0,5 a 30 o 20, o de 0,5 a 10. Se prefiere especialmente sulfato alquiletoxilado C₈₋₁₈ que tiene un grado de etoxilación promedio de 0,5 a 10, o de 0,5 a 7, o de 0,5 a 5 o de 0,5 a 3.

El alquilsulfato, el sulfato alquil alcoxilado y los alquilbenceno sulfonatos pueden ser lineales o ramificados, sustituidos o no sustituidos. Cuando el tensioactivo está ramificado, preferiblemente, el tensioactivo comprenderá un tensioactivo de sulfato o sulfonato ramificado de cadena media. Preferiblemente, los grupos ramificadores comprenden grupos alquilo C₁₋₄, de forma típica, grupos metilo y/o etilo.

Preferiblemente la composición comprende un tensioactivo no iónico detergente. Los tensioactivos no iónicos preferidos se seleccionan del grupo que consiste en: alquiletoxilatos C_{8-C18}, tales como tensioactivos no iónicos NEODOL® de Shell; alcoxilatos de alquilfenol C_{6-C12} en donde las unidades alcoxilato pueden ser unidades etileno, unidades propileno o una mezcla de las mismas; productos de condensación de alcohol C_{12-C18} y alquilfenol C_{6-C12} con polímeros de bloque de óxido de etileno/óxido de propileno tales como, por ejemplo, Pluronic® de BASF; alcoholes de cadena intermedia ramificada C_{14-C22}; alcoxilatos de alquilo C_{14-C22} de cadena media ramificada, que tengan de forma típica un grado de alcoxilación promedio de 1 a 30; alquilpolisacáridos, en un aspecto, alquilpoliglucósidos; polihidroxiamidas de ácido graso; tensioactivos de alcohol poli(oxialquilado) terminalmente protegido con éter; y mezclas de los mismos.

Los tensioactivos detergentes no iónicos adecuados incluyen alquilpoliglucósido y/o un alcohol alcoxilado de alquilo.

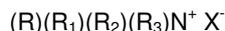
En un aspecto, los tensioactivos detergentes no iónicos incluyen alcoholes alquilalcoxilados, en un aspecto, alcohol alquilalcoxilado C₈₋₁₈, por ejemplo, un alcohol alquiletoxilado C₈₋₁₈; el alcohol alquilalcoxilado puede tener un grado promedio de alcoxilación de 1 a 80, preferiblemente de 1 a 50, con máxima preferencia, de 1 a 30, de 1 a 20 o de 1 a 10. En un aspecto, el alcohol alquilalcoxilado puede ser un alcohol alquiletoxilado C₈₋₁₈ que tiene un grado de etoxilación promedio de 1 a 10, de 1 a 7, más de 1 a 5 o de 3 a 7, o incluso inferior a 3 o 2.

El alcohol alcoxilado de alquilo puede ser lineal o ramificado y sustituido o no sustituido.

Los tensioactivos no iónicos adecuados incluyen los del nombre comercial Lutensol® de BASF.

Los tensioactivos detergentes catiónicos adecuados incluyen compuestos de alquilpiridinio, compuestos de alquilamonio cuaternario, compuestos de alquilfosfonio cuaternario, compuestos de alquilsulfonio ternario y mezclas de los mismos.

Los tensioactivos deterstivos catiónicos adecuados son compuestos de amonio cuaternario que tienen la fórmula general:



5 en donde R es un resto alquilo o alqueno C₆₋₁₈ lineal o ramificado, sustituido o no sustituido, R₁ y R₂ se seleccionan independientemente de restos metilo o etilo, R₃ es un resto hidroxilo, hidroximetilo o hidroxietilo, X es un anión que proporciona neutralidad de carga, los aniones adecuados incluyen: haluros, preferiblemente cloruro; sulfato; y sulfonato. Los tensioactivos deterstivos catiónicos adecuados son cloruros de mono-alquil C₆₋₁₈ mono-hidroxietil dimetilamonio cuaternario. Los tensioactivos deterstivos catiónicos muy adecuados son cloruro de
10 mono-alquil C₈₋₁₀ mono-hidroxietil dimetilamonio cuaternario, cloruro de mono-alquil C₁₀₋₁₂ mono-hidroxietil dimetilamonio cuaternario y cloruro de mono-alquil C₁₀ mono-hidroxietil dimetilamonio cuaternario.

Los tensioactivos anfóteros/de ion híbrido adecuados incluyen óxidos de amina y betainas.

15 Tensioactivos aniónicos neutralizados con amina - los tensioactivos aniónicos de la presente invención y cotensioactivos aniónicos adyuvantes pueden estar en forma ácida, y dicha forma ácida se puede neutralizar para formar una sal tensioactiva que es deseable para usar en las presentes composiciones detergentes. Los agentes típicos para neutralización incluyen una base con contraión metálico tal como hidróxidos, p. ej., NaOH o KOH. Otros agentes preferidos para neutralizar los tensioactivos aniónicos de la presente invención y los tensioactivos o cotensioactivos aniónicos
20 adyuvantes en sus formas ácidas incluyen amoniaco, aminas o alcanolaminas. Se prefieren las alcanolaminas. Los ejemplos no limitantes adecuados incluyen monoetanolamina, dietanolamina, trietanolamina y otras alcanolaminas lineales o ramificadas conocidas en la técnica; por ejemplo, las alcanolaminas muy preferidas incluyen 2-amino-1-propanol, 1-aminopropanol, monoisopropanolamina o 1-amino-3-propanol. La neutralización de la amina se puede realizar en todo o en parte, por ejemplo, parte de la mezcla de tensioactivo aniónico se puede neutralizar con el sodio o potasio y parte de la
25 mezcla del tensioactivo aniónico se puede neutralizar como aminas o alcanolaminas.

Aditivos reforzantes de la deterstencia. Preferiblemente, la composición comprende uno o más aditivos reforzantes de la deterstencia o un sistema de aditivos reforzantes de la deterstencia. Cuando se usa un aditivo reforzante de la deterstencia, la composición de la invención comprenderá, de forma típica, al menos 1 %, o al menos de 2 % a 60 % de aditivo reforzante de la deterstencia. Se puede preferir que la composición comprenda niveles bajos de sal fosfato y/o zeolita, por ejemplo, de 1 a 10 o 5 % en peso. La composición puede estar incluso sustancialmente exenta de aditivo reforzante de la deterstencia fuerte; sustancialmente exenta de aditivo reforzante de la deterstencia significa "sin adición deliberada" de zeolita y/o fosfato. Los aditivos reforzantes de la deterstencia de tipo zeolita típicos incluyen, zeolita A, zeolita P y zeolita MAP. Un aditivo reforzante de la deterstencia de tipo fosfato típico es el tri-polifosfato sódico.
35

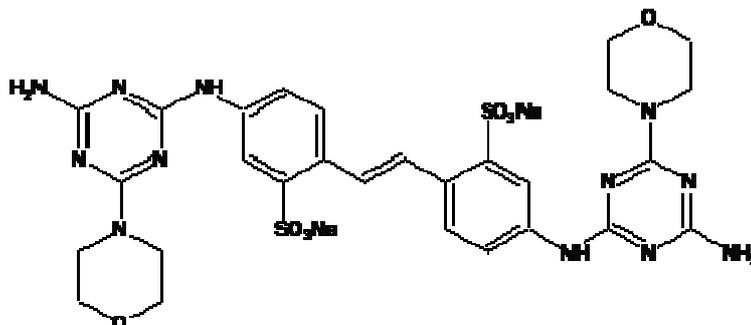
Agente quelante. Preferiblemente, la composición comprende agentes quelantes y/o inhibidores del crecimiento de cristales. Las moléculas adecuadas incluyen agentes quelantes de cobre, hierro y/o manganeso y mezclas de los mismos. Las moléculas adecuadas incluyen aminocarboxilatos, aminofosfonatos, succinatos, sales de los mismos, y mezclas de los mismos. Los ejemplos no limitativos de quelantes adecuados para su uso en la presente invención incluyen etilendiaminotetraacetatos, N-(hidroxietil)etilendiaminotriacetatos, nitrilotriacetatos, etilendiamino tetrapropionatos, trietilentaaminohexaacetatos, dietilentriamino-pentaacetatos, etanoldiglicinas, etilendiaminotetraquis (fosfonatos de metileno), dietilentriamina penta(ácido metileno-fosfónico) (DTPMP), disuccinato de etilendiamina (EDDS), ácido metilglicindiacético (MGDA), ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), sales de los mismos y mezclas de los mismos. Otros ejemplos no limitativos de quelantes para usar en la presente invención se encuentran en las patentes US-7445644, US-7585376 y 2009/0176684A1. Otros agentes quelantes adecuados para su uso en la presente memoria incluyen la serie comercial DEQUEST, y quelantes de Monsanto, DuPont, y Nalco, Inc.
40
45

Inhibidor de transferencia de colorantes (DTI). La composición puede comprender uno o más agentes inhibidores de la transferencia de colorantes. En una realización de la invención, los inventores han descubierto sorprendentemente que las composiciones que comprenden agentes inhibidores poliméricos de la transferencia de colorantes, además del tinte especificado, proporcionan un mejor rendimiento. Esto es sorprendente porque estos polímeros evitan la deposición de los tintes. Entre los inhibidores de transferencia de colorantes figuran, aunque no de forma limitativa, polímeros de polivinilpirrolidona, polímeros de N-óxido de poliamina, copolímeros de N-vinilpirrolidona y N-vinilimidazol, poliviniloxazolidonas y polivinilimidazoles o mezclas de los mismos. Algunos ejemplos adecuados incluyen PVP-K15, PVP-K30, ChromaBond S-400, ChromaBond S-403E y Chromabond S-100 de Ashland Aqualon, y Sokalan HP165, Sokalan HP50, Sokalan HP53, Sokalan HP59, Sokalan® HP 56K, Sokalan® HP 66 de BASF. Otros DTI adecuados se describen en WO2012/004134. Si está presente en una composición de la invención, el agente inhibidor de la transferencia de colorantes puede estar presente a un nivel de aproximadamente 0,0001 % a aproximadamente 10 %, de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 5 % o incluso de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 3 %, en peso de la composición.
50
55
60

Abrillantador fluorescente. Preferiblemente, la composición comprende uno o más abrillantadores fluorescentes. Los abrillantadores ópticos comerciales que pueden ser útiles en la presente invención pueden clasificarse en subgrupos que incluyen, aunque no de forma limitativa, derivados de estilbena, pirazolina, cumarina, ácido carboxílico, metinocianinas, dibenzotiofeno-5,5-dióxido, azoles, heterociclos con anillos de 5 y 6 miembros y otros agentes diversos. Los abrillantadores especialmente preferidos se seleccionan de: 2 (4-estiril-3-sulfofenil)-2H-nafto[1, 2-d]triazol de sodio, 4,4'-bis[[4-anilino-6-

(N-metil-2-hidroxietil)amino-1,3,5-triazin-2-il]amino}estilben-2,2-disulfonato de sodio, 4,4'-bis[[4-anilino-6-morfolino-1,3,5-triazin-2-il]amino}estilben-2,2'-disulfonato de sodio y 4,4'-bis(2-sulfoestiril)bifenilo de sodio. Otros ejemplos de dichos
 5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40

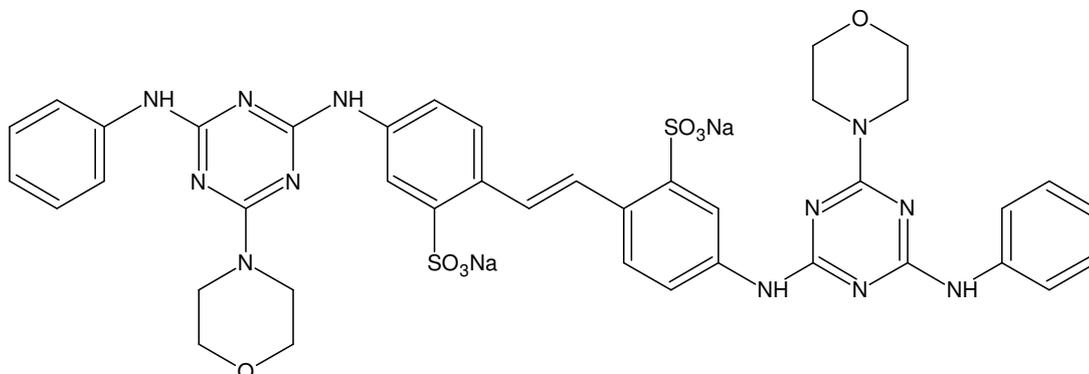
Un abrillantador preferido tiene la siguiente estructura:



Los niveles de abrillantador fluorescente adecuados incluyen niveles reducidos de aproximadamente 0,01, de aproximadamente 0,05, de aproximadamente 0,1 o incluso de aproximadamente 0,2 % en peso hasta niveles superiores de 0,5 o incluso 0,75 % en peso.

En un aspecto, el abrillantador puede cargarse en una arcilla para formar una partícula.

Los abrillantadores preferidos están totalmente o predominantemente (de forma típica, al menos 50 % en peso, al menos 75 % en peso, al menos 90 % en peso, al menos 99 % en peso), en forma alfa-cristalina. Un abrillantador muy preferido comprende el abrillantador fluorescente C.I. 260, preferiblemente con la siguiente estructura:



Puede ser particularmente útil ya que se disuelve bien en agua fría, por ejemplo, por debajo de 30 o 25 o incluso 20 °C.

Los abrillantadores preferiblemente se incorporan en la composición en forma de partículas micronizadas, con una media ponderada del tamaño de partículas primario de 3 a 30 micrómetros, de 3 micrómetros a 20 micrómetros o de 3 a 10 micrómetros.

La composición puede comprender abrillantador fluorescente C.I. 260 en forma beta-cristalina y la relación en peso de: (i) abrillantador fluorescente C.I. 260 en forma alfa-cristalina, a (ii) abrillantador fluorescente C.I. 260 en forma beta-cristalina puede ser al menos 0,1 o al menos 0,6.

El documento BE680847 se refiere a un procedimiento para la fabricación del abrillantador fluorescente C.I. 260 en forma alfa-cristalina.

Sales de silicato. La composición también puede contener preferiblemente sales de silicato, tales como silicato de sodio o potasio. La composición puede comprender de un 0 % en peso a menos de un 10 % en peso de la sal de silicato, a un 9 % en peso o a 8 % en peso o a 7 % en peso o a 6 % en peso o a 5 % en peso o a 4 % en peso o a 3 % en peso o incluso a 2 % en peso y preferiblemente de más de 0 % en peso o de 0,5 % en peso o incluso de 1 % en peso de sal de silicato. Una sal de silicato adecuada es silicato de sodio.

