

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 906 780**

51 Int. Cl.:

C11D 3/386 (2006.01)

C11D 11/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.12.2016 PCT/EP2016/082139**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.08.2017 WO17129331**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2016 E 16825399 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.12.2021 EP 3408366**

54 Título: **Método de limpieza de un instrumento médico o dental**

30 Prioridad:

28.01.2016 EP 16153226

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

20.04.2022

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

COQUILLAT, JULIEN

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 906 780 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

Método de limpieza de un instrumento médico o dental

CAMPO DE LA INVENCION

5

[0001] La presente invención se refiere a métodos de limpieza de instrumentos médicos y dentales.

ANTECEDENTES

10 [0002] En la industria sanitaria, los instrumentos médicos deben limpiarse y desinfectarse a fondo antes de volverse a utilizarlos. Los procesos de limpieza incluyen varios pasos, de los cuales algunos pasos pueden automatizarse y otros pueden ser manuales. Los instrumentos que se limpian pueden estar muy manchados con suciedad biológica, en particular suciedad proteica; y los instrumentos en sí pueden ser afilados, pequeños o de forma irregular, lo que dificulta el acceso físico a la suciedad.

15

[0003] El documento WO 2014/110015 se refiere a composiciones y métodos para limpiar instrumentos médicos y dentales. Las composiciones descritas son preferiblemente no espumantes o generan poca espuma para permitir la inspección visual del proceso de limpieza, así como el manejo seguro de los instrumentos. Las composiciones descritas emplean preferiblemente proteasas seleccionadas, un carbonato y un tensioactivo no iónico.

20

[0004] En el documento GB 2482164 se divulgan composiciones de limpieza médica que comprenden enzimas y compuestos estabilizantes de boro y calcio.

RESUMEN

25

[0005] Sorprendentemente, se ha descubierto que las composiciones y métodos descritos proporcionan una eliminación mejorada de la suciedad de superficies, tales como instrumentos médicos y dentales. Las composiciones descritas son estables y operativas en un rango de pH y temperatura.

30

[0006] De este modo, la invención proporciona un método para limpiar un instrumento médico o dental que comprende:

35

a) sumergir el instrumento médico o dental en una composición acuosa que comprende

- i) del 0,001 % p/p al 1 % p/p de una proteasa, en donde la proteasa es una subtilisina, y
- ii) del 0,001 % p/p al 1 % p/p de un estabilizador de proteasas que es un aldehído peptídico;

40

- b) opcionalmente, lavar el instrumento con una composición detergente líquida; y
- c) enjuagar el instrumento;

en donde el estabilizador de proteasas que es un aldehído peptídico tiene la fórmula $P-B^2-B^1-B^0-H$ o un aducto de hidrosulfito de este que tiene la fórmula $P-B^2-B^1-N(H)-CHR-CHOH-SO_3M$, donde

45

- i) H es hidrógeno;
- ii) B^0 es un único resto de aminoácido con configuración L o D con la fórmula $-NH-CH(R)-C(=O)-$;
- iii) B^1 y B^2 son independientemente residuos de aminoácidos individuales;
- iv) R se selecciona independientemente del grupo que consiste en alquilo de C_{1-6} , arilo de C_{6-10} o arilalquilo de C_{7-10} opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes R' , idénticos o diferentes;
- 50 v) R' se selecciona independientemente del grupo que consiste en halógeno, $-OH$, $-OR$, $-SH$, $-SR$, $-NH_2$, $-NHR$, $-NR^2$, $-CO_2H$, $-CONH_2$, $-CONHR$, $-CONR^2$, $-NHC(=N)NH_2$;
- vi) R'' es un grupo alquilo de C_{1-6} ;
- vii) P es un grupo protector del extremo N-terminal; y
- viii) M es H o un metal alcalino, preferiblemente Na o K.

55

[0007] Estas y otras formas de realización resultarán evidentes para los expertos en la técnica y para otros a la vista de la descripción y formas de realización siguientes.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

60

[0008] La presente divulgación se refiere a composiciones y métodos que son eficaces para eliminar suciedad biológica de instrumentos médicos y dentales. Las composiciones descritas proporcionan una limpieza mejorada en comparación con las composiciones enzimáticas conocidas para la limpieza de instrumentos médicos y dentales.

[0009] Los inventores han descubierto que, al incluir un estabilizador de proteasas peptídico en una composición de limpieza que contiene proteasas para instrumentos médicos o dentales, la composición muestra una eficacia de limpieza mejorada. En la técnica se conocen otros estabilizadores de proteasas, como el ácido bórico o los ácidos borónicos; sin embargo, estos estabilizadores no dan como resultado una eficacia de limpieza mejorada cuando se incluyen en composiciones de limpieza similares.

[0010] Los estabilizadores de proteasas se utilizan normalmente para inhibir la actividad de las proteasas durante el almacenamiento de productos líquidos concentrados que contienen proteasas para reducir la proteólisis de enzimas y otras proteínas. En el producto concentrado, el estabilizador se une a la proteasa pero, tras la dilución acuosa, el estabilizador se libera de la proteasa. Sorprendentemente, la presente invención demuestra que el estabilizador de proteasas derivado de péptidos liberado mejora la limpieza de instrumentos médicos y dentales cuando se usa en una composición de limpieza que contiene proteasas.

Instrumentos médicos y dentales

[0011] Entre los instrumentos médicos y dentales que se limpian, se lavan y/o se ponen a remojo según la invención se incluyen dispositivos, instrumentos o equipos médicos y dentales, incluyendo cualquiera de los diversos instrumentos o dispositivos médicos o dentales que pueden beneficiarse de la limpieza con la composición de limpieza enzimática. Entre los instrumentos y dispositivos médicos y dentales ejemplares se incluyen instrumentos, dispositivos, herramientas, aparatos, utensilios y equipos utilizados en medicina u odontología, incluyendo aquellos que pueden esterilizarse en frío, o lavarse y luego esterilizarse con calor, o beneficiarse de otra manera de la limpieza en las composiciones divulgadas. Estos diversos instrumentos, dispositivos y equipos incluyen, pero no se limitan a: instrumentos de diagnóstico, bandejas, cubetas, soportes, estantes, fórceps, tijeras, cizallas, sierras (por ejemplo, sierras para huesos y sus hojas), pinzas hemostáticas, cuchillos, cinceles, pinzas gubias, limas, tenazas, taladros, brocas, escofinas, fresas, separadores, rompedores, elevadores, abrazaderas, portaagujas, transportadores, clips, ganchos, gubias, curetas, retractores, enderezadores, punzones, extractores, cucharones, queratómetros, espátulas, pinzas de párpados, trocares, dilatadores, jaulas, material de vidrio, tubos, catéteres, cánulas, taponés, *stents*, endoscopios, artroscopios y equipos relacionados, y similares, o combinaciones de estos.

Limpieza

[0012] El instrumental médico y dental se limpia, según la invención, remojándolo en una composición acuosa (composición de limpieza) que comprende aproximadamente del 0,001 % p/p al 1 % p/p de una proteasa, y aproximadamente del 0,001 % p/p al 1% p/p de un estabilizador de proteasas peptídico, preferiblemente un estabilizador de proteasas que es un aldehído peptídico, o un aducto de hidrosulfito de este. La composición acuosa puede comprender además una o más enzimas (enzimas que no son proteasas) y otros ingredientes de limpieza adecuados, como tensioactivos, humectantes y/u otros ingredientes como se describe a continuación en "composición detergente líquida". La composición también puede incluir una fuente de alcalinidad. El pH de la composición acuosa es típicamente alcalino; preferiblemente, el pH está en el rango de pH 7 a pH 10. El pH puede medirse directamente en la composición o en una solución al 5 % en agua.

[0013] En el contexto de la presente invención, "remojarse" significa humedecer los instrumentos médicos y dentales con la composición de limpieza antes mencionada, o sumergir total o parcialmente dichos instrumentos en la composición de limpieza durante un período de tiempo, o una combinación de ambos. Un instrumento médico o dental puede remojarse solo parcialmente con la composición de limpieza si solo se requiere limpiar una parte del instrumento. Por ejemplo, puede ser deseable evitar el contacto de circuitos electrónicos u otras piezas eléctricas con la composición de limpieza acuosa.

[0014] El término "limpiar" significa reducir la cantidad de suciedad proteica; por tanto, "suciedad" en el contexto de la invención es una sustancia proteica degradable por una proteasa. En una forma de realización particular, la suciedad de la invención es sangre, componentes sanguíneos, proteínas sanguíneas, fibrina, albúmina y/o hemoglobina.

[0015] Los instrumentos médicos o dentales se sumergen en la composición acuosa durante un tiempo suficiente para que sea eficaz en la reducción o eliminación de la suciedad de los instrumentos. Dependiendo de la cantidad de suciedad, los instrumentos se pueden remojar en la composición acuosa durante al menos 1 minuto. El remojo puede continuar incluso después de completar la limpieza. Por ejemplo, para mayor comodidad, la limpieza puede continuar durante la noche o incluso hasta 24 horas. El límite de tiempo superior está determinado por la robustez de los instrumentos, para evitar dañarlos.

[0016] Los instrumentos médicos o dentales pueden remojarse en la composición acuosa a una temperatura entre temperatura ambiente y 90 grados centígrados, preferiblemente entre 20 y 90 grados centígrados, más preferiblemente entre 30 y 80 grados centígrados, aún más preferiblemente entre 30 y 70 grados centígrados y, de la manera más preferible, entre 30 y 60 grados Celsius.

[0017] El remojo de los instrumentos médicos y dentales se puede realizar con o sin acción mecánica (como agitar o remover) en una bandeja, tina, recipiente o fregadero; o por pulverización, por ejemplo, a través de un lavador de instrumentos; por tratamiento ultrasónico, tratamiento en lavadora de carros o jaulas; por aplicación manual con una botella en forma de aerosol o espuma; o por lavado mecanizado en una máquina de lavado de instrumental de vidrio de laboratorio.

[0018] En una forma de realización, la limpieza de dispositivos médicos o dentales y/o equipos de tipo no médico se lleva a cabo en una lavadora-desinfectadora (médica) según la norma EN ISO 15883-1 (o como se describe en "Class II Special Controls Guidance Document: Medical Washers and Medical Washer-Disinfectors; Guidance for the Medical Device Industry and FDA Review Staff", Administración de Alimentos y Medicamentos de EE. UU. (FDA), febrero de 2002), usando los métodos de la invención.

[0019] Durante el remojo de los instrumentos médicos o dentales sucios, los dispositivos médicos o partes de los dispositivos médicos se ponen en contacto con una cantidad eficaz de la composición acuosa que comprende la proteasa y el estabilizador de proteasas que es un aldehído peptídico. La cantidad real de la composición utilizada se basará en el juicio del usuario y dependerá de factores tales como la formulación particular del producto de la composición, la concentración de la composición, la cantidad de artículos sucios que se remojarán y el grado de suciedad de los artículos. Posteriormente, los artículos pueden someterse a un método de lavado o aclarado manual o a máquina, que implica pasos de lavado adicionales y el uso de una composición detergente, y/o a un método de aclarado manual o a máquina. Las composiciones y los métodos descritos son eficaces para eliminar la suciedad de los instrumentos al reducir la cantidad de fregado necesaria en el proceso de limpieza.

