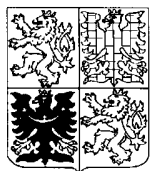


PŘÍHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:
2000 - 1478

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **23.10.1998**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **23.10.1997 23.10.1997**
23.10.1997

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1997/956323 1997/956564**
1997/956324

(33) Země priority: **US US US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **12.12.2001**
(Věstník č. 12/2001)

(86) PCT číslo: **PCT/US98/22486**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/20723**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:
C 11 D 3/386

(71) Přihlašovatel:
THE PROCTER & GAMBLE COMPANY, Cincinnati,
OH, US;

(72) Původce:
Ghosh Chanchal Kumar, West Chester, OH, US;
Baeck Andre Cesar, Bonheiden, BE;
Ohtani Ryohe, Kobe, JP;
Busch Alfred, Londerzeel, BE;
Showell Michael Stanford, Cincinnati, OH, US;

(74) Zástupce:
PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1, Praha 4,
14000;

(54) Název přihlášky vynálezu:
Čistící prostředky obsahující mnohonásobně
substituované proteázové a amylázové varianty

(57) Anotace:
Nové čisticí prostředky zahrnující proteázové varianty,
vzniklé substitucí aminokyselinových zbytků ve vybraných
polohách přirozeně se vyskytujícího subtilisinu Bacillus
amyloliquefaciens. Tyto čisticí prostředky jsou vhodné jako
prací prostředky pro praní prádla, čisticí prostředky na mytí
nádobí nebo prostředky pro osobní hygienu.

Čistící prostředky obsahující mnohonásobně substituované proteázové a amylázové varianty

Oblast techniky

Vynález se týká čistících prostředků, které zahrnují jeden nebo více proteázových enzymů, jež jsou mnohonásobně substituovanými proteázovými variantami a jeden nebo více enzymů, jež jsou amylázovými variantami. Konkrétněji, se tento vynález zabývá přípravky na praní prádla, přípravky pro mytí nádobí, přípravky na mytí tuhých povrchů a přípravky pro osobní čištění, které zahrnují jednu nebo více mnohonásobně substituovaných proteázových variant nebo jednu nebo více amylázových variant.

Dosavadní stav techniky

Různé typy enzymů se již delší dobu používají v pracích detergentech kvůli napomáhání při odstraňování určitých nečistot z tkaniny. Každá třída enzymů (amylázy, proteázy a pod.) obecně katalyzuje různé druhy chemických reakcí. Například, proteázové enzymy jsou známy pro jejich schopnost hydrolyzovat (rozbít sloučeniny na dvě nebo více jednodušších sloučenin) jiné proteiny. Tato schopnost byla využita pomocí zabudování přírodních nebo opracovaných proteázových enzymů do přípravků na praní prádla.

V současné době je také prováděn výzkum použití enzymů při automatickém mytí nádobí. Naneštěstí, mnohé enzymy, jako třeba konvenční proteázové enzymy, se dobře nesnášejí s pracovním prostředím. Konkrétně, k zajištění jejich uspokojivého působení musí být optimalizována jejich termická stabilita, pH stabilita, oxidativní stabilita a substrátová specifita.

U. S. Patent RE 34,606 (Estell et al.) popisuje modifikace aminokyselinových zbytků subtilisinového amionu odpovídajících pozicím v subtilisinu u *Bacillus amyloliquefaciens*, tyrosin -1, aspartát +32, asparagin +155, tyrosin +104, methionin +222, glycin +166, histidin +64, glycin +169, fenylalanin +189, serin +33, serin +221, tyrosin +217, glutamát +156 a alanin +152.

U. S. Patent 5,182,204 popisuje modifikaci aminokyselinového zbytku +224 u subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens* a ekvivalentních pozic u dalších subtilisinů, které mohou být modifikovány prostřednictvím substituce, inserce nebo vypuštění a které mohou být kombinovány s modifikacemi zbytků popsány v U. S. Patent RE 34,606 za vzniku užitečných

subtilisinových mutantů nebo variant. U. S. Patent 5,182,204 dále popisuje modifikace mnoha aminokyselinových zbytků v subtilisinu, včetně konkrétně +99, +101, +103, +107, +126, +135, +197 a +204.

U. S. Patent 5,679,630 (Baeck et al.) popisuje čistící přípravky zahrnující proteázovou variantu včetně substitucí aminokyselinových zbytků s jinými aminokyselinovými zbytky na pozicích odpovídajících pozici 76 v kombinaci s jednou nebo více následujících pozic: 99, 101, 103, 104, 107, 123, 27, 105, 109, 126, 128, 135, 156, 166, 195, 197, 204, 206, 210, 216, 217, 218, 222, 260, 265 a/nebo 274 subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens* a jedním nebo více čistících materiálů.

Kromě proteázových enzymů byly použity také amylázové enzymy v celé řadě různých účelů, nejdůležitější z nich je ztekucování škrobu, odšlichtování tkanin, modifikace škrobu a v papírenském průmyslu, a dále pro pivovarnictví a pečení. Další použití amylázových enzymů, které nabývá na stále větším významu, je odstraňování skvrn a nečistot s obsahem škrobu během praní tkanin, čištění tuhých povrchů a/nebo nádobí.

WO 94/18314 (Genencor) publikovaný 18. srpna 1994, WO 94/02596 (Novo) publikovaný 3. února 1994 a WO 95/10603 (Novo) publikovaný 20. dubna 1995, popisují čistící prostředky obsahující mutantní amylázy.

Další amylázy známé svým využitím v čistících prostředcích zahrnují α - a β -amylázy. α -Amylázy jsou známy v oboru a zahrnují takové, které jsou popsány v U. S. Patent 5,003,257, EP 252 666, WO 91/00353, FR 2,676,456, EP 285 123, EP 525 610, EP 368 341 a Britskou patentovou specifikací 1,296,839 (Novo).

WO 95/26397 (Novo), publikovaná 5. října 1995, popisuje α -amylázu, mající specifickou aktivitu nejméně o 25% vyšší než je specifická aktivita Termamyl[®] při teplotách od 25 °C do 55 °C a při hodnotách pH v rozmezí od 8 do 10.

WO 98/05748 (P&G), publikovaná 12. února 1998, popisuje varianty α -amylázy, popsané v WO 95/26397 použité v detergentních přípravcích.

WO 98/30669 (Henkel), publikovaná 16. července 1998, popisuje detergentní přípravky obsahující proteázy a amylázy, kde proteázou je proteázový mutant, ve kterém je aminokyselina leucin přítomná v poloze 211 (způsob číslování BLAP) přírodní proteázy vyměněna v této poloze za aspartamovou nebo glutamovou kyselinu, a amylásou je amylásový mutant, ve kterém je jeden methionin, tryptofan, cystein nebo tyrosin přítomný v přírodní amyláze odstraněn nebo vyměněn za jinou aminokyselinu, kterou je obzvláště cystein nebo methionin. Příklady amylásových

mutantů, vhodných pro použití v přípravcích podle WO 98/30669 jsou popsány v WO 94/02597 (Novo), WO 95/10603 (Novo) a WO 94/18314 (Genecor) a jsou komerčně dostupné pod obchodními názvy Duramyl® (Novo) a Purafect OxAm® (Genecor).

Ovšem stále existují zákazníci, kteří vyžadují čisticí prostředky zajišťující zvýšené a/nebo zlepšené čištění od nečistot (odstraňování a/nebo snížení nečistoty) a/nebo odstraňování skvrn ze substrátů ve srovnání s konvenčními čisticími prostředky obsahujícími enzymy.

V tomto vynálezu bylo shledáno, že kombinace nových proteázových enzymů, které jsou mnohonásobně substituované proteázové a amylázové varianty, poskytuje zvýšené a/nebo zlepšené účinky při čištění a/nebo odstraňování skvrn ve srovnání s čisticími prostředky obsahujícími konvenční enzymy a ve srovnání s čisticími prostředky obsahujícími nové proteázové enzymy podle tohoto vynálezu bez přítomnosti amylázových enzymů podle tohoto vynálezu.

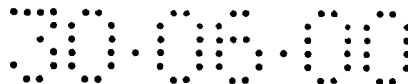
Dále bylo nalezeno, že čisticí prostředky zahrnující novou kombinaci nových proteázových enzymů podle tohoto vynálezu s amylázovými enzymy podle tohoto vynálezu zajišťují vynikající čisticí účinky ve srovnání s čisticími schopnostmi prostředků, které obsahují buď jedno nebo druhé ale nikoliv oboje (proteázy nebo amylázy podle tohoto vynálezu).

Předmětem tohoto vynálezu je tedy zajištění čisticích prostředků, obzvláště detergentních prostředků pro praní prádla a/nebo prostředků pro mytí nádobí, majících zvýšené účinky při odstraňování znečištění a skvrn a při praní tkanin.

Konkrétní kombinace nárokové v tomto vynálezu nejsou identifikovány v žádném referenci, týkající se současného stavu techniky v tomto oboru.

Podstata vynálezu

Tento vynález vychází vstříc výše zmíněných požadavků v tom, že překvapivě odhaluje fakt, že mnohonásobně substituované proteázové varianty podle tohoto vynálezu, jsou-li použity v kombinaci s amylázovými variantami podle tohoto vynálezu v čisticích prostředcích, zajišťují zvýšenou a silnější čisticí schopnost včetně odstraňování skvrn a špíny a/nebo snížení zašpinění a/nebo stupně bělosti a/nebo vymizení zašpinění nebo skvrn a/nebo odstraňování nebo snižování povlaků ve srovnání s čisticími prostředky obsahujícími konvenční enzymy.



Mnohonásobně substituované proteázové a amylázové varianty podle tohoto vynálezu jsou vhodné pro vysoko- i nízko koncentrované granulární přípravky, pro kapalně přípravky s vysokou i nižší účinností, tablety popř. kusové či jiné syntetické detergentní přípravky.

V jednom aspektu tohoto vynálezu čisticí prostředek zahrnuje:

- (a) proteázovou variantu, s výhodou účinné množství proteázové varianty, výhodněji od 0,0001% do asi 10% hmotnosti čisticího prostředku, kde zmíněná proteázová varianta obsahuje substituci aminokyselinových zbytků s jinými přírodně se vyskytujícími aminokyselinami v aminokyselinových polohách odpovídajících pozicím 103 subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens* v kombinaci se substitucí aminokyselinových zbytků za přírodní aminokyseliny v jedné nebo více pozicích odpovídajících polohám 1, 3, 4, 8, 9, 10, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 24, 27, 33, 37, 38, 42, 43, 48, 55, 57, 58, 61, 62, 68, 72, 75, 76, 77, 78, 79, 86, 87, 89, 97, 98, 99, 101, 102, 104, 106, 107, 109, 111, 114, 116, 117, 119, 121, 123, 126, 128, 130, 131, 133, 134, 137, 140, 141, 142, 146, 147, 158, 159, 160, 166, 167, 170, 173, 174, 177, 181, 182, 183, 184, 185, 188, 192, 194, 198, 203, 204, 205, 206, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 222, 224, 227, 228, 230, 232, 236, 237, 238, 240, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 265, 268, 269, 270, 271, 272, 274 a 275 subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens*, kde když zmíněná varianta zahrnuje substituci aminokyselinového zbytku v pozicích 103 a 76, obsahuje také substituci aminokyselinového zbytku v jedné nebo více aminokyselinových poloh jiných než odpovídá aminokyselinovým pozicím 27, 99, 101, 104, 107, 109, 123, 128, 166, 204, 206, 210, 216, 217, 218, 222, 260, 265 nebo 274 subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens*.
- (b) amylázovou variantu, s výhodou účinné množství amylázové varianty, výhodněji od 0,0001 % do asi 10 % hmotnosti čisticího prostředku, kde zmíněná amylázová varianta je vybrána ze skupiny obsahující:

(i) α -amylázu charakterizovanou tím, že má specifickou aktivitu nejméně o 25 % vyšší než je specifická aktivita Termamyl[®] při teplotě v rozsahu od 25 °C do 55 °C a při hodnotách pH v rozsahu od 8 do 10, měřeno pomocí stanovení α -amylázové aktivity Phadebas[®] a/nebo

(ii) α -amylázu podle (i) zahrnující aminokyselinovou sekvenci popsanou v SEQ ID č. 1 nebo α -amylázu, která je alespoň z 80 % homologická s aminokyselinovou sekvencí SEQ ID č. 1 a/nebo



(iii) α -amylázu podle (i) zahrnující aminokyselinovou sekvenci popsanou v SEQ ID č. 2 nebo α -amylázu, která je alespoň z 80 % homologická s aminokyselinovou sekvencí SEQ ID č. 2 a/nebo

(iv) α -amylázu podle (i) zahrnující následující aminokyselinovou N-terminální sekvenci: His-His-Asn-Gly-Thr-Asn-Gly-Thr-Met-Met-Gln-Tyr-Phe-Glu-Trp-Tyr-Leu-Pro-Asn-Asp (SEQ ID č. 3) nebo α -amylázu, která je N-terminálně alespoň z 80 % homologická s aminokyselinovou sekvencí SEQ ID č. 3 a/nebo

(v) α -amylázu podle (i-iv), kde α -amyláza se získává z alkalofilních druhů *Bacillus* a/nebo

(vi) α -amylázu podle (v), kde amylázu lze získat z libovolného z kmenů NCIB 12289, NCIB 12512, NCIB 12513 a DSM 935 a/nebo

(vii) α -amylázu vykazující pozitivní imunologickou kros-reaktivitu s protilátkami vzniklými proti α -amyláze, mající sekvenci aminokyselin odpovídající SEQ ID č. 1, SEQ ID č. 2 nebo SEQ ID č. 3 a/nebo

(viii) variantu mateřské α -amylázy, kde mateřská α -amyláza (1) má jednu z aminokyselinových sekvencí SEQ ID č. 1, SEQ ID č. 2 nebo SEQ ID č. 4, nebo (2) vykazuje alespoň 80 % homologii s jednou nebo více ze zmíněných aminokyselinových sekvencí a/nebo vykazuje imunologickou kros-reaktivitu s protilátkou vzniklou proti α -amyláze, mající jednu ze zmíněných aminokyselinových sekvencí a/nebo je kódována DNA sekvencí, která hybridizuje se stejným vzorkem jako DNA sekvence kódující α -amylázu mající jednu ze zmíněných aminokyselinových sekvencí, kde jsou varianty: (A) nejméně jeden aminokyselinový zbytek zmíněné matečné α -amylázy byl vypuštěn a/nebo (B) nejméně jeden aminokyselinový zbytek zmíněné matečné α -amylázy byl nahrazen jiným aminokyselinovým zbytkem a/nebo (C) nejméně jeden aminokyselinový zbytek byl inserován do zmíněné matečné α -amylázy; zmíněná varianta má α -amylázovou aktivitu a vykazuje ve srovnání s matečnou α -amylázou následující vlastnosti: zvýšená termostabilita, zvýšená stabilita vůči oxidaci, snížená závislost na Ca iontech, zvýšená stabilita a/nebo α -amylolytická aktivita při neutrálním nebo relativně vysokém pH, zvýšená α -amylolytická aktivita při relativně vyšší teplotě a zvýšení nebo snížení isoelektrického bodu (pI) takže pI hodnoty α -amylázové varianty lépe vyhovují pH média a
(c) jeden nebo více čistících doplňkových materiálů.



V dalším aspektu tohoto vynálezu je zajištěn přípravek na čištění tkanin obsahuje:

- (a) proteázovou variantu, s výhodou účinné množství proteázové varianty, výhodněji od 0,0001% do asi 10% hmotnosti čistícího prostředku tkanin, kde zmíněná proteázová varianta je popsána výše;
- (b) amylázovou variantu, s výhodou účinné množství amylázové varianty, výhodněji od 0,0001% do asi 10% hmotnosti čistícího prostředku, kde zmíněná amylázová varianta je popsána výše;
- (c) nejméně 5% hmotnosti přípravku na čištění tkanin surfaktantu a
- (d) nejméně 5 % hmotnosti přípravku na čištění tkanin plniva.

V dalším aspektu tohoto vynálezu je zajištěn způsob čištění tkanin, které vyžadují vyčištění, zahrnující kontaktování tkaniny s prostředkem na čištění tkanin podle tohoto vynálezu.

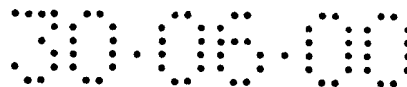
V dalším aspektu tohoto vynálezu je zajištěn čistící prostředek na mytí nádobí, zahrnující:

- (a) proteázovou variantu, s výhodou účinné množství proteázové varianty, výhodněji od 0,0001% do asi 10% hmotnosti čistícího prostředku na mytí nádobí, kde zmíněná proteázová varianta je popsána výše;
- (b) amylázovou variantu, s výhodou účinné množství amylázové varianty, výhodněji od 0,0001% do asi 10% hmotnosti čistícího prostředku na mytí nádobí, kde zmíněná amylázová varianta je popsána výše;
- (c) od 0,1 % do asi 10 % hmotnosti čistícího prostředku na mytí nádobí surfaktantu.

V dalším aspektu tohoto vynálezu je zajištěn způsob čištění nádobí, které potřebuje vyčistit, zahrnující kontaktování nádobí s prostředkem na mytí nádobí podle tohoto vynálezu.

V dalším aspektu podle tohoto vynálezu je zajištěn prostředek na osobní čištění, zahrnující:

- (a) proteázovou variantu, s výhodou účinné množství proteázové varianty, výhodněji od 0,0001% do asi 10% hmotnosti prostředku pro osobní čištění, kde zmíněná proteázová varianta je popsána výše;
- (b) amylázovou variantu, s výhodou účinné množství amylázové varianty, výhodněji od 0,0001% do asi 10% hmotnosti prostředku osobní čištění, kde zmíněná amylázová varianta je popsána výše;
- (c) od 0,1 % do asi 95 % (hmotnosti prostředku pro osobní čištění) surfaktantového systému a
- (d) případně, od 0,05 % do asi 50 % (hmotnosti prostředku pro osobní čištění) enzymového stabilizátoru.



V dalším aspektu tohoto vynálezu je zajištěn způsob osobního čištění částí lidského nebo zvířecího těla, vyžadujícího takového čištění, zahrnující kontaktování této části těla s přípravkem pro osobní čištění podle tohoto vynálezu.

V dalším aspektu podle tohoto vynálezu je zajištěn čisticí prostředek, zahrnující:

(a) proteázovou variantu, s výhodou účinné množství proteázové varianty, výhodněji od 0,0001% do asi 10% hmotnosti čisticího prostředku, kde zmíněná proteázová varianta zahrnuje substituci aminokyselinového zbytku s jiným přírodním aminokyselinovým zbytkem v jedné nebo více aminokyselinových polohách odpovídajících pozicím 62, 212, 230, 232, 252 a 257 subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens*,

(b) amylázovou variantu, s výhodou účinné množství amylázové varianty, výhodněji od 0,0001% do asi 10% hmotnosti čisticího prostředku, kde zmíněná amylázová varianta je vybrána ze skupiny obsahující:

(i) α -amylázu charakterizovanou tím, že má specifickou aktivitu nejméně o 25 % vyšší než je specifická aktivita Termamyl® při teplotách v rozsahu od 25 °C do 55 °C a při hodnotách pH v rozsahu od 8 do 10, měřeno pomocí stanovení α -amylázové aktivity Phadebas® a/nebo

(ii) α -amylázu podle (i) zahrnující aminokyselinovou sekvenci popsanou v SEQ ID č. 1 nebo α -amylázu, která je alespoň z 80 % homologická s aminokyselinovou sekvencí SEQ ID č. 1 a/nebo

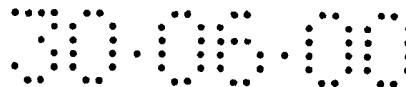
(iii) α -amylázu podle (i) zahrnující aminokyselinovou sekvenci popsanou v SEQ ID č. 2 nebo α -amylázu, která je alespoň z 80 % homologická s aminokyselinovou sekvencí SEQ ID č. 2 a/nebo

(iv) α -amylázu podle (i) zahrnující následující aminokyselinovou N-terminální sekvenci: His-His-Asn-Gly-Thr-Asn-Gly-Thr-Met-Met-Gln-Tyr-Phe-Glu-Trp-Tyr-Leu-Pro-Asn-Asp (SEQ ID č. 3) nebo α -amylázu, která je N-terminálně alespoň z 80 % homologická s aminokyselinovou sekvencí SEQ ID č. 3 a/nebo

(v) α -amylázu podle (i-iv), kde α -amyláza se získává z alkalofilních druhů *Bacillus* a/nebo

(vi) α -amylázu podle (v), kde amylázu lze získat z libovolného z kmenů NCIB 12289, NCIB 12512, NCIB 12513 a DSM 935 a/nebo

(vii) α -amylázu vykazující pozitivní imunologickou kros-reaktivitu s protilátkami vzniklými proti α -amyláze, mající sekvenci aminokyselin odpovídající SEQ ID č. 1, SEQ ID č. 2 nebo SEQ ID č. 3 a/nebo



(viii) variantu mateřské α -amylázy, kde mateřská α -amyláza (1) má jednu z aminokyselinových sekvencí SEQ ID č. 1, SEQ ID č. 2 nebo SEQ ID č. 4, nebo (2) vykazuje alespoň 80 % homologii s jednou nebo více ze zmíněných aminokyselinových sekvencí a/nebo vykazuje imunologickou kros-reaktivitu s protilátkou vzniklou proti α -amyláze, mající jednu ze zmíněných aminokyselinových sekvencí a/nebo je kódována DNA sekvencí, která hybridizuje se stejným vzorkem jako DNA sekvence kódující α -amylázu mající jednu ze zmíněných aminokyselinových sekvencí, kde jsou varianty: (A) nejméně jeden aminokyselinový zbytek zmíněné matečné α -amylázy byl vypuštěn a/nebo (B) nejméně jeden aminokyselinový zbytek zmíněné matečné α -amylázy byl nahrazen jiným aminokyselinovým zbytkem a/nebo (C) nejméně jeden aminokyselinový zbytek byl inzerován do zmíněné matečné α -amylázy; zmíněná varianta má α -amylázovou aktivitu a vykazuje ve srovnání s matečnou α -amylázou následující vlastnosti: zvýšená termostabilita, zvýšená stabilita vůči oxidaci, snížená závislost na Ca iontech, zvýšená stabilita a/nebo α -amylolytická aktivita při neutrálním nebo relativně vysokém pH, zvýšená α -amylolytická aktivita při relativně vyšší teplotě a zvýšení nebo snížení isoelektrického bodu (pI) takže pI hodnoty α -amylázové varianty lépe vyhovují pH média a (c) jeden nebo více čistících doplňkových materiálů.

V dalším aspektu tohoto vynálezu je zajištěn prostředek na čištění tkanin, zahrnující:

- (a) proteázovou variantu, s výhodou účinné množství proteázové varianty, výhodněji od 0,0001% do asi 10% hmotnosti čistícího prostředku, kde zmíněná proteázová varianta zahrnuje substituci aminokyselinového zbytku s jiným přírodním aminokyselinovým zbytkem v jedné nebo více aminokyselinových polohách odpovídajících pozicím 62, 212, 230, 232, 252 a 257 subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens*,
- (b) amylázovou variantu, s výhodou účinné množství amylázové varianty, výhodněji od 0,0001% do asi 10% hmotnosti čistícího prostředku, kde zmíněná amylázová varianta je popsána výše,
- (c) nejméně 5 % hmotnosti čistícího prostředku surfaktantu,
- (d) nejméně 5 % hmotnosti čistícího prostředku plniva.

V dalším aspektu tohoto vynálezu je zajištěn způsob čištění tkanin, které to potřebují, zahrnující kontaktování tkaniny s čistícím prostředkem podle tohoto vynálezu.

V dalším aspektu tohoto vynálezu je zajištěn prostředek na mytí nádobí, zahrnující:

- (a) proteázovou variantu, s výhodou účinné množství proteázové varianty, výhodněji od 0,0001% do asi 10% hmotnosti čistícího prostředku, kde zmíněná proteázová varianta zahrnuje substituci aminokyselinového zbytku s jiným přírodním aminokyselinovým zbytkem v jedné nebo více

aminokyselinových polohách odpovídajících pozicím 62, 212, 230, 232, 252 a 257 subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens*,

(b) amylázovou variantu, s výhodou účinné množství amylázové varianty, výhodněji od 0,0001% do asi 10% hmotnosti čistícího prostředku, kde zmíněná amylázová varianta je popsána výše,

(c) od 0,1 % do asi 10 % hmotnosti čistícího prostředku surfaktantu.

V dalším aspektu tohoto vynálezu je zajištěn způsob čištění nádobí, které to vyžaduje, zahrnující kontaktování nádobí s prostředkem na mytí nádobí podle tohoto vynálezu.

V dalším aspektu tohoto vynálezu je zajištěn prostředek pro osobní čištění, zahrnující:

(a) proteázovou variantu, s výhodou účinné množství proteázové varianty, výhodněji od 0,0001% do asi 10% hmotnosti osobního čistícího prostředku, kde zmíněná proteázová varianta zahrnuje substituci aminokyselinového zbytku s jiným přírodním aminokyselinovým zbytkem v jedné nebo více aminokyselinových polohách odpovídajících pozicím 62, 212, 230, 232, 252 a 257 subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens*,

(b) amylázovou variantu, s výhodou účinné množství amylázové varianty, výhodněji od 0,0001% do asi 10% hmotnosti prostředku osobní čištění, kde zmíněná amylázová varianta je popsána výše;

(c) od 0,1 % do asi 95 % (hmotnosti prostředku pro osobní čištění) surfaktantového systému a

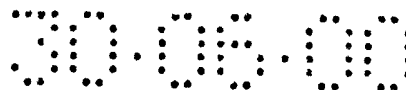
(d) případně, od 0,05 % do asi 50 % (hmotnosti prostředku pro osobní čištění) enzymového stabilizátoru.

V dalším aspektu tohoto vynálezu je zajištěn způsob čištění částí lidského nebo zvířecího těla, vyžadujícího takové čištění, zahrnující kontaktování části těla s osobním čistícím prostředkem podle tohoto vynálezu.

Předmětem tohoto vynálezu je tedy zajištění čistícího přípravku, majícího kombinaci proteázové a amylázové varianty, schopné zajištění zvýšeného a zlepšeného čištění tkanin, nádobí, přístrojů, kuchyňského zařízení a dalších substrátů s pevným povrchem. Dále je objektem tohoto vynálezu zajištění způsobu čištění těchto zmíněných substrátů pomocí použití čistících prostředků obsahujících proteázové a amylázové varianty podle tohoto vynálezu.

Tyto a další předměty, znaky a výhody tohoto vynálezu budou jasnější z následujícího detailního popisu vynálezu, příkladů provedení vynálezu a z připojených nároků.

Všechna procentuální vyjádření, poměry a proporce použité v textu jsou na základě hmotností pokud není přímo uvedeno jinak. Všechny zde citované dokumenty jsou zde zahrnuty jako reference.



Krátký popis zobrazení

Obrázek 1 A-C zobrazuje DNA aminokyselinovou sekvenci subtilisinů *Bacillus amyloliquefaciens* a částečnou restriční mapu tohoto genu.

Obrázek 2 zobrazuje zachované aminokyselinové zbytky subtilisinů *Bacillus amyloliquefaciens* (BPN)' a *Bacillus lentus* (přírodní typ).

Obrázek 3A a 3B zobrazují aminokyselinovou sekvenci čtyř subtilisinů. Horní řádka reprezentuje aminokyselinovou sekvenci subtilisinů z *Bacillus amyloliquefaciens* (někdy také popisovaný jako subtilisin BNP'). Druhá řádka ukazuje aminokyselinovou sekvenci subtilisinů z *Bacillus subtilis*. Třetí řádka zobrazuje aminokyselinovou sekvenci subtilisinů *Bacillus licheniformis*. Čtvrtá řádka ukazuje aminokyselinovou sekvenci subtilisinů z *Bacillus lentus* (také označovaný jako subtilisin 309 v PCT WO 89/06276). Symbol * označuje specifické aminokyselinové zbytky ve srovnání se subtilisinem BNP'.

Detailní popis vynálezu

I. Proteázy - Proteázy jsou karbonylhydrolázy, které obecně účinkují tak, že štěpí peptidovou vazbu proteinů nebo peptidů. V tomto textu označuje „proteáza“ přírodně se vyskytující proteázu nebo rekombinantní proteázu. Přírodně se vyskytující proteázy zahrnují α -aminoacylpeptid hydrolázy, peptidylaminokyselinové hydrolázy, acylamino hydrolázy, serin karboxypeptidázy, metalokarboxypeptidázy, thiolproteínázy, karboxylproteínázy a metalloproteínázy. Jsou zahrnuty serin-, metallo-, thiol- a kyselinové proteázy, stejně jako endo- a exo-proteázy.

Tento vynález zahrnuje proteázové enzymy, nevyskytující se v přírodě, které jsou variantami karbonylhydroláz (proteázové varianty), mající jinou proteolytickou aktivitu, stabilitu, substrátovou specifitu, pH profil a/nebo charakteristiku působení ve srovnání s prekurzorem karbonylhydrolázy, ze které je aminokyselinová sekvence varianty odvozena. Konkrétně, takovéto proteázové varianty mají aminokyselinovou sekvenci, která se nenachází v přírodě, která je vytvořena záměnou několika aminokyselinových zbytků v prekurzoru proteázy jinými aminokyselinovými zbytky.

Proteázové varianty podle tohoto vynálezu zahrnují substituci libovolné z devatenácti přírodně se vyskytujících L-aminokyselin na předem určených aminokyselinových pozicích. Tyto kombinace mohou být provedeny v libovolném prekurzorovém subtilisinu (prokaryotní, eukaryotní, savčí a pod.). V tomto textu se na různé aminokyselinové zbytky odkazuje pomocí

běžných jednopísmenných nebo třípísmenných zkratk. Tyto kódy jsou identifikovány v Dale M. W. (1989), *Molecular Genetics of Bacteria*, John Wiley & Sons, Ltd., Příloha B.

Proteázové varianty užitečné podle tohoto vynálezu jsou s výhodou odvozeny od *Bacillus subtilisin*. Výhodněji jsou proteázové varianty odvozeny od subtilisinu *Bacillus lentus* a/nebo subtilisinu 309.

Karbonyl hydrolázy - Karbonyl hydrolázy jsou proteázové enzymy, které hydrolyzují sloučeniny obsahující



vazbu, kde X je kyslík nebo dusík. Zahrnují přírodně se vyskytující karbonylové hydrolázy a rekombinantní karbonylhydrolázy. Přírodně se vyskytující karbonyl hydrolázy zahrnují hydrolázy, např. peptidhydrolázy jako je subtilisiny nebo metalloproteázy. Peptidhydrolázy zahrnují α -aminoacylpeptid hydrolázy, peptidylaminokyselinové hydrolázy, acylaminohydrolázy, serinkarboxypeptidázy, metallokarboxypeptidázy, thiolproteinázy, karboxyproteinázy a metalloproteinázy. Také jsou zahrnuty serin-, metallo-, thiol- a kyselinové proteázy, stejně jako endo- a exo-proteázy.

Subtilisiny - Subtilisiny jsou bakterální nebo houbové proteázy, které obecně působí na štěpení peptidové vazby proteinů nebo peptidů. V tomto textu označuje „subtilisin“ přírodně se vyskytující subtilisin nebo rekombinantní subtilisin. Je známo, že série přírodně se vyskytujících subtilisinů je produkována a často vylučována různými mikrobiálními druhy. Aminokyselinová sekvence členů této série není plně homologická. Avšak subtilisiny v této sérii vykazují stejný nebo podobný typ proteolytické aktivity. Tato třída serinových proteáz vykazuje společnou aminokyselinovou sekvenci definující katalytickou triádu, která je odlišuje od třídy serinových proteáz, které jsou příbuzné chymotrypsinu. Subtilisiny a serinové proteázy, které jsou příbuzné chymotrypsinu mají oba katalytickou triádu, zahrnují aspartát, histidin a serin. U proteáz příbuzných se subtilisinem je relativní pořadí těchto aminokyselin, čtených od aminokonce směrem ke karboxylovému konci, je aspartát- histidin-serin. Subtilisin v tomto textu tedy označuje serinovou proteázu, mající katalytickou triádu proteáz příbuzných se subtilisinem. Příklady zahrnují (výčet není úplný) subtilisin popsáný v obrázku 3. Obecně a pro účely tohoto vynálezu odpovídá číslování aminokyselin v proteázách číslování určenému pro subtilisinovou sekvenci *Bacillus amyloliquefaciens*, uvedenému na obrázku 1.



Proteázové varianty - „Proteázová varianta“ má aminokyselinovou sekvenci, která je odvozena z aminokyselinové sekvence „prekurzorové proteázy“. Prekurzorové proteázy zahrnují přírodně se vyskytující proteázy a rekombinantní proteázy. Aminokyselinová sekvence proteázové varianty je „odvozena“ od aminokyselinové sekvence prekurzorové proteázy substitucí, vymazáním nebo insercí jedné nebo více aminokyselin aminokyselinové sekvence prekurzoru. Tato modifikace je modifikace „prekurzorové DNA sekvence“, která kóduje sekvenci aminokyselin v prekurzorové proteáze spíše než manipulace samotného prekurzoru proteázového enzymu. Vhodné metody pro takovouto manipulaci sekvence prekurzoru DNA zahrnují metody popsané v tomto vynálezu stejně jako metody známé odborníkům v oboru (viz. například EP 0 328 299, WO 89/06279 a U. S. patenty a patentové přihlášky, které byly popsány výše).

