

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 813 727**

51 Int. Cl.:

C12N 9/54 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.12.2015 PCT/EP2015/080608**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.06.2016 WO16097350**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2015 E 15817280 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.06.2020 EP 3234123**

54 Título: **Variantes de proteasa y polinucleótidos que las codifican**

30 Prioridad:

19.12.2014 EP 14199409

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

24.03.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**NIELSEN, JENS;
HEDE, PERNILLE y
FRIIS, ESBEN PETER**

74 Agente/Representante:

PONTI GRAU, Ignacio

ES 2 813 727 T3

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

DESCRIPCIÓN

Variantes de proteasa y polinucleótidos que las codifican

5 Referencia a una lista de secuencias

[0001] Esta aplicación contiene una lista de secuencias en formato legible por ordenador.

Antecedentes de la invención

10

Campo de la invención

[0002] La presente invención se refiere a nuevas variantes de proteasa que presentan alteraciones con respecto a la proteasa progenitora en una o más propiedades que incluyen: rendimiento de lavado, estabilidad de detergente y/o estabilidad de almacenamiento. Las variantes de la invención son adecuadas para su uso en procesos de limpieza y composiciones detergentes, tales como composiciones para lavado de ropa y composiciones para lavavajillas, incluidas composiciones para lavado a mano y lavavajillas automático. La presente invención también se refiere a secuencias de ADN aisladas que codifican las variantes, los vectores de expresión, las células huésped y los métodos para producir y usar las variantes de proteasa de la invención.

15

20

Descripción de la técnica relacionada

[0003] Las enzimas se han utilizado en la industria de los detergentes como parte de las formulaciones de lavado durante muchas décadas. Las proteasas son, desde una perspectiva comercial, la enzima más relevante en tales formulaciones, pero también se utilizan a menudo otras enzimas que incluyen lipasas, amilasas, celulasas, hemicelulasas o mezclas de enzimas. Para mejorar el coste y/o el rendimiento de las proteasas, existe una búsqueda continua de proteasas con propiedades alteradas, tales como mayor actividad a bajas temperaturas, mayor estabilidad, mayor actividad específica a un pH dado, dependencia de Ca^{2+} alterada, mayor estabilidad en presencia de otros ingredientes detergentes (por ejemplo, lejía, surfactantes, etc.), etc. WO91/000345 (Novozymes A/S) se refiere a proteasas subtilisina mutadas, en las que la carga electrostática neta ha cambiado en comparación con la proteasa progenitora. Las subtilisinas son un subgrupo de la familia subtilasa de las proteasas, que se utilizan ampliamente en detergentes. Esta familia ha sido agrupada previamente en 6 subgrupos diferentes por Siezen RJ y Leunissen JAM, 1997, Protein Science, 6, 501-523. Uno de estos subgrupos es la familia de las subtilisinas, que incluye subtilasas como BPN', subtilisina 309 (SAVINASE®, Novozymes A/S), subtilisina Carlsberg (ALCALASE®, Novozymes A/S), subtilisina S41 (una subtilasa de los *Bacillus* TA41 antárticos psicrófilos, Davail S et al. 1994, The Journal of Biological Chemistry, 269 (26), 99. 17448-17453) y subtilisina S39 (una subtilasa de los *Bacillus* TA39 antárticos psicrófilos, Narinx E et al. 1997, Protein Engineering, 10 (11), págs. 1271-1279). La proteasa TY-145 es una subtilasa de *Bacillus* sp. TY-145, NCIMB 40339, que se ha descrito por primera vez en WO 92/17577 (Novozymes A/S) y en la aplicación posterior WO2004/067737 (Novozymes A/S) que describe la estructura tridimensional y el uso de la ingeniería de proteínas para alterar la funcionalidad de una subtilasa TY-145.

25

30

35

40

[0004] WO 2009/019157 describe proteasas del tipo subtilisina, incluyendo una proteasa (SEQ ID N.º: 2) con una identidad del 94 % sobre 311 posiciones con la SEQ ID N.º: 3 del presente documento.

45

[0005] Uniprot: A0A077J6A6 describe una proteasa S8 de *Bacillus* sp. con un 79 % de identidad sobre 311 posiciones con la SEQ ID N.º: 3 en este documento, y con K en la posición correspondiente a la posición 27 de la SEQ ID N.º: 3.

50

[0006] Jiang Wu et al. (2004), FEMS Microbiology Letters, vol. 230, n.º 2, páginas 251-258, describen la clonación y el análisis de una nueva proteasa similar a la subtilisina, WF146, con cuatro bucles de superficie insertados y con K en la posición correspondiente a la posición 27 de la SEQ ID N.º: 3 del presente documento.

Resumen de la invención

55

[0007] La invención se refiere a variantes de proteasa que comprenden la alteración S27K, donde cada posición corresponde a la SEQ ID N.º: 3, y donde la variante de proteasa tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID N.º: 3 y comprende un conjunto de alteraciones seleccionadas de entre las enumeradas en la reivindicación 1.

60

[0008] La presente invención también se refiere a composiciones detergentes que comprenden las variantes de proteasa, el uso de las composiciones detergentes en un proceso de limpieza y los métodos para obtener las variantes de proteasa.

65 Resumen de la lista de secuencias

[0009]

- 5 SEQ ID N.º: 1 = es la secuencia de ADN de la proteasa TY-145 aislada de *Bacillus sp.*
 SEQ ID N.º: 2 = es la secuencia de aminoácidos deducida de la SEQ ID N.º: 1.
 SEQ ID N.º: 3 = es la secuencia de aminoácidos de la proteasa TY-145 madura.
 SEQ ID N.º: 4 = es la secuencia de aminoácidos de la proteasa TY-145 con S173P + S175P
 SEQ ID N.º: 5 = es la secuencia de aminoácidos de la proteasa TY-145 con S173P + S175P + F180Y

10 Definiciones

[0010] El término "proteasa" se define en este documento como una enzima que hidroliza enlaces peptídicos. Incluye cualquier enzima que pertenezca al grupo de enzimas EC 3.4 (incluyendo cada una de sus trece subclases http://en.wikipedia.org/wiki/Category:EC_3.4). El número EC se refiere a Nomenclatura de enzimas de 15 1992 de NC-IUBMB, Academic Press, San Diego, California, incluidos los suplementos 1-5 publicados en Eur. J. Biochem. 1994, 223, 1-5; Eur. J. Biochem. 1995, 232, 1-6; Eur. J. Biochem. 1996, 237, 1-5; Eur. J. Biochem. 1997, 250, 1-6; y Eur. J. Biochem. 1999, 264, 610-650; respectivamente. El término "subtilasas" se refiere a un subgrupo de serina proteasa según Siezen et al., Protein Eng. 4 (1991) 719-737 y Siezen et al. Protein Science 6 (1997) 501-523. Las serina proteasas o serina peptidasas son un subgrupo de proteasas que se caracterizan por tener una serina en el sitio activo, que forma un aducto covalente con el sustrato. Además, las subtilasas (y las serina proteasas) se caracterizan por tener dos residuos de aminoácidos en el sitio activo aparte de la serina, a saber, una histidina y un residuo de ácido aspártico. Las subtilasas se pueden repartir en 6 subdivisiones, es decir, la familia de la subtilisina, la familia de la termitasa, la familia de la proteinasa K, la familia de la peptidasa 20 lantibiótica, la familia de la kexina y la familia de la pirrolisina. El término "actividad de proteasa" significa una actividad proteolítica (EC 3.4). Las proteasas de la invención son endopeptidasas (EC 3.4.21). Para los propósitos de la presente invención, la actividad proteasa se determina de acuerdo con el procedimiento descrito en "Materiales y métodos" más adelante. Las variantes de proteasa de la presente invención tienen al menos un 20 %, por ejemplo, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, o al menos un 100 % de la actividad de proteasa del polipéptido 25 maduro de la SEQ ID N.º: 3.

[0011] Los términos "progenitora", "proteasa progenitora" o "proteasa precursora" se refieren a una proteasa a la que se le hace una alteración para producir las variantes enzimáticas de la presente invención. Por tanto, la progenitora es una proteasa que tiene la secuencia de aminoácidos idéntica de dicha variante pero que no tiene 35 las alteraciones en una o más de dichas posiciones especificadas. Se entenderá que en el presente contexto la expresión "que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica" se refiere a un 100 % de identidad de secuencia. La progenitora puede ser un polipéptido de origen natural (tipo salvaje) o un polipéptido modificado homólogo a la SEQ ID N.º: 3, tal como se especifica a continuación. En una realización particular, la progenitora es una proteasa con al menos un 70 %, al menos un 72 %, al menos un 73 %, al menos un 74 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 81 %, al menos un 82 %, al menos un 83 %, al menos un 84 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, p. ej., al menos un 99.1 %, al menos un 99.2 %, al menos un 99.3 %, al menos un 99.4 %, al menos un 99.5 %, al menos un 99.6 o un 100 % de identidad con un polipéptido con la SEQ ID N.º: 3. 45

[0012] El término "variante de proteasa" se refiere a una proteasa que tiene actividad de proteasa que comprende una alteración, es decir, una sustitución, una inserción y/o una delección, preferiblemente una sustitución, en una o más (o una o varias) posiciones en comparación con su progenitora que es una proteasa que tiene la secuencia de aminoácidos idéntica de dicha variante pero sin las alteraciones en una o varias de dichas 50 posiciones especificadas. Una sustitución significa el reemplazo de un aminoácido que ocupa una posición con un aminoácido diferente; una delección significa la eliminación de un aminoácido que ocupa una posición; y una inserción significa añadir aminoácidos, p. ej., 1 a 10 aminoácidos, preferiblemente 1-3 aminoácidos adyacentes a un aminoácido que ocupa una posición. Preferiblemente, la variante se modifica mediante la acción humana. En un aspecto, la variante es al menos un 1 % pura, por ejemplo, al menos un 5 % pura, al menos un 10 % pura, al menos un 20 % pura, al menos un 40 % pura, al menos un 60 % pura, al menos un 80 % pura, y al menos un 90 % pura, según se determina mediante SDS PAGE. 55

[0013] El término "polinucleótido aislado" se refiere a un polinucleótido que es modificado por la acción humana. En un aspecto, el polinucleótido aislado es al menos un 1 % puro, por ejemplo, al menos un 5 % puro, al menos un 10 % puro, al menos un 20 % puro, al menos un 40 % puro, al menos un 60 % puro, al menos un 80 % puro, al menos un 90 % puro y al menos un 95 % puro, según se determina mediante electroforesis en agarosa. Los polinucleótidos pueden ser de origen genómico, ADNc, ARN, semisintético, sintético o cualquier combinación de los mismos. 60

[0014] El término "variante alélica" significa cualesquiera dos o más formas alternativas de un gen que ocupan el mismo locus cromosómico. La variación alélica surge de forma natural a través de la mutación y puede dar lugar 65

a polimorfismo dentro de las poblaciones. Las mutaciones genéticas pueden ser silenciosas (sin cambios en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos que tengan secuencias de aminoácidos alteradas. Una variante alélica de un polipéptido es un polipéptido codificado por una variante alélica de un gen.

5 [0015] El término "variante sustancialmente pura" significa un preparado que contiene como máximo un 10 %, como máximo un 8 %, como máximo un 6 %, como máximo un 5 %, como máximo un 4 %, como máximo un 3 %
10 como máximo un 2 %, como máximo un 1 % y como máximo un 0,5 % en peso de otro material polipeptídico con el que está asociado de forma nativa o recombinante. Preferiblemente, la variante es al menos un 92% pura, por ejemplo, al menos un 94% pura, al menos un 95% pura, al menos un 96% pura, al menos un 97% pura, al menos un 98% pura, al menos un 99% pura, al menos un 99.5 % puro y un 100 % puro en peso del material polipeptídico total presente en la preparación. Las variantes de la presente invención se encuentran preferiblemente en forma sustancialmente pura. Esto se puede lograr, por ejemplo, preparando la variante mediante métodos recombinantes bien conocidos o mediante métodos de purificación clásicos.

15 [0016] El término "proteasa de tipo salvaje" se refiere a una proteasa expresada por un organismo de origen natural, tal como una bacteria, una arquea, una levadura, un hongo, una planta o un animal que se encuentra en la naturaleza. Un ejemplo de una proteasa de tipo salvaje es la proteasa TY-145.

20 [0017] El término "polipéptido maduro" significa un polipéptido en su forma final después de la traducción y de cualquier modificación postraduccional, como el procesamiento del terminal N, el truncamiento de terminal C, la glicosilación, la fosforilación, etc. En un aspecto, el polipéptido maduro corresponde a la secuencia de aminoácidos con SEQ ID N.º: 3.

25 [0018] El término "secuencia codificante del polipéptido maduro" significa un polinucleótido que codifica un polipéptido maduro que tiene actividad de proteasa. En un aspecto, la secuencia codificante del polipéptido maduro son los nucleótidos 331 a 1263 de la SEQ ID N.º: 1 basándose en SignalP (Nielsen et al., 1997, Protein Engineering 10: 1-6)] que predice los nucleótidos 1 a 81 de la SEQ ID N.º: 1 son el péptido señal.

30 [0019] El término "ADNc" significa una molécula de ADN que puede prepararse mediante transcripción inversa a partir de una molécula de ARNm madura, empalmada, obtenida a partir de una célula procariótica o eucariótica. Un ADNc carece de secuencias intrónicas que puedan estar presentes en el ADN genómico correspondiente. El transcrito de ARN primario inicial es un precursor del ARNm que se procesa a través de una serie de pasos, incluido el empalme, antes de aparecer como ARNm maduro empalmado.

35 [0020] El término "secuencia codificante" significa un polinucleótido, que especifica directamente la secuencia de aminoácidos de su producto polipeptídico. Los límites de la secuencia codificante se determinan generalmente mediante un marco de lectura abierto, que comienza normalmente con el codón de inicio ATG o codones de inicio alternativos como GTG y TTG, y acaba con un codón de terminación tal como TAA, TAG y TGA. La secuencia codificante puede ser un ADN, un ADNc, un polinucleótido sintético o uno recombinante.

40 [0021] El término "constructo de ácidos nucleicos" se refiere a una molécula de ácidos nucleicos, ya sea monocatenaria o bicatenaria, que se aísla de un gen natural o se modifica para contener segmentos de ácidos nucleicos de una manera que de otra forma no existiría en la naturaleza o que es sintética. El término constructo de ácidos nucleicos es sinónimo del término "casete de expresión" cuando el constructo de ácidos nucleicos contiene las secuencias de control requeridas para la expresión de una secuencia codificante de la presente invención.

45 [0022] El término "operativamente enlazado" significa una configuración en la que una secuencia de control se coloca en una posición apropiada con respecto a la secuencia codificante de un polinucleótido de manera que la secuencia de control dirige la expresión de la secuencia codificante.

50 [0023] El término "secuencias de control" se refiere a todos los componentes necesarios para la expresión de un polinucleótido que codifica una variante de la presente invención. Cada secuencia de control puede ser nativa o extranjera al polinucleótido que codifica la variante, o nativa o extranjera a cada una de las otras. Dichas secuencias de control incluyen, pero no se limitan a, un líder, una secuencia de poliadenilación, una secuencia propeptídica, un promotor, una secuencia de péptido señal y un terminador de transcripción. Como mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor, y señales de parada transcripcional y traduccional. Las secuencias de control pueden proporcionarse con enlazadores con el fin de introducir sitios de restricción específicos que faciliten la unión de las secuencias de control con la región codificante del polinucleótido que codifica un polipéptido.

55 [0024] El término «expresión» incluye cualquier paso involucrado en la producción de la variante, que incluye, entre otros, transcripción, modificación postraduccional, traducción, modificación postraduccional y secreción.

60 [0025] El término "vector de expresión" significa una molécula de ADN lineal o circular que comprende un

polinucleótido que codifica una variante y que está operativamente enlazada a nucleótidos adicionales que garantizan su expresión.

[0026] El término "promotor de la transcripción" se usa para un promotor que es una región de ADN que facilita la transcripción de un gen particular. Los promotores de la transcripción se encuentran típicamente cerca de los genes que regulan, en la misma hebra y corriente arriba (hacia la región 5' de la hebra sentido).

[0027] El término "terminador de la transcripción" se usa para una sección de la secuencia genética que marca el final del gen u operón en el ADN genómico para la transcripción.

[0028] El término "célula huésped" significa cualquier tipo de célula que es susceptible de transformación, transfección, transducción y similares con un constructo de ácidos nucleicos o un vector de expresión que comprenden un polinucleótido de la presente invención. El término "célula huésped" abarca cualquier descendiente de una célula madre que no es idéntico a la célula madre debido a las mutaciones que ocurren durante la replicación.

[0029] La relación entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos se describe mediante el parámetro "identidad de secuencia". Para los propósitos de la presente invención, el grado de identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos se determina usando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) tal como se implementó en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277), preferiblemente la versión 3.0.0 o posterior. Los parámetros opcionales utilizados son penalización de abertura de gap de 10, penalización por extensión gap de 0.5 y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (EMBOSS versión de BLOSUM62). El resultado de Needle etiquetado como "identidad más larga" (obtenida usando la opción -nobrief) se usa como el porcentaje de identidad y se calcula de la siguiente manera:

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

[0030] El término "condiciones de astringencia alta" se refiere a sondas de por lo menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42 °C en 5X SSPE, SDS al 0.3 %, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y formamida del 50 %, siguiendo procedimientos estándar de transferencia de Southern durante 12 a 24 horas. El material portador se lava finalmente tres veces durante 15 minutos cada una usando 2X SSC, SDS al 0.2 % a 65 °C.

[0031] El término "condiciones de astringencia muy alta" se refiere a sondas de por lo menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42 °C en 5X SSPE, SDS al 0.3 %, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y formamida del 50 %, siguiendo procedimientos estándar de transferencia de Southern durante 12 a 24 horas. El material portador se lava finalmente tres veces durante 15 minutos cada una usando 2X SSC, SDS al 0.2 % a 70 °C.

[0032] El término "condiciones de astringencia media" se refiere a sondas de por lo menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42 °C en 5X SSPE, SDS al 0.3 %, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y formamida del 50 %, siguiendo procedimientos estándar de transferencia de Southern durante 12 a 24 horas. El material portador se lava finalmente tres veces durante 15 minutos cada una usando 2X SSC, SDS al 0.2 % a 55 °C.

[0033] El término "condiciones de astringencia media-alta" se refiere a sondas de por lo menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42 °C en 5X SSPE, SDS al 0.3 %, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y formamida del 50 %, siguiendo procedimientos estándar de transferencia de Southern durante 12 a 24 horas. El material portador se lava finalmente tres veces durante 15 minutos cada una usando 2X SSC, SDS al 0.2 % a 60 °C.

[0034] El término "condiciones de astringencia baja" se refiere a sondas de por lo menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42 °C en 5X SSPE, SDS al 0.3 %, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y formamida del 25%, siguiendo procedimientos estándar de transferencia de Southern durante 12 a 24 horas. El material portador se lava finalmente tres veces durante 15 minutos cada una usando 2X SSC, SDS al 0.2 % a 50 °C.

[0035] El término "condiciones de astringencia muy baja" se refiere a sondas de por lo menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42 °C en 5X SSPE, SDS al 0.3 %, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y formamida del 25%, siguiendo procedimientos estándar de transferencia de Southern durante 12 a 24 horas. El material portador se lava finalmente tres veces durante 15 minutos cada una usando 2X SSC, SDS al 0.2 % a 45 °C.

[0036] El término "propiedad mejorada" se refiere a una característica asociada con una variante que es mejorada en comparación con la progenitora o en comparación con una proteasa con la SEQ ID N.º: 3, o en

comparación con una proteasa que tiene la secuencia de aminoácidos idéntica de dicha variante pero que no tiene las alteraciones en una o más de dichas posiciones especificadas. Tales propiedades mejoradas incluyen, entre otras, rendimiento de lavado, actividad de proteasa, perfil de actividad térmica, termoestabilidad, perfil de actividad de pH, estabilidad de pH, especificidad de sustrato/cofactor, propiedades de superficie mejoradas, especificidad de sustrato, especificidad de producto, mayor estabilidad, estabilidad mejorada en condiciones de almacenamiento y estabilidad química.

[0037] El término "actividad de proteasa mejorada" se define en el presente documento como una actividad de proteasa alterada (tal como se ha definido anteriormente), p. ej., por una conversión incrementada de proteína de una variante de proteasa que muestra una alteración de la actividad en relación (o comparada) con la actividad de la proteasa progenitora, o en comparación con una proteasa con la SEQ ID N.º: 3, o en relación con una proteasa que tiene la secuencia de aminoácidos idéntica de dicha variante pero sin tener las alteraciones en una o más de dichas posiciones especificadas, por una conversión incrementada de proteínas.

[0038] El término "estabilidad" incluye la estabilidad durante el almacenamiento y la estabilidad durante el uso, p. ej., durante un proceso de lavado, y refleja la estabilidad de la variante de proteasa según la invención en función del tiempo, p. ej., cuánta actividad se retiene cuando la variante de proteasa se mantiene en una solución, en particular en una solución de detergente. La estabilidad se ve influida por muchos factores, p. ej., pH, temperatura, composición de detergente, p. ej., cantidad de coadyuvante, surfactantes, etc. El término "estabilidad mejorada" o "estabilidad aumentada" se define en el presente documento como una proteasa variante que muestra una estabilidad aumentada en las soluciones, en relación con la estabilidad de la proteasa progenitora, en relación con una proteasa que tiene la secuencia de aminoácidos idéntica de dicha variante pero que no tiene las alteraciones en una o más de dichas posiciones especificadas o en relación con la SEQ ID N.º: 3. Los términos "estabilidad mejorada" y "estabilidad aumentada" incluyen "estabilidad química mejorada", "estabilidad del detergente" o "estabilidad mejorada del detergente".

[0039] El término "actividad térmica mejorada" se refiere a una variante que exhibe un perfil de actividad dependiente de la temperatura alterado a una temperatura específica en relación con el perfil de actividad dependiente de la temperatura de la progenitora o en relación con una proteasa con la SEQ ID N.º: 3. El valor de actividad térmica proporciona una medida de la eficiencia de la variante para mejorar la catálisis de una reacción de hidrólisis en un rango de temperaturas. En una realización, las variantes de proteasa de acuerdo con la invención tienen un rendimiento mejorado respecto a la enzima progenitora a una temperatura más baja que la temperatura óptima de la progenitora definida por el perfil de actividad dependiente de la temperatura de la progenitora. En otra realización, las variantes de proteasa de acuerdo con la invención tienen un rendimiento mejorado respecto a la enzima progenitora a una temperatura más alta que la temperatura óptima de la progenitora definida por el perfil de actividad dependiente de la temperatura de la progenitora.

[0040] El término "rendimiento de lavado mejorado" se define en el presente documento como una variante de proteasa según la invención que presenta un rendimiento de lavado mejorado en relación con el rendimiento de lavado de la proteasa progenitora, en relación con una proteasa con la SEQ ID N.º: 3 o en relación con una proteasa que tiene la secuencia de aminoácidos idéntica de dicha variante pero que no tiene las alteraciones en una o más de dichas posiciones especificadas cuando se mide en AMSA tal como se describe en "Materiales y métodos" en el presente documento. El término "rendimiento de lavado" incluye el rendimiento de lavado de la ropa, pero también, p. ej., el lavado a mano y el lavado de platos, p. ej., con lavaplatos automático. El rendimiento de lavado puede cuantificarse como se describe en la definición de "rendimiento de lavado mejorado" en el presente documento. El término "rendimiento a baja temperatura" se define en el presente documento como una variante de proteasa según la invención que tiene un rendimiento de lavado tal como se ha descrito anteriormente a 20 °C o menos.

[0041] El término "composición detergente" incluye, a menos que se indique lo contrario, agentes de lavado de uso polivalente o de limpieza pesada granulares o en forma de polvo, especialmente detergentes de limpieza; agentes de lavado de uso polivalente líquidos, en gel o en pasta, especialmente los tipos denominados líquidos de limpieza pesada (HDL); detergentes líquidos para tejidos finos; agentes para lavar platos a mano o agentes para lavado ligero de platos, especialmente los de tipo altamente espumoso; agentes para lavaplatos, incluyendo los diversos tipos de pastillas, granulados, líquidos y abrillantadores para uso doméstico e institucional; agentes líquidos de limpieza y desinfección, incluyendo jabón de manos antibacteriano, pastillas de limpieza, pastillas de jabón, enjuagues bucales, limpiadores de dentaduras postizas, limpiadores para automóviles o alfombras, limpiadores de baño; champús y enjuagues para el cabello; geles de ducha, baños de espuma; limpiadores de metales; así como productos auxiliares de limpieza tales como aditivos de lejía y del tipo quitamanchas o pretratamiento. Los términos "composición detergente" y "formulación detergente" se utilizan en referencia a mezclas que están destinadas a utilizarse en un medio de lavado para la limpieza de objetos sucios. En algunas realizaciones, el término se usa en referencia al lavado de tejidos y/o prendas (por ejemplo, "detergentes para ropa"). En realizaciones alternativas, el término se refiere a otros detergentes, tales como los que se utilizan para lavar platos, cubiertos, etc. (por ejemplo, "detergentes para lavavajillas"). No se pretende que la presente invención se limite a ninguna formulación o composición detergente particular. El término "composición detergente" no pretende limitarse a composiciones que contienen surfactantes. Se pretende que, además de las

variantes según la invención, el término englobe detergentes que pueden contener, por ejemplo, surfactantes, coadyuvantes, quelantes o agentes quelantes, sistemas o componentes blanqueadores, polímeros, suavizantes de tejidos, potenciadores de espuma, supresores de espuma, colorantes, perfumes, inhibidores del bronceado, blanqueantes ópticos, bactericidas, fungicidas, agentes de suspensión de suciedad, agentes anticorrosión, inhibidores o estabilizadores enzimáticos, activadores enzimáticos, transferasas, enzimas hidrolíticas, oxidoreductasas, colorantes azules y tintes fluorescentes, antioxidantes, y solubilizantes.

[0042] El término "tejido" abarca cualquier material textil. Por tanto, la intención es que el término englobe prendas, así como tejidos, hilos, fibras, materiales sin tejer, materiales naturales, materiales sintéticos y cualquier otro material textil.

[0043] El término "textil" se refiere a tejidos, así como a fibras cortadas y filamentos adecuados para conversión o uso como hilos, telas tejidas, tricotadas y sin tejer. El término abarca hilos hechos de fibras naturales, así como sintéticas (por ejemplo, fabricadas). El término "materiales textiles" es un término general para fibras, hilos intermedios, hilados, tejidos y productos hechos de tejidos (por ejemplo, prendas de vestir y otros artículos).

[0044] El término "composiciones detergentes no textiles" incluye composiciones detergentes para superficies no textiles, incluyendo, entre otras, composiciones para la limpieza de superficies duras, tales como composiciones detergentes para lavavajillas que incluyen composiciones para lavado manual de vajillas, composiciones detergentes orales, composiciones detergentes para dentaduras postizas y composiciones de aseo personal.

[0045] El término "cantidad eficaz de enzima" se refiere a la cantidad de enzima necesaria para lograr la actividad enzimática requerida en la aplicación específica, por ejemplo, en una composición detergente definida. Dichas cantidades efectivas las puede determinar fácilmente un experto en la técnica y se basan en muchos factores, tales como la enzima particular utilizada, la aplicación de limpieza, la composición específica de la composición detergente y si se requiere una composición líquida o seca (p. ej., granulado, barra) y similares. El término "cantidad eficaz" de una variante de proteasa se refiere a la cantidad de variante de proteasa descrita anteriormente que logra un nivel deseado de actividad enzimática, por ejemplo, en una composición detergente definida.

[0046] El término "dureza del agua" o "grado de dureza" o "dH" o "°dH" tal como se usa en el presente documento se refiere a grados alemanes de dureza. Un grado se define como 10 miligramos de óxido de calcio por litro de agua.

[0047] El término "condiciones de lavado relevantes" se usa en el presente documento para indicar las condiciones, particularmente la temperatura de lavado, el tiempo, los mecanismos de lavado, la concentración de detergente, el tipo de detergente y la dureza del agua, que se usan realmente en los hogares en un segmento del mercado de detergentes.

[0048] El término "materiales adjuntos" significa cualquier material líquido, sólido o gaseoso seleccionado para el tipo particular de composición detergente deseada y la forma del producto (p. ej., composición líquida, granulada, en polvo, en barra, en pasta, en aerosol, en pastilla, en gel o en espuma), cuyos materiales también son preferiblemente compatibles con la enzima variante de proteasa utilizada en la composición. En algunas realizaciones, las composiciones granulares están en forma "compacta", mientras que en otras realizaciones, las composiciones líquidas están en forma "concentrada".

[0049] El término "enzima quitamanchas" tal como se usa en el presente documento, describe una enzima que ayuda a eliminar una mancha o suciedad de una tela o una superficie dura. Las enzimas quitamanchas actúan sobre sustratos específicos, por ejemplo, proteasa sobre proteína, amilasa sobre almidón, lipasa y cutinasa sobre lípidos (grasas y aceites), pectinasa sobre pectina y hemicelulasas sobre hemicelulosa. Las manchas son a menudo deposiciones de mezclas complejas de diferentes componentes que dan como resultado una decoloración local del material por sí mismo o que dejan una superficie pegajosa en el objeto que puede atraer la suciedad disuelta en el líquido de lavado, lo que da como resultado la decoloración del área manchada. Cuando una enzima actúa sobre su sustrato específico presente en una mancha, la enzima degrada total o parcialmente su sustrato, lo que ayuda a eliminar la suciedad y los componentes de la mancha asociados con el sustrato durante el proceso de lavado. Por ejemplo, cuando una proteasa actúa sobre una mancha de sangre, degrada los componentes proteicos de la sangre.

[0050] El término "cantidad reducida" significa en este contexto que la cantidad del componente es menor que la cantidad que se usaría en un proceso de referencia, por lo demás, bajo las mismas condiciones.

[0051] El término sistema de "baja concentración de detergente" incluye detergentes en los que se encuentran presentes menos de, aproximadamente, 800 ppm de componentes detergentes en el agua de lavado. Los detergentes asiáticos, por ejemplo, los japoneses, se consideran típicamente sistemas de baja concentración de detergente.

[0052] El término sistema de "concentración media de detergente" incluye detergentes en los que se encuentran presentes aproximadamente entre 800 ppm y 2000 ppm de componentes detergentes en el agua de lavado. Los detergentes norteamericanos generalmente se consideran sistemas de concentración media de detergente.

[0053] El término sistema de "alta concentración de detergente" incluye detergentes en los que se encuentran presentes más de, aproximadamente, 2000 ppm de componentes detergentes en el agua de lavado. Los detergentes europeos generalmente se consideran sistemas de alta concentración de detergente.

Convenciones para la designación de variantes

[0054] Para los fines de la presente invención, el polipéptido maduro descrito en la SEQ ID N.º: 3 se usa para determinar el residuo correspondiente de aminoácidos en otra proteasa. La secuencia de aminoácidos de otra proteasa se alinea con el polipéptido maduro descrito en la SEQ ID N.º: 3 y, basándose en el alineamiento, el número de la posición del aminoácido correspondiente a cualquier residuo de aminoácido en el polipéptido maduro descrito en la SEQ ID N.º: 3 se determina usando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) tal como se implementó en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277), preferiblemente la versión 5.0.0 o posterior. Los parámetros utilizados son penalización de apertura de gap de 10, penalización por extensión gap de 0.5 y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (EMBOSS versión de BLOSUM62).

[0055] La identificación del residuo de aminoácidos correspondiente en otra proteasa se puede determinar mediante un alineamiento de múltiples secuencias polipeptídicas usando varios programas informáticos que incluyen, entre otros, MUSCLE (comparación de múltiples secuencias por log-esperanza; versión 3.5 o posterior; Edgar, 2004, Nucleic Acids Research 32: 1792-1797), MAFFT (versión 6.857 o posterior; Katoh y Kuma, 2002, Nucleic Acids Research 30: 3059-3066; Katoh et al., 2005, Nucleic Acids Research 33: 511-518; Katoh y Toh, 2007, Bioinformatics 23: 372-374; Katoh et al., 2009, Methods in Molecular Biology 537: 39-64; Katoh y Toh, 2010, Bioinformatics 26: 1899-1900) y EMBOSS EMMA empleando ClustalW (1.83 o posterior; Thompson et al., 1994, Nucleic Acids Research 22: 4673-4680), utilizando sus correspondientes parámetros predeterminados.

[0056] Cuando la otra enzima ha divergido del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 3, de modo que la comparación tradicional basada en secuencias no detecta su relación (Lindahl & Eloffsson, 2000, J. Mol. Biol. 295: 613-615), se pueden usar otros algoritmos de comparación de secuencias por pares. Se puede lograr una mayor sensibilidad en la búsqueda basada en secuencias utilizando programas de búsqueda que utilizan representaciones probabilísticas de familias de polipéptidos (perfiles) para buscar en bases de datos. Por ejemplo, el programa PSI-BLAST genera perfiles a través de un proceso de búsqueda en base de datos iterativo y es capaz de detectar homólogos remotos (Atschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402). Se puede lograr una sensibilidad aún mayor si la familia o la superfamilia del polipéptido tienen uno o varios representantes en las bases de datos de estructuras de proteínas. Programas como GenTHREADER (Jones, 1999, J. Mol. Biol. 287: 797-815; McGuffin y Jones, 2003, Bioinformatics 19: 874-881) utilizan información de una variedad de fuentes (PSI-BLAST, predicción de la estructura secundaria, perfiles de alineación estructural y potenciales de solvatación) como entrada a una red neuronal que predice el pliegue estructural para una secuencia de consulta. Del mismo modo, el método de Gough et al., 2000, J. Mol. Biol. 313: 903-919, se puede usar para alinear una secuencia de estructura desconocida con los modelos de superfamilia presentes en la base de datos SCOP. Estas alineaciones, a su vez, pueden usarse para generar modelos de homología para el polipéptido, y la precisión de dichos modelos puede evaluarse usando una variedad de herramientas desarrolladas para ese propósito.

[0057] Para proteínas de estructura conocida, se encuentran disponibles varias herramientas y recursos para recuperar y generar alineaciones estructurales. Por ejemplo, las superfamilias de proteínas SCOP se han alineado estructuralmente, y esas alineaciones son accesibles y descargables. Se pueden alinear dos o más estructuras de proteínas utilizando una variedad de algoritmos, como la matriz de alineación de distancia (Holm y Sander, 1998, Proteins 33: 88-96) o extensión combinatoria (Shindyalov y Bourne, 1998, Protein Engineering 11: 739-747), y la implementación de estos algoritmos se puede utilizar además para consultar bases de datos de estructuras con una estructura de interés con el fin de descubrir posibles homólogos estructurales (por ejemplo, Holm y Park, 2000, Bioinformatics 16: 566-567).

[0058] Al describir las variantes de la presente invención, la nomenclatura que se describe a continuación se adapta para facilitar la referencia. Se emplean las abreviaturas de aminoácidos de una o tres letras aceptadas por la IUPAC. Las posiciones de los aminoácidos se indican con #₁, #₂etc.