[0020] La composición acuosa que comprende la proteasa y el estabilizador de proteasas que es un aldehído peptídico puede emplearse en una variedad de máquinas que lavan o remojan instrumentos, tales como instrumentos o dispositivos médicos o dentales. En dichas máquinas pueden cargarse manualmente formas líquidas, polvo u otras formas sólidas de la composición. Tales máquinas también pueden dispensar automáticamente las composiciones descritas. Dicha dispensación puede incluir disolver la composición de limpieza para formar una primera composición líquida concentrada, diluir opcionalmente la primera composición líquida concentrada para producir una segunda composición líquida concentrada (que está menos concentrada) y diluir la segunda composición líquida concentrada en la cámara de lavado o remojo para formar la composición de uso. La composición de uso se puede utilizar para lavar o remojar los instrumentos. Tal distribución también puede incluir disolver una composición de limpieza sólida una vez para formar una solución de uso.

[0021] Además de la limpieza de instrumentos y dispositivos médicos y dentales, las composiciones de limpieza acuosas descritas también se pueden usar para limpiar otras superficies, incluyendo equipos que se utilizan en la preparación de alimentos, como congeladores, hornos, cintas transportadoras, divisoras, laminadoras, cortadoras, rebanadoras, tolvas, clasificadoras, básculas, equipos de envasado, cuchillas, cuchillos, sierras para carne y otros utensilios de cocina. Las composiciones descritas también podrían usarse en aplicaciones de lavado manual y automático de vajilla y utensilios, como remojo previo para platos y utensilios, como detergente en una aplicación de fregadero automático, que es un dispositivo de lavado abierto con chorros de baja presión, y como un limpiador de superficies duras para su uso en cocinas, tiendas de comida preparada, supermercados, carnicerías, panaderías, restaurantes y áreas de almacenamiento en frío. También se puede usar como limpiador de superficies duras para vidrio, como el que se encuentra en espacios de venta de alimentos, desagües, superficies de baños, equipos de limpieza *in situ*, limpieza de camiones cisterna y vehículos de reparto, y lavado de botellas. Las composiciones descritas se pueden usar para limpiar superficies blandas tales como cortinas, ropa, alfombras y tapicerías. Finalmente, las composiciones descritas se pueden usar en el tratamiento del agua para ayudar a eliminar los depósitos de proteínas en los equipos de tratamiento del agua y para limpiar membranas.

Proteasa

[0022] Las enzimas proteasas para usar en la presente invención son subtilisinas e incluyen las de origen bacteriano, fúngico, vegetal, vírico o animal, por ejemplo, las de origen vegetal o microbiano. Se prefiere el origen microbiano. Se incluyen mutantes modificadas químicamente o modificadas por ingeniería genética de proteínas.

[0023] En el contexto de la presente invención, la familia de enzimas de las subtilisinas (EC 3.4.21.62) debe entenderse como la describen Siezen y col., *Protein Engng.* 4 (1991) 719-737 y Siezen et al. *Protein Science* 6 (1997) 501-523. Como se describe en ese documento, la familia de las subtilisinas se puede dividir en 3 subgrupos, es decir, I-S1 (subtilisinas "verdaderas"), I-S2 (proteasas altamente alcalinas) y subtilisinas intracelulares.

[0024] Ejemplos de subtilisinas son las derivadas de *Bacillus*, como *subtilisina lentus*, *Bacillus lentus*, *subtilisina Novo*, *subtilisina Carlsberg*, *Bacillus licheniformis*, *subtilisina BPN'*, *subtilisina 309*, *subtilisina 147* y *subtilisina 168* descrita en el documento WO 89/06279 y proteasa PD138 (WO 93/18140). Se describen ejemplos adicionales en los documentos WO 98/020115, WO 01/44452, WO 01/58275, WO 01/58276, WO 03/006602 y WO 04/099401.

[0025] Los ejemplos de variantes útiles se describen en los documentos WO 92/19729, WO 98/20115, WO 98/20116, y WO 98/34946, 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'. Más preferiblemente, las variantes de subtilisina 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, A236L, Q233H, K233H, K236L, Q245R, N252K, T274A (usando la numeración BPN).

[0026] Entre los ejemplos de subtilisinas disponibles comercialmente se incluyen Kannase™, Everlase™, Primase™, Duralase™, Esperase™, Alcalase™, Durazym™, Savinase™, Ovozyme™, Liquanase™, Coronase™, Polarzyme™, Pyrase™ y Clear-Lens™ Pro; Blaze™ (Novozymes A/S). Otras proteasas disponibles comercialmente incluyen Ronozyme™ Pro, Maxatase™, Maxacal™, Maxapem™, Opticlean™, Properase™, Purafect™, Purafect Ox™, Purafact Prime™, Excellase™, FN2™, FN3™ y FN4™ (comercializadas por Dupont).

[0027] En una forma de realización de la invención, la subtilisina es subtilisina 309 o subtilisina BPN', o una variante de cualquiera de estas. Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos de la subtilisina tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia, preferiblemente al menos un 75 %, más preferiblemente al menos un 80 %, más preferiblemente al menos un 85 %, más preferiblemente al menos un 90 %, más preferiblemente al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % y, de la manera más preferible, un 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2. En una forma de realización, la secuencia de aminoácidos de la subtilisina es la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2.

[0028] En una forma de realización, el número de sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos introducidas en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o de la SEQ ID NO: 2 es de hasta 10, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10; o hasta 5, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, o 5. Los cambios de aminoácidos pueden ser de naturaleza menor, es decir, sustituciones o inserciones de aminoácidos conservadoras que no afectan significativamente al plegamiento y/o la actividad de la proteína; pequeñas deleciones, típicamente de 1 a 30 aminoácidos; pequeñas extensiones amino- o carboxilo-terminales, tales como un residuo de metionina amino-terminal; un péptido conector pequeño de hasta 20-25 residuos; o una pequeña extensión que facilita la purificación al alterar la carga neta u otra función, como una cola de polihistidina, un epítipo antigénico o un dominio de unión.

[0029] Se pueden encontrar ejemplos de sustituciones conservadoras dentro de los grupos de aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), aminoácidos ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), aminoácidos polares (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 se describen, por ejemplo, por H. Neurath y R.L. Hill, 1979, en *The Proteins*, Academic Press, Nueva York. Las sustituciones comunes son Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu y Asp/Gly.

[0030] Los aminoácidos esenciales de un polipéptido se pueden identificar según los procedimientos conocidos en la técnica, como la mutagénesis dirigida o la mutagénesis de barrido de alanina (Cunningham y Wells, 1989, *Ciencia* 244: 1081-1085). En la 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 la subtilisina para identificar los residuos de aminoácidos que son fundamentales para la actividad de la molécula. Véase también, Hilton y col., 1996, *J. Biol. Chem* 271: 4699-4708. El sitio activo de la subtilisina u otra interacción biológica también puede determinarse mediante análisis físico de la estructura, mediante técnicas tales como resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción de electrones o marcaje por fotoafinidad, junto con la mutación de los aminoácidos del sitio de contacto putativo. Véase, por ejemplo, de Vos et al., 1992, *Science* 255: 306-312; Smith y col., 1992, *J. Mol. Biol.* 224: 899-904; Wlodavéase et al., 1992, *FEBS Lett.* 309: 59-64. La identidad de los aminoácidos esenciales también puede deducirse de un alineamiento con un polipéptido relacionado.

[0031] Las sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos simples o múltiples pueden realizarse y analizarse utilizando métodos conocidos de mutagénesis, recombinación y/o barajado, seguidos de un procedimiento de selección relevante, como los descritos por Reidhaar-Olson y Sauer, 1988, *Science* 241: 53-57; Bowie y Sauer, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2152-2156; WO 95/17413; o WO 95/22625. Otros métodos que se pueden usar incluyen PCR propensa a errores, presentación en fagos (por ejemplo, Lowman et al., 1991, *Biochemistry* 30: 10832-10837; la patente de EE. UU. n.º 5,223,409; WO 92/06204), y mutagénesis dirigida (Derbyshire et al., 1986, *gen* 46: 145; Ner et al., 1988, *DNA* 7: 127).

[0032] La relación entre dos secuencias de aminoácidos se describe mediante el parámetro "identidad de secuencia". Para los fines de la presente invención, la 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 implementa 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 posteriores. Los parámetros utilizados son la penalización por apertura de hueco de 10, la penalización por extensión de hueco de 0,5 y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (versión EMBOSS de BLOSUM62). La salida de Needle etiquetada como "identidad más larga" (obtenida con la opción -nobrief) se usa como el porcentaje de identidad y se calcula de la siguiente manera: (Residuos idénticos x 100)/(Longitud del alineamiento - Número total de huecos en el alineamiento).

Enzima distinta de la subtilisina

[0033] La enzima distinta de la subtilisina para combinar con el estabilizador de subtilisina (y la subtilisina), según la invención, puede ser una o más enzimas distintas de la subtilisina seleccionadas del grupo que consiste en lipasa, cutinasa, amilasa, carbohidrasa, celulasa, pectinasa, pectato liasa, mananasa, arabinasa, galactanasa, xilanasa, DNasa, perhidrolasa y oxidorreductasa (oxidasa, lacasa, peroxidasa, haloperoxidasa).

[0034] Los métodos y composiciones de la invención pueden incluir 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 enzima(s) distintas de la subtilisina. Una enzima distinta de la subtilisina es una enzima, preferiblemente una enzima detergente, que no es una subtilisina.

[0035] En general, las propiedades de la(s) enzima(s) seleccionada(s) deben ser compatibles con el detergente seleccionado (a saber, pH óptimo, compatibilidad con otros ingredientes enzimáticos y no enzimáticos, etc.), y las enzimas deben estar presentes en cantidades eficaces.

Lipasa/cutinasa

[0036] Entre las lipasas y cutinasas adecuadas se incluyen las de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen mutantes modificadas químicamente o modificadas por ingeniería genética de proteínas. Los ejemplos incluyen la lipasa de *Thermomyces*, por ejemplo, de *T. lanuginosus* (anteriormente llamada *Humicola lanuginosa*) como se describe en los documentos EP 258068 y EP 305216, la cutinasa de *Humicola*, por ejemplo *H. insolens* como se describe en WO 96/13580, una lipasa de *Pseudomonas*, por ejemplo, de *P. alcaligenes* o *P. pseudoalcaligenes* (EP 218272), *P. cepacia* (EP 331376), *P. stutzeri* (GB 1372034), *P. fluorescens*, *Pseudomonas sp. cepa* SD 705 (WO 95/06720 y WO 96/27002), *P. wisconsinensis* (WO 96/12012), una lipasa de *Bacillus*, por ejemplo, de *B. subtilis* (Dartois et al., Biochemica et Biophysica Acta, (1993), 1131, 253-360), *B. stearothermophilus* (JP 64/744992) o *B. pumilus* (WO 91/16422), lipasas de *Streptomyces* de tipo GDLS (WO10/065455), cutinasa de *Magnaporthe grisea* (WO10/107560), cutinasa de *Pseudomonas mendocina* (US5,389,536), lipasa de *Thermobifida fusca* (WO11/084412), lipasa de *Geobacillus stearothermophilus* (WO11/084417), lipasa de *Bacillus subtilis* (WO11/084599) y lipasa de *Streptomyces griseus* (WO11/150157) y *S. pristinaespiralis* (WO12/137147).