V preferovaném provedení proteázové varianty, které jsou proteázové enzymy užitečné v čistících přípravcích podle tohoto vynálezu, zahrnují proteázové varianty včetně substituce aminokyselinového zbytku s jiným přírodním aminokyselinovým zbytkem na aminokyselinové pozici odpovídající poloze 103 v subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens* v kombinaci se substitucí aminokyselinového zbytku za přírodní aminokyselinový zbytek na jedné nebo více aminokyselinových pozic odpovídajících polohám 1, 3, 4, 8, 9, 10, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 24, 27, 33, 37, 38, 42, 43, 48, 55, 57, 58, 61, 62, 68, 72, 75, 76, 77, 78, 79, 86, 87, 89, 97, 98, 99, 101, 102, 104, 106, 107, 109, 111, 114, 116, 117, 119, 121, 123, 126, 128, 130, 131, 133, 134, 137, 140, 141, 142, 146, 147, 158, 159, 160, 166, 167, 170, 173, 174, 177, 181, 182, 183, 184, 185, 188, 192, 194, 198, 203, 204, 205, 206, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 222, 224, 227, 228, 230, 232, 236, 237, 238, 240, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 265, 268, 269, 270, 271, 272, 274 a 275 subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens*, kde když zmíněná proteázová varianta zahrnuje substituci aminokyselinového zbytku v pozicích 103 a 76, obsahuje také substituci aminokyselinového zbytku v jedné nebo více z aminokyselinových poloh, jiných než odpovídá aminokyselinovým pozicím 27, 99, 101, 104, 107, 109, 123, 128, 166, 204, 206, 210, 216, 217, 218, 222, 260, 265 nebo 274 subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens* a jeden nebo více čistící přídatný materiál.

I když může být využita libovolná kombinace výše uvedených aminokyselinových substitucí, preferované proteázové variantní enzymy užitečné podle tohoto vynálezu zahrnují substituci, vymazání nebo inzerci v následujících kombinacích:

[illegible]

4	76	103	104	159	217	251						
4	76	103	104	159	217	252						
76	77	103	104	133	185	251						
76	103	104	159	206	244							
4	76	103	104	188								
4	76	103	104	158								
76	77	103	104	185								
76	103	104	206	251								
48	76	103	104	111	159							
68	76	103	104	159	236							
42	76	103	104	159								
12	62	76	103	104	159							
42	76	103	104	159								
76	103	104	146	159								
76	103	104	159	238								
76	103	104	159	224								
76	103	104	212	268	271							
76	89	103	104									
76	87	103	104	212	271							
76	103	104	212	245	271							
76	103	104	134	141	212	271						
76	103	104	212	236	243	271						
76	103	104	109	245								
76	103	104	109	210								
20	62	76	103	104								
68	76	103	104	236								
68	76	103	104	159	236	271						
68	76	103	104	159	236	245						
68	76	103	104	159	217	236	271					
17	68	76	103	104								
68	76	103	104									
68	76	103	104	159	236							

68	75	76	103	104	159	236						
68	76	76	103	114	121	159	236	245				
12	68	76	103	104	159	236						
68	76	103	104	159	209	236	253					
68	76	103	104	117	159	184	236					
68	76	103	104	159	236	243						
68	76	103	104	159	236	245						
68	76	103	104	142	159							
68	76	103	104	123	159	236	249					
68	76	103	104	159	236	249						
76	103	104	222	245								
12	76	103	104	222	249							
76	103	104	173	222								
76	103	104	222	263								
21	76	103	104	222	237	263						
76	103	104	109	222								
76	103	104	109	222	271							
61	76	103	104	222								
76	103	104	137	222								
76	103	104	109	222	248							
76	103	104	222	249								
68	76	103	104	159	236	245	261					
68	76	103	104	141	159	236	245	255				
68	76	103	104	159	236	245	247					
68	76	103	104	159	174	204	236	245				
68	76	103	104	159	204	236	245					
68	76	103	104	133	159	218	236	245				
68	76	103	104	159	232	236	245					
68	76	103	104	159	194	203	236	245				
12	76	103	104	222	245							
76	103	104	232	245								
24	68	76	103	104	159	232	236	245				

68	103	104	159	232	236	245	252					
68	76	103	104	159	213	232	236	245	260			
12	76	103	104	222	244	245						
12	76	103	222	210	245							
12	76	103	104	130	222	245						
22	68	76	103	104								
68	76	103	104	184								
68	103	104	159	232	236	245	248	252				
68	103	104	159	232	236	245						
68	103	104	140	159	232	236	245	252				
43	68	103	104	159	232	236	245	252				
43	68	103	104	159	232	236	245					
43	68	103	104	159	232	236	245	252				
68	87	103	104	159	232	236	245	252	275			
12	76	103	104	130	222	245	248	262				
12	76	103	104	130	215	222	245					
12	76	103	104	130	222	227	245	262				
12	76	103	104	130	222	245	261					
76	103	104	130	222	245							
12	76	103	104	130	218	222	245	262	269			
12	57	76	103	104	130	222	245	251				
12	76	103	104	130	170	185	222	243	245			
12	76	103	104	130	222	245	268					
12	76	103	104	130	222	210	245					
68	103	104	159	232	236	245	257					
68	103	104	116	159	232	236	245					
68	103	104	159	232	236	245	248					
10	68	103	104	159	232	236	245					
68	103	104	159	203	232	236	245					
68	103	104	159	232	236	237	245					
68	76	79	103	104	159	232	236	245				
68	103	104	159	183	232	236	245					

68	103	104	159	174	206	232	236	245				
68	103	104	159	188	232	236	245					
68	103	104	159	230	232	236	245					
68	98	103	104	159	232	236	245					
68	103	104	159	215	232	236	245					
68	103	104	159	232	236	245	248					
68	76	103	104	159	232	236	245					
68	76	103	104	159	210	232	236	245				
68	76	103	104	159	232	236	245	257				
76	103	104	232	236	245	257						
68	103	104	159	232	236	245	257	275				
76	103	104	257	275								
68	103	104	159	224	232	236	245	257				
76	103	104	159	232	236	245	257					
68	76	103	104	159	209	232	236	245				
68	76	103	104	159	211	232	236	245				
12	68	76	103	104	159	214	232	236	245			
68	76	103	104	159	215	232	236	245				
12	68	76	103	104	159	232	236	245				
20	68	76	103	104	159	232	236	245	259			
68	87	76	103	104	159	232	236	245	260			
68	76	103	104	159	232	236	245	261				
76	103	104	232	236	242	245						
68	76	103	104	159	210	232	236	245				
12	48	68	76	103	104	159	232	236	245			
76	103	104	232	236	245							
76	103	104	159	192	232	236	245					
76	103	104	147	159	232	236	245	248	251			
12	68	76	103	104	159	232	236	245	272			
68	76	103	104	159	183	206	232	236	245			
68	76	103	104	159	232	236	245	256				
68	76	103	104	159	206	232	236	245				

27	68	76	103	104	159	232	236	245				
68	76	103	104	116	159	170	185	232	236	245		
61	68	103	104	159	232	236	245	248	252			
43	68	103	104	159	232	236	245	248	252			
68	103	104	159	212	232	236	245	248	252			
68	103	104	99	159	184	232	236	245	248	252		
103	104	159	232	236	245	248	252					
68	103	104	159	209	232	236	245	248	252			
68	103	104	109	159	232	236	245	248	252			
20	68	103	104	159	232	236	245	248	252			
68	103	104	159	209	232	236	245	248	252			
68	103	104	159	232	236	245	248	252	261			
68	103	104	159	185	232	236	245	248	252			
68	103	104	159	210	232	236	245	248	252			
68	103	104	159	185	210	232	236	245	248	252		
68	103	104	159	212	232	236	245	248	252			
68	103	104	159	213	232	236	245	248	252			
68	103	104	213	232	236	245	248	252				
68	103	104	159	215	232	236	245	248	252			
68	103	104	159	216	232	236	245	248	252			
20	68	103	104	159	232	236	245	248	252			
68	103	104	159	173	232	236	245	248	252			
68	103	104	159	232	236	245	248	251	252			
68	103	104	159	206	232	236	245	248	252			
68	103	104	159	232	236	245	248	252				
55	68	103	104	159	232	236	245	248	252			
68	103	104	159	232	236	245	248	252	255			
68	103	104	159	232	236	245	248	252	256			
68	103	104	159	232	236	245	248	252	260			
68	103	104	159	232	236	245	248	252	257			
68	103	104	159	232	236	245	248	252	258			
8	68	103	104	159	232	236	245	248	252	269		

68	103	104	116	159	232	236	245	248	252	260		
68	103	104	159	232	236	245	248	252	261			
68	103	104	159	232	236	245	248	252	261			
68	76	103	104	159	232	236	245	248	252			
68	103	104	232	236	245	248	252					
103	104	159	232	236	245	248	252					
68	103	104	159	232	236	245	248	252				
18	68	103	104	159	232	236	245	248	252			
68	103	104	159	232	236	245	248	252				
68	76	101	103	104	159	213	218	232	236	245	260	
68	103	104	159	228	232	236	245	248	252			
33	68	76	103	104	159	232	236	245	248	252		
68	76	89	103	104	159	210	213	232	236	245	260	
61	68	76	103	104	159	232	236	245	248	252		
103	104	159	205	210	232	236	245					
61	68	103	104	130	159	232	236	245	248	252		
61	68	103	104	133	137	159	232	236	245	248	252	
61	103	104	133	159	232	236	245	248	252			
68	103	104	159	232	236	245	248	252				
68	103	104	159	218	232	236	245	248	252			
61	68	103	104	159	160	232	236	245	248	252		
3	61	68	76	103	104	232	236	245	248	252		
61	68	103	104	159	167	232	236	245	248	252		
97	103	104	159	232	236	245	248	252				
98	103	104	159	232	236	245	248	252				
99	103	104	159	232	236	245	248	252				
101	103	104	159	232	236	245	248	252				
102	103	104	159	232	236	245	248	252				
103	104	106	159	232	236	245	248	252				
103	104	109	159	232	236	245	248	252				
103	104	159	232	236	245	248	252	261				
62	103	104	159	232	236	245	248	252				

103	104	159	184	232	236	245	248	252				
103	104	159	166	232	236	245	248	252				
103	104	159	217	232	236	245	248	252				
20	62	103	104	159	213	232	236	245	248	252		
62	103	104	159	213	232	236	245	248	252			
103	104	159	206	217	232	236	245	248	252			
62	103	104	159	206	232	236	245	248	252			
103	104	130	159	232	236	245	248	252				
103	104	131	159	232	236	245	248	252				
27	103	104	159	232	236	245	248	252				
38	103	104	159	232	236	245	248	252				
38	76	103	104	159	213	232	236	245	260			
68	76	103	104	159	213	232	236	245	260	271		
68	76	103	104	159	209	213	232	236	245	260		
68	76	103	104	159	210	213	232	236	245	260		
68	76	103	104	159	205	213	232	236	245	260		
68	76	103	104	159	210	232	236	245	260			
68	103	104	159	213	232	236	245	260				
76	103	104	159	213	232	236	245	260				
68	103	104	159	209	232	236	245					
68	103	104	159	210	232	236	245					
68	103	104	159	230	232	236	245					
68	103	104	159	126	232	236	245					
68	103	104	159	205	232	236	245					
68	103	104	159	210	232	236	245					
103	104	159	230	236	245							
68	103	104	159	232	236	245	260					
103	104	159	232	236	245							
68	103	104	159	174	232	236	245	257				
68	103	104	159	194	232	236	245	257				
68	103	104	159	209	232	236	245	257				
103	104	159	232	236	245	257						

68	76	103	104	159	213	232	236	245	260	261		
68	103	104	159	232	236	245	257	261				
103	104	159	213	232	236	245	260					
103	104	159	210	232	236	245	248	252				
103	104	159	209	232	236	245	257					
68	76	103	104	159	210	213	232	236	245	260		
12	103	104	159	209	213	232	236	245	260			
103	104	209	232	236	245	257						
103	104	159	205	210	213	232	236	245	260			
103	104	159	205	209	232	236	245	260				
68	103	104	159	205	209	210	232	236	245			
103	104	159	205	209	210	232	236	245	257			
103	104	159	205	209	232	236	245	257				
68	103	104	159	205	209	210	232	236	245	260		
103	104	159	205	209	210	232	236	245				
103	104	159	209	210	232	236	245					
103	104	159	205	210	232	236	245					
68	103	104	128	159	232	236	245					
48	103	104	159	230	236	245						
48	68	103	104	159	209	232	236	245				
48	68	103	104	159	232	236	245	248	252			
48	68	103	104	159	232	236	245	257	261			
102	103	104	159	212	232	236	245	248	252			
12	102	103	104	159	212	232	236	245	248	252		
101	102	103	104	159	212	232	236	245	248	252		
98	102	103	104	159	212	232	236	245	248	252		
102	103	104	159	213	232	236	245	248	252			
103	104	131	159	232	236	245	248	252				
103	104	159	184	232	236	245	248	252				
103	104	159	232	236	244	245	248	252				
62	103	104	159	213	232	236	245	248	252	256		
12	62	103	104	159	213	232	236	245	248	252		

101	103	104	159	185	232	236	245	248	252			
101	103	104	159	206	232	236	245	248	252			
101	103	104	159	213	232	236	245	248	252			
98	102	103	104	159	232	236	245	248	252			
101	102	103	104	159	232	236	245	248	252			
98	102	103	104	159	212	232	236	245	248	252		
98	102	103	104	159	212	232	236	248	252			
62	103	104	109	159	213	232	236	245	248	252		
62	103	104	159	212	213	232	236	245	248	252		
62	101	103	104	159	212	213	232	236	245	248	252	
103	104	159	232	245	248	252						
103	104	159	230	245								
62	103	104	130	159	213	232	236	245	248	252		
101	103	104	130	159	232	236	245	248	252			
101	103	104	128	159	232	236	245	248	252			
62	101	103	104	159	213	232	236	245	248	252		
62	103	104	128	159	213	232	236	245	248	252		
62	103	104	128	159	213	232	236	245	248	252		
101	103	104	159	232	236	245	248	252	260			
101	103	104	131	159	232	236	245	248	252			
98	101	103	104	159	232	236	245	248	252			
99	101	103	104	159	232	236	245	248	252			
101	103	104	159	212	232	236	245	248	252			
76	103	104	167	170	194							
101	103	104	159	209	232	236	245	248	252			
101	103	104	159	210	232	236	245	248	252			
101	103	104	159	205	232	236	245	248	252			
101	103	104	159	230	236	245						
101	103	104	159	194	232	236	245	248	252			
76	101	103	104	159	194	232	236	245	248	252		
101	103	104	159	230	232	236	245	248	252			
62	103	104	159	185	206	213	232	236	245	248	252	271

Tabulka II

[illegible]

N76D	S103A	V104I	A228V										
P55S	N76D	S103A	V104I	S240T									
N76D	S103A	V104I	A254T										
N76D	S103A	I104N	N204T										
N76D	S103A	V104I	N204D										
N43S	N76D	S103A	V104I										
N76D	S103A	V104I	G159D										
R10H	N76D	S103A	V104I	V177A									
T58S	N76D	S103A	V104I										
N76D	S103A	V104I	A270V										
N76D	S103A	V104I	N185D										
K27N	N76D	S103A	V104I										
N76D	S103A	V104I	L262M										
N76D	S78P	S103A	V104I										
S24P	N76D	S103A	V104I										
N76D	S103A	V104I	S166G	Q236R	K251R								
H17L	N76D	S103A	V104I	K237E									
N76D	S103A	V104I	S130L										
N76D	S103A	V104I	Q109R										
N76D	S99R	S103A	V104I	N204T									
N76D	S103A	V104I	D181N										
Q12R	N76D	S103A	V104I										
N76D	S103A	V104I	S212P	E271V									
N76D	S103A	V104I	N252K	N261Y									
N76D	S103A	V104I	S242T										
N76D	S103A	V104I	E271Q										
Q12R	N76D	S103A	V104I	S242T									
N43S	N76D	S103A	V104I	N116K	N183I								
N76D	S103A	V104I	G258R										
N76D	S103A	V104I	E271G										
G61R	N76D	S103A	V104I										
T38S	N76D	S103A	V104I	Q182R	Y263H								
N76D	S103A	V104I	Q182R	A272S									
N76D	S103A	V104I	Q109R	I246V									
N76D	S87G	S103A	V104I	Q206R	H249Q	S265G							
N76D	S103A	V104I	Q137R	N238Y	E271V								

S103A	V104I	A228T										
N76D	S103A	V104I	Q182R	I198V								
L21M	N76D	S103A	V104I	Q182R								
N76D	S103A	V104I	M119I	Q137R								
N76D	S103A	V104I	Q137R	N248S								
A13T	N76D	S103A	V104I	Q206R								
N76D	S103A	V104I	Q206R									
N76D	S103A	V104I	S212P	G258R								
T58S	N76D	S103A	V104I	E271G								
N76D	S103A	V104I	Q206E	N261D								
V4E	N76D	S103A	V104I	Q206E								
N76D	N77D	S103A	V104I	Q206E								
N76D	S103A	V104I	A158E									
N76D	S103A	V104I	Q206E									
V4E	N76D	S103A	V104I	G159D	L217E	K251Q						
V4E	N76D	S103A	V104I	G159D	L217E	N252D						
N76D	N77D	S103A	V104I	A133T	N185D	K251T						
N76D	S103A	V104I	G159D	Q206E	V244A							
V4E	N76D	S103A	V104I	S188E								
V4E	N76D	S103A	V104I	A158E								
N76D	N77D	S103A	V104I	N185D								
N76D	S103A	V104I	Q206E	K251T								
A48T	N76D	S103A	V104I	L111M	G159D							
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q236H							
L42V	N76D	S103A	V104I	G159D								
Q12H	N62H	N76D	S103A	V104I	G159D							
L42I	N76D	S103A	V104I	G159D								
N76D	S103A	V104I	G146S	G159D								
N76D	S103A	V104I	G159D	N238S								
N76D	S103A	V104I	G159D	T224A								
N76D	S103A	V104I	S212P	V268F	E271V							
N76D	E89A	S103A	V104I									
N76D	S87R	S103A	V104I	S212P	E271V							
N76D	S103A	V104I	S212P	Q245L	E271V							
N76D	S103A	V104I	T134S	S141N	S212P	E271V						
N76D	S103A	V104I	S212P	Q236L	N243S	E271V						

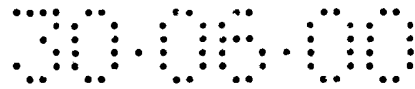
N76D	S103A	V104I	Q109R	Q245R								
N76D	S103A	V104I	Q109R	P210L								
G20V	N62S	N76D	S103A	V104I								
V68A	N76D	S103A	V104I	Q236H								
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q236H	E271V						
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q236H	Q245R						
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	L217I	Q236H	E271V					
H17Q	V68A	N76D	S103A	V104I								
V68A	N76D	S103A	V104I									
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q236R							
V68A	L75R	N76D	S103A	V104I	G159D	Q236H						
V68A	N76D	N76D	S103A	A114V	V121I	G159D	Q236H	Q245R				
Q12R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q236H						
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Y209S	Q236H	T253K					
V68A	N76D	S103A	V104I	N117K	G159D	N184S	Q236H					
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q236H	N243I						
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q236H	Q245L						
V68A	N76D	S103A	V104I	A142V	G159D							
V68A	N76D	S103A	V104I	N123S	G159D	Q236H	H249Y					
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q236H	H249Q						
N76D	S103A	V104I	M222S	Q245R								
Q12R	N76D	S103A	V104I	M222S	H249R							
N76D	S103A	V104I	N173R	M222S								
N76D	S103A	V104I	M222S	Y263F								
L21M	N76D	S103A	V104I	M222S	K237R	Y263F						
N76D	S103A	V104I	Q109R	M222S								
N76D	S103A	V104I	Q109R	M222S	E271D							
G61R	N76D	S103A	V104I	M222S								
N76D	S103A	V104I	Q137R	M222S								
N76D	S103A	V104I	Q109R	M222S	N248S							
N76D	S103A	V104I	M222S	H249R								
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q236H	Q245R	N261D					
V68A	N76D	S103A	V104I	S141N	G159D	Q236H	Q245R	T255S				
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q236H	Q245R	R247H					
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A174V	N204D	Q236H	Q245R				
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	N204D	Q236H	Q245R					

V68A	N76D	S103A	V104I	A133V	G159D	N218D	Q236H	Q245R				
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R					
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A194I	V203A	Q236H	Q245R				
Q12R	N76D	S103A	V104I	M222S	Q245R							
N76D	S103A	V104I	A232V	Q245R								
S24T	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R				
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N252K					
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A			
Q12R	N76D	S103A	I104T	M222S	V244I	Q245R						
Q12R	N76D	S103A	M222S	P210T	Q245R							
Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	M222S	Q245R						
T22K	V68A	N76D	S103A	V104I								
V68A	N76D	S103A	V104I	N184D								
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R						
V68A	S103A	V104I	N140D	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N252K				
N43S	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N252K				
N43K	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R					
N43D	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N252K				
V68A	S87G	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N252K	R275S			
Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	M222S	Q245R	N248S	L262M				
Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	A215V	M222S	Q245R					
Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	M222S	V227A	Q245R	L262S				
Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	A215T	M222S	Q245R					
Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	M222S	Q245R	N261D					
N76D	S103A	I104T	S130T	M222S	Q245R							
Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	N218D	M222S	Q245R	L262S	N269D			
Q12R	S57P	N76D	S103A	I104T	S130T	M222S	Q245R	K251Q				
Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	R170S	N185D	M222S	N243D	Q245R			
Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	M222S	Q245R	V268A					
Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	M222S	P210S	Q245R					
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	L257V					
V68A	S103A	V104I	N116D	G159D	A232V	Q236H	Q245R					
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D					
R10C	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R					
V68A	S103A	V104I	G159D	V203E	A232V	Q236H	Q245R					

V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	K237E	Q245R					
V68A	N76D	I79N	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R				
V68A	S103A	V104I	G159D	N183D	A232V	Q236H	Q245R					
V68A	S103A	V104I	G159D	A174V	Q206L	A232V	Q236H	Q245R				
V68A	S103A	V104I	G159D	S188C	A232V	Q236H	Q245R					
V68A	S103A	V104I	G159D	A230T	A232V	Q236H	Q245R					
V68A	A98T	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R					
V68A	S103A	V104I	G159D	A215T	A232V	Q236H	Q245R					
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248S					
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R					
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	P210R	A232V	Q236H	Q245R				
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	L257V				
N76D	S103A	V104I	A232V	Q236H	Q245R	L257V						
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	L257V	R275H				
N76D	S103A	V104I	L257V	R275H								
V68A	S103A	V104I	G159D	T224A	A232V	Q236H	Q245R	L257V				
N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	L257V					
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Y209W	A232V	Q236H	Q245R				
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	G211R	A232V	Q236H	Q245R				
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	G211V	A232V	Q236H	Q245R				
Q12R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Y214L	A232V	Q236H	Q245R			
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A215R	A232V	Q236H	Q245R				
Q12R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R				
G20R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	S259G			
V68A	S87R	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	T260V			
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N261G				
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N261W				
N76D	S103A	V104I	A232V	Q236H	S242P	Q245R						
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	P210L	A232V	Q236H	Q245R				
Q12R	A48V	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R			
N76D	S103A	V104I	A232V	Q236H	Q245R							
N76D	S103A	V104I	G159D	Y192F	A232V	Q236H	Q245R					
N76D	S103A	V104I	V147I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248S	K251R			
Q12R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	A272S			
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	N183K	Q206L	A232V	Q236H	Q245R			
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	S256R				



V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q206R	A232V	Q236H	Q245R				
K27R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R				
V68A	N76D	S103A	V104I	N116T	G159D	R170S	N185S	A232V	Q236H	Q245R		
G61E	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
N43D	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	S212P	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	S99N	G159D	N184D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					
V68A	S103A	V104I	G159D	Y209W	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	Q109R	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
G20R	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	Y209F	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	N261D			
V68A	S103A	V104I	G159D	N185D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	P210R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	P210T	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	P210S	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	N185D	P210L	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
V68A	S103A	V104I	G159D	P210L	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	S212A	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	S212E	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	T213E	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	T213S	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
V68A	A103V	V104I	G159D	T213E	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	T213G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	A215V	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	A215R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	S216T	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	S216V	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	S216C	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
G20A	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	N173D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	K251V	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	Q206R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			



V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252F				
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252L				
P55S	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252F			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	T255V			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	S256N			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	S256E			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	S256R			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	T260R			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	L257R			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	G258D			
I8V	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	N269D		
V68A	S103A	V104I	N116S	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	T260E		
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	N261R			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	N261D			
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					
S103A	V104I	G159D	A232S	Q236H	Q245R	N248D	N252K					
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236R	Q245R	N248D	N252K				
N18S	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245V	N248D	N252K				
V68A	N76D	S101T	S103A	V104I	G159D	T213R	N218S	A232V	Q236H	Q245R	T260A	
V68A	S103A	V104I	G159D	A228V	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
T33S	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
V68A	N76D	E89D	S103A	V104I	G159D	P210L	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A	
G61E	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
S103A	V104I	G159D	V205I	P210I	A232V	Q236H	Q245R					
G61E	V68A	S103A	V104I	S130A	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
G61E	V68A	S103A	V104I	A133S	Q137R	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	
G61E	S103A	V104I	A133V	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248G	N252K				
V68A	S103A	V104I	G159D	N218S	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
G61E	V68A	S103A	V104I	G159D	S160V	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
S3L	G61E	V68A	N76D	S103A	V104I	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
G61E	V68A	S103A	V104I	G159D	S167F	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
G97E	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
A98D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				

S99E	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
S101E	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
S101G	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
G102A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
S103A	V104I	S106E	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
S103A	V104I	Q109E	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	N261R				
S103A	V104I	Q109R	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
N62D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
S103A	V104I	G159D	N184D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
S103A	V104I	G159D	S166D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
S103A	V104I	G159D	L217E	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
G20R	N62D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
N62D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S103A	V104I	G159D	Q206R	L217E	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
N62D	S103A	V104I	G159D	Q206R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S103A	V104I	S130G	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
S103A	V104I	P131V	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
K27N	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
T38G	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
T38A	N76D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A			
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A	E271G		
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Y209W	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A		
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	P210I	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A		
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	V205I	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A		
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	P210I	A232V	Q236H	Q245R	T260A			
V68A	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A				
N76D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A				
V68A	S103A	V104I	G159D	Y209W	A232V	Q236H	Q245R					
V68A	S103A	V104I	G159D	P210I	A232V	Q236H	Q245R					
V68A	S103A	V104I	G159D	A230V	A232V	Q236H	Q245R					
V68A	S103A	V104I	G159D	L126F	A232V	Q236H	Q245R					
V68A	S103A	V104I	G159D	V205I	A232V	Q236H	Q245R					
V68A	S103A	V104I	G159D	P210L	A232V	Q236H	Q245R					
S103A	V104I	G159D	A230V	Q236H	Q245R							
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	T260A					

S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R							
V68A	S103A	V104I	G159D	A174V	A232V	Q236H	Q245R	L257V				
V68A	S103A	V104I	G159D	A194S	A232V	Q236H	Q245R	L257V				
V68A	S103A	V104I	G159D	Y209W	A232V	Q236H	Q245R	L257V				
S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	L257V						
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A	N261 W		
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	L257V	N261W				
S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A					
S103A	V104I	G159D	P210I	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
S103A	V104I	G159D	Y209W	A232V	Q236H	Q245R	L257V					
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	P210L	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A		
Q12R	S103A	V104I	G159D	Y209W	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A			
S103A	V104I	Y209W	A232V	Q236H	Q245R	L257V						
S103A	V104I	G159D	V205I	P210I	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A			
S103A	V104I	G159D	V205I	Y209W	A232V	Q236H	Q245R	T260A				
V68A	S103A	V104I	G159D	V205I	Y209W	P210I	A232V	Q236H	Q245R			
S103A	V104I	G159D	V205I	Y209W	P210I	A232V	Q236H	Q245R	L257V			
S103A	V104I	G159D	V205I	Y209W	A232V	Q236H	Q245R	L257V				
V68A	S103A	V104I	G159D	V205I	Y209W	P210I	A232V	Q236H	Q245R	T260A		
S103A	V104I	G159D	V205I	Y209W	P210I	A232V	Q236H	Q245R				
S103A	V104I	G159D	V205I	P210I	A232V	Q236H	Q245R					
V68A	S103A	V104I	S128L	G159D	A232V	Q236H	Q245R					
A48V	S103A	V104I	G159D	A230V	Q236H	Q245R						
A48V	V68A	S103A	V104I	G159D	Y209W	A232V	Q236H	Q245R				
A48V	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
A48V	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	L257V	N261W			
G102A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
Q12R	G102A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
S101G	G102A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
A98L	G102A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
G102A	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S103A	V104I	P131V	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
S103A	V104I	G159D	N184S	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
S103A	V104I	G159D	N184G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				



S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	V244T	Q245R	N248D	N252K				
S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	V244A	Q245R	N248D	N252K				
N62D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	S256R		
Q12R	N62D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
S101G	S103A	V104I	G159D	N185D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S101G	S103A	V104I	G159D	Q206E	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S101G	S103A	V104I	G159D	T213Q	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
A98L	G102A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S101G	G102A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
A98L	G102A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
A98L	G102A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	N248D	N252K			
N62D	S103A	V104I	Q109R	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
N62D	S103A	V104I	G159D	S212G	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
N62D	S101G	S103A	V104I	G159D	S212G	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	
S103A	V104I	G159D	A232V	Q245R	N248D	N252K						
S103A	V104I	G159D	A230V	Q245R								
N62D	S103A	V104I	S130G	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
S101G	S103A	V104I	S130G	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S101G	S103A	V104I	S128G	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S101G	S103A	V104I	S128L	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
N62D	S101G	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
N62D	S103A	V104I	S128G	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
N62D	S103A	V104I	S128L	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
S101G	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	T260A			
S101G	S103A	V104I	P131V	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
A98V	S101G	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S99G	S101G	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S101G	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S101G	S103A	V104I	G159D	Y209W	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S101G	S103A	V104I	G159D	P210I	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S101G	S103A	V104I	G159D	V205I	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S101G	S103A	V104I	G159D	A230V	Q236H	Q245R						
S101G	S103A	V104I	G159D	A194P	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
N76D	S101G	S103A	V104I	G159D	A194P	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
S101G	S103A	V104I	G159D	A230V	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			

N62D	S103A	V104I	G159D	N185D	Q206E	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	E271Q
------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

Ještě preferovanější proteázové varianty užitečné v čistících prostředcích podle tohoto vynálezu zahrnují soubor substitucí vybraný ze skupiny obsahující substituční soubory z Tabulky I s výjimkou následujících substitučních souborů z Tabulky III.

Tabulka III

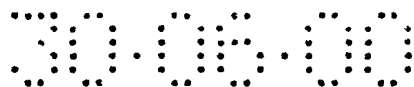
76	103	104	259							
76	86	103	104							
76	103	104	130							
76	99	103	104	204						
76	103	104	242							
76	103	104	104	182	198					
21	76	103	104	182						
76	103	104	119	137						
76	103	104	173	222						
61	76	103	104	222						
68	76	103	104	116	159	170	185	232	236	245

Ještě preferovanější proteázové varianty užitečné v čistících prostředcích podle tohoto vynálezu zahrnují soubor substitucí vybraný ze skupiny obsahující substituční soubory uvedené v Tabulce IV.

Tabulka IV

76	103	104	222	245						
76	103	104	222	249						
68	103	104	159	232	236	245	252			
68	76	103	104	159	213	232	236	245	260	
22	68	76	103	104						
68	103	104	159	232	236	245	248	252		
68	103	104	159	232	236	245				
68	103	104	140	159	232	236	245	252		
43	68	103	104	159	232	236	245	252		
43	68	103	104	159	232	236	245			
12	76	103	104	130	222	245	261			

76	103	104	130	222	245						
68	103	104	159	232	236	245	257				
68	76	103	104	159	210	232	236	245			
68	103	104	159	224	232	236	245	257			
76	103	104	159	232	236	245	257				
68	76	103	104	159	211	232	236	245			
12	68	76	103	104	159	214	232	236	245		
68	76	103	104	159	215	232	236	245			
12	68	76	103	104	159	232	236	245			
20	68	76	103	104	159	232	236	245	259		
68	76	87	103	104	159	232	236	245	260		
68	76	103	104	159	232	236	245	261			
12	48	68	76	103	104	159	232	236	245		
76	103	104	159	192	232	236	245				
76	103	104	147	159	232	236	245	248	251		
12	68	76	103	104	159	232	236	245	272		
68	76	103	104	159	183	206	232	236	245		
68	76	103	104	159	232	236	245	256			
68	76	103	104	159	206	232	236	245			
27	68	76	103	104	159	232	236	245			
68	103	104	159	212	232	236	245	248	252		
103	104	159	232	236	245	248	252				
68	103	104	159	209	232	236	245	248	252		
68	103	104	109	159	232	236	245	248	252		
20	68	103	104	159	232	236	245	248	252		
68	103	104	159	209	232	236	245	248	252		
68	103	104	159	210	232	236	245	248	252		
68	103	104	159	212	232	236	245	248	252		
68	103	104	159	213	232	236	245	248	252		
68	103	104	213	232	236	245	248	252			
68	103	104	159	215	232	236	245	248	252		
68	103	104	159	216	232	236	245	248	252		

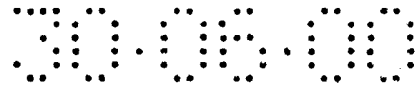


20	68	103	104	159	232	236	245	248	252		
68	103	104	159	232	236	245	248	252	255		
68	103	104	159	232	236	245	248	252	256		
68	103	104	159	232	236	245	248	252	260		
68	103	104	159	228	232	236	245	248	252		
68	76	89	103	104	159	210	213	232	236	245	260
68	103	104	159	218	232	236	245	248	252		

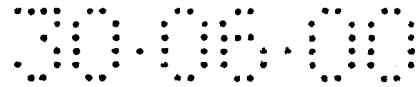
Ještě preferovanější proteázové varianty užitečné v čistících prostředcích podle tohoto vynálezu zahrnují soubor substitucí vybraný ze skupiny obsahující substituční soubory uvedené v Tabulce V.