[0059] Sustituciones: Para una sustitución de aminoácidos, se utiliza la siguiente nomenclatura: aminoácido original, posición, aminoácido sustituido. En consecuencia, la sustitución de serina en la posición #₁ con triptófano se designa como "Ser#₁Trp" o "S#₁W". Las mutaciones múltiples se separan mediante signos de suma ("+") o comas (,), p. ej., "Ser#₁Trp + Ser#₂Pro" o S#₁W, S#₂P, que representan sustituciones en las posiciones #₁

y #₂ de serina (S) con triptófano (W) y prolina (P), respectivamente. Si se puede sustituir más de un aminoácido en una posición determinada, estos se enumeran entre paréntesis, como [X] o {X}. Así pues, si tanto la Trp como la Lys según la invención pueden sustituirse en lugar del aminoácido que ocupa la posición #₁, esto se indica como X#₁{W, K} o X#₂[W, K] donde X indica los residuos de aminoácidos de diferentes proteasas que según la invención pueden ser progenitoras, p. ej., tal como una proteasa con la SEQ ID N.º 3 o una proteasa que tiene al menos un 70 % de identidad con la misma. Así pues, en algunos casos, las variantes se representan como #₁{W, K} o X#₂P lo que indica que los aminoácidos que se van a sustituir varían según la progenitora. Puesto que la SEQ ID N.º 3 se usa para numerar, las sustituciones de acuerdo con la presente solicitud pueden indicarse con el aminoácido presente en la posición correspondiente en la SEQ ID N.º 3.

[0060] Delecciones: Para una delección de aminoácidos, se utiliza la siguiente nomenclatura: aminoácido original, posición, *. En consecuencia, la delección de serina en la posición #₁ se designa como "Ser#₁Trp" o "S#₁*". Las delecciones múltiples están separadas por signos de suma "+" o comas, por ejemplo, "Ser#₁* + Ser#₂*" o "S#₁*, S#₂*".

[0061] Inserciones: La inserción de un residuo de aminoácido adicional como, p. ej., una lisina después de G#₁ se puede indicar por: Gly#₁GlyLys o G#₁GK. Alternativamente, la inserción de un residuo de aminoácidos adicional como, p. ej., lisina después de G#₁ se puede indicar por: * #₁aL. Cuando se inserta más de un residuo de aminoácidos, como p. ej., Lys y Ala después de #₁, esto puede indicarse como: Gly#₁GlyLysAla o G#₁GKA. En tales casos, el(los) residuo(s) de aminoácidos insertado(s) también se puede(n) numerar mediante la adición de letras minúsculas al número de posición del residuo de aminoácidos que precede al(los) residuo(s) de aminoácidos insertado(s), en este ejemplo: *#₁aK *#₁bA.

[0062] Múltiples alteraciones: Las variantes que comprenden múltiples alteraciones están separadas por signos de suma "+" o por comas (,), por ejemplo, "Ser#₁Trp + Ser#₂Pro" o "S#₁W, S#₂P" que representa una sustitución de serina en las posiciones #₁ y #₂ con triptófano y prolina, respectivamente, como se ha descrito anteriormente.

[0063] Diferentes alteraciones: Cuando se pueden introducir diferentes alteraciones en una posición, las diferentes alteraciones se separan con una coma, por ejemplo, "Ser#₁Trp, Lys" o S #₁W, K representa una sustitución de serina en la posición #₁ con triptófano o lisina. Por lo tanto, "Ser#₁Trp, Lys + Ser#₂Asp" designa las siguientes variantes: "Ser#₁Trp + Ser#₂Pro", "Ser #₁Lys + Ser#₂Pro" o S#₁W, K + S#₂D.

Descripción detallada de la invención

[0064] La presente invención proporciona nuevas variantes de proteasa obtenidas a partir de Bacillus sp., en particular, Bacillus sp. TY-145. Las variantes de proteasa de la invención comprenden al menos un 90 % de identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID N.º 3 y comprenden la sustitución S27K en comparación con la proteasa de la SEQ ID N.º: 3, y sustituciones de aminoácidos adicionales en posiciones seleccionadas del grupo que consiste en las posiciones 2, 4, 5, 6, 16, 17, 18, 19, 24, 39, 41, 43, 47, 50, 57, 58, 59, 63, 64, 65, 67, 70, 85, 86, 87, 92, 97, 108, 109, 111, 112, 114, 116, 118, 126, 127, 129, 130, 131, 132, 142, 143, 144, 147, 148, 149, 155, 156, 174, 177, 184, 185, 186, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 206, 207, 212, 214, 215, 218, 219, 220, 222, 225, 234, 236, 241, 245, 246, 247, 248, 264, 267, 268, 269, 270, 272, 274, 278, 279, 286, 287, 288, 293, 297, 299 y 311.

[0065] Una realización de la invención se refiere a variantes de proteasa que tienen al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID N.º 3, que tienen actividad proteolítica y que comprenden la sustitución S27K y una o más alteraciones seleccionadas del grupo que consiste en V2H, S4K, S4H, T5K, Q6K, N16K, N16H, D17N, Q18K, Q18H, S19K, T24K, T24H, T24R, Y39R, S41K, L43H, G47K, E50Q, E50T, E50L, Q57K, S58K, N59K, D63N, G64H, S65K, T67K, Q70H, G85R, G85H, S86K, N87K, Y92R, Q97K, D108N, D108S, D108A, N109K, S111K, S111R, G112R, S114K, D116S, D116A, A118R, A118K, D126G, D126W, D126K, E127Q, E127K, E127L, E127S, S129K, R130K, T131K, T131H, G132H, G142K, G142R, S143K, S143H, S144K, D147N, D147S, D147*, D147Q, D147H, D147W, S148K, L149K, D155H, Y156R, Y156H, G159H, G174R, G174H, T177K, L184H, V185K, N186K, N186R, E194*, E194S, E194K, E194Q, N195H, N195K, V196H, Q197K, Q197H, Q197R, Q198K, N199K, G200H, D206N, D206H, F207H, N212K, A214R, A214K, T215K, D218N, D218H, D218R, Y219R, Y219H, I220K, I220H, Q222K, D225N, A233R, S234K, E236C, T241K, N245K, T246K, I247K, S248K, I264R, A267H, N268K, N268H, T269K, T269H, S270K, S272K, S274K, T278K, T278H, E279Q, E279H, V286H, V286K, Y287R, Y287H, D288N, D288K, I293R, I293K, T297K, D299R y K311R, donde cada posición corresponde a la posición del polipéptido de la SEQ ID N.º: 3. En una realización preferida, la variante de proteasa tiene al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 % de identidad, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 %, p. ej. al menos un 99.1 %, al menos un 99.2 %, al menos un 99.3 %, al menos un 99.4 %, al menos un 99.5 %, al menos un 99.6 %, pero menos del 100 %, de identidad de secuencia con la SEQ ID N.º: 3.

[0066] El punto isoeléctrico, pI o pH (I), es el valor de pH donde la molécula de enzima es neutra, es decir, la suma de cargas electrostáticas (carga electrostática neta, = NEC, o carga neta) de la molécula es igual a cero.

Debe tenerse en cuenta la naturaleza positiva o negativa de las cargas electrostáticas individuales. El punto isoeléctrico puede calcularse usando consideraciones de equilibrio utilizando valores de pKa para los diversos residuos cargados en la enzima en cuestión y luego por iteración encontrar el valor de pH donde la NEC de la molécula de enzima es igual a cero.

5

[0067] La carga neta de la molécula se ve afectada por el pH de su entorno inmediato y puede aumentar o disminuir debido a la ganancia o pérdida, respectivamente, de protones (H⁺).

10

[0068] Los valores de pK_a de los residuos cargados dependen de su entorno y, en consecuencia, están sujetos a variaciones. Sin embargo, los valores aproximados específicos de pK_a pueden asignarse a los residuos cargados independientemente del valor real. El pI de una molécula de enzima también se puede determinar experimentalmente mediante enfoque isoeléctrico o valorando una solución que contiene la enzima. Varios valores de pK_a de los residuos cargados pueden determinarse experimentalmente mediante valoración.

15

[0069] Anteriormente se ha mostrado en WO91/000345 (Novozymes A/S) que los cambios en el pI de una proteasa al hacer sustituciones específicas para producir variantes de proteasa que tienen un pI total o una carga electrostática alterados influye en el rendimiento del lavado a varios valores de pH.

20

[0070] También se describen en el presente documento variantes de proteasa, en las que la carga electrostática neta ha cambiado en comparación con la proteasa progenitora con el mismo pH, y en las que las proteasas tienen, en relación con dicha proteasa progenitora, residuo(s) de aminoácidos con más carga positiva y/o menos residuo(s) de aminoácidos cargados negativamente, donde las variantes de proteasa comprenden una o más de las alteraciones seleccionadas de la lista que consta de: V2H, S4K, S4H, T5K, Q6K, N16K, N16H, D17N, Q18K, Q18H, S19K, T24K, T24H, T24R, S27K, Y39R, S41K, L43H, G47K, E50Q, E50T, E50L, Q57K, S58K, N59K, D63N, G64H, S65K, T67K, Q70H, G85R, G85H, S86K, N87K, Y92R, Q97K, D108N, D108S, D108A, N109K, S111K, S111R, G112R, S114K, D116S, D116A, A118R, A118K, D126G, D126W, D126K, E127Q, E127K, E127L, E127S, S129K, R130K, T131K, T131H, G132H, G142K, G142R, S143K, S143H, S144K, D147N, D147S, D147*, D147Q, D147H, D147W, S148K, L149K, D155H, Y156R, Y156H, G159H, G174R, G174H, T177K, L184H, V185K, N186K, N186R, E194*, E194S, E194K, E194Q, N195H, N195K, V196H, Q197K, Q197H, Q197R, Q198K, N199K, G200H, D206N, D206H, F207H, N212K, A214R, A214K, T215K, D218N, D218H, D218R, Y219R, Y219H, I220K, I220H, Q222K, D225N, A233R, S234K, E236C, T241K, N245K, T246K, I247K, S248K, I264R, A267H, N268K, N268H, T269K, T269H, S270K, S272K, S274K, T278K, T278H, E279Q, E279H, V286H, V286K, Y287R, Y287H, D288N, D288K, I293R, I293K, T297K, D299R y K311R en donde las posiciones corresponden a las posiciones de la SEQ ID N.º 3.

35

[0071] Para aquellos de los aminoácidos anteriores que tienen un aminoácido cargado negativamente al pH relevante, reemplazar este aminoácido con cualquier aminoácido neutro o cargado positivamente al mismo pH dará como resultado un aumento de carga en ese residuo. Según una realización, la suma de las cargas de aminoácidos de las variantes de proteasa de la invención es mayor que la suma de las cargas de aminoácidos de la proteasa progenitora. Por tanto, las variantes de proteasa de la invención tienen una carga neta mayor que la de la proteasa progenitora.

40

45

[0072] Cambiar la carga neta de la SEQ ID N.º 3, la SEQ ID N.º 4 o la SEQ ID N.º 5 para aumentarla en el detergente modelo B (pH 7.8) incrementa el rendimiento de lavado de la molécula según se mide en el ejemplo 2 en Materiales y métodos del presente documento. El efecto puede demostrarse comparándolo con un conjunto de variantes diseñadas para volverse más negativas en las mismas condiciones.

50

[0073] En una realización, las variantes de proteasa de la invención tienen una carga neta aumentada en comparación con la proteasa progenitora. Un método para aumentar la carga neta de una proteasa que tiene la SEQ ID N.º 3 comprende

55

a) introducir en una proteasa progenitora que tiene la SEQ ID N.º 3, o que tiene al menos un 60 % de identidad con la misma, una sustitución de un aminoácido cargado negativamente por un aminoácido cargado positivamente, neutro o sin aminoácido, es decir, delección, donde las sustituciones/delecciones se seleccionan del grupo que consta de las siguientes: D17N, E50Q, E50T, E50L, D63N, D108S, D108A, D108N, D116S, D116A, D126G, D126W, D126K, E127Q, E127K, E127L, D147N, D147S, D147Q, D147H, D147W, D147*, D155H, E194*, E194S, E194K, E194Q, D206N, D206H, D218N, D218H, D218R, D225N, E236C, E279Q, E279H, D288N y D288K, donde la variante tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos en un 60 %, al menos en un 70 %, al menos en un 80 %, al menos en un 85 %, al menos en un 90 % o al menos en un 95 % a la SEQ ID N.º: 3; y

60

b) recuperar la variante. Como se ha descrito anteriormente, las variantes de proteasa de la invención que tienen una carga neta aumentada en comparación con la proteasa progenitora tienen un mayor rendimiento de lavado en comparación con la proteasa progenitora. Por tanto, en el presente documento se describen variantes de proteasa que tienen al menos un 60 % de identidad con la SEQ ID N.º 3, que tienen actividad proteolítica y que comprenden una o más sustituciones/delecciones seleccionadas del grupo que consiste en: D17N,

65

E50Q, E50T, E50L, D63N, D108S, D108A, D108N, D116S, D116A, D126G, D126W, D126K, E127Q, E127K, E127L, D147N, D147S, D147Q, D147H, D147W, D147*, D155H, E194*, E194S, E194K, E194Q, D206N, D206H, D218N, D218H, D218R, D225N, E236C, E279Q, E279H, D288N y D288K, donde cada posición corresponde a la posición del polipéptido de la SEQ ID N.º 3 y donde las variantes de proteasa tienen un rendimiento de lavado mejorado en comparación con la progenitora o en comparación con la SEQ ID N.º 3. El rendimiento de lavado puede medirse como se describe en el ejemplo 2 del presente documento. Un método para aumentar la carga neta de una proteasa que tiene la SEQ ID N.º 3 comprende

c) introducir en una proteasa progenitora que tiene la SEQ ID N.º 3, o que tiene al menos un 60 % de identidad con la misma, una sustitución de un aminoácido que tiene carga neutra o negativa por un aminoácido que está cargado positivamente, donde las sustituciones se seleccionan del grupo que consiste de las siguientes sustituciones: V2H, S4K, S4H, T5K, Q6K, N16K, N16H, Q18K, Q18H, S19K, T24K, T24H, T24R, S27K, Y39R, S41K, L43H, G47K, Q57K, S58K, N59K, G64H, S65K, T67K, Q70H, G85R, G85H, S86K, N87K, Y92R, Q97K, N109K, S111K, S111R, G112R, S114K, A118R, A118K, S129K, R130K, T131K, T131H, G132H, G142K, G142R, S143K, S143H, S144K, S148K, L149K, Y156R, Y156H, G159H, G174R, G174H, T177K, L184H, V185K, N186K, N186R, N195H, N195K, N196H, Q197K, Q197H, Q197R, Q198K, N199K, G200H, F207H, N212K, A214R, A214K, T215K, Y219R, Y219H, I220K, I220H, Q222K, A233R, S234K, T241K, N245K, T246K, I247K, S248K, I264R, A267H, N268K, N268H, T269K, T269H, S270K, S272K, S274K, T278K, T278H, V286H, V286K, Y287R, Y287H, I293R, I293K, T297K, D299R y K311R, donde la variante tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos en un 60 %, al menos en un 70 %, al menos en un 80 %, al menos en un 85 %, al menos en un 90 % o al menos en un 95 % a la SEQ ID N.º 3; y

d) recuperar la variante.

[0074] Como se ha descrito anteriormente, las variantes de proteasa de la invención que tienen una carga neta aumentada en comparación con la proteasa progenitora tienen un mayor rendimiento de lavado. También se describen en el presente documento variantes de proteasa que tienen al menos un 60 % de identidad con la SEQ ID N.º 3, que tienen actividad proteolítica y que comprenden una o más alteraciones seleccionadas del grupo que consiste en: V2H, S4K, S4H, T5K, Q6K, N16K, N16H, D17N, Q18K, Q18H, S19K, T24K, T24H, T24R, S27K, Y39R, S41K, L43H, G47K, E50Q, E50T, E50L, Q57K, S58K, N59K, D63N, G64H, S65K, T67K, Q70H, G85R, G85H, S86K, N87K, Y92R, Q97K, D108N, D108S, D108A, N109K, S111K, S111R, G112R, S114K, D116S, D116A, A118R, A118K, D126G, D126W, D126K, E127Q, E127K, E127L, E127S, S129K, R130K, T131K, T131H, G132H, G142K, G142R, S143K, S143H, S144K, D147N, D147S, D147*, D147Q, D147H, D147W, S148K, L149K, D155H, Y156R, Y156H, G159H, G174R, G174H, T177K, L184H, V185K, N186K, N186R, E194*, E194S, E194K, E194Q, N195H, N195K, V196H, Q197K, Q197H, Q197R, Q198K, N199K, G200H, D206N, D206H, F207H, N212K, A214R, A214K, T215K, D218N, D218H, D218R, Y219R, Y219H, I220K, I220H, Q222K, D225N, A233R, S234K, E236C, T241K, N245K, T246K, I247K, S248K, I264R, A267H, N268K, N268H, T269K, T269H, S270K, S272K, S274K, T278K, T278H, E279Q, E279H, V286H, V286K, Y287R, Y287H, D288N, D288K, I293R, I293K, T297K, D299R y K311R, donde cada posición corresponde a la posición del polipéptido de la SEQ ID N.º 3 y donde las variantes de proteasa tienen un rendimiento de lavado mejorado en comparación con la progenitora o en comparación con la SEQ ID N.º 3. El rendimiento de lavado puede medirse como se describe en el ejemplo 2 del presente documento.

[0075] Una variante puede comprender una alteración en tres posiciones correspondientes a cualquiera de las posiciones 2, 4, 5, 6, 16, 17, 18, 19, 24, 27, 39, 41, 43, 47, 50, 57, 58, 59, 63, 64, 65, 67, 70, 85, 86, 87, 92, 97, 108, 109, 111, 112, 114, 116, 118, 126, 127, 129, 130, 131, 132, 142, 143, 144, 147, 148, 149, 155, 156, 174, 177, 184, 185, 186, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 206, 207, 212, 214, 215, 218, 219, 220, 222, 225, 234, 236, 241, 245, 246, 247, 248, 264, 267, 268, 269, 270, 272, 274, 278, 279, 286, 287, 288, 293, 297 o 311.

[0076] La presente invención también se refiere a composiciones limpiadoras tales como composiciones detergentes que comprenden una variante de proteasa de la invención. En una realización, la composición limpiadora es un detergente de lavandería líquido o en polvo, adecuado para, p. ej., lavado a alta temperatura y/o alto pH, p. ej., a 40 °C o más y/o a pH 8 o superior. En una realización, la composición de limpieza es un detergente líquido o en polvo, adecuado para, p. ej., lavado a baja temperatura y/o bajo pH, p. ej., a 20 °C o menos y/o pH 6 inferior. El detergente también puede formularse como un detergente de dosis unitaria y/o detergente compacto opcionalmente con un mínimo de agua o sin agua. El detergente también puede ser un detergente para lavavajillas que preferiblemente no contiene fosfatos. La composición limpiadora puede comprender además al menos una enzima adicional como, p. ej., enzimas activas en carbohidratos tales como carbohidrasa, pectinasa, mananasa, amilasa, celulasa, arabinasa, galactanasa, xilanasas o proteasas como metaloproteasas, lipasa, cutinasa, oxidasa, p. ej., una lacasa y/o una peroxidasa.

[0077] En general, las posiciones dentro de una proteasa útiles para hacer variantes son aquellas posiciones en las que al menos una sustitución conduce a una variante que exhibe una característica mejorada en comparación con la proteasa inalterada. Las variantes pueden comprender además una o más alteraciones adicionales en una o más (por ejemplo, varias) otras posiciones. En una realización preferida particular, las variantes de proteasa de la invención comprenden además una sustitución en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 171, 173, 175, 179 o 180 de la SEQ ID N.º 3, en donde la variante tiene una identidad de secuencia con la SEQ

ID . N.º 3 de al menos un 60 % y tiene actividad proteasa. En una realización aún más preferida, el aminoácido en la posición correspondiente a la posición 171 de la SEQ ID N.º 3 se selecciona del grupo que consta de Trp, Lys, Glu, Asn, y/o el aminoácido en la posición correspondiente a la posición 173 de la SEQ ID N.º 3 es Pro, y/o el aminoácido en la posición correspondiente a la posición 175 de la SEQ ID N.º 3 es Ala, Val, Pro, y/o el aminoácido en la posición correspondiente a la posición 179 de la SEQ ID N.º 3 se selecciona del grupo que consta de Cys, Val, Gin, Ser, Thr, Glu, His, Lys, Met, Asn, Tyr y Ala, y/o el aminoácido en la posición correspondiente a la posición 180 de la SEQ ID N.º 3 es Tyr. En otra realización preferida, las variantes de proteasa de la invención comprenden además una sustitución en dos o más posiciones correspondientes a las posiciones 171, 173, 175, 179 o 180 de la SEQ ID N.º 3, donde la variante tiene una identidad de secuencia con la SEQ ID . : 3 de al menos un 60 % y de menos del 100 %, y la variante tiene actividad proteasa en dos posiciones correspondientes a cualquiera de las posiciones 171, 173, 175, 179 y 180. En una realización preferida de la invención, las variantes de la invención comprenden las mutaciones S173P + S175P tal como se muestra en la SEQ ID N.º 4. En otra realización preferida, las variantes de proteasa de la invención comprenden las mutaciones S173P + S175P + F180Y tal como se muestra en la SEQ ID N.º 5. Las variantes de proteasa de la invención pueden comprender además una o varias de las sustituciones: E50V, E50H, E127R, N199R o V286R.

[0078] Las variantes de proteasa de la invención pueden comprender las siguientes alteraciones en comparación con la SEQ ID N.º 3:

20 V2H,S4K,S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
S4K,S173P,S175P;
S4K,S173P,S175P, F180Y,Q198E,T297P;
S4K,S27K,S173P,S175P, F180Y,Q198E,T297P;
25 S4K,S27K,I137E,S173P,S175P,F180Y,T297P;
A1*,V2*,P3*,S4K,S27K,S173P,S175P, F180Y,Q198E,T297P;
S4K,S27K,N87K,E127Q,G132H,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
S4H,S173P,S175P;
T5K,S173P,S175P;
30 Q6K,S173P,S175P;
N16K,S173P,S175P;
N16K,D17N,S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
N16H,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
N16H,S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
35 N16H,S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
N16H,S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
N16H,S27K,I137E,S173P,S175P,F180Y,T297P;
D17N,S173P,S175P;
D17N,I137E,S173P,S175P,F180Y,T297P;
40 D17N,S173P,S175P,Q198E;
D17N,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
D17N,S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
D17N,S27K,I137E,S173P,S175P,F180Y,T297P;
Q18K,S173P,S175P;
45 Q18K,S27K,E127Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
S19K,S173P,S175P;
T24K,S173P,S175P;
T24H,S173P,S175P;
S27K,S173P,S175P;
50 S27K,I137E,S173P,S175P,F180Y,T297P;
S27K,S173P,S175P,Q198E;
S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
S27K,S144R,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
S27K,D147N,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
55 S27K,E127Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
S27K,E50Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
S27K,N87K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
S4K,S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,S270K,T297P;
60 S27K,Q97K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
D17N,S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
N16H,S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
N16H,S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
N16H,S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
65 S27K,I137E,S144R,S173P,S175P,F180Y,T297P;
S27K,E127Q,I137E,S173P,S175P,F180Y,T297P;

ES 2 813 727 T3

S27K,I137E,S173P,G174R,S175P,F180Y,T297P;
 S27K,Q97K,1137E,S173P,S175P,F180Y,T297P;
 D17N,S27K,1137E,S173P,S175P,F180Y,T297P;
 S27K,D126G,S173P,S175P,F180Y,T297P;
 5 Y39R,S173P,S175P;
 S27K,Y39R,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
 S27K,Y39R,1137E,S173P,S175P,F180Y,T297P;
 S27K,Y39R,N87K,I137E,S173P,S175P,F180Y,T297P;
 S27K,Y39R,I137E,S144R,S173P,S175P,F180Y,T297P;
 10 S27K,Y39R,I121V,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
 S41K,S173P,S175P;
 S27K,S41K,E127Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
 L43H,S173P,S175P;
 G47K,R130K,G132R,S173P,S175P;
 15 E50Q,S173P,S175P;
 E50Q,S173P,S175P,F180Y;
 E50Q,S173P,S175P,Q198E;
 E50Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
 S27K,E50Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
 20 E50T,S173P,S175P,F180Y;
 E50L,S173P,S175P,F180Y;
 G28N,Q57K,S86K,N87R,Q89R,S173P,S175P;
 S58K,S173P,S175P;
 S58K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
 25 N59K,S173P,S175P;
 D63N,S173P,S175P;
 D63E,R69D,S173P,S175P;
 G64H,S173P,S175P;
 S65K,S173P,S175P;
 30 S65K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
 S27K,S65K,S173P,S175P,F180Y,T297P;
 S27K,S65K,S173P,S175P,F180Y,T297P;
 T67K,S173P,S175P;
 Q70H,S173P,S175P,F180Y;
 35 G85R,S173P,S175P,F180Y;
 G85H,S173P,S175P,F180Y;
 S86K,S173P,S175P;
 N87K,S173P,S175P;
 N87K,I137E,S173P,S175P,F180Y,T297P;
 40 N87K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
 S27K,N87K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
 S27K,N87K,I137E,S173P,S175P,F180Y,T297P;
 S27K,N87K,N109S,S111R,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
 S27K,N59L,T67V,N87K,G107N,I121V,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
 45 S27K,N59L,T67V,N87K,G107N,I121V,E127Q,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
 S27K,Q70N,N87K,I121V,E127Q,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,N199R,T297P;
 Y92R,S173P,S175P,F180Y;
 Q97K,S173P,S175P;
 Q97K,I137E,S173P,S175P,F180Y,T297P;
 50 Q97K,S173P,S175P,Q198E;
 Q97K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
 S27K,Q97K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
 S27K,Q97K,1137E,S173P,S175P,F180Y,T297P;
 S27K,N59L,T67V,Q97K,G107N,I121V,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
 55 D108N,S173P,S175P;
 D108S,S173P,S175P;
 D108A,S173P,S175P;
 S27K,N109K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
 S111K,S173P,S175P;
 60 S27K,N109S,S111R,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
 S114K,S173P,S175P,F180Y;
 D116S,M139L,S173P,S175P;
 A118R,S173P,S175P,F180Y;
 S27K,S111R,A118R,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
 65 A118K,S173P,S175P,F180Y;
 D126G,S173P,S175P,F180Y;

ES 2 813 727 T3

S27K,D126G,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
 S27K,D126G,E127Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
 D126W,S173P,S175P,F180Y;
 D126K,S173P,S175P,F180Y;
 5 Y113T,E127Q,S173P,G174K,S175P,F180Y;
 *109aS,E127Q,S173P,S175P,F180Y,T297P;
 E127Q,S173P,S175P,Q198E;
 E127Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
 S27K,E127Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
 10 S27K,D126G,E127Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
 S27K,E127Q,I137Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
 S27K,E127Q,S144R,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
 S27K,E127Q,V162S,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
 S27K,E127Q,V162E,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
 15 S27K,E127Q,V162Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
 S27K,E127Q,V162G,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
 S27K,E127Q,V162F,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
 S27K,E127Q,V162T,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
 S27K,E127Q,V162Y,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
 20 S27K,N109S,S111R,E127Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
 S27K,N109S,S111R,E127Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
 S27K,N59L,T67V,N87K,G107N,I121V,E127Q,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
 S27K,N87K,I121V,E127Q,S171N,S173P,S175P,F180Y,T297P;
 E127K,S173P,S175P,F180Y;
 25 E127L,S173P,S175P,F180Y;
 S129K,S173P,S175P;
 S41K,L43K,G47K,R130K,G132R,S173P,S175P;
 S41R,L43R,G47K,R130K,G132R,S173P,S175P;
 T131K,S173P,S175P;
 30 G132H,S173P,S175P;
 G132H,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
 S143K,S173P,S175P;
 S144K,S173P,S175P;
 D147N,S173P,S175P;
 35 D147N,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
 S27K,D147N,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
 S27K,N109S,S111R,D147N,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
 D147S,S148A,L149T,I150L,S173P,S175P;
 A145S,K146P,D147S,S173P,S175P;
 40 A145S,K146P,D147S,S148A,S173P,S175P;
 S144P,A145S,K146P,D147S,S148A,L149T,I150L,S173P,S175P;
 D147S,L149T,S173P,S175P;
 K146P,D147S,S148A,L149T,I150L,S173P,S175P;
 A145S,K146P,D147S,S148A,L149T,S173P,S175P;
 45 S27K,K146E,D147S,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,Q198E,N199K,E223K,T2 97P;
 K146*,D147*,S173P,S175P;
 D147Q,S173P,S175P;
 D147Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
 D147H,S173P,S175P;
 50 S148K,S173P,S175P;
 L149K,S173P,S175P;
 D155H,S173P,S175P;
 Y156R,S173P,S175P;
 Y156R,S173P,S175P;
 55 Y156R,S173P,S175P;
 Y156R,S173P,S175P,Q198E;
 Y156R,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
 S4K,D17N,S27K,N59L,N87K,Y156R,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
 S4K,D17N,S27K,N59L,N87K,Y156R,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
 60 Y156H,S173P,S175P;
 G159H,S173P,S175P;
 S27K,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
 S27K,I137E,S173P,G174R,S175P,F180Y,T297P;
 S27K,N59L,T67V,N87K,S114V,I121V,I150L,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,T297P;
 65 S173P,S175P,T177K;
 S173P,S175P,F180Y,L184H;

ES 2 813 727 T3

I137E,S173P,S175P,F180Y,V185K,T297P;
 I137E,S173P,S175P,F180Y,V185K,N186P,T297P;
 I137E,S173P,S175P,F180Y,V185K,N186D,T297P;
 I137E,S173P,S175P,F180Y,N186K,T297P;
 5 S173P,S175P,N186K;
 I137E,S173P,S175P,F180Y,N186R,T297P;
 S173P,S175P,E194*;
 S173P,S175P,E194*,Q198E;
 S173P,S175P,F180Y,E194*,Q198E,T297P;
 10 S173P,S175P,F180Y,E194S;
 S27K,E127Q,S173P,S175P,F180Y,E194S,Q198E,T297P;
 S173P,S175P,F180Y,E194K;
 S27K,E127Q,S173P,S175P,F180Y,E194K,Q198E,T297P;
 S27K,E127Q,S173P,S175P,F180Y,E194Q,Q198E,T297P;
 15 S173P,S175P,N195H;
 S27K,E127Q,S173P,S175P,F180Y,N195H,V196N,Q197*,Q198*,N199*,G200*,T201*,T297 P;
 S173P,S175P,N195K;
 S173P,S175P,V196H;
 S173P,S175P,Q197K;
 20 S27K,S173P,S175P, F180Y,Q197K,T297P;
 S27K,S173P,S175P,F180Y,E194R,Q197K,Q198E,T297P;
 S27K,S173P,S175P,F180Y,Q197K,Q198E,T297P;
 S27K,E127Q,S173P,S175P,F180Y,Q197K,Q198E,T297P;
 25 S27K,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q197K,Q198E,T297P;
 S27K,N109S,S111R,S173P,S175P,F180Y,Q197K,Q198E,T297P;
 S27K,S173P,G174K,S175P,F180Y,L184F,Q197K,Q198E,T297P;
 I121V,S173P,S175P,F180Y,Q197K,Q198E,T297P;
 S173P,S175P,Q197H;
 S173P,S175P,F180Y,Q197R;
 30 S27K,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q197R,Q198E,T297P;
 S173P,S175P,Q198K;
 S173P,S175P,Q198K;
 S173P,S175P,N199K;
 S173P,S175P,N199K;
 35 S27K,S173P,S175P,F180Y,E194*,Q197K,Q198E,N199K,T297P;
 S27K,E127Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,N199K,T297P;
 S27K,E127Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,N199K,T297P;
 S27K,I121V,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,N199K,T297P;
 S27K,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,N199K,T297P;
 40 S27K,N109S,S111R,S173P,S175P,F180Y,Q198E,N199K,T297P;
 S27K,S173P,S175P,F180Y,Q197K,Q198E,N199K,T297P;
 S27K,Q70N,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,N199K,T297P;
 S27K,I150S,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,N199K,T297P;
 S27K,S114V,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,N199K,T297P;
 45 S27K,Q70N,G107N,I121V,E127Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,N199K,T297P;
 S27K,Q70A,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,N199K,T297P;
 S27K,Q70V,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,N199K,T297P;
 S27K,S173P,G174K,S175P,F180Y,L184F,Q198E,N199K,T297P;
 S27K,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,N199K,T297P;
 50 S27K,S171R,S173P,G174E,S175P,F180Y,Q198E,N199K,T297P;
 S27K,S171K,S173P,G174E,S175P,F180Y,Q198E,N199K,T297P;
 S27K,S171E,S173P,G174K,S175P,F180Y,Q198E,N199K,T297P;
 S173P,S175P,G200H;
 S173P,S175P,D206N;
 55 S173P,S175P,N212K;
 S173P,S175P,F180Y,A214R;
 S173P,S175P,F180Y,A214K;
 S173P,S175P,T215K;
 S173P,S175P,D218N;
 60 S173P,S175P,D218H;
 S173P,S175P,F180Y,D218R;
 S173P,S175P,Y219R;
 S173P,S175P,Y219H;
 S173P,S175P,I220K;
 65 S173P,S175P,Q222K;
 S27K,Q97K,E127Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,D225N,I247M,T297P;

ES 2 813 727 T3

S173P,S175P,F180Y,A233R;
 S173P,S175P,F180Y,A233R;
 S173P,S175P,F180Y,A233R;
 S173P,S175P,F180Y,A233R;
 5 S173P,S175P,F180Y,S234K;
 T5C,S27K,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,E236C,T297P;
 Q6C,S27K,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,E236C,T297P;
 S4C,S27K,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,E236C,T297P;
 10 A1*,T5C,S27K,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,E236C,T297P;
 A1*,Q6C,S27K,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,E236C,T297P;
 A1*,S4C,S27K,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,E236C,T297P;
 A1*,P3*,T5C,S27K,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,E236C,T297P;
 S173P,S175P,T241K;
 S173P,S175P,N245K;
 15 S173P,S175P,T246K;
 S173P,S175P,S248K;
 S173P,S175P,F180Y,I264R;
 S173P,S175P,F180Y,I264R;
 S173P,S175P,F180Y,I264R;
 20 S173P,S175P,F180Y,I264R;
 S173P,S175P,A267H;
 S173P,S175P,N268K;
 S27K,E127Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,N268K,T297P;
 S173P,S175P,T269K;
 25 S173P,S175P,S270K;
 S173P,S175P,S270K;
 S173P,S175P,F180Y,Q198E,S270K,T297P;
 S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,S270K,T297P;
 30 S27K,I137E,S173P,S175P,F180Y,S270K,T297P;
 S27K,N87K,I121V,S171N,S173P,S175P,F180Y,S270K,T297P;
 S27K,S173P,S175P,F180Y,S270K,T297P;
 S27K,S173P,S175P,F180Y,S270K,T297P;
 S173P,S175P,S272K;
 S173P,S175P,S274K;
 35 S173P,S175P,T278K;
 S173P,S175P,E279Q;
 S173P,S175P,E279H;
 S173P,S175P,V286H;
 I137E,S173P,S175P,F180Y,V286K,T297P;
 40 I137E,S173P,S175P,F180Y,V286K,T297P;
 S173P,S175P,Y287R;
 S173P,S175P,Y287H;
 I137E,S173P,S175P,F180Y,D288N,T297P;
 S173P,S175P,F180Y,Q198E,D288N,T297P;
 45 I137E,S173P,S175P,F180Y,D288K,T297P;
 S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,I293R,T297P;
 S27K,I137E,S173P,S175P,F180Y,I293R,T297P;
 S173P,S175P,I293K;
 S173P,S175P,T297K;
 50 G28D,S86K,N87R,Q89R,S173P,S175P,K311R;
 G28N,S86K,N87R,Q89R,S173P,S175P,K311R;
 E127S,S173P,S175P,F180Y;
 S173P,S175P,F180Y;
 S173P,S175P,F180Y,D299R;
 55 S27K,D147N,I150S,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q197K,Q198E,S274V,T297P;
 S27K,D147N,I150S,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,S274V,T297P;
 S27K,D147N,I150S,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,N199K,R224G,T297P;
 S27K,D147S,I150S,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,S274V,T297P;
 S27K,G142E,D147N,I150S,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,N199K,T297P;
 60 S27K,G142E,I150S,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,N199K,T297P;
 S27K,I150L,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,N199K,T297P;
 S27K,I150L,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
 S27K,I150S,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,N199K,S274V,T297P;
 S27K,I150S,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,S274V,T297P;
 65 S27K,I150S,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,N199K,R224G,T297P;
 S27K,N109K,S111D,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P;

S27K,N109K,S111D,S171E,S173P,G174K,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,N199K, T297P;
 S27K,N109K,S111E,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
 S27K,N109K,S111E,S171E,S173P,G174K,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,N199K, T297P;
 S27K,N109K,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
 5 S27K,N109S,*109aE,S111R,S171E,S173P,G174K,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E, N199K,T297P;
 S27K,N109S,*109aE,S171E,S173P,G174K,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,N199K, T297P;
 S27K,N109S,I121V,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,N199K, S274V, T297P;
 S27K,N109S,I121V,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,S274V, T297P;
 10 S27K,N87K,G132H,V162T,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E, S274V,T297P;
 S27K,N87K,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
 S27K,N87K,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,N199K,S274V, T297P;
 S27K,N87K,S173P,G174K,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,V286R,T297P;
 S27K,N87K,V162T,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,S274V, T297P;
 15 S27K,Q70A,D147N,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,N199K, S274V, T297P;
 S27K,Q70A,N109K,S111E,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E, N199K,
 S274V, T297P;
 S27K,Q70A,S111E,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,N199K, S274V, T297P;
 20 S27K,Q70A,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,N199K,S274V, T297P;
 S27K,Q70A,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,S274V,T297P;
 S27K,S111D,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
 S27K,S111D,S171E,S173P,G174K,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,N199K,T297P;
 S27K,S111E,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
 25 S27K,S111E,S171E,S173P,G174K,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,N199K,T297P;
 S27K,S111R,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,S270V,S274V, L280V, T297P;
 S27K,S114V,I121V,S129K,S173P,G174K,S175P,F180Y,L184F,Q198E,N199K,T297P;
 S27K,S114V,I121V,S173P,G174K,S175P,F180Y,L184F,Q198E,N199K,T297P;
 S27K,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,S270V,S274V,L280V, T297P;
 30 S27K,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,T297P;
 S27K,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q197K,Q198E,T297P;
 S27K,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
 S27K,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,N199K,S274V,T297P;
 S27K,S173P,G174K,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,V286R,T297P;
 S27K,V162T,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,S274V,T297P;
 35 S4K,S27K,E127Q,G132H,Y156R,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
 S4K,S27K,N87K,E127Q,G132H,Y156R,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P y T24R,S173P,S175P,F180Y

[0079] Las variantes pueden comprender además una o más alteraciones adicionales en una o más (por
 40 ejemplo, varias) otras posiciones. Los cambios en aminoácidos pueden ser de naturaleza menor, es decir,
 sustituciones o inserciones conservadoras de aminoácidos que no afectan significativamente al plegado y/o la
 actividad de la proteína; pequeñas deleciones, típicamente de 1 a 5 aminoácidos; pequeñas extensiones del
 amino- o el carboxilo-terminal, tales como un residuo de metionina en el amino-terminal; un péptido enlazante
 pequeño de hasta 20-25 residuos, ubicado en el amino- o en el carboxilo-terminal; o una pequeña extensión que
 45 facilita la purificación cambiando la carga neta u otra función, por ejemplo, un tracto de polihistidina, un epitopo
 antigénico o un dominio de unión.