[0037] Otros ejemplos son variantes de lipasa como las descritas en los documentos WO 92/05249, WO 94/01541, EP 407225, EP 260105, WO 95/35381, WO 96/00292, WO 95/30744, WO 94/25578, WO 95/14783, WO 95/22615, WO 97/04079, WO 97/07202, WO 00/060063, WO 07/087508 y WO 09/109500.

[0038] Las enzimas lipasa disponibles en el mercado preferidas incluyen Lipolase™, Lipolase Ultra™ y Lipex™; Lecitase™, Lipolex™; Lipoclean™, Lipoprime™ (Novozymes A/S). Otras lipasas disponibles comercialmente incluyen Lumafast (Genencor Int Inc); Lipomax (Gist-Brocades/Genencor Int Inc) y lipasa de *Bacillus sp* de Solvay.

Carbohidrasa

[0039] Una carbohidrasa es un término general para las enzimas que escinden carbohidratos. En general, las carbohidrasas reciben el nombre de los sustratos sobre los que actúan, por ejemplo, las amilasas actúan sobre la amilasa y las celulasas actúan sobre la celulosa. Muchas carbohidrasas han encontrado un uso en aplicaciones de limpieza y lavado de ropa, tales como amilasa, celulasa, pectinasa, pectato liasa, mananasa, arabinasa, galactanasa y xilanasa, y todas ellas pueden aplicarse en la composición de limpieza líquida.

Amilasa

[0040] Las amilasas adecuadas incluyen las de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen mutantes modificadas químicamente o modificadas por ingeniería genética de proteínas. Las amilasas incluyen, por ejemplo, α -amilasas obtenidas de *Bacillus*, por ejemplo, de una cepa especial de *Bacillus licheniformis*, descrita con más detalle en la patente GB 1,296,839.

[0041] Entre los ejemplos de amilasas adecuadas se incluyen las amilasas que tienen la SEQ ID NO: 2 de WO 95/10603 o variantes que tienen un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3 de la misma. Las variantes preferidas se describen en los documentos WO 94/02597, WO 94/18314, WO 97/43424 y SEQ ID NO: 4 de WO 99/019467, como 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.

[0042] Diferentes amilasas adecuadas incluyen amilasas que tienen la SEQ ID NO: 6 de WO 02/010355 o variantes de esta que tienen una identidad de secuencia del 90 % con la SEQ ID NO: 6. Las variantes preferidas de la SEQ ID NO: 6 son aquellas que tienen una delección en las posiciones 181 y 182 y una sustitución en la posición 193. Otras amilasas que son adecuadas son la alfa-amilasa híbrida que comprende los residuos 1-33 de la alfa-amilasa derivada de *B. amyloliquefaciens* que se muestra en la SEQ ID NO: 6 de WO 2006/066594 y los residuos 36-483 de la alfa-amilasa de *B. liqueniformis* que se muestra en la SEQ ID NO: 4 de WO 2006/066594 o variantes que tienen una identidad de secuencia del 90 % de las mismas. 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 comprenden los residuos 1-33 de la alfa-amilasa derivada de *B. amyloliquefaciens* se muestran en la SEQ ID NO: 6 de WO 2006/066594 y los residuos 36-483 de la SEQ ID NO: 4 son las que tienen las sustituciones: M197T; H156Y+A181T+N190F+A209V+Q264S; o G48A+T49I+G107A+H156Y+A181T+N190F+1201F+A209V+Q264S.

[0043] Otras amilasas que son adecuadas son las amilasas que tienen la SEQ ID NO: 6 de WO 99/019467 o variantes de esta que tienen una identidad de secuencia del 90 % con la SEQ ID NO: 6. Las variantes preferidas de la SEQ ID NO: 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 aquellas que tienen una delección en las posiciones R181 y G182, o en las posiciones H183 y G184.

[0044] Las amilasas adicionales que se pueden usar son aquellas que tienen la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 7 de WO 96/023873 o variantes de la misma que tienen una identidad de secuencia del 90 % con la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 7. Las variantes preferidas de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 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. Las variantes más preferidas son aquellas que tienen una delección en las posiciones 181 y 182 o las posiciones 183 y 184. Las variantes de amilasa más preferidas de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 7 son aquellas que tienen una delección en las posiciones 183 y 184 y sustitución en una o más de las posiciones 140, 195, 206, 243, 260, 304 y 476.

[0045] Otras amilasas que pueden usarse son amilasas que tienen la SEQ ID NO: 2 de WO 08/153815, la SEQ ID NO: 10 de WO 01/66712 o variantes de la misma que tienen un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2 de WO 08/153815 o un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 10 de WO 01/66712. Las variantes preferidas de la SEQ ID NO: 10 de 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.

[0046] Otras amilasas adecuadas son las amilasas que tienen la SEQ ID NO: 2 de WO 09/061380 o variantes que tienen un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2 de la misma. Las variantes preferidas de la SEQ ID NO: 2 son aquellas que tienen un truncamiento del extremo C-terminal y/o 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 NO: 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 delección en la posición R180 y/o S181 o de T182 y/o G183. Las variantes de amilasa más preferidas de la SEQ ID NO: 2 son aquellas 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 extremo C terminal y, opcionalmente, comprenden además una sustitución en la posición 243 y/o una delección en la posición 180 y/o en la posición 181.

[0047] Otras amilasas adecuadas son la alfa-amilasa que tiene la SEQ ID NO: 12 de WO01/66712 o una variante que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 12. Las variantes de amilasa preferidas son aquellas que tienen una sustitución, una delección o una inserción en una o más de las siguientes posiciones de la SEQ ID NO: 12 de 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, 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, la más preferida es una variante que además tiene sustituciones en todas estas posiciones.

[0048] Otros ejemplos son variantes de amilasa como las descritas en los documentos WO2011/098531, WO2013/001078 y WO2013/001087.

[0049] Las amilasas disponibles comercialmente son Stainzyme™, Stainzyme Plus™, Amplify™, Resilience™, Everest™, Duramyl™, Termamyl™, Termamyl Ultra™; Natalase™, Fungamyl™ y BAN™ (Novozymes A/S), Rapidase™ y Purastar™/Effectenz™, Powerase™ y Preferenz S100 (de Genencor International Inc./DuPont).

Liasas

[0050] La liasa puede ser una pectato liasa derivada de *Bacillus*, particularmente de *B. licherniformis* o *B. agaradhaerens*, o una variante derivada de cualquiera de estas, por ejemplo, como se describe en las patentes US 6124127, WO 99/027083, WO 99/027084, WO 02/006442, WO 02/092741, WO 03/095638, Las pectato liasas disponibles en el mercado son XPECT™, Pectawash™ y Pectaway™ (Novozymes A/S).

Mananasa

[0051] 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*. En el documento WO 99/064619 se describen mananasas adecuadas. Una mananasa disponible en el mercado es Mannaway™ (Novozymes A/S).

Celulasa

[0052] Las celulasas adecuadas pueden ser de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen mutantes modificadas química o genéticamente. 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 los documentos US 4,435,307, US 5,648,263, US 5,691,178, US 5,776,757 y WO 89/09259.

[0053] Las celulasas especialmente adecuadas son las celulasas alcalinas o neutras que tienen beneficios para el cuidado del color. Ejemplos de tales celulasas son las celulasas descritas en los documentos 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 los documentos WO 94/07998, EP 0 531 315, US 5,457,046, US 5,686,593.

[0054] Las celulasas disponibles comercialmente incluyen Carezyme™, Celluzyme™, Celluclean™, Celuclast™, Endolase™, Renozyme™, Whitezyme™ (Novozymes A/S); Clazinase™, Puradax, Puradax HA y Puradax EG (comercializadas por Genencor) y KAC-500(B)™ (Corporación Kao).

Peroxidasas/Oxidasas

[0055] Las peroxidasas adecuadas están comprendidas por la clasificación enzimática EC 1.11.1.7, según lo establecido por el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB), o cualquier fragmento derivado de la misma, que presente actividad peroxidasa.

[0056] Las peroxidasas adecuadas incluyen las de origen vegetal, bacteriano o fúngico. Se incluyen mutantes modificadas químicamente o modificadas por ingeniería genética de proteínas. Ejemplos de peroxidasas útiles incluyen peroxidasas de *Coprinopsis*, por ejemplo, de *C. cinerea* (EP 179,486), y sus variantes como las descritas en WO 93/24618, WO 95/10602, y WO 98/15257.

[0057] Las peroxidasas también incluyen una enzima haloperoxidasa, tal como cloroperoxidasa, bromoperoxidasa y compuestos que poseen actividad cloroperoxidasa o bromoperoxidasa. Las haloperoxidasas se clasifican según su especificidad por los iones haluro. Las cloroperoxidasas (E.C. 1.11.1.10) catalizan la formación de hipoclorito a partir de iones de cloruro.

[0058] En una forma de realización, la haloperoxidasa de la invención es una cloroperoxidasa. Preferiblemente, la haloperoxidasa es una haloperoxidasa de vanadio, es decir, una haloperoxidasa que contiene vanadato. En un método preferido de la presente invención, la haloperoxidasa que contiene vanadato se combina con una fuente de ion cloruro.

[0059] Las haloperoxidasas se han aislado de muchos hongos diferentes, en particular del grupo de los hongos hifomicetos dematiáceos, como *Caldariomyces*, por ejemplo, *C. fumago*, *Alternaria*, *Curvularia*, por ejemplo, *C. verruculosa* y *C. inaequalis*, *Drechslera*, *Ulocladium* y *Botritis*.

5 [0060] También se han aislado haloperoxidasas de bacterias como *Pseudomonas*, por ejemplo, *P. pyrrocinia* y *Streptomyces*, por ejemplo, *S. aureofaciens*.

[0061] En una forma de realización preferida, la haloperoxidasa se deriva de *Curvularia* sp., en particular *Curvularia verruculosa* o *Curvularia inaequalis*, como *C. inaequalis* CBS 102.42 como se describe en WO 95/27046; o *C. verruculosa* CBS 147.63 o *C. verruculosa* CBS 444.70 como se describe en WO 97/04102; o de *Drechslera hartlebii* como se describe en WO 01/79459, *Dendryphiella salina* como se describe en WO 01/79458, *Phaeotrichoconis crotalarie* como se describe en WO 01/79461, o *Geniculosporium* sp. como se describe en WO 01/79460.