Tabulka V

V68A	S103A	V104I	G159D	A228V	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
V68A	S103A	V104I	G159D	N218S	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
G20R	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
V68A	N76D	E89D	S103A	V104I	G159D	P210L	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	S256R		
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	T260R		
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	T255V		
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	S256N		
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252L			
V68A	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
V68A	S103A	V104I	G159D	A215V	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
V68A	S103A	V104I	G159D	A215R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
V68A	S103A	V104I	G159D	S216T	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
V68A	S103A	V104I	G159D	S216V	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
V68A	S103A	V104I	T213S	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	P210L	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
V68A	S103A	V104I	G159D	S212C	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
V68A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
V68A	S103A	V104I	G159D	Y209W	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
V68A	S103A	V104I	Q109R	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
G20R	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
V68A	S103A	V104I	G159D	Y209F	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
Q12R	N76D	S103A	I104T	S130T	M222S	Q245R	N261D				
N76D	S103A	I104T	S130T	M222S	Q245R						
N76D	S103A	V104I	M222S	H249R							
N76D	S103A	V104I	M222S	Q245R							
N76D	S103A	V104I	G159D	Y192F	A232V	Q236H	Q245R				
N76D	S103A	V104I	V147I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248S	K251R		



Q12R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	A272S		
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	N183K	Q206L	A232V	Q236H	Q245R		
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	S256R			
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q206R	A232V	Q236H	Q245R			
K27R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R			
Q12R	A48V	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R		
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N261W			
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	G211R	A232V	Q236H	Q245R			
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	G211V	A232V	Q236H	Q245R			
Q12R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Y214L	A232V	Q236H	Q245R		
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A215R	A232V	Q236H	Q245R			
Q12R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R			
G20R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	S259G		
V68A	N76D	S87R	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	T260V		
N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	L257V				
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A		
T22K	V68A	N76D	S103A	V104I							
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	P210R	A232V	Q236H	Q245R			
V68A	S103A	V104I	G159D	S212P	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
V68A	S103A	V104I	G159D	T224A	A232V	Q236H	Q245R	L257V			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N252S				
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N252K				
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R					
V68A	S103A	V104I	N140D	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N252K			
N43S	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N252K			
N43K	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R				
N43D	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	L257V				



Vysoce preferované proteázové varianty užitečné v čistících prostředcích podle tohoto vynálezu zahrnují soubor substitucí vybraný ze skupiny obsahující:

12/102/103/104/159/212/232/236/245/248/252; 12/76/103/104/130/170/185/222/243/245;
 12/76/103/104/130/222/245/261; 12/76/103/104/130/222/245;
 12/76/103/104/222/245;
 61/68/103/104/159/232/236/245/248/252; 62/103/104/159/213/232/236/245/248/252;
 62/103/104/109/159/213/232/236/245/248/252; 62/103/104/159/232/236/245/248/252;
 62/101/103/104/159/212/213/232/236/245/248/252;
 62/103/104/130/159/213/232/236/245/248/252; 68/103/104/159/232/236/245/248/252/270;
 68/103/104/159/185/232/236/245/248/252; 68/103/104/159/210/232/236/245/248/252;
 68/103/104/159/185/210/232/236/245/248/252; 68/103/104/159/213/232/236/245/248/252;
 68/103/104/159/230/232/236/245; 68/76/103/104/159/209/232/236/245;
 68/103/104/232/236/245/248/257/275; 68/103/104/213/232/236/245/248/252;
 68/103/104/159/232/236/245/248/252; 68/103/104/159/209/232/236/245;
 68/76/103/104/159/236; 68/76/103/104/159/236/245;
 68/76/103/104/159/232/236/245; 68/103/104/159/232/236/245/252;
 68/103/104/159/232/236/245; 68/103/104/159/232/236/245/257;
 68/76/103/104/159/211/232/236/245; 68/76/103/104/159/215/232/236/245;
 68/103/104/159/210/232/236/245; 68/103/104/159/213/232/236/245/260;
 68/76/103/104/159/213/232/236/245/260; 68/103/104/159/236;
 68/76/103/104/159/210/232/236/245/260; 68/103/104/159/236/245;
 68/103/104/159/183/232/236/245/248/252; 68/76/103/104/159/236/245;
 68/103/104/232/236/245/257/275; 68/103/104/159/213/232/236/245;
 76/103/222/245; 76/103/104/222/245;
 76/103/104/159/232/236/245;
 76/103/104/159/213/232/236/245/260; 76/103/104/159;
 76/103/104/131/159/232/236/245/248/252; 97/103/104/159/232/236/245/248/252;
 98/102/103/104/159/212/232/236/245/248/252; 98/103/104/159/232/236/245/248/252;
 101/103/104/159/232/236/245/248/252; 102/103/104/159/232/236/245/248/252;
 103/104/159/232/236/245; 103/104/159/232/236/245/248/252;
 103/104/159/205/209/232/236/245/257 103/104/159/232/245/248/252;
 103/104/159/205/209/210/232/236/245/257; 103/104/159/213/232/236/245/248/252;
 103/104/159/217/232/236/245/248/252; 103/104/130/159/232/236/245/248/252;
 103/104/159/230/236/245; 103/104/159/236/245;
 103/104/159/248/252/270; 103/104/131/159/232/236/245/248/252;
 103/104/159/205/209/232/236/245; and 103/104/159/232/236/245/257.



Více vysoce preferované proteázové varianty užitečné v čistících prostředcích podle tohoto vynálezu zahrnují soubor substitucí vybraný ze skupiny obsahující:

12R/76D/103A/104T/130T/222S/245R;
12R/76D/103A/104I/222S/245R;
12R/102A/103A/104I/159D/212G/232V/236H/245R/248D/252K;
12R/76D/103A/104T/130G/222S/245R/261D;
12R/76D/103A/104T/130G/170S/185D/222S/243D/245R;
61E/68A/103A/104I/159D/232V/236H/245R/248D/252K;
62D/103A/104I/109R/159D/213R/232V/236H/245R/248D/252K;
62D/103A/104I/159D/213R/232V/236H/245R/248D/252K;
62D/103A/104I/159D/232V/236H/245R/248D/252K;
62D/103A/104I/130G/159D/213R/232V/236H/245R/248D/252K;
62D/101G/103A/104I/159D/212G/213R/232V/236H/245R/248D/252K;
68A/103A/104I/159D/232V/236H/245R/248D/252K/270A;
68A/76D/103A/104I/159D/213R/232V/236H/245R/260A;
68A/103A/104I/159D/236H;
68A/103A/104I/159D/236H/245R;
68A/76D/103A/104I/159D/210I/232V/236H/245R/260A;
68A/103A/104I/159D/183D/232V/236H/245R/248D/252K;
68A/103A/104I/159D/209W/232V/236H/245R;
68A/76D/103A/104I/159D/211R/232V/236H/245R;
68A/76D/103A/104I/159D/215R/232V/236H/245R;
68A/103A/104I/159D/213R/232V/236H/245R/260A;
68A/76D/103A/104I/159D/236H;
68A/76D/103A/104I/159D/236H/245R;
68A/76D/103A/104I/159D/232V/236H/245R;
68A/103A/104I/159D/232V/236H/245R/252K;
68A/103A/104I/159D/232V/236H/245R;
68A/103A/104I/159D/232V/236H/245R/257V;
68A/103A/104I/159D/185D/232V/236H/245R/248D/252K;
68A/103A/104I/159D/210L/232V/236H/245R/248D/252K;
68A/103A/104I/159D/185D/210L/232V/236H/245R/248D/252K;
68A/103A/104I/159D/213E/232V/236H/245R/248D/252K;
68A/103A/104I/159D/230V/232V/236H/245R;

68A/76D/103A/104I/159D/209W/232V/236H/245R;
 68A/103A/104I/232V/236H/245R/248D/257V/275H;
 68A/103A/104I/232V/236H/245R/257V/275H;
 68A/103A/104I/213E/232V/236H/245R/248D/252K;
 68A/103A/104I/159D/232V/236H/245R/248D/252K;
 68A/103A/104I/159D/210I/232V/236H/245R;
 68A/103A/104I/159D/210L/232V/236H/245R;
 68A/103A/104I/159D/213G/232V/236H/245R;
 76D/103A/222S/245R;
 76D/103A/104I/222S/245R;
 76D/103A/104I/159D/232V/236H/245R;
 76D/103A/104I/159D;
 76D/103A/104I/131V/159D/232V/236H/245R/248D/252K;
 76D/103A/104I/159D/213R/232V/236H/245R/260A;
 97E/103A/104I/159D/232V/236H/245R/248D/252K;
 98L/103A/104I/159D/232V/236H/245R/248D/252K;
 98L/102A/103A/104I/159D/212G/232V/236H/245R/248D/252K;
 101G/103A/104I/159D/232V/236H/245R/248D/252K;
 102A/103A/104I/159D/232V/236H/245R/248D/252K;
 103A/104I/159D/232V/236H/245R/248D/252K;
 103A/104I/159D/213R/232V/236H/245R/248D/252K;
 103A/104I/130G/159D/232V/236H/245R/248D/252K;
 103A/104I/159D/230V/236H/245R;
 103A/104I/159D/217E/232V/236H/245R/248D/252K;
 103A/104I/159D/236H/245R;
 103A/104I/159D/248D/252K/270V;
 103A/104I/159D/232V/236H/245R;
 103A/104I/159D/205I/209W/232V/236H/245R;
 103A/104I/159D/232V/236H/245R/257V;
 103A/104I/159D/205I/209W/232V/236H/245R/257V;
 103A/104I/131V/159D/232V/236H/245R/248D/252K;
 103A/104I/159D/205I/209W/210I/232V/236H/245R/257V; and
 103A/104I/159D/232V/245R/248D/252K.

Dokonce ještě více vysoce preferované proteázové varianty užitečné v čistících
 prostředcích podle tohoto vynálezu zahrnují soubor substitucí vybraný ze skupiny obsahující:



12/76/103/104/130/222/245/261;
 62/103/104/159/232/236/245/248/252;
 62/103/104/159/213/232/236/245/248/252;
 62/101/103/104/159/212/213/232/236/245/248/252;
 68/103/104/159/232/236/245;
 68/103/104/159/230/232/236/245;
 68/103/104/159/209/232/236/245;
 68/103/104/159/232/236/245/257;
 68/76/103/104/159/213/232/236/245/260;
 68/103/104/159/213/232/236/245/248/252;
 68/103/104/159/183/232/236/245/248/252;
 68/103/104/159/185/232/236/245/248/252;
 68/103/104/159/185/210/232/236/245/248/252;
 68/103/104/159/210/232/236/245/248/252;
 68/103/104/159/213/232/236/245;
 98/103/104/159/232/236/245/248/252;
 98/102/103/104/159/212/232/236/245/248/252;
 101/103/104/159/232/236/245/248/252;
 102/103/104/159/232/236/245/248/252;
 103/104/159/230/236/245;
 103/104/159/232/236/245/248/252;
 103/104/159/217/232/236/245/248/252;
 103/104/130/159/232/236/245/248/252;
 103/104/131/159/232/236/245/248/252;
 103/104/159/213/232/236/245/248/252; a
 103/104/159/232/236/245.

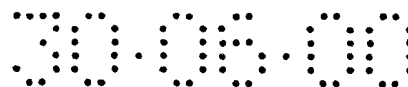
Nejvíce preferované proteázové varianty užitečné v čistících prostředcích podle tohoto vynálezu zahrnují soubor substitucí vybraný ze skupiny obsahující:

12R/76D/103A/104T/130T/222S/245R/261D;
 62D/103A/104I/159D/232V/236H/245R/248D/252K;
 62D/103A/104I/159D/213R/232V/236H/245R/248D/252K;
 68A/103A/104I/159D/209W/232V/236H/245R;
 68A/76D/103A/104I/159D/213R/232V/236H/245R/260A;
 68A/103A/104I/159D/213E/232V/236H/245R/248D/252K;
 68A/103A/104I/159D/183D/232V/236H/245R/248D/252K;

68A/103A/104I/159D/232V/236H/245R;
 68A/103A/104I/159D/230V/232V/236H/245R;
 68A/103A/104I/159D/232V/236H/245R/257V;
 68A/103A/104I/159D/213G/232V/236H/245R/248D/252K;
 68A/103A/104I/159D/185D/232V/236H/245R/248D/252K;
 68A/103A/104I/159D/185D/210L/232V/236H/245R/248D/252K;
 68A/103A/104I/159D/210L/232V/236H/245R/248D/252K;
 68A/103A/104I/159D/213G/232V/236H/245R;
 98L/103A/104I/159D/232V/236H/245R/248D/252K;
 98L/102A/103A/104I/159D/212G/232V/236H/245R/248D/252K;
 101G/103A/104I/159D/232V/236H/245R/248D/252K;
 102A/103A/104I/159D/232V/236H/245R/248D/252K;
 103A/104I/159D/230V/236H/245R;
 103A/104I/159D/232V/236H/245R/248D/252K;
 103A/104I/159D/217E/232V/236H/245R/248D/252K;
 103A/104I/130G/159D/232V/236H/245R/248D/252K;
 103A/104I/131V/159D/232V/236H/245R/248D/252K;
 103A/104I/159D/213R/232V/236H/245R/248D/252K; and
 103A/104I/159D/232V/236H/245R.

V dalším preferovaném provedení proteázové varianty, které jsou proteázové enzymy užitečné v čistících prostředcích podle tohoto vynálezu, zahrnují proteázové varianty zahrnující substituci aminokyselinového zbytku s jinou přírodní aminokyselinou v jedné nebo více polohách odpovídajících pozicím 62, 212, 230, 232, 252 a 257 subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens*.

I když může být použita libovolná z výše uvedených aminokyselinových substitucí, preferované proteázové variantní enzymy užitečné v čistících prostředcích podle tohoto vynálezu zahrnují substituce, vypuštění nebo inserce aminokyselinového zbytku v následujících kombinacích:



- (1) proteázová varianta zahrnující substituci aminokyselinových zbytků v poloze 62 a jedné nebo více z následujících poloh 103, 104, 109, 159, 213, 232, 236, 245, 248 a 252;
- (2) proteázová varianta zahrnující substituci aminokyselinových zbytků v poloze 212 a jedné nebo více z následujících poloh 12, 98, 102, 103, 104, 159, 232, 236, 245, 248 a 252;
- (3) proteázová varianta zahrnující substituci aminokyselinových zbytků v poloze 230 a jedné nebo více z následujících poloh 68, 103, 104, 159, 232, 236 a 245;
- (4) proteázová varianta zahrnující substituci aminokyselinových zbytků v poloze 232 a jedné nebo více z následujících poloh 12, 61, 62, 68, 76, 97, 98, 101, 102, 103, 104, 109, 130, 131, 159, 183, 185, 205, 209, 210, 212, 213, 217, 230, 236, 245, 248, 252, 257, 260, 270 a 275;
- (5) proteázová varianta zahrnující substituci aminokyselinových zbytků v poloze 212 a jedné nebo více z následujících poloh 103, 104, 236 a 245;
- (6) proteázová varianta zahrnující substituci aminokyselinových zbytků v poloze 232 a 103 a jedné nebo více z následujících poloh 12, 61, 62, 68, 76, 97, 98, 101, 102, 103, 104, 109, 130, 131, 159, 183, 185, 205, 209, 210, 212, 213, 217, 230, 236, 245, 248, 252, 257, 260, 270 a 275;
- (7) proteázová varianta zahrnující substituci aminokyselinových zbytků v poloze 232 a 104 a jedné nebo více z následujících poloh 12, 61, 62, 68, 76, 97, 98, 101, 102, 103, 104, 109, 130, 131, 159, 183, 185, 205, 209, 210, 212, 213, 217, 230, 236, 245, 248, 252, 257, 260, 270 a 275;
- (8) proteázová varianta zahrnující substituci aminokyselinových zbytků v poloze 232 a 236 a jedné nebo více z následujících poloh 12, 61, 62, 68, 76, 97, 98, 101, 102, 103, 104, 109, 130, 131, 159, 183, 185, 205, 209, 210, 212, 213, 217, 230, 236, 245, 248, 252, 257, 260, 270 a 275;
- (9) proteázová varianta zahrnující substituci aminokyselinových zbytků v poloze 232 a 245 a jedné nebo více z následujících poloh 12, 61, 62, 68, 76, 97, 98, 101, 102, 103, 104, 109, 130, 131, 159, 183, 185, 205, 209, 210, 212, 213, 217, 230, 236, 245, 248, 252, 257, 260, 270 a 275;
- (10) proteázová varianta zahrnující substituci aminokyselinových zbytků v poloze 232, 103, 104, 236 a 245 a jedné nebo více z následujících poloh 12, 61, 62, 68, 76, 97, 98, 101, 102, 103, 104, 109, 130, 131, 159, 183, 185, 205, 209, 210, 212, 213, 217, 230, 236, 245, 248, 252, 257, 260, 270 a 275;
- (11) proteázová varianta zahrnující substituci aminokyselinových zbytků v poloze 252 a jedné nebo více z následujících poloh 12, 61, 62, 68, 76, 97, 98, 101, 102, 103, 104, 109, 130, 131, 159, 183, 185, 210, 212, 213, 217, 232, 236, 245, 248 a 270;
- (12) proteázová varianta zahrnující substituci aminokyselinových zbytků v poloze 252 a jedné nebo více z následujících poloh 103, 104, 236 a 245;



(13) proteázová varianta zahrnující substituci aminokyselinových zbytků v poloze 252 a 103 a jedné nebo více z následujících poloh 12, 61, 62, 68, 97, 98, 101, 102, 103, 104, 109, 130, 131, 159, 183, 185, 210, 212, 213, 217, 232, 236, 245, 248 a 270;

(14) proteázová varianta zahrnující substituci aminokyselinových zbytků v poloze 252 a 104 a jedné nebo více z následujících poloh 12, 61, 62, 68, 97, 98, 101, 102, 103, 104, 109, 130, 131, 159, 183, 185, 210, 212, 213, 217, 232, 236, 245, 248 a 270;

(15) proteázová varianta zahrnující substituci aminokyselinových zbytků v poloze 252 a 236 a jedné nebo více z následujících poloh 12, 61, 62, 68, 97, 98, 101, 102, 103, 104, 109, 130, 131, 159, 183, 185, 210, 212, 213, 217, 232, 236, 245, 248 a 270;

(16) proteázová varianta zahrnující substituci aminokyselinových zbytků v poloze 252 a 245 a jedné nebo více z následujících poloh 12, 61, 62, 68, 97, 98, 101, 102, 103, 104, 109, 130, 131, 159, 183, 185, 210, 212, 213, 217, 232, 236, 245, 248 a 270;

(17) proteázová varianta zahrnující substituci aminokyselinových zbytků v poloze 252, 103, 104, 236 a 245 a jedné nebo více z následujících poloh 12, 61, 62, 68, 97, 98, 101, 102, 103, 104, 109, 130, 131, 159, 183, 185, 210, 212, 213, 217, 232, 236, 245, 248 a 270;

(18) proteázová varianta zahrnující substituci aminokyselinových zbytků v poloze 257 a jedné nebo více z následujících poloh 68, 103, 104, 205, 209, 210, 232, 236, 245 a 275;

Preferovanější proteázové varianty užitečné v čistících přípravcích podle tohoto vynálezu zahrnují substituční soubor (jeden substituční soubor na řádku v následující Tabulce VI) vybraný ze skupiny obsahující:

Tabulka VI

76	103	104	212	271								
76	103	104	252	261								
76	103	104	212	258								
4	76	103	104	159	217	252						
12	62	76	103	104	159							
76	103	104	212	268	271							
76	87	103	104	212	271							
76	103	104	212	245	271							
76	103	104	134	141	212	271						
76	103	104	212	236	243	271						
20	62	76	103	104								
68	76	103	104	159	232	236	245					
76	103	104	232	245								
24	68	76	103	104	159	232	236	245				

68	103	104	159	232	236	245	252					
68	76	103	104	159	213	232	236	245	260			
68	103	104	159	232	236	245	248	252				
68	103	104	159	232	236	245						
68	103	104	140	159	232	236	245	252				
43	68	103	104	159	232	236	245	252				
43	68	103	104	159	232	236	245					
43	68	103	104	159	232	236	245	252				
68	87	103	104	159	232	236	245	252	275			
68	103	104	159	232	236	245	257					
68	103	104	116	159	232	236	245					
68	103	104	159	232	236	245	248					
10	68	103	104	159	232	236	245					
68	103	104	159	203	232	236	245					
68	103	104	159	232	236	237	245					
68	76	79	103	104	159	232	236	245				
68	103	104	159	183	232	236	245					
68	103	104	159	174	206	232	236	245				
68	103	104	159	188	232	236	245					
68	103	104	159	230	232	236	245					
68	98	103	104	159	232	236	245					
68	103	104	159	215	232	236	245					
68	103	104	159	232	236	245	248					
68	76	103	104	159	232	236	245					
68	76	103	104	159	210	232	236	245				
68	76	103	104	159	232	236	245	257				
76	103	104	232	236	245	257						
68	103	104	159	232	236	245	257	275				
76	103	104	257	275								
68	103	104	159	224	232	236	245	257				
76	103	104	159	232	236	245	257					
68	76	103	104	159	209	232	236	245				
68	76	103	104	159	211	232	236	245				
12	68	76	103	104	159	214	232	236	245			
68	76	103	104	159	215	232	236	245				
12	68	76	103	104	159	232	236	245				

20	68	76	103	104	159	232	236	245	259			
68	87	76	103	104	159	232	236	245	260			
68	76	103	104	159	232	236	245	261				
76	103	104	232	236	242	245						
68	76	103	104	159	210	232	236	245				
12	48	68	76	103	104	159	232	236	245			
76	103	104	232	236	245							
76	103	104	159	192	232	236	245					
76	103	104	147	159	232	236	245	248	251			
12	68	76	103	104	159	232	236	245	272			
68	76	103	104	159	183	206	232	236	245			
68	76	103	104	159	232	236	245	256				
68	76	103	104	159	206	232	236	245				
27	68	76	103	104	159	232	236	245				
68	76	103	104	116	159	170	185	232	236	245		
61	68	103	104	159	232	236	245	248	252			
43	68	103	104	159	232	236	245	248	252			
68	103	104	159	212	232	236	245	248	252			
68	103	104	99	159	184	232	236	245	248	252		
103	104	159	232	236	245	248	252					
68	103	104	159	209	232	236	245	248	252			
68	103	104	109	159	232	236	245	248	252			
20	68	103	104	159	232	236	245	248	252			
68	103	104	159	209	232	236	245	248	252			
68	103	104	159	232	236	245	248	252	261			
68	103	104	159	185	232	236	245	248	252			
68	103	104	159	210	232	236	245	248	252			
68	103	104	159	185	210	232	236	245	248	252		
68	103	104	159	212	232	236	245	248	252			
68	103	104	159	213	232	236	245	248	252			
68	103	104	213	232	236	245	248	252				
68	103	104	159	215	232	236	245	248	252			
68	103	104	159	216	232	236	245	248	252			
20	68	103	104	159	232	236	245	248	252			
68	103	104	159	173	232	236	245	248	252			
68	103	104	159	232	236	245	248	251	252			

30.05.00

68	103	104	159	206	232	236	245	248	252			
68	103	104	159	232	236	245	248	252				
55	68	103	104	159	232	236	245	248	252			
68	103	104	159	232	236	245	248	252	255			
68	103	104	159	232	236	245	248	252	256			
68	103	104	159	232	236	245	248	252	260			
68	103	104	159	232	236	245	248	252	257			
68	103	104	159	232	236	245	248	252	258			
8	68	103	104	159	232	236	245	248	252	269		
68	103	104	116	159	232	236	245	248	252	260		
68	103	104	159	232	236	245	248	252	261			
58	103	104	159	232	236	245	248	252	261			
58	76	103	104	159	232	236	245	248	252			
58	103	104	232	236	245	248	252					
103	104	159	232	236	245	248	252					
8	103	104	159	232	236	245	248	252				
3	68	103	104	159	232	236	245	248	252			
3	103	104	159	232	236	245	248	252				
1	76	101	103	104	159	213	218	232	236	245	260	
	103	104	159	228	232	236	245	248	252			
	68	76	103	104	159	232	236	245	248	252		
	76	89	103	104	159	210	213	232	236	245	260	
	68	76	103	104	159	232	236	245	248	252		
	104	159	205	210	232	236	245					
	68	103	104	130	159	232	236	245	248	252		
	68	103	104	133	137	159	232	236	245	248	252	
	103	104	133	159	232	236	245	248	252			
	103	104	159	232	236	245	248	252				
	103	104	159	218	232	236	245	248	252			
	68	103	104	159	160	232	236	245	248	252		
	61	68	76	103	104	232	236	245	248	252		
	68	103	104	159	167	232	236	245	248	252		
	103	104	159	232	236	245	248	252				
	103	104	159	232	236	245	248	252				
	103	104	159	232	236	245	248	252				
	103	104	159	232	236	245	248	252				

102	103	104	159	232	236	245	248	252				
103	104	106	159	232	236	245	248	252				
103	104	109	159	232	236	245	248	252				
103	104	159	232	236	245	248	252	261				
62	103	104	159	232	236	245	248	252				
103	104	159	184	232	236	245	248	252				
103	104	159	166	232	236	245	248	252				
103	104	159	217	232	236	245	248	252				
20	62	103	104	159	213	232	236	245	248	252		
62	103	104	159	213	232	236	245	248	252			
103	104	159	206	217	232	236	245	248	252			
62	103	104	159	206	232	236	245	248	252			
103	104	130	159	232	236	245	248	252				
103	104	131	159	232	236	245	248	252				
27	103	104	159	232	236	245	248	252				
38	103	104	159	232	236	245	248	252				
38	76	103	104	159	213	232	236	245	260			
68	76	103	104	159	213	232	236	245	260	271		
68	76	103	104	159	209	213	232	236	245	260		
68	76	103	104	159	210	213	232	236	245	260		
68	76	103	104	159	205	213	232	236	245	260		
68	76	103	104	159	210	232	236	245	260			
68	103	104	159	213	232	236	245	260				
76	103	104	159	213	232	236	245	260				
68	103	104	159	209	232	236	245					
68	103	104	159	210	232	236	245					
68	103	104	159	230	232	236	245					
68	103	104	159	126	232	236	245					
68	103	104	159	205	232	236	245					
68	103	104	159	210	232	236	245					
103	104	159	230	236	245							
68	103	104	159	232	236	245	260					
103	104	159	232	236	245							
68	103	104	159	174	232	236	245	257				
68	103	104	159	194	232	236	245	257				
68	103	104	159	209	232	236	245	257				

30.05.00

103	104	159	232	236	245	257						
68	76	103	104	159	213	232	236	245	260	261		
68	103	104	159	232	236	245	257	261				
103	104	159	213	232	236	245	260					
103	104	159	210	232	236	245	248	252				
103	104	159	209	232	236	245	257					
68	76	103	104	159	210	213	232	236	245	260		
12	103	104	159	209	213	232	236	245	260			
103	104	209	232	236	245	257						
103	104	159	205	210	213	232	236	245	260			
103	104	159	205	209	232	236	245	260				
68	103	104	159	205	209	210	232	236	245			
103	104	159	205	209	210	232	236	245	257			
103	104	159	205	209	232	236	245	257				
68	103	104	159	205	209	210	232	236	245	260		
103	104	159	205	209	210	232	236	245				
103	104	159	209	210	232	236	245					
103	104	159	205	210	232	236	245					
68	103	104	128	159	232	236	245					
48	103	104	159	230	236	245						
48	68	103	104	159	209	232	236	245				
48	68	103	104	159	232	236	245	248	252			
48	68	103	104	159	232	236	245	257	261			
102	103	104	159	212	232	236	245	248	252			
12	102	103	104	159	212	232	236	245	248	252		
101	102	103	104	159	212	232	236	245	248	252		
98	102	103	104	159	212	232	236	245	248	252		
102	103	104	159	213	232	236	245	248	252			
103	104	131	159	232	236	245	248	252				
103	104	159	184	232	236	245	248	252				
103	104	159	232	236	244	245	248	252				
62	103	104	159	213	232	236	245	248	252	256		
12	62	103	104	159	213	232	236	245	248	252		
101	103	104	159	185	232	236	245	248	252			
101	103	104	159	206	232	236	245	248	252			
101	103	104	159	213	232	236	245	248	252			

98	102	103	104	159	232	236	245	248	252			
101	102	103	104	159	232	236	245	248	252			
98	102	103	104	159	212	232	236	245	248	252		
98	102	103	104	159	212	232	236	248	252			
62	103	104	109	159	213	232	236	245	248	252		
62	103	104	159	212	213	232	236	245	248	252		
62	101	103	104	159	212	213	232	236	245	248	252	
103	104	159	232	245	248	252						
103	104	159	230	245								
62	103	104	130	159	213	232	236	245	248	252		
101	103	104	130	159	232	236	245	248	252			
101	103	104	128	159	232	236	245	248	252			
62	101	103	104	159	213	232	236	245	248	252		
62	103	104	128	159	213	232	236	245	248	252		
62	103	104	128	159	213	232	236	245	248	252		
101	103	104	159	232	236	245	248	252	260			
101	103	104	131	159	232	236	245	248	252			
98	101	103	104	159	232	236	245	248	252			
99	101	103	104	159	232	236	245	248	252			
101	103	104	159	212	232	236	245	248	252			
101	103	104	159	209	232	236	245	248	252			
101	103	104	159	210	232	236	245	248	252			
101	103	104	159	205	232	236	245	248	252			
101	103	104	159	230	236	245						
101	103	104	159	194	232	236	245	248	252			
76	101	103	104	159	194	232	236	245	248	252		
101	103	104	159	230	232	236	245	248	252			
62	103	104	159	185	206	213	232	236	245	248	252	271

Ještě preferovanější proteázové varianty užitečné v čistících přípravcích podle tohoto vynálezu zahrnují substituční soubor (jeden substituční soubor na řádce následující Tabulky VII) vybraný ze skupiny obsahující:

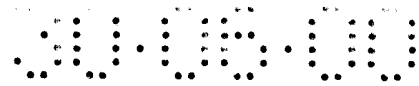
Tabulka VII

N76D	S103A	V104I	S212P	E271V								
------	-------	-------	-------	-------	--	--	--	--	--	--	--	--

N76D	S103A	V104I	N252K	N261Y								
N76D	S103A	V104I	S212P	G258R								
V4E	N76D	S103A	V104I	G159D	L217E	N252D						
Q12H	N62H	N76D	S103A	V104I	G159D							
N76D	S103A	V104I	S212P	V268F	E271V							
N76D	S87R	S103A	V104I	S212P	E271V							
N76D	S103A	V104I	S212P	Q245L	E271V							
N76D	S103A	V104I	T134S	S141N	S212P	E271V						
N76D	S103A	V104I	S212P	Q236L	N243S	E271V						
G20V	N62S	N76D	S103A	V104I								
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R					
N76D	S103A	V104I	A232V	Q245R								
S24T	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R				
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N252K					
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R						
V68A	S103A	V104I	N140D	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N252K				
N43S	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N252K				
N43K	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R					
N43D	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N252K				
V68A	S87G	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N252K	R275S			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	L257V					
V68A	S103A	V104I	N116D	G159D	A232V	Q236H	Q245R					
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D					
R10C	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R					
V68A	S103A	V104I	G159D	V203E	A232V	Q236H	Q245R					
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	K237E	Q245R					
V68A	N76D	I79N	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R				
V68A	S103A	V104I	G159D	N183D	A232V	Q236H	Q245R					
V68A	S103A	V104I	G159D	A174V	Q206L	A232V	Q236H	Q245R				
V68A	S103A	V104I	G159D	S188C	A232V	Q236H	Q245R					
V68A	S103A	V104I	G159D	A230T	A232V	Q236H	Q245R					
V68A	A98T	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R					
V68A	S103A	V104I	G159D	A215T	A232V	Q236H	Q245R					
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248S					



V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R					
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	P210R	A232V	Q236H	Q245R				
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	L257V				
N76D	S103A	V104I	A232V	Q236H	Q245R	L257V						
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	L257V	R275H				
N76D	S103A	V104I	L257V	R275H								
V68A	S103A	V104I	G159D	T224A	A232V	Q236H	Q245R	L257V				
N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	L257V					
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Y209W	A232V	Q236H	Q245R				
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	G211R	A232V	Q236H	Q245R				
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	G211V	A232V	Q236H	Q245R				
Q12R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Y214L	A232V	Q236H	Q245R			
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A215R	A232V	Q236H	Q245R				
Q12R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R				
G20R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	S259G			
V68A	S87R	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	T260V			
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N261G				
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N261W				
N76D	S103A	V104I	A232V	Q236H	S242P	Q245R						
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	P210L	A232V	Q236H	Q245R				
Q12R	A48V	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R			
N76D	S103A	V104I	A232V	Q236H	Q245R							
N76D	S103A	V104I	G159D	Y192F	A232V	Q236H	Q245R					
N76D	S103A	V104I	V147I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248S	K251R			
Q12R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	A272S			
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	N183K	Q206L	A232V	Q236H	Q245R			
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	S256R				
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q206R	A232V	Q236H	Q245R				
K27R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R				
V68A	N76D	S103A	V104I	N116T	G159D	R170S	N185S	A232V	Q236H	Q245R		
G61E	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
N43D	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	S212P	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	S99N	G159D	N184D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					
V68A	S103A	V104I	G159D	Y209W	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			