[0080] Los ejemplos de sustituciones conservadoras están dentro de los grupos de aminoácidos básicos
 (arginina, lisina e histidina), aminoácidos ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), aminoácidos polares
 50 (glutamina y asparagina), aminoácidos hidrófobos (leucina, isoleucina y valina), aminoácidos aromáticos
 (fenilalanina, triptófano y tirosina) y aminoácidos pequeños (glicina, alanina, serina, treonina y metionina). Las
 sustituciones de aminoácidos que generalmente no alteran la actividad específica se conocen en la técnica y son
 descritos, por ejemplo, por H. Neurath y R.L. Hill, 1979, In, The Proteins, Academic Press, Nueva York. Las
 sustituciones habituales son Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Asn/Gln, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val,
 55 Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Glu/Gln, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu y Asp/Gly.

[0081] Alternativamente, los cambios de aminoácidos son de naturaleza tal que se alteran las propiedades físico-
 químicas de los polipéptidos. Por ejemplo, los cambios de aminoácidos pueden mejorar la estabilidad térmica del
 polipéptido, alterar la especificidad del sustrato, cambiar el pH óptimo y similares.

[0082] Los aminoácidos esenciales en un polipéptido pueden identificarse de acuerdo con procedimientos
 conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida o mutagénesis por barrido de alanina (Cunningham y
 Wells, 1989, Science 244: 1081-1085). En esta última técnica, se introducen mutaciones individuales de alanina
 en cada residuo de la molécula, y las moléculas mutantes resultantes se analizan para determinar la actividad de
 proteasa con el fin de identificar los residuos de aminoácidos que son críticos para la actividad de la molécula.
 65 Ver también, Hilton et al., 1996, J. Biol. Chem. 271: 4699-4708. El sitio activo de la enzima u otra interacción
 biológica puede determinarse también mediante análisis físico de la estructura, según se determina mediante

técnicas tales como resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción de electrones o marcaje por fotoafinidad, junto con la mutación de aminoácidos putativos del sitio de contacto. Ver, por ejemplo, de Vos et al., 1992, Science 255: 306-312; Smith et al., 1992, J. Mol. Biol. 224: 899-904; Wlodaver et al., 1992, FEBS Lett. 309: 59-64. La identidad de los aminoácidos esenciales también se puede inferir a partir de un alineamiento con un polipéptido relacionado. Para la proteasa TY-145 (SEQ ID N.º: 3), la tríada catalítica que comprende los aminoácidos D35, H72 y S251 es esencial para la actividad de proteasa de la enzima.

[0083] En una realización, la variante tiene una actividad catalítica mejorada en comparación con la enzima progenitora.

[0084] La homología entre dos secuencias de aminoácidos se describe en este contexto mediante el parámetro "identidad", para los propósitos de la presente invención el grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina usando el algoritmo de Needleman-Wunsch tal como se ha descrito anteriormente. El resultado de la rutina es, además del alineamiento de aminoácidos, el cálculo del "porcentaje de identidad" entre las dos secuencias.

[0085] Basándose en esta descripción, es habitual que un experto en la técnica identifique proteasas homólogas adecuadas, que pueden modificarse según la invención.

[0086] Las variantes de proteasa progenitora sustancialmente homólogas pueden tener una o más (varias) sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos, en el presente contexto el término "uno o más" se usa indistintamente con el término "varios". Estos cambios son preferiblemente de naturaleza menor, es decir, sustituciones de aminoácidos conservadoras tal como se ha descrito anteriormente y otras sustituciones que no afectan significativamente al plegado o actividad tridimensional de la proteína o polipéptido; pequeñas deleciones, típicamente de uno a aproximadamente 30 aminoácidos; y pequeñas extensiones amino- o carboxilo-terminales, tales como un residuo de metionina amino-terminal, un pequeño péptido enlazante de hasta aproximadamente 20-25 residuos o una pequeña extensión que facilita la purificación (una etiqueta de afinidad), por ejemplo, un tracto de polihistidina o proteína A (Nilsson et al., 1985, EMBO J. 4: 1075; Nilsson et al., 1991, Methods Enzymol. 198: 3. Véase, también, en general, Ford et al., 1991, Protein Expression and Purification 2: 95-107.

[0087] Aunque los cambios descritos anteriormente son preferiblemente de naturaleza menor, tales cambios también pueden ser de naturaleza sustantiva, como la fusión de polipéptidos más grandes de hasta 300 aminoácidos o más en forma de extensiones amino- o carboxilo-terminales.

[0088] La proteasa progenitora puede comprender o constar de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º: 3 o una variante alélica de la misma; o un fragmento de la misma que tiene actividad de proteasa. En un aspecto, la proteasa progenitora comprende o consta de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º: 3.

[0089] La proteasa progenitora puede ser (a) un polipéptido que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 3; (b) un polipéptido codificado por un polinucleótido que se hibrida en condiciones de astringencia media o alta con (i) la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 1, (ii) una secuencia que codifica el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2, o (iii) el complemento de longitud completa de (i) o (ii); o (c) un polipéptido codificado por un polinucleótido que tiene al menos un 90 % de identidad con la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 1.

[0090] En un aspecto, la proteasa progenitora tiene una identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 3 de al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92%, al menos un 93%, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99% pero menos del 100 % de identidad.

[0091] En un aspecto, la secuencia de aminoácidos de la proteasa progenitora difiere en no más de 10 aminoácidos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9, del polipéptido con la SEQ ID N.º: 3.

[0092] En otro aspecto, la progenitora comprende o consta de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º: 3. En otro aspecto, la progenitora comprende o consta de los aminoácidos 1 a 311 de la SEQ ID N.º: 2.

[0093] En un aspecto, la secuencia de aminoácidos de la proteasa progenitora difiere en no más de 10 aminoácidos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9, del polipéptido con la SEQ ID N.º: 4.

[0094] En otro aspecto, la progenitora comprende o consta de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º: 4.

[0095] En un aspecto, la secuencia de aminoácidos de la proteasa progenitora difiere en no más de 10 aminoácidos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9, del polipéptido con la SEQ ID N.º: 5.

[0096] En otro aspecto, la progenitora comprende o consta de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º: 5

[0097] En otro aspecto, la proteasa progenitora está codificada por un polinucleótido que se hibrida en condiciones de astringencia muy baja, condiciones de astringencia baja, condiciones de astringencia media, condiciones de astringencia alta o condiciones de astringencia muy alta con (i) la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 1, (ii) una secuencia que codifica el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2, o (iii) el complemento de longitud completa de (i) o (ii), (Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor, Nueva York).

[0098] El polinucleótido de la SEQ ID N.º: 1 o una subsecuencia del mismo, así como el polipéptido de la SEQ ID N.º: 3 o un fragmento del mismo se pueden usar para diseñar sondas de ácidos nucleicos con el fin de identificar y clonar ADN que codifica un progenitor de cepas de diferentes géneros o especies de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. En particular, estas sondas pueden utilizarse para la hibridación con el ADN genómico o el ADNc de una célula de interés, siguiendo procedimientos estándar de transferencia de Southern, con el fin de identificar y aislar el gen correspondiente en el mismo. Dichas sondas pueden ser considerablemente más cortas que la secuencia completa, pero deben ser al menos de 15, p. ej., al menos de 25, al menos de 35, o al menos de 70 nucleótidos de longitud. Preferiblemente, la sonda de ácidos nucleicos tiene una longitud de al menos 100 nucleótidos, p. ej., al menos 200 nucleótidos, al menos 300 nucleótidos, al menos 400 nucleótidos, al menos 500 nucleótidos, al menos 600 nucleótidos, al menos 700 nucleótidos, al menos 800 nucleótidos o al menos 900 nucleótidos de longitud. Se pueden utilizar sondas tanto de ADN como de ARN. Las sondas suelen estar etiquetadas para detectar el gen correspondiente (por ejemplo, con ³²P, ³H, ³⁵S, biotina o avidina). Dichas sondas están incluidas en la presente invención.

[0099] Una biblioteca de ADN genómico o ADNc preparada a partir de dichas otras cepas puede cribarse en busca de ADN que se hibride con las sondas descritas anteriormente y codifique una progenitora. El ADN genómico o de otro tipo de estas otras cepas puede separarse mediante electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida u otras técnicas de separación. El ADN de las bibliotecas o el ADN separado puede transferirse e inmovilizarse en nitrocelulosa u otro material portador adecuado. Para identificar un clon o un ADN que se hibrida con la SEQ ID N.º: 1; o una subsecuencia de la misma, el material portador se usa en una transferencia de Southern.

[0100] Para los propósitos de la presente invención, la hibridación indica que el polinucleótido se hibrida con una sonda de ácidos nucleicos etiquetada que corresponde a (i) la SEQ ID N.º: 1; (ii) la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 1; (iii) una secuencia que codifica el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2; (iv) el complemento de longitud completa del mismo; o (v) una subsecuencia del mismo; bajo condiciones de astringencia de muy baja a muy alta. Las moléculas con las que se hibrida la sonda de ácidos nucleicos en estas condiciones pueden detectarse usando, por ejemplo, una película radiográfica o cualquier otro medio de detección conocido en la técnica.

[0101] En un aspecto, la sonda de ácidos nucleicos es la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 1. En otro aspecto, la sonda de ácidos nucleicos es un fragmento de 80 a 1140 nucleótidos de longitud de la SEQ ID N.º: 1, p. ej., 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 o 1100 nucleótidos de longitud. En otro aspecto, la sonda de ácidos nucleicos es un polinucleótido que codifica el polipéptido de la SEQ ID N.º: 2; el polipéptido maduro de la misma; o un fragmento de la misma. En otro aspecto, la sonda de ácidos nucleicos es la SEQ ID N.º: 1 o una secuencia que codifica el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2.

[0102] En otra realización, la progenitora está codificada por un polinucleótido que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 1 o una secuencia que codifica el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2.

[0103] El polipéptido puede ser un polipéptido híbrido en el que una región de un polipéptido se fusiona en el N-terminal o en el C-terminal de una región de otro polipéptido.

[0104] La progenitora puede ser un polipéptido de fusión o un polipéptido de fusión escindible con el que otro polipéptido se fusiona en el N-terminal o en el C-terminal del polipéptido de la presente invención. Se produce un polipéptido de fusión fusionando un polinucleótido que codifica otro polipéptido a un polinucleótido de la presente invención. Las técnicas para producir polipéptidos de fusión son conocidas en la técnica e incluyen ligar las secuencias codificantes que codifican los polipéptidos de manera que estén en el marco y que la expresión del polipéptido de fusión esté bajo control de los mismos promotores y terminador. Los polipéptidos de fusión también se pueden construir usando tecnología de inteína en la que los polipéptidos de fusión se crean postraduccionalmente (Cooper et al., 1993, EMBO J. 12: 2575-2583; Dawson et al., 1994, Science 266: 776-779.).

[0105] Un polipéptido de fusión puede comprender además un sitio de escisión entre los dos polipéptidos. Tras la secreción de la proteína de fusión, el sitio se escinde liberando los dos polipéptidos. Los ejemplos de sitios de

escisión incluyen, entre otros, los sitios descritos en Martin et al., 2003, J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 3: 568-576; Svetina et al., 2000, J. Biotechnol. 76: 245-251; Rasmussen-Wilson et al., 1997, Appl. Environ. Microbiol. 63: 3488-3493; Ward et al., 1995, Biotechnology 13: 498-503; y Contreras et al., 1991, Biotechnology 9: 378-381; Eaton et al., 1986, Biochemistry 25: 505-512; Collins-Racie et al., 1995, Biotechnology 13: 982-987; Carter et al., 1989, Proteins: Structure, Function, and Genetics 6: 240-248; y Stevens, 2003, Drug Discovery World 4: 35-48.

[0106] La progenitora puede obtenerse a partir de organismos de cualquier género. Para los propósitos de la presente invención, el término "obtenido a partir de" tal como se utiliza en el presente documento en relación con una fuente dada significará que la progenitora codificada por un polinucleótido es producida por la fuente o por una cepa en la que se ha insertado el polinucleótido de la fuente. En un aspecto, la progenitora se secreta extracelularmente.

[0107] La progenitora puede ser una proteasa bacteriana. Por ejemplo, la progenitora puede ser un polipéptido bacteriano gram-positivo tal como una proteasa de *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Geobacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Oceanobacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* o *Streptomyces* o un polipéptido bacteriano Gram-negativo tal como una proteasa de *Campylobacter*, *E. coli*, *Flavobacterium*, *Fusobacterium*, *Helicobacter*, *Ilyobacter*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Salmonella* o *Ureaplasma*.

[0108] En un aspecto, la progenitora es una proteasa de *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* o *Bacillus thuringiensis*.

[0109] En un aspecto, la progenitora es una proteasa de *Bacillus sp.*, por ejemplo, la proteasa de la SEQ ID N.º 3 o el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º 2.

[0110] Las cepas de estas especies son fácilmente accesibles al público en una serie de colecciones de cultivos, como la American Type Culture Collection (ATCC), la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), la Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS) y la Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center (NRRL).

[0111] La progenitora puede identificarse y obtenerse de otras fuentes, incluyendo microorganismos aislados de la naturaleza (*p. ej.*, tierra, abono, agua, etc.) o muestras de ADN obtenidas directamente de materiales naturales (*p. ej.*, tierra, abono, agua, etc.) utilizando las sondas mencionadas anteriormente. Los métodos para aislar microorganismos y ADN directamente de hábitats naturales son bien conocidas en la técnica. Puede obtenerse entonces un polinucleótido que codifica una progenitora cribando de manera similar una biblioteca de ADN genómico o de ADNc de otro microorganismo o muestra de ADN mixto. Una vez que se ha detectado un polinucleótido que codifica una progenitora con la(s) sonda(s), el polinucleótido puede aislarse o clonarse utilizando técnicas que son conocidas por los expertos en la técnica (ver, *p. ej.*, Sambrook *et al.*, 1989, *supra*).

Preparación de variantes

[0112] La presente invención también se refiere a un método para obtener una variante de proteasa que tiene al menos una propiedad mejorada en comparación con la SEQ ID N.º 3, que comprende

- a) introducir en una proteasa progenitora que tiene al menos un 90 % de identidad con la SEQ ID N.º: 3 uno de los conjuntos de alteraciones definidos en la reivindicación 1 que comprende la alteración S27K, donde la variante tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos en un 90 % o al menos en un 95 % a la SEQ ID N.º: 3; y
- b) recuperar la variante.

[0113] Las variantes se pueden preparar usando cualquier procedimiento de mutagénesis conocido en la técnica, tal como mutagénesis dirigida, construcción de genes sintéticos, construcción de genes semisintéticos, mutagénesis aleatoria, barajado, etc.

[0114] También se describe en el presente documento un método para obtener una variante de proteasa que tiene al menos una propiedad mejorada en comparación con la SEQ ID N.º 3, que comprende introducir en una proteasa progenitora con al menos un 65 % de identidad con la SEQ ID N.º: 3 una sustitución en una o más posiciones: 2, 4, 5, 6, 16, 17, 18, 19, 24, 27, 39, 41, 43, 47, 50, 57, 58, 59, 63, 64, 65, 67, 70, 85, 86, 87, 92, 97, 108, 109, 111, 112, 114, 116, 118, 126, 127, 129, 130, 131, 132, 142, 143, 144, 147, 148, 149, 155, 156, 174, 177, 184, 185, 186, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 206, 207, 212, 214, 215, 218, 219, 220, 222, 225, 234, 236, 241, 245, 246, 247, 248, 264, 267, 268, 269, 270, 272, 274, 278, 279, 286, 287, 288, 293, 297 o 311 correspondientes a las posiciones de la SEQ ID N.º 3 donde la variante tiene una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos un 70 %, al menos un 80%, al menos un 85 %, al menos un 90 % o al menos un 95 % con la SEQ ID N.º: 3; y recuperar la variante.

[0115] También se describe en el presente documento un método para obtener una variante de proteasa que tiene al menos una propiedad mejorada en comparación con la SEQ ID N.º 3, que comprende introducir en una proteasa progenitora con al menos un 75 % de identidad con la SEQ ID N.º: 3 una sustitución en dos o más posiciones: 2, 4, 5, 6, 16, 17, 18, 19, 24, 27, 39, 41, 43, 47, 50, 57, 58, 59, 63, 64, 65, 67, 70, 85, 86, 87, 92, 97, 108, 109, 111, 112, 114, 116, 118, 126, 127, 129, 130, 131, 132, 142, 143, 144, 147, 148, 149, 155, 156, 174, 177, 184, 185, 186, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 206, 207, 212, 214, 215, 218, 219, 220, 222, 225, 234, 236, 241, 245, 246, 247, 248, 264, 267, 268, 269, 270, 272, 274, 278, 279, 286, 287, 288, 293, 297 o 311 correspondientes a las posiciones de la SEQ ID N.º 3 donde la variante tiene una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos un 70 %, al menos un 80%, al menos un 85 %, al menos un 90 % o al menos un 95 % con la SEQ ID N.º: 3; y recuperar la variante.

[0116] Las variantes de la invención también se pueden preparar mediante procedimientos como los que se mencionan a continuación.

[0117] La mutagénesis dirigida es una técnica en la que una o más (*p. ej.*, varias) mutaciones se introducen en uno o más sitios definidos en un polinucleótido que codifica la progenitora.

[0118] Se puede lograr la mutagénesis dirigida *in vitro* mediante PCR que implica el uso de cebadores de oligonucleótidos que contienen la mutación deseada. También se puede realizar mutagénesis dirigida *in vitro* por mutagénesis en casete que involucra la escisión mediante una enzima de restricción en un sitio del plásmido que comprende un polinucleótido que codifica la progenitora y la unión subsiguiente de un oligonucleótido que contiene la mutación en el polinucleótido. Generalmente, la enzima de restricción que digiere el plásmido y el oligonucleótido es la misma, lo que permite que los extremos cohesivos del plásmido y el inserto se unan entre sí. Ver, *p. ej.*, Scherer y Davis, 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 76: 4949-4955; y Barton et al., 1990, Nucleic Acids Res. 18: 7349-4966.

[0119] También se puede lograr la mutagénesis dirigida *in vivo* por métodos conocidos en la técnica. Ver, *p. ej.*, publicación de solicitud de patente EE. UU. n.º 2004/0171154; Storici et al., 2001, Nature Biotechnol. 19: 773-776; Kren et al., 1998, Nat. Med. 4: 285-290; y Calissano y Macino, 1996, Fungal Genet. Newslett. 43: 15-16.

[0120] La construcción de genes sintéticos conlleva la síntesis *in vitro* de una molécula de polinucleótido diseñada para codificar un polipéptido de interés. La síntesis de genes se puede realizar utilizando una variedad de técnicas como, por ejemplo, la tecnología múltiplex basada en microchips descrita por Tian et al. (2004, Nature 432: 1050-1054, y tecnologías similares en las que los oligonucleótidos se sintetizan y ensamblan en chips microfluídicos fotogramables.

[0121] Se pueden realizar y probar sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos individuales o múltiples, utilizando métodos conocidos de mutagénesis, recombinación y/o barajado, seguidos de un procedimiento de cribado pertinente, tales como los descritos por Reidhaar-Olson y Sauer, 1988, Science 241: 53-57; Bowie y Sauer, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 86: 2152-2156; WO 95/17413; o WO 95/22625. Otros métodos que se pueden usar incluyen PCR propensa a errores, despliegue de fagos (*p. ej.*, Lowman et al., 1991, Biochemistry 30: 10832-10837.; EE. UU. 5.223.409; WO 92/06204) y mutagénesis dirigida por región (Derbyshire et al., 1986, Gene 46: 145; Ner et al., 1988, DNA 7: 127).

[0122] Los métodos de mutagénesis/barajado se pueden combinar con métodos de cribado automatizados de alto rendimiento para detectar la actividad de polipéptidos clonados y mutagenizados expresados por células huésped (Ness et al., 1999, Nature Biotechnology 17: 893-896). Las moléculas de ADN mutagenizadas que codifican polipéptidos activos pueden recuperarse de las células huésped y secuenciarse rápidamente usando métodos estándar en la técnica. Estos métodos permiten determinar rápidamente la importancia de los residuos de aminoácidos individuales en un polipéptido.

[0123] La construcción de genes semisintéticos se logra combinando aspectos de la construcción de genes sintéticos y/o mutagénesis dirigida y/o mutagénesis aleatoria y/o barajado. La construcción semisintética se tipifica mediante un proceso que utiliza fragmentos de polinucleótidos que se sintetizan, en combinación con técnicas de PCR. Por tanto, regiones definidas de genes pueden sintetizarse *de novo* mientras que otras regiones pueden amplificarse utilizando cebadores mutagénicos específicos del sitio, e incluso mientras que otras regiones pueden someterse a una PCR propensa a errores o a una amplificación de PCR no propensa a errores. Las subsecuencias de polinucleótidos pueden luego barajarse.

Polinucleótidos

[0124] La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados que codifican una variante de la presente invención.

Constructos de ácidos nucleicos

5 [0125] La presente invención también se refiere a constructos de ácidos nucleicos que comprenden un polinucleótido que codifica una variante de la presente invención operativamente enlazada a una o más secuencias de control que dirigen la expresión de la secuencia codificante en una célula huésped adecuada en condiciones compatibles con las secuencias de control.

10 [0126] El polinucleótido puede manipularse de diversas formas para proporcionar la expresión de una variante. La manipulación del polinucleótido antes de su inserción en un vector puede ser deseable o necesaria dependiendo del vector de expresión. Las técnicas para modificar polinucleótidos utilizando métodos de ADN recombinante son bien conocidas en la técnica.

15 [0127] La secuencia de control puede ser un promotor, un polinucleótido que es reconocido por una célula huésped para la expresión del polinucleótido. El promotor contiene secuencias de control de la transcripción que median la expresión de la variante. El promotor puede ser cualquier polinucleótido que muestre actividad transcripcional en la célula huésped, incluyendo promotores mutantes, truncados e híbridos, y puede obtenerse a partir de genes que codifican polipéptidos extracelulares o intracelulares, ya sean homólogos o heterólogos a la célula huésped.

20 [0128] Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de los constructos de ácidos nucleicos de la presente invención en una célula huésped bacteriana son los promotores obtenidos del gen de la alfa-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* (*amyQ*), el gen de la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (*amyL*), el gen de la penicilinas de *Bacillus licheniformis* (*penP*), el gen de la amilasa maltogénica de *Bacillus stearothermophilus* (*amyM*), el gen de levansacarasa de *Bacillus subtilis* (*sacB*), los genes de *Bacillus subtilis* *xylA* y *xylB*, el gen de *Bacillus thuringiensis cryIIIA* (Agaisse y Lereclus, 1994, Molecular Microbiology 13: 97-107), el operón lac de *E. coli*, el promotor trc de *E. coli* (Egon et al., 1988, Gene 69: 301-315), el gen de agarasa de *Streptomyces coelicolor* (*dagA*) y el gen procarionta de beta-lactamasa (Villa-Kamaroff et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 75: 3727-3731), así como el promotor tac (DeBoer et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 80: 21-25). Otros promotores se describen en "Useful proteins from recombinant bacteria" en Gilbert et al., 1980, Scientific American, 242: 74-94; y en Sambrook et al., 1989, supra. Se describen ejemplos de promotores en tándem en WO 99/43835.

35 [0129] La secuencia de control también puede ser un terminador de transcripción, que es reconocido por una célula huésped para terminar la transcripción. La secuencia terminadora está operativamente enlazada al terminal 3' del polinucleótido que codifica la variante. Puede utilizarse cualquier terminador que sea funcional en la célula huésped.

40 [0130] Los terminadores preferidos para las células huésped bacterianas se obtienen de los genes para la proteasa alcalina de *Bacillus clausii* (*aprH*), la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (*amyL*) y el ARN ribosómico de *Escherichia coli* (*rnbB*).

[0131] La secuencia de control también puede ser una región estabilizadora de ARNm corriente abajo de un promotor y corriente arriba de la secuencia codificante de un gen que aumenta la expresión del gen.

45 [0132] Se obtienen ejemplos de regiones estabilizadoras de ARNm adecuadas a partir de un gen de *Bacillus thuringiensis cryIIIA* (WO 94/25612) y un gen SP82 de *Bacillus subtilis* (Hue et al., 1995, Journal of Bacteriology 177: 3465-3471).

50 [0133] La secuencia de control también puede ser una región codificante de péptido señal que codifica un péptido señal enlazado al N-terminal de una variante y dirige la variante hacia la vía secretora de la célula. El extremo 5' de la secuencia codificante del polinucleótido puede contener de forma inherente una secuencia codificante del péptido señal enlazada de manera natural en un marco de lectura de traducción con el segmento de la secuencia codificante que codifica la variante. Alternativamente, el extremo 5' de la secuencia codificante puede contener una secuencia codificante del péptido señal que es extranjera para la secuencia codificante. 55 Puede ser necesaria una secuencia codificante de péptido señal extranjera cuando la secuencia codificante no contiene de forma natural una secuencia codificante de péptido señal. Alternativamente, una secuencia codificante de péptido señal extranjera puede simplemente reemplazar la secuencia codificante de péptido señal natural para mejorar la secreción de la variante. Sin embargo, se puede usar cualquier secuencia codificante de péptido señal que dirija la variante expresada hacia la ruta secretora de una célula huésped.

60 [0134] Las secuencias codificantes de péptido señal eficaces para células huésped bacterianas son las secuencias codificantes de péptido señal obtenidas a partir de los genes de amilasa maltogénica de *Bacillus* NCIB 11837, subtilisina de *Bacillus licheniformis*, beta-lactamasa de *Bacillus licheniformis*, alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, proteasas neutras (*nprT*, *nprS*, *nprM*) de *Bacillus stearothermophilus* y *prsA* de *Bacillus subtilis*. Otros péptidos señal son descritos por Simonen y Palva, 1993, Microbiological Reviews 57: 109-137.

5 [0135] La secuencia de control también puede ser una secuencia codificante de propéptido que codifica un propéptido situado en el N-terminal de una variante. El polipéptido resultante se conoce como proenzima o propolipéptido (o zimógeno en algunos casos). Un propolipéptido está generalmente inactivo y puede convertirse en un polipéptido activo por escisión catalítica o autocatalítica del propéptido del propolipéptido. La secuencia codificante del propéptido puede obtenerse de los genes de la proteasa alcalina de *Bacillus subtilis* (*aprE*), proteasa neutra de *Bacillus subtilis* (*nprT*), lacasa de *Myceliophthora thermophila* (WO 95/33836), proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei* y factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae*.

10 [0136] Cuando las secuencias de péptido señal y de propéptido están presentes, la secuencia de propéptido se posiciona junto al N-terminal de la variante y la secuencia de péptido señal se coloca junto al N-terminal de la secuencia de propéptido.

15 [0137] También puede ser deseable añadir secuencias reguladoras que regulen la expresión de la variante en relación con el crecimiento de la célula huésped. Ejemplos de sistemas reguladores son aquellos que hacen que la expresión del gen se active o desactive en respuesta a un estímulo físico o químico, incluyendo la presencia de un compuesto regulador. Los sistemas reguladores en sistemas procarióticos incluyen los sistemas de operadores *lac*, *tac* y *trp*.

20 Vectores de expresión

25 [0138] La presente invención también se refiere a vectores de expresión recombinantes que comprenden un polinucleótido que codifica una variante de la presente invención, un promotor y señales de parada transcripcional y traduccional. Las diversas secuencias de nucleótidos y de control pueden unirse para producir un vector de expresión recombinante que puede incluir uno o más sitios de restricción convenientes para permitir la inserción o sustitución del polinucleótido que codifica la variante en dichos sitios. Alternativamente, el polinucleótido puede expresarse insertando el polinucleótido o un constructo de ácidos nucleicos que comprende el polinucleótido en un vector apropiado para la expresión. Al crear el vector de expresión, la secuencia codificante se ubica en el vector de modo que la secuencia codificante esté operativamente enlazada con las

30 secuencias de control apropiadas para la expresión.

[0139] El vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector (p. ej., un plásmido o un virus) que pueda someterse convenientemente a procedimientos de ADN recombinante y pueda producir la expresión del polinucleótido. La elección del vector dependerá típicamente de la compatibilidad del vector con la célula huésped en la que se va a introducir el vector. El vector puede ser un plásmido circular cerrado o lineal.

35

[0140] El vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, p. ej., un plásmido, un elemento extracromosómico, un minicromosoma o un cromosoma artificial. El vector puede contener cualquier medio para garantizar la autorreplicación. Alternativamente, el vector puede ser tal que, cuando se introduce en la célula huésped, se integra en el genoma y se replica junto con los cromosomas en los que se ha integrado. Además, se puede usar un único vector o plásmido o dos o más vectores o plásmidos que juntos contienen el ADN total que se va a introducir en el genoma de la célula huésped, o un transposón.

40

45 [0141] El vector contiene preferiblemente uno o más marcadores seleccionables que permiten una fácil selección de células transformadas, transfectadas, transducidas o similares. Un marcador seleccionable es un gen cuyo producto proporciona resistencia a biocidas o virus, resistencia a metales pesados, prototrofia a auxótrofos, y similares.

50 [0142] Ejemplos de marcadores bacterianos seleccionables son los genes *dal* de *Bacillus licheniformis* o *Bacillus subtilis* o marcadores que confieren resistencia antibiótica, como ampicilina, cloranfenicol, kanamicina, neomicina, espectinomina o tetraciclina.

55 [0143] El vector contiene preferiblemente un elemento o elementos que permiten la integración del vector en el genoma de la célula huésped o la replicación autónoma del vector en la célula independiente del genoma.

[0144] Para la integración en el genoma de la célula huésped, el vector puede basarse en la secuencia del polinucleótido que codifica la variante o cualquier otro elemento del vector para su integración en el genoma mediante recombinación homóloga o no homóloga. Alternativamente, el vector puede contener polinucleótidos adicionales para dirigir la integración mediante recombinación homóloga en el genoma de la célula huésped en una o varias ubicaciones precisas en el(los) cromosoma(s). Para aumentar la probabilidad de integración en una ubicación precisa, los elementos de integración deben contener una cantidad suficiente de ácidos nucleicos, tales como de 100 a 10 000 pares de bases, de 400 a 10 000 pares de bases y de 800 a 10 000 pares de bases, que tienen un alto grado de identidad de secuencia con la secuencia diana correspondiente para aumentar la probabilidad de recombinación homóloga. Los elementos de integración pueden ser cualquier secuencia que sea homóloga a la secuencia diana en el genoma de la célula huésped. Además, los elementos de integración

60

65

pueden ser polinucleótidos no codificantes o codificantes. Por otra parte, el vector puede integrarse en el genoma de la célula huésped mediante recombinación no homóloga.

5 [0145] Para la replicación autónoma, el vector puede comprender además un origen de replicación que permita al vector replicarse de forma autónoma en la célula huésped en cuestión. El origen de replicación puede ser cualquier replicador de plásmido que medie en la replicación autónoma que funciona en una célula. El término "origen de replicación" o "replicador de plásmido" significa un polinucleótido que permite que un plásmido o vector se replique *in vivo*.