15 [0062] Las oxidasas adecuadas incluyen, en particular, cualquier enzima lacasa comprendida en la clasificación enzimática EC 1.10.3.2, o cualquier fragmento derivado de la misma que muestre actividad lacasa, o un compuesto que muestre una actividad similar, como una catecol oxidasa (EC 1.10.3.1), una o-aminofenol oxidasa (EC 1.10.3.4), o una bilirrubina oxidasa (EC 1.3.3.5).

20 [0063] Las enzimas lacasa preferidas son enzimas de origen microbiano. Las enzimas pueden derivarse de plantas, bacterias u hongos (incluyendo hongos filamentosos y levaduras).

[0064] Entre los ejemplos adecuados de hongos se incluyen una lacasa derivable de una cepa de *Aspergillus*, *Neurospora*, por ejemplo, *N. crassa*, *Podospora*, *Botrytis*, *Collybia*, *Fomes*, *Lentinus*, *Pleurotus*,

25 [0065] *Trametes*, por ejemplo, *T. villosa* y *T. versicolor*, *Rhizoctonia*, por ejemplo, *R. solani*, *Coprinopsis*, por ejemplo, *C. cinerea*, *C. comatus*, *C. friesii*, y *C. plicatilis*, *Psathyrella*, por ejemplo, *P. condelleana*, *Panaeolus*, por ejemplo, *P. papilionaceus*, *Myceliophthora*, por ejemplo, *M. thermophila*, *Schytalidium*, por ejemplo, *S.*

30 [0066] *thermophilum*, *Polyporus*, por ejemplo, *P. pinsitus*, *Phlebia*, por ejemplo, *P. radiata* (WO 92/01046), o *Coriolus*, por ejemplo, *C. hirsutus* (JP 2238885).

[0067] Entre los ejemplos adecuados de bacterias se incluye una lacasa derivada de una cepa de *Bacillus*. Se prefiere una lacasa derivada de *Coprinopsis* o *Myceliophthora*; en particular una lacasa derivada de *Coprinopsis cinerea*, como se describe en WO 97/08325; o de *Myceliophthora thermophila*, como se describe en WO 95/33836.

Desoxirribonucleasa (DNasa)

40 [0068] Las desoxirribonucleasas (DNasas) adecuadas son cualquier enzima que catalice la escisión hidrolítica de enlaces fosfodiéster en el esqueleto del ADN, degradando así el ADN. Según la invención, se prefiere una DNasa que se puede obtener de una bacteria; en particular, se prefiere una DNasa que se puede obtener de un *Bacillus*; en particular, se prefiere una DNasa que se puede obtener de *Bacillus subtilis* o *Bacillus licheniformis*. En la solicitud de patente WO 2011/098579 o en la PCT/EP2013/075922 se describen ejemplos de dichas DNasas.

Perhidrolasa

50 [0069] Las perhidrolasas adecuadas son capaces de catalizar una reacción de perhidrólisis que da como resultado la producción de un perácido a partir de un sustrato de éster de ácido carboxílico (acilo) en presencia de una fuente de peroxígeno (por ejemplo, peróxido de hidrógeno). Mientras que muchas enzimas realizan esta reacción a niveles bajos, las perhidrolasas muestran una alta proporción de perhidrólisis:hidrólisis, a menudo superior a 1. Las perhidrolasas adecuadas pueden ser de origen vegetal, bacteriano o fúngico. Se incluyen mutantes modificadas químicamente o modificadas por ingeniería genética de proteínas.

55 [0070] Los ejemplos de perhidrolasas útiles incluyen enzimas perhidrolasa procedentes de micobacterias naturales, o variantes de las mismas. Una enzima ejemplar se deriva de *Mycobacterium smegmatis*. Dicha enzima, sus propiedades enzimáticas, su estructura y sus variantes se describen en los documentos WO 2005/056782, WO 2008/063400, US 2008/145353, y US2007167344.

Estabilizador de proteasas que es un aldehído peptídico

[0071] El estabilizador de proteasas derivado de péptidos ("estabilizador de proteasas peptídico") usado en los métodos y composiciones de la invención es un aldehído peptídico o un aducto de hidrosulfito del mismo.

65

[0072] El estabilizador de proteasas que es un aldehído peptídico tiene la fórmula P-B²-B¹-B⁰-H o un aducto con la fórmula P-B²-B¹-N(H)-CHR-CHOH-SO₃M, en la que

i) H es hidrógeno;

ii) B⁰ es un único resto de aminoácido con configuración L- o D- con la fórmula -NH-CH(R)-C(=O)-;

iii) B¹ y B² son independientemente residuos de aminoácidos individuales;

iv) R se selecciona independientemente del grupo que consiste en alquilo de C₁₋₆, arilo de C₆₋₁₀ o arilalquilo de C₇₋₁₀ opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes R', idénticos o diferentes;

v) R' se selecciona independientemente del grupo que consiste en halógeno, -OH, -OR", -SH, -SR", -NH₂, -NHR", -NR"₂, -CO₂H, -CONH₂, -CONHR", -CONR"₂, -NHC(=N)NH₂;

vi) R" es un grupo alquilo de C₁₋₆;

vii) P es un grupo protector N-terminal, preferiblemente metoxicarbonilo (Moc) o benciloxycarbonilo (Cbz); y

viii) M es H o un metal alcalino, preferiblemente Na o K.

[0073] B⁰ puede ser un único residuo de aminoácido con configuración L o D, que está conectado a H a través del extremo C-terminal del aminoácido. B⁰ tiene la fórmula -NH-CH(R)-C(=O)-, en la que R es una cadena lateral alquilo de C₁₋₆, arilo de C₆₋₁₀ o arilalquilo de C₇₋₁₀, tal como metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, fenilo o bencilo, y donde R puede estar opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes R', idénticos o diferentes. Ejemplos particulares de B⁰ son la forma D o L de arginina (Arg), 3,4-dihidroxisfenilalanina, isoleucina (Ile), leucina (Leu), metionina (Met), norleucina (Nle), norvalina (Nva), fenilalanina (Phe), m-tirosina, p-tirosina (Tyr) y valina (Val). Una forma de realización particular es cuando B⁰ es leucina, metionina, fenilalanina, p-tirosina y valina.

[0074] B¹, que está conectado a B⁰ a través del extremo C-terminal del aminoácido, puede ser un aminoácido alifático, hidrófobo y/o neutro. Ejemplos de B¹ son alanina (Ala), cisteína (Cys), glicina (Gly), isoleucina (Ile), leucina (Leu), norleucina (Nle), norvalina (Nva), prolina (Pro), serina (Ser), treonina (Thr) y valina (Val). Ejemplos particulares de B¹ son alanina, glicina, isoleucina, leucina y valina. Una forma de realización particular es cuando B¹ es alanina, glicina o valina.

[0075] B², que está conectado a B¹ a través del extremo C-terminal del aminoácido, puede ser un aminoácido alifático, hidrófobo, neutro y/o polar. Ejemplos de B² son alanina (Ala), arginina (Arg), capreomicidina (Cpd), cisteína (Cys), glicina (Gly), isoleucina (Ile), leucina (Leu), norleucina (Nle), norvalina (Nva), fenilalanina (Phe), prolina (Pro), serina (Ser), treonina (Thr) y valina (Val). Ejemplos particulares de B² son alanina, arginina, capreomicidina, glicina, isoleucina, leucina, fenilalanina y valina. Una forma de realización particular es cuando B² es arginina, glicina, leucina, fenilalanina o valina.

[0076] El grupo protector N-terminal P puede seleccionarse de entre formilo, acetilo (Ac), benzoílo (Bz), trifluoroacetilo, metoxisuccinilo, grupos protectores uretano aromático y alifático tales como fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc), metoxicarbonilo (Moc), (fluorometoxi)carbonilo, benciloxycarbonilo (Cbz), t-butiloxycarbonilo (Boc) y adamantiloxycarbonilo; p-metoxibencilo carbonilo, bencilo (Bn), p-metoxibencilo (PMB), p-metoxifenilo (PMP), metoxiacetilo, metilamino carbonilo, metilsulfonilo, etilsulfonilo, bencilsulfonilo, metilfosforamidilo (MeOP(OH)(=O)) y bencilfosforamidilo (PhCH₂OP(OH)(=O)).

[0077] Los aldehídos peptídicos adecuados se describen en WO 2009/118375. Más particularmente, el péptido aldehído puede ser Cbz-Arg-Ala-Tyr-H, Ac-Gly-Ala-Tyr-H, Cbz-Gly-Ala-Tyr-H, Cbz-Gly-Ala-Tyr-CF₃, Cbz-Gly-Ala-Leu-H, Cbz-Val-Ala-Leu-H, Cbz-Val-Ala-Leu-CF₃, Moc-Val-Ala-Leu-CF₃, Cbz-Gly-Ala-Phe-H, Cbz-Gly-Ala-Phe-CF₃, Cbz-Gly-Ala-Val-H, Cbz-Gly-Gly-Tyr-H, Cbz-Gly-Gly-Phe-H, Cbz-Arg-Val-Tyr-H, Cbz-Leu-Val-Tyr-H, MeO-CO-Val-Ala-Leu-H, MeNCO-Val-Ala-Leu-H, MeSO₂-Val-Ala-Leu-H, PhCH₂OP(OH)(O)-Val-Ala-Leu-H, PhCH₂ENTONCES₂-Val-Ala-Leu-H, PhCH₂OP(OH)(O)-Leu-Ala-Leu-H, o PhCH₂O-P(OH)(O)-Phe-Ala-Leu-H. Un estabilizador preferido para usar en la composición líquida de la invención es Cbz-Gly-Ala-Tyr-H, o un aducto de hidrosulfito del mismo, en el que Cbz es benciloxycarbonilo.

Composición detergente líquida

[0078] La composición detergente líquida tiene una forma física que no es sólida (o gaseosa). Puede ser un líquido vertible, un gel vertible o un gel no vertible. Puede ser isotrópica o estructurada, preferiblemente isotrópica. Puede ser una formulación útil para el lavado en lavadoras automáticas o para el lavado a mano.

[0079] La composición detergente líquida puede ser acuosa, con un contenido típico de al menos un 20 % en peso y hasta un 95 % de agua, tal como hasta un 70 % de agua, hasta un 50 % de agua, hasta un 40 % de agua, hasta un 30 % de agua, o hasta un 20 % de agua. En un detergente líquido acuoso se pueden incluir otros tipos de líquidos, incluidos, entre otros, alcanoles, aminas, dioles, éteres y polioles. Un detergente líquido acuoso puede contener de un 0 a un 30 % de solvente orgánico. Un detergente líquido puede ser incluso no acuoso, en el que el contenido de agua es inferior al 10 %, preferiblemente inferior al 5 %.

[0080] Los ingredientes del detergente se pueden separar físicamente unos de otros mediante compartimentos en bolsas solubles en agua. De este modo se puede evitar la interacción de almacenamiento negativa entre los

componentes. Los diferentes perfiles de disolución de cada uno de los compartimentos también pueden dar lugar a una disolución retardada de componentes seleccionados en la solución de lavado.