Dispersantes. La composición también puede contener preferiblemente dispersantes. Los materiales orgánicos solubles en agua adecuados incluyen los ácidos homopoliméricos o copoliméricos o sus sales, en los que el ácido policarboxílico comprende al menos dos radicales carboxilo separados entre sí por no más de dos átomos de carbono.

5 **Estabilizadores de enzimas.** La composición puede comprender preferiblemente estabilizadores de enzimas. Se puede usar cualquier estabilizador de enzimas convencional; por ejemplo, mediante la presencia de fuentes solubles en agua de iones de calcio y/o magnesio en los productos de limpieza y/o tratantes terminados que proporcionan dichos iones a las enzimas. En el caso de composiciones acuosas que comprenden proteasa, se puede añadir un inhibidor reversible de la proteasa, tal como un compuesto de boro que incluye borato o, preferiblemente, ácido 4-formil fenilborónico, ácido fenilborónico y derivados de los mismos, o compuestos tales como formiato de calcio, formiato de sodio y 1,2-propanodiol, para mejorar adicionalmente la estabilidad.

15 **Sistema disolvente.** El sistema disolvente de las presentes composiciones puede ser un sistema disolvente que contiene agua sola o mezclas de disolventes orgánicos sin o, preferiblemente, con agua. Los disolventes orgánicos preferidos incluyen 1,2-propanodiol, etanol, glicerol, dipropilenglicol, metilpropano diol y mezclas de los mismos. También se pueden usar otros alcoholes inferiores, alcanolaminas C1-C4 tales como monoetanolamina y trietanolamina. Los sistemas disolventes pueden estar ausentes, por ejemplo, de realizaciones sólidas anhidras de la invención, aunque de forma más típica están presentes a niveles en el intervalo de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 98 %, preferiblemente al menos de aproximadamente 1 % a aproximadamente 50 %, más usualmente de aproximadamente 5 % a aproximadamente 25 %.

25 En algunas realizaciones de la invención, la composición está en forma de un líquido estructurado. Dichos líquidos estructurados pueden estar estructurados internamente, de modo que la estructura esté formada por ingredientes primarios (p. ej., material tensioactivo) y/o estar estructurados externamente mediante la provisión de una estructura de matriz tridimensional usando ingredientes secundarios (p. ej., polímeros, arcilla y/o material de silicato), para usar, p. ej., como espesantes. La composición puede comprender un estructurante, preferiblemente de 0,01 % en peso a 5 % en peso, de 0,1 % en peso a 2,0 % en peso de estructurante. Los ejemplos de estructurantes adecuados se proporcionan en US-2006/0205631A1, US-2005/0203213A1, US-7294611, US-6855680. El estructurante se selecciona, de forma típica, del grupo que consiste en diglicéridos y triglicéridos, diestearato de etilenglicol, celulosa microcristalina, materiales celulósicos, microfibras de celulosa, emulsiones hinchables en álcalis modificados con alilo de forma hidrófoba tales como Polygel W30 (3VSigma), biopolímeros, goma xantano, goma gellan, aceite de ricino hidrogenado, derivados de aceite de ricino hidrogenado tales como derivados no etoxilados de los mismos y mezclas de los mismos, en particular, los seleccionados del grupo que consiste de aceite de ricino hidrogenado, derivados de aceite de ricino hidrogenado, celulosa microfibrilar, materiales cristalinos hidroxifuncionalizados, alcoholes grasos de cadena larga, ácidos 12-hidroxiesteáricos, arcillas, y mezclas de los mismos. Un estructurante preferido se describe en la patente US-6.855.680, que define materiales cristalinos hidroxifuncionalizados adecuados detalladamente. Se prefiere el aceite de ricino hidrogenado. Algunos ejemplos no limitativos de estructurantes útiles incluyen. Dichos estructurantes tienen un sistema estructurante filamentososo que tiene un intervalo de relaciones dimensionales. Otros estructurantes adecuados y los procesos para prepararlos se describen en WO2010/034736.

40 La composición de la presente invención puede comprender un compuesto graso de alto punto de fusión. El compuesto graso de alto punto de fusión útil en la presente memoria tiene un punto de fusión de 25 °C o superior, y se selecciona del grupo que consiste en alcoholes grasos, ácidos grasos, derivados de alcohol graso, derivados de ácido graso, y mezclas de los mismos. Dichos compuestos de bajo punto de fusión no se incluyen en esta sección. Los ejemplos no limitativos de compuestos de alto punto de fusión se describen en International Cosmetic Ingredient Dictionary, 5ª edición, 1993, y CTFA Cosmetic Ingredient Handbook, 2ª edición, 1992. Cuando está presente, el compuesto graso de alto punto de fusión se incluye preferiblemente en la composición a un nivel de 0,1 % a 40 %, preferiblemente de 1 % a 30 %, más preferiblemente de 1,5 % a 16 % en peso de la composición, de 1,5 % a 8 % para proporcionar ventajas de acondicionamiento mejoradas tales como una sensación de deslizamiento durante la aplicación al cabello húmedo, suavidad y sensación de humedad sobre el cabello seco.

55 **Polímero catiónico.** Las composiciones de la presente invención pueden contener un polímero catiónico. Las concentraciones del polímero catiónico en la composición están de forma típica en el intervalo de 0,05 % a 3 %, en otra realización, de 0,075 % a 2,0 % y, en otra realización adicional, de 0,1 % a 1,0 %. Los polímeros catiónicos adecuados tendrán densidades de carga catiónica de al menos 0,5 meq/g, en otra realización de al menos 0,9 meq/g, en otra realización de al menos 1,2 meq/g, en otra realización adicional de al menos 1,5 meq/g, pero en otra realización también menos de 7 meq/g, y en otra realización menos de 5 meq/g al pH de uso previsto de la composición, donde el pH estará generalmente en un intervalo de pH 3 a pH 9, en una realización entre pH 4 y pH 8. En la presente memoria, "densidad de carga catiónica" de un polímero se refiere a la relación del número de cargas positivas en un polímero con el peso molecular del polímero. El peso molecular promedio en peso de dichos polímeros catiónicos adecuados estará en general entre 10.000 y 10 millones, en una realización entre 50.000 y 5 millones, y en otra realización entre 100.000 y 3 millones.

65 Los polímeros catiónicos adecuados para usar en las composiciones de la presente invención contienen restos catiónicos que contienen nitrógeno tales como restos de amonio cuaternario o restos de amina catiónica protonada. Puede utilizarse cualquier contraión aniónico junto con los polímeros catiónicos siempre que los polímeros sigan siendo solubles en agua, en la composición, o en una fase coacervada de la composición, y siempre que los contraiones sean

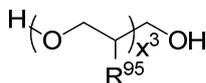
física y químicamente compatibles con los componentes esenciales de la composición o no perjudiquen de otro modo excesivamente la eficacia, estabilidad o propiedades estéticas del producto. Algunos ejemplos no limitativos de dichos contraiones incluyen haluros (p. ej., cloruro, fluoruro, bromuro, yoduro), sulfatos y metilsulfato.

5 Algunos ejemplos no limitativos de dichos polímeros se describen en el diccionario de ingredientes cosméticos de la CTFA, 3ª edición, editado por Estrin, Crosley y Haynes, (The Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association, Inc., Washington, D.C., EE. UU. (1982)).

10 Otros polímeros catiónicos adecuados para usar en la composición incluyen polímeros de polisacáridos, derivados catiónicos de goma guar, éteres de celulosa que contienen nitrógeno cuaternario, polímeros sintéticos, copolímeros de celulosa eterificada, guar y almidón. Cuando se usan, los polímeros catiónicos de la presente memoria son solubles en la composición o son solubles en una fase coacervada compleja en la composición formada por el polímero catiónico y el componente tensioactivo aniónico, anfótero y/o de ion híbrido descrito anteriormente. Los coacervados complejos del polímero catiónico también se pueden formar con otros materiales cargados en la composición.

15 Los polímeros catiónicos adecuados se describen en las patentes US-3.962.418; US-3.958.581; y en la publicación US-2007/0207109A1.

20 **Polímero no iónico.** La composición de la presente invención puede incluir un polímero no iónico como un agente acondicionador. En la presente memoria resultan útiles los polialquilenglicoles que tienen un peso molecular de más de 1000. Son útiles los que tienen la siguiente fórmula general:



25 en donde R⁹⁵ se selecciona del grupo que consiste en H, metilo, y mezclas de los mismos. Los agentes acondicionadores, y especialmente las siliconas, se pueden incluir en la composición. Los agentes acondicionadores útiles en las composiciones de la presente invención de forma típica comprenden un líquido insoluble en agua, dispersable en agua, no volátil que forma partículas líquidas emulsionadas. Los agentes acondicionadores adecuados para usar en la composición son aquellos agentes acondicionadores caracterizados generalmente como
30 siliconas (p. ej., aceites de silicona, siliconas catiónicas, gomas de silicona, siliconas altamente refringentes y resinas de silicona), aceites orgánicos de acondicionado (p. ej., aceites hidrocarbonados, poliolefinas y ésteres grasos) o combinaciones de los mismos, o los agentes acondicionadores que de otro modo forman partículas dispersas, líquidas en la matriz acuosa de tensioactivo de la presente memoria. Dichos agentes acondicionadores deberían ser
35 física y químicamente compatibles con los componentes esenciales de la composición y no deberían perjudicar de otro modo excesivamente la estabilidad, propiedades estéticas o eficacia del producto.

La concentración del agente acondicionador en la composición debería ser suficiente para proporcionar las ventajas de acondicionado deseadas. Dicha concentración puede variar con el agente acondicionador, la eficacia de acondicionado deseada, el tamaño promedio de las partículas del agente acondicionador, el tipo y
40 concentración de otros componentes y otros factores similares.

La concentración del agente acondicionador de silicona está de forma típica en el intervalo de aproximadamente 0,01 % hasta aproximadamente 10 %. Se describen ejemplos no limitativos de agentes acondicionadores de tipo silicona adecuados y agentes de suspensión opcionales para la silicona en la patente reexpedida US-34.584, en
45 la patente US-5.104.646; la patente US-5.106.609; la patente US-4.152.416; la patente US-2.826.551; la patente US-3.964.500; la patente US-4.364.837; la patente US-6.607.717; la patente US-6.482.969; la patente US-5.807.956; la patente US-5.981.681; la patente US-6.207.782; la patente US-7.465.439; la patente US-7.041.767; la patente US-7.217.777; solicitudes de patente US-2007/0286837A1; US-2005/0048549A1; US-2007/0041929A1; patente GB- 849.433; la solicitud de patente alemana DE-10036533; Chemistry and Technology of Silicones, Nueva York: Academic Press (1968); y en las hojas de datos de cauchos de silicona SE 30, SE 33, SE 54 y SE 76 de General Electric; Silicon Compounds, Petrarch Systems, Inc. (1984); y en la Encyclopedia of Polymer Science and Engineering, vol. 15, 2d ed., pág. 204-308, John Wiley & Sons, Inc. (1989).

55 **Aceites acondicionadores orgánicos.** Las composiciones de la presente invención pueden también comprender de aproximadamente 0,05 % a aproximadamente 3 % de al menos un aceite acondicionador orgánico como agente acondicionador, ya sea solo o en combinación con otros agentes acondicionadores, tales como las siliconas (descritas anteriormente). Los aceites acondicionadores adecuados incluyen aceites hidrocarbonados, poliolefinas y ésteres grasos. Son también adecuados para usar en las composiciones de la presente invención los agentes acondicionadores descritos en las patentes de Procter & Gamble Company US-5.674.478 y US-5.750.122. Son
60 también adecuados para su uso en la presente memoria los agentes acondicionadores descritos en las patentes US-4.529.586, US-4.507.280, US-4.663.158, US-4.197.865, US-4.217.914, US-4.381.919 y US-4.422.853.

Agente para la higiene. Las composiciones de la presente invención también pueden comprender componentes para proporcionar ventajas de higiene y/o contra los malos olores tales como uno o más de ricinoleato de cinc,

timol, sales de amonio cuaternario tales como Bardac®, polietileniminas (tales como Lupasol® de BASF) y complejos de cinc de los mismos, plata y compuestos de plata, especialmente los diseñados para liberar lentamente Ag + o nanodispersiones de plata.

5 **Probióticos.** La composición puede comprender probióticos, tales como los descritos en WO2009/043709.

10 **Reforzadores de las jabonaduras.** La composición puede comprender, preferiblemente, reforzadores de las jabonaduras si se desea una alta formación de jabonaduras. Los ejemplos adecuados son alcanolamidas C10-C16 o alquilsulfatos C10-C14, que se incorporan preferiblemente en niveles de 1 %-10 %. Las monoetanolamidas y dietanolamidas C10-C14 representan una clase típica de dichos reforzadores de las jabonaduras. También resulta ventajoso el uso de dichos reforzadores de formación de las jabonaduras con tensioactivos adyuvantes de alta formación de jabonaduras tales como los óxidos de amina, las betaínas y las sultaínas. Si se desea, pueden añadirse sales de magnesio y/o calcio solubles en agua, tales como MgCl₂, MgSO₄, CaCl₂, CaSO₄ y similares, de forma típica a niveles de 0,1 %-2 %, para obtener espuma adicional y para aumentar la eficacia de eliminación de grasa.

15 **Supresor de las jabonaduras.** En las composiciones de la presente invención pueden incorporarse compuestos para reducir o suprimir la formación de jabonaduras. La supresión de las jabonaduras puede ser de particular importancia en el denominado “proceso de limpieza a alta concentración” como se describe en la patente US-4.489.455 y US-4.489.574, y en lavadoras de ropa de carga frontal. Puede utilizarse una gran variedad de materiales como supresores de las jabonaduras y los supresores de las jabonaduras son bien conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, la Encyclopedia of Chemical Technology de Kirk Othmer, 3ª edición, volumen 7, págs. 430-447 (John Wiley y Sons, Inc., 1979). Los ejemplos de supresores de las jabonaduras incluyen ácidos grasos monocarboxílicos y sales solubles de los mismos, hidrocarburos de alto peso molecular tales como parafina, éster de ácidos grasos (p. ej., triglicéridos de ácido graso), ésteres de ácidos grasos de alcoholes monovalentes, cetonas C18-C40 alifáticas (p. ej., estearona), aminotriazinas N-alquiladas, hidrocarburos cerúleos que tienen preferiblemente un punto de fusión por debajo de aproximadamente 100 °C, supresores de las jabonaduras de silicona, y alcoholes secundarios. Los supresores de las jabonaduras se describen en las patentes US- 2.954.347; 4.265.779; 4.265.779; 3.455.839; 3.933.672; 4.652.392; 4.978.471; 4.983.316; 5.288.431; 4.639.489; 4.749.740; y US-4.798.679; 4.075.118; la solicitud de patente europea 89307851.9; EP 150.872; y DOS 2.124.526.