10 [0146] Ejemplos de orígenes bacterianos de replicación son los orígenes de replicación de los plásmidos pBR322, pUC19, pACYC177 y pACYC184 que permiten la replicación en *E. coli*, y pUB110, pE194, pTA1060 y pAM β 1 que permiten la replicación en *Bacillus*.

15 [0147] Puede insertarse más de una copia de un polinucleótido de la presente invención en una célula huésped para aumentar la producción de una variante. Puede obtenerse un aumento en el número de copias del polinucleótido integrando al menos una copia adicional de la secuencia en el genoma de la célula huésped o incluyendo un gen marcador seleccionable amplificable con el polinucleótido donde las células que contienen copias amplificadas del gen marcador seleccionable, y por lo tanto copias adicionales del polinucleótido, se pueden seleccionar cultivando las células en presencia del agente seleccionable apropiado.

20 [0148] Los procedimientos utilizados para ligar los elementos descritos anteriormente para construir los vectores de expresión recombinantes de la presente invención son bien conocidos por los expertos en la técnica (ver, *p. ej.*, Sambrook *et al.*, 1989, *supra*).

25 Células huésped

[0149] La presente invención también se refiere a células huésped recombinantes, que comprenden un polinucleótido que codifica una variante de la presente invención operativamente enlazada a una o más secuencias de control que dirigen la producción de una variante de la presente invención. Se introduce un constructo o un vector que comprende un polinucleótido en una célula huésped de modo que el constructo o el vector se mantengan como un integrante cromosómico o como un vector extracromosómico autorreplicante tal como se ha descrito anteriormente. El término "célula huésped" abarca cualquier descendiente de una célula madre que no es idéntico a la célula madre debido a las mutaciones que ocurren durante la replicación. La elección de una célula huésped dependerá en gran medida del gen que codifica la variante y su fuente.

35 [0150] La célula huésped puede ser cualquier célula útil en la producción recombinante de una variante, *p. ej.*, un procarionota o un eucariota.

40 [0151] La célula huésped procariótica puede ser cualquier bacteria gram-positiva o gram-negativa. Las bacterias gram-positivas incluyen, entre otras, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Geobacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Oceanobacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Streptomyces*. Las bacterias gram-negativas incluyen, entre otras, *Campylobacter*, *E. coli*, *Flavobacterium*, *Fusobacterium*, *Helicobacter*, *Ilyobacter*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Salmonella* y *Ureaplasma*.

45 [0152] La célula huésped bacteriana puede ser cualquier célula de *Bacillus* incluyendo, entre otras, células de *Bacillus alkaphilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus thuringiensis*

50 [0153] La célula huésped bacteriana también puede ser cualquier célula de *Streptococcus* incluyendo, entre otras, células de *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus uberis* y *Streptococcus equi* subsp. *Zoepidemicus*.

55 [0154] La célula huésped bacteriana también puede ser cualquier célula de *Streptomyces* incluyendo, entre otras, células de *Streptomyces achromogenes*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces griseus* y *Streptomyces lividans*.

60 [0155] La introducción de ADN en una célula de *Bacillus* puede efectuarse mediante transformación de protoplastos (ver, *p. ej.*, Chang y Cohen, 1979, Mol. Gen. Genet. 168: 111-115), transformación celular competente (ver, *p. ej.*, Young y Spizizen, 1961, J. Bacteriol. 81: 823-829, o Dubnau y Davidoff-Abelson, 1971, J. Mol. Biol. 56: 209-221), electroporación (ver, *p. ej.*, Shigekawa y Dower, 1988, Biotechniques 6: 742-751) o conjugación (ver, *p. ej.*, Koehler y Thorne, 1987, J. Bacteriol. 169: 5271-5278). La introducción de ADN en una célula de *E. coli* puede efectuarse mediante transformación de protoplastos (ver, *p. ej.*, Hanahan, 1983, J. Mol. Biol. 166: 557-580) o electroporación (ver, *p. ej.*, Dower et al., 1988, Nucleic Acids Res. 16: 6127-6145). La introducción de ADN en una célula de *Streptomyces* puede efectuarse, por ejemplo, mediante transformación de protoplastos, electroporación (ver, *p. ej.*, Gong et al., 2004, Folia Microbiol. (Praga) 49: 399-405), conjugación

(ver, *p. ej.*, Mazodier et al., 1989, J. Bacteriol. 171: 3583-3585) o transducción (ver, *p. ej.*, Burke et al., 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 98: 6289-6294). La introducción de ADN en una célula de *Pseudomonas* puede efectuarse mediante electroporación (ver, *p. ej.*, Choi et al., 2006, J. Microbiol. Methods 64: 391-397) o conjugación (ver, *p. ej.*, Pinedo y Smets, 2005, Appl. Environ. Microbiol. 71: 51-57). La introducción de ADN en una célula de *Streptococcus* puede efectuarse mediante competencia natural (ver, *p. ej.*, Perry y Kuramitsu, 1981, Infect. Immun. 32: 1295-1297), transformación de protoplastos (ver, *p. ej.*, Catt y Jollick, 1991, Microbios 68: 189-207), electroporación (ver, *p. ej.*, Buckley et al., 1999, Appl. Environ. Microbiol. 65: 3800-3804) o conjugación (ver, *p. ej.*, Clewell, 1981, Microbiol. Rev 45: 409-436). Sin embargo, puede usarse cualquier método conocido en la técnica para introducir ADN en una célula huésped.

Métodos de producción

[0156] La presente invención también se refiere a métodos para producir una variante, que comprenden: (a) cultivar una célula huésped de la presente invención en condiciones adecuadas para la expresión de la variante; y (b) recuperar la variante.

[0157] Las células huésped se cultivan en un medio nutriente adecuado para la producción de la variante utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la célula puede cultivarse mediante cultivo en matraz de agitación o fermentación a pequeña o gran escala (incluyendo fermentaciones continuas, por lotes, por lote alimentado o de estado sólido) en fermentadores de laboratorio o industriales realizados en un medio adecuado y en condiciones que permiten expresar y/o aislar la variante. El cultivo tiene lugar en un medio nutriente adecuado que comprende fuentes de carbono y nitrógeno y sales inorgánicas, utilizando procedimientos conocidos en la técnica. Los medios adecuados están disponibles en los proveedores comerciales o pueden prepararse de acuerdo con las composiciones publicadas (*p. ej.*, en los catálogos de la American Type Culture Collection). Si la variante se secreta en el medio nutriente, esta puede recuperarse directamente del medio. Si la variante no se secreta, puede recuperarse de los lisados celulares.

[0158] La variante puede detectarse usando métodos conocidos en la técnica que son específicos para las variantes con actividad de proteasa. Estos métodos de detección incluyen, entre otros, el uso de anticuerpos específicos, la formación de un producto enzimático o la desaparición de un sustrato enzimático. Por ejemplo, puede usarse un ensayo enzimático para determinar la actividad de la variante.

[0159] La variante se puede recuperar usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la variante puede recuperarse del medio nutriente mediante procedimientos convencionales que incluyen, entre otros, recolección, centrifugación, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación o precipitación.

[0160] La variante puede purificarse mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica que incluyen, entre otros, cromatografía (*p. ej.*, intercambio iónico, afinidad, hidrofobia, cromatoenfoco y exclusión de tamaño), procedimientos electroforéticos (*p. ej.*, enfoque isoelectrico preparativo), solubilidad diferencial (*p. ej.*, precipitado de sulfato de amonio), SDS-PAGE o extracción (ver, *p. ej.*, Protein Purification, Janson y Ryden, editores, VCH Publishers, Nueva York, 1989) para obtener variantes sustancialmente puras.

[0161] En un aspecto alternativo, la variante no se recupera, sino que se usa como fuente de la variante una célula huésped de la presente invención que expresa la variante.

Composiciones

[0162] En cierto aspecto, las variantes según la invención tienen una estabilidad mejorada en los detergentes en comparación con la enzima progenitora o en comparación con una proteasa que tiene la secuencia de aminoácidos idéntica de dicha variante pero que no tiene las alteraciones en una o más de dichas posiciones especificadas o en comparación con una proteasa con la SEQ ID N.º 3, donde la estabilidad se mide en el ejemplo 2 como se describe en "Materiales y métodos" en el presente documento.

[0163] Además de las enzimas, las composiciones detergentes pueden comprender componentes adicionales. La elección de componentes adicionales está dentro de la habilidad del experto e incluye ingredientes convencionales, incluidos los componentes no limitantes ejemplares que se exponen a continuación. La elección de los componentes puede incluir, para el cuidado del tejido, la consideración del tipo de tejido que se va a limpiar, el tipo y/o el grado de suciedad, la temperatura a la que se va a limpiar y la formulación del producto detergente. Aunque los componentes mencionados a continuación se clasifican por encabezamiento general según una funcionalidad particular, esto no debe interpretarse como una limitación, ya que un componente puede comprender funcionalidades adicionales como apreciará el experto en la técnica.

Composiciones detergentes de la presente invención

[0164] Las variantes de la presente invención se pueden añadir a una composición detergente en una cantidad que corresponde a 0.001-100 mg de proteína, por ejemplo, 0.01-100 mg de proteína, preferiblemente 0.005-50

mg de proteína, más preferiblemente 0.01-25 mg de proteína, incluso más preferiblemente de 0.05 a 10 mg de proteína, lo más preferible de 0.05 a 5 mg de proteína e incluso más preferiblemente de 0.01 a 1 mg de proteína por litro de líquido de lavado.

5 [0165] Las variantes de la presente invención se pueden estabilizar utilizando agentes estabilizantes, que pueden seleccionarse del grupo que contiene propilenglicol, glicerol, un azúcar, un alcohol de azúcar, ácido láctico, ácido bórico, borato y derivados del ácido fenilborónico, tales como ácido 4-formilfenilborónico (4-FPBA).

10 [0166] Las variantes según la invención también se pueden estabilizar usando aldehídos o cetonas peptídicas tal como se describe en WO 2005/105826 y WO 2009/118375. También se puede incorporar una variante de la presente invención en las formulaciones de detergente descritas en WO 97/07202.

Surfactantes

15 [0167] La composición detergente puede comprender uno o más surfactantes, que pueden ser aniónicos y/o catiónicos y/o no iónicos y/o semipolares y/o bipolares o una mezcla de los mismos. En una realización particular, la composición detergente incluye una mezcla de uno o más surfactantes no iónicos y uno o más surfactantes aniónicos. El(los) surfactante(s) está(n) típicamente presente(s) a un nivel de aproximadamente un 0.1 % a un 60 % en peso, tal como aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 40 %, o aproximadamente un 3 % a aproximadamente un 20 %, o aproximadamente un 3 % a aproximadamente un 10 %. El(los) surfactante(s) se selecciona(n) basándose en la aplicación de limpieza deseada, e incluye cualquier surfactante convencional conocido en la técnica. Se puede utilizar cualquier surfactante conocido en la técnica para usar en detergentes.

25 [0168] Cuando se incluye en él, el detergente normalmente contendrá de aproximadamente de un 1 % a aproximadamente un 40 % en peso, tal como de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 30 %, incluyendo de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 15 % o de aproximadamente un 20 % a aproximadamente un 25 % de un surfactante. Los ejemplos no limitantes de surfactantes aniónicos incluyen sulfatos y sulfonatos, en particular, alquilbencenosulfonatos lineales (LAS), isómeros de LAS, alquilbencenosulfonatos ramificados (BABS), fenilalcanosulfonatos, alfa olefin sulfonatos (AOS), olefin sulfonatos, alcanosulfonatos, alcano-2,3-diilbis(sulfatos), hidroxialcanosulfonatos y disulfonatos, alquilsulfatos (AS) como el dodecilsulfato de sodio (SDS), sulfatos de alcohol graso (FAS), sulfatos de alcohol primario (PAS), alcohol éter sulfatos (AES o AEOS o FES, también conocidos como alcohol etoxisulfatos o éter sulfatos de alcohol graso), alcanosulfonatos secundarios (SAS), sulfonatos de parafina (PS), éster sulfonatos, ésteres de glicerol de ácidos grasos sulfonados, ésteres metílicos de ácidos grasos alfa-sulfo (alfa-SFMe o SES) incluyendo metil éster sulfonato (MES), ácido alquil- o alquensulfónico, ácido dodecenil/tetradecenilsulfónico (D TSA), derivados de ácidos grasos de aminoácidos, diésteres y monoésteres de ácido sulfo-succínico o jabón, y combinaciones de los mismos.

40 [0169] Cuando se incluye en él, el detergente normalmente contendrá aproximadamente de un 1 % a un 40 % en peso de un surfactante catiónico. Ejemplos no limitantes de surfactantes catiónicos incluyen alquildimetil etanolamina cuaternaria (ADMEAQ), bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), cloruro de dimetildiestearilamonio (DSDMAC) y alquilbencildimetilamonio, y combinaciones de los mismos, compuestos de alquilamonio cuaternario, amonio cuaternario alcoxilado (AQA).

45 [0170] Cuando se incluye en él, el detergente normalmente contendrá de aproximadamente un 0.2 % a aproximadamente un 40 % en peso de un surfactante no iónico, por ejemplo de aproximadamente un 0.5 % a aproximadamente un 30 %, en particular de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 20 %, de aproximadamente un 3 % a aproximadamente un 10 %, tal como de aproximadamente un 3 % a aproximadamente un 5 %, o de aproximadamente un 8 % a aproximadamente un 12 %. Ejemplos no limitantes de surfactantes no iónicos incluyen etoxilados de alcohol (AE o AEO), propoxilados de alcohol, alcoholes grasos propoxilados (PFA), ésteres de alquilo de ácidos grasos alcoxilados, tales como ésteres de alquilo de ácidos grasos etoxilados y/o propoxilados, etoxilados de alquilfenol (APE), etoxilados de nonilfenol (NPE), alquilpoliglucósidos (APG), aminas alcoxiladas, monoetanolamidas de ácidos grasos (FAM), dietanolamidas de ácidos grasos (FADA), monoetanolamidas de ácidos grasos etoxilados (EFAM), monoetanolamidas de ácidos grasos propoxilados (PFAM), amidas de ácidos grasos polihidroxialquilo o derivados N-acil N-alquil de glucosamina (glucamidas, GA, o glucamida de ácido graso, FAGA), así como productos disponibles con los nombres comerciales SPAN y TWEEN, y combinaciones de los mismos.

60 [0171] Cuando se incluye en él, el detergente normalmente contendrá aproximadamente de un 1 % a un 40 % en peso de un surfactante semipolar. Los ejemplos no limitantes de surfactantes semipolares incluyen óxidos de amina (AO) tales como óxido de alquildimetilamina, óxido de N-(alquil de coco)-N,N-dimetilamina y óxido de N-(alquil de sebo)-N,N-bis(2-hidroxietil)amina, alcanolamidas de ácidos grasos y alcanolamidas de ácidos grasos etoxilados, y combinaciones de los mismos.

65 [0172] Cuando se incluye en él, el detergente normalmente contendrá aproximadamente de un 1 % a un 40 % en

peso de un surfactante bipolar. Los ejemplos no limitantes de surfactantes bipolares incluyen betaina, alquildimetilbetaína y sulfobetaina, y combinaciones de los mismos.

Hidrótropos

5

[0173] Un hidrótopo es un compuesto que solubiliza compuestos hidrófobos en soluciones acuosas (o de manera opuesta, sustancias polares en un entorno no polar). Típicamente, los hidrótopos tienen carácter tanto hidrófilo como hidrófobo (las denominadas propiedades anfífilas como se sabe a partir de los surfactantes); sin embargo, la estructura molecular de los hidrótopos generalmente no favorece la autoagregación espontánea, véase p. ej., la reseña de Hodgdon y Kaler (2007), *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 12: 121-128. Los hidrótopos no muestran una concentración crítica por encima de la cual se produce la autoagregación como ocurre con los surfactantes y los lípidos que forman mesofases micelares, laminares o de otro tipo bien definidas. En cambio, muchos hidrótopos muestran un proceso de agregación de tipo continuo donde los tamaños de los agregados crecen a medida que aumenta la concentración. Sin embargo, muchos hidrótopos alteran el comportamiento de la fase, la estabilidad y las propiedades coloidales de los sistemas que contienen sustancias de carácter polar y no polar, incluidas mezclas de agua, aceite, surfactantes y polímeros. Clásicamente, los hidrótopos se utilizan en todas las industrias, desde la farmacéutica, el cuidado personal, la alimentación hasta las aplicaciones técnicas. El uso de hidrótopos en composiciones detergentes permite, por ejemplo, formulaciones más concentradas de surfactantes (como en el proceso de compactación de detergentes líquidos eliminando agua) sin inducir fenómenos no deseados tales como separación de fases o alta viscosidad.

[0174] El detergente puede contener un 0-5 % en peso, como, por ejemplo, aproximadamente de un 0.5 a aproximadamente un 5 % o de aproximadamente un 3 % a aproximadamente un 5 %, de un hidrótopo. Se puede utilizar cualquier hidrótopo conocido en la técnica para usar en detergentes. Los ejemplos no limitantes de hidrótopos incluyen bencenosulfonato de sodio, p-toluenosulfonatos de sodio (STS), xilenosulfonatos de sodio (SXS), cumenosulfonatos de sodio (SCS), cimenosulfonato de sodio, óxidos de aminas, alcoholes y poliglicoléteres, hidroxinaftoato de sodio, hidroxinaftaleno sulfonato de sodio, etilhexil sulfato de sodio y combinaciones de los mismos.

Adyuvantes y coadyuvantes

[0175] La composición detergente puede contener aproximadamente un 0-65 % en peso, por ejemplo, aproximadamente de un 5 % a aproximadamente un 50 % de un adyuvante o un coadyuvante de detergente, o una mezcla de los mismos. En un detergente para lavavajillas, el nivel de coadyuvante es típicamente del 40 al 65 %, particularmente del 50 al 65 %. El adyuvante y/o coadyuvante particularmente puede ser un agente quelante que forma complejos hidrosolubles con Ca y Mg. Puede utilizarse cualquier adyuvante y/o coadyuvante conocido en la técnica para uso en lavado de ropa, ADW y detergentes de limpieza de superficies duras. Los ejemplos no limitantes de adyuvantes incluyen zeolitas, difosfatos (pifosfatos), trifosfatos como el trifosfato de sodio (STP o STPP), carbonatos como el carbonato de sodio, silicatos solubles como el metasilicato de sodio, silicatos en capas (p. ej., SKS-6 de Hoechst), etanolaminas tales como 2-aminoetan-1-ol (MEA), iminodietanol (DEA) y 2,2',2"-nitrotrietanol (TEA) y carboximetilululina (CMI), y combinaciones de los mismos.

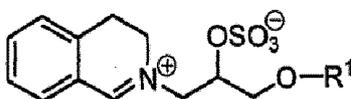
[0176] La composición detergente también puede contener un 0-65 % en peso, por ejemplo, aproximadamente de un 5 % a aproximadamente un 40 % de un coadyuvante de detergente, o una mezcla de los mismos. La composición detergente puede incluir un coadyuvante solo, o en combinación con un constructor, por ejemplo un coadyuvante de zeolita. Los ejemplos no limitantes de coadyuvantes incluyen homopolímeros de poliácridatos o copolímeros de los mismos, tales como ácido poli(acrílico) (PAA) o ácido copoli(acrílico/maleico) (PAA/PMA). Otros ejemplos no limitantes incluyen citrato, quelantes tales como aminocarboxilatos, aminopolicarboxilatos y fosfonatos, y ácido alquil- o alqueniilsuccínico. Ejemplos específicos adicionales incluyen ácido 2,2',2"-nitrotriacético (NTA), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), ácido iminodisuccínico (IDS), ácido etilendiamino-N,N'-disuccínico (EDDS), ácido metilglicinodiacético (MGDA), ácido glutámico N,N-ácido diacético (GLDA), ácido 1-hidroxietano-1,1-diilbis(fosfónico) (HEDP), ácido etilendiaminotetrakis(metilen)tetrakis (fosfónico) (EDTMPA), ácido dietilentriaminopentakis(metilen)pentakis(fosfónico) (DTPMPA), ácido N-(2-hidroxi)etiliminodiacético (EDG), ácido aspártico N-ácido monoacético (ASMA), ácido aspártico N,N-ácido diacético (ASDA), ácido aspártico N-ácido monopropiónico (ASMP), ácido iminodisuccínico (IDA), ácido N-(2-sulfometil) aspártico (SMAS), ácido N-(2-sulfoetil) aspártico (SEAS), ácido N-(2-sulfometil) glutámico (SMGL), ácido N-(2-sulfoetil) glutámico (SEGL), ácido N-metiliminodiacético (MIDA), ácido α -alanin-N,N-diacético (α -ALDA), ácido serín-N,N-diacético (SEDA), ácido isoserín-N,N-diacético (ISDA), ácido fenilalanin-N,N-diacético (PHDA), ácido antranílico N,N-ácido diacético (ANDA), ácido sulfanílico N,N-ácido diacético (SLDA), ácido taurín-N,N-diacético (TUDA) y ácido sulfometil-N,N-diacético (SMDA), N-(hidroxi)etil-etilidenodiaminotriacetato (HEDTA), dietanoglicina (DEG), ácido dietilentriamino penta(metilenfosfónico) (DTPMP), ácido aminotris(metilenfosfónico) (ATMP) y combinaciones y sales de los mismos. Otros ejemplos de adyuvantes y/o coadyuvantes se describen en, por ejemplo, WO 09/102854, EE.UU. 5977053.

65

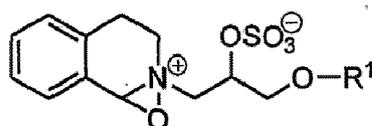
Sistemas de blanqueo

[0177] El detergente puede contener un 0-10% en peso, como, por ejemplo, de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 5 %, de un sistema de blanqueo. Puede utilizarse cualquier sistema de blanqueo conocido en la técnica para uso en lavado de ropa, ADW y detergentes de limpieza de superficies duras. Los componentes adecuados del sistema de blanqueo incluyen catalizadores de blanqueo, fotoblanqueadores, activadores de blanqueo, fuentes de peróxido de hidrógeno tales como percarbonato de sodio y perboratos de sodio, perácidos preformados y mezclas de los mismos. Los perácidos preformados adecuados incluyen, entre otros, ácidos y sales peroxycarboxílicos, sales y ácidos percarbónicos, sales y ácidos perimidicos, sales y ácidos peroximonosulfúricos, por ejemplo, Oxone®, y mezclas de los mismos. Los ejemplos no limitantes de sistemas de blanqueo incluyen sistemas blanqueadores con base de peróxido, que pueden comprender, por ejemplo, una sal inorgánica, incluyendo sales de metales alcalinos tales como sales de sodio de perborato (normalmente mono o tetrahidrato), percarbonato, persulfato, perfosfato, sales de persulfato, en combinación con un activador de blanqueo formador de perácido. Por activador del blanqueador se entiende un compuesto que reacciona con el blanqueador peroxigenado como el peróxido de hidrógeno para formar un perácido. El perácido así formado constituye el blanqueador activado. Los activadores de blanqueo adecuados que se van a usar en la presente invención incluyen los que pertenecen a la clase de ésteres, amidas, imidas o anhídridos. Ejemplos adecuados son tetracetil atilendiamina (TAED), 3,5,5 trimetil hexanoiloxibencenosulfonato de sodio, ácido diperoxi dodecanoico, 4-(dodecanoiloxi)bencenosulfonato (LOBS), 4-(decanoiloxi)bencenosulfonato, 4-(decanoiloxi) benzoato (DOBS), 4-(3,5,5-trimetilhexanoiloxi) bencenosulfonato (ISONOBS), tetraacetiletildiamina (TAED) y 4-(nonanoiloxi)bencenosulfonato (NOBS), y/o los descritos en WO98/17767. Una familia particular de activadores de blanqueo de interés se dio a conocer en EP624154 y, en ella, se prefiere particularmente el citrato de acetiltriethyl (ATC). El ATC o un triglicérido de cadena corta como la triacina tiene la ventaja de que es respetuoso con el medio ambiente ya que termina degradándose en ácido cítrico y alcohol. Además, el citrato de acetiltriethyl y la triacetina tienen una buena estabilidad hidrolítica en el producto tras el almacenamiento y son activadores eficaces del blanqueo. Por último, el ATC proporciona una buena capacidad adyuvante al aditivo de lavado. Alternativamente, el sistema de blanqueo puede comprender peroxiacidos, por ejemplo, del tipo amida, imida o sulfona. El sistema de blanqueo también puede comprender perácidos tales como ácido 6-(ftaloilamino)percaprónico (PAP). El sistema de blanqueo también puede incluir un catalizador de blanqueo. En algunas realizaciones, el componente de blanqueo puede ser un catalizador orgánico seleccionado del grupo que consiste en los catalizadores orgánicos que tienen las siguientes fórmulas:

(i)



(ii)



(iii) y mezclas de los mismos; en donde cada R^1 por separado es un grupo alquilo ramificado que contiene de 9 a 24 carbonos o un grupo alquilo lineal que contiene de 11 a 24 carbonos, preferiblemente cada R^1 por separado es un grupo alquilo ramificado que contiene de 9 a 18 carbonos o un grupo alquilo lineal que contiene de 11 a 18 carbonos, más preferiblemente cada R^1 se selecciona por separado del grupo que consiste en 2-propilheptilo, 2-butiloctilo, 2-pentilonilo, 2-hexildecilo, n-dodecilo, n-tetradecilo, n-hexadecilo, n-octadecilo, iso-nonilo, iso-decilo, iso-tridecilo e iso-pentadecilo. Otros sistemas de blanqueo ejemplares se describen, por ejemplo, en WO2007/087258, WO2007/087244, WO2007/087259, WO2007/087242. Los fotoblanqueadores adecuados pueden ser, por ejemplo, ftalocianina de zinc sulfonada

Polímeros

[0178] El detergente puede contener un 0-10 % en peso, como por ejemplo, un 0.5-5 %, un 2-5 %, un 0.5-2 % o un 0.2-1 % de un polímero. Se puede utilizar cualquier polímero conocido en la técnica para usar en detergentes. El polímero puede funcionar como coadyuvante tal como se mencionó anteriormente, o puede proporcionar propiedades antirredeposición, protección de fibras, liberación de suciedad, inhibición de transferencia de tintes, limpieza de grasa y/o propiedades antiespumantes. Algunos polímeros pueden tener más de una de las propiedades mencionadas anteriormente y/o más de uno de los motivos mencionados a continuación. Los ejemplos de polímeros incluyen (carboximetil)celulosa (CMC), poli(vinil alcohol) (PVA), poli(vinilpirrolidona) (PVP), poli(etilenglicol) o óxido de (poli)etileno (PEG), poli(etiliminina) etoxilada, carboximetil inulina (CMI) y policarboxilatos tales como PAA, PAA/PMA, ácido (poli)aspártico y copolímeros de lauril metacrilato/ácido acrílico, CMC modificado hidrofóticamente (HM-CMC) y siliconas, copolímeros de ácido tereftálico y glicoles

5 oligoméricos, copolímeros de tereftalato de polietileno y tereftalato de polioxieteno (PET-POET), PVP, poli(vinilimidazol) (PVI), poli(vinilpiridín-N-óxido) (PVPO o PVPNO) y polivinilpirrolidona-vinilimidazol (PVPVI). Otros ejemplos de polímeros incluyen policarboxilatos sulfonados, óxido de polietileno y óxido de polipropileno (PEO-PPO) y etoxisulfato de diquaternium. Otros ejemplos de polímeros se describen, por ejemplo, en WO 2006/130575. También se contemplan las sales de los polímeros mencionados anteriormente.

Agentes matizantes de tejidos

10 [0179] Las composiciones detergentes pueden incluir también agentes matizantes de tejidos tales como colorantes o pigmentos que, cuando se formulan en composiciones detergentes, pueden depositarse sobre un tejido cuando dicho tejido se pone en contacto con un líquido de lavado que comprende dichas composiciones detergentes alterando así el tinte de dicho tejido a través de la absorción/reflexión de la luz visible. Los agentes blanqueadores fluorescentes emiten al menos algo de luz visible. Por el contrario, los agentes matizantes de tejidos alteran el matiz de una superficie cuando absorben al menos una porción del espectro de luz visible. Los agentes matizantes de tejidos adecuados incluyen tintes y conjugados de tinte-arcilla, y también pueden incluir pigmentos. Los tintes adecuados incluyen tintes de molécula pequeña y tintes poliméricos. Los tintes de molécula pequeña adecuados incluyen tintes de molécula pequeña seleccionados del grupo que consiste en tintes que entran en las clasificaciones de índice de color (IC) azul directo, rojo directo, violeta directo, azul ácido, rojo ácido, violeta ácido, azul básico, violeta básico y rojo básico, o mezclas de los mismos, por ejemplo, tal como se describe en WO2005/03274, WO2005/03275, WO2005/03276 y EP1876226. Una composición detergente comprende preferiblemente de aproximadamente un 0.00003 % en peso a aproximadamente un 0.2 % en peso, de aproximadamente un 0.00008 % en peso a aproximadamente un 0.05 % en peso, o incluso de aproximadamente un 0.0001 % en peso a aproximadamente un 0.04 % en peso de agente matizante de tejido. La composición puede comprender de un 0.0001 % en peso a un 0.2 % en peso de agente matizante de tejidos, esto puede preferirse especialmente cuando la composición está en forma de bolsa de dosis unitaria. Los agentes matizantes adecuados también se describen, por ejemplo, en WO 2007/087257, WO2007/087243.

Enzimas adicionales

30 [0180] En una realización, las variantes según la invención se combinan con una o varias enzimas, por ejemplo, al menos dos enzimas, más preferiblemente al menos tres, cuatro o cinco enzimas. Preferiblemente, las enzimas tienen diferente especificidad de sustrato, por ejemplo, actividad proteolítica, actividad amilolítica, actividad lipolítica, actividad hemicelulítica o actividad pectolítica.

35 [0181] El aditivo de detergente así como la composición detergente pueden comprender una o más enzimas adicionales tales como enzimas activas en carbohidratos como la carbohidrasa, la pectinasa, la mananasa, la amilasa, la celulasa, la arabinasa, la galactanasa, la xilanasas o la proteasa, la lipasa, la cutinasa, la oxidasa, *p. ej.*, la lacasa y/o la peroxidasa.

40 [0182] En general, las propiedades de la(s) enzima(s) seleccionada(s) deben ser compatibles con el detergente seleccionado (*es decir*, pH óptimo, compatibilidad con otros ingredientes enzimáticos y no enzimáticos, etc.), y la(s) enzima(s) deben estar presentes en cantidades eficaces.

Celulasas:

45 [0183] Las celulasas adecuadas incluyen las de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen mutantes modificados químicamente o modificados por ingeniería de proteínas. Las celulasas adecuadas incluyen celulasas de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Humicola*, *Fusarium*, *Thielavia*, *Acremonium*, *por ejemplo*, las celulasas fúngicas producidas a partir de *Humicola insolens*, *Myceliophthora thermophila* y *Fusarium oxysporum* descritas en EE.UU. 4.435.307, EE.UU. 5.648.263, EE.UU. 5.691.178, EE.UU. 5.776.757 y WO 89/09259.

50 [0184] Las celulasas especialmente adecuadas son las celulasas alcalinas o neutras que tienen beneficios para el cuidado del color. Ejemplos de dichas celulasas son las celulasas descritas en EP 0 495 257, EP 0 531 372, WO 96/11262, WO 96/29397, WO 98/08940. Otros ejemplos son variantes de celulasa como las descritas en WO 94/07998, EP 0 531 315, EE. UU. 5.457.046, EE. UU. 5.686.593, EE. UU. 5.763.254, WO 95/24471, WO 98/12307 y WO99/001544.

60 [0185] Otras celulasas son la enzima endo-beta-1,4-glucanasa que tiene una secuencia de al menos un 97 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la posición 1 a la posición 773 de la SEQ ID N.º: 2 de WO 2002/099091 o una xiloglucanasa de la familia 44, con una enzima xiloglucanasa que tiene una secuencia de al menos un 60 % de identidad con las posiciones 40-559 de la SEQ ID N.º: 2 de WO 2001/062903.

[0186] Las celulasas disponibles comercialmente incluyen Celluzyme™ y Carezyme™ (Novozymes A/S) Carezyme Premium™ (Novozymes A/S), Celluclean™ (Novozymes A/S), Celluclean Classic™ (Novozymes

A/S), Cellusoft™ (Novozymes A/S), Whitezyme™ (Novozymes A/S), Clazinase™ y Puradax HA™ (Genencor International Inc.) y KAC-500(B)™ (Kao Corporation).

Mananasas

5

[0187] Las mananasas adecuadas incluyen las de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen mutantes modificados química o genéticamente. La mananasa puede ser una mananasa alcalina de la familia 5 o 26. Puede ser un tipo salvaje de *Bacillus* o *Humicola* particularmente *B. agaradhaerens*, *B. licheniformis*, *B. halodurans*, *B. clausii*, o *H. insolens*. Las mananasas adecuadas se describen en WO 1999/064619. Una mananasa disponible comercialmente es Mannaway (Novozymes A/S).

10

Proteasas:

15

[0188] Las proteasas adecuadas incluyen las de origen bacteriano, fúngico, vegetal, vírico o animal, p. ej., de origen vegetal o microbiano. Se prefiere el origen microbiano. Se incluyen mutantes modificados químicamente o modificados por ingeniería de proteínas. Puede ser una proteasa alcalina, por ejemplo, una serina proteasa o una metaloproteasa. Una serina proteasa puede ser, por ejemplo, de la familia S1, como la tripsina, o de la familia S8, como la subtilisina. Una proteasa de metaloproteasas puede ser, por ejemplo, una termolisina de, p. ej., la familia M4 u otra metaloproteasa como las de las familias M5, M7 o M8.

20

[0189] El término "subtilasas" se refiere a un subgrupo de serina proteasa según Siezen et al., Protein Eng. 4 (1991) 719-737 y Siezen et al. Protein Science 6 (1997) 501-523. Las serina proteasas son un subgrupo de proteasas que se caracterizan por tener una serina en el sitio activo, que forma un aducto covalente con el sustrato. Las subtilasas se pueden repartir en 6 subdivisiones, es decir, la familia de la subtilisina, la familia de la termitasa, la familia de la proteinasa K, la familia de la peptidasa lantibiótica, la familia de la kexina y la familia de la pirrolisina.

25

[0190] Ejemplos de subtilasas son las derivadas de *Bacillus* tales como *Bacillus lentus*, *B. alkalophilus*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus* y *Bacillus gibsonii* descritas en EE. UU. 7262042 y WO09/021867 y de *subtilisina lentus*, *subtilisina Novo*, *subtilisina Carlsberg*, *Bacillus licheniformis*, *subtilisina BPN'*, *subtilisina 309*, *subtilisina 147* y *subtilisina 168* descritas en WO89/06279 y de proteasa PD138 descrita en (WO93/18140). Otras proteasas útiles pueden ser las descritas en WO92/175177, WO01/016285, WO02/026024 y WO02/016547. Ejemplos de proteasas de tipo tripsina son la tripsina (por ejemplo, de origen porcino o bovino) y la proteasa de *Fusarium* descrita en WO89/06270, WO94/25583 y WO05/040372, y las quimotripsina proteasas derivadas de *Cellulomonas* descrito en WO05/052161 y WO05/052146.