5 [0081] La composición detergente puede adoptar la forma de un producto monodosis. Un producto monodosis es el envasado de una única dosis en un envase no reutilizable. Se utiliza cada vez más en detergentes para ropa y lavavajillas. Un producto de detergente monodosis es el envasado (por ejemplo, en una bolsa hecha de una película soluble en agua) de la cantidad de detergente utilizada para un solo lavado.

10 [0082] Las bolsas pueden tener cualquier forma, contorno y material que sea adecuado para contener la composición, por ejemplo, sin permitir la liberación de la composición de la bolsa antes de que entre en 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 forman una 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, la cantidad de polímero presente en la película, por ejemplo, PVA, es de al menos alrededor del 60 %. El peso molecular medio preferido será típicamente de alrededor de 20 000 a alrededor de 150 000. Las películas también pueden ser composiciones de mezcla que comprenden mezclas de polímeros hidrolíticamente degradables y solubles en agua, como ácido poliláctico y alcohol polivinílico (conocido con la referencia comercial M8630 vendido por Chris Craft In. Prod. Of Gary, Ind., EE. UU.) más plastificantes como glicerol, etilenglicerol, propilenglicerol, sorbitol y mezclas de los mismos. Las bolsas pueden comprender una composición de limpieza sólida o componentes parciales y/o una composición de limpieza 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 (véase, por ejemplo, el documento US 2009/0011970).

30 [0083] La elección de los componentes del detergente puede incluir la consideración del tipo y/o grado de suciedad, la temperatura a la que se realizará la limpieza y la formulación del producto detergente. Aunque los componentes mencionados a continuación se clasifican por un encabezado 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 materia.

35 [0084] La elección de componentes adicionales está dentro de la experiencia del técnico e incluye ingredientes convencionales, incluidos los componentes ejemplares no excluyentes expuestos a continuación.

Tensioactivos

40 [0085] La composición detergente puede comprender uno o más tensioactivos, que pueden ser aniónicos y/o catiónicos y/o no iónicos y/o semipolares y/o zwitteriónicos, o una mezcla de los mismos. En una forma de realización particular, la composición detergente incluye una mezcla de uno o más tensioactivos no iónicos y uno o más tensioactivos aniónicos. El/los tensioactivo(s) está(n) presente(s) típicamente en una cantidad de alrededor del 0,1 % al 60 % en peso, tal como alrededor del 1 % a alrededor del 40 %, o alrededor del 3 % a alrededor del 20 %, o alrededor del 3 % a alrededor del 10 %. El o los tensioactivos se eligen en función de la aplicación de limpieza deseada e incluyen cualquier tensioactivo convencional conocido en la técnica. Puede utilizarse cualquier tensioactivo conocido en la técnica para su uso en detergentes.

50 [0086] Cuando se incluya, el detergente normalmente contendrá del 1 % al 40 % en peso, tal como del 5 % al 30 %, incluyendo del 5 % al 15 %, o del 20 % al 25 % de un tensioactivo aniónico. Los ejemplos no limitativos de tensioactivos aniónicos incluyen sulfatos y sulfonatos, en particular, alquilbencenosulfonatos lineales (LAS), isómeros de LAS, alquilbencenosulfonatos ramificados (BABS), fenilalcanosulfonatos, alfa-olefinsulfonatos (AOS), olefinsulfonatos, alquenosulfonatos, alcano-2,3-diilbis(sulfatos), hidroxialcanosulfonatos y disulfonatos, alquilsulfatos (AS) como dodecilsulfato de sodio (SDS), sulfatos de alcoholes grasos (FAS), sulfatos de alcoholes primarios (PAS), étersulfatos de alcoholes (AES o AEOS o FES, también conocidos como etoxisulfatos de alcohol o éter sulfatos de alcoholes grasos), alcanosulfonatos secundarios (SAS), sulfonatos de parafina (PS), sulfonatos de éster, ésteres de glicerol de ácidos grasos sulfonados, ésteres metílicos de ácidos grasos alfa-sulfo (alfa-SFMe o SES), incluido el sulfonato de éster metílico (MES), ácido alquil- o alquenilsuccínico, ácido dodecenil/tetradecenil succínico (DTSA), derivados de ácidos grasos de aminoácidos, diésteres y monoésteres de ácido sulfosuccínico o jabón, y combinaciones de los mismos.

60 [0087] Cuando se incluya, el detergente normalmente contendrá de aproximadamente un 0,1% a aproximadamente un 10 % en peso de un tensioactivo catiónico. Entre los ejemplos no limitativos de tensioactivos catiónicos se incluyen alquildimetiletanolamina cuaternaria (ADMEAQ), bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), cloruro de dimetildiestearilamonio (DSDMAC) y alquilbencildimetilamonio, compuestos de alquil amonio cuaternario, compuestos de amonio cuaternario alcoxilado (AQA) y combinaciones de los mismos.

[0088] Cuando se incluya, el detergente normalmente contendrá de aproximadamente un 0,2 % a aproximadamente un 40 % en peso de un tensioactivo 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 %. Entre los ejemplos no limitantes de tensioactivos no iónicos se incluyen etoxilatos de alcohol (AE o AEO), propoxilatos de alcohol, alcoholes grasos propoxilados (PFA), ésteres alquílicos de ácidos grasos alcoxilados, tales como ésteres alquílicos de ácidos grasos etoxilados y/o propoxilados, etoxilatos de alquilfenol (APE), etoxilatos 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 polihidroxialquilácidos grasos, o derivados *n*-acilo *n*-alquilo de glucosamina (glucamidas, GA, o glucamida de ácidos grasos, FAGA), así como productos disponibles con los nombres comerciales SPAN y TWEEN, y combinaciones de estos.

[0089] Cuando se incluya, el detergente normalmente contendrá de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 20 % en peso de un tensioactivo semipolar. Entre los ejemplos no limitantes de tensioactivos semipolares se incluyen óxidos de amina (AO) tales como óxido de alquildimetilamina, óxido de *N*-(coco alquil)-*N,N*-dimetilamina y óxido de *N*-(alquilo de sebo)-*N,N*-bis(2-hidroxi)etil)amina, alcanolamidas de ácidos grasos y alcanolamidas de ácidos grasos etoxilados, y combinaciones de estos.

[0090] Cuando se incluya, el detergente normalmente contendrá de aproximadamente un 0,1% a aproximadamente un 10 % en peso de un tensioactivo zwitteriónico. Entre los ejemplos no limitativos de tensioactivos zwitteriónicos se incluyen betaina, alquildimetilbetaina, sulfobetaina y combinaciones de estos.

Hidrotropos

[0091] Un hidrotropo es un compuesto que solubiliza compuestos hidrófobos en soluciones acuosas (o, por el contrario, sustancias polares en un entorno no polar). Típicamente, los hidrotropos tienen un carácter tanto hidrófilo como hidrófobo (las denominadas propiedades anfífilas, como se conocen de los tensioactivos); sin embargo, la estructura molecular de los hidrotropos generalmente no favorece la autoagregación espontánea; véase, por ejemplo, Hodgdon y Kaler (2007), Current Opinion in Colloid & Interface Science 12: 121-128. Los hidrotropos no muestran una concentración crítica por encima de la cual se produce la autoagregación, como ocurre con los tensioactivos y los lípidos que forman mesofases micelares, lamelares u otras bien definidas. Por el contrario, muchos hidrotropos muestran un proceso de agregación de tipo continuo en el que el tamaño de los agregados crece a medida que aumenta la concentración. Sin embargo, muchos hidrotropos alteran el comportamiento de fase, la estabilidad y las propiedades coloidales de los sistemas que contienen sustancias de carácter polar y no polar, incluidas las mezclas de agua, aceite, tensioactivos y polímeros. Los hidrotropos se usan de manera habitual en industrias que van desde la farmacéutica, el cuidado personal, la alimentación hasta las aplicaciones técnicas. El uso de hidrotropos en composiciones detergentes permite, por ejemplo, formulaciones más concentradas de tensioactivos (como en el proceso de compactación de detergentes líquidos mediante la eliminación del agua) sin inducir fenómenos no deseados tales como una separación de fases o una viscosidad alta.

[0092] El detergente puede contener del 0 al 5 % en peso, tal como de aproximadamente el 0,5 a aproximadamente el 5 %, o de aproximadamente el 3% a aproximadamente el 5 %, de un hidrotropo. Puede utilizarse cualquier hidrotropo conocido en la técnica para su uso en detergentes. Entre los ejemplos no limitativos de hidrotropos se incluyen bencenosulfonato de sodio, *p*-toluensulfonato de sodio (STS), xilensulfonato de sodio (SXS), cumensulfonato de sodio (SCS), cimensulfonato de sodio, óxidos de amina, alcoholes y poliglicoléteres, hidroxinaftoato de sodio, hidroxinaftaleno de sodio sulfonato, etilhexilsulfato de sodio y combinaciones de estos.

Adyuvantes y coadyuvantes

[0093] La composición detergente puede contener aproximadamente un 0-65 % en peso, tal como aproximadamente de un 5 % a aproximadamente un 50 % de un adyuvante o coadyuvante de detergente, o una mezcla de los mismos. En un detergente lavavajillas, la cantidad de adyuvante es normalmente del 40 al 65 %, particularmente del 50 al 65 %. El adyuvante y/o coadyuvante puede ser en particular un quelante que forma complejos solubles en agua con iones de Ca y Mg. Se puede utilizar cualquier adyuvante y/o coadyuvante conocido en la técnica para su uso en detergentes para el lavado de ropa. Entre los ejemplos no limitantes de adyuvantes se incluyen citratos, zeolitas, difosfatos (pirofosfatos), trifosfatos como trifosfato de sodio (STP o STPP), carbonatos como carbonato de sodio, silicatos solubles como metasilicato de sodio, silicatos en capas (por ejemplo, SKS-6 de Hoechst), etanolaminas como 2-aminoetan-1-ol (MEA), dietanolamina (DEA, también conocida como iminodietanol), trietanolamina (TEA, también conocida como 2,2',2"-nitrilotrietanol) y carboximetilnilulina (CMI), y combinaciones de estos.