20 Ninguna composición detergente que se vaya a utilizar en lavadoras automáticas de ropa debería formar espuma en un grado que desbordara la lavadora. Cuando se utilizan supresores de las jabonaduras, estos están preferiblemente presentes en “una cantidad supresora de las jabonaduras”. “Una cantidad supresora de las jabonaduras” significa que el formulador puede seleccionar una cantidad de este regulador de las jabonaduras que regule suficientemente las jabonaduras para obtener un detergente para lavado de ropa con baja formación de jabonaduras, para usar en lavadoras de ropa automáticas. Las composiciones de la presente invención comprenderán generalmente de 0 % a 10 % de un supresor de las jabonaduras. Cuando se utilizan como supresores de las jabonaduras, los ácidos grasos monocarboxílicos y sales de los mismos estarán presentes de forma típica en cantidades de hasta 5 % en peso de la composición detergente. Preferiblemente se utiliza de 0,5 % a 3 % de un supresor de las jabonaduras de tipo monocarboxilato graso. Los supresores de las jabonaduras de tipo silicona se utilizan de forma típica en cantidades de hasta 2,0 % en peso de la composición detergente, aunque pueden utilizarse cantidades superiores. Los supresores de las jabonaduras de tipo fosfato de monoestearilo se utilizan generalmente en cantidades de 0,1 % a 2 %, en peso, de la composición. Los supresores de las jabonaduras hidrocaborbonados se utilizan de forma típica en cantidades que oscilan de 0,01 % a 5,0 %, aunque pueden utilizarse cantidades superiores. Los supresores de jabonaduras tipo alcohol se usan típicamente en cantidades de 0,2 %-3 % en peso de las composiciones acabadas.

25 **Agentes perlescentes.** Los agentes perlescentes, tales como los que se describen en WO2011/163457, se pueden incorporar a las composiciones de la invención.

30 **Perfume.** Preferiblemente, la composición comprende un perfume, preferiblemente, en el intervalo de 0,001 a 3 % en peso, con máxima preferencia, de 0,1 a 1 % en peso. Muchos ejemplos adecuados de perfumes se proporcionan en la guía de CTFA (Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association) 1992 International Buyers Guide, publicada por CFTA Publications y la OPD 1993 Chemicals Buyers Directory 80ª Edición Anual, publicada por Schnell Publishing Co. Es habitual que una pluralidad de componentes de perfume estén presentes en las composiciones de la invención, por ejemplo cuatro, cinco, seis, siete o más. En mezclas de perfume, preferiblemente de 15 a 25 % en peso son notas altas. Las notas altas se definen en Poucher (Journal of the Society of Cosmetic Chemists 6(2):80 [1995]). Las notas altas preferidas incluyen óxido de rosa, aceites cítricos, acetato de linalilo, lavanda, linalol, dihidromircenol y cis-3 hexanol.

35 **Procesos de fabricación y utilización de las composiciones de limpieza**

40 La presente invención también proporciona un método para fabricar una composición como se ha descrito anteriormente que comprende obtener al menos una de las variantes anteriormente descritas y mezclarla con un material adyuvante o mezclas de los mismos.

45 Las composiciones de limpieza de la presente invención se formulan en cualquier forma adecuada tal como un sólido, polvo, líquido, pastilla o gel, y el mezclado de la variante y el adyuvante se puede realizar por cualquier

proceso adecuado seleccionado por el formulador (véanse, p. ej., las patentes US-5.879.584, 5.691.297, 5.574.005, 5.569.645, 5.565.422, 5.516.448, 5.489.392, 5.486.303, 4.515.705, 4.537.706, 4.515.707, 4.550.862, 4.561.998, 4.597.898, 4.968.451, 5.565.145, 5.929.022, 6.294.514 y 6.376.445).

5 Las composiciones de limpieza de la presente invención se pueden proporcionar en forma de dosis unitaria que incluyen pastillas, cápsulas, bolsitas, bolsas y bolsas multicompartimentales. En algunas realizaciones, el formato de dosis unitaria está diseñado para proporcionar una liberación controlada de los ingredientes dentro de una bolsa con múltiples compartimientos (u otro formato de dosis unitaria). En la técnica se conocen formatos de dosis unitaria y liberación controlada adecuados (véase, p. ej., el documento EP 2 100 949, el documento WO 02/102955 y las patentes US-10 4.765.916 y 4.972.017 y el documento WO 04/111178 para los materiales adecuados para usar en formatos de dosis unitarias y de liberación controlada). En algunas realizaciones, la forma de dosis unitaria se proporciona en tabletas recubiertas con una película soluble en agua o bolsas solubles en agua. Se proporcionan diversos formatos de dosis unitarias en el documento EP 2 100 947 y son conocidos en la técnica. En una bolsa multicompartimental preferida, la variante de proteasa se encuentra en un compartimento separado de la una o más enzima proteasa adicional, una primera 15 enzima lipasa de lavado, una enzima celulasa, una enzima amilasa, un componente del blanqueador, un modificador del pH, un tinte matizador de telas, un abrillantador óptico y un tensioactivo no iónico, o mezclas de los mismos.

Métodos de utilización

20 La presente invención también proporciona un método para tratar una superficie, especialmente una tela, que comprende poner en contacto la superficie con una solución acuosa que comprende al menos una de las variantes anteriormente relacionadas y un material adyuvante. De forma típica, la variante de proteasa y el material adyuvante se añaden al agua para formar la solución de lavado añadiendo la composición de la invención al agua. La superficie a tratar en el método de la invención puede ser cualquier superficie de tela o doméstica a cuidar para su limpieza tales como vajillas, ropa, 25 superficies duras, lentes de contacto, etc. En algunas realizaciones, al menos una parte de la superficie se pone en contacto con al menos una realización de las composiciones de limpieza de la presente invención, en forma pura o, preferiblemente, diluida en una solución de lavado, y la superficie se lava y opcionalmente se aclara. Para los fines de la presente invención, el "lavado" incluye, aunque no de forma limitativa, remojo, frotado y agitación mecánica. En algunas realizaciones, las composiciones de limpieza de la presente invención se utilizan en concentraciones de aproximadamente 30 500 ppm a aproximadamente 15,000 ppm en solución. En algunas realizaciones en las que el disolvente de lavado es agua, la temperatura del agua está comprendida de forma típica de aproximadamente 5 °C a 90 °C.

La composición de limpieza puede comprender una composición detergente para lavavajillas y/o una composición detergente para lavado de vajillas a mano, y el artículo u objeto a limpiar es un artículo de vajilla o un artículo de cubertería y cristalería. La composición de limpieza puede comprender una composición detergente para lavado de ropa (p. ej., una 35 composición detergente en polvo para lavado de ropa o una composición detergente líquida para lavado de ropa) y el artículo a limpiar es un artículo de tela. En otras realizaciones, la composición de limpieza es una composición de pretratamiento para ropa. La composición de limpieza puede comprender un limpiador de superficies duras.

40 En algunas realizaciones, las composiciones de limpieza se usan en concentraciones de aproximadamente 500 ppm a aproximadamente 15,000 ppm en solución (p. ej., solución de lavado acuosa). Cuando la superficie, artículo u objeto comprende una tela, la relación másica entre el agua y la tela es, típicamente, de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 30:1.

45 La presente invención también proporciona métodos para limpiar un artículo de ropa o tela en una lavadora, comprendiendo el método proporcionar una lavadora, introducir una cantidad de una composición detergente para lavado de ropa que comprende al menos una subtilisina variante de la invención suficiente para limpiar el artículo de ropa o tela en la máquina (p. ej., introduciendo la composición en un dispensador o compartimento para detergente adecuado o proporcionado en la máquina), introducir el artículo de ropa o tela en la máquina y poner en funcionamiento la máquina para limpiar el artículo de ropa o tela (p. ej., según las instrucciones del fabricante). Los métodos de la presente invención 50 incluyen cualquier composición detergente para el lavado de ropa descrita en la presente descripción que comprende, aunque no de forma limitativa, al menos una variante de subtilisina proporcionada en la presente descripción.

Parte experimental

55 La presente invención se describe más detalladamente en referencia a los ejemplos siguientes.

En la siguiente descripción experimental, las abreviaturas que se detallan más abajo son de aplicación: IR (Índice de rendimiento), ppm (partes por millón); M (molar); mM (milimolar); μ M (micromolar); nM (nanomolar); mol (moles); mmol (milimoles); μ mol (micromoles); nmol (nanomoles); g (gramos); mg (miligramos); μ g (microgramos); pg (picogramos); l (litros); ml (mililitros); μ l (microlitros); cm (centímetros); mm (milímetros); μ m (micrómetros); nm (nanómetros); U (unidades); V (voltios); PM, MW (Peso molecular); s (segundos); min(s) (minuto/minutos); h(s) y hr(s) (hora/horas); °C (grados centígrados); QS (cantidad suficiente); ND (no realizado); rpm (revoluciones por minuto); GH (grados de dureza alemanes); H₂O (agua); dH₂O (agua desionizada); HCl (ácido clorhídrico); aa (aminoácido); pb (pares de bases); kb (pares de kilobases); kD (kilodaltons); ADNc (ADN de copia o complementario); ADN (ácido desoxirribonucleico); ADNmc (ADN monocatenario); ADNbc (ADN bicatenario); dNTP (trifosfato de desoxirribonucleótido); ARN (ácido

ribonucleico); MgCl₂ (cloruro de magnesio); NaCl (cloruro de sodio); p/v (peso en volumen); v/v (volumen en volumen); p/p (peso a peso); g (gravedad); DO (densidad óptica); ppm (partes por millón); suero salino tamponado con fosfato de Dulbecco; SOC (Bacto-triptona al 2 %, extracto de levadura Bacto al 0,5 %, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM); Caldo terrífico (TB; 12 g/l de Bacto-Tripton, 24 g/l de glicerol, 2,31 g/l de KH₂PO₄, y 12,54 g/l de K₂HPO₄); DO₂₈₀ (densidad óptica a 280 nm); DO₆₀₀ (densidad óptica a 600 nm); A₄₀₅ (absorbancia a 405 nm); Vmáx. (la velocidad inicial máxima de una reacción catalizada por enzima); PAGE (electroforesis en gel de acrilamida); PBS (suero salino tamponado con fosfato [NaCl 150 mM, tampón fosfato de sodio 10 mM, pH 7,2]); PBST (PBS+TWEEN®-20 al 0,25 %); PEG (polietilenglicol); PCR (reacción en cadena de la polimerasa); RT-PCR (PCR con transcripción inversa); SDS (dodecilsulfato de sodio); Tris (tris(hidroximetil)aminometano); HEPES (ácido N-[2-hidroxietil]piperazina-N-[ácido 2-etanosulfónico]); HBS (suero salino tamponado con HEPES); Tris-HCl (tris(hidroximetil)aminometano-clorhidrato); Tricina (N-[tris(hidroximetil)-metil]glicina); CHES (ácido 2-(N-ciclo-hexilamino) etano-sulfónico); TAPS (ácido 3-[[tris(hidroximetil)-metil]-amino]-propanosulfónico); CAPS (ácido 3-(ciclo-hexilamino)-propano-sulfónico); DMSO (dimetilsulfóxido); DTT (1,4-ditio-DL-treitol); SA (ácido sinapínico (ácido s,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico); TCA (ácido tricloroacético); Glut y GSH (glutación reducido); GSSG (glutación oxidado); TCEP (Tris[2-carboxietil]fosfina); Ci (Curies); mCi (miliCuries); µCi (microCuries); HPLC (cromatografía líquida de alta presión); RP-HPLC (cromatografía líquida de alta presión en fase invertida); TLC (cromatografía en capa fina); MALDI-TOF (desorción/ionización asistida por láser - tiempo de vuelo); Ts (tosilo); Bn (bencilo); Ph (fenilo); Ms (mesilo); Et (etilo), Me (metilo); Taq (ARN polimerasa de *Thermus aquaticus*); Klenow (fragmento grande (Klenow) de la ADN polimerasa I); EGTA (ácido etilenglicol-bis(β-aminoetil éter) N, N, N', N'-tetraacético); EDTA (ácido etilendiaminotetraacético); bla (gen de resistencia a la β-lactamasa o ampicilina); MJ Research (MJ Research, Reno, NV); Baseclear (Baseclear BV, Inc., Leiden, Países Bajos); PerSeptive (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA); ThermoFinnigan (ThermoFinnigan, San Jose, CA); Argo (Argo BioAnalytica, Morris Plains, NJ); Seitz EKS (SeitzSchenk Filtersystems GmbH, Bad Kreuznach, Alemania); Pall (Pall Corp., East Hills, NY y Bad Kreuznach, Alemania); Spectrum (Spectrum Laboratories, Dominguez Rancho, CA); Molecular Structure (Molecular Structure Corp., Woodlands, TX); Accelrys (Accelrys, Inc., San Diego, CA); Chemical Computing (Chemical Computing Corp., Montreal, Canadá); New Brunswick (New Brunswick Scientific, Co., Edison, NJ); CFT (Center for Test Materials, Vlaardingen, Países Bajos); P&G y Procter & Gamble (Procter & Gamble, Inc., Cincinnati, OH); GE Healthcare (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Reino Unido); DNA2.0 (DNA2.0, Menlo Park, CA); OXOID (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Reino Unido); Megazyme (Megazyme International Ireland Ltd., Bray Business Park, Bray, Co., Wicklow, Irlanda); Finnzymes (Finnzymes Oy, Espoo, Finlandia); Kelco (CP Kelco, Wilmington, DE); Corning (Corning Life Sciences, Corning, NY); NEN (NEN Life Science Products, Boston, MA); Pharma AS (Pharma AS, Oslo, Noruega); Dynal (Dynal, Oslo, Noruega); Bio-Synthesis (Bio-Synthesis, Lewisville, TX); ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD); Gibco/BRL (Gibco/BRL, Grand Island, NY); Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO); Pharmacia (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ); NCBI (National Center for Biotechnology Information); Applied Biosystems (Applied Biosystems, Foster City, CA); BD Biosciences y/o Clontech (BD Biosciences CLONTECH Laboratories, Palo Alto, CA); Operon Technologies (Operon Technologies, Inc., Alameda, CA); MWG Biotech (MWG Biotech, High Point, NC); Oligos Etc (Oligos Etc. Inc, Wilsonville, OR); Bachem (Bachem Bioscience, Inc., King of Prussia, PA); Difco (Difco Laboratories, Detroit, MI); Mediatech (Mediatech, Herndon, VA); Santa Cruz (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA); Oxoid (Oxoid Inc., Ogdensburg, NY); Worthington (Worthington Biochemical Corp., Freehold, NJ); GIBCO BRL o Gibco BRL (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD); Millipore (Millipore, Billerica, MA); Bio-Rad (Bio-Rad, Hercules, CA); Invitrogen (Invitrogen Corp., San Diego, CA); NEB (New England Biolabs, Beverly, MA); Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO); Pierce (Pierce Biotechnology, Rockford, IL); Takara (Takara Bio Inc. Otsu, Japón); Roche (Hoffmann-La Roche, Basel, Suiza); EM Science (EM Science, Gibbstown, NJ); Qiagen (Qiagen, Inc., Valencia, CA); Biodesign (Biodesign Intl., Saco, Maine); Aptagen (Aptagen, Inc., Herndon, VA); Sorvall (marca Sorvall, de Kendro Laboratory Products, Asheville, NC); Molecular Devices (Molecular Devices, Corp., Sunnyvale, CA); R&D Systems (R&D Systems, Mineápolis, MN); Siegfried Handel (Siegfried Handel AG, Zofingen, Suiza); Stratagene (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA); Marsh (Marsh Biosciences, Rochester, NY); Geneart (Geneart GmbH, Regensburg, Alemania); Bio-Tek (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT); (Biacore (Biacore, Inc., Piscataway, NJ); PeproTech (PeproTech, Rocky Hill, NJ); SynPep (SynPep, Dublín, CA); New Objective (marca New Objective; Scientific Instrument Services, Inc., Ringoes, NJ); Waters (Waters, Inc., Milford, MA); Matrix Science (Matrix Science, Boston, MA); Dionex (Dionex, Corp., Sunnyvale, CA); Monsanto (Monsanto Co., St. Louis, MO); Wintershall (Wintershall AG, Kassel, Alemania); BASF (BASF Co., Florham Park, NJ); Huntsman (Huntsman Petrochemical Corp., Salt Lake City, UT); Shell Chemicals (Shell Chemicals, Inc., Londres, Reino Unido); Stepan (Stepan, Northfield, IL); Clariant (Clariant, Sulzbach, Alemania); Industrial Zeolite (Industrial Zeolite Ltd., Grays, Essex, Reino Unido); Jungbunzlauer (Jungbunzlauer, Basel, Suiza); Solvay (Solvay, Bruselas, Bélgica); 3V Sigma (3V Sigma, Bergamo, Italia); Innospec (Innospec, Ellesmere Port, Reino Unido); Thermphos (Thermphos, Vlissingen-Ost, Países Bajos); Ciba Specialty (Ciba Specialty Chemicals, Basel, Suiza); Dow Corning (Dow Corning, Barry, Reino Unido); Enichem (Enichem Iberica, Barcelona, España); Fluka Chemie AG (Fluka Chemie AG, Buchs, Suiza); Gist-Brocades (Gist-Brocades, NV, Delft, Países Bajos); Dow Corning (Dow Corning Corp., Midland, MI); Mettler-Toledo (Mettler-Toledo Inc, Columbus, OH); RB (Reckitt-Benckiser, Slough, Reino Unido); y Microsoft (Microsoft, Inc., Redmond, WA).