30

35

[0191] Otra proteasa preferida es la proteasa alcalina de *Bacillus lentus* DSM 5483, tal como se describe, por ejemplo, en WO95/23221, y variantes de la misma que se describen en WO92/21760, WO95/23221, EP1921147 y EP1921148.

40

[0192] Ejemplos de metaloproteasas son la metaloproteasa neutra según se describe en WO07/044993 (Genencor Int.) tal como los derivados de *Bacillus amyloliquefaciens*. Ejemplos de proteasas útiles son las variantes descritas en: WO92/19729, WO96/034946, WO98/20115, WO98/20116, WO99/011768, WO01/44452, WO03/006602, WO04/03186, WO04/041979, WO07/006305, WO11/036263, WO11/036264, especialmente las variantes con sustituciones en una o más de las siguientes posiciones: 3, 4, 9, 15, 27, 36, 57, 68, 76, 87, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 106, 118, 120, 123, 128, 129, 130, 160, 167, 170, 194, 195, 199, 205, 206, 217, 218, 222, 224, 232, 235, 236, 245, 248, 252 y 274 utilizando la numeración BPN'. Las variantes de proteasa más preferidas pueden comprender las mutaciones: S3T, V4I, S9R, A15T, K27R, *36D, V68A, N76D, N87S,R, *97E, A98S, S99G,D,A, S99AD, S101G,M,R S103A, V104I,Y,N, S106A, G118V,R, H120D,N, N123S, S128L, P129Q, S130A, G160D, Y167A, R170S, A194P, G195E, V199M, V205I, L217D, N218D, M222S, A232V, K235L, Q236H, Q245R, N252K, T274A (usando la numeración BPN').

45

50

[0193] Las enzimas proteasas adecuadas disponibles comercialmente incluyen las que se venden con los nombres comerciales Alcalase®, Duralase™, Durazym™, Relase®, Relase® Ultra, Savinase®, Savinase® Ultra, Primase®, Polazyme®, Kannase®, Liqunase®, Liqunase® Ultra, BLAZE®, Ovozyme®, Coronase®, Coronase® Ultra, Neutrase®, Everlase® y Esperase® (Novozymes A/S), las que se venden con los nombres comerciales Maxatase®, Maxacal®, Maxapem®, Purafect®, Purafect Prime®, Purafect MA®, Purafect Ox®, Purafect OxP®, Puramax®, Properase®, FN2® , FN3®, FN4®, Excellase®, Eraser®, Opticlean® y Optimase® (Danisco/DuPont), Axapem™ (Gist-Brocases NV), BLAP (secuencia mostrada en la figura 29 de US5352604) y sus variantes (Henkel AG) y KAP (subtilisina de *Bacillus alkalophilus*) de Kao.

60

Lipasas y cutinasas:

65

[0194] Las lipasas y cutinasas adecuadas incluyen las de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen enzimas

mutantes modificadas químicamente o mediante ingeniería de proteínas. Los ejemplos incluyen la lipasa de *Thermomyces*, p. ej. de *T. lanuginosus* (anteriormente llamada *Humicola lanuginosa*) tal como se describe en EP258068 y EP305216, la cutinasa de *Humicola*, p. ej. *H. insolens* (WO96/13580), la lipasa de cepas de *Pseudomonas* (algunas de estas ahora se llaman *Burkholderia*), p. ej., *P. alcaligenes* o *P. pseudoalcaligenes* (EP218272), *P. cepacia* (EP331376), *P. sp.* cepa SD705 (WO95/06720 y WO96/27002), *P. wisconsinensis* (WO96/12012), las lipasas tipo GDSL de *Streptomyces* WO10/065455), la cutinasa de *Magnaporthe grisea* (WO10/107560), la cutinasa de *Pseudomonas mendocina* (EE. UU. 5.389.536), la lipasa de *Thermobifida fusca* (WO11/084412), la lipasa de *Geobacillus stearothermophilus* WO11/084417), la lipasa de *Bacillus subtilis* (WO11/084599) y la lipasa de *Streptomyces griseus* (WO11/150157) y *S. pristinaespiralis* (WO12/137147).

[0195] Otros ejemplos son variantes de lipasa como las descritas en EP407225, WO92/05249, WO94/01541, WO94/25578, WO95/14783, WO95/30744, WO95/35381, WO95/22615, WO96/00292, WO97/04079, WO97/07202, WO00/34450, WO00/60063, WO01/92502, WO07/87508 y WO09/109500.

[0196] Los productos de lipasa comerciales preferidos incluyen LipolasaTM, LipexTM, LipolexTM y LipocleanTM (Novozymes A/S), Lumafast (originalmente de Genencor) y Lipomax (originalmente de Gist-Brocades).

[0197] Otros ejemplos son las lipasas a veces denominadas aciltransferasas o perhidrolasas, p. ej., aciltransferasas con homología con la lipasa A de *Candida antarctica* (WO10/111143), aciltransferasa de *Mycobacterium smegmatis* (WO05/56782), perhidrolasas de la familia CE 7 (WO09/67279), y variantes de la perhidrolasa de *M. smegmatis* en particular la variante S54V utilizada en el producto comercial Gentle Power Bleach de Huntsman Textile Effects Pte Ltd (WO10/100028).

Amilasas:

[0198] Las amilasas adecuadas que pueden usarse junto con las variantes de la invención pueden ser una alfa-amilasa o una glucoamilasa y pueden ser de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen mutantes modificados químicamente o modificados por ingeniería de proteínas. Las amilasas incluyen, por ejemplo, alfa-amilasas obtenidas a partir de *Bacillus*, por ejemplo, una cepa especial de *Bacillus licheniformis*, descrita con más detalle en GB 1.296.839.

[0199] Las amilasas adecuadas incluyen amilasas que tienen la SEQ ID N.º: 2 en WO 95/10603 o variantes que tienen una identidad de secuencia del 90 % con la SEQ ID N.º: 3 de la misma. Las variantes preferidas se describen en WO 94/02597, WO 94/18314, WO 97/43424 y la SEQ ID N.º: 4 de WO 99/019467, por ejemplo, variantes con sustituciones en una o más de las siguientes posiciones: 15, 23, 105, 106, 124, 128, 133, 154, 156, 178, 179, 181, 188, 190, 197, 201, 202, 207, 208, 209, 211, 243, 264, 304, 305, 391, 408 y 444.

[0200] Las diferentes amilasas adecuadas incluyen amilasas que tienen la SEQ ID N.º: 6 en WO 02/010355 o variantes de la misma que tienen una identidad de secuencia del 90 % con la SEQ ID N.º: 6. Las variantes preferidas de la SEQ ID N.º: 6 son aquellas que tienen una delección en las posiciones 181 y 182 y una sustitución en la posición 193.

[0201] Otras amilasas adecuadas son la alfa-amilasa híbrida que comprende los residuos 1-33 de la alfa-amilasa derivada de *B. amyloliquefaciens* mostrada en la SEQ ID N.º: 6 de WO 2006/066594 y los residuos 36-483 de la alfa-amilasa de *B. licheniformis* mostrada en la SEQ ID N.º: 4 de WO 2006/066594 o variantes de las mismas que tienen una identidad de secuencia del 90 %. Las variantes preferidas de esta alfa-amilasa híbrida son aquellas que tienen una sustitución, una delección o una inserción en una o más de las siguientes posiciones: G48, T49, G107, H156, A181, N190, M197, 1201, A209 y Q264. Las variantes más preferidas de la alfa-amilasa híbrida que comprende los residuos 1-33 de la alfa-amilasa derivada de *B. amyloliquefaciens* mostrada en la SEQ ID N.º: 6 de WO 2006/066594 y los residuos 36-483 de la SEQ ID N.º: 4 son las que tienen las sustituciones:

M197T;
H156Y + A181T + N190F + A209V + Q264S; o
G48A + T49I + G107A + H156Y + A181T + N190F + I201F + A209V + Q264S.

[0202] Otras amilasas adecuadas son las amilasas que tienen la SEQ ID N.º: 6 en WO 99/019467 o variantes de la misma que tienen una identidad de secuencia del 90 % con la SEQ ID N.º: 6. Las variantes preferidas de la SEQ ID N.º: 6 son aquellas que tienen una sustitución, una delección o una inserción en una o más de las siguientes posiciones: R181, G182, H183, G184, N195, I206, E212, E216 y K269. Las amilasas particularmente preferidas son las que tienen una delección en las posiciones R181 y G182, o en las posiciones H183 y G184.

[0203] Las amilasas adicionales que se pueden usar son las que tienen la SEQ ID N.º: 1, la SEQ ID N.º: 3, la SEQ ID N.º: 2 o la SEQ ID N.º: 7 de WO 96/023873 o variantes de las mismas que tienen una identidad de secuencia del 90 % con la SEQ ID N.º: 1, la SEQ ID N.º: 2, la SEQ ID N.º: 3 o la SEQ ID N.º: 7. Las variantes

preferidas de la SEQ ID N.º: 1, la SEQ ID N.º: 2, la SEQ ID N.º: 3 o la SEQ ID N.º: 7 son aquellas que tienen una sustitución, una delección o una inserción en una o más de las siguientes posiciones: 140, 181, 182, 183, 184, 195, 206, 212, 243, 260, 269, 304 y 476, usando la SEQ ID 2 de WO 96/023873 para su numeración. Las variantes más preferidas son aquellas que tienen una delección en dos posiciones seleccionadas de 181, 182, 183 y 184, tales como 181 y 182, 182 y 183, o las posiciones 183 y 184. Las variantes de amilasa más preferidas de la SEQ ID N.º: 1, la SEQ ID N.º: 2 o la SEQ ID N.º: 7 son aquellas que tienen una delección en las posiciones 183 y 184 y una sustitución en una o más de las posiciones 140, 195, 206, 243, 260, 304 y 476.

[0204] Otras amilasas que pueden usarse son las amilasas que tienen la SEQ ID N.º: 2 de WO 08/153815, la SEQ ID N.º: 10 en WO 01/66712 o variantes de las mismas que tienen una identidad de secuencia del 90 % con la SEQ ID N.º: 2 de WO 08/153815 o una identidad de secuencia del 90 % con la SEQ ID N.º: 10 de WO 01/66712. Las variantes preferidas de la SEQ ID N.º: 10 en WO 01/66712 son aquellas que tienen una sustitución, una delección o una inserción en una o más de las siguientes posiciones: 176, 177, 178, 179, 190, 201, 207, 211 y 264.

[0205] Otras amilasas adecuadas son las amilasas que tienen la SEQ ID N.º: 2 de WO 09/061380 o variantes que tienen una identidad de secuencia del 90 % con la SEQ ID N.º: 2 de la misma. Las variantes preferidas de la SEQ ID N.º: 2 son aquellas que tienen un truncamiento del C-terminal, una sustitución, una delección o una inserción en una o más de las siguientes posiciones: Q87, Q98, S125, N128, T131, T165, K178, R180, S181, T182, G183, M201, F202, N225, S243, N272, N282, Y305, R309, D319, Q320, Q359, K444 y G475. Las variantes más preferidas de la SEQ ID N.º: 2 son aquellas que tienen la sustitución en una o más de las siguientes posiciones: Q87E,R, Q98R, S125A, N128C, T131I, T165I, K178L, T182G, M201L, F202Y, N225E,R, N272E,R, S243Q,A,E,D, Y305R, R309A, Q320R, Q359E, K444E y G475K y/o la delección en la posición R180 y/o S181 o de T182 y/o G183. Las variantes de amilasa más preferidas de la SEQ ID N.º: 2 son las que tienen las sustituciones:

N128C + K178L + T182G + Y305R + G475K;

N128C + K178L + T182G + F202Y + Y305R + D319T + G475K;

S125A + N128C + K178L + T182G + Y305R + G475K; o

S125A + N128C + T131I + T165I + K178L + T182G + Y305R + G475K donde las variantes están truncadas en el C-terminal y opcionalmente comprenden además una sustitución en la posición 243 y/o una delección en las posiciones 180 y/o 181.

[0206] Otras amilasas adecuadas son las amilasas que tienen la SEQ ID N.º: 1 de WO13184577 o variantes que tienen una identidad de secuencia del 90 % con la SEQ ID N.º: 1 de la misma. Las variantes preferidas de la SEQ ID N.º: 1 son aquellas que tienen una sustitución, una delección o una inserción en una o más de las siguientes posiciones: K176, R178, G179, T180, G181, E187, N192, M199, I203, S241, R458, T459, D460, G476 y G477. Las variantes más preferidas de la SEQ ID N.º: 1 son aquellas que tienen la sustitución en una o más de las siguientes posiciones: K176L, E187P, N192FYH, M199L, I203YF, S241QADN, R458N, T459S, D460T, G476K y G477K y/o la delección en la posición R178 y/o S179 o de T180 y/o G181. Las variantes de amilasa más preferidas de la SEQ ID N.º: 1 son las que tienen las sustituciones:

E187P + I203Y + G476K

E187P + I203Y + R458N + T459S + D460T + G476K,

donde las variantes opcionalmente comprenden además una sustitución en la posición 241 y/o una delección en la posición 178 y/o la posición 179.

[0207] Otras amilasas adecuadas son las amilasas que tienen la SEQ ID N.º: 1 de WO10104675 o variantes que tienen una identidad de secuencia del 90 % con la SEQ ID N.º: 1 de la misma. Las variantes preferidas de la SEQ ID N.º: 1 son aquellas que tienen una sustitución, una delección o una inserción en una o más de las siguientes posiciones: N21, D97, V128, K177, R179, S180, I181, G182, M200, L204, E242, G477 y G478. Las variantes más preferidas de la SEQ ID N.º: 1 son aquellas que tienen la sustitución en una o más de las siguientes posiciones: N21D, D97N, V128I, K177L, M200L, L204YF, E242QA, G477K y G478K y/o la delección en la posición R179 y/o S180 o de I181 y/o G182. Las variantes de amilasa más preferidas de la SEQ ID N.º: 1 son las que tienen las sustituciones:

N21D + D97N + V128I,

donde las variantes opcionalmente comprenden además una sustitución en la posición 200 y/o una delección en la posición 180 y/o la posición 181.

[0208] Otras amilasas adecuadas son las alfa-amilasas que tienen la SEQ ID N.º: 12 de WO01/66712 o una variante que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID N.º: 12. Las variantes preferidas de amilasa son aquellas que tienen una sustitución, una delección o una inserción en una o más de las siguientes posiciones de la SEQ ID N.º: 12 en WO01/66712: R28, R118, N174; R181, G182, D183, G184, G186, W189, N195, M202, Y298, N299, K302, S303, N306, R310, N314; R320, H324, E345, Y396, R400, W439, R444, N445,

5 K446, Q449, R458, N471, N484 Las amilasas particularmente preferidas incluyen variantes que tienen una delección de D183 y G184 y que tienen las sustituciones R118K, N195F, R320K y R458K, y una variante que además tiene sustituciones en una o más posiciones seleccionadas del grupo: M9, G149, G182, G186, M202, T257, Y295, N299, M323, E345 y A339, lo más preferido es una variante que además tiene sustituciones en todas estas posiciones.

[0209] Otros ejemplos son variantes de amilasa como las descritas en WO2011/098531, WO2013/001078 y WO2013/001087.

10 [0210] Las amilasas disponibles comercialmente son Duramyl™, Termamyl™, Fungamyl™, Stainzyme™, Stainzyme Plus™, Natalase™, Liquozyme X y BAN™ (de Novozymes A/S), y Rapidase™, Purastar™/Effectenz™, Powerase, Preferenz S1000, Preferenz S100 y Preferenz S110 (de Genencor International Inc./DuPont).

15 Peroxidasas/oxidadas:

20 [0211] Las peroxidasas/oxidadas adecuadas incluyen las de origen vegetal, bacteriano o fúngico. Se incluyen mutantes modificados químicamente o modificados por ingeniería de proteínas. Los ejemplos de peroxidasas útiles incluyen peroxidasas de *Coprinus*, por ejemplo, de *C. cinereus*, y variantes de las mismas como las descritas en WO 93/24618, WO 95/10602y WO 98/15257.

[0212] Las peroxidasas disponibles comercialmente incluyen Guardzyme™ (Novozymes A/S).

25 Otras enzimas:

[0213] Una variante de proteasa según la invención también se puede combinar con enzimas adicionales tales como pectato liasas, p. ej., Pectawash™, clorofilasas, etc. La variante de proteasa de la invención puede mezclarse con cualquier enzima adicional.

30 [0214] La enzima o enzimas detergentes pueden incluirse en una composición detergente añadiendo aditivos separados que contengan una o más enzimas, o añadiendo un aditivo combinado que comprenda todas estas enzimas. Un aditivo de detergente, es decir, un aditivo separado o un aditivo combinado, puede formularse, por ejemplo, como un granulado, un líquido, una suspensión, etc. Las formulaciones de aditivos de detergentes preferidas son granulados, en particular granulados no pulverulentos, líquidos, en particular líquidos estabilizados, o suspensiones.

35 [0215] Los granulados no pulverulentos se pueden producir, p. ej., como se describe en EE.UU. 4.106.991 y 4.661.452 y opcionalmente pueden recubrirse a través de métodos conocidos en la técnica. Ejemplos de materiales de recubrimiento ceroso son productos de poli(oxietileno) (polietilenglicol, PEG) con pesos molares medios de 1000 a 20 000; nonilfenoles etoxilados que tienen de 16 a 50 unidades de óxido de etileno; alcoholes grasos etoxilados en los que el alcohol contiene de 12 a 20 átomos de carbono y en los que hay de 15 a 80 unidades de óxido de etileno; alcoholes grasos; ácidos grasos; y mono-, di- y triglicéridos de ácidos grasos. Ejemplos de materiales de revestimiento formadores de películas adecuados para aplicación mediante técnicas de lecho fluidificado se dan en GB 1483591. Los preparados enzimáticos líquidos pueden, por ejemplo, estabilizarse añadiendo un poliol tal como propilenglicol, un azúcar o alcohol de azúcar, ácido láctico o ácido bórico según métodos establecidos. Las enzimas protegidas pueden prepararse de acuerdo con el método descrito en EP 238.216.

50 Materiales adjuntos

55 [0216] Se puede utilizar cualquier componente detergente conocido en la técnica para usar en detergentes para la ropa. Otros componentes detergentes opcionales incluyen agentes anticorrosión, agentes antiencogimiento, agentes contra la redeposición de suciedad, agentes antiarrugas, bactericidas, aglutinantes, inhibidores de corrosión, desintegrantes/agentes de desintegración, colorantes, estabilizadores enzimáticos (incluyendo ácido bórico, boratos, CMC y/o polioles tales como propilenglicol), acondicionadores de tejidos incluyendo arcillas, rellenos/auxiliares de procesamiento, agentes blanqueadores fluorescentes/blanqueantes ópticos, reforzadores de espuma, reguladores de espuma (jabonosa), perfumes, agentes de suspensión de suciedad, suavizantes, supresores de espuma, inhibidores de deslustrado y agentes de absorción, ya sea solos o en combinación. Puede utilizarse cualquier ingrediente conocido en la técnica para su uso en detergentes para la

60 [0217] La elección de dichos ingredientes está dentro de la capacidad del artesano.

[0218] Dispersantes Las composiciones detergentes también pueden contener dispersantes. En particular, los

detergentes en polvo pueden comprender dispersantes. Los materiales orgánicos solubles en agua adecuados incluyen los ácidos homo- 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. Los dispersantes adecuados se describen, por ejemplo, en Powdered Detergents, Surfactant science series volumen 71, Marcel Dekker, Inc.

5 [0219] Agentes inhibidores de la transferencia de tinte - Las composiciones detergentes también pueden incluir uno o más agentes inhibidores de la transferencia de tinte. Los agentes poliméricos adecuados inhibidores de la transferencia de colorantes incluyen, entre otros, polímeros de polivinilpirrolidona, polímeros de N-óxido de poliamina, copolímeros de N-vinilpirrolidona y N-vinilimidazol, poliviniloxazolidonas y polivinilimidazoles o mezclas de los mismos. Cuando están presentes en una composición, los agentes inhibidores de la transferencia de tinte pueden estar presentes en niveles de aproximadamente un 0.0001 % a aproximadamente un 10 %, de aproximadamente un 0.01 % a aproximadamente un 5 % o incluso de aproximadamente un 0.1 % a aproximadamente un 3 % en peso de la composición.

15 [0220] Agente blanqueador fluorescente - Las composiciones detergentes preferiblemente también contendrán componentes adicionales que pueden teñir los artículos que se están limpiando, tales como un agente blanqueador fluorescente o blanqueantes ópticos. Cuando está presente, el blanqueador está preferiblemente en un nivel de aproximadamente un 0.01 % a aproximadamente un 0.5 %. En la composición se puede usar cualquier agente blanqueador fluorescente adecuado para su uso en una composición de detergente de lavandería. Los agentes blanqueadores fluorescentes más comúnmente usados son los que pertenecen a las clases de derivados de ácido diamino estilbeno sulfónico, derivados de diarilpirazolina y derivados de bisfenil-distirilo. Ejemplos del tipo derivado del ácido diamino estilbeno sulfónico de agentes blanqueadores fluorescentes incluyen las sales de sodio de: 4,4'-bis-(2-dietanolamino-4-anilino-s-triazin-6-ilamino) estilbeno-2,2'-disulfonato; 4,4'-bis-(2,4-dianilino-s-triazin-6-ilamino) estilbeno-2,2'-disulfonato; 4,4'-bis-(2-anilino-4-(N-metil-N-2-hidroxi-etilamino)-s-triazin-6-ilamino) estilbeno-2,2'-disulfonato, 4,4'-bis-(4-fenil-2,1,3-triazol-2-il) estilbeno-2,2'-disulfonato; 4,4'-bis-2-(2-anilino-4-(1-metil-2-hidroxi-etilamino)-s-triazin-6-ilamino) estilbeno-2,2'-disulfonato y 2-(estilbil-4"-nafto-1',2',4,5)-1,2,3-triazol-2"-sulfonato. Los agentes blanqueadores fluorescentes preferidos son Tinopal DMS y Tinopal CBS disponibles en Ciba-Geigy AG, Basilea, Suiza. Tinopal DMS es la sal disódica del 4,4'-bis-(2-morfolino-4-anilino-s-triazin-6-ilamino) estilbeno disulfonato. Tinopal CBS es la sal disódica del 2,2'-bis-(fenil-estiril) disulfonato. También se prefieren los agentes blanqueadores fluorescentes como el Parawhite KX disponible comercialmente, suministrado por Paramount Minerals and Chemicals, Mumbai, India. Otros agentes fluorescentes adecuados para su uso incluyen las 1-3-diaril pirazolininas y las 7-alkilaminocumarinas.

35 [0221] Los niveles adecuados de blanqueador fluorescente incluyen desde niveles inferiores de aproximadamente un 0.01, de un 0.05, de aproximadamente un 0.1 o incluso de aproximadamente un 0.2 % en peso hasta niveles superiores de un 0.5 o incluso de un 0.75 % en peso.

40 [0222] Polímeros antimanchas - La composición detergente también puede incluir uno o más polímeros antimanchas que ayudan a eliminar la suciedad de tejidos tales como tejidos con base de algodón y poliéster, en particular a eliminar la suciedad hidrófoba de tejidos con base de poliéster. Los polímeros antimanchas pueden ser, por ejemplo, polímeros no iónicos o aniónicos con base de tereftalato, polivinil caprolactama y copolímeros relacionados, copolímeros de vinilo para injertos, poliamidas de poliéster, véase por ejemplo el capítulo 7 de Powdered Detergents, Surfactant science series volumen 71, Marcel Dekker, Inc. Otro tipo de polímeros anti manchados son los polímeros alcoxilados anfifílicos limpiadores de grasa que comprenden una estructura principal y una multitud de grupos alcoxilados unidos a esa estructura principal. La estructura principal puede comprender una estructura de polialquilenimina o una estructura de polialcanolamina como se describe en detalle en WO 2009/087523. Además, los copolímeros de injerto al azar son polímeros adecuados para la eliminación de suciedad. Los copolímeros de injerto adecuados se describen con más detalle en WO 2007/138054, WO 2006/108856 y WO 2006/113314. Otros polímeros antimanchas son estructuras de polisacáridos sustituidos, especialmente estructuras celulósicas sustituidas tales como derivados modificados de celulosa como los descritos en EP 1867808 o WO 2003/040279. Los polímeros celulósicos adecuados incluyen celulosa, éteres de celulosa, ésteres de celulosa, amidas de celulosa y mezclas de los mismos. Los polímeros celulósicos adecuados incluyen celulosa modificada aniómicamente, celulosa modificada no iónicamente, celulosa modificada catiónicamente, celulosa modificada zwitteriónicamente y mezclas de los mismos. Los polímeros celulósicos adecuados incluyen metilcelulosa, carboximetilcelulosa, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxilpropilmetilcelulosa, éster de carboximetilcelulosa y mezclas de los mismos.

60 [0223] Agentes antirredeposición - Las composiciones detergentes también pueden incluir uno o más agentes antirredeposición tales como carboximetilcelulosa (CMC), alcohol polivinílico (PVA), polivinilpirrolidona (PVP), polioxietileno y/o polietilenglicol (PEG), homopolímeros de ácido acrílico, copolímeros de ácido acrílico y maleico y polietileniminas etoxiladas. Los polímeros con base de celulosa descritos anteriormente en polímeros antimanchas pueden también funcionar como agentes antirredeposición.

65 [0224] Otros materiales adjuntos adecuados incluyen, entre otros, agentes antiencogimiento, agentes antiarrugas, bactericidas, aglutinantes, portadores, tintes, estabilizadores enzimáticos, suavizantes de tejidos,

rellenantes, reguladores de espuma, hidrótropos, perfumes, pigmentos, supresores de espuma, disolventes y estructurantes para detergentes líquidos y/o agentes de flexibilización de estructuras.

Formulación de productos detergentes

5

[0225] La composición detergente de la invención puede estar en cualquier forma conveniente, por ejemplo, una barra, una pastilla homogénea, una pastilla que tiene dos o más capas, una bolsa que tiene uno o más compartimentos, un polvo normal o compacto, un gránulo, una pasta, un gel o un líquido normal, compacto o concentrado. .

10

[0226] Formas de formulación de detergente: capas (fases iguales o diferentes), bolsas, frente a formas para la unidad de dosificación a máquina.

15

[0227] Las bolsas se pueden configurar como compartimentos individuales o múltiples. Pueden ser de cualquier forma y material adecuados para contener la composición, p. ej., sin permitir la liberación de la composición de la bolsa antes del contacto con el agua. La bolsa está hecha de una película soluble en agua que encierra un volumen interior. Dicho volumen interior se puede dividir en compartimentos de la bolsa. Las películas preferidas son materiales poliméricos preferiblemente polímeros que se forman como película o lámina. Los polímeros, copolímeros o derivados de los mismos preferidos son poliácridatos seleccionados y copolímeros de acrilato solubles en agua, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, dextrina sódica, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, maltodextrina, polimetacrilatos, más preferiblemente copolímeros de alcohol polivinílico e hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC). Preferiblemente, el nivel de polímero en la película, por ejemplo, PVA, es al menos de un 60 % aproximadamente. El peso molecular medio preferido será típicamente de aproximadamente 20 000 a aproximadamente 150 000. Las películas también pueden ser composiciones de mezcla que comprenden mezclas de polímeros hidrolíticamente degradables y solubles en agua tales como polilactida y alcohol polivinílico (conocidas bajo la referencia comercial M8630 tal como la vende Chris Craft In. Prod. de Gary, Indiana, EE. UU.) más plastificantes como glicerol, etilenglicerol, propilenglicerol, sorbitol y mezclas de los mismos. Las bolsas pueden comprender una composición sólida de limpieza de lavandería o componentes parciales y/o una composición limpiadora líquida o componentes parciales separados por la película soluble en agua. El compartimento para componentes líquidos puede tener una composición diferente a la de los compartimentos que contienen sólidos. Ref: (US2009/0011970 A1)

20

25

30

35

[0228] Los ingredientes de los detergentes pueden separarse físicamente entre sí mediante compartimentos en bolsas solubles en agua o en diferentes capas de pastillas. De este modo se puede evitar la interacción de almacenamiento negativa entre los componentes. Diferentes perfiles de disolución de cada uno de los compartimentos también pueden dar lugar a una disolución retardada de los componentes seleccionados en la solución de lavado.

40

Definición/características de las formas:

45

[0229] Un detergente líquido o en gel, que no tiene dosificación unitaria, puede ser acuoso, y normalmente contiene al menos un 20 % en peso y hasta un 95 % de agua, como, por ejemplo, hasta aproximadamente un 70 % de agua, hasta aproximadamente un 65 % de agua, hasta aproximadamente un 55 % de agua, hasta aproximadamente un 45 % de agua, hasta aproximadamente un 35 % de agua. En un líquido o gel acuoso se pueden incluir otros tipos de líquidos, que incluyen, sin limitación, alcanoles, aminas, dioles, éteres y polioles. Un detergente acuoso líquido o en gel puede contener de 0-30 % de disolvente orgánico.

50

[0230] Un detergente líquido o en gel puede ser no acuoso.

Métodos y usos

55

[0231] Las variantes de proteasa de la presente invención se pueden agregar y así convertirse en un componente de una composición detergente, donde dicha variante comprende una alteración en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 2, 4, 5, 6, 16, 17, 18, 19, 24, 27, 39, 41, 43, 47, 50, 57, 58, 59, 63, 64, 65, 67, 70, 85, 86, 87, 92, 97, 108, 109, 111, 112, 114, 116, 118, 126, 127, 129, 130, 131, 132, 142, 143, 144, 147, 148, 149, 155, 156, 174, 177, 184, 185, 186, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 206, 207, 212, 214, 215, 218, 219, 220, 222, 225, 234, 236, 241, 245, 246, 247, 248, 264, 267, 268, 269, 270, 272, 274, 278, 279, 286, 287, 288, 293, 297 o 311 de la SEQ ID N.º: 3, donde la variante tiene al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID N.º: 3. Las composiciones detergentes se utilizan generalmente en procesos de limpieza tales como lavandería y/o limpieza de superficies duras, p. ej., lavado de platos.

60

65

[0232] En el presente documento se describe una composición detergente, por ejemplo, una composición para lavar la ropa o para lavar platos que comprende una variante de proteasa de una proteasa progenitora que tiene al menos un 90 % de identidad con la SEQ ID N.º 3 en la que dicha variante comprende al menos una alteración

en comparación con dicha proteasa progenitora en un aminoácido que ocupa cualquiera de las posiciones: 2, 4, 5, 6, 16, 17, 18, 19, 24, 27, 39, 41, 43, 47, 50, 57, 58, 59, 63, 64, 65, 67, 70, 85, 86, 87, 92, 97, 108, 109, 111, 112, 114, 116, 118, 126, 127, 129, 130, 131, 132, 142, 143, 144, 147, 148, 149, 155, 156, 174, 177, 184, 185, 186, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 206, 207, 212, 214, 215, 218, 219, 220, 222, 225, 234, 236, 241, 245, 246, 247, 248, 264, 267, 268, 269, 270, 272, 274, 278, 279, 286, 287, 288, 293, 297 o 311 de la SEQ ID N.º 3 donde la variante tiene una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos un 90 % o al menos un 95 % con la SEQ ID N.º: 3.

[0233] Una composición detergente puede comprender al menos una variante donde dicha variante comprende S27K y una o más de las siguientes alteraciones: V2H, S4K, S4H, T5K, Q6K, N16K, N16H, D17N, Q18K, Q18H, S19K, T24K, T24H, T24R, Y39R, S41K, L43H, G47K, E50Q, E50T, E50L, Q57K, S58K, N59K, D63N, G64H, S65K, T67K, Q70H, G85R, G85H, S86K, N87K, Y92R, Q97K, D108N, D108S, D108A, N109K, S111K, S111R, G112R, S114K, D116S, D116A, A118R, A118K, D126G, D126W, D126K, E127Q, E127K, E127L, E127S, S129K, R130K, T131K, T131H, G132H, G142K, G142R, S143K, S143H, S144K, D147N, D147S, D147*, D147Q, D147H, D147W, S148K, L149K, D155H, Y156R, Y156H, G159H, G174R, G174H, T177K, L184H, V185K, N186K, N186R, E194*, E194S, E194K, E194Q, N195H, N195K, V196H, Q197K, Q197H, Q197R, Q198K, N199K, G200H, D206N, D206H, F207H, N212K, A214R, A214K, T215K, D218N, D218H, D218R, Y219R, Y219H, I220K, I220H, Q222K, D225N, A233R, S234K, E236C, T241K, N245K, T246K, I247K, S248K, I264R, A267H, N268K, N268H, T269K, T269H, S270K, S272K, S274K, T278K, T278H, E279Q, E279H, V286H, V286K, Y287R, Y287H, D288N, D288K, I293R, I293K, T297K, D299R y K311R de la SEQ ID N.º: 3, donde la variante tiene una identidad de secuencia con la SEQ ID N.º: 3 de al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID N.º: 3 y la variante tiene actividad de proteasa. Dicha variante de proteasa tiene preferiblemente una estabilidad detergente incrementada con respecto a la progenitora o con respecto a una proteasa progenitora que tiene la secuencia de aminoácidos idéntica de dicha variante pero que no tiene las sustituciones en una o más de dichas posiciones cuando se prueba en el ensayo B descrito en el ejemplo 2, tal como se describe en "Materiales y métodos".

[0234] Una composición detergente puede formularse, por ejemplo, como una composición detergente para lavado de ropa a mano o a máquina, que incluye una composición de aditivo para lavado de ropa adecuada para el pretratamiento de telas manchadas y una composición suavizante de telas añadida en el enjuague, o puede formularse como una composición detergente para uso en operaciones domésticas de limpieza general de superficies duras, o formularse para operaciones de lavado de vajillas a mano o a máquina.

[0235] Un proceso de limpieza o un proceso de cuidado textil pueden ser, por ejemplo, un proceso de lavado de ropa, un proceso de lavado de vajillas o la limpieza de superficies duras como baldosas de baño, suelos, tableros de mesa, desagües, fregaderos y lavabos. Los procesos de lavado pueden ser, por ejemplo, lavado doméstico, pero también pueden ser lavado industrial. Un proceso de lavado de tejidos y/o prendas puede ser un proceso que comprende tratar tejidos con una solución de lavado que contiene una composición detergente y al menos una variante de proteasa. Un proceso de limpieza o un proceso de cuidado textil se puede realizar, por ejemplo, en un proceso de lavado a máquina o a mano. La solución de lavado puede ser, por ejemplo, una solución de lavado acuosa que contiene una composición detergente.

[0236] Las telas y/o prendas sometidas a un proceso de lavado, limpieza o cuidado textil pueden ser ropa lavable convencional, por ejemplo ropa doméstica. Preferiblemente, la mayor parte de la colada son prendas y tejidos, incluidos tejidos de punto, telas tejidas, tela vaquera, telas no tejidas, fieltros, hilos y toallas. Los tejidos pueden tener base de celulosa, tales como tejidos celulósicos naturales, que incluyen algodón, linaza, lino, yute, ramio, sisal o bonote o tejidos celulósicos artificiales (por ejemplo, procedentes de pulpa de madera) que incluyen viscosa/rayón, ramio, fibras de acetato de celulosa (tricell), lyocell o mezclas de los mismos. Los tejidos también pueden tener base no celulósica, como poliamidas naturales que incluyen lana, camello, cachemir, mohair, conejo y seda o polímero sintético como nailon, aramida, poliéster, acrílico, polipropileno y spándex/elastano, o mezclas de los mismos, así como una mezcla de fibras con base celulósica y no celulósica. Ejemplos de mezclas son las mezclas de algodón y/o rayón/viscosa con uno o más materiales complementarios como lana, fibras sintéticas (por ejemplo, fibras de poliamida, fibras acrílicas, fibras de poliéster, fibras de alcohol polivinílico, fibras de cloruro de polivinilo, fibras de poliuretano, fibras de poliurea, fibras de aramida) y fibras que contienen celulosa (por ejemplo, rayón/viscosa, ramio, linaza, lino, yute, fibras de acetato de celulosa, lyocell).