[0094] La composición detergente también puede contener del 0 al 50 % en peso, tal como de aproximadamente el 0,5 % a aproximadamente el 10 % de un coadyuvante de detergente, o una mezcla de estos. La composición detergente puede incluir un coadyuvante solo o en combinación con un adyuvante, por ejemplo, un adyuvante de citrato. Entre los ejemplos no limitantes de coadyuvantes se incluyen homopolímeros de poliacrilatos o copolímeros de estos, tales como ácido poli(acrílico) (PAA) o copolímero de ácido acrílico/ácido maleico (PAA/PMA). Otros ejemplos no limitantes incluyen citrato, quelantes tales como aminocarboxilatos, aminopolicarboxilatos y fosfonatos, y ácido alquil- o alquenilsuccínico. Entre los ejemplos específicos adicionales se incluyen ácido 2,2',2"-nitrotriácético (NTA), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), ácido iminodisuccínico (IDS), ácido etilendiamino-*N,N'*-disuccínico (EDDS), ácido metilglicinadiacético (MGDA), ácido glutámico-*N,N'*-ácido diacético (GLDA), ácido 1-hidroxietano-1,1-difosfónico (HEDP), ácido etilendiaminotetra(metilenfosfónico) (EDTMPA), ácido dietilentriaminopentakis(metilenfosfónico) (DTMPA o DTPMPA), ácido *N*-(2-hidroxietyl)iminodiacético (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 -alanina-*N,N'*-diacético (α -ALDA), ácido serina-*N,N'*-diacético (SEDA), ácido isoserina-*N,N'*-diacético (ISDA), ácido fenilalanina-*N,N'*-diacético (PHDA), ácido antranílico-*N,N'*-ácido diacético (ANDA), ácido sulfanílico-*N,N'*-ácido diacético (SLDA), ácido taurina-*N,N'*-diacético (TUDA) y ácido sulfometil-*N,N'*-diacético (SMDA), *N*-(2-hidroxietyl)-etilendiamina-*N,N'*, *N'*-triacetato (HEDTA), dietanolglicina (DEG), ácido dietilentriamina penta(metilenfosfónico) (DTPMP), ácido aminotris(metilenfosfónico) (ATMP), y combinaciones y sales de estos. Otros adyuvantes y/o coadyuvantes ejemplares se describen en, por ejemplo, WO 09/102854, US 5977053.

Polímeros

[0095] El detergente puede contener un 0-10 % en peso, tal como un 0,5-5 %, un 2-5 %, un 0,5-2 % o un 0,2-1 % de un polímero. Puede utilizarse cualquier polímero conocido en la técnica para su uso en detergentes. El polímero puede funcionar como un coadyuvante como se ha mencionado anteriormente, o puede proporcionar propiedades antirredespósito, de protección de fibras, de liberación de suciedad, de inhibición de la transferencia de tinte, de 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. Entre los ejemplos de polímeros se incluyen (carboximetil)celulosa (CMC), alcohol poli(vinílico) (PVA), poli(vinilpirrolidona) (PVP), poli(etilenglicol) u óxido de poli(etileno) (PEG), poli(etilenimina) etoxilada, carboximetilululina (CMI) y policarboxilatos como PAA, PAA/PMA, ácido poliaspártico y copolímeros de metacrilato de laurilo/ácido acrílico, CMC hidrófobamente modificada (HM-CMC) y siliconas, copolímeros de ácido tereftálico y glicoles oligoméricos, copolímeros de tereftalato de poli(etileno) y tereftalato de poli(oxieteno) (PET-POET), PVP, poli(vinilimidazol) (PVI), poli(vinilpiridina-*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 dicuaternio. Otros ejemplos de polímeros se describen en, por ejemplo, los documentos WO 2006/130575 y US 5,955,415. También se contemplan las sales de los polímeros mencionados anteriormente.

Enzimas adicionales

[0096] La composición detergente líquida puede comprender enzimas adicionales utilizando otras tecnologías de formulación, como la encapsulación (por ejemplo, como se describe en los documentos WO 1997/024177, WO 2014/177709 o WO 2015/144784), partículas (matriz) o películas enzimáticas solubles en agua (por ejemplo, como se describe en los documentos WO 2014/152674, WO 2014/152547, o WO 2013/148492).

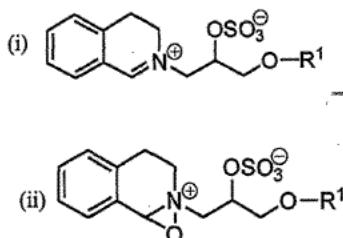
Materiales añadidos

[0097] También se puede utilizar cualquier componente detergente conocido en la técnica para su uso en detergentes para el lavado de ropa.

Sistemas de blanqueamiento

[0098] Debido a la incompatibilidad de los componentes, todavía existen pocos ejemplos de detergentes líquidos que combinen lejía y enzimas (por ejemplo, US 5,275,753 o WO 99/00478). El detergente puede contener un 0-50 % de un sistema de blanqueamiento. Se puede utilizar cualquier sistema de blanqueamiento conocido en la técnica para el uso en detergentes para el lavado de ropa. Los componentes adecuados del sistema de blanqueamiento incluyen catalizadores del blanqueamiento, fotoblanqueadores, activadores del blanqueamiento, 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, pero no se limitan a, ácidos y sales peroxicarboxílicos, ácidos y sales percarbónicos, ácidos y sales perimidicos, ácidos y sales peroximonosulfúricos, por ejemplo, Oxone®, y mezclas de los mismos. Los ejemplos no limitativos de sistemas de blanqueamiento incluyen sistemas de blanqueamiento a base de peróxido, que pueden comprender, por

ejemplo, una sal inorgánica, incluidas 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 del blanqueamiento formador de perácido. El término activador del blanqueamiento se entiende en este caso como un compuesto que reacciona con un blanqueador peroxigenado como el peróxido de hidrógeno para formar un perácido. El perácido formado de este modo constituye el blanqueador activado. Los activadores de blanqueamiento adecuados para usar en este caso incluyen los que pertenecen a la clase de los ésteres, las amidas, las imidas o los anhídridos. Algunos ejemplos adecuados son tetracetiletildiamina (TAED), 4-[(3,5,5-trimetilhexanoil)oxi]bencenosulfonato de sodio (ISONOBS), ácido diperoxidodecanoico, 4-(dodecanoiloxi)bencenosulfonato (LOBS), 4-(decanoiloxi)bencenosulfonato, 4-(decanoiloxi)benzoato (DOBS), 4-(nonanoiloxi)-bencenosulfonato (NOBS) y/o los descritos en WO 98/17767. Una familia particular de activadores del blanqueamiento de interés se ha descrito en EP624154, y dentro de esa familia se prefiere en particular el acetil trietil citrato (ATC). El ATC o un triglicérido de cadena corta como la triacetina tiene la ventaja de que no daña el medio ambiente, ya que finalmente se degrada en ácido cítrico y alcohol. Además, el acetil trietil citrato y la triacetina tienen una buena estabilidad hidrolítica en el producto durante el almacenamiento y son un activador del blanqueamiento eficaz. Alternativamente, el sistema de blanqueamiento puede comprender peroxiácidos, por ejemplo, del tipo amida, imida o sulfona. El sistema de blanqueamiento también puede comprender perácidos como el ácido 6-(ftalimido)peroxihexanoico (PAP). El sistema de blanqueamiento también puede incluir un catalizador del blanqueamiento. En algunas formas de realización, el componente blanqueador puede ser un catalizador orgánico seleccionado del grupo que consiste en catalizadores orgánicos que tienen las siguientes fórmulas:



y mezclas de los mismos; donde cada R^1 es independientemente 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 es independientemente 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 independientemente del grupo que consiste en 2-propilheptilo, 2-butiloctilo, 2-pentilnonilo, 2-hexildecilo, n-dodecilo, n-tetradecilo, n-hexadecilo, n-octadecilo, iso-nonilo, iso-decilo, iso-tridecilo e iso-pentadecilo. Se describen otros ejemplos de sistemas de blanqueamiento, por ejemplo, en los documentos WO 2007/087258, WO 2007/087244, WO 2007/087259 y WO 2007/087242. Los fotoblanqueadores adecuados pueden ser, por ejemplo, ftalocianina de zinc sulfonada.

Formulación de productos detergentes.

[0099] La composición detergente líquida de la invención puede presentarse en cualquier forma conveniente, por ejemplo, una bolsa que tiene uno o más compartimentos, un gel o un detergente líquido normal, compacto o concentrado (véase, por ejemplo, WO 2009/098660 o WO 2010/141301).

[0100] Las bolsas se pueden configurar como compartimentos individuales o múltiples. Puede ser de cualquier forma, contorno y material que sea adecuado para contener la composición, por ejemplo, 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 forman una 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, la cantidad de polímero de la película, por ejemplo, PVA, es de al menos alrededor del 60 %. El peso molecular medio preferido será típicamente de alrededor de 20 000 a alrededor de 150 000. Las películas también pueden ser composiciones combinadas que comprenden mezclas de polímeros hidrolíticamente degradables y solubles en agua, como ácido poliláctico y alcohol polivinílico (conocido con la referencia comercial M8630, vendido por MonoSol LLC, Indiana, EE. UU.), además de plastificantes como glicerol, etilenglicerol, propilenglicol, sorbitol y mezclas de estos. Las bolsas pueden comprender una composición de limpieza sólida o componentes parciales y/o una composición de limpieza 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.

[0101] Los ingredientes del detergente se pueden separar físicamente unos de otros mediante compartimentos en bolsas solubles en agua. De este modo, se puede evitar la interacción de almacenamiento negativa entre los componentes. Los diferentes perfiles de disolución de cada uno de los compartimentos también pueden dar lugar a una disolución retardada de determinados componentes en la solución de lavado.

5

EJEMPLOS

[0102] Los productos químicos utilizados como soluciones amortiguadoras y sustratos eran productos comerciales de al menos grado reactivo. Proteasa1 tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 1. Proteasa2 tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 3. Proteasa3 tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 4. El estabilizador de proteasas utilizado fue Cbz-Gly-Ala-NHCH(CH₂Cr,H₄pOH)C(OH)(SO₃)Na, en donde Cbz es benciloxicarbonilo (forma hidrosulfito/bisulfito de un péptido aldehído).

10

[0103] La solución amortiguadora de carbonato se preparó mezclando 5 g de bicarbonato de sodio y 1 g de carbonato de sodio en 1 L de agua destilada y regulando el pH a 9.

15

[0104] Los experimentos para esta solicitud de patente se realizaron con los kits de prueba estándar que se describen a continuación.

20

[0105] Estos kits de prueba se desarrollaron originalmente para usos hospitalarios (para garantizar y verificar regularmente el buen rendimiento de las lavadoras desinfectadoras y las soluciones de limpieza) y empresas de calificación que deben certificar la correcta eficacia de los equipos/materiales de reprocesamiento de instrumentos médicos instalados en centros médicos (consultas de dentistas, hospitales...).

25

[0106] Todos los kits de prueba utilizados en esta solicitud de patente cumplen con la norma ISO 15883 relacionada con las lavadoras desinfectadoras.

Kits de prueba

30

Indicador de limpieza SIMICON-RI

[0107] Mancha de sangre para lavadora desinfectadora (fibrina + proteína de hemoglobina); de SIMICON GmbH, Sigmund-Riefler-Bogen 19, 81829 München - Riem, Alemania.

35

[0108] *Campo de aplicación:* El indicador de limpieza SIMICON RI está diseñado para la validación y el control rutinario de la eficacia de limpieza del proceso de limpieza y desinfección en las lavadoras desinfectadoras para instrumentos de cirugía estándar y mínimamente invasiva (MIS).

40

[0109] *Características:* El indicador de limpieza SIMICON RI se contamina con suciedad de prueba según ISO 15883.

[0110] *Conformidad:* La resistencia del indicador de limpieza SIMICON RI se ajusta según la norma ISO 15883. Si los parámetros esenciales como el tiempo, la temperatura, la presión del agua y la concentración de detergente se calibran con precisión, la mancha de prueba se eliminará por completo al final del ciclo de limpieza.