60 Como se usa en la presente descripción, en algunas listas, se indica un "0" principal, para proporcionar una designación de tres números para cada sitio (p. ej., "001" es lo mismo que "1," por tanto "A001C" es lo mismo que "A1C"). En algunas listas, no se incluye el "0" principal. Además, como se utiliza en la presente memoria, "X" se refiere a cualquier aminoácido.

65

En las composiciones detergentes ilustrativas proporcionadas en la presente descripción, los niveles de enzimas se expresan por enzima pura en peso de la composición total y salvo que se indique lo contrario, los ingredientes del detergente se expresan en peso de las composiciones totales. Las abreviaturas de los componentes en la presente memoria tienen el siguiente significado:

5

Abreviatura	Ingrediente
LAS	: Alquil C ₁₁₋₁₃ benceno sulfonato sódico lineal.
NaC16-17HSAS	: Alquil C ₁₆₋₁₇ sulfato muy soluble
TAS	: Sebo alquilsulfato sódico.
CxyAS	: Alquilsulfato C _{1x} - C _{1y} sódico.
CxyEz	: Alcohol primario condensado C _{1x} - C _{1y} predominantemente lineal con una media de z moles de óxido de etileno.
CxyAEzS	: Alquilsulfato sódico condensado C _{1x} - C _{1y} con una media de z moles de óxido de etileno. Nombre de la molécula añadido en los ejemplos.
Tensioactivo no iónico	: Alcohol graso etoxilado/propoxilado mixto (p. ej. Plurafac LF404 es un alcohol con un grado de etoxilación promedio de 3,8 y un grado de propoxilación de 4,5.
QAS	: R ₂ .N+(CH ₃) ₂ (C ₂ H ₄ OH) con R ₂ = C ₁₂ -C ₁₄ .
Silicato	: Silicato de sodio amorfo (relación SiO ₂ :Na ₂ O = 1,6-3,2:1).
Metasilicato	: Metasilicato de sodio (relación SiO ₂ :Na ₂ O = 1,0).
Zeolita A	: Aluminosilicato hidratado de fórmula Na ₁₂ (AlO ₂ SiO ₂) ₁₂ . 27H ₂ O
SKS-6	: Silicato laminar cristalino de fórmula δ-Na ₂ Si ₂ O ₅ .
Sulfato	: Sulfato sódico anhidro.
STPP	: Tripolifosfato sódico.
MA/AA	: Copolímero aleatorio con una relación 4:1 de acrilato:maleato y un peso molecular medio de aproximadamente 70.000 a 80.000.
AA	: Polímero de poliacrilato sódico con un peso molecular medio de 4.500.
Policarboxilato	: Copolímero que comprende una mezcla de monómeros carboxilados tales como acrilato, maleato y metiacrilato, con un MW comprendido entre 2.000-80.000 tal como Sokolan comercializado por BASF, que es un copolímero de ácido acrílico, MW 4.500.
BB1	: Sulfonato de 3-(3,4-dihidroisoquinolinio)propano
BB2	: 1-(3,4-dihidroisoquinolinio)-decano-2-sulfato
PB1	: Perborato de sodio monohidratado.
PB4	: Perborato de sodio tetrahidratado de fórmula nominal NaBO ₃ .4H ₂ O.
Percarbonato	: Percarbonato de sodio de fórmula nominal 2Na ₂ CO ₃ .3H ₂ O ₂ .
TAED	: Tetraacetil etilendiamina.
NOBS	: Nonanoiloxibencenosulfonato en forma de sal sódica.
DTPA	: Ácido dietilentriamino pentaacético.
HEDP	: Ácido 1,1-hidroxietano difosfónico.
DETPMP	: Dietiltri amino penta(metilén) fosfonato, comercializado por Monsanto bajo la marca registrada Dequest 2060.
EDDS	: Ácido etilendiamino-N,N'-disuccínico, isómero (S,S) en la forma de su sal sódica
Diamina	: dimetil aminopropilamina; 1,6-hexanodiamina; 1,3-propanodiamina; 2-metil-1,5-pentanodiamina; 1,3-pentanodiamina; 1-metil-diaminopropano.
DETBCHD	: 5,12-dietil-1,5,8,12-tetraazabicyclo [6,6,2] hexadecano, dicloruro, Mn(II) sal
PAAC	: Sal de pentaamino acetato de cobalto(III).
Parafina	: Aceite de parafina comercializado bajo la marca registrada Winog 70 por Wintershall.
Sulfonato de parafina	: Un aceite o cera de parafina donde parte de los átomos de hidrógeno se han sustituido por grupos sulfonato.
Aldosa oxidasa	: Enzima oxidasa comercializada con el nombre comercial de Aldose Oxidase por Novozymes A/S
Galactosa oxidasa	: Galactosa oxidasa de Sigma
nprE	: La forma recombinante de metaloproteasa neutra expresada en <i>Bacillus subtilis</i> (Véase, p. ej., documento WO 07/044993)
PMN	: Metaloproteasa neutra purificada de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> .

Abreviatura	Ingrediente
Amilasa	: Una enzima amilolítica adecuada, tal como la comercializada con los nombres comerciales PURAFECT® Ox descrita en los documentos WO 94/18314, WO96/05295 comercializada por Genencor; NATALASE®, TERMAMYL®, FUNGAMYI® y DURAMYL™, todas comercializadas por Novozymes A/S.
Lipasa	: Una enzima lipolítica adecuada tales como las comercializadas con los nombres comerciales LIPEX®, LIPOLASE®, LIPOLASE® Ultra por Novozymes A/S y Lipomax™ de Gist-Brocades.
Celulasa	: Una enzima celulítica adecuada tales como las comercializadas con los nombres comerciales CAREZYME®, CELLUZYME® y/o ENDOLASE® por Novozymes A/S.
Pectina liasa	: Una pectina liasa adecuada, tales como las comercializadas con los nombres comerciales PECTAWAY® y PECTAWASH® comercializadas por Novozymes A/S.
PVP	: Polivinilpirrolidona con un peso molecular promedio de 60.000
PVNO	: N-óxido de polivinilpiridina, con un peso molecular medio de 50.000.
PVPVI	: Copolímero de vinilimidazol y vinilpirrolidona, con un peso molecular medio de 20.000.
Abrillantador 1	: 4,4'-bis(2-sulfoestiril)bifenil disódico.
Antiespumante de silicona	: Controlador de espuma de polidimetilsiloxano con copolímero siloxano-oxialquileo como agente dispersante con una relación entre dicho controlador de espuma y dicho agente dispersante de 10:1 a 100:1.
Supresor de las jabonaduras	: 12 % de silicona/sílice, 18 % de alcohol estearílico, 70 % de almidón en forma granulada.
SRP 1	: Poliésteres terminalmente protegidos con anión.
PEG X	: Polietilenglicol, con un peso molecular de x.
PVP K60®	: Homopolímero de vinilpirrolidona (MW promedio 160.000)
Jeffamine® ED-2001	: Polietilenglicol protegido de Huntsman
Isachem® AS	: Un alquilsulfato de alcohol ramificado de Enichem
MME PEG (2000)	: Polietilenglicol monometil éter (MW 2000) de Fluka Chemie AG.
DC3225C	: Supresor de las jabonaduras de silicona; mezcla de aceite de silicona y sílice de Dow Corning.
TEPAE	: Etoxilato de tetraetilenpentaamina.
BTA	: Benzotriazol.
Betaína	: $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{COO}^-$
Azúcar	: D-glucosa de calidad industrial o azúcar de calidad alimentaria
CFAA	: alquil C ₁₂ -C ₁₄ N-metil glucamida
TPKFA	: Ácidos grasos C ₁₂ -C ₁₄ de la destilación primaria de crudo.
Arcilla	: Un silicato de aluminio hidratado de la fórmula general Al ₂ O ₃ SiO ₂ ·xH ₂ O. Tipos: caolinita, montmorillonita, atapulgita, illita, bentonita, halloysita.
pH	: Medido en forma de solución al 1 % en agua destilada a 20 °C.

Para heavy duty liquid laundry (lavado de ropa de limpieza intensiva - HDL) a comercializar en Norteamérica (NA) y Europa occidental (EO), la inactivación térmica de las enzimas presentes en los detergentes comerciales se realiza introduciendo detergente líquido previamente pesado (en un frasco de vidrio) en un baño de agua a 95 °C durante 2 horas. El tiempo de incubación para la inactivación térmica de los detergentes NA y WE para lavavajillas automáticos es de 8 horas. Se sometieron a ensayo detergentes tanto sin calentar como calentados durante 5 minutos de disolución del detergente para determinar con precisión el porcentaje desactivado. La actividad de la enzima se analiza en el ensayo AAPF.

- 5
- 10
- 15
- Para estudiar la actividad de la enzima en detergentes inactivados térmicamente, se prepararon soluciones de trabajo a partir de las soluciones madre térmicamente inactivadas. Se añadieron cantidades adecuadas de dureza del agua (p. ej., 6 gpg o 12 gpg) y tampón a las soluciones detergentes para imitar las condiciones deseadas. Las soluciones se mezclaron por vortización o inversión de los frascos. La siguiente Tabla A proporciona información relativa a algunas composiciones detergentes. En algunos experimentos, detergentes adicionales y/u otros detergentes comerciales son de utilidad en los siguientes Ejemplos.

La Tabla A proporciona composiciones detergentes granuladas producidas según la invención adecuadas para el lavado de tejidos.

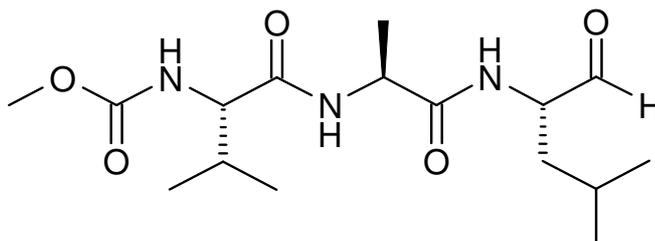
Tabla A. Composiciones detergentes granuladas para lavado de ropa y sus componentes						
Componente	Composiciones detergentes					
	1	2	3	4	5	6
Alquilbenceno sulfonato lineal con una longitud de cadena de carbono alifática de C ₁₁ -C ₁₂	15	12	20	10	12	13
Otros tensioactivos	1,6	1,2	1,9	3,2	0,5	1,2
Agente(s) reforzante(s) de la detergencia de tipo fosfato	2	3	4			
Zeolita		1		1	4	1
Silicato	4	5	2	3	3	5
Carbonato sódico	2	5	5	4	0	3
Poliacrilato (MW 4500)	1	0,6	1	1	1,5	1
Carboximetilcelulosa (Finnfix BDA de CPKelco)	1	-	0,3	-	1,1	-
Celluclean® (15,6 mg/g)	0,23	0,17	0,5	0,2	0,2	0,6
Proteasa de agua fría*	0,23	0,17	0,05	0,2	0,03	0,1
Stainzyme Plus® (14 mg/g)	0,23	0,17	0,5	0,2	0,2	0,6
Mannaway 4.0T (4 mg/g)	0,1			0,1		0,1
Lipex 100T (18,6 mg/g)	0,2		0,1		0,3	
Abrillantador(es) fluorescente(s)	0,16	0,06	0,16	0,18	0,16	0,16
Ácido dietilentriaminopentaacético o ácido etilendiaminotetraacético	0,6		0,6	0,25	0,6	0,6
MgSO ₄	1	1	1	0,5	1	1
Blanqueador(es) y activador(es) del blanqueador	6,88		6,12	2,09	1,17	4,66
Tinte de matizado de tiofeno etoxilado ⁵	0,002	0,001	0,003	0,003	-	-
Direct Violet 9 ex Ciba Specialty Chemicals				0,0006	0,0004	0,0006
Sulfato/ácido cítrico/bicarbonato sódico/humectante/perfume	Resto hasta 100 %					

1 El copolímero de injerto aleatorio es un copolímero de poli(óxido de etileno) injertado con acetato de polivinilo que tiene una cadena principal de poli(óxido de etileno) y múltiples cadenas laterales de acetato de polivinilo. El peso molecular de la cadena principal del poli(óxido de etileno) es de aproximadamente 6000 y la relación de peso del poli(óxido de etileno) a acetato de polivinilo es de aproximadamente 40 a 60 y no hay más de 1 punto de injerto por 50 unidades de óxido de etileno.