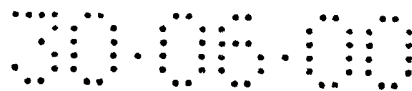


V68A	S103A	V104I	Q109R	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
G20R	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	Y209F	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	N261D			
V68A	S103A	V104I	G159D	N185D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	P210R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	P210T	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	P210S	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	N185D	P210L	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
V68A	S103A	V104I	G159D	P210L	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	S212A	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	S212E	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	T213E	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	T213S	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
V68A	A103V	V104I	G159D	T213E	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	T213G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	A215V	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	A215R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	S216T	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	S216V	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	S216C	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
G20A	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	N173D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	K251V	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	Q206R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252F				
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252L				
P55S	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252F			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	T255V			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	S256N			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	S256E			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	S256R			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	T260R			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	L257R			

V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	G258D			
I8V	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	N269D		
V68A	S103A	V104I	N116S	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	T260E		
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	N261R			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	N261D			
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K					
S103A	V104I	G159D	A232S	Q236H	Q245R	N248D	N252K					
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236R	Q245R	N248D	N252K				
N18S	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245V	N248D	N252K				
V68A	N76D	S101T	S103A	V104I	G159D	T213R	N218S	A232V	Q236H	Q245R	T260A	
V68A	S103A	V104I	G159D	A228V	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
T33S	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
V68A	N76D	E89D	S103A	V104I	G159D	P210L	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A	
G61E	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
S103A	V104I	G159D	V205I	P210I	A232V	Q236H	Q245R					
G61E	V68A	S103A	V104I	S130A	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
G61E	V68A	S103A	V104I	A133S	Q137R	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	
G61E	S103A	V104I	A133V	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248G	N252K				
V68A	S103A	V104I	G159D	N218S	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
G61E	V68A	S103A	V104I	G159D	S160V	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
S3L	G61E	V68A	N76D	S103A	V104I	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
G61E	V68A	S103A	V104I	G159D	S167F	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
G97E	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
A98D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
S99E	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
S101E	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
S101G	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
G102A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
S103A	V104I	S106E	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
S103A	V104I	Q109E	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	N261R				
S103A	V104I	Q109R	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
N62D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				

S103A	V104I	G159D	N184D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
S103A	V104I	G159D	S166D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
S103A	V104I	G159D	L217E	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
G20R	N62D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
N62D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S103A	V104I	G159D	Q206R	L217E	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
N62D	S103A	V104I	G159D	Q206R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S103A	V104I	S130G	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
S103A	V104I	P131V	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
K27N	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
T38G	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
T38A	N76D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A			
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A	E271G		
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Y209W	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A		
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	P210I	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A		
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	V205I	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A		
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	P210I	A232V	Q236H	Q245R	T260A			
V68A	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A				
N76D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A				
V68A	S103A	V104I	G159D	Y209W	A232V	Q236H	Q245R					
V68A	S103A	V104I	G159D	P210I	A232V	Q236H	Q245R					
V68A	S103A	V104I	G159D	A230V	A232V	Q236H	Q245R					
V68A	S103A	V104I	G159D	L126F	A232V	Q236H	Q245R					
V68A	S103A	V104I	G159D	V205I	A232V	Q236H	Q245R					
V68A	S103A	V104I	G159D	P210L	A232V	Q236H	Q245R					
S103A	V104I	G159D	A230V	Q236H	Q245R							
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	T260A					
S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R							
V68A	S103A	V104I	G159D	A174V	A232V	Q236H	Q245R	L257V				
V68A	S103A	V104I	G159D	A194S	A232V	Q236H	Q245R	L257V				
V68A	S103A	V104I	G159D	Y209W	A232V	Q236H	Q245R	L257V				
S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	L257V						
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A	N261W		
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	L257V	N261W				
S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A					
S103A	V104I	G159D	P210I	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				

S103A	V104I	G159D	Y209W	A232V	Q236H	Q245R	L257V					
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	P210L	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A		
Q12R	S103A	V104I	G159D	Y209W	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A			
S103A	V104I	Y209W	A232V	Q236H	Q245R	L257V						
S103A	V104I	G159D	V205I	P210I	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A			
S103A	V104I	G159D	V205I	Y209W	A232V	Q236H	Q245R	T260A				
V68A	S103A	V104I	G159D	V205I	Y209W	P210I	A232V	Q236H	Q245R			
S103A	V104I	G159D	V205I	Y209W	P210I	A232V	Q236H	Q245R	L257V			
S103A	V104I	G159D	V205I	Y209W	A232V	Q236H	Q245R	L257V				
V68A	S103A	V104I	G159D	V205I	Y209W	P210I	A232V	Q236H	Q245R	T260A		
S103A	V104I	G159D	V205I	Y209W	P210I	A232V	Q236H	Q245R				
S103A	V104I	G159D	Y209W	P210I	A232V	Q236H	Q245R					
S103A	V104I	G159D	V205I	P210I	A232V	Q236H	Q245R					
V68A	S103A	V104I	S128L	G159D	A232V	Q236H	Q245R					
A48V	S103A	V104I	G159D	A230V	Q236H	Q245R						
A48V	V68A	S103A	V104I	G159D	Y209W	A232V	Q236H	Q245R				
A48V	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
A48V	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	L257V	N261W			
G102A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
Q12R	G102A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
S101G	G102A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
A98L	G102A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
G102A	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S103A	V104I	P131V	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
S103A	V104I	G159D	N184S	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
S103A	V104I	G159D	N184G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	V244T	Q245R	N248D	N252K				
S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	V244A	Q245R	N248D	N252K				
N62D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	S256R		
Q12R	N62D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
S101G	S103A	V104I	G159D	N185D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S101G	S103A	V104I	G159D	Q206E	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S101G	S103A	V104I	G159D	T213Q	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
A98L	G102A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S101G	G102A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
A98L	G102A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		



A98L	G102A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	N248D	N252K			
N62D	S103A	V104I	Q109R	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
N62D	S103A	V104I	G159D	S212G	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
N62D	S101G	S103A	V104I	G159D	S212G	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	
S103A	V104I	G159D	A232V	Q245R	N248D	N252K						
S103A	V104I	G159D	A230V	Q245R								
N62D	S103A	V104I	S130G	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
S101G	S103A	V104I	S130G	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S101G	S103A	V104I	S128G	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S101G	S103A	V104I	S128L	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
N62D	S101G	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
N62D	S103A	V104I	S128G	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
N62D	S103A	V104I	S128L	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
S101G	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	T260A			
S101G	S103A	V104I	P131V	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
A98V	S101G	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S99G	S101G	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S101G	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S101G	S103A	V104I	G159D	Y209W	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S101G	S103A	V104I	G159D	P210I	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S101G	S103A	V104I	G159D	V205I	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
S101G	S103A	V104I	G159D	A230V	Q236H	Q245R						
S101G	S103A	V104I	G159D	A194P	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
N76D	S101G	S103A	V104I	G159D	A194P	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
S101G	S103A	V104I	G159D	A230V	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
N62D	S103A	V104I	G159D	N185D	Q206E	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	E271Q

Ještě preferovanější proteázové varianty užitečné v čistících přípravcích podle tohoto vynálezu zahrnují substituční soubor vybraný ze skupiny obsahující substituční soubory v Tabulce VI s výjimkou následujících substitučních souborů v Tabulce VIII:

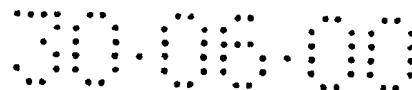
Tabulka VIII

68	76	103	104	116	159	170	185	232	236	245
----	----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Ještě preferovanější proteázové varianty užitečné v čistících přípravcích podle tohoto vynálezu zahrnují substituční soubor vybraný ze skupiny obsahující substituční soubory z Tabulky IX:

Tabulka IX
Table IX

68	103	104	159	232	236	245	252				
68	76	103	104	159	213	232	236	245	260		
68	103	104	159	232	236	245	248	252			
68	103	104	159	232	236	245					
68	103	104	140	159	232	236	245	252			
43	68	103	104	159	232	236	245	252			
43	68	103	104	159	232	236	245				
68	103	104	159	232	236	245	257				
68	76	103	104	159	210	232	236	245			
68	103	104	159	224	232	236	245	257			
76	103	104	159	232	236	245	257				
68	76	103	104	159	211	232	236	245			
12	68	76	103	104	159	214	232	236	245		
68	76	103	104	159	215	232	236	245			
12	68	76	103	104	159	232	236	245			
20	68	76	103	104	159	232	236	245	259		
68	76	87	103	104	159	232	236	245	260		
68	76	103	104	159	232	236	245	261			
12	48	68	76	103	104	159	232	236	245		
76	103	104	159	192	232	236	245				
76	103	104	147	159	232	236	245	248	251		
12	68	76	103	104	159	232	236	245	272		
68	76	103	104	159	183	206	232	236	245		
68	76	103	104	159	232	236	245	256			
68	76	103	104	159	206	232	236	245			
27	68	76	103	104	159	232	236	245			
68	103	104	159	212	232	236	245	248	252		
103	104	159	232	236	245	248	252				



68	103	104	159	209	232	236	245	248	252		
68	103	104	109	159	232	236	245	248	252		
20	68	103	104	159	232	236	245	248	252		
68	103	104	159	209	232	236	245	248	252		
68	103	104	159	210	232	236	245	248	252		
68	103	104	159	212	232	236	245	248	252		
68	103	104	159	213	232	236	245	248	252		
68	103	104	213	232	236	245	248	252			
68	103	104	159	215	232	236	245	248	252		
68	103	104	159	216	232	236	245	248	252		
20	68	103	104	159	232	236	245	248	252		
68	103	104	159	232	236	245	248	252	255		
68	103	104	159	232	236	245	248	252	256		
68	103	104	159	232	236	245	248	252	260		
68	103	104	159	228	232	236	245	248	252		
68	76	89	103	104	159	210	213	232	236	245	260
68	103	104	159	218	232	236	245	248	252		

Ještě preferovanější proteázové varianty užitečné v čistících přípravcích podle tohoto vynálezu zahrnují substituční soubor vybraný ze skupiny obsahující substituční soubory z Tabulky X:

Tabulka X

V68A	S103A	V104I	G159D	A228V	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
V68A	S103A	V104I	G159D	N218S	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
G20R	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
V68A	N76D	E89D	S103A	V104I	G159D	P210L	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	S256R		
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	T260R		
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	T255V		
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K	S256N		
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252L			
V68A	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
V68A	S103A	V104I	G159D	A215V	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
V68A	S103A	V104I	G159D	A215R	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		

V68A	S103A	V104I	G159D	P210L	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
V68A	S103A	V104I	G159D	S212C	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
V68A	S103A	V104I	G159D	S212G	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K				
V68A	S103A	V104I	G159D	Y209W	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
V68A	S103A	V104I	Q109R	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
G20R	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
V68A	S103A	V104I	G159D	Y209F	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
N76D	S103A	V104I	G159D	Y192F	A232V	Q236H	Q245R				
N76D	S103A	V104I	V147I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248S	K251R		
Q12R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	A272S		
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	N183K	Q206L	A232V	Q236H	Q245R		
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	S256R			
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Q206R	A232V	Q236H	Q245R			
K27R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R			
Q12R	A48V	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R		
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N261W			
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	G211R	A232V	Q236H	Q245R			
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	G211V	A232V	Q236H	Q245R			
Q12R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	Y214L	A232V	Q236H	Q245R		
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A215R	A232V	Q236H	Q245R			
Q12R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R			
G20R	V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	S259G		
V68A	N76D	S87R	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	T260V		
N76D	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	L257V				
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	T213R	A232V	Q236H	Q245R	T260A		
V68A	N76D	S103A	V104I	G159D	P210R	A232V	Q236H	Q245R			
V68A	S103A	V104I	G159D	S212P	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K		
V68A	S103A	V104I	G159D	T224A	A232V	Q236H	Q245R	L257V			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N252S				
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N252K				
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N248D	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R					
V68A	S103A	V104I	N140D	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N252K			
N43S	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N252K			
N43K	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R				

N43D	V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	N252K			
V68A	S103A	V104I	G159D	A232V	Q236H	Q245R	L257V				

Vysoce preferované proteázové varianty užitečné v čistících přípravcích podle tohoto vynálezu zahrnují substituční soubor vybraný ze skupiny obsahující:

12/102/103/104/159/212/232/236/245/248/252; 61/68/103/104/159/232/236/245/248/252;
62/103/104/130/159/213/232/236/245/248/252; 62/103/104/159/213/232/236/245/248/252;
62/103/104/109/159/213/232/236/245/248/252; 62/103/104/159/232/236/245/248/252;
62/101/103/104/159/212/213/232/236/245/248/252;
68/103/104/159/232/236/245/248/252/270;
68/103/104/159/185/232/236/245/248/252; 68/103/104/159/210/232/236/245/248/252;
68/103/104/159/185/210/232/236/245/248/252; 68/103/104/159/213/232/236/245/248/252;
68/103/104/159/230/232/236/245; 68/76/103/104/159/209/232/236/245;
68/103/104/232/236/245/248/257/275; 68/103/104/213/232/236/245/248/252;
68/103/104/159/232/236/245/248/252; 68/103/104/159/209/232/236/245;
68/76/103/104/159/232/236/245; 68/103/104/159/232/236/245/252;
68/103/104/159/232/236/245; 68/103/104/159/232/236/245/257;
68/76/103/104/159/211/232/236/245; 68/76/103/104/159/215/232/236/245;
68/103/104/159/210/232/236/245; 68/103/104/159/213/232/236/245/260;
68/76/103/104/159/213/232/236/245/260; 68/76/103/104/159/210/232/236/245/260;
68/103/104/159/183/232/236/245/248/252; 68/103/104/232/236/245/257/275;
68/103/104/159/213/232/236/245; 76/103/104/159/232/236/245;
76/103/104/159/213/232/236/245/260; 76/103/104/131/159/232/236/245/248/252;
97/103/104/159/232/236/245/248/252; 98/103/104/159/232/236/245/248/252;
98/102/103/104/159/212/232/236/245/248/252; 101/103/104/159/232/236/245/248/252;
102/103/104/159/232/236/245/248/252; 103/104/159/232/236/245;
103/104/159/248/252/270; 103/104/159/232/236/245/248/252;
103/104/159/205/209/232/236/245/257 103/104/159/232/245/248/252;
103/104/159/205/209/210/232/236/245/257; 103/104/159/213/232/236/245/248/252;
103/104/159/217/232/236/245/248/252; 103/104/130/159/232/236/245/248/252;
103/104/131/159/232/236/245/248/252; 103/104/159/205/209/232/236/245; and
103/104/159/232/236/245/257.

Ještě více vysoce preferované proteázové varianty užitečné v čistících přípravcích podle tohoto vynálezu zahrnují substituční soubor vybraný ze skupiny obsahující:

12R/102A/103A/104I/159D/212G/232V/236H/245R/248D/252K;
61E/68A/103A/104I/159D/232V/236H/245R/248D/252K;
62D/103A/104I/109R/159D/213R/232V/236H/245R/248D/252K;
62D/103A/104I/159D/213R/232V/236H/245R/248D/252K;
62D/103A/104I/159D/232V/236H/245R/248D/252K;
62D/103A/104I/130G/159D/213R/232V/236H/245R/248D/252K;
62D/101G/103A/104I/159D/212G/213R/232V/236H/245R/248D/252K;
68A/76D/103A/104I/159D/213R/232V/236H/245R/260A;
68A/76D/103A/104I/159D/210I/232V/236H/245R/260A;
68A/103A/104I/159D/183D/232V/236H/245R/248D/252K;
68A/103A/104I/159D/209W/232V/236H/245R;
68A/76D/103A/104I/159D/211R/232V/236H/245R;
68A/76D/103A/104I/159D/215R/232V/236H/245R;
68A/103A/104I/159D/213R/232V/236H/245R/260A;
68A/76D/103A/104I/159D/232V/236H/245R;
68A/103A/104I/159D/232V/236H/245R/252K;
68A/103A/104I/159D/232V/236H/245R;
68A/103A/104I/159D/232V/236H/245R/257V;
68A/103A/104I/159D/185D/232V/236H/245R/248D/252K;
68A/103A/104I/159D/210L/232V/236H/245R/248D/252K;
68A/103A/104I/159D/185D/210L/232V/236H/245R/248D/252K;
68A/103A/104I/159D/213E/232V/236H/245R/248D/252K;
68A/103A/104I/159D/230V/232V/236H/245R;
68A/76D/103A/104I/159D/209W/232V/236H/245R;
68A/103A/104I/232V/236H/245R/248D/257V/275H;
68A/103A/104I/232V/236H/245R/257V/275H;
68A/103A/104I/213E/232V/236H/245R/248D/252K;
68A/103A/104I/159D/232V/236H/245R/248D/252K;
68A/103A/104I/159D/210I/232V/236H/245R;
68A/103A/104I/159D/210L/232V/236H/245R;
68A/103A/104I/159D/213G/232V/236H/245R;
68A/103A/104I/159D/232V/236H/245R/248D/252K/270A;
76D/103A/104I/159D/232V/236H/245R;
76D/103A/104I/131V/159D/232V/236H/245R/248D/252K;
76D/103A/104I/159D/213R/232V/236H/245R/260A;
97E/103A/104I/159D/232V/236H/245R/248D/252K;
98L/103A/104I/159D/232V/236H/245R/248D/252K;

98L/102A/103A/104I/159D/212G/232V/236H/245R/248D/252K;
 101G/103A/104I/159D/232V/236H/245R/248D/252K;
 102A/103A/104I/159D/232V/236H/245R/248D/252K;
 103A/104I/159D/232V/236H/245R/248D/252K;
 103A/104I/159D/213R/232V/236H/245R/248D/252K;
 103A/104I/130G/159D/232V/236H/245R/248D/252K;
 103A/104I/159D/217E/232V/236H/245R/248D/252K;
 103A/104I/159D/248D/252K/270V;
 103A/104I/159D/232V/236H/245R;
 103A/104I/159D/205I/209W/232V/236H/245R;
 103A/104I/159D/232V/236H/245R/257V;
 103A/104I/159D/205I/209W/232V/236H/245R/257V;
 103A/104I/131V/159D/232V/236H/245R/248D/252K;
 103A/104I/159D/205I/209W/210I/232V/236H/245R/257V: a
 103A/104I/159D/232V/245R/248D/252K.

Rekombinantní proteázy/rekombinantní subtilisiny - „Rekombinantní proteázy“ nebo „rekombinantní subtilisin“ označuje proteázu nebo subtilisin, u kterého je DNA sekvence přirodně se vyskytující proteázy nebo subtilisinu modifikována za vzniku mutantní DNA sekvence, která kóduje substituci, inserci nebo vymazání jedné nebo více aminokyselin v aminosekvenci proteázy nebo subtilisinu. Vhodné modifikační metody jsou popsány v tomto vynálezu a v U. S. Patentu RE 34,606, 5,204,015 a 5,185,258.

Jiné než humánní proteázy /jiné než humánní subtilisiny - „Jiné než humánní proteázy“ nebo „jiné než humánní subtilisiny“ a DNA, která je kóduje mohou být získány z mnoha prokaryotních a eukaryotních organismů. Vhodné příklady prokaryotních organismů zahrnují gramnegativní organismy jako je E. coli nebo Pseudomonas a gram pozitivní bakterie jako jsou Micrococcus nebo Bacillus. Příklady eukaryotních organismů, z nichž mohou být získány karbonylhydrolázy a jejich geny, zahrnují kvasinky jako třeba Saccharomyces cerevisiae, houby jako třeba Aspergillus sp. a nehumánní savčí zdroje jako např. hovězí sp., z nichž mohou být získány geny kódující proteázy chymosin nebo subtilisinový chymosin. Série proteáz a/nebo subtilisinů může být získána z různých příbuzných druhů, majících aminokyselinovou sekvenci, která mezi dvěma členy této série není plně homogenní, která ovšem vykazuje stejný typ biologické aktivity. Jiné než lidské proteázy nebo jiné než lidské subtilisiny použité v tomto

vynálezu mají funkční definici, která se odkazuje na proteázy nebo subtilisiny, které jsou spojeny přímo nebo nepřímo s prokaryotními nebo eukaryotními zdroji.

Variantní DNA sekvence - Variantní DNA sekvence kódující tyto proteázové nebo subtilisinové varianty jsou odvozeny od sekvence prekurzorové DNA, která kóduje přirozeně se vyskytující nebo rekombinantní prekurzory enzymu. Sekvence variantní DNA jsou odvozeny modifikací sekvence prekurzorové DNA tak, aby kódovaly substituci jedné nebo více specifických aminokyselinových zbytků kódovaných prekurzorovou DNA sekvencí odpovídající polohám 103 v kombinaci s jednou nebo s více následujících poloh: 1, 3, 4, 8, 9, 10, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 22, 24, 27, 33, 37, 38, 42, 43, 48, 55, 57, 61, 62, 68, 72, 75, 76, 77, 78, 79, 86, 87, 89, 97, 98, 99, 101, 102, 104, 106, 107, 109, 111, 114, 115, 116, 117, 119, 121, 123, 128, 130, 131, 133, 134, 137, 140, 141, 142, 146, 147, 158, 159, 160, 161, 166, 167, 170, 173, 174, 177, 181, 182, 183, 184, 185, 188, 192, 194, 198, 203, 204, 205, 206, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 222, 224, 227, 228, 230, 232, 236, 237, 238, 240, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 265, 268, 269, 270, 271, 272, 274 a 275 subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens*, kde když zmíněná proteázová varianta zahrnuje substituci aminokyselinového zbytku v pozicích 103 a 76, obsahuje také substituci aminokyselinového zbytku v jedné nebo více z aminokyselinových poloh, jiných než odpovídá aminokyselinovým pozicím 27, 99, 101, 104, 107, 109, 123, 128, 166, 204, 206, 210, 216, 217, 218, 222, 260, 265 nebo 274 subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens*. Ačkoliv aminokyselinové zbytky identifikované pro modifikaci jsou identifikovány podle číslování použitelného pro *B. amyloliquefaciens* (což se stalo běžnou metodou identifikace pozice zbytku u všech subtilisinů), preferovaná sekvence prekurzorové DNA užitečné podle tohoto vynálezu je sekvence *Bacillus lentus* zobrazená na Obrázku 3.

V preferovaném provedení kódují tyto sekvence variantní DNA substituci, inserci nebo vymazání aminokyselinového zbytku odpovídajícího poloze 103 subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens* v kombinaci s jednou nebo s více dalšími aminokyselinovými zbytky odpovídajícími následujícím polohám: 1, 3, 4, 8, 9, 10, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 22, 24, 27, 33, 37, 38, 42, 43, 48, 55, 57, 61, 62, 68, 72, 75, 76, 77, 78, 79, 86, 87, 89, 97, 98, 99, 101, 102, 104, 106, 107, 109, 111, 114, 115, 116, 117, 119, 121, 123, 128, 130, 131, 133, 134, 137, 140, 141, 142, 146, 147, 158, 159, 160, 161, 166, 167, 170, 173, 174, 177, 181, 182, 183, 184, 185, 188, 192, 194, 198, 203, 204, 205, 206, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 222, 224, 227, 228, 230, 232, 236, 237, 238, 240, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 251, 252,

253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 265, 268, 269, 270, 271, 272, 274 a 275 subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens*, kde když zmíněná proteázová varianta zahrnuje substituci aminokyselinového zbytku v pozicích 103 a 76, obsahuje také substituci aminokyselinového zbytku v jedné nebo více z aminokyselinových poloh, jiných než odpovídá aminokyselinovým pozicím 27, 99, 101, 104, 107, 109, 123, 128, 166, 204, 206, 210, 216, 217, 218, 222, 260, 265 nebo 274 subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens*. Výhodněji tyto sekvence variantní DNA kódují proteázové varianty popsané v tomto vynálezu.

V dalším provedení tyto sekvence variantní DNA kódují substituci, inserci nebo vymazání jednoho nebo více aminokyselinových zbytků odpovídajících polohám 62, 212, 230, 232, 252 a 257 subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens*. Výhodněji tyto sekvence variantní DNA kódují proteázové varianty popsané zde.

Ačkoliv aminokyselinové zbytky identifikované pro modifikaci jsou identifikovány podle číslování použitelného pro *B. amyloliquefaciens* (což se stalo běžnou metodou identifikace pozice zbytku u všech subtilisinů), preferovaná sekvence prekurzorové DNA užitečné podle tohoto vynálezu je sekvence *Bacillus lentus* zobrazená na Obrázku 3.

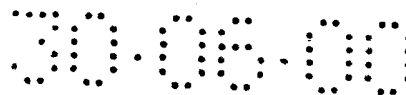
Tyto sekvence rekombinantní DNA kódují proteázové varianty, mající novou sekvenci aminokyselin a obecně alespoň jednu vlastnost, která je významně jiná než je stejná vlastnost u enzymu kódovaného sekvencí DNA prekurzorové proteázy. Tyto vlastnosti zahrnují proteolytické aktivity, substrátovou specifitu, stabilitu, změněný pH profil a/nebo zlepšené pracovní charakteristiky.

Specifické substituce odpovídají poloze 103 v kombinaci s jednou nebo s více následujících poloh: 1, 3, 4, 8, 9, 10, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 22, 24, 27, 33, 37, 38, 42, 43, 48, 55, 57, 61, 62, 68, 72, 75, 76, 77, 78, 79, 86, 87, 89, 97, 98, 99, 101, 102, 104, 106, 107, 109, 111, 114, 115, 116, 117, 119, 121, 123, 128, 130, 131, 133, 134, 137, 140, 141, 142, 146, 147, 158, 159, 160, 161, 166, 167, 170, 173, 174, 177, 181, 182, 183, 184, 185, 188, 192, 194, 198, 203, 204, 205, 206, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 222, 224, 227, 228, 230, 232, 236, 237, 238, 240, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 265, 268, 269, 270, 271, 272, 274 a 275 subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens*, kde když zmíněná proteázová varianta zahrnuje substituci aminokyselinového zbytku v pozicích 103 a 76, obsahuje také substituci aminokyselinového zbytku v jedné nebo více z aminokyselinových poloh, jiných než odpovídá aminokyselinovým pozicím 27, 99, 101, 104, 107, 109, 123, 128, 166, 204, 206, 210, 216, 217, 218, 222, 260, 265 nebo 274, kde

číslování poloh odpovídá přírodně se vyskytujícímu subtilisinu z *Bacillus amyloliquefaciens* nebo ekvivalentním aminokyselinovým zbytkům v jiných karbonyl hydrolázách nebo subtilisinech (jako je subtilisin *Bacillus lentus*) zde popsáných. Dále jsou zde popsány specifické substituce odpovídající jedné nebo více z následujících poloh 62, 212, 230, 232, 252 a 257, kde číslované polohy odpovídají přírodně se vyskytujícímu subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens* nebo ekvivalentním aminokyselinovým zbytkům u jiných karbonylhydroláz nebo subtilisinů (jako je subtilisin *Bacillus lentus*). Tato čísla poloh aminokyselin odkazují na sekvenci přírodního subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens*, která je zobrazena na Obrázku 1. Tento vynález ovšem není omezen na používání mutace tohoto konkrétního subtilisinu, ale je rozšířen i na prekursorové proteázy obsahující aminokyselinové zbytky v polohách, které jsou „ekvivalentní“ konkrétně identifikovaným zbytkům v subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens*. V preferovaném provedení tohoto vynálezu je prekurzorovou proteázou subtilisin *Bacillus lentus* a substituce, vymazání nebo inserce jsou provedeny na ekvivalentních aminokyselinových zbytcích v *Bacillus lentus* odpovídající výše uvedenému seznamu.

Zbytek (aminokyseliny) prekursorové proteázy je ekvivalentní ke zbytku *Bacillus amyloliquefaciens* pokud je buď homologický (to jest v odpovídající poloze primární nebo terciální struktury) nebo analogický k určitému zbytku nebo části subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens* (to jest mající stejnou nebo podobnou funkční schopnost kombinovat, reagovat nebo interagovat chemicky).

Za účelem určení homologie k primární struktuře se sekvence aminokyselin prekursorové proteázy přímo srovnává s primární sekvencí subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens* a obzvláště se sadou zbytků o níž je známo, že je invariantní u subtilisinu se známou strukturou. Například, obrázek 2 ukazuje zachované zbytky mezi subtilisinem *Bacillus amyloliquefaciens* a subtilisinem *Bacillus lentus*. Po seřazení zachovaných zbytků, dovolujícím nezbytnou inzerci a vymazání za účelem udržení základního uspořádání (to jest vyhnutí se eliminaci zachovaných zbytků pomocí nezávislého vymazání nebo inserce) jsou definovány zbytky odpovídající konkrétním aminokyselinám v primární sekvenci subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens*. Uspořádání zachovaných zbytků by s výhodou mělo zachovávat 100 % těchto zbytků. Avšak uspořádání mající více než 75 % nebo dokonce jen 50 % zachovaných zbytků je také adekvátní k definování ekvivalentních zbytků. Zachování katalytické triády Asp32/His64/Ser221 by mělo být zachováno.



Například, na obrázku 3 jsou seřazeny aminokyselinové sekvence subtilisinů z *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* (carlsbergensis) a *Bacillus lentus* za účelem zajištění maximální homologie mezi aminokyselinovými sekvencemi. Tyto zachované zbytky (jako mezi BNP' a *B. lentus*) jsou identifikovány na obrázku 2.

Tyto konservované zbytky mohou být tedy použity k definování odpovídajících ekvivalentních aminokyselinových zbytků *Bacillus lentus* (PCT Publication č. WO 89/06279 publikované 13. července 1989), preferovaný proteázový prekurzorový enzym nebo subtilisin označovaný jako PB92 (EP 0 328 299), který je vysoce homologický k preferovanému subtilisinu *Bacillus lentus*. Aminokyselinová sekvence některých z těchto subtilisinů jsou seřazeny na obrázku 3A a 3B spolu se sekvencí subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens* za účelem vytvoření maximální homologie konservovaných zbytků. Jak je vidět, je zde mnoho vypuštění v sekvenci *Bacillus lentus* ve srovnání se subtilisinem *Bacillus amyloliquefaciens*. Tak například, ekvivalentní aminokyselina pro Val165 v subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens* v ostatních subtilisinech je isoleucin pro *B. lentus* a *B. licheniformis*. Tak například, aminokyselina v poloze +76 je asparagin (N) jak u subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens* tak u subtilisinu *Bacillus lentus*. V proteázových variantách podle tohoto vynálezu je však aminokyselinový ekvivalent k +76 subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens* substituován s aspartátem (D). Zkratky a jednopísmenné kódy pro všechny aminokyseliny podle tohoto vynálezu odpovídají Patentin User Manual (GenBank, Mountain View, CA), 1990, str. 101.

„Ekvivalentní zbytky“ mohou být také definovány určením homologie na úrovni terciální struktury pro prekurzorovou proteázu, jejíž terciální struktura byla určena x-Ray krystalografií. Ekvivalentní zbytky jsou definovány jako ty, u nichž atomové koordináty dvou nebo více atomů hlavního řetězce konkrétního aminokyselinového zbytku prekurzorové proteázy a subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens* (N k N, CA k CA, C k C a O k O) jsou v rozmezí 0,13 nm a s výhodou 0,1 nm po seřazení. Seřazení je dosaženo poté co je nejlepší model orientován a natočen tak, aby dával maximální překryv atomových koordinát nevodíkových proteinových atomů zkoumané proteázy se subtilisinem *Bacillus amyloliquefaciens*. Nejlepší model je krystalografický model dávající nejnížší R faktor pro experimentální difrakční data při nejvyšším dostupném rozlišení.

$$R \text{ faktor} = \frac{\sum_h |F_o(h)| - |F_c(h)|}{\sum_h |F_o(h)|}$$

Ekvivalentní zbytky, které jsou funkčně analogické k určitým zbytkům subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens*, jsou definovány jako takové aminokyseliny prekursorové proteázy, které mohou přijmout takovou konformaci, kdy buď mění, modifikují nebo přispívají k proteinové struktuře, vázání substrátu nebo katalýze způsobem definovaným a připisovaným konkrétnímu zbytku v subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens*. Dále jsou to takové zbytky prekursorové proteázy (u které byla terciální struktura získána pomocí X-ray krystalografie), které zaujímají analogickou pozici do té míry, že ačkoliv atomy hlavního řetězce daného zbytku nemusí splňovat kritéria ekvivalence na základě obsazení homologické pozice, leží atomové koordináty nejméně dvou atomů postranního řetězce v rozmezí 0,13 nm s odpovídajícími atomy postranního řetězce subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens*. Koordináty trojdimenzionální struktury subtilisinů *Bacillus amyloliquefaciens* jsou sepsány v WPO publikaci číslo 0 251 446 (ekvivalentní s U. S. Patentem 5,182, 204, jejichž popis je zde zahrnut jako reference) a mohou být použity jak bylo naznačeno výše k určení ekvivalentních zbytků na úrovni terciální struktury.

Některé ze zbytků identifikovaných pro substituci, inserci nebo vymazání jsou konservované zbytky, zatímco ostatní nikoliv. V případě zbytků, které nejsou konservovány, je náhrada jedné nebo více aminokyselin limitována na substituci, která produkuje variantu, která má aminokyselinovou sekvenci jenž neodpovídá sekvenci nalézané v přírodě. V případě konservovaných zbytků by takovéto změny neměly vést k přírodním sekvencím. Proteázové varianty podle tohoto vynálezu zahrnují zralé formy proteázových variant, stejně jako pro- a pre-pro-formy těchto proteázových variant. Pre-pro-formy jsou preferovanou konstrukcí protože usnadňují expresi, sekreci a zrání proteázových variant.