45

Especificaciones:

50

[0111]

- Suciedad de prueba: según ISO 15883
- Soporte: acero inoxidable V4A
- Carga orgánica: sangre de oveja y aditivos

55

Indicador de limpieza 'STF load check'

[0112] Indicador multidireccional con 4 caras por hoja y varios tipos de suciedad con proteínas/lípidos/polisacáridos; de Albert BROWNE Ltd, Chancery House, 190 Waterside Road, Hamilton Industrial Park, Leicester LE5 1QZ, Reino Unido.

60

[0113] *Campo de aplicación:* La prueba del indicador 'STF load check' es una forma constante y repetible de hacer un seguimiento la eficacia de limpieza de una lavadora desinfectadora. Las tiras indicadoras se han diseñado para funcionar de manera equivalente a las suciedades de prueba descritas en documentos como ISO 15883-5, HTM2030 y HTM01-05. Cuando se colocan en los soportes 'STF Load Check', representan la suciedad típica que se produciría durante el uso normal de instrumentos quirúrgicos reutilizables. Esta es una prueba de

65

rendimiento con punto de referencia que es adecuado para la validación. Las tiras indicadoras imitan las superficies ocluidas para presentar una dificultad de lavado realista.

5 [0114] *Características:* Las tiras indicadoras 'STF load check' contienen dos fuentes de proteínas, lípidos y polisacáridos.

10 [0115] *Conformidad:* La resistencia del indicador de limpieza 'STF load check' se ajusta según ISO 15883, HTM2030 y HTM01-05. Si los parámetros esenciales como el tiempo, la temperatura, la presión del agua y la concentración de detergente se calibran con precisión, la mancha de prueba se eliminará por completo al final del ciclo de limpieza.

Especificaciones:

15 [0116]

- Suciedad de prueba: según ISO 15883-5, HTM2030 y HTM01-05
- Soporte: láminas de plástico
- Carga orgánica: dos fuentes de proteínas, lípidos y polisacáridos.

20 Indicador de limpieza TOSI

[0117] Suciedad de sangre en cupón de acero inoxidable. Mezcla de diferentes fuentes de proteínas (hemoglobina y fibrina). Disponible en Healthmark Industries Company, 33671 Doreka, Fraser, MI 48026, Estados Unidos.

25 [0118] *Campo de aplicación:* TOSI es un dispositivo para manchas de sangre que se correlaciona directamente con el desafío de limpieza de los instrumentos quirúrgicos. El dispositivo TOSI proporciona un método constante, repetible y fiable para evaluar la eficacia de limpieza de lavadoras automáticas de instrumentos. La suciedad de sangre se fabrica según especificaciones exactas cada vez. Cuando se mide sobre la placa de acero inoxidable, el TOSI es completamente análogo a un instrumento de acero inoxidable manchado con sangre seca. Colocado en el soporte de plástico transparente, el desafío es idéntico a las áreas de los instrumentos que normalmente están ocultas a la vista (es decir, los candados de las cajas). El uso rutinario de esta prueba ayudará a asegurar que una lavadora de instrumentos esté funcionando a un nivel constante, mejorando la inspección visual rutinaria de los instrumentos.

35 [0119] *Características:* El indicador TOSI contiene varias fuentes de proteínas: hemoglobina, albúmina y fibrina.

[0120] *Conformidad:* La resistencia del indicador de limpieza TOSI se ajusta según las directrices ISO 15883, AAMI y AORN, así como la guía ASTM D7225.

40 *Especificaciones:*

[0121]

- 45 • Suciedad de prueba: según ISO 15883-5, directrices AAMI y AORN y guía ASTM D7225
- Soporte: acero inoxidable
- Carga orgánica: varias fuentes de proteína - fibrina, albúmina y hemoglobina.

50 EJEMPLO 1

Rendimiento de lavado medido con el indicador de limpieza SIMICON-RI

55 [0122] 1. Se preparó una solución enzimática líquida preparando una solución amortiguadora de carbonato a pH 9, añadiendo un 1 % p/p de tensioactivo (70 % de Mergital D8 y 30 % de Dehydol PO5) y añadiendo un 0,1 % p/p de enzima. La solución se transfirió a un vaso de precipitados de 200 ml (suficientemente grande para permitir la inmersión del kit de prueba).

60 [0123] La solución amortiguadora de carbonato se precalentó a 40 °C en un baño de calentamiento antes de agregar las enzimas y el tensioactivo, y ambos se agregaron justo antes de la prueba de lavado.

[0124] 2. Se añadió un agitador magnético a la solución de lavado. El vaso de precipitados se colocó sobre una placa calefactora donde se controlaba la temperatura y la acción mecánica (sistema de agitación). La temperatura se fijó a 40 °C y la acción de agitación a 150 r.p.m.

65 [0125] 3. El indicador de limpieza médica SIMICON RI se sacó del paquete y se colocó en un soporte con unas pinzas. El indicador de limpieza se sumergió en el centro del vaso de precipitados, en el vórtice generado por el

agitador magnético. Siempre hay que colocar el indicador en la misma área para toda la serie de pruebas. Los cambios en esta área del vaso de precipitados pueden modificar significativamente el rendimiento del lavado.

5 [0126] 4. El rendimiento de limpieza se determinó midiendo el tiempo necesario para alcanzar una eliminación del 100 % de la suciedad en la superficie del indicador (observación visual). Se calculó un promedio de varias repeticiones para aumentar la precisión de los resultados.

10 [0127] 5. Cuanto más breve sea el tiempo para obtener una eliminación del 100 % de la suciedad, mejor y más eficaz será la enzima analizada (consulte la Tabla 1). Tabla 1. **SIMICON RI**; Tiempo requerido para alcanzar la eliminación del 100 % de la suciedad (minutos).

Condiciones	Proteasa	Hora (minutos)
1% tensioactivo; pH 9; 40 °C; Agitación; 0,1 % de proteasa	Proteasa 1	25,6
	Proteasa1 + estabilizador de proteasa	20,2
	Proteasa2	16,3
	Proteasa2 + estabilizador de proteasa	14,4

EJEMPLO 2

15 Rendimiento de lavado medido con indicador de limpieza STF load check (Protocolo 1)

[0128] 1. Se preparó una solución enzimática líquida sin tensioactivo preparando una solución amortiguadora de carbonato a pH 9 y añadiendo 0,02 % p/p de enzima. La solución se transfirió a un vaso de precipitados de 200 ml (suficientemente grande para permitir la inmersión del kit de prueba).

20 [0129] La solución amortiguadora de carbonato se precalentó a 40 °C en un baño de calentamiento antes de agregar las enzimas, justo antes de la prueba de lavado.

25 [0130] 2. Se añadió un agitador magnético a la solución de lavado. El vaso de precipitados se colocó sobre una placa calefactora donde se controlaba la temperatura y la acción mecánica (sistema de agitación). La temperatura se fijó a 40 °C y la acción de agitación a 150 r.p.m.

30 [0131] 3. El indicador de limpieza médica 'STF load check' se extrajo del paquete y se colocó en un soporte con unas pinzas. El indicador de limpieza se sumergió en el centro del vaso de precipitados, en el vórtice generado por el agitador magnético. Siempre hay que colocar el indicador en la misma área para toda la serie de pruebas. Los cambios en esta área del vaso de precipitados pueden modificar significativamente el rendimiento del lavado.

35 [0132] 4. El rendimiento de limpieza se determinó midiendo el tiempo necesario para alcanzar una eliminación del 100 % de la suciedad en la superficie del indicador (observación visual). Se calculó un promedio de varias repeticiones para aumentar la precisión de los resultados.

40 [0133] 5. Cuanto más breve sea el tiempo para obtener una eliminación del 100 % de la suciedad, mejor y más eficaz será la enzima analizada (consulte la Tabla 2). Tabla 2. **STF load check**; Tiempo requerido para alcanzar una eliminación del 100 % de la suciedad (minutos).

Condiciones	Proteasa	Hora (minutos)
Sin tensioactivo; pH 9; 40 °C; Agitación; 0,02 % de proteasa	Proteasa 1	8,4
	Proteasa1 + estabilizador de proteasa	7,8
	Sin enzima	>30

EJEMPLO 3

45 Rendimiento de lavado medido con indicador de limpieza STF load check (Protocolo 2)

[0134] Se siguió el protocolo 1 (véase lo anterior) desde el paso 1 hasta el paso 5.

6. El indicador de limpieza 'STF load check' se retiró después de 4 minutos de lavado en el vaso de precipitados

7. El indicador de limpieza se enjuagó con agua del grifo durante 5 segundos sin tocar la parte sucia restante.

50 8. El indicador de limpieza se secó teniendo cuidado de no tocar la superficie del indicador contra una toalla/pañuelo o cualquier otra cosa para no eliminar la suciedad restante de la superficie.

9. El rendimiento de limpieza se determinó midiendo el valor de reflectancia a 460 nm con el equipo DIGLeye del 'STF load check'. Se calculó un promedio de varias repeticiones para aumentar la precisión de los resultados.

55 10. Cuanto mayor era el valor de reflectancia, mejor y más eficaz era la enzima (véase Tabla 3). Tabla 3. **STF load check**; Reflectancia medida a 460 nm después de agitación durante 4 minutos.

Condiciones	Proteasa	Reflectancia
Sin tensioactivo;	Proteasa1	25,8

pH 9; 40 °C; Agitación; 0,02 % de proteasa	Proteasa1 + estabilizador de proteasa	70,0
--	---------------------------------------	------

EJEMPLO 4

5 Remojo sin agitación medido con el indicador de limpieza STF load check (Protocolo 2)

[0135] El protocolo 2 se realizó sin agitación. En algunos casos, el reprocesamiento de instrumentos médicos se realiza únicamente por remojo. La acción mecánica puede ser limpieza manual o durante la limpieza automática (después de la limpieza manual).

[0136] El indicador "STF load check" se colocó en un vaso de precipitados sin dejar que ningún lado del indicador estuviera en contacto con la superficie del vaso de precipitados. La única diferencia en este procedimiento en comparación con el protocolo de "agitación" fue el tiempo requerido: el indicador 'STF load check' se sumergió en la solución de remojo enzimático durante 18 minutos antes de retirar el indicador y enjuagarlo.

[0137] Cuanto mayor era el valor de reflectancia, mejor y más eficaz era la enzima analizada (véase la Tabla 4).

Tabla 4. **STF load check**; Reflectancia medida a 460 nm después de remojo durante 18 minutos.

Condiciones	Proteasa	Reflectancia
Sin tensioactivo; pH 9; 40 °C; Sin agitación; 0,02 % de proteasa	Proteasa1	46,7
	Proteasa1 + estabilizador de proteasa	54,7
	Proteasa2	61,5
	Proteasa2 + estabilizador de proteasa	62,3

EJEMPLO 5

Rendimiento de lavado en detergentes médicos comerciales; STF load check o indicador de limpieza TOSI

[0138]

1. Se preparó una solución de lavado/detergente enzimático líquido en un vaso de precipitados y se precalentó a 40 °C en un baño de calentamiento. La concentración de enzima en la solución de lavado fue de 0,0125 %. El detergente era un detergente médico comercial europeo (Tabla 5) o un detergente médico comercial de la zona de Asia Pacífico (Tabla 6 y Tabla 7). El pH lo determinó el detergente médico utilizado.