[0237] En los últimos años ha habido un interés creciente en reemplazar componentes en detergentes, que se derivan de productos petroquímicos con componentes biológicos renovables como enzimas y polipéptidos sin comprometer el rendimiento del lavado. Cuando los componentes de las composiciones de detergente cambian, se necesitan nuevas actividades enzimáticas o nuevas enzimas con propiedades alternativas y/o mejoradas en comparación con las enzimas detergentes comúnmente utilizadas, como proteasas, lipasas y amilasas, para lograr un rendimiento de lavado similar o mejorado en comparación con el detergente tradicional. Composiciones

[0238] Las proteasas y variantes de las mismas se pueden utilizar en procesos de eliminación de manchas

proteínicas. Las manchas proteínicas pueden ser manchas tales como manchas de comida, por ejemplo, comida para bebés, sebo, cacao, huevo, sangre, leche, tinta, hierba o una combinación de las mismas.

[0239] Las composiciones típicas de detergente incluyen varios componentes además de las enzimas, estos componentes tienen diferentes efectos, algunos componentes como los surfactantes reducen la tensión superficial en el detergente, lo que permite que la mancha que se está limpiando se separe y se disperse y luego se elimine, otros componentes como los sistemas blanqueadores eliminan la decoloración a menudo mediante oxidación y muchos blanqueadores también tienen fuertes propiedades bactericidas y se utilizan para desinfectar y esterilizar. Incluso otros componentes como los adyuvantes y los quelantes suavizan, por ejemplo, el agua de lavado al eliminar los iones metálicos del líquido.

[0240] Las composiciones enzimáticas pueden comprender además al menos uno o más de los siguientes: un surfactante, un adyuvante, un quelante o agente quelante, un sistema blanqueador o un componente blanqueador en el lavado de ropa o vajilla.

[0241] La cantidad de surfactante, adyuvante, quelante o agente quelante, sistema blanqueador y/o componente blanqueador puede reducirse en comparación con la cantidad de surfactante, adyuvante, quelante o agente quelante, sistema blanqueador y/o componente blanqueador utilizado sin la variante de proteasa añadida de la invención. Preferiblemente, el componente que es un surfactante, un coadyuvante, un quelante o agente quelante, sistema blanqueador y/o componente blanqueador está presente en una cantidad que es un 1 % menos, tal como un 2 % menos, tal como un 3 % menos, tal como un 4 % menos, tal como un 5 % menos, tal como un 6 % menos, tal como un 7 % menos, tal como un 8 % menos, tal como un 9 % menos, tal como un 10 % menos, tal como un 15 % menos, tal como un 20 % menos, tal como un 25 % menos, tal como un 30 % menos, tal como un 35 % menos, tal como un 40 % menos, tal como un 45 % menos, tal como un 50 % menos que la cantidad del componente en el sistema sin el adición de variantes de proteasa de la invención, tales como una cantidad convencional de dicho componente. Las composiciones detergentes también pueden ser composiciones que están libres de al menos un componente que es un surfactante, un adyuvante, un quelante o agente quelante, sistema blanqueador o componente blanqueador y/o polímero.

Método de lavado

[0242] Las composiciones detergentes son ideales para su uso en aplicaciones de lavandería. Estos métodos incluyen un método para lavar un tejido. El método comprende los pasos de poner en contacto un tejido que se va a lavar con una solución limpiadora de lavandería que comprende una composición detergente. El tejido puede comprender cualquier tela que pueda lavarse en condiciones normales de uso por parte del consumidor. La solución tiene preferiblemente un pH de aproximadamente 5.5 a aproximadamente 11.5. Las composiciones se pueden emplear a concentraciones de aproximadamente 100 ppm, preferiblemente de 500 ppm a aproximadamente 15 000 ppm en disolución. Las temperaturas del agua suelen oscilar entre aproximadamente 5 °C y aproximadamente 95 °C, incluyendo aproximadamente 10 °C, aproximadamente 15 °C, aproximadamente 20 °C, aproximadamente 25 °C, aproximadamente 30 °C, aproximadamente 35 °C, aproximadamente 40 °C, aproximadamente 45 °C, aproximadamente 50 °C, aproximadamente 55 °C, aproximadamente 60 °C, aproximadamente 65 °C, aproximadamente 70 °C, aproximadamente 75 °C, aproximadamente 80 °C, aproximadamente 85 °C y aproximadamente 90 °C. La proporción de agua y tejido típicamente es de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 30:1.

[0243] En realizaciones particulares, el método de lavado se realiza a un pH de aproximadamente 5.0 a aproximadamente 11.5, o de aproximadamente 6 a aproximadamente 10.5, aproximadamente 5 a aproximadamente 11, aproximadamente 5 a aproximadamente 10, aproximadamente 5 a aproximadamente 9, aproximadamente 5 a aproximadamente 8, de aproximadamente 5 a aproximadamente 7, de aproximadamente 5.5 a aproximadamente 11, de aproximadamente 5.5 a aproximadamente 10, de aproximadamente 5.5 a aproximadamente 9, de aproximadamente 5.5 a aproximadamente 8, aproximadamente 5.5 a aproximadamente 7, aproximadamente 6 a aproximadamente 11, aproximadamente 6 a aproximadamente 10, aproximadamente 6 a aproximadamente 9, aproximadamente 6 a aproximadamente 8, aproximadamente 6 a aproximadamente 7, aproximadamente 6.5 a aproximadamente 11, aproximadamente 6.5 a aproximadamente 10, aproximadamente 6.5 a aproximadamente 9, aproximadamente 6.5 a aproximadamente 8, aproximadamente 6.5 a aproximadamente 7, aproximadamente 7 a aproximadamente 11, aproximadamente 7 a aproximadamente 10, aproximadamente 7 a aproximadamente 9, o aproximadamente 7 a aproximadamente 8, aproximadamente 8 a aproximadamente 11, aproximadamente 8 a aproximadamente 10, de aproximadamente 8 a aproximadamente 9, de aproximadamente 9 a aproximadamente 11, de aproximadamente 9 a aproximadamente 10, de aproximadamente 10 a aproximadamente 11, preferiblemente de aproximadamente 5.5 a aproximadamente 11.5.

[0244] En realizaciones particulares, el método de lavado se realiza a un grado de dureza de aproximadamente 0 °dH a aproximadamente 30 °dH, por ejemplo, aproximadamente 1 °dH, aproximadamente 2 °dH, aproximadamente 3 °dH, aproximadamente 4 °dH, aproximadamente 5 °dH, aproximadamente 6 °dH, aproximadamente 7 °dH, aproximadamente 8 °dH, aproximadamente 9 °dH, aproximadamente 10 °dH, aproximadamente 11 °dH, aproximadamente 12 °dH, aproximadamente 13 °dH, aproximadamente 14 °dH,

aproximadamente 15 °dH, aproximadamente 16 °dH, aproximadamente 17 °dH, aproximadamente 18 °dH, aproximadamente 19 °dH, aproximadamente 20 °dH, aproximadamente 21 °dH, aproximadamente 22 °dH, aproximadamente 23 °dH, aproximadamente 24 °dH, aproximadamente 25 °dH, aproximadamente 26 °dH, aproximadamente 27 °dH, aproximadamente 28 °dH, aproximadamente 29 °dH, aproximadamente 30 °dH. En condiciones típicas de lavado europeas, el grado de dureza es de aproximadamente 16 °dH, en condiciones de lavado típicas de EE. UU. aproximadamente 6 °dH y en condiciones de lavado típicas de Asia, aproximadamente 3 °dH.

[0245] Las composiciones para usar en los métodos descritos anteriormente pueden además comprender al menos una enzima adicional tal como se establece en la sección "otras enzimas" anterior, por ejemplo, una enzima seleccionada del grupo de las hidrolasas tales como proteasas, lipasas y cutinasas, carbohidrasas tales como amilasas, celulasas, hemicelulasas, xilanasas y pectinasas o una combinación de las mismas.

[0246] La presente invención se describe además mediante los siguientes ejemplos que no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención.

Ejemplos

Materiales y métodos

Ensayos de actividad de proteasa

1) Ensayo de actividad de Suc-AAPF-pNA:

[0247] La actividad proteolítica se puede determinar mediante un método que emplea el sustrato Suc-AAPF-pNA. Suc-AAPF-pNA es una abreviatura de N-succinil-alanina-alanina-prolina-fenilalanina-p-nitroanilida, y es un péptido bloqueado que puede ser escindido por endoproteasas. Después de la escisión, se libera una molécula de pNA libre que tiene color amarillo y, por lo tanto, puede medirse mediante espectrofotometría visible a una longitud de onda de 405 nm. El sustrato Suc-AAPF-PNA es fabricado por Bachem (nº de cat. L1400, disuelto en DMSO).

[0248] La muestra de proteasa sujeta a análisis se diluyó en tampón de actividad residual (Tris 100 mM pH 8.6). El ensayo se realizó transfiriendo 30 µl de muestras de enzima diluidas a una placa de microtitulación de 96 pocillos y añadiendo 70 µl de solución funcional de sustrato (0.72 mg/ml en Tris 100 mM, pH 8.6). La solución se mezcló a temperatura ambiente y la absorción se midió cada 20 segundos. durante 5 minutos a una DO de 405 nm.

[0249] La pendiente (absorbancia por minuto) de la curva de absorción dependiente del tiempo es directamente proporcional a la actividad de la proteasa en cuestión bajo el conjunto de condiciones dado. La muestra de proteasa debe diluirse hasta un nivel en el que la pendiente sea lineal.

Tabla 1: Composición del detergente modelo B	
Ingrediente	% en peso
Ácido (C10-C13) alquilbencenosulfónico	7.2
lauril éter sulfato sódico	10.6
ácido graso de cacao	2.75
ácido graso de soja	2.75
etoxilato de alcohol	6.6
hidróxido sódico	1.1
Etanol	3
propano-1,2-diol	6
Glicerol	1.7
Trietanolamina	3.3
formiato sódico	1
citrato sódico	2
ácido dietilentriaminapentakis(metilen)pentakis(fosfónico)	0.5

Tabla 1: Composición del detergente modelo B	
Ingrediente	% en peso
ácido copoli(acrílico/maleico)	0.5
agua de intercambio iónico	51

Métodos generales de biología molecular:

5 [0250] A menos que se indique lo contrario, las manipulaciones y transformaciones del ADN se realizaron utilizando métodos estándar de biología molecular (Sambrook et al. (1989); Ausubel et al. (1995); Harwood y Cutting (1990).

Ejemplo 1: Construcción de variantes de TY145 mediante mutagénesis dirigida

10 [0251] Se construyeron variantes dirigidas de la proteasa TY145 (SEQ ID N.º: 3) que comprende sustituciones específicas según la invención. Las variantes se obtuvieron mediante la clonación tradicional de fragmentos de ADN (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed., Cold Spring Harbor, 1989) utilizando PCR junto con oligonucleótidos mutagénicos adecuadamente diseñados que introdujeron las mutaciones deseadas en la secuencia resultante.

15 [0252] Se diseñaron oligonucleótidos mutagénicos correspondientes a la secuencia de ADN que flanquea el sitio o sitios de mutación deseados, separados por los pares de bases de ADN que definen las inserciones/delecciones/sustituciones, y se compraron a un proveedor de oligonucleótidos como Life Technologies. De esta manera, se construyeron y produjeron las variantes enumeradas en la tabla 2 a
20 continuación.

[0253] Para ensayar las variantes de proteasa TY145 de la invención, el ADN mutado que comprende una variante de la invención se transformó en una cepa competente de *B. subtilis* y se fermentó utilizando protocolos estándar (medio líquido, 3-4 días, 30 °C). El caldo de cultivo se centrifugó (26 000 x g, 20 min) y el sobrenadante se decantó cuidadosamente desde el precipitado. El sobrenadante se filtró a través de una unidad de filtración Nalgene de 0.2 µm para eliminar el resto de las células huésped de Bacillus. El filtrado de 0.2 µm se mezcló 1: 1 con (NH₄)₂SO₄ 3.0 M y la mezcla se aplicó a una columna de Phenyl-sepharose FF (high sub) (de GE Healthcare) equilibrada en H₃BO₃ 100 mM, MES/NaOH 10 mM, CaCl₂ 2 mM, (NH₄)₂SO₄ 1.5 M, pH 6.0. Después de lavar la columna con el tampón de equilibrado, la proteasa se eluyó por etapas con H₃BO₃ 100 mM, MES 10 mM, CaCl₂ 2 mM, pH 6.0. El pico eluido (que contiene la actividad de proteasa) se recogió y se aplicó a una columna de agarosa de bacitracina (de Upfront chromatography) equilibrada en H₃BO₃ 100 mM, MES 10 mM, CaCl₂ 2 mM, pH 6.0. Después de lavar a fondo la columna con el tampón de equilibrado, la proteasa se eluyó con H₃BO₃ 100 mM, MES 10 mM, CaCl₂ 2 mM, NaCl 1 M, pH 6.0 con 2-propanol del 25 % (v/v). El pico de elución (que contiene la actividad de proteasa) se transfirió a MES 20 mM, CaCl₂ 2 mM, pH 6.0 en una columna Sephadex G25 (de GE Healthcare). El pico transferido G25 fue la preparación purificada y se utilizó para experimentos adicionales.
25
30
35

Tabla 2a – Variantes de SEQ ID NO 3
V2H,S4K,S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P
S4K,S173P,S175P
S4K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P
S4K,S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P
S4K,S27K,I137E,S173P,S175P,F180Y,T297P
A1*,V2*,P3*,S4K,S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P
S4K,S27K,N87K,E127Q,G132H,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P
S4H,S173P,S175P
T5K,S173P,S175P
Q6K,S173P,S175P
N16K,S173P,S175P
N16K,D17N,S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P

ES 2 813 727 T3

Tabla 2a – Variantes de SEQ ID NO 3
N16H,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P
N16H,S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P
N16H,S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P
N16H,S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P
N16H,S27K,I137E,S173P,S175P,F180Y,T297P
D17N,S173P,S175P
D17N,I137E,S173P,S175P,F180Y,T297P
D17N,S173P,S175P,Q198E
D17N,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P
D17N,S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P
D17N,S27K,I137E,S173P,S175P,F180Y,T297P
Q18K,S173P,S175P
Q18K,S27K,E127Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P
S19K,S173P,S175P
T24K,S173P,S175P
T24H,S173P,S175P
S27K,S173P,S175P
S27K,I137E,S173P,S175P,F180Y,T297P
S27K,S173P,S175P,Q198E
S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P
S27K,S144R,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P
S27K,D147N,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P
S27K,E127Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P
S27K,E50Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P
S27K,N87K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P
S4K,S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P
S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,S270K,T297P
S27K,Q97K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P
D17N,S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P
N16H,S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P
N16H,S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P
N16H,S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P
S27K,I137E,S144R,S173P,S175P,F180Y,T297P
S27K,E127Q,I137E,S173P,S175P,F180Y,T297P
S27K,I137E,S173P,G174R,S175P,F180Y,T297P
S27K,Q97K,I137E,S173P,S175P,F180Y,T297P
D17N,S27K,I137E,S173P,S175P,F180Y,T297P
S27K,D126G,S173P,S175P,F180Y,T297P

ES 2 813 727 T3

Tabla 2a – Variantes de SEQ ID NO 3
Y39R,S173P,S175P
S27K,Y39R,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P
S27K,Y39R,I137E,S173P,S175P,F180Y,T297P
S27K,Y39R,N87K,I137E,S173P,S175P, F180Y,T297P
S27K,Y39R,I137E,S144R,S173P,S175P,F180Y,T297P
S27K,Y39R,I121V,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P
S41K,S173P,S175P
S27K,S41K,E127Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P
L43H,S173P,S175P
G47K,R130K,G132R,S173P,S175P
E50Q,S173P,S175P
E50Q,S173P,S175P,F180Y
E50Q,S173P,S175P,Q198E
E50Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P
S27K,E50Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P
E50T,S173P,S175P,F180Y
E50L,S173P,S175P,F180Y
G28N,Q57K,S86K,N87R,Q89R,S173P,S175P
S58K,S173P,S175P
S58K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P
N59K,S173P,S175P
D63N,S173P,S175P
D63E,R69D,S173P,S175P
G64H,S173P,S175P
S65K,S173P,S175P
S65K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P
S27K,S65K,S173P,S175P,F180Y,T297P
S27K,S65K,S173P,S175P,F180Y,T297P
T67K,S173P,S175P
Q70H,S173P,S175P,F180Y
G85R,S173P,S175P,F180Y
G85H,S173P,S175P,F180Y
S86K,S173P,S175P
N87K,S173P,S175P
N87K,I137E,S173P,S175P,F180Y,T297P
N87K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P
S27K,N87K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P
S27K,N87K,I137E,S173P,S175P,F180Y,T297P

ES 2 813 727 T3

Tabla 2a – Variantes de SEQ ID NO 3
S27K,N87K,N109S,S111R,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P
S27K,N59L,T67V,N87K,G107N,I121V,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P
S27K,N59L,T67V,N87K,G107N,I121V,E127Q,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P
S27K,Q70N,N87K,I121V,E127Q,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,N199R,T297P
Y92R,S173P,S175P,F180Y
Q97K,S173P,S175P
Q97K,I137E,S173P,S175P,F180Y,T297P
Q97K,S173P,S175P,Q198E
Q97K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P
S27K,Q97K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P
S27K,Q97K,I137E,S173P,S175P,F180Y,T297P
S27K,N59L,T67V,Q97K,G107N,I121V,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P
D108N,S173P,S175P
D108S,S173P,S175P
D108A,S173P,S175P
S27K,N109K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P
S111K,S173P,S175P
S27K,N109S,S111R,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P
S114K,S173P,S175P,F180Y
D116S,M139L,S173P,S175P
A118R,S173P,S175P,F180Y
S27K,S111R,A118R,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P
A118K,S173P,S175P,F180Y
D126G,S173P,S175P,F180Y
S27K,D126G,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P
S27K,D126G,E127Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P
D126W,S173P,S175P,F180Y
D126K,S173P,S175P,F180Y
Y113T,E127Q,S173P,G174K,S175P,F180Y
*109aS,E127Q,S173P,S175P,F180Y,T297P
E127Q,S173P,S175P,Q198E
E127Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P
S27K,E127Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P
S27K,D126G,E127Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P
S27K,E127Q,I137Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P
S27K,E127Q,S144R,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P
S27K,E127Q,V162S,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P
S27K,E127Q,V162E,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P

ES 2 813 727 T3

Tabla 2a – Variantes de SEQ ID NO 3
S27K,E127Q,V162Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P
S27K,E127Q,V162G,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P
S27K,E127Q,V162F,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P
S27K,E127Q,V162T,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P
S27K,E127Q,V162Y,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P
S27K,N109S,S111R,E127Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P
S27K,N109S,S111R,E127Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P
S27K,N59L,T67V,N87K,G107N,I121V,E127Q,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P
S27K,N87K,I121V,E127Q,S171N,S173P,S175P,F180Y,T297P
E127K,S173P,S175P,F180Y
E127L,S173P,S175P,F180Y
S129K,S173P,S175P
S41K,L43K,G47K,R130K,G132R,S173P,S175P
S41R,L43R,G47K,R130K,G132R,S173P,S175P
T131 K,S173P,S175P
G132H,S173P,S175P
G132H,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P
S143K,S173P,S175P
S144K,S173P,S175P
D147N,S173P,S175P
D147N,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P
S27K,D147N,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P
S27K,N109S,S111R,D147N,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P
D147S,S148A,L149T,I150L,S173P,S175P
A145S,K146P,D147S,S173P,S175P
A145S,K146P,D147S,S148A,S173P,S175P
S144P,A145S,K146P,D147S,S148A,L149T,I150L,S173P,S175P
D147S,L149T,S173P,S175P
K146P,D147S,S148A,L149T,I150L,S173P,S175P
A145S,K146P,D147S,S148A,L149T,S173P,S175P
S27K,K146E,D147S,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,Q198E,N199K,E223K,T297P
K146*,D147*,S173P,S175P
D147Q,S173P,S175P
D147Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P
D147H,S173P,S175P
S148K,S173P,S175P
L149K,S173P,S175P
D155H,S173P,S175P

ES 2 813 727 T3

Tabla 2a – Variantes de SEQ ID NO 3
Y156R,S173P,S175P
Y156R,S173P,S175P
Y156R,S173P,S175P
Y156R,S173P,S175P,Q198E
Y156R,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P
S4K,D17N,S27K,N59L,N87K,Y156R,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P
S4K,D17N,S27K,N59L,N87K,Y156R,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P
Y156H,S173P,S175P
G159H,S173P,S175P
S27K,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P
S27K,I137E,S173P,G174R,S175P,F180Y,T297P
S27K,N59L,T67V,N87K,S114V,I121V,I150L,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,T297P
S173P,S175P,T177K
S173P,S175P,F180Y,L184H
I137E,S173P,S175P,F180Y,V185K,T297P
I137E,S173P,S175P,F180Y,V185K,N186P,T297P
I137E,S173P,S175P,F180Y,V185K,N186D,T297P
I137E,S173P,S175P,F180Y,N186K,T297P
S173P,S175P,N186K
I137E,S173P,S175P,F180Y,N186R,T297P
S173P,S175P,E194*
S173P,S175P,E194*,Q198E
S173P,S175P,F180Y,E194*,Q198E,T297P
S173P,S175P,F180Y,E194S
S27K,E127Q,S173P,S175P,F180Y,E194S,Q198E,T297P
S173P,S175P,F180Y,E194K
S27K,E127Q,S173P,S175P,F180Y,E194K,Q198E,T297P
S27K,E127Q,S173P,S175P,F180Y,E194Q,Q198E,T297P
S173P,S175P,N195H
S27K,E127Q,S173P,S175P,F180Y,N195H,V196N,Q197*,Q198*,N199*,G200*,T201*,T297P
S173P,S175P,N195K
S173P,S175P,V196H
S173P,S175P,Q197K
S27K,S173P,S175P,F180Y,Q197K,T297P
S27K,S173P,S175P,F180Y,E194R,Q197K,Q198E,T297P
S27K,S173P,S175P,F180Y,Q197K,Q198E,T297P
S27K,E127Q,S173P,S175P,F180Y,Q197K,Q198E,T297P
S27K,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q197K,Q198E,T297P

ES 2 813 727 T3

Tabla 2a – Variantes de SEQ ID NO 3
S27K,N109S,S111R,S173P,S175P,F180Y,Q197K,Q198E,T297P
S27K,S173P,G174K,S175P,F180Y,L184F,Q197K,Q198E,T297P
I121V,S173P,S175P,F180Y,Q197K,Q198E,T297P
S173P,S175P,Q197H
S173P,S175P,F180Y,Q197R
S27K,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q197R,Q198E,T297P
S173P,S175P,Q198K
S173P,S175P,Q198K
S173P,S175P,N199K
S173P,S175P,N199K
S27K,S173P,S175P,F180Y,E194*,Q197K,Q198E,N199K,T297P
S27K,E127Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,N199K,T297P
S27K,E127Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,N199K,T297P
S27K,I121V,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,N199K,T297P
S27K,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,N199K,T297P
S27K,N109S,S111R,S173P,S175P,F180Y,Q198E,N199K,T297P
S27K,S173P,S175P,F180Y,Q197K,Q198E,N199K,T297P
S27K,Q70N,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,N199K,T297P
S27K,I150S,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,N199K,T297P
S27K,S114V,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,N199K,T297P
S27K,Q70N,G107N,I121V,E127Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,N199K,T297P
S27K,Q70A,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,N199K,T297P
S27K,Q70V,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,N199K,T297P
S27K,S173P,G174K,S175P,F180Y,L184F,Q198E,N199K,T297P
S27K,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,N199K,T297P
S27K,S171R,S173P,G174E,S175P,F180Y,Q198E,N199K,T297P
S27K,S171K,S173P,G174E,S175P,F180Y,Q198E,N199K,T297P
S27K,S171 E,S173P,G174K,S175P,F180Y,Q198E,N199K,T297P
S173P,S175P,G200H
S173P,S175P,D206N
S173P,S175P,N212K
S173P,S175P,F180Y,A214R
S173P,S175P,F180Y,A214K
S173P,S175P,T215K
S173P,S175P,D218N
S173P,S175P,D218H
S173P,S175P,F180Y,D218R
S173P,S175P,Y219R

ES 2 813 727 T3

Tabla 2a – Variantes de SEQ ID NO 3
S173P,S175P,Y219H
S173P,S175P,I220K
S173P,S175P,Q222K
S27K,Q97K,E127Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,D225N,I247M,T297P
S173P,S175P,F180Y,A233R
S173P,S175P,F180Y,A233R
S173P,S175P,F180Y,A233R
S173P,S175P,F180Y,A233R
S173P,S175P,F180Y,S234K
T5C,S27K,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,E236C,T297P
Q6C,S27K,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,E236C,T297P
S4C,S27K,S171N,S173P,G17 4R,S175P,F180Y,Q198E, E236C,T297P
A1*,T5C,S27K,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,E236C,T297P
A1*,Q6C,S27K,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,E236C,T297P
A1*,S4C,S27K,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,E236C,T297P
A1*,P3*,T5C,S27K,S171N,S173P,G17 4R,S175P, F180Y,Q198E, E236C,T297P
S173P,S175P,T241K
S173P,S175P,N245K
S173P,S175P,T246K
S173P,S175P,S248K
S173P,S175P,F180Y,I264R
S173P,S175P,F180Y,I264R
S173P,S175P,F180Y,I264R
S173P,S175P,F180Y,I264R
S173P,S175P,A267H
S173P,S175P,N268K
S27K,E127Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,N268K,T297P
S173P,S175P,T269K
S173P,S175P,S270K
S173P,S175P,S270K
S173P,S175P,F180Y,Q198E,S270K,T297P
S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,S270K,T297P
S27K,I137E,S173P,S175P,F180Y,S270K,T297P
S27K,N87K,I121V,S171N,S173P,S175P,F180Y,S270K,T297P
S27K,S173P,S175P,F180Y,S270K,T297P
S27K,S173P,S175P,F180Y,S270K,T297P
S173P,S175P,S272K
S173P,S175P,S274K

ES 2 813 727 T3

Tabla 2a – Variantes de SEQ ID NO 3
S173P,S175P,T278K
S173P,S175P,E279Q
S173P,S175P,E279H
S173P,S175P,V286H
I137E,S173P,S175P,F180Y,V286K,T297P
I137E,S173P,S175P, F180Y,V286K,T297P
S173P,S175P,Y287R
S173P,S175P,Y287H
I137E,S173P,S175P,F180Y,D288N,T297P
S173P,S175P,F180Y,Q198E,D288N,T297P
I137E,S173P,S175P,F180Y,D288K,T297P
S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,1293R,T297P
S27K,I137E,S173P,S175P,F180Y,1293R,T297P
S173P,S175P,1293K
S173P,S175P,T297K
G28D,S86K,N87R,Q89R,S173P,S175P,K311R
G28N,S86K,N87R,Q89R,S173P,S175P,K311R
Tabla 2b – Variantes de SEQ ID NO 3
E127S,S173P,S175P,F180Y
S173P,S175P,F180Y
S173P,S175P,F180Y,D299R
S27K,D147N,I150S,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q197K,Q198E,S274V,T297P
S27K,D147N,I150S,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,S274V,T297P
S27K,D147N,I150S,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,N199K,R224G,T297P
S27K,D147S,I150S,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,S274V,T297P
S27K,G142E,D147N,I150S,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,N199K,T297P
S27K,G142E,I150S,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,N199K,T297P
S27K,I150L,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,N199K,T297P
S27K,I150L,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P
S27K,I150S,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,N199K,S274V,T297P
S27K,I150S,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,S274V,T297P
S27K,I150S,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,N199K,R224G,T297P
S27K,N109K,S111D,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P
S27K,N109K,S111D,S171E,S173P,G174K,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,N199K,T297P
S27K,N109K,S111E,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P
S27K,N109K,S111E,S171E,S173P,G174K,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,N199K,T297P
S27K,N109K,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P
S27K,N109S,*109aE,S111R,S171E,S173P,G174K,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,N199K,T297P

Tabla 2b – Variantes de SEQ ID NO 3
S27K,N109S,*109aE,S171E,S173P,G174K,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,N199K,T297P
S27K,N109S,I121V,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,N199K,S274V,T297P
S27K,N109S,I121V,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,S274V,T297P
S27K,N87K,G132H,V162T,S171 D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,S274V,T297P
S27K,N87K,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,T297P
S27K,N87K,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P
S27K,N87K,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,N199K,S274V,T297P
S27K,N87K,S173P,G174K,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,V286R,T297P
S27K,N87K,V162T,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,S274V,T297P
S27K,Q70A,D147N,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,N199K,S274V,T297P
S27K,Q70A,N109K,S111E,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,N199K,S274V,T297P
S27K,Q70A,S111E,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,N199K,S274V,T297P
S27K,Q70A,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,N199K,S274V,T297P
S27K,Q70A,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,S274V,T297P
S27K,S111D,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P
S27K,S111D,S171E,S173P,G174K,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,N199K,T297P
S27K,S111E,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P
S27K,S111E,S171 E,S173P,G174K,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,N199K,T297P
S27K,S111R,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,S270V,S274V,L280V,T297P
S27K,S114V,I121V,S129K,S173P,G174K,S175P,F180Y,L184F,Q198E,N199K,T297P
S27K,S114V,I121V,S173P,G174K,S175P,F180Y,L184F,Q198E,N199K,T297P
S27K,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,S270V,S274V,L280V,T297P
S27K,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,T297P
S27K,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q197K,Q198E,T297P
S27K,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P
S27K,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,N199K,S274V,T297P
S27K,S173P,G174K,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,V286R,T297P
S27K,V162T,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,S274V,T297P
S4K,S27K,E127Q,G132H,Y156R,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P
S4K,S27K,N87K,E127Q,G132H,Y156R,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P
T24R,S173P,S175P,F180Y

Ejemplo 2: Prueba de lavado de las variantes mediante ensayo de esfuerzo mecánico automático (AMSA por sus siglas en inglés)

5 [0254] Los experimentos de lavado se llevan a cabo para evaluar el rendimiento de lavado de las variantes de proteasa seleccionadas en detergente para ropa. Las proteasas de la presente solicitud se probaron usando el ensayo de esfuerzo mecánico automático (AMSA). Con el AMSA, se puede examinar el rendimiento de lavado de muchas soluciones de detergente enzimático de pequeño volumen. La placa AMSA tiene varias ranuras para las soluciones de prueba y una tapa que aprieta firmemente la muestra textil que se va a lavar contra las aberturas de las ranuras. Durante el lavado, la placa, las soluciones de prueba, la muestra textil y la tapa se agitan vigorosamente para poner la solución de prueba en contacto con la muestra textil sucia y aplicar tensión

10

mecánica de una manera oscilante, periódica y regular. Para una descripción más detallada, consulte WO 02/42740 especialmente el párrafo "Realizaciones de métodos especiales" en la página 23-24.

5 [0255] El experimento se llevó a cabo en las condiciones experimentales que se especifican en la tabla 3 a continuación.

Tabla 3: Condiciones experimentales de AMSA	
Detergente	Detergente modelo B
Dosis de detergente	3.33 g/l
Volumen de la solución de ensayo	160 µl
Tiempo de lavado	20 minutos
Temperatura	20 °C
Dureza del agua	15 °dH
Concentración de enzima en la solución de ensayo	30 - 60 nM
Material de ensayo	Muestra de leche con chocolate y hollín (PC-03), muestra de tinta, leche y sangre (EMPA117) con tratamiento térmico adicional, muestra de huevo completo con pigmento (CS-37)

La dureza del agua se ajustó a 15 °dH añadiendo CaCl₂, MgCl₂ y NaHCO₃ (Ca²⁺: Mg²⁺: CO₃²⁻ = 4: 1: 7.5) al sistema de ensayo. Los tejidos de muestra se enjuagaron con agua corriente y se secaron después del lavado.

10 [0256] El rendimiento de una variante de enzima se mide como el brillo del color del tejido lavado con esa proteasa específica. El brillo también se puede expresar como la intensidad de la luz reflejada de la muestra cuando se ilumina con luz blanca. Cuando la muestra se mancha, la intensidad de la luz reflejada es menor que la de una muestra limpia. Por lo tanto, la intensidad de la luz reflejada puede usarse para medir el rendimiento de lavado de una proteasa. Las mediciones de color se realizaron con un escáner plano profesional (EPSON EXPRESSION 10000XL, Atea A/S, Lautrupvang 6, 2750 Ballerup, Dinamarca), que se utiliza para capturar una imagen de los azulejos de melamina lavados.

20 [0257] Para extraer un valor para la intensidad de la luz de las imágenes escaneadas, se utiliza una aplicación de software especialmente diseñada (Novozymes Color Vector Analyzer). El programa recupera los valores de píxeles de 24 bits de la imagen y los convierte en valores de rojo, verde y azul (RGB). El valor de intensidad (Int) se calcula sumando los valores RGB como vectores y luego tomando la longitud del vector resultante:

$$Int = \sqrt{r^2 + g^2 + b^2}$$

25 Textiles

[0258] Muestras textiles estándar de leche con chocolate y hollín (PC-03), tinta, leche, sangre (EMPA117) con tratamiento térmico adicional y muestras textiles de huevo completo con pigmento (CS-37) se obtuvieron del Center For Testmaterials BV, código postal 120, 3133 KT Vlaarding, Países Bajos.

[0259] El rendimiento de lavado relativo de AMSA se calcula luego para cada variante dividiendo el valor de intensidad para el tejido lavado con la variante por el valor de intensidad para el tejido lavado con la progenitora.