„Prosekvence“ označuje sekvenci aminokyselin vázanou k N-terminální části zralé formy proteázy, přičemž po jejím odstranění vzniká „zralá“ forma proteázy. Mnoho proteolytických enzymů se nachází v přírodě jako produkty translačních proenzymů a bez post-translačního opracování se exprimují tímto způsobem. Preferovaná prosekvence pro produkci proteázových variant je putativní prosekvence subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens*, ačkoliv mohou být použity i další proteázové prosekvence.

„Signálová sekvence“ nebo „prosekvence“ označuje libovolné sekvence aminokyselin vázanou k N-terminální části proteázy nebo N-terminální části proproteázy, které mohou participovat při sekreci zralých forem proteáz. Tato definice signálové sekvence je definicí funkční, zamýšlená tak, aby zahrnovala všechny tyto aminokyselinové sekvence kódované N-terminální částí proteázového genu, který participuje při efektuaci sekrece proteázy za nativních

podmínek. Tento vynález využívá takovéto sekvence k ovlivnění sekrece proteázových variant podle zde uvedené definice. Jedna možná signálová sekvence zahrnuje prvních sedm aminokyselinových zbytků signální sekvence ze subtilisinu *Bacillus subtilis* připojených ke zbytku signálové sekvence subtilisinu z *Bacillus lentus* (ATCC 21536).

„Prepro“ forma proteázové varianty se skládá z dospělé formy proteázy, mající prosekvenci operativně připojenou k aminokonci proteázy a „pre“ nebo „signální“ sekvence je „provozuschopně“ připojená k aminokonci prosekvence.

„Expresní vektor“ označuje DNA konstrukci obsahující DNA sekvenci, který je operativně připojen ke vhodné kontrolní sekvenci schopné ovlivňovat expresi zmíněné DNA ve vhodném hostiteli. Tyto kontrolní sekvence zahrnují promotor k ovlivnění transkripce, optimální perátorovou sekvenci pro kontrolu takovéto transkripce, sekvenci kódující vhodné vázací místo pro mRNA na ribosomu a sekvence, které řídí terminaci transkripce a translace. Vektor může být plasmid, částice fágu nebo jednoduše potenciální genomický insert. Po transformování do vhodného hosta se vektor může replikovat a fungovat nezávisle na hostitelském genomu nebo se v některých případech může integrovat do samotného genomu. V této přihlášce se označení „plasmid“ a „vektor“ někdy používají zaměnitelně, protože plasmid je v současné době nejčastěji používanou formou. Ovšem, vynález je zamýšlen tak, aby zahrnoval tyto další formy expresních vektorů, které plní stejnou funkci a které jsou známy v oboru.

„Hostitelské buňky“ používané v tomto vynálezu jsou obecně prokariotní nebo eukaryotní hostitelé, které byly s výhodou manipulovány způsoby popsány v U. S. Patent RE 34,606 s cílem učinit je neschopnými sekrece enzymaticky aktivních endoproteáz. Preferované hostitelské buňky pro expresi proteáz je kmen *Bacillus* BG2036, který je deficientní pokud jde o enzymaticky aktivní neutrální proteázy a alkalické proteázy (subtilisin). Konstrukce kmenu BG2036 je popsána detailně v U. S. Patent 5,264,366. Další hostitelské buňky pro expresi proteáz zahrnují *Bacillus subtilis* 168 (také popsáný v U. S. Patent RE 34,606 a U. S. Patent 5,264,366, jejichž popis je zde zařazen jako reference), stejně jako libovolné vhodné kmeny *Bacillus* jako třeba *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus* a pod.).

Hostitelské buňky jsou transformovány nebo transfektovány s vektory konstruovanými s využitím technik rekombinantní DNA. Takto transformované hostitelské buňky jsou schopné buď replikace vektorů kódujících proteázové varianty nebo exprimování požadované proteázové varianty. V případě vektorů kódujících pre- nebo prepro-formu proteázové varianty, jsou tyto

varianty jsou-li exprimovány, v typickém případě vylučovány z hostitelské buňky do média hostitelských buněk.

„Operativně spojen“, při popisu vztahů mezi dvěma oblastmi DNA tento termín jednoduše znamená, že jsou funkcionálně příbuzné jeden druhému. Například, prosekvence je operativně připojena k peptidu, pokud funguje jako signální sekvenční a účastňuje se v sekreci dospělých forem proteinu což nejpravděpodobněji zahrnuje štěpení signální sekvenční. Promóter je operativně připojen ke kódující sekvenci pokud řídí transkripci sekvenční, ribosomové vázací místo je operativně připojen ke kódující sekvenci je-li umístěn tak, aby dovolil translaci.

Geny kódující přírodně se vyskytující proteázy mohou být získány podle obecné metody známé v oboru. Metody obecně zahrnují syntézu značených značek, majících oblasti putativních sekvencí kódujících příslušné proteázy, přípravu genomických knihoven z organismů exprimujících proteázu a skrining těchto knihoven hybridizací do vzorků. Pozitivně hybridizované klony jsou poté mapovány a sekvencovány.

Klonovaná proteáza je poté použita k transformaci hostitelské buňky za účelem exprese proteázy. Proteázový gen je potom ligován do plasmidu. Tento plasmid se replikuje uvnitř v tom smyslu, že obsahuje dobře známé elementy nezbytné pro plasmidovou replikaci: promóter operativně připojen k genu (který může být dodán jako genu vlastní homologický promóter je-li rozeznán, to jest: transkribován hostitelem.) terminací transkripce a polyadenyl pro stabilitu m-RNA transkribované hostitelem z proteázového genu v určitých eukaryotních hostitelských buněk, které jsou exogenní nebo je zajištěn endogenní oblastí terminátoru proteázového genu a s výhodou výběrový gen jako je resistance genu proti antibiotikům, která zajišťuje kontinuální kultivaci hostitelských buněk infikovaných plasmidem v médiu obsahujícím antibiotika. Plasmidy vyšších kopií také obsahují počátek replikace pro hostitele, čímž uvolňuje velké množství plasmidů, které by měly být generovány cytoplasmě bez chromosomální limitaci. Ovšem, v rámci tohoto vynálezu je integrace násobných kopií proteázového genu do hostitelského genomu. To je usnadněno prokaryotními a eukaryotními organismy, které jsou obzvláště náchylné k homologické rekombinaci. Genem může být přírodní gen *B. lentus*. Alternativně, může být vyroben syntetický gen kódující přírodně se vyskytující nebo mutantní prekursorovou proteázu. V tomto případě se určuje DNA a/nebo aminokyselinová sekvenční prekursorové proteázy. Poté se syntetizují násobné, překrývající se, syntetické fragmenty jednopramenných DNA, kódující prekursorové proteázy. Příklad syntetické genové

konstrukce je uveden v příkladu 3 U.S. Patentu 5,204,105, jehož popis je zde zařazen jako reference.

Jsou-li přírodně se vyskytující nebo syntetické prekursorové proteázy naklonovány, provádí se mnoho modifikací za účelem většího použití genu kromě syntézy přírodně se vyskytující prekursorové proteázy. Takovéto modifikace zahrnují produkci rekombinantních proteáz jak je popsáno v U. S. Patent RE 34,606 a EPO publikace číslo 0 251 446 a produkci proteázových variant popsaných zde.

Následující metoda kazetové mutagenese může být použita k usnadnění konstrukce proteázových variant podle tohoto vynálezu, ačkoliv mohou být použity i jiné metody. Nejdříve se získají přírodně se vyskytující geny kódující proteázu a sekvence, a to celé nebo částečně. Poté se u sekvence hledá místo, ve kterém je vhodné provést mutaci (vymazání, inserce nebo substituce) jedné nebo více aminokyselin v kódovaném enzymu. Sekvence sousedící s tímto místem se prohlédnou s ohledem na přítomnost restrikčních míst pro náhradu krátkého segmentu genu s množstvím oligonukleotidů, které po expresi budou kódovat různé mutanty. Tyto restrikční místa jsou s výhodou unikátní místa v rámci proteázového genu takže usnadňují náhradu genového segmentu. Ovšem, může být použito libovolné konvenční restrikční místo proteázového genu, které není redundantní, za předpokladu, že genové fragmenty generované restrikčním trávením mohou být poskládány v příslušnou sekvenci. Nejsou-li přítomna restrikční místa v lokalitách v rámci konvenční vzdálenosti od vybraného bodu (od 10 do 15 nukleotidů), jsou tato místa generována substitucí nukleotidů v genu takovým způsobem, že ani čtecí rámeček ani kódované aminokyseliny nejsou změněny ve finální konstrukci. Mutace genu za účelem změny jeho sekvence a potvrzení požadované sekvence se provádí extensí M13 primeru v souladu s obecně známými metodami. Úkol lokalizace vhodných sousedních regionů a vyhodnocení potřebných změn k dosažení dvou konvenčních sekvencí restrikčních míst se stává rutinním díky redundanci genetického kódu, restrikční enzymatické mapě genu a velkému množství různých restrikčních enzymů. Povšimněte si prosím, že je-li dosažitelné konvenční sousední restrikční místo, výše uvedená metoda musí být použita pouze ve spojení se sousedním regionem, neobsahujícím místo.

Poté, co je přírodně se vyskytující nebo syntetická DNA klonována, restrikční místa obklopující pozice, které mají být zmutovány, jsou natrávena s příbuznými restrikčními enzymy a množství koncově-komplementárních oligonukleotidových kazet je ligováno do genu. Mutagenese je touto metodou usnadněna, protože všechny oligonukleotidy mohou být

syntetizovány tak, abychom měli stejná restriční místa a k vytvoření restričních míst nejsou třeba žádné spojovací části. V tomto textu je definována proteolytická aktivita jako rychlost hydrolýzy peptidických vazeb na miligram aktivního enzymu. Pro měření proteolytické aktivity existuje mnoho procedur (K. M. Kalisz, „Microbial Proteinases“, Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, A. Fiechter ed., 1988). Kromě toho popřípadě jako alternativa k modifikované proteolytické aktivitě mohou mít variantní enzymy podle tohoto vynálezu další modifikované vlastnosti jako je K_m , k_{cat} , poměr k_{cat}/K_m a/nebo specificky modifikovaný substrát a/nebo modifikovaným profilem pH aktivity. Tyto enzymy mohou být připraveny na míru pro konkrétní substrát o němž se předpokládá, že bude přítomen, např. v přípravě peptidů nebo u hydrolytických procesů jako je praní prádla.

V jednom aspektu vynálezu je předmětem vynálezu zajištění variantní proteázy, mající proteolytickou aktivitu ve srovnání s prekursorovou proteázou, protože zvýšení této aktivity (numericky vyšší) umožňuje použití enzymů k lepšímu působení na substrát. Předmětem zájmu jsou také variantní enzymy, mající změněnou termickou stabilitu a/nebo změněnou substrátovou specifitu ve srovnání s prekurzorem. V některých případech může být požadována nižší proteolytická aktivita, například snížení proteolytické aktivity by bylo užitečné tam, kde je požadována syntetická aktivita proteáz (jako při syntéze peptidů). Někdy je třeba snížení této proteolytické aktivity, která by byla schopná rozbití produktů této syntézy. Obráceně, v některých případech může být vhodné zvýšení proteolytické aktivity variantního enzymu ve srovnání s prekurzorem. Kromě toho, zvýšení nebo snížení (alterace) stability variant, ať již alkalické nebo termální stability, může být vyžadováno. Zvýšení nebo snížení v k_{cat} , K_m nebo k_{cat}/K_m jsou specifická k substrátu použitému k určení těchto kinetických parametrů.

V dalším aspektu tohoto vynálezu bylo určeno, že substituce v pozicích odpovídajících 103 v kombinaci s jedním nebo více následujících pozic 1, 3, 4, 8, 9, 10, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 24, 27, 33, 37, 38, 42, 43, 48, 55, 57, 58, 61, 62, 68, 72, 75, 76, 77, 78, 79, 86, 87, 89, 97, 98, 99, 101, 102, 104, 106, 107, 109, 111, 114, 116, 117, 119, 121, 123, 126, 128, 130, 131, 133, 134, 137, 140, 141, 142, 146, 147, 158, 159, 160, 166, 167, 170, 173, 174, 177, 181, 182, 183, 184, 185, 188, 192, 194, 198, 203, 204, 205, 206, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 222, 224, 227, 228, 230, 232, 236, 237, 238, 240, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 265, 268, 269, 270, 271, 272, 274 a 275 substilisinu *Bacillus amyloliquefaciens* jsou důležité při modulování celkové stability a/nebo proteolytické aktivity enzymu.

V dalším aspektu vynálezu bylo určeno, že substituce na jedné nebo více následujících pozic odpovídajících polohám 62, 212, 230, 232, 252 a 257 subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens* jsou také důležité při modulování celkové stability a/nebo proteolytické aktivity enzymu.

Tyto substituce jsou s výhodou u subtilisinu *Bacillus lentus* (rekombinantní nebo přírodní typ), ačkoliv substituce mohou být provedeny v libovolné *Bacillus* proteáze.

Na základě výsledků screeningu získaného u variantních proteáz jsou zmíněné mutace subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens* důležité pro proteolytickou aktivitu, působení a/nebo stabilitu těchto enzymů a pro čisticí a prací působení těchto variantních enzymů.

Metody a způsoby přípravy enzymů použitých v detergentech a čisticích prostředcích podle tohoto vynálezu jsou známé a jsou diskutované v PCT Publikaci č. WO 95/10615.

Enzymy podle tohoto vynálezu mají trypsinovou specifitu. To znamená, že enzymy podle tohoto vynálezu hydrolyzují proteiny přednostním štěpením peptidové vazby nabitého aminokyselinového zbytku, konkrétněji zbytků jako je arginin a lysin, spíše než preferenčním štěpením peptidových vazeb hydrofobních aminokyselinových zbytků, konkrétněji fenylalanin, tryptofan a tyrosin. Enzymy mající tento profil se označují jako enzymy s chymotrypsinovou specifitou. Substrátová specifita, diskutovaná výše, je ilustrována působením enzymu na dva syntetické substráty. Proteázy mající trypsinovou specifitu hydrolyzují syntetický substrát bVGR-pNA preferenčně ve srovnání se syntetickým substrátem sucAAPF-pNA. Oproti tomu, chymotrypsinové proteázové enzymy hydrolyzují později zmíněný substrát (sucAAPF-pNA) mnohem rychleji než prvně jmenovaný. Pro účely tohoto vynálezu byla využita následující procedura pro definování trypsinové specifity enzymů podle tohoto vynálezu:

Fixní množství glycinového pufru při pH 10 a teplotě 25 °C bylo přidáno do standardní 10 ml zkumavky. Pak bylo do zkumavky přidáno 0,5 ppm aktivního enzymu, určeného k testování. Poté bylo do zkumavky přidáno 1,25 mg syntetického substrátu na 1 ml roztoku pufru. Směs byla ponechána inkubovat 15 minut při 25 °C. Po proběhnutí inkubační doby byl ke směsi přidán enzymový inhibitor PMSF v koncentraci 0,5 mg na 1 ml roztoku pufru. Poté byla naměřena absorbance nebo hodnoty OD směsi při 410 nm. Absorbance potom indikuje aktivitu enzymu vůči syntetickému substrátu. Čím vyšší je absorbance tím vyšší je úroveň aktivity vůči substrátu.

K určení specifity konkrétního enzymu může být absorbance dvou syntetických substrátových proteinů převedena na specifitní poměr. Pro účely tohoto vynálezu je poměr určen vzorcem:

$$[\text{aktivita vůči sAAPF-pNA}]/[\text{aktivita vůči bVGR-pNA}]$$

Enzym mající poměr menší než asi 10, výhodněji nižší než asi 5 a nejvýhodněji nižší než asi 2,5, mohou být považovány za enzymy, demonstrující trypsinu podobnou aktivitu.

Tyto varianty obecně mají nejméně jednu vlastnost, která je odlišuje od téže vlastnosti proteázových prekurzorů, z nichž jsou aminokyselinové sekvence variant odvozeny.

Jeden aspekt tohoto vynálezu jsou přípravky, jako jsou detergenty a čisticí přípravky pro čištění textilu, kuchyňského nádobí a dalších substrátů s tuhými povrchy, které zahrnují jednu nebo více proteázových variant podle tohoto vynálezu. Přípravky obsahující proteázy mohou být použity pro čištění např.: hedvábí nebo vlny, stejně jako pro další typy tkanin, jak je popsáno v publikacích jako třeba RD 216,034, EP 134,267, US 4,533,359 a EP 344,259 a kuchyňského vybavení a dalších substrátů s pevným povrchem jak je popsáno v US 5,478,742, US 5,346,822, US 5,679,630 a US 5,677,272.

II. Amylázové varianty - Amylázové varianty používané podle tohoto vynálezu zahrnují, výčet není limitující, amylázové enzymy popsané v WO 95/26397 a WO 96/23873 (Novo). Tyto enzymy jsou zahrnuty v čisticích přípravcích v koncentracích od 0,0001 %, s výhodou od 0,00018 %, výhodněji od asi 0,00024 %, nejvýhodněji od 0,05 % do asi 0,1 %, s výhodou do asi 0,060 %, výhodněji do asi 0,048 % čistého enzymu na hmotnost čisticího prostředku.

Amylázové varianty jsou s výhodou vybrány ze skupiny obsahující α -amylázové varianty.

Vhodné α -amylázové varianty pro použití podle tohoto vynálezu zahrnují, výčet není limitující, následující α -amylázy:

(i) α -amylázy charakterizované tím, že mají specifickou aktivitu nejméně o 25 % vyšší než je specifická aktivita Termamyl® při teplotě v rozsahu 25 °C až 55 °C a při pH hodnotách v rozsahu od 8 do 10, měřeno stanovením α -amylázové aktivity Phadebas®, a/nebo

(ii) α -amylázy podle bodu (i) zahrnující aminokyselinovou sekvenci ukázanou na SEQ ID č. 1 nebo α -amylázy, které jsou nejméně z 80 % homologické s aminokyselinovou sekvencí ukázanou na SEQ ID č. 1 a/nebo

(iii) α -amylázy podle bodu (i) zahrnující aminokyselinovou sekvenci ukázanou na SEQ ID č. 2 nebo α -amylázy, které jsou nejméně z 80 % homologické s aminokyselinovou sekvencí ukázanou na SEQ ID č. 2 a/nebo

(iv) α -amylázy podle bodu (i) zahrnující následující aminokyselinovou N-terminální sekvenci: His-His-Asn-Gly-Thr-Asn-Gly-Thr-Met-Met-Gln-Tyr-Phe-Glu-Trp-Tyr-Leu-Pro-Asn-Asp- (SEQ ID č. 3) nebo amylázy, které jsou nejméně z 80 % homogenní s aminokyselinovou N-terminální sekvencí ukázanou na SEQ ID č. 3 a/nebo

(v) α -amyláza podle bodů (i-iv), kde je α -amyláza získatelná z alkalofilních druhů *Bacillus* a/nebo

(vi) α -amyláza podle bodu (v), kde amyláza je získatelná z libovolných kmenů NCIB 12289, NCIB 12512, NCIB 12513 a DSM 935 a/nebo

(vii) α -amyláza vykazující pozitivní imunologickou kros-reaktivitu s protilátkami vyrobenými proti α -amyláze, mající aminokyselinovou sekvenci odpovídající SEQ ID č. 1, ID č. 2 nebo ID č. 3 a/nebo

(viii) varianta matečné α -amylázy, kde matečná α -amyláza (1) má jednu z aminokyselinových sekvencí ukázanou na SEQ ID č. 1, ID č. 2 nebo ID č. 4, (2) vykazují alespoň 80 %homologii s jednou nebo více zmíněných aminokyselinových sekvencí a/nebo vykazuje imunologickou kros-reaktivitu s protilátkou získanou proti α -amyláze, mající jednu ze zmíněných aminokyselinových sekvencí a/nebo je kódována DNA sekvencí, která hybridizuje se stejnou značkou jako DNA sekvence kódující α -amylázu, mající jednu ze zmíněných aminokyselinových sekvencí, kde varianty: (A) alespoň jeden aminokyselinový zbytek zmíněné matečné α -amylázy byl vypuštěn, a/nebo (B) alespoň jeden aminokyselinový zbytek zmíněné matečné α -amylázy byl nahrazen jinou aminokyselinou a/nebo (C) alespoň jeden aminokyselinový zbytek byl inzerován ve srovnání se zmíněnou matečnou α -amylázou; přičemž zmíněné varianty mají α -amylázovou a vykazují alespoň jednu z následujících vlastností ve srovnání se zmíněnou matečnou α -amylázou: zvýšená termostabilita, zvýšená stabilita vůči oxidaci, snížená závislost na Ca iontech, zvýšená stabilita a/nebo α -amylolytická aktivita při neutrálním nebo relativně vysokém pH, zvýšený nebo snížený isoelektrický bod (pI) aby pI hodnoty pro α -amylázovou variantu lépe odpovídaly pH hodnotám média.

Polypeptid se pokládá za X % homologický k matečné amyláze, pokud srovnání odpovídajících aminokyselinových sekvencí, prováděné algoritmem jako např. popsáným v Lipman a Pearson v Science 227, 1985, 1435, potvrdí X% identitu.

V kontextu tohoto vynálezu označuje termín „získatelný z“ nejen to, že je amyláza produkována kmenem *Bacillus*, ale také to, že je amyláza kódována DNA sekvencí izolovanou z kmene *Bacillus* a produkována v hostitelském organismu transformovaném s DNA sekvencí.

III. Proteázové/amylázové kombinace - Ačkoliv libovolná jedna nebo více proteázových variant popsaných výše může být kombinováno s jednou nebo více amylázovými variantami, podle vysoce preferovaného provedení tohoto vynálezu zahrnují proteázové varianty substituční sadu: 101/103/104/159/232/236/245/248/252 a ještě preferovanější provedení obsahuje substituční sadu: 101G/103A/104I/232V/236H/245R/248D/252K.

Ačkoliv proteázové varianty a amylázové varianty podle tohoto vynálezu mohou být přítomny v čistících prostředcích v libovolném poměru ppm, preferovaný poměr proteázové varianty k amylázové variantě v ppm čistícího prostředku podle tohoto vynálezu v rozmezí od 1:20 do asi 20:1, s výhodou od asi 1:10 do asi 10:1, ještě výhodněji od 1:3 do 3:1.

Čistící prostředky

Čistící prostředky podle tohoto vynálezu zahrnují, kromě jedné nebo více proteázových variant popsaných výše, jednu nebo více pomocných čistících materiálů, s výhodou kompatibilní s proteázovou variantou. Termín „čistící přídavný materiál“ označuje libovolný kapalný, tuhý nebo plynný materiál, vybraný pro určitý typ čistícího přípravku určeného pro konkrétní formu produktu (např. kapaliny, granule, prášek, kus, pasta, sprej, tableta, gel, pěna), přičemž tyto materiály jsou s výhodou kompatibilní s proteázovými enzymy používanými v přípravku. Granulární přípravky mohou být také v „kompaktní“ formě a kapalné přípravky mohou být „koncentrované“ formě.

Konkrétní výběr čistících přídavných materiálů je snadno proveden na základě povrchu, druhu tkaniny určenému čištění a požadované formy přípravku pro zamýšlené čištění (např. pomocí pracího detergentu). Termín „kompatibilní“ označuje v tomto vynálezu, že materiály čistícího přípravku nesnižují proteolytickou aktivitu proteázových enzymů do takové míry, že by proteázy nebyly účinné jak je požadováno za normálních okolností. Příklady vhodných čistících přídavných materiálů zahrnují (výčet není úplný) surfaktanty, pojiva, bělidla, aktivátory bělení, katalyzátory bělení, další enzymy, systémy pro stabilizaci enzymů, chelanty, optické zjasňovače, polymery pro uvolňování špíny, činidla bránící přenosu barev, disperzanty, protipěnová činidla, barviva, parfémy, koloranty, soli plnidla, hydrotropy, fotoaktivátory, fluorescenční látky, kondicionéry látek, hydrolyzovatelné surfaktanty, preservativa, antioxidanty, látky proti smršťování, látky proti mačkání, germicidy, fungicidy, látky proti skvrnám, látky proti zákalu

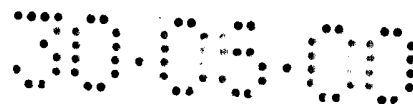
a/nebo antikorozivní látky, zdroje alkality, činidla pro rozpouštění, nosiče, pomocná výrobní činidla, pigmenty a látky na úpravu pH podle popisu U. S. Patent 5,705,464, 5,710,115, 5,698,504, 5,695,679, 5,686,014 a 5,646,101. Konkrétní materiály čistícího přípravku jsou detailně uvedeny v níže uvedených příkladech.

Pokud přídavné čistící materiály nejsou kompatibilní s proteázovou variantou v čistícím prostředku, může být použito vhodných metod udržujících čistící přídavné materiály a proteázové varianty oddělené (nejsou v přímém vzájemném kontaktu) až do doby použití čistícího přípravku. Vhodné metody mohou být libovolné metody známé v oboru, jako jsou gely, enkapsulace, tablety, fyzická separace a pod.

S výhodou je v přípravku na čištění různých povrchů, které vyžadují odstranění proteinových skvrn, zahrnuto účinné množství jedné nebo více výše popsaných proteázových variant. Tyto čistící přípravky zahrnují detergentní přípravky pro čištění tuhých povrchů, neomezené pokud jde o formu (např. kapalně a granulární), detergentní přípravky pro čištění tkanin, neomezené pokud jde o formu (např. granulární, kapalně a kouskové přípravky), přípravky na mytí nádobí (neomezené pokud jde o formu a zahrnující jak granulární tak i kapalně prostředky na automatické mytí nádobí), ústní čistící prostředky bez omezení pokud jde o formu (např. ústní voda, zubní pasta a prostředky na vyplachování ústní dutiny) a přípravky na čištění zubních náhrad bez omezení pokud jde o formu (např. kapaliny, tablety).

„Účinné množství proteázové varianty“ označuje v tomto vynálezu množství proteázové varianty popsané v tomto vynálezu, potřebné pro dosažení enzymatické aktivity nezbytné pro konkrétní čistící prostředek. Tato účinná množství jsou snadno určena odborníky v oboru na základě mnoha faktorů jako jsou konkrétní použité varianty, použití čistícího prostředku, konkrétní čistící přípravky, popř. zda je požadován kapalný nebo kusový čistící prostředek a pod.

S výhodou čistící prostředky zahrnují od asi 0,0001 %, s výhodou od asi 0,001 %, ještě výhodněji od 0,01 % (hmotnosti čistícího prostředku) jednu nebo více proteázových variant podle tohoto vynálezu do asi 10 %, s výhodou do asi 1 %, ještě výhodněji do 0,1 %. Také výhodně jsou proteázové varianty podle tohoto vynálezu přítomny v přípravcích v množstvích dostatečných pro zajištění poměru aktivní proteázy (v mg na 100 g přípravku) k ppm teoreticky dostupného O_2 („AvO₂“) z libovolné peroxykyseliny v pracím roztoku, který se zde označuje jako poměr enzymu a bělidla (E/B poměr), v rozmezí od asi 1:1 do asi 20:1. Několik příkladů různých čistících prostředků, v nichž mohou být použity proteázové varianty podle tohoto



vynálezu, je diskutováno dále. Čistící přípravky mohou také zahrnovat od 1% do asi 99,9 % hmotnosti přípravku pomocných čisticích materiálů.

Čistící prostředky podle tohoto vynálezu mohou být ve formě „tkaninových čisticích přípravků“ nebo jako „netkaninové čistící přípravky.“

„Tkaninové čistící přípravky“ zahrnují detergentní přípravky na ruční nebo automatické praní prádla včetně přídavných přípravků a kompozic vhodných pro použití při namáčení a/nebo předeprání zašpiněných tkanin.

„Netkaninové čistící přípravky“ zahrnují čistící přípravky na tuhé povrchy, detergentní přípravky na mytí nádobí, ústní čistící přípravky, čistící přípravky zubních náhrad a osobní čistící přípravky.

Jsou-li čistící přípravky podle tohoto vynálezu formulovány jako přípravky vhodné pro použití v automatickém praní prádla, obsahují přípravky podle tohoto vynálezu s výhodou jak surfaktant tak i pojivo a dále jeden nebo více čisticích přídavných materiálů, s výhodou vybraných ze skupiny organických polymerních látek, bělicích činidel, dalších enzymů, protipěnových činidel, disperzantů, změkčovadel, činidel podporujících suspendování špíny a bránících jejímu zpětnému usazování a inhibitorů koroze. Přípravky na praní prádla mohou také obsahovat změkčující činidla jako další čistící přídavné látky.

Přípravky podle tohoto vynálezu mohou být také použity jako detergentní aditivní produkty v tuhé nebo kapalné formě. Tyto aditivní produkty jsou zamýšleny pro doplnění nebo zesílení výkonu konvenčního detergentního přípravku a mohou být přidány v libovolném stupni čištění.

Jsou-li čistící přípravky podle tohoto vynálezu formulovány jako přípravky pro použití při manuálním mytí nádobí, s výhodou obsahují surfaktant a s výhodou i další čistící přídavné materiály jako jsou organické polymerní sloučeniny, činidla na zvýšení pěnivosti, kovy skupiny II, rozpouštědla, hydrotropy a další enzymy.

Pokud je potřeba, hustota pracích detergentních prostředků podle tohoto vynálezu se pohybuje v rozmezí od 400 do 1200 g/l, s výhodou od 500 do 950 g/l přípravku, měřeno při 20 °C.

„Kompaktní“ forma čisticích prostředků podle tohoto vynálezu je nejlépe popsána pomocí hustoty, a pokud jde o složení pomocí množství anorganické plnicí soli; anorganické plnicí soli jsou konvenční složky detergentních přípravků v práškové formě; v konvenčních detergentních přípravcích jsou plnicí soli přítomny ve značném množství, typicky od 17 do 35 % celkové hmotnosti přípravku. V kompaktních přípravcích jsou plnicí soli přítomny v množstvích

nepřesahujících 15 % celkové hmotnosti, s výhodou ne více než 10 %, nejvýhodněji ne více než 5 % celkové hmotnosti přípravku. Anorganické plnicí soli, ve smyslu tohoto vynálezu, jsou vybrány ze sulfátů a chloridů alkalických kovů a kovů alkalických zemin. Preferovanou plnicí solí je síran sodný.

Kapalné čisticí prostředky podle tohoto vynálezu mohou být také použity v „koncentrované formě“, v tomto případě bude kapalný čisticí prostředek podle tohoto vynálezu obsahovat menší množství vody ve srovnání s konvenčními kapalnými detergenty. Typicky bude obsah vody v koncentrovaných kapalných čisticích prostředcích nižší než 40 %, výhodněji menší než 30 %, nejvýhodněji nižší než 20 % hmotnosti čisticího prostředku.

Čisticí přídavné materiály

System surfaktantu

Detersivní surfaktanty představují v plně formulovaném čisticím přípravku podle tohoto vynálezu od alespoň 0,01 %, s výhodou alespoň 0,1 %, výhodněji alespoň 0,5 %, nejvýhodněji alespoň 1 % do 60 %, výhodněji do asi 35 %, nejvýhodněji do asi 30 % hmotnosti čisticího prostředku, v závislosti na konkrétním surfaktantu použitém pro požadované účinky.

Detersivní surfaktant může být neionický, anionický, amfolytický, zwitterionický, kationický, semipolární neionický a jejich směs, četné příklady jsou uvedeny v U. S. Patent 5,707,950 a 5,576,282. Preferovaný detergent a čisticí prostředky zahrnují anionické detersivní surfaktanty nebo směsi anionických surfaktantů s jinými surfaktanty, obzvláště neionickými surfaktanty.

Příklady surfaktantů užitečných podle tohoto vynálezu zahrnují konvenční C_{11} až C_{18} alkylbenzensulfonáty a primární, sekundární a náhodné alkylsulfáty, C_{10} až C_{18} alkylalkoxysulfáty, C_{10} až C_{18} alkylpolyglykosidy a jejich odpovídající sulfonované polyglykosidy, C_{12} až C_{18} α -sulfonované estery mastných kyselin, C_{12} až C_{18} alkyl a alkylfenolalkoxyláta (obzvláště ethoxyláty a směsi ethoxy/propoxy), C_{12} - C_{18} betainy a sulfobetainy („sultainy“), C_{10} až C_{18} aminoxidy a pod. Další konvenční užitečné surfaktanty jsou uvedeny ve standardních textech.

Surfaktant se s výhodou formuluje tak, aby byl kompatibilní s enzymovou složkou přítomnou v kompozici. V kapalných nebo gelových přípravcích je surfaktant nejvýhodněji formulován tak, aby povzbuzoval nebo alespoň nesnižoval stabilitu enzymu v těchto přípravcích.

Neionické surfaktanty

Polyethylen, polypropylen a polybutylenoxidové kondenzáty alkylfenolů jsou vhodné pro použití jako neionické surfaktantní systémy podle tohoto vynálezu, přičemž jsou preferovány polyethylenoxidové kondenzáty. Komerčně dostupné neionické surfaktanty tohoto typu zahrnují IgepalTM CO-630, prodáváný firmou GAF Corporation a TritonTM X-45, X-114, X-100 a X-102, prodávané firmou Rohm & Haas Company. Tyto surfaktanty jsou běžně označovány jako alkylfenolalkoxyláty (např. alkylfenoethoxyláty).