2 Polietilenimina (PM = 600) con 20 grupos etoxilados por -NH.

3 El polímero limpiador de grasa anfílico alcoxilado es una polietilenimina (PM = 600) con 24 grupos etoxilato por -NH y 16 grupos propoxilato por -NH

4 Inhibidor de la proteasa reversible de estructura:



5 El tinte de matizado de tiofeno etoxilado es como se describe en el documento US-7.208.459 B2.

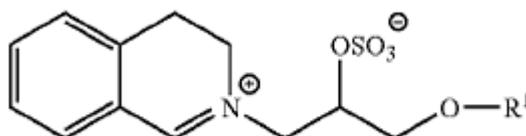
En la Tabla A, todos los niveles enzimáticos se expresan como % de materia prima enzimática, salvo la proteasa en agua fría (de la presente invención), que se expresa como % de proteína activa añadida al producto.

5 La Tabla B proporciona composiciones detergentes para lavado de ropa granuladas para lavadoras automáticas de carga superior (composiciones detergentes 7-9) y lavadoras automáticas de carga frontal (composiciones detergentes 10-11). La variante de proteasa GG36 estudiada y/o la proteasa de agua fría de la presente invención se añadieron por separado a estas formulaciones.

Tabla B. Composiciones detergentes granuladas para lavado de ropa y sus componentes					
Componente	Composición detergente				
	7	8	9	10	11
Tensioactivos					
Alquilsulfato ramificado C ₁₆₋₁₇	3,55	15,8			
Alquil C ₁₂₋₁₄ sulfato			1,5		
Sulfonato de alquilbenceno lineal de sodio con una longitud de cadena alifática de C ₁₁ -C ₁₂	9,6		10,6	7,5	9
Alcohol etoxi C _{14/15} -3-sulfato de sodio	1,15			2,88	
Alquilsulfato C _{14/15} de sodio	2,37				
Etoxilado de alcohol C _{14/15} con un promedio de etoxilación de 7 moles				1,17	1
Cloruro de mono-alquil C ₈₋₁₀ mono-hidroxietil-dimetil-amonio cuaternario					0,45
Cloruro de dimetil-hidroxil-etil-lauril-amonio			0,18		
Zeolita A	13,9	4,7	0,01	2,9	1,8
Silicato de sodio a una relación de 1,6	4	0,2		4	4
Silicato de sodio a una relación de 2,35			8		
Ácido cítrico				2,5	1,4
Tripolifosfato de sodio			5		
Carbonato sódico	24,1	30	16,9	24,4	21
Nonanoiloxibencenosulfonato	5,78	2,81	0,96		
Potenciador de blanqueo a base de oxaciridina				0,03	0,017
Etilendiamino-S,S-disuccinato de tetrasodio				0,2	
Sal heptasódica del ácido dietilentriamino penta (metileno fosfónico)	0,61				0,33
Ácido hidroxietano dimetileno fosfónico				0,29	0,45
Tetraacetato de etilendiamina			0,27		
MgSO ₄			0,47	0,5994	0,782
Percarbonato de sodio	7	4,4		15,9	19,1
Tetraacetil etilendiamina				3,3	4,6
Perborato de sodio monohidratado			1,2		
Carboximetilcelulosa (p. ej. Finnfix BDA de CPKelco)	0,1		0,17	1,69	0,23
Copolímero de ácido acrílico/ácido maleico (70/30) de sodio	0,0236	3,8		2	2,5
Poliacrilato sódico (Sokalan PA30 CL)	4		0,84		
Polímero de tereftalato				0,23	
Copolímero de injerto aleatorio de polietilenglicol/acetato de vinilo			0,89	0,89	0,91
Fotoblanqueante - tetrasulfonato de ftalocianina de cinc			0,005	0,001	0,002
Abrillantador fluorescente C.I. 260	0,11	0,15	0,04	0,23	0,15
Abrillantador fluorescente C.I. 351 (Tinopal ® CBS)			0,1		
Gránulo supresor de las jabonaduras		0,25		0,07	0,04

Tabla B. Composiciones detergentes granuladas para lavado de ropa y sus componentes					
Componente	Composición detergente				
	7	8	9	10	11
Carboximetilcelulosa modificada hidrófobamente (Finnifix ® SH-1)			0,019	0,028	
Bentonita			8,35		
Compuesto varios (tintes, perfumes, adyuvante de proceso, humectantes y sulfato sódico)	Resto	Resto	Resto	Resto	Resto

En la Tabla B, los tensioactivos ingredientes se pueden obtener a partir de cualquier proveedor adecuado que incluye, aunque no de forma limitativa, BASF (p. ej., LUTENSOL®), Shell Chemicals, Stepan, Huntsman y Clariant (p. ej., PRAEPAGEN®). La zeolita se puede obtener de fuentes tales como Industrial Zeolite. El ácido cítrico y el citrato de sodio pueden obtenerse de fuentes tales como Jungbunzlauer. El percarbonato sódico, el carbonato sódico, el bicarbonato sódico y el sesquicarbonato sódico pueden obtenerse de fuentes tales como Solvay. Los copolímeros de acrilato/maleato se pueden obtener de fuentes tales como BASF. La carboximetilcelulosa y carboximetilcelulosa modificada hidrófobamente se pueden obtener de fuentes tales como CPKelco. El abrillantador fluorescente C.I. 260 se puede obtener de 3V Sigma (p. ej., OPTIBLANC®, OPTIBLANC® 2M/G, OPTIBLANC® 2MG/LT Extra, u OPTIBLANC® Ecobright). El etilendiamino-S,S-disuccinato de tetrasodio se puede obtener de fuentes tales como Innospec. El copolímero de tereftalato puede obtenerse de Clariant (p. ej., REPELOTEX SF 2). Además, el ácido 1-hidroxietano-1,1-difosfónico se puede obtener de Thermphos. El reforzador de blanqueo basado en oxaziridinio tiene la siguiente estructura, en donde R1 = 2-butiloctilo, y se produjo según el documento US-2006/0089284A1.



Las enzimas NATALASE®, TERMAMYL®, STAINZYME PLUS®, CELLUCLEAN® y MANNWAY® se pueden obtener de Novozymes. El tetrasulfonato de ftalocianina de zinc se puede obtener de Ciba Specialty Chemicals (p. ej., TINOLUX® BMC). El gránulo supresor de las jabonaduras se puede obtener de Dow Corning. En estas composiciones detergentes, el copolímero de injerto aleatorio es un copolímero de poli(óxido de etileno) injertado con acetato de polivinilo que tiene una cadena principal de poli(óxido de etileno) y múltiples cadenas laterales de acetato de polivinilo. El peso molecular de la cadena principal del poli(óxido de etileno) es de aproximadamente 6000 y la relación de peso del poli(óxido de etileno) a acetato de polivinilo es de aproximadamente 40 a 60 y no hay más de 1 punto de injerto por 50 unidades de óxido de etileno.

Las Tablas C-E proporcionan composiciones detergentes granuladas adecuadas para lavadoras automáticas (detergentes 36a-n). La variante de proteasa GG36 estudiada o la proteasa de agua fría de la presente invención se añadieron por separado a estas formulaciones.

Tabla C. Composiciones detergentes granuladas para lavado de ropa adicionales y sus componentes					
Componente	Composición detergente				
	36a	36b	36c	36d	36e
Tensioactivos					
no iónico C ₁₀				0,1843	
Alquilsulfato ramificado C ₁₆₋₁₇	3,53	3,53	3,53		
Alquil C ₁₂₋₁₄ sulfato					
Sulfonato de alquilbenceno lineal de sodio con una longitud de cadena alifática de C _{11-C12}	8,98	8,98	8,98	13,58	14,75
Alcohol etoxi C _{14/15} -3-sulfato de sodio	1,28	1,28	1,28		
Alquilsulfato C _{14/15} de sodio	2,36	2,36	2,36		
Etoxilado de alcohol C _{14/15} con un promedio de etoxilación de 7 moles					
Cloruro de mono-alkil C ₈₋₁₀ mono-hidroxietil-dimetil-amonio cuaternario					
Cloruro de dimetil-hidroxil-etil-lauril-amonio				0,1803	

ES 2 809 509 T3

Zeolita A	15,31	15,31	15,31		4,47
Bentonita				8,35	
Silicato de sodio a una relación de 1,6					0,16
Silicato de sodio a una relación de 2,0	3,72	3,72	3,72	8,41	
Silicato de sodio a una relación de 2,35					
Ácido cítrico				0,0066	
Tripolifosfato de sodio				5,06	
Carbonato sódico	26,1	26,18	26,1	15,9	29,0
Nonanoiloxibencenosulfonato	5,78	5,78	5,78	1,17	1,86
Potenciador de blanqueo a base de oxaciridina	0,037	0,037	0,037		
Etilendiamino-S,S-disuccinato de tetrasodio					
Sal heptasódica del ácido dietilentriamino penta (metileno fosfónico)	0,62	0,62	0,62		
Ácido hidroxietano dimetileno fosfónico					
Tetraacetato de etilendiamina				0,2701	
MgSO ₄	0,056	0,056	0,056	0,47	
Percarbonato de sodio		7,06	7,06		3,64
Tetraacetil etilendiamina					
Perborato de sodio monohidratado				1,47	
Carboximetilcelulosa (p. ej. Finnfix BDA de CPKelco)	0,38	0,38	0,38	0,173	
Copolímero de ácido acrílico/ácido maleico (70/30) de sodio	3,79	3,78	3,79		3,64
Poliacrilato sódico (Sokalan PA30 CL)	3,78	3,78	3,78	0,842	
Polímero de tereftalato					
Copolímero de injerto aleatorio de polietilenglicol/acetato de vinilo				0,89	
Fotoblanqueante - tetrasulfonato de ftalocianina de cinc					
Abrillantador fluorescente C.I. 260	0,1125	0,1125	0,1125	0,043	0,15
Abrillantador fluorescente C.I. 351 (Tinopal ® CBS)				0,0952	
Gránulo supresor de las jabonaduras	0,015	0,015	0,015		0,031
Carboximetilcelulosa modificada hidrófobamente (Finnifix ® SH-1)					
Bentonita					
Compuesto varios (tintes, perfumes, adyuvante de proceso, humectantes y sulfato sódico)	Resto	Resto	Resto	Resto	Resto

Tabla D. Composiciones detergentes granuladas para lavado de ropa adicionales y sus componentes					
Componente	Composición detergente				
	36f	36g	36h	36i	36j
Tensioactivos					
no iónico C ₁₀	0,1142	0,2894	0,1885	0,1846	0,1885
Alquil C ₁₆₋₁₇ sulfato ramificado					
Alquil C ₁₂₋₁₄ sulfato					
Sulfonato de alquilbenceno lineal de sodio con una longitud de cadena alifática de C ₁₁ -C ₁₂	12,94	15,69	9,01	8,42	9,51
Alcohol etoxi C _{14/15} -3-sulfato de sodio					
Alquilsulfato C _{14/15} de sodio					
Etoxilado de alcohol C _{12/14} con un promedio de etoxilación de 7 moles	2,9				
Etoxilado de alcohol C _{12/14} con un promedio de etoxilación de 3 moles				2,44	

ES 2 809 509 T3

Etoxilado de alcohol C _{14/15} con un promedio de etoxilación de 7 moles			0,97	1,17	0,97
Cloruro de mono-alquil C ₈₋₁₀ mono-hidroxietil-dimetil-amonio cuaternario			0,45		
Cloruro de dimetil-hidroxil-etil-lauril-amonio		0,195			0,45
Zeolita A	2,01	0,39	1,83	2,58	0,59
Silicato de sodio a una relación de 1,6			4,53	5,62	4,53
Silicato de sodio a una relación de 2,0		10,1			
Silicato de sodio a una relación de 2,35	7,05				
Ácido cítrico			1,4	1,84	1,0
Tripolifosfato de sodio		5,73			
Carbonato sódico	12,65	15,93	21,0	27,31	20,2
Nonanoiloxibencenosulfonato		1,73			
Potenciador de blanqueo a base de oxaciridina			0,0168	0,0333	0,024
Etilendiamino-S,S-disuccinato de tetrasodio					
Sal heptasódica del ácido dietilentriamino penta (metilen fosfónico)			0,327		0,3272
Ácido hidroxietano dimetileno fosfónico			0,45	0,2911	0,45
Tetraacetato de etilendiamina		0,28		0,1957	
MgSO ₄		0,54	0,79	0,6494	0,793
Percarbonato de sodio			19,1	15,85	22,5
Tetraacetil etilendiamina			4,554	3,71	5,24
Perborato de sodio monohidratado		5,55			
Carboximetilcelulosa (p. ej. Finnfix BDA de CPKelco)	0,62	0,21	0,23	1,07	0,2622
Copolímero de ácido acrílico/ácido maleico (70/30) de sodio	0,40	2,61	2,5	2,00	1,75
Poliacrilato sódico (Sokalan PA30 CL)			0,0055	0,011	0,008
Polímero de tereftalato				0,231	
Copolímero de injerto aleatorio de polietilenglicol/acetato de vinilo	0,55	1,40	0,911	0,8924	0,911
Fotoblanqueante - tetrasulfonato de ftalocianina de cinc					
Abrillantador fluorescente C.I. 260	0,1174	0,048	0,1455	0,2252	0,1455
Abrillantador fluorescente C.I. 351 (Tinopal ® CBS)		0,1049			
Gránulo supresor de las jabonaduras			0,04	0,0658	0,04
Carboximetilcelulosa modificada hidrófobamente (Finnifix ® SH-1)					
Bentonita					
Compuesto varios (tintes, perfumes, adyuvante de proceso, humectantes y sulfato sódico)	Resto	Resto	Resto	Resto	Resto