35 Rendimiento de lavado relativo de AMSA_{variante} = $\frac{int_{variante}}{int_{progenitora}}$

40 [0260] Teniendo el rendimiento de lavado relativo AMSA para cada variante, es posible calcular el efecto de una sola mutación, si hay datos disponibles para al menos dos variantes que difieren solo en esa mutación (Tabla 4). En este caso, se calcula el rendimiento de lavado relativo de AMSA para la mutación:

$$\text{Rendimiento de lavado relativo de AMSA}_{\text{mutación}} = \frac{\text{Rendimiento de lavado relativo de AMSA}_{\text{variante con mutación}}}{\text{Rendimiento de lavado relativo de AMSA}_{\text{variante sin mutación}}}$$

Tabla 4a: Rendimiento de lavado relativo de AMSA_{Mutación} en muestra textil estándar con leche con chocolate y hollín (PC-03) y una muestra textil estándar con sangre, leche y tinta con tratamiento térmico extra. (EMPA117EH)

Mutación	Variante con la mutación	Variante sin la mutación	PC-03	EMPA 117EH
V2H	V2H,S4K,S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	S4K,S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.16	0.99
S4K	S4K,S173P,S175P	S173P,S175P	1.47	1.05
S4K	S4K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.76	1.23
S4K	S4K,S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.22	1.08
S4K	S4K,S27K,I137E,S173P,S175P,F180Y,T297P	S27K,I137E,S173P,S175P,F180Y,T297P	1.37	1.10
S4K	A1*,V2*,P3*,S4K,S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	A1*,V2*,P3*,S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.63	1.27
S4K	S4K,S27K,N87K,E127Q,G132H,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	S27K,N87K,E127Q,G132H,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.38	1.17
S4H	S4H,S173P,S175P	S173P,S175P	1.30	1.05
T5K	T5K,S173P,S175P	S173P,S175P	1.49	1.15
Q6K	Q6K,S173P,S175P	S173P,S175P	1.33	1.03
N16K	N16K,S173P,S175P	S173P,S175P	1.54	1.05
N16K	N16K,D17N,S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	D17N,S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.23	1.11
N16H	N16H,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.12	1.13
N16H	N16H,S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	0.84	1.06
N16H	N16H,S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.21	1.10
N16H	N16H,S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.13	-
N16H	N16H,S27K,I137E,S173P,S175P,F180Y,T297P	S27K,I137E,S173P,S175P,F180Y,T297P	1.22	1.11
D17N	D17N,S173P,S175P	S173P,S175P	1.42	1.10
D17N	D17N,I137E,S173P,S175P,F180Y,T297P	I137E,S173P,S175P,F180Y,T297P	0.93	1.19
D17N	D17N,S173P,S175P,Q198E	S173P,S175P,Q198E	1.06	1.22
D17N	D17N,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.43	1.18
D17N	D17N,S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.28	0.99
D17N	D17N,S27K,I137E,S173P,S175P,F180Y,T297P	S27K,I137E,S173P,S175P,F180Y,T297P	1.37	1.05

ES 2 813 727 T3

Tabla 4a: Rendimiento de lavado relativo de AMSA _{Mutación} en muestra textil estándar con leche con chocolate y hollín (PC-03) y una muestra textil estándar con sangre, leche y tinta con tratamiento térmico extra. (EMPA117EH)				
Mutación	Variante con la mutación	Variante sin la mutación	PC-03	EMPA 117EH
Q18K	Q18K,S173P,S175P	S173P,S175P	1.40	1.10
Q18K	Q18K,S27K,E127Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	S27K,E127Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.26	0.97
S19K	S19K,S173P,S175P	S173P,S175P	1.29	1.02
T24K	T24K,S173P,S175P	S173P,S175P	1.52	1.04
T24H	T24H,S173P,S175P	S173P,S175P	1.24	0.94
S27K	S27K,S173P,S175P	S173P,S175P	1.19	1.04
S27K	S27K,I137E,S173P,S175P,F180Y,T297P	I137E,S173P,S175P,F180Y,T297P	0.84	1.09
S27K	S27K,S173P,S175P,Q198E	S173P,S175P,Q198E	0.93	1.16
S27K	S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.67	1.29
S27K	S27K,S144R,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	S144R,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.24	1.12
S27K	S27K,D147N,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	D147N,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.17	1.05
S27K	S27K,E127Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	E127Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.18	1.09
S27K	S27K,E50Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	E50Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.37	1.12
S27K	S27K,N87K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	N87K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.40	1.10
S27K	S4K,S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	S4K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.16	1.13
S27K	S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,S270K,T297P	S173P,S175P,F180Y,Q198E,S270K,T297P	1.44	1.12
S27K	S27K,Q97K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	Q97K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.27	1.03
S27K	D17N,S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	D17N,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.49	1.09
S27K	N16H,S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	N16H,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.25	1.21
S27K	N16H,S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	N16H,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.80	1.26
S27K	N16H,S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	N16H,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.68	-
S27K	S27K,I137E,S144R,S173P,S175P,F180Y,T297P	I137E,S144R,S173P,S175P,F180Y,T297P	1.54	1.04
S27K	S27K,E127Q,I137E,S173P,S175P,F180Y,T297P	E127Q,I137E,S173P,S175P,F180Y,T297P	1.20	1.05
S27K	S27K,I137E,S173P,G174R,S175P,F180Y,T297P	I137E,S173P,G174R,S175P,F180Y,T297P	1.14	1.09

ES 2 813 727 T3

Tabla 4a: Rendimiento de lavado relativo de AMSA _{Mutación} en muestra textil estándar con leche con chocolate y hollín (PC-03) y una muestra textil estándar con sangre, leche y tinta con tratamiento térmico extra. (EMPA117EH)				
Mutación	Variante con la mutación	Variante sin la mutación	PC-03	EMPA 117EH
S27K	S27K,Q97K,I137E,S173P,S175P,F180Y,T297P	Q97K,I137E,S173P,S175P,F180Y,T297P	1.52	1.03
S27K	D17N,S27K,I137E,S173P,S175P,F180Y,T297P	D17N,I137E,S173P,S175P,F180Y,T297P	1.24	0.96
S27K	S27K,D126G,S173P,S175P,F180Y,T297P	D126G,S173P,S175P,F180Y,T297P	1.05	1.06
Y39R	Y39R,S173P,S175P	S173P,S175P	1.10	0.98
Y39R	S27K,Y39R,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.31	1.03
Y39R	S27K,Y39R,I137E,S173P,S175P,F180Y,T297P	S27K,I137E,S173P,S175P,F180Y,T297P	1.28	1.14
Y39R	S27K,Y39R,N87K,I137E,S173P,S175P,F180Y,T297P	S27K,N87K,I137E,S173P,S175P,F180Y,T297P	1.10	1.07
Y39R	S27K,Y39R,I137E,S144R,S173P,S175P,F180Y,T297P	S27K,I137E,S144R,S173P,S175P,F180Y,T297P	1.21	0.95
Y39R	S27K,Y39R,I121V,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P	S27K,I121V,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.11	0.88
S41K	S41K,S173P,S175P	S173P,S175P	1.48	1.16
S41K	S27K,S41K,E127Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	S27K,E127Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.11	1.01
L43H	L43H,S173P,S175P	S173P,S175P	1.16	1.02
G47K	G47K,R130K,G132R,S173P,S175P	R130K,G132R,S173P,S175P	1.59	1.26
E50Q	E50Q,S173P,S175P	S173P,S175P	1.26	1.10
E50Q	E50Q,S173P,S175P,F180Y	S173P,S175P,F180Y	1.77	1.25
E50Q	E50Q,S173P,S175P,Q198E	S173P,S175P,Q198E	0.94	1.10
E50Q	E50Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.55	1.20
E50Q	S27K,E50Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.27	1.04
E50T	E50T,S173P,S175P,F180Y	S173P,S175P,F180Y	1.08	1.16
E50L	E50L,S173P,S175P,F180Y	S173P,S175P,F180Y	1.83	1.27
Q57K	G28N,Q57K,S86K,N87R,Q89R,S173P,S175P	G28N,S86K,N87R,Q89R,S173P,S175P	1.05	0.96
S58K	S58K,S173P,S175P	S173P,S175P	1.27	0.98
S58K	S58K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.57	1.22
N59K	N59K,S173P,S175P	S173P,S175P	1.18	1.04
D63N	D63N,S173P,S175P	S173P,S175P	1.12	1.06
D63E	D63E,R69D,S173P,S175P	R69D,S173P,S175P	1.41	1.03
G64H	G64H,S173P,S175P	S173P,S175P	1.19	0.96

ES 2 813 727 T3

Tabla 4a: Rendimiento de lavado relativo de AMSA _{Mutación} en muestra textil estándar con leche con chocolate y hollín (PC-03) y una muestra textil estándar con sangre, leche y tinta con tratamiento térmico extra. (EMPA117EH)				
Mutación	Variante con la mutación	Variante sin la mutación	PC-03	EMPA 117EH
S65K	S65K,S173P,S175P	S173P,S175P	1.22	0.96
S65K	S65K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.63	1.20
S65K	S27K,S65K,S173P,S175P,F180Y,T297P	S27K,S173P,S175P,F180Y, T297P	1.07	0.94
S65K	S27K,S65K,S173P,S175P,F180Y,T297P	S27K,S173P,S175P,F180Y, T297P	1.13	-
T67K	T67K,S173P,S175P	S173P,S175P	1.12	0.98
Q70H	Q70H,S173P,S175P,F180Y	S173P,S175P,F180Y	1.09	1.12
G85R	G85R,S173P,S175P,F180Y	S173P,S175P,F180Y	1.84	1.26
G85H	G85H,S173P,S175P,F180Y	S173P,S175P,F180Y	2.17	1.34
S86K	S86K,S173P,S175P	S173P,S175P	1.10	1.01
N87K	N87K,S173P,S175P	S173P,S175P	1.44	1.11
N87K	N87K,I137E,S173P,S175P,F180Y,T297P	I137E,S173P,S175P,F180Y,T297P	0.98	1.12
N87K	N87K,S173P,S175P,F180Y, Q198E, T297P	S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.47	1.22
N87K	S27K,N87K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.24	1.03
N87K	S27K,N87K,I137E,S173P,S175P,F180Y,T297P	S27K,I137E,S173P,S175P,F180Y,T297P	1.11	0.96
N87K	S27K,N87K,N109S,S111R,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	S27K,N109S,S111R,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.15	1.03
N87K	S27K,N59L,T67V,N87K,G107N,I121V,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P	S27K,N59L,T67V,G107N,I121V,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.06	1.08
N87K	S27K,N59L,T67V,N87K,G107N,I121V,E127Q,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P	S27K,N59L,T67V,G107N,I121V,E127Q,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.08	1.08
N87K	S27K,Q70N,N87K,I121V,E127Q,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,N199R,T297P	S27K,Q70N,I121V,E127Q,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,N199R,T297P	1.09	0.95
Y92R	Y92R,S173P,S175P,F180Y	S173P,S175P,F180Y	1.73	1.28
Q97K	Q97K,S173P,S175P	S173P,S175P	1.18	1.06
Q97K	Q97K,I137E,S173P,S175P,F180Y,T297P	I137E,S173P,S175P,F180Y,T297P	0.81	1.12
Q97K	Q97K,S173P,S175P,Q198E	S173P,S175P,Q198E	0.89	1.10
Q97K	Q97K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.49	1.21
Q97K	S27K,Q97K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.13	0.97
Q97K	S27K,Q97K,I137E,S173P,S175P,F	S27K,I137E,S173P,S175P,F180Y,	1.47	1.06

ES 2 813 727 T3

Tabla 4a: Rendimiento de lavado relativo de AMSA _{Mutación} en muestra textil estándar con leche con chocolate y hollín (PC-03) y una muestra textil estándar con sangre, leche y tinta con tratamiento térmico extra. (EMPA117EH)				
Mutación	Variante con la mutación	Variante sin la mutación	PC-03	EMPA 117EH
	180Y,T297P	T297P		
Q97K	S27K,N59L,T67V,Q97K,G107N,I121V,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P	S27K,N59L,T67V,G107N,I121V,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.05	1.01
D108N	D108N,S173P,S175P	S173P,S175P	-	1.10
D108S	D108S,S173P,S175P	S173P,S175P	1.11	0.99
D108A	D108A,S173P,S175P	S173P,S175P	1.19	1.00
N109K	S27K,N109K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.26	1.04
S111K	S111K,S173P,S175P	S173P,S175P	1.19	0.93
S111R	S27K,N109S,S111R,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	S27K,N109S,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.61	1.09
S114K	S114K,S173P,S175P,F180Y	S173P,S175P,F180Y	1.61	1.11
D116S	D116S,M139L,S173P,S175P	M139L,S173P,S175P	2.70	1.38
A118R	A118R,S173P,S175P,F180Y	S173P,S175P,F180Y	1.61	1.20
A118R	S27K,S111R,A118R,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	S27K,S111R,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.76	0.94
A118K	A118K,S173P,S175P,F180Y	S173P,S175P,F180Y	1.60	1.20
D126G	D126G,S173P,S175P,F180Y	S173P,S175P,F180Y	1.95	1.24
D126G	S27K,D126G,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.15	0.99
D126G	S27K,D126G,E127Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	S27K,E127Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.10	0.87
D126W	D126W,S173P,S175P,F180Y	S173P,S175P,F180Y	1.82	1.20
D126K	D126K,S173P,S175P,F180Y	S173P,S175P,F180Y	1.78	1.18
E127Q	Y113T,E127Q,S173P,G174K,S175P,F180Y	Y113T,S173P,G174K,S175P,F180Y	1.13	0.99
E127Q	*109aS,E127Q,S173P,S175P,F180Y,T297P	*109aS,S173P,S175P,F180Y,T297P	2.38	1.71
E127Q	E127Q,S173P,S175P,Q198E	S173P,S175P,Q198E	1.06	1.21
E127Q	E127Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.67	1.23
E127Q	S27K,E127Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.19	1.04
E127Q	S27K,D126G,E127Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	S27K,D126G,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.14	0.91
E127Q	S27K,E127Q,I137Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	S27K,I137Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.70	1.14
E127Q	S27K,E127Q,S144R,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	S27K,S144R,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.14	0.97

ES 2 813 727 T3

Tabla 4a: Rendimiento de lavado relativo de AMSA _{Mutación} en muestra textil estándar con leche con chocolate y hollín (PC-03) y una muestra textil estándar con sangre, leche y tinta con tratamiento térmico extra. (EMPA117EH)				
Mutación	Variante con la mutación	Variante sin la mutación	PC-03	EMPA 117EH
E127Q	S27K,E127Q,V162S,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	S27K,V162S,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.89	1.19
E127Q	S27K,E127Q,V162E,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	S27K,V162E,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.44	1.07
E127Q	S27K,E127Q,V162Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	S27K,V162Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.23	1.04
E127Q	S27K,E127Q,V162G,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	S27K,V162G,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.34	1.07
E127Q	S27K,E127Q,V162F,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	S27K,V162F,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.36	1.07
E127Q	S27K,E127Q,V162T,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	S27K,V162T,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.99	1.25
E127Q	S27K,E127Q,V162Y,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	S27K,V162Y,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.72	1.11
E127Q	S27K,N109S,S111R,E127Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	S27K,N109S,S111R,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.25	1.18
E127Q	S27K,N109S,S111R,E127Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	S27K,N109S,S111R,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.44	1.21
E127Q	S27K,N59L,T67V,N87K,G107N,I121V,E127Q,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P	S27K,N59L,T67V,N87K,G107N,I121V,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.06	0.98
E127Q	S27K,N87K,I121V,E127Q,S171N,S173P,S175P,F180Y,T297P	S27K,N87K,I121V,S171N,S173P,S175P,F180Y,T297P	1.06	0.99
E127K	E127K,S173P,S175P,F180Y	S173P,S175P,F180Y	1.72	1.16
E127L	E127L,S173P,S175P,F180Y	S173P,S175P,F180Y	1.27	1.30
S129K	S129K,S173P,S175P	S173P,S175P	1.25	1.16
R130K	S41K,L43K,G47K,R130K,G132R,S173P,S175P	S41K,L43K,G47K,G132R,S173P,S175P	1.21	1.02
R130K	S41R,L43R,G47K,R130K,G132R,S173P,S175P	S41R,L43R,G47K,G132R,S173P,S175P	1.11	0.98
T131K	T131K,S173P,S175P	S173P,S175P	1.44	1.03
G132H	G132H,S173P,S175P	S173P,S175P	1.18	1.02
G132H	G132H,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.11	1.11
S143K	S143K,S173P,S175P	S173P,S175P	1.10	0.96
S144K	S144K,S173P,S175P	S173P,S175P	1.32	0.99
D147N	D147N,S173P,S175P	S173P,S175P	1.51	0.89
D147N	D147N,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.55	1.09
D147N	S27K,D147N,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.09	0.89

ES 2 813 727 T3

Tabla 4a: Rendimiento de lavado relativo de AMSA _{Mutación} en muestra textil estándar con leche con chocolate y hollín (PC-03) y una muestra textil estándar con sangre, leche y tinta con tratamiento térmico extra. (EMPA117EH)				
Mutación	Variante con la mutación	Variante sin la mutación	PC-03	EMPA 117EH
D147N	S27K,N109S,S111R,D147N,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	S27K,N109S,S111R,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.11	1.00
D147S	D147S,S148A,L149T,I150L,S173P,S175P	S148A,L149T,I150L,S173P,S175P	1.69	1.13
D147S	A145S,K146P,D147S,S173P,S175P	A145S,K146P,S173P,S175P	1.74	1.01
D147S	A145S,K146P,D147S,S148A,S173P,S175P	A145S,K146P,S148A,S173P,S175P	2.04	1.09
D147S	S144P,A145S,K146P,D147S,S148A,L149T,I150L,S173P,S175P	S144P,A145S,K146P,S148A,L149T,I150L,S173P,S175P	2.41	1.20
D147S	D147S,L149T,S173P,S175P	L149T,S173P,S175P	1.41	1.08
D147S	K146P,D147S,S148A,L149T,I150L,S173P,S175P	K146P,S148A,L149T,I150L,S173P,S175P	1.33	1.14
D147S	A145S,K146P,D147S,S148A,L149T,S173P,S175P	A145S,K146P,S148A,L149T,S173P,S175P	1.18	1.08
D147S	S27K,K146E,D147S,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,Q198E,N199K,E223K,T297P	S27K,K146E,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,Q198E,N199K,E223K,T297P	1.16	0.83
D147*	K146*,D147*,S173P,S175P	K146*,S173P,S175P	-	1.08
D147Q	D147Q,S173P,S175P	S173P,S175P	1.28	0.84
D147Q	D147Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.40	1.00
D147H	D147H,S173P,S175P	S173P,S175P	1.31	0.85
S148K	S148K,S173P,S175P	S173P,S175P	1.33	1.00
L149K	L149K,S173P,S175P	S173P,S175P	1.12	0.99
D155H	D155H,S173P,S175P	S173P,S175P	1.25	0.98
Y156R	Y156R,S173P,S175P	S173P,S175P	1.29	0.95
Y156R	Y156R,S173P,S175P	S173P,S175P	1.33	1.03
Y156R	Y156R,S173P,S175P	S173P,S175P	1.19	0.93
Y156R	Y156R,S173P,S175P,Q198E	S173P,S175P,Q198E	1.04	1.12
Y156R	Y156R,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.59	1.19
Y156R	S4K,D17N,S27K,N59L,N87K,Y156R,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	S4K,D17N,S27K,N59L,N87K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.12	0.92
Y156R	S4K,D17N,S27K,N59L,N87K,Y156R,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	S4K,D17N,S27K,N59L,N87K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.18	-
Y156H	Y156H,S173P,S175P	S173P,S175P	1.18	0.97
G159H	G159H,S173P,S175P	S173P,S175P	1.21	1.05
G174R	S27K,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P	S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.18	1.00
G174R	S27K,I137E,S173P,G174R,S175P,F180	S27K,I137E,S173P,S175P,F180Y,T29	1.15	1.04

ES 2 813 727 T3

Tabla 4a: Rendimiento de lavado relativo de AMSA _{Mutación} en muestra textil estándar con leche con chocolate y hollín (PC-03) y una muestra textil estándar con sangre, leche y tinta con tratamiento térmico extra. (EMPA117EH)				
Mutación	Variante con la mutación	Variante sin la mutación	PC-03	EMPA 117EH
	Y,T297P	7P		
G174R	S27K,N59L,T67V,N87K,S114V,I121V,I150L,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,T297P	S27K,N59L,T67V,N87K,S114V,I121V,I150L,S171N,S173P,S175P,F180Y,T297P	1.07	0.91
T177K	S173P,S175P,T177K	S173P,S175P	1.09	0.93
L184H	S173P,S175P,F180Y,L184H	S173P,S175P,F180Y	1.32	1.21
V185K	I137E,S173P,S175P,F180Y,V185K,T297P	I137E,S173P,S175P,F180Y,T297P	1.00	1.13
V185K	I137E,S173P,S175P,F180Y,V185K,N186P,T297P	I137E,S173P,S175P,F180Y,N186P,T297P	1.49	1.14
V185K	I137E,S173P,S175P,F180Y,V185K,N186D,T297P	I137E,S173P,S175P,F180Y,N186D,T297P	1.72	1.23
N186K	I137E,S173P,S175P,F180Y,N186K,T297P	I137E,S173P,S175P,F180Y,T297P	0.84	1.08
N186K	S173P,S175P,N186K	S173P,S175P	1.22	1.04
N186R	I137E,S173P,S175P,F180Y,N186R,T297P	I137E,S173P,S175P,F180Y,T297P	0.83	1.13
E194*	S173P,S175P,E194*	S173P,S175P	1.34	0.98
E194*	S173P,S175P,E194*,Q198E	S173P,S175P,Q198E	0.85	1.12
E194*	S173P,S175P,F180Y,E194*,Q198E,T297P	S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.54	1.26
E194S	S173P,S175P,F180Y,E194S	S173P,S175P,F180Y	2.05	1.25
E194S	S27K,E127Q,S173P,S175P,F180Y,E194S,Q198E,T297P	S27K,E127Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.28	0.95
E194K	S173P,S175P,F180Y,E194K	S173P,S175P,F180Y	1.84	1.13
E194K	S27K,E127Q,S173P,S175P,F180Y,E194K,Q198E,T297P	S27K,E127Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.30	0.91
E194Q	S27K,E127Q,S173P,S175P,F180Y,E194Q,Q198E,T297P	S27K,E127Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.27	0.96
N195H	S173P,S175P,N195H	S173P,S175P	1.09	0.99
N195H	S27K,E127Q,S173P,S175P,F180Y,N195H,V196N,Q197*,Q198*,N199*,G200*,T201*,T297P	S27K,E127Q,S173P,S175P,F180Y,V196N,Q197*,Q198*,N199*,G200*,T201*,T297P	0.96	1.06
N195K	S173P,S175P,N195K	S173P,S175P	1.25	1.07
V196H	S173P,S175P,V196H	S173P,S175P	1.36	0.98
Q197K	S173P,S175P,Q197K	S173P,S175P	1.20	0.95
Q197K	S27K,S173P,S175P,F180Y,Q197K,T297P	S27K,S173P,S175P,F180Y,T297P	1.07	1.05
Q197K	S27K,S173P,S175P,F180Y,E194R,Q197K,Q198E,T297P	S27K,S173P,S175P,F180Y,E194R,Q198E,T297P	1.10	0.96
Q197K	S27K,S173P,S175P,F180Y,Q197K,Q198E,T297P	S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.38	1.14

ES 2 813 727 T3

Tabla 4a: Rendimiento de lavado relativo de AMSA _{Mutación} en muestra textil estándar con leche con chocolate y hollín (PC-03) y una muestra textil estándar con sangre, leche y tinta con tratamiento térmico extra. (EMPA117EH)				
Mutación	Variante con la mutación	Variante sin la mutación	PC-03	EMPA 117EH
Q197K	S27K,E127Q,S173P,S175P,F180Y,Q197K,Q198E,T297P	S27K,E127Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.17	1.01
Q197K	S27K,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q197K,Q198E,T297P	S27K,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.17	1.11
Q197K	S27K,N109S,S111R,S173P,S175P,F180Y,Q197K,Q198E,T297P	S27K,N109S,S111R,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.12	0.92
Q197K	S27K,S173P,G174K,S175P,F180Y,L184F,Q197K,Q198E,T297P	S27K,S173P,G174K,S175P,F180Y,L184F,Q198E,T297P	1.57	1.03
Q197K	I121V,S173P,S175P,F180Y,Q197K,Q198E,T297P	I121V,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.50	1.30
Q197H	S173P,S175P,Q197H	S173P,S175P	1.16	1.01
Q197R	S173P,S175P,F180Y,Q197R	S173P,S175P,F180Y	2.50	1.38
Q197R	S27K,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q197R,Q198E,T297P	S27K,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.05	-
Q198K	S173P,S175P,Q198K	S173P,S175P	1.39	1.00
Q198K	S173P,S175P,Q198K	S173P,S175P	1.36	0.99
N199K	S173P,S175P,N199K	S173P,S175P	1.34	0.99
N199K	S173P,S175P,N199K	S173P,S175P	1.35	1.03
N199K	S27K,S173P,S175P,F180Y,E194*,Q197K,Q198E,N199K,T297P	S27K,S173P,S175P,F180Y,E194*,Q197K,Q198E,T297P	1.18	0.96
N199K	S27K,E127Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,N199K,T297P	S27K,E127Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.27	1.04
N199K	S27K,E127Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,N199K,T297P	S27K,E127Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.37	-
N199K	S27K,I121V,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,N199K,T297P	S27K,I121V,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.09	1.01
N199K	S27K,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,N199K,T297P	S27K,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.23	1.05
N199K	S27K,N109S,S111R,S173P,S175P,F180Y,Q198E,N199K,T297P	S27K,N109S,S111R,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.07	1.06
N199K	S27K,S173P,S175P,F180Y,Q197K,Q198E,N199K,T297P	S27K,S173P,S175P,F180Y,Q197K,Q198E,T297P	1.17	0.94
N199K	S27K,Q70N,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,N199K,T297P	S27K,Q70N,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.16	0.99
N199K	S27K,I150S,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,N199K,T297P	S27K,I150S,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.25	1.03
N199K	S27K,S114V,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,N199K,T297P	S27K,S114V,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.12	1.04
N199K	S27K,Q70N,G107N,I121V,E127Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,N199K,T297P	S27K,Q70N,G107N,I121V,E127Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.08	1.00
N199K	S27K,Q70A,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,N199K,T297P	S27K,Q70A,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.00	1.09

ES 2 813 727 T3

Tabla 4a: Rendimiento de lavado relativo de AMSA _{Mutación} en muestra textil estándar con leche con chocolate y hollín (PC-03) y una muestra textil estándar con sangre, leche y tinta con tratamiento térmico extra. (EMPA117EH)				
Mutación	Variante con la mutación	Variante sin la mutación	PC-03	EMPA 117EH
N199K	S27K,Q70V,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,N199K,T297P	S27K,Q70V,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.31	0.95
N199K	S27K,S173P,G174K,S175P,F180Y,L184F,Q198E,N199K,T297P	S27K,S173P,G174K,S175P,F180Y,L184F,Q198E,T297P	1.90	1.02
N199K	S27K,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,N199K,T297P	S27K,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.11	1.16
N199K	S27K,S171R,S173P,G174E,S175P,F180Y,Q198E,N199K,T297P	S27K,S171R,S173P,G174E,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.02	1.13
N199K	S27K,S171K,S173P,G174E,S175P,F180Y,Q198E,N199K,T297P	S27K,S171K,S173P,G174E,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.21	1.17
N199K	S27K,S171E,S173P,G174K,S175P,F180Y,Q198E,N199K,T297P	S27K,S171E,S173P,G174K,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.31	1.14
G200H	S173P,S175P,G200H	S173P,S175P	1.36	1.10
D206N	S173P,S175P,D206N	S173P,S175P	-	1.12
N212K	S173P,S175P,N212K	S173P,S175P	1.13	0.94
A214R	S173P,S175P,F180Y,A214R	S173P,S175P,F180Y	1.63	1.23
A214K	S173P,S175P,F180Y,A214K	S173P,S175P,F180Y	1.80	1.32
T215K	S173P,S175P,T215K	S173P,S175P	1.46	1.04
D218N	S173P,S175P,D218N	S173P,S175P	1.46	1.09
D218H	S173P,S175P,D218H	S173P,S175P	1.20	1.03
D218R	S173P,S175P,F180Y,D218R	S173P,S175P,F180Y	1.73	1.27
Y219R	S173P,S175P,Y219R	S173P,S175P	1.24	1.01
Y219H	S173P,S175P,Y219H	S173P,S175P	1.10	0.96
I220K	S173P,S175P,I220K	S173P,S175P	1.26	1.05
Q222K	S173P,S175P,Q222K	S173P,S175P	1.25	1.02
D225N	S27K,Q97K,E127Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,D225N,I247M,T297P	S27K,Q97K,E127Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,I247M,T297P	0.99	1.10
A233R	S173P,S175P,F180Y,A233R	S173P,S175P,F180Y	1.92	1.24
A233R	S173P,S175P,F180Y,A233R	S173P,S175P,F180Y	1.69	1.29
A233R	S173P,S175P,F180Y,A233R	S173P,S175P,F180Y	1.98	-
A233R	S173P,S175P,F180Y,A233R	S173P,S175P,F180Y	2.03	-
S234K	S173P,S175P,F180Y,S234K	S173P,S175P,F180Y	1.78	1.25
E236C	T5C,S27K,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,E236C,T297P	T5C,S27K,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.21	1.08
E236C	Q6C,S27K,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,E236C,T297P	Q6C,S27K,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.51	1.13
E236C	S4C,S27K,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,E236C,T297P	S4C,S27K,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.06	0.94
E236C	A1*,T5C,S27K,S171N,S173P,G174R,S	A1*,T5C,S27K,S171N,S173P,G174R,	1.71	1.21

ES 2 813 727 T3

Tabla 4a: Rendimiento de lavado relativo de AMSA_{Mutación} en muestra textil estándar con leche con chocolate y hollín (PC-03) y una muestra textil estándar con sangre, leche y tinta con tratamiento térmico extra. (EMPA117EH)

Mutación	Variante con la mutación	Variante sin la mutación	PC-03	EMPA 117EH
	175P,F180Y,Q198E,E236C,T297P	S175P,F180Y,Q198E,T297P		
E236C	A1*,Q6C,S27K,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,E236C,T297P	A1*,Q6C,S27K,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.07	1.02
E236C	A1*,S4C,S27K,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,E236C,T297P	A1*,S4C,S27K,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.27	1.07
E236C	A1*,P3*,T5C,S27K,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,E236C,T297P	A1*,P3*,T5C,S27K,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.34	1.06
T241K	S173P,S175P,T241K	S173P,S175P	1.34	0.99
N245K	S173P,S175P,N245K	S173P,S175P	1.38	1.03
T246K	S173P,S175P,T246K	S173P,S175P	1.64	1.05
S248K	S173P,S175P,S248K	S173P,S175P	1.07	0.96
I264R	S173P,S175P,F180Y,I264R	S173P,S175P,F180Y	1.81	1.36
I264R	S173P,S175P,F180Y,I264R	S173P,S175P,F180Y	1.66	1.37
I264R	S173P,S175P,F180Y,I264R	S173P,S175P,F180Y	1.94	-
I264R	S173P,S175P,F180Y,I264R	S173P,S175P,F180Y	1.83	-
A267H	S173P,S175P,A267H	S173P,S175P	1.10	0.95
N268K	S173P,S175P,N268K	S173P,S175P	1.39	1.05
N268K	S27K,E127Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,N268K,T297P	S27K,E127Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.18	0.92
T269K	S173P,S175P,T269K	S173P,S175P	1.29	1.05
S270K	S173P,S175P,S270K	S173P,S175P	1.27	1.08
S270K	S173P,S175P,S270K	S173P,S175P	1.25	1.07
S270K	S173P,S175P,F180Y,Q198E,S270K,T297P	S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.40	1.22
S270K	S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,S270K,T297P	S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.21	1.06
S270K	S27K,I137E,S173P,S175P,F180Y,S270K,T297P	S27K,I137E,S173P,S175P,F180Y,T297P	1.19	1.02
S270K	S27K,N87K,I121V,S171N,S173P,S175P,F180Y,S270K,T297P	S27K,N87K,I121V,S171N,S173P,S175P,F180Y,T297P	1.11	1.01
S270K	S27K,S173P,S175P,F180Y,S270K,T297P	S27K,S173P,S175P,F180Y,T297P	1.11	0.97
S270K	S27K,S173P,S175P,F180Y,S270K,T297P	S27K,S173P,S175P,F180Y,T297P	1.20	-
S272K	S173P,S175P,S272K	S173P,S175P	1.31	1.03
S274K	S173P,S175P,S274K	S173P,S175P	1.20	1.04
T278K	S173P,S175P,T278K	S173P,S175P	1.39	1.04
E279Q	S173P,S175P,E279Q	S173P,S175P	1.67	1.01
E279H	S173P,S175P,E279H	S173P,S175P	1.23	1.04

ES 2 813 727 T3

Tabla 4a: Rendimiento de lavado relativo de AMSA_{Mutación} en muestra textil estándar con leche con chocolate y hollín (PC-03) y una muestra textil estándar con sangre, leche y tinta con tratamiento térmico extra. (EMPA117EH)

Mutación	Variante con la mutación	Variante sin la mutación	PC-03	EMPA 117EH
V286H	S173P,S175P,V286H	S173P,S175P	1.06	1.02
V286K	I137E,S173P,S175P,F180Y,V286K,T297P	I137E,S173P,S175P,F180Y,T297P	0.93	1.14
V286K	I137E,S173P,S175P,F180Y,V286K,T297P	I137E,S173P,S175P,F180Y,T297P	0.73	1.07
Y287R	S173P,S175P,Y287R	S173P,S175P	1.36	1.07
Y287H	S173P,S175P,Y287H	S173P,S175P	1.15	0.98
D288N	I137E,S173P,S175P,F180Y,D288N,T297P	I137E,S173P,S175P,F180Y,T297P	0.77	1.09
D288N	S173P,S175P,F180Y,Q198E,D288N,T297P	S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.34	1.19
D288K	I137E,S173P,S175P,F180Y,D288K,T297P	I137E,S173P,S175P,F180Y,T297P	0.69	1.12
I293R	S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,I293R,T297P	S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.17	1.03
I293R	S27K,I137E,S173P,S175P,F180Y,I293R,T297P	S27K,I137E,S173P,S175P,F180Y,T297P	1.11	1.03
I293K	S173P,S175P,I293K	S173P,S175P	1.36	1.05
T297K	S173P,S175P,T297K	S173P,S175P	1.42	1.13
K311R	G28D,S86K,N87R,Q89R,S173P,S175P,K311R	G28D,S86K,N87R,Q89R,S173P,S175P	1.51	1.13
K311R	G28N,S86K,N87R,Q89R,S173P,S175P,K311R	G28N,S86K,N87R,Q89R,S173P,S175P	0.95	1.06

Tabla 4b: Rendimiento de lavado relativo de AMSA_{Mutación} en muestra textil estándar con leche con chocolate y hollín (PC-03) y una muestra textil estándar con sangre, leche y tinta con tratamiento térmico extra. (EMPA117EH)

Mutación	Variante con la mutación	Variante sin la mutación	PC-03	EMPA117EH
D299R	S173P,S175P,F180Y,D299R	S173P,S175P,F180Y	1.38	1.11
N199K	S27K,N109S,I121V,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,N199K,S274V,T297P	S27K,N109S,I121V,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,S274V,T297P	1.39	1.17
N199K	S27K,I150S,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,N199K,S274V,T297P	S27K,I150S,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,S274V,T297P	1.42	1.12
N199K	S27K,Q70A,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,N199K,S274V,T297P	S27K,Q70A,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,S274V,T297P	1.43	1.09
N199K	S27K,I150L,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,N199K,T297P	S27K,I150L,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.20	NA
Q197K	S27K,D147N,I150S,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q197K,Q198E,S274V,T297P	S27K,D147N,I150S,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,S274V,T297P	1.25	1.04
Q197K	S27K,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y	S27K,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y	0.98	1.09

ES 2 813 727 T3

Tabla 4b: Rendimiento de lavado relativo de AMSA _{Mutación} en muestra textil estándar con leche con chocolate y hollín (PC-03) y una muestra textil estándar con sangre, leche y tinta con tratamiento térmico extra. (EMPA117EH)				
Mutación	Variante con la mutación	Variante sin la mutación	PC-03	EMPA117EH
	0Y,Q197K,Q198E,T297P	180Y,Q198E,T297P		
Q197K	S27K,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q197K,Q198E,T297P	S27K,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.16	1.14
D147S	S27K,D147S,I150S,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,S274V,T297P	S27K,I150S,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,S274V,T297P	1.58	0.96
D147N	S27K,Q70A,D147N,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,N199K,S274V,T297P	S27K,Q70A,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,N199K,S274V,T297P	1.20	0.94
D147N	S27K,D147N,I150S,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,N199K,R224G,T297P	S27K,I150S,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,N199K,R224G,T297P	1.13	0.96
D147N	S27K,D147N,I150S,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,S274V,T297P	S27K,I150S,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,S274V,T297P	1.67	1.01
D147N	S27K,D147N,I150S,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,S274V,T297P	S27K,I150S,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,S274V,T297P	1.39	1.03
G132H	S27K,N87K,G132H,V162T,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,S274V,T297P	S27K,N87K,V162T,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,S274V,T297P	1.15	1.04
E127S	E127S,S173P,S175P,F180Y	S173P,S175P,F180Y	1.78	1.16
S111R	S27K,N109S,*109aE,S111R,S171E,S173P,G174K,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,N199K,T297P	S27K,N109S,*109aE,S171E,S173P,G174K,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,N199K,T297P	1.75	1.13
S111R	S27K,S111R,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,S270V,S274V,L280V,T297P	S27K,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,S270V,S274V,L280V,T297P	1.08	0.95
N109K	S27K,Q70A,N109K,S111E,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,N199K,S274V,T297P	S27K,Q70A,S111E,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,N199K,S274V,T297P	1.12	1.02
N109K	S27K,N109K,S111E,S171E,S173P,G174K,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,N199K,T297P	S27K,S111E,S171E,S173P,G174K,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,N199K,T297P	1.36	1.08
N109K	S27K,N109K,S111D,S171E,S173P,G174K,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,N199K,T297P	S27K,S111D,S171E,S173P,G174K,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,N199K,T297P	1.13	0.98
N109K	S27K,N109K,S111E,S171E,S173P,G174K,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,N199K,T297P	S27K,S111E,S171E,S173P,G174K,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,N199K,T297P	1.15	1.04
N109K	S27K,N109K,S111D,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P	S27K,S111D,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.29	1.12
N109K	S27K,N109K,S111E,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P	S27K,S111E,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.34	1.15
N109K	S27K,N109K,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P	S27K,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P	0.96	1.06

ES 2 813 727 T3

Tabla 4b: Rendimiento de lavado relativo de AMSA_{Mutación} en muestra textil estándar con leche con chocolate y hollín (PC-03) y una muestra textil estándar con sangre, leche y tinta con tratamiento térmico extra. (EMPA117EH)

Mutación	Variante con la mutación	Variante sin la mutación	PC-03	EMPA117EH
D147N	S27K,G142E,D147N,I150S,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,N199K,T297P	S27K,G142E,I150S,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,N199K,T297P	2.44	1.02
N87K	S27K,N87K,S173P,G174K,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,V286R,T297P	S27K,S173P,G174K,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,V286R,T297P	0.96	1.08
N87K	S27K,N87K,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,T297P	S27K,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,T297P	1.72	1.01
N87K	S27K,N87K,V162T,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,S274V,T297P	S27K,V162T,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,S274V,T297P	1.17	0.98
N87K	S27K,N87K,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P	S27K,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P	0.96	1.07
N87K	S27K,N87K,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P	S27K,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.03	1.09
N87K	S4K,S27K,N87K,E127Q,G132H,Y156R,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	S4K,S27K,E127Q,G132H,Y156R,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P	1.16	NA
S129K	S27K,S114V,I121V,S129K,S173P,G174K,S175P,F180Y,L184F,Q198E,N199K,T297P	S27K,S114V,I121V,S173P,G174K,S175P,F180Y,L184F,Q198E,N199K,T297P	1.05	1.15
T24R	T24R,S173P,S175P,F180Y	S173P,S175P,F180Y	1.87	1.26

Tabla 5. Rendimiento de lavado relativo de AMSA_{Mutación} para las mutaciones de la columna 1, usando una muestra textil estándar con huevo y pigmento (CS-37).