Kondenzační produkty primárních a sekundárních alifatických alkoholů s 1 až 25 moly ethylenoxidu jsou vhodné pro použití jako neionické surfaktanty v neionických surfaktantních systémech podle tohoto vynálezu. Příklady komerčně dostupných neionických surfaktantů tohoto typu zahrnují TergitolTM 15-S-9 (kondenzační produkt C₁₁ až C₁₅ lineárních alkoholů s 9 moly ethylenoxidu), TergitolTM 24-L-6 NMW (kondenzační produkt C₁₂ až C₁₄ primárního alkoholu se 6 moly ethylenoxidu s úzkou distribucí molekulových hmot), oba prodávané firmou Union Carbide Corporation; NeodolTM 45-9 (kondenzační produkt C₁₄ až C₁₅ lineárních alkoholů s 9 moly ethylenoxidu), NeodolTM 23-3 (kondenzační produkt C₁₂ až C₁₃ lineárních alkoholů se 7 moly ethylenoxidu), NeodolTM 45-5 (kondenzační produkt C₁₄ až C₁₅ lineárního alkoholu s 5 moly ethylenoxidu) prodávané firmou Shell Chemical Company, KyroTM EOB (kondenzační produkt C₁₃ až C₁₅ alkoholu s 9 moly ethylenoxidu), prodáváný firmou Procter & Gamble Company a Genapol LA O3O nebo O5O (kondenzační produkt C₁₂ až C₁₄ alkoholu se 3 až 5 moly ethylenoxidu), prodávané firmou Hoechst. Preferovaný rozsah HLB těchto produktů je od 8 do 11 a nejvýhodněji od 8 do 10.

Alkylpolysacharidy popsané v U. S. Patent 4,565,647 jsou užitečné neionické surfaktanty neionických surfaktantních systémů podle tohoto vynálezu.

Preferované alkylpolysacharidy mají vzorec $R^2O(C_nH_{2n}O)_t(glykosyl)_x$, kde R² je vybrán ze skupiny obsahující alkyl, alkylfenyl, hydroxyalkyl, hydroxyalkylfenyl a jejich směsi, kde alkylová skupina obsahuje od 10 do 18, s výhodou od 12 do 14 uhlíkových atomů, n je 2, nebo 3, s výhodou 2, t je od 0 do asi 10, s výhodou 0 a x je od 1,3 do asi 10, s výhodou od 1,3 do asi 3, nejvýhodněji od 1,3 do asi 2,7.

Kondenzační produkty ethylenoxidu s hydrofobní bází vzniklou kondenzací propylenoxidu s propylenglykolem jsou také vhodné pro použití jako dodatečné neionické surfaktantní systémy podle tohoto vynálezu. Příklady sloučenin tohoto typu zahrnují některé komerčně dostupné surfaktanty PlurafacTM LF404 a PluronicTM, prodávané firmou BASF.

Také vhodné pro neionické surfaktanty z neionických surfaktantních systémů podle tohoto vynálezu jsou kondenzační produkty ethylenoxidu s produktem, vzniklým reakcí propylenoxidu a ethylendiaminu. Příklady tohoto typu neionických surfaktantů zahrnují některé komerčně dostupné sloučeniny TetronicTM, prodávané firmou BASF.

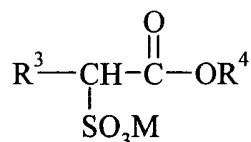
Preferované neionické surfaktanty surfaktantních systémů podle tohoto vynálezu jsou polyethylenoxidové kondenzáty alkylfenolů, kondenzační produkty primárních nebo sekundárních alifatických alkoholů s 1 až 25 moly ethylenoxidu, alkylpolysacharidy a jejich směsi. Nejpreferovanější jsou C₈ až C₁₄ alkylfenoethoxyláty mající od 3 do 15 ethoxyskupin a C₈ až C₁₈ alkoethoxyláty (s výhodou průměrně C₁₀) mající od 2 do 10 atomů uhlíku a jejich směsi.

Vysoce preferované neionické surfaktanty jsou amidy polyhydroxymastných kyselin obecného vzorce: R²-C(O)-N(R¹)-Z, kde R¹ je H nebo R¹ je C₁ až C₄ hydrokarbyl, 2-hydroxyethyl, 2-hydroxypropyl nebo jejich směsi; R² je C₅ až C₃₁ hydrokarbyl a Z je polyhydroxyhydrokarbyl, mající lineární uhlovodíkový řetězec s nejméně 3 hydroxyly přímo napojenými na řetězec nebo jejich alkoxylované deriváty. S výhodou R¹ je methyl, R² je rovný C₁₁ až C₁₅ alkyl nebo C₁₆ až C₁₈ alkylový nebo alkenylový řetězec jako třeba kokosový alkyl nebo jejich směsi a Z je odvozený od redukujícího cukru jako je glukosa, fruktosa, maltosa, laktosa v reduktivní aminační reakci.

Anionické surfaktanty

Vhodné anionické surfaktanty pro použití podle tohoto vynálezu jsou lineární alkylbenzenové sulfonáty, alkylestersulfonátové surfaktanty včetně lineárních esterů C₈ až C₂₀ karboxylových kyselin (to jest mastných kyselin), které jsou sulfonovány s plynným SO₃ podle Journal of the American Oil Chemists Society, 52 (1975), str. 323-329. Vhodné výchozí látky by zahrnovaly přírodní mastné kyseliny odvozené od loje, palmového oleje a pod.

Preferované alkylestersulfonátové surfaktanty, obzvláště pro praní prádla, zahrnují alkylesterové sulfonátové surfaktanty obecného vzorce:



kde R³ je C₈ až C₂₀ hydrokarbyl, s výhodou alkyl, nebo jejich kombinace, R⁴ je C₁ až C₆ hydrokarbyl, s výhodou alkyl nebo jejich kombinace a M je kation, který vytváří vodorozpustnou sůl s alkylestersulfonátem. Vhodný kation vytvářející sůl zahrnuje kovy jako jsou sodík, draslík a

lithium a substituované nebo nesubstituované amonné kationty jako jsou monoethanolamin, diethanolamin a triethanolamin. S výhodou R^3 je C_{10} až C_{16} alkyl a R^4 je methyl, ethyl nebo isopropyl. Obzvláště preferované jsou methylestersulfonáty, kde C_{10} až C_{16} alkyl.

Další vhodné anionické surfaktanty zahrnují alkylsulfátové surfaktanty, které jsou vodorozpustné soli kyselin obecného vzorce $ROSO_3M$, kde R je s výhodou C_{10} až C_{24} uhlovodíkový zbytek, s výhodou alkyl nebo hydroxylalkyl, mající C_{10} až C_{20} alkylovou komponentu, výhodněji C_{12} až C_{18} alkyl nebo hydroxyalkyl a M je H nebo kation. Typicky, jsou preferovány alkylové C_{12} až C_{16} řetězce pro nižší prací teploty (např. pod teploty $50\text{ }^\circ\text{C}$) a C_{16} až C_{18} alkylové řetězce pro vyšší prací teploty (např. nad teploty $50\text{ }^\circ\text{C}$).

Další anionické surfaktanty užitečné pro deteršivní účely zahrnují soli mýdel, C_8 až C_{22} primární nebo sekundární alkansulfonáty, C_8 až C_{24} olefinsulfonáty, sulfonované polykarboxylové kyseliny připravené sulfonací pyrolyzovaných produktů citrátů kovů alkalických zemin, např. popsané v britské patentové specifikaci 1,082,179, C_8 až C_{24} alkylpolyglykolethersulfáty (obsahující až 10 molů ethylenoxidu); alkylglycerolsulfonáty, mastné acylglycerín sulfonáty, mastné oleylglycerínsulfáty, alkylfenoletylenoxidether sulfáty, parafinsulfonáty, alkylfosfáty, isethionáty jako jsou acylisethionáty, N-acyltauráty, alkylsukcináty a sulfosukcináty, monoestery sulfosukcinátů (obzvláště nasycené a nenasycené C_{12} až C_{18} monoestery) a diestery sulfosukcinátů (obzvláště nasycené nebo nenasycené C_6 až C_{12} diestery), acylsarkosináty, sulfáty alkylpolysacharidy jako jsou sulfáty alkylpolyglukosidů (neionické nesulfátované sloučeniny popsané níže), větvené primární alkylsulfáty a alkylpolyethoxykarboxyláty jako jsou sloučeniny obecného vzorce $RO(CH_2CH_2O)_k-CH_2COO^-M^+$, kde R je C_8 až C_{22} alkyl, k je celé číslo od 1 do 10 a M je rozpustný sůl vytvářející kation. Pryskyřičné kyseliny a hydrogenované pryskyřičné kyseliny jsou také vhodné, jako např. rosin, hydrogenovaný rosin a pryskyřičné kyseliny a hydrogenované pryskyřičné kyseliny přítomné v tallovém oleji nebo z něho odvozené.

Další příklady jsou popsány v „Surface Active Agents and Detergents“ (vol. I a II, Schwartz, Perry a Berch). Množství těchto surfaktantů je také obecně popsáno v U. S. Patentu 3,929,678, vydaném 30. prosince 1975 (Laughlin et al.) na sloupci 23, řádka 58 až sloupci 29, řádce 23 (zde zahrnutý jako reference).

Vysoce preferované anionické surfaktanty zahrnují alkylalkoxylované sulfátové surfaktanty podle tohoto vynálezu jsou vodo-rozpustné soli nebo kyseliny obecného vzorce $RO(A)_mSO_3M$, kde R je nesubstituovaný C_{10} až C_{24} alkyl nebo hydroxyalkylová skupina, mající

C_{10} až C_{24} alkylovou komponentu, s výhodou C_{12} až C_{20} alkyl nebo hydroxyalkyl, výhodněji C_{12} až C_{18} alkyl nebo hydroxylalkyl, A je ethoxy nebo propoxyjednotka, m je vyšší než nula, typicky mezi 0,5 a asi 6, výhodněji mezi 0,5 a asi 3 a M je H nebo kation, který může být např. kation kovu (např. sodík, draslík, lithium, vápník, hořčík a pod.), amonný nebo substituovaný kation. Alkylethoxylované sulfáty stejně jako alkylpropoxylované sulfáty jsou zde také zahrnuty. Konkrétní příklady substituovaných amonných kationtů zahrnují methyl-, dimethyl-, trimethylamonné kationty a kvartérní amonné kationty jako tetramethylamonium a dimethylpiperidiniový kation a dále ty, které jsou odvozené od alkylaminů jako jsou ethylamin, diethylamin, triethylamin, jejich směsi a pod. Příklady surfaktantů jsou C_{12} až C_{18} alkylpolyethoxylát (1,0) sulfát (C_{12} až $C_{18}E(1,0)M$), C_{12} až C_{18} alkylpolyethoxylát (2,25) sulfát (C_{12} až $C_{18}E(2,25)M$), C_{12} až C_{18} alkylpolyethoxylát (3,0) sulfát (C_{12} až $C_{18}E(3,0)M$) a C_{12} až C_{18} alkylpolyethoxylát (4,0) sulfát (C_{12} až $C_{18}E(4,0)M$), kde M je konvenčně vybrán ze skupiny obsahující sodík a draslík.

Jsou-li obsaženy v čistících prostředcích podle tohoto vynálezu, typicky anionické surfaktanty tvoří od 1 % , s výhodou od 3 % do asi 4 % , s výhodou kolem 20 % hmotnosti čistícího prostředku.

Kationické surfaktanty

Kationické deteršivní surfaktanty pro použití v čistících prostředcích podle tohoto vynálezu jsou surfaktanty, mající jednu dlouhou uhlovodíkovou skupinu. Příklady těchto kationických surfaktantů zahrnují amonné surfaktanty jako jsou alkyltrimethylamonium halogenidy a surfaktanty mající obecný vzorec $[R^2(OR^3)_y][R^4(OR^3)_2R^5N^+X^-]$, kde R^2 je alkyl nebo alkylbenzyllová skupina, mající od 8 do asi 18 uhlíkových atomů v alkylovém řetězci, každý R^3 je vybrán ze skupiny obsahující $-CH_2CH_2-$, $-CH_2CH(CH_3)-$, $-CH_2CH(CH_2OH)-$, $-CH_2CH_2CH_2-$ a jejich směsi; každý R^4 je vybrán ze skupiny obsahující C_1 až C_4 alkyl, C_1 až C_4 hydroxyalkyl, benzyllové kruhové struktury vzniklé spojením dvou R^4 skupin, $-CH_2CHOH-CHOHCOR^6CHOHCH_2OH$, kde R^6 je libovolná hexosa nebo hexosový polymer, mající molekulovou hmotnost nižší než 1000 a vodík, když y není 0; R^5 je stejný jako R^4 nebo je alkylový řetězec, když celkový počet atomů uhlíku v R^2 plus R^5 není vyšší než asi 18; každý y je od 0 do asi 10 a součet hodnot y je od 0 do asi 15; X je libovolný kompatibilní anion.

Vysoce preferované kationické surfaktanty, užitečné v přípravcích podle tohoto vynálezu, jsou vodo-rozpustné kvartérní amonné sloučeniny, mající vzorec (i): $R_1R_2R_3R_4N^+X^-$, kde R_1 je C_8 až C_{16} alkyl, každý R_2 , R_3 a R_4 je nezávisle C_1 až C_4 alkyl, C_1 až C_4 hydroxylalkyl, benzyl a -

$(C_2H_4)_xH$, kde x má hodnotu od 2 do 5 a X je anion. Ne více než jeden z R_2 , R_3 nebo R_4 by měl být benzylem. Délka preferovaného alkylového řetězce pro R_1 je C_{12} až C_{15} , obzvláště kde alkylová skupina je směsí různých délek řetězců odvozených od kokosového nebo palmového oleje nebo je derivován synteticky výstavbou olefinů nebo OXO syntézou alkoholů. Preferované skupiny pro R_2R_3 a R_4 jsou methyl a hydroxyethyllová skupina a anion X může být vybrán ze skupiny obsahující halidy, methosulfát, acetát a fosfát.

Příklady vhodných kvarterních amonných sloučenin vzorce (i) pro použití podle tohoto vynálezu zahrnují, výčet není úplný, kokosový trimethylamonium chlorid nebo bromid, kokosový methyldihydroxyethylamonium chlorid nebo bromid, decyltriethylamonium chlorid, decyldimethylhydroxyethylamonium chlorid nebo bromid, C_{12} až C_{15} dimethylhydroxyethylamonium chlorid nebo bromid, kokosový dimethylhydroxyethylamonium chlorid nebo bromid, myristyltrimethylamonium methylsulfát, lauryldimethylbenzylamonium chlorid nebo bromid, lauryldimethyl(ethenoxy)₄amonium chlorid nebo bromid, cholinové estery (sloučeniny obecného vzorce (i), kde R_1 je $CH_2-CH_2-O-C(=O)-C_{12-14}$ alkyl a $R_2R_3R_4$ jsou methyl) a di-alkylimidazolinu [(i)].

Další kationické surfaktanty užitečné podle tohoto vynálezu jsou také popsány v U. S. Patentu 4,228,044 (Cambre), vydaném 14. října 1980 a v Evropské patentové přihlášce EP 000,224.

Jsou-li zahrnuty v čistících přípravcích podle tohoto vynálezu, kationické surfaktanty typicky představují od asi 0,2 %, s výhodou od 1 % do asi 25 %, s výhodou do asi 8 % hmotnosti přípravku.

Amfolytické surfaktanty

Amfolytické surfaktanty, jejichž příklady jsou popsány v U. S. Patent 3,929,678, jsou také vhodné pro použití v čistících prostředcích podle tohoto vynálezu.

Jsou-li zahrnuty v čistících přípravcích podle tohoto vynálezu, amfolytické surfaktanty typicky představují od asi 0,2 %, s výhodou od 1 % do asi 15 %, s výhodou do asi 10 % hmotnosti přípravku.

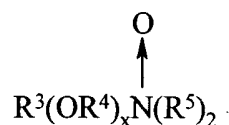
Zwitterionické surfaktanty

Zwitterionické surfaktanty, jejichž příklady jsou popsány v U. S. Patent 3,929,678, jsou také vhodné pro použití v čistících prostředcích podle tohoto vynálezu.

Jsou-li zahrnuty v čistících přípravcích podle tohoto vynálezu, zwitterionické surfaktanty typicky představují od asi 0,2 %, s výhodou od 1 % do asi 15 %, s výhodou do asi 10 % hmotnosti přípravku.

Semipolární neionické surfaktanty

Semipolární neionické surfaktanty jsou speciální kategorií, která zahrnuje vodo-rozpustné aminoxidy, mající vzorec:



kde R^3 je alkyl, hydroxyalkyl nebo alkylfenylová skupina nebo jejich směsi obsahující od 8 do asi 22 uhlíkových atomů; R^4 je alkylénová nebo hydroxyalkylénová skupina obsahující od 2 do asi 3 uhlíkových atomů; x je od 0 do asi 3; a každý R^5 je alkyl nebo hydroxyalkylová skupina obsahující od 1 do asi 3 uhlíkových atomů nebo polyethylenoxidová skupina obsahující od 1 do asi 3 ethylenoxidových jednotek (R^5 skupiny mohou být připojeny navzájem, například prostřednictvím kyslíku nebo dusíku za vzniku kruhové struktury); vodo-rozpustné fosfinové oxidy obsahující jednu alkylskupinu od 10 do asi 18 atomů uhlíku a 2 skupiny vybrané ze skupiny obsahující alkylové skupiny a hydroxyalkylové skupiny obsahující od 1 do asi 3 uhlíkových atomů a vodo-rozpustné sulfoxidy obsahující jednu alkylovou jednotku od 10 do asi 18 uhlíkových atomů a jednotku vybranou ze skupiny obsahující alkyl nebo hydroxyalkylové jednotky mající od 1 do asi 3 atomů uhlíku.

Aminoxidové surfaktanty obzvláště zahrnují C_{10} až C_{18} alkyldimethylaminoxidy a C_8 až C_{12} alkoxyethyldihydroxyethylamin oxidy.

Jsou-li zahrnuty v čistících přípravcích podle tohoto vynálezu, semipolární neionické surfaktanty typicky představují od asi 0,2 %, s výhodou od 1 % do asi 15 %, s výhodou do asi 10 % hmotnosti přípravku.

Kosurfaktanty

Čistící přípravky podle tohoto vynálezu mohou dále obsahovat kosurfaktant vybraný ze skupiny obsahující primární nebo terciální aminy. Vhodné primární aminy k použití podle tohoto vynálezu zahrnují aminy podle obecného vzorce R_1NH_2 , kde R_1 je C_6 až C_{12} , s výhodou C_6 až C_{10} alkylový řetězec nebo $\text{R}_4\text{X}(\text{CH}_2)_n$, X je $-\text{O}-$, $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ nebo $-\text{NH}-$, R_4 je C_6 až C_{12} alkylový řetězec, n je mezi 1 až 5, s výhodou 3, R_1 alkylové řetězce mohou být rovné nebo rozvětvené a mohou být přerušovány až se 12, s výhodou méně než 5 ethylenoxidovými jednotkami.

Preferované aminy podle výše uvedeného vzorce jsou n-alkylaminy. Vhodné aminy pro použití podle tohoto vynálezu mohou být vybrány z 1-hexylaminu, 1-oktylaminu, 1-decylaminu a laurylaminu. Další preferované primární aminy zahrnují C_8 až C_{10} oxypropylamin, oktyloxypropylamin, 2-ethylhexyloxypropylamin, laurylamidopropylamin a amidopropylamin. Nejpreferovanější aminy pro použití v prostředcích podle tohoto vynálezu jsou 1-hexylamin, 1-decylamin, 1-dodecylamin. Obzvláště vhodné jsou n-dodecyldimethylamin a bis(hydroxyethyl)kokosalkylamin a oleylamin sedmkrát hydroxylovaný, laurylamidopropylamin a kokoamidopropylamin.

LFNS

Obzvláště preferované surfaktanty pro přípravky určené pro automatické mytí nádobí (ADD) podle tohoto vynálezu jsou nízkopěňivé neionické surfaktanty (LFNI), které jsou popsány v U. S. Patent 5,705,464 a 5,710,115. LFNI mohou být přítomny v množstvích od 0,01 % do asi 10 % hmotnosti, s výhodou od asi 0,1 % do přibližně 10 % a nejvýhodněji od asi 0,25 % do asi 4 %. LFNI jsou nejtypičtěji použity v ADD na základě jejich zvýšené schopnosti potahovat vodou (obzvláště pokud jde o sklo), kterou vnášejí do ADD produktů. Mohou také zahrnovat nesilikonové, nefosfátové polymerní materiály dále ilustrované, které jsou známy tím, že odštěňují zbytky jídel s nimiž se setkávají v myčkách nádobí.

Preferované LFNI zahrnují neionické alkoxylované surfaktanty, obzvláště ethoxylované deriváty primárních alkoholů a jejich směsi se sofistikovanějšími surfaktanty, jako třeba polyoxypropylen/polyoxyethylen/polyoxypropylen (PO/PE/PO) reverzní blokované polymery podle popisu v U. S. Patent 5,705,464 a 5,710,115.

LFNI, které mohou být použity, zahrnují také POLY-TERGENT® SLF-18 neionické surfaktanty od firmy Olin Corp., a libovolné biodegradovatelné LFNI mající výše diskutované vlastnosti týkající se bodu tání.

Tyto a další neionické surfaktanty jsou dobře známé v oboru a jsou detailněji popsány v Kirk Otmer's Encyklopedia of Chemical Technology, 3. vydání, vol. 22. str. 360-379, „Surfactants and Detergent Systems“, zahrnuté zde jako reference.

Bělicí systém

Čistící prostředky podle tohoto vynálezu s výhodou obsahují bělicí systém. Bělicí systém typicky obsahuje „bělicí činidlo“ (zdroj peroxidu vodíku) a „iniciátor“ nebo „katalyzátor“. Jsou-li přítomny, bělicí činidla budou typicky v množstvích od asi 1 %, s výhodou od asi 5 % do asi 30 %, s výhodou od 20 % hmotnosti přípravku. Jsou-li přítomny, množství bělicího aktivátoru

bude typicky od asi 0,1 %, s výhodou od asi 0,5 % do asi 60 %, s výhodou do asi 40 % hmotnosti bělicího přípravku, zahrnujícího bělicí činidlo plus aktivátor bělení.

Bělicí činidla

Zdroje peroxidu vodíku jsou detailně popsány ve zde zahrnuté Kirk Othmer's Encyclopedia of Chemical Technology, 4. vydání (1992, John Wiley & Sons), vol. 4, str. 271-300. „Bleaching Agents (Survey)“ a zahrnují různé formy peroxyboritanu sodného a peroxyuhličitanu sodného, včetně různých potáhnutých a modifikovaných forem.

Preferovaný zdroj peroxidu vodíku použitý v tomto vynálezu může být libovolný zdroj, včetně samotného peroxidu vodíku. Například, perborát, třeba perborát sodný (libovolný hydrát ovšem s výhodou mono- nebo tetra hydrát), uhličitan sodný peroxyhydrát nebo ekvivalentní peruhličitanová sůl, pyrofosfát sodný peroxyhydrát, peroxyhydrát močoviny nebo peroxid sodný. Také jsou užitečné zdroje dostupného kyslíku jako třeba persulfátová bělidla (např. OXONE, vyráběný firmou DuPont). Perborát sodný monohydrát a perkarbonát sodný jsou obzvláště preferovány. Směsi libovolných zdrojů kyslíku mohou být také použity.

Preferovaná perkarbonátová bělidla zahrnují částice mající v průměru velikost v rozsahu od asi 500 mikrometrů do přibližně 1000 mikrometrů, ne více než asi 10 % hmotnosti zmíněných částic není menších než 200 mikrometrů a ne více než 10 % hmotnosti částic je větších než 1250 mikrometrů. Perkarbonát může být případně pokryt se silikátem, borátem nebo vodo-rozpustným surfaktantem. Perkarbonát je dostupný z různých komerčních zdrojů jako jsou FMC, Solvay a Tokai Denka.

Přípravky podle tohoto vynálezu mohou také zahrnovat bělicí činidlo chlorového typu. Tato činidla jsou velmi dobře známa v oboru a zahrnují např. dichlorisokyanurát sodný („NaDCC“). Ovšem bělicí činidla chlorového typu jsou méně preferována pro přípravky obsahující enzymy.

(a) Bělicí aktivátory

Bělicí složka s výhodou obsahuje aktivátor (prekursor perkyseliny). Aktivátor je přítomen v koncentracích od asi 0,01 %, s výhodou od asi 0,5 %, výhodněji od 1 % do přibližně 15 %, výhodněji 10 %, ještě výhodněji asi 8 % hmotnosti přípravku. Preferované aktivátory jsou vybrány ze skupiny obsahující tetraacetyethylendiamin (TAED), benzoylkaprolaktam (BzCl), 4-nitrobenzoylkaprolaktam, 3-chlorbenzoylkaprolaktam, benzoyloxybenzensulfonát (BOBS), nonanoyloxybenzensulfonát (NOBS), fenylbenzoát (PhBz), dekanoyloxybenzensulfonát (C₁₀-OBS), benzoylvalerolaktam (BZVL), oktanoyloxybenzensulfonát (C₈-OBS), perhydrolyzovatelné

estery a jejich směsi, nejvýhodněji benzoylkaprolaktam a benzoylvalerolaktam. Obzvláště výhodné jsou aktivátory pro pH rozsah od 8 do asi 9,5, které mají OBS nebo VL odstupující skupinu.

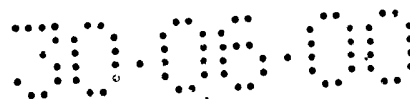
Preferované hydrofobní bělicí aktivátory zahrnují (výčet není úplný) nonanoyloxybenzensulfonát (NOBS), sodná sůl 4-[N-(nonanoyl)aminohexanoyloxy]-benzensulfonátu (NACA-OBS), jejichž příklady jsou popsány v U. S. Patent 5,523,434, dodekanoyloxybenzensulfonát (LOBS nebo C₁₂-OBS), 10-undecenoyloxybenzensulfonát (UDOBS nebo C₁₁-OBS) s nenasycením v poloze 10 a dekanoyloxybenzoová kyselina (DOBA).

Preferované aktivátory bělení jsou popsány v U. S. Patent 5,698,504 (Christie et al.) vydaném 16. prosince 1997; U. S. Patent 5,695,679 (Christie et al.) vydaném 9. prosince 1997; U. S. Patent 5,686,401 (Willey et al.) vydaném 11. listopadu 1997; U. S. Patent 5,686,014 (Hartshorn et al.) vydaném 11. listopadu 1997; U. S. Patent 5,405,412 (Willey et al.) vydaném 11. dubna 1995; U. S. Patent 5,405,413 (Willey et al.) vydaném 11. dubna 1995; U. S. Patent 5,130,045 (Mitchel et al.) vydaném 14. července 1992 a U. S. Patent 4,412,934 (Chung et al.) vydaném 1. listopadu 1983 a dosud nevyřízené patentové přihlášky U. S. pořadové číslo 08/709,072, 08/064,564, které jsou zde zahrnuty jako reference.

Molární poměr peroxydového bělicího činidla (AvO) k bělicímu aktivátoru v tomto vynálezu je obecně v rozsahu od nejméně 1:1 do asi 20:1, výhodněji od 10:1 do asi 1:1, s výhodou do asi 3:1.

Mohou být také zahrnuty kvartérní substituované bělicí aktivátory. Současné čistící prostředky s výhodou zahrnují kvartérní substituované bělicí aktivátory (QSBA) nebo kvartérní substituované perkyseliny (QSP), přičemž výhodnější je dříve uvedený. Preferované QSBA struktury jsou dále popsány v U. S. Patent 5,686,015 (Willey et al.), vydaném 11. listopadu 1997; U. S. Patent 5,654,421 (Taylor et al.), vydaném 5. srpna 1997; U. S. Patent 5,460,747 (Gosselink et al.), vydaném 24. října 1995; U. S. Patent 5,584,888 (Miracle et al.), vydaném 17. prosince 1996 a U. S. Patent 5,578,136 (Taylor et al.), vydaném 26. listopadu 1996, které jsou zde všechny zahrnuty jako reference.

Vysoce preferované bělicí aktivátory použitelné v tomto vynálezu jsou amidsubstituované aktivátory, jak je popsáno v U. S. Patent 5,698,504, U. S. Patent 5,695,679 a U. S. Patent 5,686,014, které jsou zde všechny zahrnuty jako reference. Preferované příklady těchto aktivátorů bělení zahrnují: (6-oktanamidokaproyl)oxybenzensulfonát, (6-



nonanamidokaproyl)oxybenzensulfonát, (6-dekanamidokaproyl)oxybenzensulfonát a jejich směsi.

Další užitečné aktivátory jsou popsány v U. S. Patent 5,698,504, U. S. Patent 5,695,679, U. S. Patent 5,686,014, které jsou zde všechny zahrnuty jako reference a U. S. Patent 4,966,723 (Hodge et al.), vydaném 30. října 1990 a zahrnují aktivátory bezoxazinového typu, jako třeba C_6H_4 kruh, ke kterému je přikondenzována v polohách 1,2 skupina $-C(O)OC(R^1)=N$.

V závislosti na aktivátoru a použití mohou být získány dobré bělicí účinky z bělicích systémů majících použití při pH od 6 do 13, s výhodou od asi 9,0 do asi 10,5. Typicky se používají aktivátory s elektron přitahujícími skupinami pro neutrální nebo subneutrální pH. Pro zajištění takového pH lze použít alkálie a pufovací činidla.

Acyllaktamové aktivátory, podle popisu v U. S. Patent 5,698,504, U. S. Patent 5,695,679 a U. S. Patent 5,686,014, které jsou zde všechny zahrnuty jako reference, jsou velmi užitečné podle tohoto vynálezu, obzvláště acylkaprolaktamy (viz. například WO 94-28102 A) a acylvalerolaktamy (viz. U. S. Patent 5,503,639 (Willey et al.), vydaný 2. dubna 1996), které jsou zde zahrnuty jako reference.

(b) Organické peroxidy, obzvláště diacylperoxidy

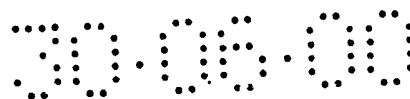
Tyto jsou široce dokumentovány v Kirk Othmer, Encyclopedia of Chemical Technology, vol. 17, John Wiley and Sons, 1982 na str. 27-90 a obzvláště na str. 63 až 72, všechny jsou zde zahrnuty jako reference. Jestliže je použit diacylperoxid, bude to s výhodou ten, který vykazuje minimální negativní vliv na tvorbu skvrn nebo vytváření filmů.

(c) Bělicí katalyzátory obsahující kov

Přípravky podle tohoto vynálezu a metody zde obsažené mohou využívat bělicích katalyzátorů s obsahem kovu, které jsou užitečné pro použití v bělicích přípravcích. Preferovány jsou bělicí katalyzátory s obsahem kobaltu a manganu.

Jeden typ katalyzátoru bělení obsahujícího kov je katalytický systém zahrnující kation přechodného kovu s definovanou bělicí katalytickou aktivitou, jako je měď, železo, titan, ruthenium, wolfram, molybden nebo mangan, pomocný kovový kation mající žádnou nebo jen malou bělicí aktivitu jako jsou zinek nebo hliník a sequestrant, mající definovanou konstantu stability pro kationty katalytického a pomocného kovu, obzvláště ethylendiamintetraoctová kyselina, ethylendiamintetra(methylenfosforečná kyselina) a jejich vodo-rozpustné soli. Takovéto katalyzátory jsou popsány v U. S. Patent 4,430,243 (Bragg), vydaném 2. února 1982.

Komplexy manganu



Je-li to požadováno, přípravky podle tohoto vynálezu mohou být katalyzovány pomocí sloučenin manganu. Takovéto sloučeniny a jejich koncentrace jsou známy v oboru a zahrnují například katalyzátory na bázi manganu popsané v U. S. Patent 5,576,282, U. S. Patent 5,246,621, U. S. Patent 5,244,594, U. S. Patent 5,194,416 a U. S. Patent 5,114,606 a publikace Evropské patentové přihlášky 549,271 A1, 549,272 A1, 544,440 A2 a 544,490 A1; Preferované příklady těchto katalyzátorů zahrnují $\text{Mn}^{\text{IV}}_2(\text{u-O})_3(1,4,7\text{-trimethyl-1,4,7-triazacyklononan})_2(\text{PF}_6)_2$, $\text{Mn}^{\text{III}}_2(\text{u-O})_1(\text{u-OAc})_2(1,4,7\text{-trimethyl-1,4,7-triazacyklononan})_2(\text{ClO}_4)_2$, $\text{Mn}^{\text{IV}}_4(\text{u-O})_6(1,4,7\text{-triazacyklononan})_4(\text{ClO}_4)_4$, $\text{Mn}^{\text{III}}\text{Mn}^{\text{IV}}_4(\text{u-O})_1(\text{u-OAc})_2(1,4,7\text{-trimethyl-1,4,7-triazacyklononan})_2(\text{ClO}_4)_3$, $\text{Mn}^{\text{IV}}(1,4,7\text{-trimethyl-1,4,7-triazacyklononan})(\text{OCH}_3)_3(\text{PF}_6)$ a jejich směsi. Další bělicí katalyzátory na bázi kovů zahrnují katalyzátory popsané v U. S. Patentu 4,430,243 a U. S. Patentu 5,114,611. Použití manganu s různými komplexními ligandy ke zvýšení bělicího účinku jsou také popsány v následujících U. S. Patentech 4,728,455, 5,284,944, 5,246,612, 5,256,779, 5,280,117, 5,274,147, 5,153,161 a 5,227,084.