Tabla E. Composiciones detergentes granuladas para lavado de ropa adicionales y sus componentes					
Componente	Composición detergente				
	36k	36l	36m	36n	
Tensioactivos					
no iónico C ₁₀	0,1979	0,1979	0,1979	0,1979	
Alquilsulfato ramificado C ₁₆₋₁₇					
Alquil C ₁₂₋₁₄ sulfato					
Sulfonato de alquilbenceno lineal de sodio con una longitud de cadena alifática de C ₁₁ -C ₁₂	8,92	8,92	11,5	11,5	
Alcohol etoxi C _{14/15} -3-sulfato de sodio	1,62	1,62	1,125	1,125	
Alquilsulfato C _{14/15} de sodio					
Etoxilado de alcohol C _{14/15} con un promedio de	1,0	1,0	1,5	1,5	

ES 2 809 509 T3

etoxilación de 7 moles					
Cloruro de mono-alquil C ₈₋₁₀ mono-hidroxietyl-dimetil-amonio cuaternario					
Cloruro de dimetil-hidroxietyl-etyl-lauril-amonio					
Zeolita A	1,63	1,63	2,0	2,0	
Silicato de sodio a una relación de 1,6	4,75	4,75	4,75	4,75	
Silicato de sodio a una relación de 2,0			0,06	0,06	
Silicato de sodio a una relación de 2,35					
Ácido cítrico	1,10	1,10	1,1	1,1	
Tripolifosfato de sodio					
Carbonato sódico	23,3	23,3	23,3	23,3	
Nonanoiloxibencenosulfonato					
Potenciador de blanqueo a base de oxaciridina	0,021	0,021	0,015	0,015	
Etilendiamino-S,S-disuccinato de tetrasodio	0,26	0,26	0,26	0,26	
Sal heptasódica del ácido dietilentriamino penta (metileno fosfónico)					
Ácido hidroxietano dimetileno fosfónico	0,47	0,47	0,47	0,47	
Tetraacetato de etilendiamina					
MgSO ₄	0,83	0,83	0,82	0,82	
Percarbonato de sodio	19,35	19,35	19,35	19,35	
Tetraacetil etilendiamina	4,51	4,51	4,51	4,51	
Perborato de sodio monohidratado					
Carboximetilcelulosa (p. ej. Finnfix BDA de CPKelco)	1,01	1,01	1,01	1,01	
Copolímero de ácido acrílico/ácido maleico (70/30) de sodio	1,84	1,84	1,84	1,84	
Poliacrilato sódico (Sokalan PA30 CL)	0,007	0,007	0,005	0,005	
Polímero de tereftalato	0,179	0,179	0,179	0,179	
Copolímero de injerto aleatorio de polietilenglicol/acetato de vinilo	0,96	0,96	0,96	0,96	
Fotoblanqueante - tetrasulfonato de ftalocianina de cinc					
Abrillantador fluorescente C.I. 260	0,153	0,153	0,171	0,171	
Abrillantador fluorescente C.I. 351 (Tinopal ® CBS)					
Gránulo supresor de las jabonaduras	0,042	0,042	0,042	0,042	
Carboximetilcelulosa modificada hidrófobamente (Finnifix ® SH-1)					
Bentonita					
Compuesto varios (tintes, perfumes, adyuvante de proceso, humectantes y sulfato sódico)	Resto	Resto	Resto	Resto	Resto

Notas para las composiciones detergentes 36 a – n de las Tablas C, D, E:

- 5 Los ingredientes tensioactivos pueden obtenerse de BASF, Ludwigshafen, Alemania (Lutensol®); Shell Chemicals, Londres, Reino Unido; Stepan, Northfield, Illinois, Estados Unidos; Huntsman, Huntsman, Salt Lake City, Utah, Estados Unidos; Clariant, Sulzbach, Alemania (Praepagen®).

La zeolita puede obtenerse de Industrial Zeolite (UK) Ltd, Grays, Essex, Reino Unido.

- 10 El ácido cítrico y el citrato de sodio pueden obtenerse de Jungbunzlauer, Basilea, Suiza.

El percarbonato sódico, el carbonato sódico, el bicarbonato sódico y el sesquicarbonato sódico pueden obtenerse de Solvay, Bruselas, Bélgica.

- 15 Los copolímeros de acrilato/maleato se pueden obtener de BASF, Ludwigshafen, Alemania.

La carboximetilcelulosa y carboximetilcelulosa modificada hidrófobamente se pueden obtener de CPKelco, Arnhem, Países Bajos.

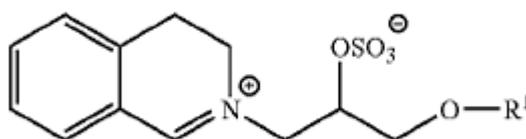
5 El abrillantador fluorescente C.I. 260 se puede obtener de 3V Sigma, Bergamo, Italia como Optiblanc® Optiblanc® 2M/G, Optiblanc® 2MG/LT Extra u Optiblanc® Ecobright.

El etilendiamino-S,S-disuccinato de tetrasodio se puede obtener de Innospec, Ellesmere Port, Reino Unido.

10 El copolímero de tereftalato puede obtenerse de Clariant con el nombre comercial Repelotex SF 2.

El ácido 1-hidroxietano-1,1-difosónico puede obtenerse de Thermphos, Vlissingen - Oost, Países Bajos.

15 El reforzador de blanqueo basado en oxaziridinio tiene la siguiente estructura, en donde R1 = 2-butiloctilo, y se produjo según el documento US-2006/0089284A1.



20 Las enzimas Natalase®, Termamyl®, Stainzyme Plus®, Celluclean® y Mannaway®, se pueden obtener de Novozymes, Bagsvaerd, Dinamarca.

El tetrasulfonato de ftalocianina de zinc se puede obtener de Ciba Specialty Chemicals, Basilea, Suiza, como Tinolux® BMC.

25 El gránulo supresor de espuma se puede obtener de Dow Corning, Barry, Reino Unido.

El copolímero de injerto aleatorio es un copolímero de óxido de polietileno injertado con acetato de polivinilo que tiene una cadena principal de óxido de polietileno y múltiples cadenas laterales de acetato de polivinilo. El peso molecular de la cadena principal del poli(óxido de etileno) es de aproximadamente 6000 y la relación de peso del poli(óxido de etileno) a acetato de polivinilo es de aproximadamente 40 a 60 y no hay más de 1 punto de injerto por 50 unidades de óxido de etileno.

Ejemplo 1

Pruebas y métodos de ensayo

35 Este Ejemplo describe los diversos Métodos de ensayo y ensayos utilizados en el desarrollo de la presente invención. Cualquier desviación de los protocolos proporcionados, se indica en los ejemplos pertinentes.

40 Los ensayos se realizaron usando un robot Biomek FX (Beckman Coulter) o una pipeta multicanal (p. ej., Rainin PipetLite, Mettler-Toledo) y un lector de MTP SpectraMax (tipo 340; Molecular Devices).

Métodos de ensayo

45 Método de ensayo 1

A continuación se proporciona un protocolo para definir si un material de tinte o de pigmento es un agente de matizado de tejidos para el fin de la presente invención:

1) Llenar dos recipientes de tipo tergotómetro con 800 ml de agua de la red de suministro urbano de Newcastle upon Tyne, Reino Unido (~12 granos por galón americano de dureza total, suministrada por Northumbrian Water, Pity Me, Durham, Co. Durham, Reino Unido).

2) Insertar los recipientes en el aparato de tipo tergotómetro, con la temperatura del agua controlada a 30 °C y la agitación fijada a 40 rpm durante el tiempo que dura el experimento.

3) Añadir 4,8 g de detergente IEC-B (detergente tipo B para una lavadora de referencia base IEC 60456), suministrado por wfk, Brügggen-Bracht, Alemania, a cada recipiente.

55 4) Al cabo de dos minutos, añadir 2,0 mg de colorante activo al primer recipiente.

5) Al cabo de un minuto, añadir 50 g de camiseta de algodón liso (suministrado por Warwick Equest, Consett, County Durham, Reino Unido), cortado en muestras de 5 cm x 5 cm, a cada recipiente.

6) Al cabo de 10 minutos, vaciar los recipientes y volverlos a llenar con agua fría (16 °C) con un grado de dureza de 14,4 grados de dureza Clark ingleses con una relación molar de calcio a magnesio de 3:1.

7) Al cabo de 2 minutos de aclarado, retirar los tejidos.

- 8) Repetir las etapas 3-7 durante tres ciclos más usando los mismos tratamientos.
- 9) Recoger y tender los tejidos en un recinto cerrado durante 12 horas para que se sequen.
- 10) Analizar las muestras usando un espectrómetro Hunter Miniscan equipado con iluminante D65 y filtro de UVA para obtener valores Hunter a (eje rojo-verde) y Hunter b (eje amarillo-azul).
- 11) Promediar los valores Hunter a y Hunter b para cada conjunto de tejidos. Si los tejidos tratados con colorante sometidos a valoración muestran una diferencia de tono promedio superior a 0,2 unidades en el eje a o en el eje b, se considera que es un agente de matizado de tejidos para el propósito de la invención.

Método de ensayo 2

Para el Método de ensayo 2, el ensayo de micromuestras BMI que se proporciona a continuación se realizó usando la composición detergente granulada 10 (véase la Tabla D, más arriba). El detergente para lavado de ropa se disolvió en agua que tenía una dureza de 12 gpg y se ajustó a una temperatura de 16 °C, y se añadió la enzima variante de proteasa de interés. Después, se determinó el rendimiento de las enzimas variantes de proteasa según el ensayo de micromuestras BMI descrito. El índice de rendimiento se determina comparando el rendimiento de la enzima variante de proteasa con el de la enzima subtilisina GG36 de *B. lentus* que tiene la secuencia de aminoácidos de la Id de Sec. n.º2, siendo en todos los casos el intervalo de dosificación de la enzima de 0,15 ppm. Las enzimas variantes de proteasa que tienen un índice de rendimiento de 1,1 o superior se consideran proteasas de agua fría.

Método de ensayo 3

Para el Método de ensayo 3, el ensayo de micromuestras BMI que se proporciona a continuación se realizó usando la composición detergente para lavado de ropa granulada 7 (véase la Tabla D, más arriba). El detergente para lavado de ropa se disolvió en agua que tenía una dureza de 6 gpg y se ajustó a una temperatura de 16 °C, y se añadió la enzima variante de proteasa GG36 de interés. Después, se determinó el rendimiento de las enzimas variantes de proteasa GG36 según el ensayo de micromuestras BMI descrito. El índice de rendimiento se determina comparando el rendimiento de la enzima variante de proteasa GG36 con el de la enzima subtilisina GG36 de *B. lentus* que tiene la secuencia de aminoácidos de la Id de Sec. n.º2, siendo en todos los casos el intervalo de dosificación de la enzima de 0,15 ppm. Las enzimas variantes de proteasa GG36 que tienen un índice de rendimiento de 1,1 o superior se consideran proteasas de agua fría.

Método de ensayo 4

Para el Método de ensayo 4, el ensayo de micromuestras BMI se realizó usando la composición detergente para lavado de ropa granulada 7 (véase la Tabla D, más arriba). El detergente para lavado de ropa se disolvió en agua que tenía una dureza de 6 gpg y se ajustó a una temperatura de 16 °C, y se añadió la enzima variante de proteasa GG36 de interés. Después, se determinó el rendimiento de las enzimas variantes de proteasa GG36 según el ensayo de micromuestras BMI descrito. El índice de rendimiento se determinó comparando el rendimiento de la enzima variante de proteasa GG36 con el de una enzima GG36-A158E de referencia, consistiendo dicha enzima GG36-A158E de referencia en la proteasa subtilisina GG36 de *B. lentus* con la secuencia de aminoácidos de la Id de sec. n.º2 con una única sustitución de ácido glutámico por alanina en la posición 158 (es decir, la mutación A158E), siendo en todos los casos el intervalo de dosificación de la enzima 0,1 – 5 ppm. Las enzimas variantes de proteasa GG36 que tienen un índice de rendimiento de 1,0 o superior se consideran proteasas de agua fría.

Método de ensayo 6

Para el Método de ensayo 6, el ensayo de micromuestras BMI se realizó usando uno de los detergentes de los Ejemplos 36a - 36n de la Tabla 1-2. El detergente se disolvió en agua que tiene la dureza que se especifica en la Tabla 1-2 y se ajustó a una temperatura de 16 °C. Después, se determina el rendimiento de las enzimas variantes según el ensayo de micromuestras de SLT descrito. El índice de rendimiento se determina comparando el rendimiento de la variante con el de la enzima de la Id. de sec. n.º2, siendo el intervalo de dosificación de la enzima de 0,1-5 ppm en todos los casos. Las enzimas que tienen un índice de rendimiento de 1,1 o superior, se consideran proteasas de agua fría.

Método de ensayo 7

Para el Método de ensayo 7, el ensayo de micromuestras BMI se realizó usando uno de los detergentes de la Tabla 1. El detergente se disolvió en agua que tiene la dureza y el tampón que se especifican en la Tabla 1 y se ajustó a una temperatura de 16 °C o 25 °C. Después, se determina el rendimiento de las enzimas variantes según el ensayo de micromuestras de SLT descrito. El índice de rendimiento se determina comparando el rendimiento de la variante con el de la enzima de la Id. de sec. n.º2, siendo el intervalo de dosificación de la enzima de 0,1-5 ppm en todos los casos. Las enzimas que tienen un índice de rendimiento de 1,1 o superior, se consideran proteasas de agua fría.