Mutación	Variantes con las mutaciones	Variantes sin las mutaciones	CS-37
Q18H	Q18H,S173P,S175P	S173P,S175P	1.39
G112R	G112R,S173P,S175P,F180Y	S173P,S175P,F180Y	3.56
G112R	G112R,S173P,S175P	S173P,S175P	2.49
D116A	D116A,S173P,S175P,F180Y	S173P,S175P,F180Y	1.81
T131H	T131 H,S173P,S175P	S173P,S175P	1.06
G142K	G142K,S173P,S175P	S173P,S175P	3.68
G142R	G142R,S173P,S175P	S173P,S175P	5.80
S143H	S143H,S173P,S175P	S173P,S175P	1.10
D147W	D147W,S173P,S175P	S173P,S175P	1.68
G174H	I137E,S173P,G174H,S175P,F180Y,T297P	I137E,S173P,S175P,F180Y,T297P	2.41
D206H	S173P,S175P,D206H	S173P,S175P	1.07
F207H	S173P,S175P,F207H	S173P,S175P	1.69
I220H	S173P,S175P,I220H	S173P,S175P	1.42
I247K	S173P,S175P,I247K	S173P,S175P	1.31
N268H	S173P,S175P,N268H	S173P,S175P	1.33
T269H	S173P,S175P,T269H	S173P,S175P	1.05
T278H	S173P,S175P,T278H	S173P,S175P	1.17

LISTADO DE SECUENCIAS

[0261]

5

<110> Novozymes A/S

<120> Variantes de proteasas y nucleótidos que las codifican

<130> 12932-WO-PCT

<160> 5

10 <170> Versión de PatentIn 3.5

<210> 1

<211> 1263

<212> ADN

<213> bacillus sp.

15 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(1263)

<220>

<221> sig_peptide

20 <222> (1)..(80)

<220>

<221> mat_peptide

<222> (331)..(1263)

ES 2 813 727 T3

<400> 1

atg aag aaa ccg ttg ggg aaa att gtc gca agc acc gca cta ctc	45
Met Lys Lys Pro Leu Gly Lys Ile Val Ala Ser Thr Ala Leu Leu	
-110 -105 -100	
att tct gtt gct ttt agt tca tcg atc gca tcg gct gca ctt gca aaa	93
Ile Ser Val Ala Phe Ser Ser Ser Ile Ala Ser Ala Ala Leu Ala Lys	
-95 -90 -85 -80	
gac aaa gtt gag gta aag gaa caa gat tca tat cgt gtg cta atc aaa	141
Asp Lys Val Glu Val Lys Glu Gln Asp Ser Tyr Arg Val Leu Ile Lys	
-75 -70 -65	
gca cca act aca tca atc agt act ttt caa tca caa tac gat gtc cgt	189
Ala Pro Thr Thr Ser Ile Ser Thr Phe Gln Ser Gln Tyr Asp Val Arg	
-60 -55 -50	
tgg gat ttt ggc aaa gag gga ttt aca aca gat gtt gat gcc aaa cag	237
Trp Asp Phe Gly Lys Glu Gly Phe Thr Thr Asp Val Asp Ala Lys Gln	
-45 -40 -35	
ctc caa acg ctt caa agc aac aaa gac att caa att cag aag gta aat	285
Leu Gln Thr Leu Gln Ser Asn Lys Asp Ile Gln Ile Gln Lys Val Asn	
-30 -25 -20	
gaa atg aca gta gaa act gtt aca aca gaa aag gcg gaa gtg acg gcg	333
Glu Met Thr Val Glu Thr Val Thr Thr Glu Lys Ala Glu Val Thr Ala	
-15 -10 -5 -1 1	
gta cca agt aca caa acc cct tgg ggc ata aag tca att tat aat gat	381
Val Pro Ser Thr Gln Thr Pro Trp Gly Ile Lys Ser Ile Tyr Asn Asp	
5 10 15	

ES 2 813 727 T3

caa tca att aca aaa aca act gga ggc agc gga att aag gta gct gtt	429
Gln Ser Ile Thr Lys Thr Thr Gly Gly Ser Gly Ile Lys Val Ala Val	
20 25 30	
tta gat aca ggg gtt tat aca agc cat tta gat tta gct ggt tct gcc	477
Leu Asp Thr Gly Val Tyr Thr Ser His Leu Asp Leu Ala Gly Ser Ala	
35 40 45	
gag caa tgc aag gat ttt acc caa tct aat cct tta gta gat ggt tca	525
Glu Gln Cys Lys Asp Phe Thr Gln Ser Asn Pro Leu Val Asp Gly Ser	
50 55 60 65	
tgc acc gat cgc caa ggg cat ggt aca cat gtt gcc gga act gta ttg	573
Cys Thr Asp Arg Gln Gly His Gly Thr His Val Ala Gly Thr Val Leu	
70 75 80	
gcg cat gga ggc agt aat gga caa ggc gtt tac ggg gtg gct ccg caa	621
Ala His Gly Gly Ser Asn Gly Gln Gly Val Tyr Gly Val Ala Pro Gln	
85 90 95	
gcg aaa cta tgg gca tat aaa gta tta gga gat aac ggc agc gga tac	669
Ala Lys Leu Trp Ala Tyr Lys Val Leu Gly Asp Asn Gly Ser Gly Tyr	
100 105 110	
tct gat gat att gca gca gct atc aga cat gta gct gat gaa gct tca	717
Ser Asp Asp Ile Ala Ala Ala Ile Arg His Val Ala Asp Glu Ala Ser	
115 120 125	
cgt aca ggt tcc aaa gta gta att aat atg tcg cta ggt tca tct gcc	765
Arg Thr Gly Ser Lys Val Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Ser Ser Ala	
130 135 140 145	
aag gat tca ttg att gct agt gca gta gat tat gca tat gga aaa ggt	813
Lys Asp Ser Leu Ile Ala Ser Ala Val Asp Tyr Ala Tyr Gly Lys Gly	
150 155 160	
gta tta atc gtt gct gcg gct ggt aat agt ggg tca ggc agc aat aca	861
Val Leu Ile Val Ala Ala Ala Gly Asn Ser Gly Ser Gly Ser Asn Thr	
165 170 175	
atc ggc ttt cct ggc ggg ctt gta aat gca gtg gca gta gcg gca ttg	909
Ile Gly Phe Pro Gly Gly Leu Val Asn Ala Val Ala Val Ala Ala Leu	
180 185 190	
gag aat gtt cag caa aat gga act tat cga gta gct gat ttc tca tct	957
Glu Asn Val Gln Gln Asn Gly Thr Tyr Arg Val Ala Asp Phe Ser Ser	
195 200 205	
aga ggg aat ccg gca act gct gga gat tat atc att caa gag cgt gat	1005
Arg Gly Asn Pro Ala Thr Ala Gly Asp Tyr Ile Ile Gln Glu Arg Asp	
210 215 220 225	
att gaa gtt tca gct ccg gga gca agt gta gag tct aca tgg tac act	1053
Ile Glu Val Ser Ala Pro Gly Ala Ser Val Glu Ser Thr Trp Tyr Thr	
230 235 240	
ggc ggt tat aat acg atc agc ggt aca tca atg gct aca cct cat gta	1101
Gly Gly Tyr Asn Thr Ile Ser Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val	
245 250 255	
gct ggg tta gct gct aaa atc tgg tca gcg aat act tca tta agt cat	1149
Ala Gly Leu Ala Ala Lys Ile Trp Ser Ala Asn Thr Ser Leu Ser His	

ES 2 813 727 T3

260	265	270	
agc caa ctg cgc aca gaa ttg	caa aat cgc gct aaa gta tat gat att		1197
Ser Gln Leu Arg Thr Glu Leu	Gln Asn Arg Ala Lys Val Tyr Asp Ile		
275	280	285	
aaa ggt ggt atc gga gcc gga	aca ggt gac gat tat gca tca ggg ttc		1245
Lys Gly Gly Ile Gly Ala Gly	Thr Gly Asp Asp Tyr Ala Ser Gly Phe		
290	295	300	305
gga tat cca aga gta aaa			1263
Gly Tyr Pro Arg Val Lys			
	310		

<210> 2
 <211> 421
 <212> PRT
 <213> bacillus sp.

5

ES 2 813 727 T3

<400> 2

Met Lys Lys Pro Leu Gly Lys Ile Val Ala Ser Thr Ala Leu Leu
 -110 -105 -100

Ile Ser Val Ala Phe Ser Ser Ser Ile Ala Ser Ala Ala Leu Ala Lys
 -95 -90 -85 -80

Asp Lys Val Glu Val Lys Glu Gln Asp Ser Tyr Arg Val Leu Ile Lys
 -75 -70 -65

Ala Pro Thr Thr Ser Ile Ser Thr Phe Gln Ser Gln Tyr Asp Val Arg
 -60 -55 -50

Trp Asp Phe Gly Lys Glu Gly Phe Thr Thr Asp Val Asp Ala Lys Gln
 -45 -40 -35

Leu Gln Thr Leu Gln Ser Asn Lys Asp Ile Gln Ile Gln Lys Val Asn
 -30 -25 -20

Glu Met Thr Val Glu Thr Val Thr Thr Glu Lys Ala Glu Val Thr Ala
 -15 -10 -5 -1 1

Val Pro Ser Thr Gln Thr Pro Trp Gly Ile Lys Ser Ile Tyr Asn Asp
 5 10 15

Gln Ser Ile Thr Lys Thr Thr Gly Gly Ser Gly Ile Lys Val Ala Val
 20 25 30

Leu Asp Thr Gly Val Tyr Thr Ser His Leu Asp Leu Ala Gly Ser Ala
 35 40 45

Glu Gln Cys Lys Asp Phe Thr Gln Ser Asn Pro Leu Val Asp Gly Ser

ES 2 813 727 T3

50					55						60					65
Cys	Thr	Asp	Arg	Gln	Gly	His	Gly	Thr	His	Val	Ala	Gly	Thr	Val	Leu	
				70					75					80		
Ala	His	Gly	Gly	Ser	Asn	Gly	Gln	Gly	Val	Tyr	Gly	Val	Ala	Pro	Gln	
			85					90					95			
Ala	Lys	Leu	Trp	Ala	Tyr	Lys	Val	Leu	Gly	Asp	Asn	Gly	Ser	Gly	Tyr	
		100					105					110				
Ser	Asp	Asp	Ile	Ala	Ala	Ala	Ile	Arg	His	Val	Ala	Asp	Glu	Ala	Ser	
	115						120				125					
Arg	Thr	Gly	Ser	Lys	Val	Val	Ile	Asn	Met	Ser	Leu	Gly	Ser	Ser	Ala	
130					135					140					145	
Lys	Asp	Ser	Leu	Ile	Ala	Ser	Ala	Val	Asp	Tyr	Ala	Tyr	Gly	Lys	Gly	
				150					155					160		
Val	Leu	Ile	Val	Ala	Ala	Ala	Gly	Asn	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Asn	Thr	
			165					170					175			
Ile	Gly	Phe	Pro	Gly	Gly	Leu	Val	Asn	Ala	Val	Ala	Val	Ala	Ala	Leu	
		180					185					190				
Glu	Asn	Val	Gln	Gln	Asn	Gly	Thr	Tyr	Arg	Val	Ala	Asp	Phe	Ser	Ser	
	195					200					205					
Arg	Gly	Asn	Pro	Ala	Thr	Ala	Gly	Asp	Tyr	Ile	Ile	Gln	Glu	Arg	Asp	
210					215					220					225	
Ile	Glu	Val	Ser	Ala	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Glu	Ser	Thr	Trp	Tyr	Thr	
				230					235					240		
Gly	Gly	Tyr	Asn	Thr	Ile	Ser	Gly	Thr	Ser	Met	Ala	Thr	Pro	His	Val	
			245					250					255			
Ala	Gly	Leu	Ala	Ala	Lys	Ile	Trp	Ser	Ala	Asn	Thr	Ser	Leu	Ser	His	
		260					265					270				
Ser	Gln	Leu	Arg	Thr	Glu	Leu	Gln	Asn	Arg	Ala	Lys	Val	Tyr	Asp	Ile	
	275					280					285					
Lys	Gly	Gly	Ile	Gly	Ala	Gly	Thr	Gly	Asp	Asp	Tyr	Ala	Ser	Gly	Phe	
290					295					300					305	

Gly Tyr Pro Arg Val Lys
310

5 <210> 3
<211> 311
<212> PRT
<213> Bacillus sp.

ES 2 813 727 T3

<400> 3

Ala Val Pro Ser Thr Gln Thr Pro Trp Gly Ile Lys Ser Ile Tyr Asn
 1 5 10 15

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

Val Leu Asp Thr Gly Val Tyr Thr Ser His Leu Asp Leu Ala Gly Ser
 35 40 45

Ala Glu Gln Cys Lys Asp Phe Thr Gln Ser Asn Pro Leu Val Asp Gly
 50 55 60

Ser Cys Thr Asp Arg Gln Gly His Gly Thr His Val Ala Gly Thr Val
 65 70 75 80

Leu Ala His Gly Gly Ser Asn Gly Gln Gly Val Tyr Gly Val Ala Pro
 85 90 95

Gln Ala Lys Leu Trp Ala Tyr Lys Val Leu Gly Asp Asn Gly Ser Gly
 100 105 110

Tyr Ser Asp Asp Ile Ala Ala Ala Ile Arg His Val Ala Asp Glu Ala
 115 120 125

Ser Arg Thr Gly Ser Lys Val Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Ser Ser
 130 135 140

Ala Lys Asp Ser Leu Ile Ala Ser Ala Val Asp Tyr Ala Tyr Gly Lys
 145 150 155 160

Gly Val Leu Ile Val Ala Ala Ala Gly Asn Ser Gly Ser Gly Ser Asn
 165 170 175

Thr Ile Gly Phe Pro Gly Gly Leu Val Asn Ala Val Ala Val Ala Ala
 180 185 190

Leu Glu Asn Val Gln Gln Asn Gly Thr Tyr Arg Val Ala Asp Phe Ser
 195 200 205

ES 2 813 727 T3

Ser Arg Gly Asn Pro Ala Thr Ala Gly Asp Tyr Ile Ile Gln Glu Arg
 210 215 220

Asp Ile Glu Val Ser Ala Pro Gly Ala Ser Val Glu Ser Thr Trp Tyr
 225 230 235 240

Thr Gly Gly Tyr Asn Thr Ile Ser Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His
 245 250 255

Val Ala Gly Leu Ala Ala Lys Ile Trp Ser Ala Asn Thr Ser Leu Ser
 260 265 270

His Ser Gln Leu Arg Thr Glu Leu Gln Asn Arg Ala Lys Val Tyr Asp
 275 280 285

Ile Lys Gly Gly Ile Gly Ala Gly Thr Gly Asp Asp Tyr Ala Ser Gly
 290 295 300

Phe Gly Tyr Pro Arg Val Lys
 305 310

- <210> 4
- <211> 311
- <212> PRT
- <213> Bacillus sp.

5

ES 2 813 727 T3

<400> 4

Ala	Val	Pro	Ser	Thr	Gln	Thr	Pro	Trp	Gly	Ile	Lys	Ser	Ile	Tyr	Asn
1				5					10					15	
Asp	Gln	Ser	Ile	Thr	Lys	Thr	Thr	Gly	Gly	Ser	Gly	Ile	Lys	Val	Ala
			20					25					30		
Val	Leu	Asp	Thr	Gly	Val	Tyr	Thr	Ser	His	Leu	Asp	Leu	Ala	Gly	Ser
		35					40					45			
Ala	Glu	Gln	Cys	Lys	Asp	Phe	Thr	Gln	Ser	Asn	Pro	Leu	Val	Asp	Gly
	50					55					60				
Ser	Cys	Thr	Asp	Arg	Gln	Gly	His	Gly	Thr	His	Val	Ala	Gly	Thr	Val
65					70					75					80
Leu	Ala	His	Gly	Gly	Ser	Asn	Gly	Gln	Gly	Val	Tyr	Gly	Val	Ala	Pro
				85					90					95	
Gln	Ala	Lys	Leu	Trp	Ala	Tyr	Lys	Val	Leu	Gly	Asp	Asn	Gly	Ser	Gly
			100					105					110		

ES 2 813 727 T3

Tyr Ser Asp Asp Ile Ala Ala Ala Ile Arg His Val Ala Asp Glu Ala
 115 120 125

Ser Arg Thr Gly Ser Lys Val Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Ser Ser
 130 135 140

Ala Lys Asp Ser Leu Ile Ala Ser Ala Val Asp Tyr Ala Tyr Gly Lys
 145 150 155 160

Gly Val Leu Ile Val Ala Ala Ala Gly Asn Ser Gly Pro Gly Pro Asn
 165 170 175

Thr Ile Gly Phe Pro Gly Gly Leu Val Asn Ala Val Ala Val Ala Ala
 180 185 190

Leu Glu Asn Val Gln Gln Asn Gly Thr Tyr Arg Val Ala Asp Phe Ser
 195 200 205

Ser Arg Gly Asn Pro Ala Thr Ala Gly Asp Tyr Ile Ile Gln Glu Arg
 210 215 220

Asp Ile Glu Val Ser Ala Pro Gly Ala Ser Val Glu Ser Thr Trp Tyr
 225 230 235 240

Thr Gly Gly Tyr Asn Thr Ile Ser Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His
 245 250 255

Val Ala Gly Leu Ala Ala Lys Ile Trp Ser Ala Asn Thr Ser Leu Ser
 260 265 270

His Ser Gln Leu Arg Thr Glu Leu Gln Asn Arg Ala Lys Val Tyr Asp
 275 280 285

Ile Lys Gly Gly Ile Gly Ala Gly Thr Gly Asp Asp Tyr Ala Ser Gly
 290 295 300

Phe Gly Tyr Pro Arg Val Lys
 305 310

<210> 5
 <211> 311

ES 2 813 727 T3

<212> PRT
<213> Bacillus sp.

<400> 5

	Ala	Val	Pro	Ser	Thr	Gln	Thr	Pro	Trp	Gly	Ile	Lys	Ser	Ile	Tyr	Asn
5	1				5					10					15	

ES 2 813 727 T3

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

Val Leu Asp Thr Gly Val Tyr Thr Ser His Leu Asp Leu Ala Gly Ser
 35 40 45

Ala Glu Gln Cys Lys Asp Phe Thr Gln Ser Asn Pro Leu Val Asp Gly
 50 55 60

Ser Cys Thr Asp Arg Gln Gly His Gly Thr His Val Ala Gly Thr Val
 65 70 75 80

Leu Ala His Gly Gly Ser Asn Gly Gln Gly Val Tyr Gly Val Ala Pro
 85 90 95

Gln Ala Lys Leu Trp Ala Tyr Lys Val Leu Gly Asp Asn Gly Ser Gly
 100 105 110

Tyr Ser Asp Asp Ile Ala Ala Ala Ile Arg His Val Ala Asp Glu Ala
 115 120 125

Ser Arg Thr Gly Ser Lys Val Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Ser Ser
 130 135 140

Ala Lys Asp Ser Leu Ile Ala Ser Ala Val Asp Tyr Ala Tyr Gly Lys
 145 150 155 160

Gly Val Leu Ile Val Ala Ala Ala Gly Asn Ser Gly Pro Gly Pro Asn
 165 170 175

Thr Ile Gly Tyr Pro Gly Gly Leu Val Asn Ala Val Ala Val Ala Ala
 180 185 190

Leu Glu Asn Val Gln Gln Asn Gly Thr Tyr Arg Val Ala Asp Phe Ser
 195 200 205

Ser Arg Gly Asn Pro Ala Thr Ala Gly Asp Tyr Ile Ile Gln Glu Arg
 210 215 220

Asp Ile Glu Val Ser Ala Pro Gly Ala Ser Val Glu Ser Thr Trp Tyr
 225 230 235 240

Thr Gly Gly Tyr Asn Thr Ile Ser Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His
 245 250 255

Val Ala Gly Leu Ala Ala Lys Ile Trp Ser Ala Asn Thr Ser Leu Ser
 260 265 270

ES 2 813 727 T3

His Ser Gln Leu Arg Thr Glu Leu Gln Asn Arg Ala Lys Val Tyr Asp
275 280 285

Ile Lys Gly Gly Ile Gly Ala Gly Thr Gly Asp Asp Tyr Ala Ser Gly
290 295 300

Phe Gly Tyr Pro Arg Val Lys
305 310

REIVINDICACIONES

1. Variante de proteasa que comprende la alteración S27K, donde cada posición corresponde a la SEQ ID N.º 3, y donde la variante de proteasa tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID N.º 3 y comprende un conjunto de alteraciones seleccionadas del grupo que consiste en:

- V2H,S4K,S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
- S4K,S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
- S4K,S27K,I137E,S173P,S175P,F180Y,T297P;
- A1*,V2*,P3*,S4K,S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P; donde "*" indica una deleción;
- S4K,S27K,N87K,E127Q,G132H,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
- N16K,D17N,S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
- N16H,S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
- N16H,S27K,I137E,S173P,S175P,F180Y,T297P;
- D17N,S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
- D17N,S27K,I137E,S173P,S175P,F180Y,T297P;
- Q18K,S27K,E127Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
- S27K,S173P,S175P;
- S27K,I137E,S173P,S175P,F180Y,T297P;
- S27K,S173P,S175P,Q198E;
- S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
- S27K,S144R,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
- S27K,D147N,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
- S27K,E127Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
- S27K,E50Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
- S27K,N87K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
- S4K,S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
- S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,S270K,T297P;
- S27K,Q97K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
- S27K,I137E,S144R,S173P,S175P,F180Y,T297P;
- S27K,E127Q,I137E,S173P,S175P,F180Y,T297P;
- S27K,I137E,S173P,G174R,S175P,F180Y,T297P;
- S27K,Q97K,I137E,S173P,S175P,F180Y,T297P;
- D17N,S27K,I137E,S173P,S175P,F180Y,T297P;
- S27K,D126G,S173P,S175P,F180Y,T297P;
- S27K,Y39R,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
- S27K,Y39R,I137E,S173P,S175P,F180Y,T297P;
- S27K,Y39R,N87K,I137E,S173P,S175P,F180Y,T297P;
- S27K,Y39R,I137E,S144R,S173P,S175P,F180Y,T297P;
- S27K,Y39R,I121V,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
- S27K,S41K,E127Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
- S27K,S65K,S173P,S175P,F180Y,T297P;
- S27K,N87K,I137E,S173P,S175P,F180Y,T297P;
- S27K,N87K,N109S,S111R,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
- S27K,N59L,T67V,N87K,G107N,I121V,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
- S27K,N59L,T67V,N87K,G107N,I121V,E127Q,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
- S27K,Q70N,N87K,I121V,E127Q,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,N199R,T297P;
- S27K,N59L,T67V,Q97K,G107N,I121V,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
- S27K,N109K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
- S27K,N109S,S111R,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
- S27K,S111R,A118R,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
- S27K,D126G,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
- S27K,D126G,E127Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
- S27K,E127Q,I137Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
- S27K,E127Q,S144R,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
- S27K,E127Q,V162S,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
- S27K,E127Q,V162E,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
- S27K,E127Q,V162Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
- S27K,E127Q,V162G,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
- S27K,E127Q,V162F,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
- S27K,E127Q,V162T,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
- S27K,E127Q,V162Y,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
- S27K,N109S,S111R,E127Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
- S27K,N59L,T67V,N87K,G107N,I121V,E127Q,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
- S27K,N87K,I121V,E127Q,S171N,S173P,S175P,F180Y,T297P;
- S27K,N109S,S111R,D147N,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;

ES 2 813 727 T3

- S27K,K146E,D147S,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,Q198E,N199K, E223K,T297P;
- S4K,D17N,S27K,N59L,N87K,Y156R,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
- S27K,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E, T297P;
- 5 • S27K,N59L,T67V,N87K,S114V,I121V,I150L,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y, T297P;
- S27K,E127Q,S173P,S175P,F180Y,E194S,Q198E,T297P;
- S27K,E127Q,S173P,S175P,F180Y,E194K,Q198E,T297P;
- S27K,E127Q,S173P,S175P,F180Y,E194Q,Q198E,T297P;
- S27K,E127Q,S173P,S175P,F180Y,N195H,V196N,Q197*,Q198*,N199*,G200*,T201*, T297P; donde "" indica una deleción;
- 10 • S27K,S173P,S175P,F180Y,Q197K,T297P;
- S27K,S173P,S175P,F180Y,E194R,Q197K,Q198E,T297P;
- S27K,S173P,S175P,F180Y,Q197K,Q198E,T297P;
- S27K,E127Q,S173P,S175P,F180Y,Q197K,Q198E,T297P;
- 15 • S27K,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q197K,Q198E,T297P;
- S27K,N109S,S111R,S173P,S175P,F180Y,Q197K,Q198E,T297P;
- S27K,S173P,G174K,S175P,F180Y,L184F,Q197K,Q198E,T297P;
- S27K,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q197R,Q198E,T297P;
- S27K,S173P,S175P,F180Y,E194*,Q197K,Q198E,N199K,T297P; donde "" indica una deleción;
- 20 • S27K,E127Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,N199K,T297P;
- S27K,I121V,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,N199K,T297P;
- S27K,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,N199K,T297P;
- S27K,N109S,S111R,S173P,S175P,F180Y,Q198E,N199K,T297P;
- S27K,S173P,S175P,F180Y,Q197K,Q198E,N199K,T297P;
- 25 • S27K,Q70N,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,N199K,T297P;
- S27K,I150S,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,N199K,T297P;
- S27K,S114V,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,N199K,T297P;
- S27K,Q70N,G107N,I121V,E127Q,S173P,S175P,F180*Y,Q198E,N199K,T297P;
- S27K,Q70A,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,N199K,T297P;
- 30 • S27K,Q70V,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,N199K,T297P;
- S27K,S173P,G174K,S175P,F180Y,L184F,Q198E,N199K,T297P;
- S27K,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,N199K,T297P;
- S27K,S171R,S173P,G174E,S175P,F180Y,Q198E,N199K,T297P;
- S27K,S171K,S173P,G174E,S175P,F180Y,Q198E,N199K,T297P;
- S27K,S171E,S173P,G174K,S175P,F180Y,Q198E,N199K,T297P;
- 35 • S27K,Q97K,E127Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,D225N,I247M,T297P;
- T5C,S27K,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,E236C,T297P;
- Q6C,S27K,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,E236C,T297P;
- S4C,S27K,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,E236C,T297P;
- 40 • A1*,T5C,S27K,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,E236C,T297P; donde "" indica una deleción;
- A1*,Q6C,S27K,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,E236C,T297P; donde "" indica una deleción;
- AT*,S4C,S27K,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,E236C,T297P; donde "" indica una deleción;
- A1*,P3*,T5C,S27K,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,E236C,T297P; donde "" indica una deleción;
- 45 • S27K,E127Q,S173P,S175P,F180Y,Q198E,N268K,T297P;
- S27K,I137E,S173P,S175P,F180Y,S270K,T297P;
- S27K,N87K,I121V,S171N,S173P,S175P,F180Y,S270K,T297P;
- S27K,S173P,S175P,F180Y,S270K,T297P;
- S27K,S173P,S175P,F180Y,Q198E,I293R,T297P;
- S27K,I137E,S173P,S175P,F180Y,I293R,T297P;
- 50 • S27K,D147N,I150S,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q197K,Q198E, S274V,T297P;
- S27K,D147N,I150S,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,S274V, T297P;
- S27K,D147N,I150S,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,N199K,R224G,T297P;
- S27K,D147S,I150S,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,S274V, T297P;
- 55 • S27K,G142E,D147N,I150S,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E, N199K,T297P;
- S27K,I150L,S171N,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,N199K,T297P;
- S27K,I150S,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,N199K,S274V, T297P;
- S27K,N109K,S111D,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
- S27K,N109K,S111D,S171E,S173P,G174K,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,N199K, T297P;
- S27K,N109K,S111E,S171 D,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
- 60 • S27K,N109K,S111E,S171 E,S173P,G174K,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,N199K,T297P;
- S27K,N109K,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
- S27K,N109S,*109aE,S111R,S171E,S173P,G174K,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,N199K,T297P; donde ""109aE" indica una inserción;
- S27K,N109S,I121V,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,N199K, S274V,T297P;
- 65 • S27K,N87K,G132H,V162T,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,S274V,T297P;
- S27K,N87K,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,T297P;

- S27K,N87K,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q198E,T297P;
 - S27K,N87K,S173P,G174K,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,V286R,T297P;
 - S27K,N87K,V162T,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,S274V,T297P;
 - S27K,Q70A,D147N,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,N199K,S274V,T297P;
 -
 - S27K,Q70A,N109K,S111E,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,N199K,S274V,T297P;
 - S27K,Q70A,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,N199K,S274V,T297P;
 - S27K,S111R,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,G182A,L184F,Q198E,S270V,S274V,L280V,T297P;
 - S27K,S114V,I121V,S129K,S173P,G174K,S175P,F180Y,L184F,Q198E,N199K,T297P;
 - S27K,S171D,S173P,G174R,S175P,F180Y,Q197K,Q198E,T297P; and
 - S4K,S27K,N87K,E127Q,G132H,Y156R,S173P,S175P,F180Y,Q198E,T297P.
- 5
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
2. Variante de proteasa según la reivindicación 1, donde la variante tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID N.º: 3.
 3. Variante de proteasa según la reivindicación 1, donde la variante comprende o consta de la SEQ ID N.º: 3 con uno de dichos conjuntos de alteraciones.
 4. Variante de proteasa según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que tiene un rendimiento de lavado mejorado en comparación con la proteasa de la SEQ ID N.º: 3 cuando se mide en el ensayo AMSA descrito en el presente documento.
 5. Composición detergente que comprende una variante de proteasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y uno o más componentes de detergente.
 6. Composición detergente según la reivindicación 5, que comprende además una o más enzimas seleccionadas del grupo que consta de proteasas, amilasas, lipasas, cutinasas, celulasas, endoglucanasas, xiloglucanasas, pectinasas, pectina liasas, xantanasas, peroxidadasas, haloperoxigenasas, catalasas y mananasas o cualquier mezcla de las mismas.
 7. Composición detergente según las reivindicaciones 5 o 6 en forma de barra, pastilla homogénea, pastilla con dos o más capas, una bolsa con uno o varios compartimentos, un polvo normal o compacto, un gránulo, una pasta, un gel o un líquido normal, compacto o concentrado.
 8. Composición detergente según cualquiera de las reivindicaciones 5-7, donde la composición es una composición de lavado de ropa.
 9. Composición detergente según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, donde la composición es una composición para lavar vajillas.
 10. Uso de una composición detergente según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9 en un proceso de limpieza, tal como el lavado de ropa o la limpieza de superficies duras como el lavado de vajillas.
 11. Uso según la reivindicación 10, donde la composición se usa en una aplicación de lavado de ropa.
 12. Método para obtener una variante de proteasa según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende introducir en una proteasa progenitora que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID N.º: 3 uno de dichos conjuntos de alteraciones tal como se define en la reivindicación 1 que comprende la alteración S27K, donde cada posición corresponde a la SEQ ID N.º: 3 y la variante tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos un 90 % o al menos un 95 % con la SEQ ID N.º: 3, y recuperar la variante.
 13. Método según la reivindicación 12, donde la proteasa progenitora comprende o consta de la secuencia de SEQ ID N.º: 3.