Komplexy kobaltu

Kobaltové bělicí katalyzátory užitečné v tomto vynálezu jsou popsány například v U. S. Patent 5,597,936, U. S. Patent 5,595,967 a U. S. Patent 5,703,030 a M. L. Tobe, „Base Hydrolysis of Transition-Metal Complexes“, Adv. Inorg. Bioinorg. Mech., (1983), 2, str. 1-94. Nejpreferovanější kobaltový katalyzátor užitečný podle tohoto vynálezu jsou kobaltové soli pentaaminacetátu, mající vzorec $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{OAc}]\text{T}_y$, kde „OAc“ reprezentuje acetátovou jednotku a „T_y“ je anion a obzvláště kobalt pentaaminacetát chlorid $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{OAc}]\text{Cl}_2$ stejně jako $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{OAc}](\text{OAc})_2$, $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{OAc}](\text{PF}_6)_2$, $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{OAc}](\text{SO}_4)$, $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{OAc}](\text{BF}_4)_2$ a $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{OAc}](\text{NO}_3)_2$ (označovaný jako „PAC“).

Tyto kobaltové katalyzátory jsou snadno připravovány známými postupy, jako třeba těmi popsány v U. S. Patent 5,597,936, U. S. Patent 5,595,967 a U. S. Patent 5,703,030, v Tobeho článku a referencích tam uvedených a v U. S. Patent 4,810,410, J. Chem. Ed. (1989), 66, (12), 1043-45, The Synthesis and Characterization of Inorganic Compounds, W. L. Jolly (Prentice-Hall, 1970), str. 461-3, Inorg. Chem., 18, 1497-1502 (1979), Inorg. Chem., 21, 2881-2885 (1982), Inorg. Chem., 18, 2023-2025 (1979), Inorg. Synthesis, 173-176 (1960) a Journal of Physical Chemistry, 56, 22-25 (1952).

Komplexy přechodných kovů s makropolycyklickými rigidními ligandy

Přípravky podle tohoto vynálezu mohou také výhodně obsahovat jako bělicí katalyzátor komplexy přechodných kovů s makropolycyklickými rigidními ligandy. Termín

„makropolycyklický rigidní ligand“ je někdy v níže uvedené diskusi zkracován jako „MLR“. Množství použité v přípravcích je katalyticky účinné množství, vhodně kolem 1 ppb nebo více, například až do asi 99,9 %, typičtěji kolem 0,001 ppm nebo více, s výhodou od asi 0,05 ppm do asi 500 ppm (kde „ppb“ označuje part per bilion podle hmotnosti a „ppm“ označuje part per milion podle hmotnosti).

Vhodné přechodné kovy např. Mn jsou ilustrovány dále. „Makropolycyklický“ označuje že MLR je zároveň makrocyclický a polycyklický. „Polycyklický“ znamená, že je nejméně bicyklický. Termín „rigidní“ označuje fakt, že jde o „superstrukturu“ a „křížem přemostěnou“ strukturu. „Rigidní“ byl definován jako vynucený opak flexibilního: viz. D. H. Busch., Chemical Reviews., (1993), 93, 847-860, zahrnuté zde jako reference. Konkrétněji, „rigidní“ znamená, že MLR musí být určitelně více rigidní než je makrocylus („matečný makrocyclus“), který by byl jinak identický (mající stejnou velikost kruhu a typ a počet atomů v hlavním kruhu) ovšem postrádá superstrukturu (obzvláště spojovací jednotku, s výhodou přemostřující jednotky), nalézající se v MLR. Při určování komparativní rigidity makrocyclů se superstrukturou nebo bez superstruktury, bude hodnotitel používat volnou formu (nikoliv formu s vázaným kovem) makrocyclu. Je známo, že rigidita je velmi užitečná při srovnávání makrocyclů, vhodné způsoby určování, měření srovnatelné rigidity zahrnují výpočetní metody (viz. např.: Zimmer, Chemical Reviews, (1995), 95(38), 2629-2648 nebo Hancock et al., Inorganica Chimica Acta, (1989), 164, 73-84.

Preferované MLR podle tohoto vynálezu jsou speciální typ ultrarigidního ligandu, který je přemostěn. „Přemostění“ je nikoliv limitně popsáno v níže uvedeném 1.11. V 1.11 je přemostěním $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ jednotka. Tato jednotka křížem přemostřuje N^1 a N^8 ilustrované níže. Pro srovnání, „můstek na stejné straně“, pokud by byl přemostěn N^1 a N^{12} v 1.11, nevedlo by toto přemostění ke „křížovému přemostění“ a nebylo by tedy preferováno.

Vhodné kovy v komplexech rigidního ligandu zahrnují Mn(II), Mn(III), Mn(IV), Mn(V), Fe(II), Fe(III), Fe(IV), Co(I), Co(II), Co(III), Ni(I), Ni(II), Ni(III), Cu(I), Cu(II), Cu(III), Cr(II), Cr(III), Cr(IV), Cr(V), Cr(VI), V(III), V(IV), V(V), Mo(IV), Mo(V), Mo(VI), W(IV), W(V), W(VI), Pd(II), Ru(II), Ru(III) a Ru(IV). Preferované přechodné kovy v těchto katalyzátorech na bázi přechodných kovů zahrnují mangan, železo a chrom.

Obecněji, MLR (a odpovídající katalyzátory na bázi přechodných kovů) podle tohoto vynálezu vhodně zahrnují:

(a) alespoň jeden makrocyclický hlavní kruh, zahrnující čtyři nebo více heteroatomů a

(b) kovalentně vázané nekovové superstruktury schopné zvýšit rigiditu makrocyclu, s výhodou vybrány z

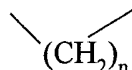
(i) přemost'ující superstruktury, jako třeba spojovací jednotka

(ii) křížem přemost'ující superstruktury jako křížem přemost'ující spojovací jednotka a

(iii) jejich kombinace.

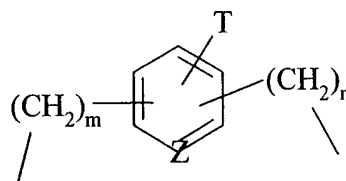
Termín „superstruktura“ se zde používá podle definice v literatuře Busch et al., viz. např. články v „Chemical Reviews“.

Preferované superstruktury podle tohoto vynálezu nejen že zvyšují rigiditu matečného makrocyclu, ale také favorizují skládání makrocyclu tak, aby se koordinoval ke kovu ve formě klepet. Vhodné superstruktury mohou být značně jednoduché, např. mohou být použity spojovací jednotky jako třeba ty, které jsou ilustrovány na níže uvedeném Obr. 1 a Obr. 2.



Obr. 1

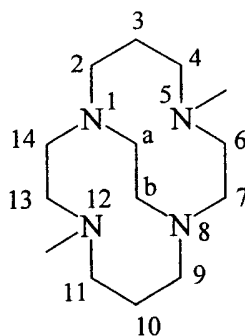
kde n je celé číslo, např. od 2 do 8, s výhodou méně než 6, typicky 2 až 4 nebo



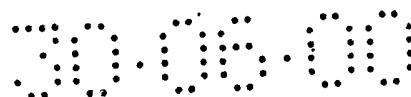
Obr.2

kde m a n jsou celá čísla od 1 do 8, výhodněji od 1 do 3; Z je N nebo CH; a T je kompatibilní substituent, např. H, alkyl, trialkylamonium, halogen, nitro, sulfonát a pod. Aromatický kruh v 1.10 může být nahrazen nasyceným kruhem, ve kterém je atom Z připojen do kruhu obsahujícím N, O, S nebo C.

Vhodné MLR jsou dále (nikoliv vyčerpávajícím výčtem) ilustrovány následující sloučeninou:



Obr.3



Toto je MLR podle tohoto vynálezu, který je vysoce preferován, křížem přemostěný, methylsubstituovaný (všechny atomy dusíku jsou terciální) derivát cyklamu. Formálně se tento ligand jmenuje 5,12-dimethyl-1,5,8,12-tetraazabicyklo[6.6.2]hexadekan s využitím rozšířeného von Baeyerova systému. Viz. „A Guide to IUPAC Nomenclature of Organic Compounds: Recommendations 1993“, R. Panico, W. H. Powell a J.-C. Richter (Eds.), Blackwell Scientific Publications, Boston, 1993, viz. obzvláště sekci R-2.4.2.1.

Bělící katalyzátory na bázi přechodných kovů a makrocyclických rigidních ligandů (MLR), které jsou vhodné pro použití v prostředcích podle tohoto vynálezu mohou obecně zahrnovat známé sloučeniny, kde jsou v souladu s výše uvedenou definicí stejně jako výhodněji libovolnou z velkého množství nových sloučenin úmyslně navržených pro použití při praní prádla nebo čištění a které jsou (nikoliv vyčerpávajícím způsobem) ilustrovány dále:

dichlor-5,12-dimethyl-1,5,8,12-tetraazabicyklo[6.6.2]hexadekan mangan (II)

diaquo-5,12-dimethyl-1,5,8,12-tetraazabicyklo[6.6.2]hexadekan mangan (II) hexafluorofosfát

aquo-hydroxy-5,12-dimethyl-1,5,8,12-tetraazabicyklo[6.6.2]hexadekan mangan (III) hexafluorofosfát

diaquo-5,12-dimethyl-1,5,8,12-tetraazabicyklo[6.6.2]hexadekan mangan (II) tetrafluoroborát

dichlor-5,12-dimethyl-1,5,8,12-tetraazabicyklo[6.6.2]hexadekan mangan (III) hexafluorofosfát

dichlor-5,12-di-n-butyl-1,5,8,12-tetraazabicyklo[6.6.2]hexadekan mangan (II)

dichlor-5,12-dibenzyl-1,5,8,12-tetraazabicyklo[6.6.2]hexadekan mangan (II)

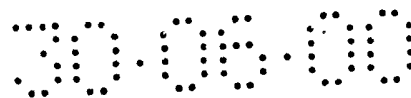
dichlor-5-n-butyl-12-methyl-1,5,8,12-tetraazabicyklo[6.6.2]hexadekan mangan (II)

dichlor-5-n-octyl-12-methyl-1,5,8,12-tetraazabicyklo[6.6.2]hexadekan mangan (II)

dichlor-5-n-butyl-12-methyl-1,5,8,12-tetraazabicyklo[6.6.2]hexadekan mangan (II).

Z praktických důvodů a nikoliv jako výsledek nějakého omezení se přípravky a způsoby čištění podle tohoto vynálezu mohou adjustovat za účelem zajištění řádově alespoň jednu part per sto milionů aktivní částice bělicího katalyzátoru ve vodném pracím roztoku a budou s výhodou zajištěny v koncentracích od 0,01 ppm do asi 25 ppm, výhodněji od 0,05 ppm do asi 10 ppm a nejvýhodněji od 0,1 ppm do asi 5 ppm aktivní částice bělicího katalyzátoru v pracím roztoku. Za účelem získání těchto koncentrací v pracím roztoku při automatickém praní prádla, typické přípravky budou obsahovat od asi 0,0005 % do asi 0,2 %, výhodněji od 0,004 % do asi 0,08 % (hmotnosti bělicího přípravku) bělicího katalyzátoru, obzvláště manganového nebo kobaltového katalyzátoru.

(d) ostatní bělicí katalyzátory



Přípravky podle tohoto vynálezu mohou obsahovat jeden nebo více jiných bělicích katalyzátorů. Preferované bělicí katalyzátory jsou zwitterionické bělicí katalyzátory, které jsou popsány v U. S. Patent 5,576,282 (obzvláště 3-(3,4-dihydroisochinolinium)propansulfonát. Další bělicí katalyzátory zahrnují kationické bělicí katalyzátory popsané v U. S. Patent 5,360,569, U. S. Patent 5,442,066, U. S. Patent 5,478,357, U. S. Patent 5,370,826, U. S. Patent 5,482,515, U. S. Patent 5,550,256 a WO 95/13351, WO 95/13352 a WO 95/13353.

Také jsou jako bělicí činidla vhodné perkyseliny jako třeba ftalimidoperoxykaproová kyselina („PAP“). Viz. například U. S. Patent 5,487,818, U. S. Patent 5,310,934, U. S. Patent 5,246,620, U. S. Patent 5,279,757 a U. S. Patent 5,132,431.

Doplňkové deteršivní enzymy

Detergenty a čistící prostředky podle tohoto vynálezu mohou také případně obsahovat jeden nebo více typů detergentních enzymů. Takovíto enzymy mohou zahrnovat další proteázy, amylázy, celulózy a lipázy. Tyto materiály jsou známe v oboru a jsou komerčně dostupné pod obchodními názvy. Mohou být zahrnuty do nevodných kapalných detergentních prostředků podle tohoto vynálezu ve formě suspenzí. Další vhodný typ enzymů zahrnuje ty, které jsou ve formě kaší enzymů v neionických surfaktantech, např. enzymy prodávané firmou Novo Nordisk pod obchodní značkou „SL“ nebo mikroenkapsulované enzymy prodávané firmou Novo Nordisk pod obchodním názvem „LDP“. Vhodné enzymy a koncentrace pro použití jsou popsány v U. S. Patent 5,576,282, U. S. Patent 5,705,464 a U. S. Patent 5,710,115.

Enzymy přidávané do přípravků podle tohoto vynálezu ve formě konvenčních enzymových prilů jsou zde obzvláště preferovány. Tyto prilky budou obecně velikosti v rozsahu od 100 do 1000 mikrometrů, výhodněji od 200 do 800 mikrometrů a budou suspendovány v nevodné kapalně fázi přípravku. Bylo zjištěno, že prilky v přípravcích podle tohoto vynálezu ve srovnání s jinými formami enzymů, vykazují obzvláště vhodnou enzymovou stabilitu pokud jde o zachování enzymatické aktivity s časem. Přípravky využívající enzymové prilky tedy nemusí obsahovat konvenční stabilizační látky pro enzymy jak tomu musí často být jsou-li použity enzymy ve vodných kapalných detergentech.

Enzymy přidávané do přípravků ovšem mohou být ve formě granulátů, s výhodou T-granulátů.

„Deteršivní enzymy“ označuje enzymy, mající čistící efekt, schopnost odstraňování skvrn nebo jiný prospěšný vliv na prané prádlo, čištění tuhého povrchu nebo v detergentních přípravcích pro osobní čištění. Preferované deteršivní enzymy jsou hydrolázy jako třeba

proteázy, amylázy a lipázy. Preferované enzymy pro praní prádla zahrnují (výčet není úplný) proteázy, celulózy, lipázy a peroxidázy. Vysoce preferované pro automatické mytí nádobí jsou amylázy a/nebo proteázy, včetně jak v současné době komerčně dostupných typů tak i upravených typů, které, ačkoliv jsou stále více kompatibilní s bělením, mají určitou zbývající schopnost deaktivace při bělení.

Příklady vhodných enzymů zahrnují (výčet není úplný) hemicelulózy, peroxidázy, proteázy, celulózy, xylanázy, lipázy, fosfolipázy, esterázy, kutinázy, pektinázy, keratinázy, reduktázy, oxidázy, fenoloxidázy, lipoxygenázy, ligninázy, pululanázy, tannázy, pentosanázy, malanázy, β -glukanázy, arabinosidázy, hyaluronidázy, chondroitinázy, lakkázy a známé amylázy nebo jejich směsi.

Příklady těchto vhodných enzymů jsou popsány v U. S. Patent 5,705,464, U. S. Patent 5,710,115, U. S. Patent 5,576,282, U. S. Patent 5,728,671 a U. S. Patent 5,707,950.

Celulózy užitečné podle tohoto vynálezu zahrnují jak bakteriální tak i houbové celulózy. S výhodou budou mít pH optimum mezi 5 až 12 a specifickou aktivitu vyšší než 50 CEVU/mg (Cellulose Viskosity Unit). Vhodné celulózy jsou popsány v U. S. Patent 4,435,307, J61078384 a WO 96/02653, které popisují houbové celulózy, produkované *Humicola insolens*, *Trichoderma*, *Thielavia* a *Sporotrichum*. EP 739 982 popisuje celulózy, izolované z nových druhů *Bacillus*. Vhodné celulózy jsou také popsány v GB-A-2.075.028, GB-A-2.095.275, DE-OS-2.247.832 a WO 95/26398.

Příklady těchto celuláz, produkovaných kmenem *Humicola insolens* (*Humicola grisea* var. *thermoidea*), obzvláště kmenem *Humicola* DSM 1800.

Další vhodné celulózy, mající původ v *Humicola insolens*, mají molekulovou hmotnost kolem 50 kDa, isoelektrický bod 5,5 a obsahují 415 aminokyselin, a 43 kDa endoglutináza z *Humicola insolens*, DSM 1800, vykazující celulázovou aktivitu, preferovaná endoglutinázová komponenta má aminokyselinovou sekvenci popsanou v WO 91/17243. Také vhodné celulózy jsou EGIII celulózy z *Trichoderma longibrachiatum*, popsané ve WO 94/21801 Genecorem. Obzvláště vhodné celulózy jsou celulózy mající kladný vliv na péči o barvy. Příklady těchto celuláz jsou celulózy popsané v evropské patentové přihlášce 91202879.2, podané 6. listopadu 1991 (Novo). Carezyme a Celluzyme (Novo Nordisk A/S) jsou obzvláště užitečné. Viz také WO 91/17244 a WO 91/21801. Další vhodné celulózy pro péči o tkaniny a/nebo čištění tkanin jsou popsány ve WO 96/34092, WO 96/17994 a WO 95/24471.

Celulázy, jsou-li přítomny, jsou normálně obsaženy v čistících prostředcích v koncentracích od 0,0001 % do 2 % čistého enzymu na hmotnost čistícího prostředku.

Peroxidázové enzymy jsou používány v kombinaci se zdrojem kyslíku, např. perkarbonáty, perboráty, persulfáty, peroxidem vodíku a pod., a s fenolickým substrátem jako molekulou zesilující bělení. Jsou používány pro „roztokové bělení“, to jest k prevenci přenosu barev nebo pigmentů odstraněných ze substrátu během prací operace na ostatní substráty v pracím roztoku. Peroxidázové enzymy jsou známy v oboru a zahrnují například křenovou peroxidázu, ligninázu a haloperoxidázu jako jsou chlor- a brom-peroxidázy. Vhodné peroxidázy a detergentní přípravky obsahující peroxidázy jsou popsány v U. S. Patent 5,705,464, U. S. Patent 5,710,115, U. S. Patent 5,576,282, U. S. Patent 5,728,671 a U. S. Patent 5,707,950, PCT mezinárodní přihláška WO 89/099813, WO 89/09813 a v evropské patentové přihlášce EP 91202882.6, podané 6. listopadu 1991 a EP 96870013.8, podané 20. února 1996. Také jsou vhodné lakkázové enzymy.

Zesilovače jsou obecně zahrnuty v koncentracích od 0,1 % do 5 % celkové hmotnosti přípravku. Preferované zesilovače jsou substituovaný fenthiazin a fenoxazin 10-fenothiazinpropionová kyselina (PPT), 10-ethylfenothiazin-4-karboxylová kyselina (EPC), 10-fenoxazinpropionová kyselina (POP) a 10-methylfnoxazin (popsaný ve WO 94/12621) a substituované syringáty (C3-C5 substituované alkylsyringáty) a fenoly. Preferovanými zdroji peroxidu vodíku jsou perkarbonát sodný a perborát sodný.

Zmíněné peroxidázy jsou normálně zahrnuty do čistících prostředků v koncentracích od 0,0001 % do 2 % čistého enzymu na hmotnost čistícího prostředku.

Enzymatické systémy mohou být použity jako bělicí činidla. Peroxid vodíku může být také přítomen přidáním enzymatického systému (to jest enzymu a jeho substrátu), který je schopen generování peroxidu vodíku na začátku nebo během pracího a/nebo máchacího procesu. Tyto enzymové systémy jsou popsány v EP evropské patentové přihlášce 91202655.6, podané 9. října 1991.

Další preferované enzymy, které mohou být zahrnuty v čistících přípravech podle tohoto vynálezu, zahrnují lipázy. Vhodné lipázové enzymy pro použití v detergentech zahrnují enzymy, produkované mikroorganismy skupiny *Pseudomonas*, jako třeba *Pseudomonas stutzeri* ATCC 19.154 jak je popsáno v Britském patentu 1,372,034. Vhodné lipázy zahrnují lipázy vykazující pozitivní kros-reakce s protilátkou lipázy, produkované mikroorganismem *Pseudomonas fluorescent IAM 1057*. Tato lipáza je dostupná od Amano Pharmaceutical Co. Ltd., Nagoya,

Japonsko pod obchodním názvem Lipase P „Amano“, dále označována jako „Amano-P“. Další vhodné komerční lipázy zahrnují Amano-CEX, lipázy z *Chromobacter viscosum*, např. *Chromobacter viscosum* var. *lipolyticum* NRRLB 3673 od Toyo Jozo Co., Tagata Japonsko; *Chromobacter viscosum* lipázy z U. S. Biochemical Corp., USA a Disoynt Co., Nizozemí a lipázy ex *Pseudomonas gladioli*. Obzvláště vhodné lipázy jsou lipázy jako třeba M1 Lipase^R a Lipomax^R (Gist-Brocades) a Lipolase^R a Lipolase Ultra^R (Novo), které byly shledány velmi účinnými, jsou-li použity v kombinaci s přípravky podle tohoto vynálezu. Také jsou vhodné lipolytické enzymy popsané v EP 258 068, WO 92/05249 a WO 95/22615 od firmy Novo Nordisk a WO 94/03578, WO 95/35381 a WO 96/00292 od firmy Unilever.

Také jsou vhodné kutinázy [EC 3.1.1.50], které mohou být považovány za speciální druh lipázy, jmenovitě lipázy, které nepotřebují mezifázovou aktivaci. Přídavek kutinázy do čistících prostředků bylo popsáno např. v WO-A-88/09367 (Genecor), WO 90/09446 (Plant Genetic System) a WO 94/14963 a WO 94/14964 (Unilever).

Lipázy a/nebo kutinázy, jsou-li přítomny, jsou normálně zahrnuty v čistících prostředcích v koncentracích od 0,0001 % do 2 % čistého enzymu na hmotnost čistícího prostředku.

Kromě výše zmíněných lipáz mohou být v prostředcích podle tohoto vynálezu zahrnuty fosfolipázy. Nikoliv vyčerpávající příklady vhodných fosfolipáz zahrnují: EC 3.1.1.32 Fosfolipáza A1, EC 3.1.1.4 Fosfolipáza A2, EC 3.1.1.5 Lysofosfolopáza, EC 3.1.4.3 Fosfolipáza C, EC 3.1.4.4. Fosfolipáza D. Komerčně dostupné fosfolipázy zahrnují LECITASE[®] od firmy Novo Nordisk A/S z Dánska a Fosfolipáza A2 od firmy Sigma. Jsou-li zahrnuty fosfolipázy v přípravcích podle tohoto vynálezu, jsou preferovány amylázy. Bez toho aniž bychom se cítili býti vázáni teorií, má se za to, že kombinovaný účinek fosfolipázy a amylázy zajišťují značný účinek při odstraňování skvrn, obzvláště mastných a olejových, škrobových a vysoce barevných skvrn a špíny. S výhodou jsou fosfolipázy a amylázy přítomny v přípravcích podle tohoto vynálezu v poměru hmotností čistého enzymu v rozmezí od 4500:1 do 1:5, výhodněji od 50:1 do 1:1.

Vhodnými proteázami jsou subtilisiny, které se získávají z některých kmenů *Bacillus subtilis* a *Bacillus licheniformis* (subtilisi BPN a BPN'). Jedna vhodná proteáza se získává z kmene *Bacillus*, mající maximální aktivitu při pH v rozmezí od 8 do 12, vyvinutá a prodávána jako ESPERASE[®] od firmy Novo Industries A/S z Dánska, dále označovanou jako „Novo“. Příprava tohoto enzymu a enzymů analogických je popsána v GB 1,243,784 (Novo). Proteolytické enzymy také zahrnují modifikované bakteriální serinové proteázy, jako jsou

proteázy popsané v přihlášce evropského patentu 87 303761.8, podané 28. dubna 1987 (obzvláště strany 17, 24 a 98) a které se zde dále nazývají „Proteáza B“ a evropské patentové přihlášce 199,404, Venegas, publikované 29. října 1986, která odkazuje na modifikovaný bakteriální serinový proteolytický enzym, který se zde dále nazývá „Proteáza A“. Vhodná je proteáza nazývaná zde „Proteáza C“, která je variantou alkalické serinové proteázy z *Bacillus*, ve které je Lysin nahrazen argininem v poloze 27, tyrosin nahrazuje valin v poloze 104, serin nahrazuje asparagin v poloze 123 a alanin nahrazuje threonin v poloze 274. Proteáza C je popsána v EP 90915958.4, odpovídající WO 91/06637, publikované 16. května 1991. Geneticky modifikované varianty, obzvláště Proteázy C, jsou zde také zahrnuty.

Preferovanou proteázou označovanou jako „Proteáza D“ je karbonyl hydroláza jak je popsána v U. S. Patent 5,677,272 a WO 95/10591. Také je vhodná karbonylhydrolázová varianta proteázy, popsaná ve WO 95/10591, mající aminokyselinovou sekvenci odvozenou náhradou několika aminokyselinových zbytků nahrazených v prekurzoru enzymu odpovídajícího pozici +210 v kombinaci s jedním nebo více následujícími zbytky: +33, +62, +67, +76, +100, +103, +104, +107, +128, +129, +130, +132, +135, +156, +158, +164, +166, +167, +170, +209, +215, +217, +218 a +222, kde číselné pozice odpovídají přírodně se vyskytujícímu subtilisinu z *Bacillus amyloliquefaciens* nebo ekvivalentním aminokyselinovým zbytkům v jiných karbonylhydrolázách nebo subtilisinech, jako třeba subtilisin z *Bacillus lentus* (dosud neuzavřená patentová přihláška US č. 60/048,550, podané 4. června 1997 a PCT mezinárodní přihlášce č. PCT/IB98/00853).

Také vhodné podle tohoto vynálezu jsou proteázy popsané v patentové přihlášce EP 251 446 a WO 91/06637, proteáza BLAP[®] popsaná ve WO 91/02792 a její varianty popsané ve WO 95/23221.

Viz. také proteázu pracující při vysokém pH z *Bacillus* sp. NCIMB 40338, popsané ve WO 93/18140 A (Novo). Enzymatické detergenty zahrnující proteázy, jeden nebo více enzymů, a reverzibilní proteázový inhibitor, jsou popsány ve WO 92/03529 A (Novo). Je-li to požadováno, jsou dostupné proteázy se sníženou adsorpcí a zvýšenou schopností hydrolýzy jak je popsáno ve WO 95/07791 (Procter & Gamble). Rekombinantní trypsinová proteáza pro detergenty podle tohoto vynálezu je popsána ve WO 94/25583 (Novo). Další vhodné proteázy jsou popsány v EP 516 200 (Unilever).

Obzvláště užitečné proteázy jsou popsány v PCT publikacích: WO 95/30010, WO 95/30011, WO 95/29979. Vhodné proteázy jsou komerčně dostupné jako ESPERASE[®], ALCALASE[®], DURAZYM[®], SAVINASE[®], EVERLASE[®] a KANNASE[®], všechny od Novo

Nordisk A/S z Dánska a jako MAXATASE[®], MAXACAL[®], PROPERASE[®] a MAXAPEM[®], všechny od firmy Genecor International (dříve Gist-Brocades of the Netherlands).

Tyto proteolytické enzymy, jsou-li přítomny, jsou zabudovány v čistících prostředcích podle tohoto vynálezu v koncentracích od 0,0001 % do 2 %, s výhodou od 0,001 % do 0,2 %, výhodněji od 0,005 % do 0,1 % čistého enzymu na hmotnost přípravku.

Amylázy (α a/nebo β) mohou být zahrnuty pro odstraňování karbohydrátových skvrn. WO 94/02597 popisuje čistící prostředky, které obsahují mutantní amylázy. Viz. také WO 95/10603. Další amylázy známé pro jejich použití v čistících prostředcích zahrnují jak α - tak i β -amylázy. α -Amylázy jsou známé v oboru s zahrnují ty, které jsou popsány v U. S. Patent 5,003,257, EP 252,666, WO/91/00353, FR 2,676,456, EP 285,123, EP 525,610, EP 368,341 a britská patentová specifikace č. 1,296,839 (Novo). Další vhodné amylázy jsou amylázy se zvýšenou stabilitou, popsané v WO 94/18314 a WO 96/05295, Genencor a amylázové varianty mající další modifikace v bezprostředních předchůdcích, dostupné od firmy Novo Nordisk A/S, popsané ve WO 95/10603. Také jsou vhodné amylázy popsané v EP 277 216.

Příklady komerčních α -amylázových produktů jsou Purafect Ox Am[®] od firmy Genencor a Termamyl[®], Ban[®], Fungamyl[®] a Duramyl[®], všechny dostupné od firmy Novo Nordisk A/S Dánsko. WO 95/26397 popisuje další vhodné amylázy: α -amylázy charakteristické tím, že mají specifickou aktivitu nejméně o 25 % vyšší než je specifická aktivita Termamyl[®] při teplotách v rozmezí od 25 °C do 55 °C a při pH v rozmezí od 8 do 10, měřeno pomocí stanovení α -amylázové aktivity Phadebas[®]. Vhodné jsou varianty výše uvedených enzymů, popsané ve WO 96/23873 (Novo Nordisk). Další amylolytické enzymy se zlepšenými vlastnostmi pokud jde o úroveň aktivity a kombinace termostability a vyšší úrovně aktivity jsou popsány ve WO 95/35382.

Tyto amylolytické enzymy, jsou-li přítomny, jsou zabudovány v čistících prostředcích podle tohoto vynálezu v úrovních od 0,0001 % do 2 %, výhodněji od 0,00018 % do 0,06 %, výhodněji od 0,00024 % do 0,048 % čistého enzymu na hmotnost přípravku.

Výše zmíněné enzymy mohou být libovolného původu, jako třeba rostlinného, živočišného, bakteriálního, houbového a kvasinkového. Původ může být dále mesofilní nebo extreemofilní (psychrofilní, psychrotropní, termofilní, barofilní, alkalofilní, acidofilní, halofilní, a pod.). Mohou být použity čištěné nebo nečištěné formy těchto enzymů. Dnes je běžnou praxí modifikovat divoké typy enzymů pomocí technik proteinového/genetického inženýrství za účelem optimalizace jejich působení v detergentech pro praní prádla a/nebo přípravcích pro péči o tkaniny podle tohoto vynálezu. Například, mohou být navrženy takové

varianty, že jejich kompatibilita vůči běžně se vyskytujícím ingrediencím v těchto přípravcích. Alternativně, mohou být varianty navrženy tak, aby bylo dosaženo optimálního pH, stability vůči bělení nebo chelantu, katalytické aktivity a pod., aby se co nejlépe hodily pro zymýšlené aplikace.

Obzvláště by měla být věnována pozornost citlivosti aminokyselin k oxidaci v případě stability vůči bělení a povrchovým nábojům kvůli kompatibilitě se surfaktantem. Izoelektrický bod takovýchto enzymů může být modifikován substitucí některých nabitých aminokyselin, např. zvýšení isoelektrického bodu může pomoci zvýšit kompatibilitu s anionickými surfaktanty. Stabilita enzymů může být dále zvýšena vytvořením např. dalších solných můstků a zesílením míst vázajících vápník ke zvýšení stability chelantu.

Tyto opční deterdivní enzymy, jsou-li přítomny, jsou normálně zahrnuty v čistících prostředcích v koncentracích od 0,0001 % do 2 % čistého enzymu na hmotnost čistícího přípravku. Enzymy mohou být přidány jako oddělená jednotlivá ingredience (prily, granuláty, stabilizované kapaliny a pod. obsahující jeden enzym) nebo jako směsi dvou nebo více enzymů (např. kogranuláty).

Další vhodné deterdivní ingredience, které mohou být přidány do přípravků podle tohoto vynálezu, jsou činidla bránící oxidaci enzymů. Příklady těchto činidel bránících oxidaci enzymů jsou ethoxylované tetraethylenpolyaminy.

Rozsah enzymových materiálů a prostředky pro jejich zavedení do syntetických detergentních prostředků je také popsán ve WO 9307260 (Genencor International), WO 8908694 a U. S. Patent 3,553,139, z 5. ledna 1971 (McCarty et al.). Enzymy jsou dále popsány v U. S. Patent 4,101,457 a U. S. Patent 4,507,219. Enzymové materiály užitečné pro kapalnou detergentní přípravku a jejich zabudování do těchto přípravků jsou popsány v U. S. Patent 4,261,868.

Enzymové stabilizátory

Enzymy pro použití v detergentech podle tohoto vynálezu mohou být stabilizovány různými technikami. Techniky stabilizace enzymů jsou popsány a příklady uvedeny v U. S. Patent 3,600,319, EP 199,405 a EP 200,586. Systémy pro stabilizaci enzymů jsou také popsány např. v U. S. Patent 3,519,570. Užitečný *Bacillus* sp. AC13, poskytující proteázy, xylanázy a celulózy, je popsán ve WO 9401532. Enzymy zde použité mohou být stabilizovány přítomností vodo-rozpustných zdrojů iontů vápníku a/nebo hořčíku ve finálním přípravku, které zajišťují tyto ionty pro enzymy. Vhodné stabilizátory enzymů a jejich

koncentrace pro použití jsou popsány v U. S. Patent 5,705,464, U. S. Patent 5,710,115 a U. S. Patent 5,576,282.