2. Se añadió un agitador magnético a la solución de lavado (la solución de lavado total fue de 200 ml). El vaso de precipitados se colocó sobre una placa calefactora donde se controlaba la temperatura y la acción mecánica (sistema de agitación). La temperatura se fijó a 40 °C y la acción de agitación a 150 r.p.m.

3. El indicador de limpieza médica 'STF load check' o el indicador de limpieza médica TOSI se extrajo del paquete y se colocó en un soporte con unas pinzas. El indicador de limpieza se sumergió en el centro del vaso de precipitados, en el vórtice generado por el agitador magnético. Siempre hay que colocar el indicador en la misma área para toda la serie de pruebas. Los cambios en esta área del vaso de precipitados pueden modificar significativamente el rendimiento del lavado.

4. El rendimiento de limpieza se determinó midiendo el tiempo necesario para alcanzar una eliminación del 100 % de la suciedad en la superficie del indicador (observación visual). Se calculó un promedio de dos repeticiones para aumentar la precisión de los resultados.

5. Cuanto más breve sea el tiempo para obtener una eliminación del 100 % de la suciedad, mejor y más eficaz será la enzima (véase Tablas 5-7). Tabla 5. **STF load check**; Tiempo requerido para alcanzar una eliminación del 100 % de la suciedad (minutos).

Condiciones	Proteasa	Hora (minutos)
Detergente médico europeo; pH 9,5; 40°C; Agitación; 0,0125 % de proteasa	Proteasa 1	22,3
	Proteasa1 + estabilizador de proteasa	13,6
	Proteasa2 + estabilizador de proteasa	9,2
	Proteasa3 + estabilizador de proteasa	6,2

Tabla 6. **STF load check**; Tiempo requerido para alcanzar una eliminación del 100 % de la suciedad (minutos).

Condiciones	Proteasa	Hora (minutos)
Detergente médico de Asia Pacífico; pH 8,9; 40 °C;	Proteasa1	36,5

ES 2 906 780 T3

Agitación; 0,0125 % de proteasa	Proteasa1 + estabilizador de proteasa	24,0
	Proteasa2 + estabilizador de proteasa	15,4
	Proteasa3 + estabilizador de proteasa	8,2

Tabla 7. **TOSI**; Tiempo requerido para alcanzar una eliminación del 100 % de la suciedad (minutos).

Condiciones	Proteasa	Hora (minutos)
Detergente médico de Asia Pacífico; pH 8,9; 40°C; Agitación; 0,0125 % de proteasa	Proteasa1	18,0
	Proteasa1 + estabilizador de proteasa	16,2
	Proteasa2 + estabilizador de proteasa	10,9
	Proteasa3 + estabilizador de proteasa	8,2

5 LISTADO DE SECUENCIAS

[0139]

10 <110> Novozymes A/S

<120> Método de limpieza de un instrumento médico y dental

<130> 13042-WO-PCT

15 <160> 13

<170> Versión de PatentIn 3.5

20 <210> 1

<211> 269

<212> PRT

<213> Bacillus lentus

25 <400> 1

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

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

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

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

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

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

ES 2 906 780 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

55 <210> 2
 <211> 275
 <212> PRT
 <213> Bacillus amyloliquefaciens

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

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

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

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

ES 2 906 780 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

65 Ala Ala Gln
 275

<210> 3
 <211> 269
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Variante de la SEQ ID NO: 1

<400> 3

Ala Gln Ser Val Pro Trp Gly Ile Ser Arg Val Gln Ala Pro Ala Ala

ES 2 906 780 T3

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

ES 2 906 780 T3

<210> 4
 <211> 269
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Variante de la SEQ ID NO: 1

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

60 Val Ala Pro Gly Val Asn Ile Leu Ser Thr Trp Pro Gly Ser Thr Tyr
 195 200 205

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

Ala Ala Leu Val Lys Gln Lys Asn Pro Ser Trp Ser Asn Val Gln Ile

ES 2 906 780 T3

	225	230	235	240
--	-----	-----	-----	-----

5	Arg Asn His Leu	Lys Asn Thr Ala Thr	Ser Leu Gly Asp Thr	Trp Glu
		245	250	255

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

<210> 5
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Inhibidor de la subtilisina

20

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> Acetyl-Leu

25

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Tyr-H

30

<400> 5

Leu Gly Ala Tyr
 1

35

<210> 6
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial

40

<220>
 <223> Inhibidor de la subtilisina

45

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> Acetyl-Phe

50

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Tyr-H

55

<400> 6

Phe Gly Ala Tyr
 1

60

<210> 7
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial

65

<220>

<223> Inhibidor de la subtilisina

5 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> Acetyl-Tyr

10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Tyr-H

15 <400> 7
 Tyr Gly Ala Tyr
 1

20 <210> 8
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Inhibidor de la subtilisina

30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> Acetyl-Phe; MeO-CO-Phe; MeSO₂-Phe; o EtSO₂-Phe

35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Leu-H

40 <400> 8
 Phe Gly Ala Leu
 1

45 <210> 9
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial

50 <220>
 <223> Inhibidor de la subtilisina

55 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> Acetyl-Phe o MeO-CO-Phe

60 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Tyr-H

65 <400> 9
 Phe Gly Ala Phe
 1

5 <210> 10
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> Inhibidor de la subtilisina

15 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Acetyl-Phe

20 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> Tyr-H

<400> 10

25 Phe Gly Val Tyr
1

30 <210> 11
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<223> Inhibidor de la subtilisina

40 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Acetyl-Phe

45 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> Met-H

<400> 11

50 Phe Gly Ala Met
1

55 <210> 12
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

60 <220>
<223> Inhibidor de la subtilisina

65 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Acetyl-Trp

<220>

ES 2 906 780 T3

<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> Tyr-H

5 <400> 12

Trp Leu Val Tyr
1

10

<210> 13
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

15

<220>
<223> Inhibidor de la subtilisina

20

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> MeO-P(OH)(O)-Leu

25

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> Leu-H

30 <400> 13

Leu Gly Ala Leu
1

35

REIVINDICACIONES

1. Método de limpieza de un instrumento médico o dental que comprende:

5 (a) sumergir el instrumento médico o dental en una composición acuosa que comprende

- i) del 0,001 % p/p al 1 % p/p de una proteasa, en donde la proteasa es subtilisina, y
- ii) del 0,001 % p/p al 1 % p/p de un estabilizador de proteasas que es un aldehído peptídico;

10 (b) opcionalmente, lavar el instrumento con una composición detergente líquida; y
(c) enjuagar el instrumento; en donde el estabilizador de proteasas que es un aldehído peptídico tiene la fórmula P-B²-B¹-B⁰-H o un aducto de hidrosulfito del mismo que tiene la fórmula P-B²-B¹-N(H)-CHR-CHOH-SO₃M, donde

- 15 i) H es hidrógeno;
- ii) B⁰ es un único resto de aminoácido con configuración L- o D- con la fórmula -NH-CH(R)-C(=O)-;
- iii) B¹ y B² son independientemente residuos de aminoácidos individuales;
- iv) R se selecciona independientemente del grupo que consiste en alquilo de C₁₋₆, arilo de C₆₋₁₀ o arilalquilo de C₇₋₁₀ opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes R', idénticos o diferentes;
- 20 v) R' se selecciona independientemente del grupo que consiste en halógeno, -OH, -OR", -SH, -SR", -NH₂, -NHR", -NR"₂, -CO₂H, -CONH₂, -CONHR", -CONR"₂, -NHC(=N)NH₂;
- vi) R" es un grupo alquilo de C₁₋₆;
- vii) P es un grupo protector N-terminal; y
- viii) M es H o un metal alcalino, preferiblemente Na o K.

25 2. Método de la reivindicación 1, en el que el instrumento médico o dental se sumerge en la composición acuosa de (a) durante un tiempo suficiente para reducir la suciedad presente en el instrumento, preferiblemente durante al menos 1 minuto.

30 3. Método de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que la composición detergente de (b) consiste en un tensioactivo y otros ingredientes utilizados en las composiciones detergentes y de limpieza.

4. Método de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la composición acuosa de (a) comprende además una o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en amilasa, lipasa, celulasa, pectinasa, mananasa, DNasa, perhidrolasa y oxidorreductasa.

35 5. Método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la composición acuosa de (a) contiene además un tensioactivo o un humectante.

40 6. Método de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la composición acuosa de (a) tiene un pH alcalino, preferiblemente un pH en el rango de pH 7 a pH 10.

7. Método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que B⁰ es leucina, metionina, fenilalanina, p-tirosina o valina; preferiblemente leucina, fenilalanina o p-tirosina.

45 8. Método de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que B¹ es alanina, glicina o valina.

9. Método de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que B² es arginina, glicina, leucina, fenilalanina o valina; preferiblemente arginina, glicina o valina.

50 10. Método de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que P es p-metoxicarbonilo (Moc) o benciloxicarbonilo (Cbz).

11. Método de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que el estabilizador de proteasas que es un aldehído peptídico es Cbz-Arg-Ala-Tyr-H, Ac-Gly-Ala-Tyr-H, Cbz-Gly-Ala-Tyr-H, Cbz-Gly-Ala-Tyr-CF₃, Cbz-Gly-Ala-Leu-H, Cbz-Val-Ala-Leu-H, Cbz-Val-Ala-Leu-CF₃, Moc-Val-Ala-Leu-CF₃, Cbz-Gly-Ala-Phe-H, Cbz-Gly-Ala-Phe-CF₃, Cbz-Gly-Ala-Val-H, Cbz-Gly-Gly-Tyr-H, Cbz-Gly-Gly-Phe-H, Cbz-Arg-Val-Tyr-H, Cbz-Leu-Val-Tyr-H, MeO-CO-Val-Ala-Leu-H, MeNCO-Val-Ala-Leu-H, MeSO₂-Val-Ala-Leu-H, PhCH₂OP(OH)(O)-Val-Ala-Leu-H, PhCH₂SO₂-Val-Ala-Leu-H, PhCH₂OP(OH)(O)-Leu-Ala-Leu-H, o PhCH₂O-P(OH)(O)-Phe-Ala-Leu-H, o un aducto de hidrosulfito de cualquiera de estos, en el que Cbz es benciloxicarbonilo y Moc es metoxicarbonilo.

55 12. Método de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que el estabilizador es Cbz-Gly-Ala-Tyr-H o Moc-Val-Ala-Leu-H, o un aducto de hidrosulfito de estos, donde Cbz es benciloxicarbonilo y Moc es metoxicarbonilo.

65 13. Método de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que limpieza significa la reducción de la cantidad de sangre, constituyentes de la sangre, proteínas de la sangre, fibrina, albúmina y/o hemoglobina.