B. Ensayos

Ensayo TCA para la determinación del contenido de proteína

Se hicieron crecer cultivos de *B. subtilis* 2-3 días a 37 °C, agitando a 250-300 rpm con aireación humidificada. Las células se separaron del sobrenadante del cultivo que contenía la enzima, por centrifugación y/o filtración. La concentración de proteasa/proteína/enzima se determinó usando un ensayo de precipitación TCA. Se transfirió una alícuota (20-25 µl) de sobrenadante de cultivo a una placa de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos (MTP; placa de poliestireno transparente de unión media Costar 9017) que contiene 100 µl/pocillo de HCl 0,25 N. La lectura "basal" se determinó mediante lectura de la dispersión/absorbancia de la luz a 405 nm después de 5 s de mezclado. Se añadieron 100 µl/pocillo de ácido tricloroacético (TCA) al 30 % (p/v) a la placa que contenía HCl y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente para facilitar la precipitación de proteínas. La dispersión/absorbancia de la luz a 405 nm de esta placa "de ensayo" se determinó después de 5 s de mezclado. La turbidez/aumento de la dispersión de la luz en las muestras se correlaciona con la cantidad total de proteína precipitable en el sobrenadante de cultivo. Los cálculos se realizaron restando la lectura "basal" (obtenida después de la adición de HCl) a la lectura "de ensayo" (obtenida después de la adición de TCA), para proporcionar una medida relativa de la proteína total presente. Se determinó un factor de conversión que relacionaba la precipitación de proteínas con la concentración de proteínas para un patrón de GG36 de concentración conocida. Este factor de conversión se puede utilizar para todas las variantes, ya que la precipitación es lineal con la concentración. Si se desea, se puede crear una curva patrón calibrando las lecturas de TCA con ensayos de proteasa AAPF (véase más adelante) de clones con actividad específica conocida. Sin embargo, los resultados de TCA son lineales con respecto a la concentración de proteína de 50 a 500 partes por millón (ppm) de proteína (en donde 1 ppm corresponde a 1 mg/l) y por lo tanto se pueden trazar directamente en función del rendimiento de la enzima, con el fin de escoger variantes con el rendimiento deseado.

Ensayo de proteasa AAPF

Para determinar la actividad proteasa de las variantes de serina proteasa, más específicamente variantes de subtilisina, se midió la hidrólisis de N-succinil-L-alanil-L-alanil-L-prolil-L-fenil-p-nitroanilida (suc-AAPF-pNA). Las soluciones de reactivos usados fueron: Tris/HCl 100 mM, pH 8,6, que contiene TWEEN®-80 al 0,005 % (tampón de dilución de Tris); tampón Tris 100 mM, pH 8,6, que contenía CaCl₂ 1 mM y TWEEN®-80 al 0,005 % (tampón de Tris/Ca); y 160 mM de suc-AAPF-pNA en DMSO (solución madre suc-AAPF-pNA) (Sigma: S-7388). Para preparar una solución de trabajo de suc-AAPF-pNA, se añadió 1 ml de solución madre suc-AAPF-pNA a 100 ml de tampón Tris/Ca y se mezcló bien durante al menos 10 segundos. El ensayo se realizó mediante la adición de 10 µl de solución de proteasa diluida a cada pocillo de una MTP de 96 pocillos, inmediatamente seguido de la adición de 190 µl de solución de trabajo de suc-AAPF-pNA de 1 mg/ml. Las soluciones se mezclaron durante 5 s y se realizó la lectura de la variación en la absorbancia en el modo de cinética (25 lecturas en 5 minutos) a 405 nm en un lector de MTP, a 25 °C. La actividad proteasa se expresó como UA (actividad = $\Delta OD \cdot \text{min}^{-1} \text{ ml}^{-1}$).

Ensayo de micromuestras de tela SLT (ensayo SLT)

Se obtuvieron micromuestras de tela preaclaradas y troqueladas manchadas con blood, milk and ink (sangre, leche y tinta - SLT) (EMPA116) con un diámetro circular de 5,5 milímetros en placas de microtitulación de 96 pocillos (MTP; Corning 3641) del centro de materiales de ensayo BV (Vlaardingén, Países Bajos).

Los detergentes de la Tabla 1 se prepararon por mezclado durante al menos 30 minutos con el nivel de dureza de agua adecuado (3:1 Ca:Mg. - CaCl₂: MgCl₂·6H₂O) en agua Mili-Q para las composiciones detergentes 104 y 105, y en tampón de carbonato de sodio 2 mM pH 10,3 para las composiciones detergentes 101, 102, 103, 106 y 107 como se describe en la Tabla 1. Los detergentes se centrifugaron y se filtraron para eliminar el precipitado y se enfriaron sobre hielo durante 30 minutos antes de usarlos en los ensayos realizados a 16 °C.

Se igualaron las concentraciones de enzima a una concentración fija deseada comprendida en 20-50 ppm respecto a un nivel de GG36 purificada. La actividad específica de GG36 usando AAPF como sustrato se usó para convertir los valores de TCA a los que se han restado los basales en la concentración de enzima en ppm. Una vez que se determinó la concentración de enzima en ppm, se usó una fórmula sencilla para calcular el volumen de cada variante que se requería añadir a un volumen fijo de tampón (300-600 µl) con el fin de conseguir la concentración de enzima madre deseada:

$$x = (\text{ppm objetivo}) (v_b)/(y - \text{ppm objetivo})$$

Donde x = volumen de la enzima, y = concentración de la enzima, v_b = volumen de tampón

Se usó un robot Perkin-Elmer Janus con un brazo de 8 canales Versispan para dispensar volúmenes variables de enzima a partir de la placa fuente (placa de pocillos Axygen de media profundidad con variantes recogidas agrupadas usadas en el ensayo TCA de la concentración de enzima) en la placa de destino llena de tampón, usando puntas conductoras. Las muestras se mezclaron tres veces pipeteando arriba y abajo. Se validó la precisión de las diluciones de enzima mediante la medición de la actividad de AAPF de la placa igualada y comparándola con la de la placa fuente, para verificar que se habían preparado las diluciones correctas.

Después de la igualación, se añadieron 5-15 µl de solución de enzima a una placa de micromuestras BMI de tela llena de detergente para alcanzar un volumen final de ~200 µl. En algunos casos, las muestras de enzima no se

igualaron y en cambio se diluyeron todas por igual a partir de la placa madre para proporcionar un intervalo de trabajo de 0,1 a 5 ppm. Se determinaron las concentraciones diana óptimas para cada ensayo a partir de una curva de respuesta a la dosis que mide la actividad de limpieza en este intervalo para un detergente dado.

5 La MTP se selló con film (Bio-Rad) y se incubó en incubador/agitador iEMS (Thermo/Labsystems) preajustado a 16 °C en un ambiente frío ajustado a 4 °C o a 25 °C en la mesa de trabajo durante 15-30 minutos a 1400 rpm. Después de la incubación, se transfirieron 120 µl del sobrenadante a una MTP nueva (Corning 9017) y se realizó la lectura a 600 nm usando el lector SpectraMax. Las lecturas de absorbancia reales se obtuvieron restando un control de blanco (sin enzima) a cada valor.

10 Se calculó un índice de rendimiento (IR) para cada variante. El índice de rendimiento es la relación de la absorbancia del sobrenadante producido por la variante de enzima de limpieza a la absorbancia producida por la GG36 de limpieza a una concentración de enzima fija. Los valores de IR se calcularon dividiendo la absorbancia de una variante por la del control para una placa dada. Si se obtuvieron múltiples versiones de la misma variante durante un cribado de bibliotecas, sus valores IR se promediaron para derivar un único valor representativo. Un índice de rendimiento (IR) superior a 1 (IR > 1), indica una limpieza superior por una variante, en comparación con el patrón (p. ej., GG36), mientras que un IR de 1 (IR = 1) identifica una variante que rinde igual que el patrón y un IR que es inferior a 1 (IR < 1), identifica una variante con un rendimiento inferior al del patrón.

15

Tabla 1-1: Composiciones detergentes							
Composiciones detergentes	101	102	103	104	105	106	107
Alquilsulfato C ₁₂₋₁₇ de sodio		0,8	5,88	6,93	6,93		
Sulfonato de alquilbenzeno lineal de sodio con una longitud de cadena alifática de C _{11-C12}	14,47	13,6	8,98	8,2	7,02	11,5	8,78
Alcohol etoxi C ₁₂₋₁₇ sulfato de sodio		2	1,28	1,51	1,51	1,12	
Etoxilado de alcohol C ₁₀₋₁₅ con un promedio de etoxilación de 7 moles	0,06	0,12				1,7	1,33
Zeolita	2,7		15,21	17,78	20,54	2,04	1,57
Silicato de sodio	5,7	8	3,72	3,44	2,94	4,76	5,87
Ácido cítrico			0	0,5	0	1,08	1
Tripolifosfato de sodio							
Carbonato sódico	11,93	13,47	26,09	29,7	28	23,28	23,77
Nonanoiloxibencenosulfonato			5,77	2,74	0,63		
Potenciador de blanqueo a base de oxaciridina			0,04	0	0	0,01	0,01
Etilendiamino-S,S-disuccinato de tetrasodio						0,26	0
Sal heptasódica del ácido dietilentriamino penta (metileno fosfónico) (DTPA)			0,61	0,49	1,6		
Ácido hidroxietano dimetileno fosfónico						0,47	0,55
Tetraacetato de etilendiamina							
MgSO ₄			0,05	0	0	0,81	2
Percarbonato de sodio		1,53	7,05	6,53	10,4	19,35	14,11
Tetraacetil etilendiamina		1,15				4,51	3,26
Perborato de sodio monohidratado							
Carboximetilcelulosa (p. ej. Finnfix BDA de CPKelco)	0,21	0,21	0,38	0	0	1,01	0,91
Copolímero de ácido acrílico/ácido acrílico-maleico de sodio	1,55	0,75	3,79	3,48	2,98	1,84	1,75
Copolímero de injerto aleatorio de polietilenglicol/acetato de vinilo	0,3	0,6				0,96	0,91
Fotoblanqueante - tetrasulfonato de ftalocianina de cinc		0,0066				0,0022	0,0012
Abrillantador fluorescente	0,2	0,13	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11
Gránulo supresor de las jabonaduras			0,01	0,16	0,01	0,05	0,05
Compuesto varios (tintes, perfumes, adyuvante de proceso, humectantes y sulfato sódico)	Resto						

TABLA 1-2: Concentraciones finales de detergente, de dureza del agua y de tampón usadas para los ensayos con micromuestras de tela SLT			
Composición detergente	Concentración final de detergente (g/l)	Dureza final del agua* (gpg)	Concentración final de tampón de carbonato de sodio (mM)
1	1,2	12	2
2	2,25	12	2
3	0,719	6	2
4	0,625	6	0
5	0,625	6	0
6	7,69	20	2
7	7,69	20	2

* Concentración (Ca:Mg 3:1) como se detalla en el texto.

Índice de comportamiento

5 El Índice de rendimiento compara el comportamiento de la variante (valor medido) y el de la enzima patrón (valor teórico) para la misma concentración de proteína. Además, los valores teóricos se pueden calcular usando los parámetros del comportamiento en una curva de respuesta a las dosis de la proteasa patrón

10 Ejemplo 2

Construcción de variantes y bibliotecas combinatorias de GG36

15 Este Ejemplo describe la limpieza en agua fría de variantes de GG36 y bibliotecas construidas en *B. subtilis* usando el plásmido de expresión pHPLT-GG36 de *B. subtilis*. Este plásmido de expresión de *B. subtilis* contiene el casete de expresión GG36 que se muestra a continuación, el promotor LAT de *B. licheniformis* (Plat) y elementos adicionales de pUB110 (McKenzie y col., Plasmid, 15:93-103, 1986), que incluyen un gen de replicasa (reppUB), un gen de resistencia a la neomicina (neo)/kanamicina y un marcador de resistencia a la bleomicina (bleo) (Figura 4 de la patente US-6.566.112). El mapa del plásmido pHPLT-GG36 se proporciona en el documento WO2011140364. La secuencia del casete de expresión GG36 se proporciona a continuación.

Se proporciona a continuación la secuencia de ADN de GG36 (la secuencia señal se muestra en letras minúsculas, el propéptido en minúsculas con texto subrayado y la secuencia madura de GG36 en letras mayúsculas):

25 gtgagaagcaaaaaattgtggatcgtcgcgctgaccgcactactcatttctgttcttcagttcatcgcgcgcgcgctgctgaagaagcaaaaataatttaattgg
ctttaatgagcaggaagcgttcagtgagttgtgagaacaagtagagccaaatgacgaggctgccattctctcaggaagaggaagtcgaaatgaattgctcatgaatt
gaaaccgattcctgtttatccgttgagtttaagcccagaagatgtggacgcgcttgagctcagccagcatttcttatattgaagaggaatgcagaagtaaccgacaatgGCG
CAATCAGTGCCATGGGGAATTAGCCGTGTGCAAGCCCAGCTGCCATAACCGTGGATTGACAGGTTCTGGTGTA
30 GGAACCATCCACTCAAGATGGGAATGGGCATGGCACGCATGTGGCCGGGACGATTGCTGCTTTAAACAATTGTA
TTGGCGTTCTTGGCGTAGCGCCGAGCGCGGAACTATACGCTGTTAAAGTATTAGGGCGAGCGGTTTCAGGTTCCG
GTCAGCTCGATTGCCAAGGATTGGAATGGGCAGGGAACAATGGCATGCACGTTGCTAATTTGAGTTTAGGAAGC
CCTTCGCCAAGTGCCACACTTGAGCAAGCTGTTAATAGCGCGACTTCTAGAGGCGTTCTTGTGTAGCGGCATCTG
GAAATTCAGGTGCAGGCTCAATCAGCTATCCGGCCGTTATGCGAACGCAATGGCAGTCGGAGCTACTGACCAAA
35 ACAACAACCGCGCCAGCTTTTACAGTATGGCGCAGGGCTTACATTGTCGCACCAGGTGTAACGTGCAGAGCA
CATAACCGGTTCAACGTATGCCAGCTTAAACGGTACATCGATGGCTACTCCTCATGTTGCAGGTGCAGCAGCCCT
TGTTAAACAAAAGAACCCATCTTGGTCCAATGTACAAATCCGCAATCATCTAAAGAATACGGCAACGAGCTTAGGAA
GCACGAACTTGATGGAAGCGGACTTGTCAATGCAGAAGCTGCAACTCGTTAA (Id de sec. n.º 3)

40 Se proporciona a continuación la secuencia de la proteína GG36 (la secuencia señal se muestra en letras minúsculas, el propéptido en minúsculas con texto subrayado y la secuencia de proteasa madura de GG36 en letras mayúsculas):

vrskklwivastallisvafssiasaeeeakekyliqfneqevsefveqveandevailseeeveiehellhefetipvlsvlspedvdaleldpaisyieedaevtt
mAQSVPWGISRVQAPAAHNRGLTGSVGVKVAVLDTGISTHPDLNIRGGASFVPGEPSTQDGNHGHGTHVAGTIAALN
45 NSIGVLGVAPSAELYAVKVLGASGSGSVSSIAQGLEWAGNNGMHVANLSLGSPPSATLEQAVNSATSRGVLVVA
SGNSGAGSISYPARYANAMAVGATDQNNNRASFSQYGALDIVAPGVNVQSTYPGSTYASLNGTSMATPHVAGAA
ALVKQKNPSWSNVQIRNHLKNTATSLGSTNLYGSLVNAEAATR (SEQ ID NO:4).

Las bibliotecas de ADN y las variantes se crearon mediante extensión por PCR (WO2011140364), mutagénesis dirigida de cambio rápido (Stratagene) o se sintetizaron en DNA2.0, Inc. o GeneArt. El plásmido pHPLT –GG36 se usó para clonar los genes de las variantes de GG36 o para las reacciones de mutagénesis. Para una transformación eficaz de las bibliotecas y de las variantes en *B. subtilis*, 1 microlitro de los productos de la biblioteca o de las reacciones de mutagénesis ligados se amplificaron usando amplificación en círculo rodante mediante el kit Illustra Templiphi kit según las instrucciones del fabricante (GE Healthcare) para generar ADN multimérico para su transformación en *Bacillus subtilis*. Los productos de la amplificación en círculo rodante se diluyeron 100 veces y se usaron para transformar células de *B. subtilis* (genotipo: AaprE, AnprE, amyE::xylRPxylAcomK-phleo). Una alícuota de la mezcla de transformación se sembró en placas de LB que contenían leche desnatada al 1,6 % y 10 µg/ml de neomicina, y se incubaron durante la noche a 37 °C. Posteriormente, se inocularon las colonias con halos en 120 µl de medio de caldo Luria que contenía 10 µg/ml de neomicina, para la extracción de ADN plasmídico (kit QIAprep Spin Miniprep, Qiagen). Los plásmidos extraídos se secuenciaron para confirmar la presencia de las mutaciones deseadas. Las variantes se expresaron en células de *B. subtilis* (genotipo: ΔaprE, ΔnprE, amyE::xylRPxylAcomK-phleo) como se describe en el Ejemplo 1 (ensayo TCA) y se caracterizaron adicionalmente usando el ensayo de limpieza con micromuestras BMI como se describe en el Ejemplo 1. En las siguientes Tablas, las composiciones detergentes (“Detergentes”) corresponden a las mostradas en la Tabla 1. También, como se indica, la posición de aminoácidos se enumera de acuerdo con la numeración de BPN’.

TABLA 2-1: capacidad limpiadora BMI de las variantes del grupo D1.	
IR = índice de rendimiento	
IR > 0 = 3 is +++; IR entre 2,9 y 2 = ++; IR entre 1,9 y 1,1 = + en una composición detergente que se describe en la Tabla 1	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración de BPN')	IR relativo a GG36; Ensayo BMI a 25 °C
T022A-T033S-S101G-S103A-V104I-N116L-G159D-S188D-T213A-A232V-Q245R-N248D-E271F	+++
T022A-V068A-S101G-S103A-V104I-N116L-G159D-S188D-T213A-A232V-Q245R-N248D-E271F	+++
T022A-S101G-S103A-V104I-N116L-G159D-S188D-T213A-A232V-Q245R-N248D-E271F	+++
T022A-S101G-S103A-V104I-N116L-S128L-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F	+++
T022A-V068A-S101G-S103A-V104I-N116L-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F	+++
T022A-S101G-S103A-V104I-N116L-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F	+++
T022A-S101G-S103A-V104I-N116L-S128L-G159D-S188D-T213A-A232V-Q245R-N248D-E271F	++
T022A-N062D-S101G-S103A-V104I-N116L-G159D-S188D-T213A-A232V-Q245R-N248D-E271F	++
T022A-T033S-S101G-S103A-V104I-N116L-S128L-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F	+
T022A-T033S-S101G-S103A-V104I-N116L-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F	+
T022A-T033S-S101G-S103A-V104I-N116L-S128L-G159D-S188D-T213A-A232V-Q245R-N248D-E271F	+

TABLA 2-2: capacidad limpiadora BMI de las variantes del grupo D2.	
IR = índice de rendimiento	
IR > 0 = 3 is +++; IR entre 2,9 y 2 = ++; IR entre 1,9 y 1,1 = + en la composición detergente 104 se describe en la Tabla 1	
Secuencia de variantes de GG36 (numeración de BPN')	IR relativo a GG36; Ensayo BMI, detergente 104 a 25 °C
T022A-S101G-S103A-V104I-N116L-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F	+++
T022A-S101G-S103A-V104I-N116L-G159D-S188D-A232V-Q245R-E271F	+++
T022A-S101G-S103A-V104I-N116L-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F	+++
T022A-S101G-S103A-V104I-N116L-G159D-S188D-Q245R-N248D-E271F	+++
T022A-S101G-S103A-V104I-N116L-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F	+++
T022A-S101G-V104I-N116L-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F	+++
T022A-S103A-V104I-N116L-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F	+++
T022A-S101G-S103A-V104I-N116L-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D	++

Las dimensiones y valores descritos en la presente memoria no deben entenderse como estrictamente limitados a los valores numéricos exactos indicados. Sino que, salvo que se indique lo contrario, debe considerarse que cada dimensión significa tanto el valor indicado como un intervalo funcionalmente equivalente en torno a ese valor. Por ejemplo, una dimensión descrita como "40 mm" se refiere a "aproximadamente 40 mm".

5

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> The Procter & Gamble Company

<120> Composiciones y métodos que comprenden serina proteasa

<130> CM3738F

<160> 2

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 275

<212> PRT

<213> Bacillus amyloliquefaciens

<400> 1

Ala Gln Ser Val Pro Tyr Gly Val Ser Gln Ile Lys Ala Pro Ala Leu
 1 5 10 15

His Ser Gln Gly Tyr Thr Gly Ser Asn Val Lys Val Ala Val Ile Asp
 20 25 30

Ser Gly Ile Asp Ser Ser His Pro Asp Leu Lys Val Ala Gly Gly Ala
 35 40 45

Ser Met Val Pro Ser Glu Thr Asn Pro Phe Gln Asp Asn Asn Ser His
 50 55 60

Gly Thr His Val Ala Gly Thr Val Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly
 65 70 75 80

Val Leu Gly Val Ala Pro Ser Ala Ser Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu
 85 90 95

Gly Ala Asp Gly Ser Gly Gln Tyr Ser Trp Ile Ile Asn Gly Ile Glu
 100 105 110

Trp Ala Ile Ala Asn Asn Met Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly
 115 120 125

Pro Ser Gly Ser Ala Ala Leu Lys Ala Ala Val Asp Lys Ala Val Ala
 130 135 140

Ser Gly Val Val Val Val Ala Ala Ala Gly Asn Glu Gly Thr Ser Gly
 145 150 155 160

Ser Ser Ser Thr Val Gly Tyr Pro Gly Lys Tyr Pro Ser Val Ile Ala
 165 170 175

ES 2 809 509 T3

Val Gly Ala Val Asp Ser Ser Asn Gln Arg Ala Ser Phe Ser Ser Val
180 185 190

Gly Pro Glu Leu Asp Val Met Ala Pro Gly Val Ser Ile Gln Ser Thr
195 200 205

Leu Pro Gly Asn Lys Tyr Gly Ala Tyr Asn Gly Thr Ser Met Ala Ser
210 215 220

Pro His Val Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lys His Pro Asn
225 230 235 240

Trp Thr Asn Thr Gln Val Arg Ser Ser Leu Glu Asn Thr Thr Thr Lys
245 250 255

Leu Gly Asp Ser Phe Tyr Tyr Gly Lys Gly Leu Ile Asn Val Gln Ala
260 265 270

Ala Ala Gln
275

<210> 2
<211> 269
<212> PRT
<213> Bacillus lentus

<400> 2

Ala Gln Ser Val Pro Trp Gly Ile Ser Arg Val Gln Ala Pro Ala Ala
1 5 10 15

His Asn Arg Gly Leu Thr Gly Ser Gly Val Lys Val Ala Val Leu Asp
20 25 30

Thr Gly Ile Ser Thr His Pro Asp Leu Asn Ile Arg Gly Gly Ala Ser
35 40 45

Phe Val Pro Gly Glu Pro Ser Thr Gln Asp Gly Asn Gly His Gly Thr
50 55 60

His Val Ala Gly Thr Ile Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly Val Leu
65 70 75 80

Gly Val Ala Pro Ser Ala Glu Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Gly Ala
85 90 95

Ser Gly Ser Gly Ser Val Ser Ser Ile Ala Gln Gly Leu Glu Trp Ala
100 105 110

ES 2 809 509 T3

Gly Asn Asn Gly Met His Val Ala Asn Leu Ser Leu Gly Ser Pro Ser
 115 120 125

Pro Ser Ala Thr Leu Glu Gln Ala Val Asn Ser Ala Thr Ser Arg Gly
 130 135 140

Val Leu Val Val Ala Ala Ser Gly Asn Ser Gly Ala Gly Ser Ile Ser
 145 150 155 160

Tyr Pro Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Met Ala Val Gly Ala Thr Asp Gln
 165 170 175

Asn Asn Asn Arg Ala Ser Phe Ser Gln Tyr Gly Ala Gly Leu Asp Ile
 180 185 190

Val Ala Pro Gly Val Asn Val Gln Ser Thr Tyr Pro Gly Ser Thr Tyr
 195 200 205

Ala Ser Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Ala
 210 215 220

Ala Ala Leu Val Lys Gln Lys Asn Pro Ser Trp Ser Asn Val Gln Ile
 225 230 235 240

Arg Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr Ser Leu Gly Ser Thr Asn Leu
 245 250 255

Tyr Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg
 260 265

REIVINDICACIONES

1. Una composición limpiadora y/o tratante que comprende un material adyuvante y una variante de subtilisina aislada, en donde dicha variante de subtilisina tiene al menos 90 % de identidad de aminoácidos con la proteasa subtilisina GG36 de *Bacillus lentus* que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la Id. de sec. n.º 2 y dicha variante de subtilisina es una forma madura que tiene actividad proteolítica y comprende una secuencia de aminoácidos que comprende una de las combinaciones de sustituciones de aminoácidos: T022A-S103A-V104I-N116L-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-S101G-V104I-N116L-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-S101G-S103A-V104I-N116L-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-S101G-S103A-V104I-N116L-G159D-S188D-Q245R-N248D-E271F, T022A-S101G-S103A-V104I-N116L-G159D-S188D-A232V-N248D-E271F, T022A-S101G-S103A-V104I-N116L-G159D-S188D-A232V-Q245R - E271F, T022A-S101G-S103A-V104I-N116L-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-T033S-S101G-S103A-V104I-N116L-G159D-S188D-T213A-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-V068A-S101G-S103A-V104I-N116L-G159D-S188D-T213A-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-S101G-S103A-V104I-N116L-G159D-S188D-T213A-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-S101G-S103A-V104I-N116L-S128L-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-S101G-S103A-V104I-N116L-S128L-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-V068A-S101G-S103A-V104I-N116L-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-S101G-S103A-V104I-N116L-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D, T022A-S101G-S103A-V104I-N116L-S128L-G159D-S188D-T213A-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-N062D-S101G-S103A-V104I-N116L-G159D-S188D-T213A-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-T033S-S101G-S103A-V104I-N116L-S128L-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-T033S-S101G-S103A-V104I-N116L-S128L-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-T033S-S101G-S103A-V104I-N116L-S128L-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-S101G-S103A-V104I-N116L-S128L-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-S101G-S103A-V104I-N116L-G159D-S188D-A232V-Q245R - E271F, T022A-S101G-S103A-V104I-N116L-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-S101G-S103A-V104I-N116L-G159D-S188D-T213A-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-S101G-S103A-V104I-N116L-G159D-S188D-A232V-Q245R - E271F, T022A-S101G-S103A-V104I-N116L-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-T033S-S101G-S103A-V104I-N116L-G159D-S188D-T213A-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-V068A-S101G-S103A-V104I-N116L-G159D-S188D-T213A-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-S101G-S103A-V104I-N116L-G159D-S188D-T213A-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-S101G-S103A-V104I-N116L-S128L-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F, T022A-S101G-S103A-V104I-N116L-S128L-G159D-S188D-A232V-Q245R-N248D-E271F, y en donde las posiciones de aminoácidos de la variante de subtilisina están numeradas según la numeración de las correspondientes posiciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada en la Id. de sec. n.º 1.
2. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde la carga neta total de la variante de subtilisina aislada es -1, 0, +1, +2, +3, +4, +5, -1, -2, -3, -4 o -5 con respecto a la carga neta total de la proteasa subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*, preferiblemente 0, +1, +2, +3, +4 o +5 con respecto a la carga neta total de la proteasa subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*.
3. Una composición según cualquiera las reivindicaciones anteriores en donde la carga neta total de la variante es +5, -1, -2, -3, o -4 con respecto a la carga neta total de la proteasa subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*, preferiblemente 0, -1, -2, -3, +4 o -4 con respecto a la carga neta total de la proteasa subtilisina GG36 de *Bacillus lentus*.
4. Una composición según cualquiera las reivindicaciones anteriores que comprende, además, al menos una adicional seleccionada de hemicelulasas, celulasas, peroxidasas, proteasas, metaloproteasas, xilanasas, lipasas, fosfolipasas, estererasas, perhidrolasas, cutinasas, pectinasas, pectato liasas, mananasas, queratinasas, reductasas, oxidasas, fenoloxidasas, lipoxigenasas, ligninasas, pululananas, tannasas, pentosanasas, malanasas, β -glucanasas, arabinosidasas, hialuronidasa, condroitinasas, lacasas y amilasas, o cualquier combinación de las mismas.
5. Un método para fabricar la composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende mezclar el material adyuvante con la variante de subtilisina.
6. Un método para tratar una superficie, preferiblemente una tela, que comprende poner en contacto la superficie con una solución de lavado acuosa que comprende una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
7. Un método según la reivindicación 6 en donde la solución de lavado acuosa tiene una conductividad de 0,1 a 3, preferiblemente de 0,3 a 2,5 mS/cm y preferiblemente la composición es una composición según la reivindicación 2 o la reivindicación 3.

8. Un método según la reivindicación 6 en donde la solución de lavado acuosa tiene una conductividad de más de 3 a 30 mS/cm, preferiblemente de 3,5 a 20 mS/cm.