Plnidla

Detergentní a čistící prostředky podle tohoto vynálezu s výhodou obsahují jeden nebo více detergentních plniv nebo plnivových systémů. Jsou-li přítomny, přípravky podle tohoto vynálezu budou typicky obsahovat nejméně 1 % plniva, s výhodou od 5 %, výhodněji od asi 10 % do asi 80 %, s výhodou do asi 50 %, výhodněji do asi 30 % hmotnosti detergentního plniva. Nižší nebo vyšší koncentrace plniva, však nejsou tímto vyloučeny.

Preferovaná pojiva pro použití v detergentních a čistících přípravcích podle tohoto vynálezu, obzvláště přípravků na mytí nádobí, zahrnují vodo-rozpustné plnidla, (např. polykarboxyláty) podle popisu v U. S. Patent 5,695,679, U. S. Patent 5,705,464 a U. S. Patent 5,710,115. Další vhodné polykarboxyláty jsou popsány v U. S. Patent 4,144,226, U. S. Patent 3,308,067 a U. S. Patent 3,723,322. Preferované polykarboxyláty jsou hydroxykarboxyláty obsahující až tři karboxylové skupiny v molekule, konkrétněji titráty.

Anorganická nebo fosfor obsahující detergentní plniva zahrnují, výčet není úplný, soli alkalických kovů, amonné soli a alkanolamonné soli polyfosfátů (příklady jsou tripolyfosfáty, pyrofosfáty a sklovité polymerní meta-fosfáty), fosfonáty (viz. například U. S. Patent 3,159,581, U. S. Patent 3,213,030, U. S. Patent 3,422,021, U. S. Patent 3,400,148 a U. S. Patent 3,422,137), kyselina listová, silikáty, uhličitany (včetně bikarbonátů a sesquikarbonátů), sulfáty a aluminosilikáty.

Ovšem, v některých oblastech jsou vyžadovány nefosfátové plnidla. Je důležité, že přípravky podle tohoto vynálezu překvapivě dobře fungují dokonce i v přítomnosti tzv. „slabých“ plnidel (ve srovnání s fosfáty) jako jsou citrát nebo v tzv. „underbuilt“ situacích, ke kterým může dojít v přítomnosti zeolitů nebo vrstvených silikátových plnidel.

Vhodné silikáty zahrnují vodo-rozpustné sodné silikáty s poměrem $\text{SiO}_2:\text{Na}_2\text{O}$ v rozmezí od 1,0 do 2,8, s preferovaným poměrem od 1,6 do asi 2,4 a obzvláště preferovány jsou poměry kolem 2,0. Silikáty mohou být buď ve formě bezvodých solí nebo hydratovaných solí. Sodný silikát s poměrem $\text{SiO}_2:\text{Na}_2\text{O}$ kolem 2,0 je nejvíce preferován. Silikáty, jsou-li přítomny, jsou s výhodou přítomny v detergentech a čistících přípravcích popsaných v tomto vynálezu v koncentracích od asi 5 % do přibližně 50 % hmotnosti přípravku, výhodněji od asi 10 % do asi 40 % hmotnosti.

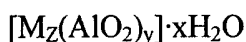
Částečně rozpustná nebo nerozpustná plnidla, vhodná pro použití v detergentních a čistících přípravcích podle tohoto vynálezu, obzvláště granulární detergentní přípravky,

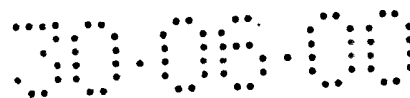
zahrnují krystalické vrstvené silikáty, s výhodou krystalické vrstvené sodné silikáty (obzvláště vodo-rozpustné) podle popisu v U. S. Patent 4,664,839 a sodné aluminosilikáty (vodo-nerozpustné). Jsou-li přítomny v detergentních nebo čistících prostředcích podle tohoto vynálezu, jsou tato plnidla typicky přítomna v koncentracích od asi 1 % do asi 80 % hmotnosti, s výhodou od 10 % do asi 70 % hmotnosti, nejvýhodněji od asi 20 % do asi 60 % hmotnosti přípravku.

Krystalické vrstvené sodné silikáty mající obecný vzorec $\text{NaMSi}_x\text{O}_{2x+1} \cdot y\text{H}_2\text{O}$, kde M je sodík nebo vodík, x je číslo od 1,9 do asi 4, s výhodou od 2 do 4, nejvýhodněji 2 a y je číslo od 0 do 20, s výhodou 0, mohou být použity v přípravcích podle tohoto vynálezu. Krystalické vrstvené sodné silikáty tohoto typu jsou popsány v EP-A-0164514 a způsoby jejich přípravy jsou popsány v DE-A-3417649 a DE-A-3742043. Nejpreferovanější materiál je delta- Na_2SiO_5 , dostupný od firmy Hoechst AG jako NaSKS-6 (obvykle zkracovaný jako „SKS-6“). Narozdíl od zeolitových plnidel, toto NaSKS-6 silikátové plnidlo neobsahuje hliník. NaSKS-6 má delta- Na_2SiO_5 morfologii vrstveného silikátu. SKS-6 je vysoce preferovaný vrstvený silikát pro použití podle tohoto vynálezu, ovšem v přípravcích popsáných v tomto vynálezu mohou být použity i další vrstvené silikáty, jako třeba ty které mají obecný vzorec $\text{NaMSi}_x\text{O}_{2x+1} \cdot y\text{H}_2\text{O}$, kde M je sodík nebo vodík, x je číslo od 1,9 do 4, s výhodou 2 a y je číslo od 0 do asi 20, s výhodou 0. Další různé silikáty od firmy Hoechst zahrnují NaSKS-5, NaSKS-7 a NaSKS-11) jako alfa, beta a gama formy. Jak bylo zmíněno výše, delta forma Na_2SiO_5 (NaSKS-6 form) je nejpreferovanější pro použití v tomto vynálezu. Další silikáty mohou být také použity jako např. silikát hořčíku, který může sloužit zotřovácí činidlo v granulárních kondenzacích, jako stabilizační činidla pro kyslíkatá bělidla a jako komponenta do systému na řízení pěnovosti.

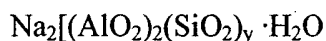
Krystalický vrstvený sodný silikátový materiál se s výhodou nachází v granulárních detergentních přípravcích jako částice v těsné směsi s tuhým, vodo-rozpustným ionizovatelným materiálem. Tuhý vodo-rozpustný materiál je s výhodou vybrán z organických kyselin, organických nebo anorganických solí a jejich směsí.

Aluminosilikátová pojiva jsou velmi důležitá ve většině v současné době prodávaných granulárních detergentních přípravcích a mohou být také významnou součástí plniva u kapalných detergentních formulací. Aluminosilikátová plnidla mají empirický vzorec:



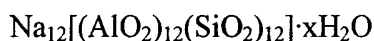


kde z a y jsou celá čísla nejméně 6, molární poměr z ku y je v rozsahu od 1,0 do asi 0,5 a x je celé číslo od 15 do asi 264. S výhodou aluminosilikátová plnidla jsou aluminosilikátové zeolity, mající vzorec:

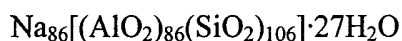


když z a y jsou alespoň 6, molární poměr z ku y je od 1,0 do 0,5 a x je alespoň 5, s výhodou 7,5 až 276, výhodněji od 10 do 264. Aluminosilikátová plniva jsou přednostně v hydratované formě a s výhodou krystalické, obsahující od 10 % do asi 28 %, výhodněji od 18 % do asi 22 % vody ve vázané formě.

Tyto aluminosilikátové iontoměničové materiály mohou být krystalické nebo amorfní pokud jde o strukturu a mohou to být přirozeně se vyskytující nebo derivované aluminosilikáty. Způsoby výroby aluminosilikátových iontoměničových materiálů jsou popsány v U. S. Patent 3,985,669. Preferované syntetické krystalické aluminosilikátové ionexové materiály užitečné podle tohoto vynálezu jsou dostupné pod označeními Zeolite A, Zeolite B, Zeolite P, Zeolit X, Zeolite MAP a Zeolite HS a jejich směsi. V obzvláště preferovaném provedení mají aluminosilikátové iontově-výměnné materiály tento vzorec:

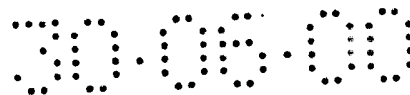


kde x je od asi 20 do asi 30, s výhodou 27. Tento materiál je známý jako zeolit A. Dehydratované zeolity ($x = 0-10$) mohou být také užitečné. S výhodou má aluminosilikát velikost částic od 0,1 do 10 mikrometrů. Zeolit X má následující vzorec:



Citrátová plnidla, např. kyselina citronová a její rozpustné soli (obzvláště soli sodné) jsou polykarboxylová plnidla obzvláštního významu pro kapalné detergentní formulace s velkým výkonem, díky jejich dostupnosti z obnovitelných zdrojů a jejich biodegradovatelnosti. Citráty mohou být také použity v granulárních přípravcích, obzvláště v kombinaci se Zeolitem a/nebo vrstveným silikátovým plnidlem. Oxydisukcináty jsou také užitečné v těchto přípravcích a kombinacích.

Také 3,3-dikarboxy-4-oxa-1,6-hexanedionáty jsou vhodné pro zde popsané detergentní přípravky, stejně jako příbuzné sloučeniny popsané v U. S. Patent 4,566,984. Užitečné plnidla na bázi jantarové kyseliny zahrnují C_5 - C_{20} alkyl a alkenyljantarové kyseliny a jejich soli. Obzvláště preferovanou sloučeninou tohoto typu je dodecenylyantarová kyselina. Konkrétní příklady jantarových plnidel zahrnují: laurylsukcinát, myristylsukcinát, palmitylsukcinát, 2-dodecenylylsukcinát (preferovaný), 2-pentadecenylylsukcinát a pod. Laurylsukcináty jsou



preferovaná plnidla této skupiny a jsou popsány v evropské patentové přihlášce 86200690.5/0.200,263, publikované 5. listopadu 1986.

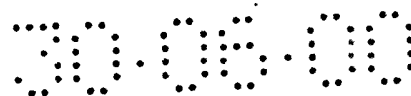
Mastné kyseliny, např. C_{12} až C_{18} monokarboxylové kyseliny mohou být také zabudovány do přípravků, a to samotné nebo v kombinaci s dříve zmíněnými plnidly, obzvláště citrátovými nebo sukcinátovými plnidly, za účelem zajištění další plnidlové aktivity. Toto použití mastných kyselin obecně povede ke snížení pění, což musí být vzato v úvahu při formulaci přípravku.

Dispergant

Jedna nebo více vhodných polyalkyleniminových dispergantů může být zabudováno do čistících prostředků podle tohoto vynálezu. Příklady takovýchto vhodných dispergantů mohou být nalezeny v evropské patentové přihlášce 111,965, 111,984 a 112,592, U. S. Patent 4,597,898, U. S. Patent 4,548,744 a U. S. Patent 5,565,145. Ovšem v pracích prostředcích podle tohoto vynálezu mohou být použity jakékoliv dispergantů špíny a jílu nebo činidla zabraňující jejich zpětnému usazování.

Kromě toho jsou pro použití podle tohoto vynálezu vhodné polymerní dispergující činidla, zahrnující polymerní karboxyláty a polyethylenglykoly. Nenasycené monomerní kyseliny, které mohou být polymerizovány za vzniku vhodných polymerních polykarboxylátů zahrnují kyselinu akrylovou, kyselinu maleinovou (nebo maleinanhydrid), kyselinu fumarovou, kyselinu itakonovou, kyselinu akonitovou, kyselinu mesakonovou, kyselinu citrakonovou a kyselinu methylenmalonovou. Obzvláště vhodné polymerní polykarboxyláty mohou být odvozeny od kyseliny akrylové. Tyto polymery založené na kyselině akrylové, užitečné podle tohoto vynálezu, jsou vodo-rozpustné soli polymerizované kyseliny akrylové. Průměrná molekulová hmotnost těchto polymerů v kyselé formě se s výhodou pohybuje od asi 2000 do 10000, výhodněji od asi 4000 do 7000 a nejvýhodněji od 4000 do 5000. Vodo-rozpustné soli těchto polymerů kyseliny akrylové mohou zahrnovat, např. soli alkalických kovů, amonné a substituované amonné soli. Vhodné polymery tohoto typu jsou známé materiály. Použití polyakrylátů tohoto typu v detergentních přípravcích bylo popsáno např. v U. S. Patent 3,308,067.

Kopolymery akrylové/maleinové kyseliny mohou být také použity jako preferované složky dispergujících činidel a činidel zabraňujících opětovnému usazení dispergované špíny. Takovéto materiály zahrnují vodo-rozpustné soli kopolymerů akrylové a maleinové kyseliny. Průměrná molekulová hmotnost těchto kopolymerů v kyselé formě se s výhodou pohybuje v rozmezí od asi 2000 až 100000, výhodněji od 5000 do 75000, nejvýhodněji od 7000 do



65000. Poměr akrylátových a maleinových segmentů v těchto kopolymerech se bude obecně pohybovat od asi 30:1 do asi 1:1, výhodněji od asi 10:1 do 2:1. Vodo-rozpustné soli těchto kopolymerů akrylové a maleinové kyseliny mohou zahrnovat např. soli alkalických kovů, amonné a substituované amonné soli. Rozpustné kopolymery akrylové a maleinové kyseliny tohoto typu jsou známé materiály v oboru, které jsou popsány v evropské patentové přihlášce č. 66915, publikované 15. prosince 1982, stejně jako v EP 193,360, publikované 3. září 1986, které také popisují tyto polymery zahrnující hydroxypropylakrylát. Další užitečné dispergační činidla zahrnují terpolymery maleinové kyseliny/akrylové kyseliny/vinylalkoholu. Tyto materiály jsou také popsány v EP 193,360, včetně např. 45/45/10 terpolymeru akrylové kyseliny/maleinové kyseliny/vinyl alkoholu.

Další polymerní materiál, který může být zahrnut je polyethylenglykol (PEG). PEG může vykazovat účinky dispergujícího činidla stejně jako napomáhá odstraňování špíny a jejímu opětovnému usazování. Typické molekulové hmotnosti se pohybují v rozsahu od asi 500 do 100000, s výhodou od asi 1000 do asi 50000, výhodněji od asi 1500 do 10000.

Mohou být použita polyaspartátová a polyglutamátová dispergační činidla, obzvláště ve spojení se zeolitovými plnidly. Dispergující činidla jako jsou polyaspartát mají s výhodou molekulovou hmotnost (průměr) kolem 10000.

Činidla uvolňující špínu

Přípravky podle tohoto vynálezu mohou případně zahrnovat jedno nebo více činidel uvolňujících špínu. Jsou-li použity, budou tato činidla zahrnovat kolem 0,01 %, s výhodou od asi 0,1 %, výhodněji od asi 0,2 % do asi 10 %, s výhodou do 5 %, výhodněji do asi 3 % hmotnosti přípravku. Nikoliv limitující příklady vhodných činidel uvolňujících špínu jsou popsány v U. S. Patent 5,728,671, 5,691,298, 5,599,782, 5,415,807, 5,182,043, 4,956,447, 4,976,879, 4,968,451, 4,925,577, 4,861,512, 4,877,896, 4,771,730, 4,711,730, 4,721,580, 4,000,093, 3,959,230 a 3,893,929 a evropské patentové přihlášce 0 219 048.

Další vhodná činidla uvolňující špínu jsou popsány v U. S. Patent 4,201,824, 4,240,918, 4,525,524, 4,579,681, 4,220,918 a 4,787,989, EP 279,134 A, EP 457,205 A a v DE 2,335,044.

Chelatující činidla

Přípravky podle tohoto vynálezu mohou také obsahovat chelatující činidla, která slouží k chelataci alkalických kovů a kovových nečistot, které by jinak vedly k deaktivaci bělicího činidla. Užitečná chelatující činidla mohou zahrnovat aminokarboxyláty, fosfonáty, aminofosfonáty, polyfunkčně substituované aromatické chelatující činidla a jejich směsi.

Další příklady vhodných chelatujících činidel a koncentrací jejich použití jsou popsány v U. S. Patent 5,705,464, 5,710,115, 5,728,671 a 5,576,282.

Přípravky podle tohoto vynálezu také obsahují vodo-rozpustné soli nebo kyselé formy methylglycin diacetové kyseliny (MGDA) jako chelant nebo koplidlo užitečné např. nerozpustnými plnidly typu zeolity, vrstvené silikáty a pod.

Jsou-li použita, chelatující činidla budou obecně představovat od asi 0,1 % do asi 15 %, výhodněji od 0,1 % do asi 3,0 % hmotnosti detergentního přípravku podle tohoto vynálezu.

Činidla potlačující pění

Další vhodné ingredience jsou činidla potlačující vznik pěny, jejichž příklady zahrnují silikony a směsi silikonů. Příklady činidel potlačujících vznik pěny jsou uvedeny v U. S. Patent 5,707,950 a 5,728,671. Tato činidla pro potlačení pěnivosti jsou obvykle použity v koncentracích od 0,001 % do 2 % hmotnosti přípravku, s výhodou od 0,01 % do 1 % hmotnosti.

Změkčující činidla

Do pracích prostředků podle tohoto vynálezu mohou být také zahrnuty změkčovadla látek. Anorganická změkčující činidla jsou např. smektické jíly popsané v GB-A-1 400 898 a U. S. 5,019,292. Organická změkčující činidla zahrnují vodo-rozpustné terciální aminy jak je popsáno v GB-A-1 514 276 a EP-B-011 340 a jejich kombinace s C_{12} až C_{14} kvarterními amonnými solemi jsou popsány v EP-B-026 527 a EP-B-026 528 a amidy se dvěma dlouhými řetězci podle popisu v EP-B-0 242 919. Další užitečné organické složky systémů změkčujících tkaniny zahrnují vysokomolekulární polyethylenoxidové materiály podle popisu v EP-A-0 299 575 a 0 313 146.

Obzvláště vhodná činidla změkčující tkaniny jsou popsány v U. S. Patent 5,707,950 a 5,728,673.

Koncentrace smektických jíků jsou normálně v rozsahu od 2 % do 20 %, výhodněji od 5 % do 15 % hmotnosti, přičemž se materiál přidával ve formě na vzduchu sušeného materiálu ke zbytku přípravku. Organická činidla pro změkčování látek, jako jsou vodo-nerozpustné terciální aminy nebo amidy se dvěma dlouhými alkalickými řetězci jsou zabudovány v koncentracích od 0,5 % do 5 % hmotnosti, normálně od 1 % do 3 % hmotnosti, zatímco vysokomolekulární polyethylenoxidové materiály a vodo-rozpustné kationické materiály se přidávají v koncentracích od 0,1 % do 2 %, normálně od 0,15 % do 1,5 % hmotnosti. Tyto materiály se normálně přidávají ke sprejováním usušené části přípravku,

ačkoliv v některých případech může být pohodlnější přidávat je jako suché míchané částice nebo sprejovány jako roztavená kapalina na další tuhé složky přípravku.

Biodegradovatelné kvartérní amonné sloučeniny podle popisu v EP-A-040 562 a EP-A-239 910 byly prezentovány jako alternativy k tradičně používaným amonium chloridům popř. amonium methylsulfátům se dvěma dlouhými alkyly.

Nikoliv vyčerpávající příklady aniontů kompatibilních s funkcí změkčovače pro kvarterní amonné soli a aminové prekursory zahrnují chlorid a methylsulfát.

Inhibitory přenosu barviva

Detergentní přípravky podle tohoto vynálezu mohou také zahrnovat sloučeniny pro inhibici přenosu barev (rozpuštěných popř. suspendovaných) z jedné látky na druhou během pracího procesu popřípadě během kondicionující operace barvených tkanin.

Polymerní činidla bránící přenosu barev

Detergentní přípravky podle tohoto vynálezu mohou také zahrnovat od 0,001 % do 10 %, s výhodou od 0,01 % do asi 2 %, výhodněji od 0,05 % do 1 % hmotnosti polymerního činidla bránícího přenosu barev. Zmíněná polymerní činidla bránící přenosu barev jsou normálně zabudovány do detergentního přípravku za účelem inhibice barev z jedné tkaniny na druhou. Tyto polymery mají schopnost komplexovat nebo adsorbovat nestálé barvy vymyté ven z tkaniny před tím, než dojde k usazení barev na jiném kusu prádla.

Obzvláště vhodná polymerní činidla pro inhibici přenosu barev jsou polyamin N-oxidové polymery, kopolymery N-vinylpyrrolidonu a N-vinylimidazolu, polyvinylpyrrolidonové polymery, polyvinylloxazolidony a polyvinylimidazoly a jejich směsi. Příklady těchto činidel zabraňujících přenosu barev jsou popsány v U. S. Patent 5,707,950 a 5,707,951.

Další vhodná činidla inhibující přenos barev zahrnují (výčet není úplný) zesíťované polymery. Zesíťované polymery jsou polymery, jejichž hlavní řetězce jsou navzájem propojeny do určitého stupně; tato propojení mohou být chemické nebo fyzikální povahy, pravděpodobně s aktivními skupinami na skeletu nebo na rozvětvení; zesíťované polymery byly popsány v Journal Polymer Science, vol. 22, str. 1035-1039.

V jednom provedení vynálezu jsou zesíťované polymery udělány tak, aby tvořily trojdimensionální rigidní strukturu, která může zachycovat barvivo ve vytvořených pórech, vzniklých trojdimensionální strukturou. V dalším provedení zesíťované polymery zachycují barvivo pomocí bobtnání. Tyto zesíťované polymery jsou popsány v dosud nevyřízené evropské patentové přihlášce 94870213.9.

Přídavek těchto polymerů také zesiluje účinky enzymů podle tohoto vynálezu.

Úprava pH a pufrů

Mnohé detergentní a čistící prostředky podle tohoto vynálezu budou pufovány, to znamená, že jsou relativně rezistentní ke změnám pH v přítomnosti kyselých znečištění. Ovšem, jiné přípravky podle tohoto vynálezu mohou mít výjimečně nízkou pufrovací kapacitu nebo mohou být v podstatě nepufovány. Techniky kontroly a změny pH při doporučených užitných koncentracích obecně zahrnují použití nejen pufrů, ale také dalších alkálií, kyselin, systémů na skokovou změnu pH, dvojitých oddělených nádob a pod., a jsou velmi dobře známi odborníkům v oboru.

Preferované ADD přípravky podle tohoto vynálezu zahrnují složky pro úpravu pH, vybrané z vodo-rozpustných alkalických anorganických solí a vodo-rozpustná organická pojidla jak jsou popsány v U. S. Patent 5,705,464 a 5,710,115.

Činidla pro péči o materiál

Preferované ADD přípravky mohou obsahovat jedno nebo více činidel pro péči o materiál, která jsou účinná jako inhibitory koroze a/nebo činidla proti matnému zákalu podle popisu v U. S. Patent 5,705,464, 5,710,115 a 5,646,101.

Jsou-li přítomna, tato činidla pro ochranu materiálů jsou s výhodou zahrnuta v nízkých koncentracích od asi 0,01 % do asi 5 % ADD přípravku.

Další materiály

Detersivní ingredience nebo přídavné materiály případně zahrnuté v přípravcích podle tohoto vynálezu mohou obsahovat jeden nebo více materiálů pro asistování nebo zesílení čistícího účinku, pro zpracování čištěného substrátu nebo jsou určeny pro estetické vylepšení přípravku. Doplnkové látky, které mohou být také obsaženy v přípravku v koncentracích obvyklých v oboru pro daný typ sloučenin; doplnkové materiály představují obecně od 30 % do asi 99,9 %, s výhodou od 70 % do asi 95 % hmotnosti přípravku, zahrnují další aktivní složky jako jsou třeba nefosfátové pojidla, barevné skvrny, protimatové a protikorozní činidla, barvy, plniva, germicidy, zdroje alkalinity, hydrotropy, anti-oxidanty, parfémy, rozpouštěcí činidla, nosiče, procesní látky, pigmenty a činidla pro kontrolu pH podle popisu v U. S. Patent 5,705,464, 5,710,115, 5,698,504, 5,695,679, 5,686,014 a 5,646,101.

Způsoby čištění

Kromě zde popsaných způsobů čištění tkanin, nádobí a dalších tuhých povrchů a části těla při osobní hygieně, obsahuje také proces předzpracování tkaniny, která byla poskvíněná nebo zašpiněná, zahrnující kontakt zmíněných skvrn s vysoce koncentrovanou formou

čisticího prostředku před samotným praním této tkaniny s využitím konvenčního vodného pracího roztoku. Výhodně, čisticí prostředky zůstávají v kontaktu se špínou nebo skvrnou po dobu 30 sekund až 24 h před tím, než je tkanina vyprána obvyklým konvenčním způsobem. Výhodněji zpracování předem bude trvat od 1 do 180 minut.

Následující příklady jsou míněny jako příklady přípravků podle tohoto vynálezu, ovšem nejsou nezbytně zamýšleny jako limitující z hlediska rozsahu tohoto vynálezu.

Ve všech následujících příkladech Proteáza označuje proteázovou variantu zahrnující substituci aminokyselinového zbytku s jiným přírodním aminokyselinovým zbytkem v pozici odpovídající polohám 101G/103A/104I/159D/232V/236H/245R/248D/252K subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens*. Proteáza může být substituována s libovolnou další proteázovou variantou podle tohoto vynálezu s prakticky podobnými výsledky v následujících příkladech.

V příkladech čisticích prostředků podle tohoto vynálezu, koncentrace proteázového enzymu je vyjádřena jako čistý enzym ku celkové hmotnosti přípravku, koncentrace jiných enzymů je vyjádřena hmotností surového materiálu k celkové hmotnosti přípravku pokud není specifikováno jinak, ostatní ingredience jsou vyjádřeny na celkovou hmotnost přípravku.

Ve všech následujících příkladech označuje Amyláza amylázovou variantu podle tohoto vynálezu.

V následujících příkladech jsou použity zkratky, které jsou známy odborníkům v oboru.

Příklady provedení vynálezu

Příklady 1-7

Kapalné čisticí prostředky na pevné povrchy

Složka	Příklad číslo						
	1	2	3	4	5	6	7
Proteáza ¹	0,05	0,05	0,20	0,02	0,03	0,10	0,03
Proteáza ²	-	-	-	-	-	0,20	0,1
Amyláza ³	-	0,002	0,002	0,0005	0,04	0,0008	0,005
Chelant**	-	-	-	2,90	2,90	-	-
Citrat	-	-	-	-	-	2,90	2,90
LAS	-	1,95	-	1,95	-	1,95	-
AS	2,00	-	2,20	-	2,20	-	2,20
AES	2,00	-	2,20	-	2,20	-	2,20
Aminoxid	0,40	-	0,50	-	0,50	-	0,50
Hydrotrop	-	1,30	-	1,30	-	1,30	-
Rozpouštědlo ***	-	6,30	6,30	6,30	6,30	6,30	6,30
Voda a minority	doplnit na 100 %						

²Proteáza jiná než proteáza¹ včetně dalších proteáz užitečných podle tohoto vynálezu

**Na₄ ethylendiamindioctová kyselina

***Diethylenglykolmonohehexylether

**** Všechny formulace jsou adjustovány na pH 7

V příkladech 6 a 7, libovolné kombinace proteázových enzymů užitečných podle tohoto vynálezu, jsou substituovány za Proteázu¹ a Proteázu², s v podstatě stejnými výsledky.

Příklady 2-7

Přípravky na mytí nádobí	Příklad číslo:					
	2	3	4	5	6	7
Proteáza ¹	0,05	0,50	0,02	0,40	0,10	0,03
Proteáza ²	-	-	-	-	0,40	0,1
Amyláza ³	0,002	0,002	0,0005	0,04	0,0008	0,005
TFAA I	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90
AES	12,00	12,00	12,00	12,00	12,00	12,00
2-methylundekanová kyselina	4,50	4,50	--	4,50	4,50	--
C12 ethoxy (2) karboxylát	4,50	4,50	4,50	4,50	4,50	4,50
C12 alkoholethoxylát (4)	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
Aminoxid	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
Hydrotrop	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Ethanol	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
Mg ⁺⁺ (jako MgCl ₂)	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
Ca ⁺⁺ (jako CaCl ₂)	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
Voda a minority ****	doplnit do 100 %					

²Proteáza jiná než proteáza¹ včetně dalších zde popsanych proteáz užitečných podle tohoto vynálezu

**** Všechny formulace jsou adjustovány na pH 7

V příkladech 6 a 7, libovolné kombinace proteázových enzymů užitečných podle tohoto vynálezu, jsou substituovány za Proteázu¹ a Proteázu², s v podstatě stejnými výsledky.

Příklad 8

Přípravek na mytí nádobí (A & B ADW, C kapalina)

Složka	A	B	C
STPP	17,5	-	-
Citrát		15,0	-
Natrium polyakrylát (MW 4500)	0,80	-	-
Acusol 480 N	-	5,10	-
Uhličitan draselný	8,30	-	-
Uhličitan sodný	-	8,50	-
2.1r K silikát	3,99	-	-
2.0r Na Silikát	2,00	-	-

3.2r Na silikát	5,18	-	-
tristearát hlinitý	0,10	-	-
neionický surfaktant	-	2,50	-
NaAE0.6S	-	-	24,70
glukosamid	-	-	3,09
C10E8	-	-	4,11
Betain	-	-	2,06
aminoxid	-	-	2,06
hořčík jako oxid	-	-	0,49
hydrotrop	-	-	4,47
natrium hypochlorit jako AvCl_2	1,15	-	-
Amyláza ¹	0,002	0,03	0,005
Proteáza ¹	0,01	0,43	0,05
Doplněno na 100 %			

Příklad 9

Kapalné prostředky na mytí nádobí (obzvláště vhodné do japonských podmínek)

Složka	A	B
AE1.45	24,69	24,69
N-kokoyl-N-methylglukamin	3,09	3,09
aminoxid	2,06	2,06
betain	2,06	2,06
neionický surfaktant	4,11	4,11
hydrotrop	4,47	4,47
hořčík	0,49	0,49
ethanol	7,2	7,2
LemonEase	0,45	0,45
Geraniol/BHT	-	0,60/0,02
Amyláza ³	0,03	0,005
Proteáza ¹	0,01	0,43
Doplněno na 100 %		

Příklad 10

Granulární přípravky na automatické praní prádla

Složka	A	B	C
kyselina citronová	15,0	-	-
citrát	4,0	29,0	15,0
akrylát/methakrylát kopolymer	6,0	-	6,0
kyselina akrylová/kyselina maleinová kopolymer	-	3,7	-
za sucha přidáný uhličitan	9,0	-	20,0
silikát alkalických kovů	8,5	17,0	9,0
parafin	-	0,5	-
benzotriazol	-	0,3	-
Amyláza ³	1,6	1,6	1,6
Proteáza ¹	0,2	0,1	0,06
Peroxyuhličitan (AvO)	1,5	-	-
peroxyboritan monohydrát	-	0,3	1,5
peroxyboritan tetrahydrát	-	0,9	-
tetraacetyلهنديamin	3,8	4,4	-
diethylentrieminpentamethylfosforečná kys.	0,13	0,13	0,13
(Mg sůl)			
alkylethoxysulfát -3 krát ethoxylovaný	3,0	-	-
alkylethoxypropoxyneionický surfaktant	-	1,5	-
čínidlo proti pění	2,0	-	-
Olin SLF18 neionický surfaktant	-	-	2,0
Sulfát	doplněno na 100 %		

Příklad 11

Kompaktní detergentní přípravky A až F na mytí nádobí s vysokou hustotou (0,96 kg/l) podle tohoto vynálezu:

Složka	A	B	C	D	E	F
STPP	-	51,4	51,4	-	-	44,3
Citrát	17,05	-	-	49,6	40,2	-
Karbonát	17,50	14,0	20,0	-	8,0	33,6
Hydrogenuhličitan	-	-	-	26,0	-	-
Silikát	14,81	15,0	8,0	-	25,0	3,6
Metasilikát	2,50	4,5	4,5	-	-	-
PB1	9,74	7,79	7,79	-	-	-
PB4	-	-	-	9,6	-	-

Peroxyuhličitan	-	-	-	-	11,8	4,8
Neionický	2,00	1,50	1,50	2,6	1,9	5,9
TAED	2,39	-	-	3,8	-	1,4
HEDP	1,00	-	-	-	-	-
DETPMP	0,65	-	-	-	-	-
Mn TACN	-	-	-	-	0,008	-
PAAC	-	0,008	0,008	-	-	-
Parafín	0,50	0,38	0,38	0,6	-	-
Proteáza ¹	0,1	0,06	0,05	0,03	0,07	0,01
Amyláza ³	1,5	1,5	1,5	2,6	2,1	0,8
BTA	0,30	0,22	0,22	0,3	0,3	0,3
Polykarboxylát	6,0	-	-	-	4,2	0,9
Parfém	0,2	0,12	0,12	0,2	0,2	0,2
Síran / voda	20,57	1,97	2,97	3,6	4,5	3,9
pH (1% roztok)	11,0	11,0	11,3	9,6	10,8	10,9

Příklad 12

Příklady granulárních detergentních přípravků na mytí nádobí A až F o hustotě 1,02 kg/l podle tohoto vynálezu:

Složka	A	B	C	D	E	F
STPP	30,00	33,5	27,9	29,62	33,8	22,0
Uhličitan	30,50	30,50	30,5	23,00	34,5	45,0
Silikát	7,40	7,50	12,6	13,3	3,2	6,2
Metasilikát	-	4,5				
Peroxyuhličitan	-	-		-	4,0	
PBI	4,4	4,5	4,3	-	-	
NaDCC	-	-		2,00	-	0,9
Neionický	1,0	0,75	1,0	1,90	0,7	0,5
TAED	1,00	-		-	0,9	
PAAC	-	0,004		-	-	
Parafín	0,25	0,25		-	-	
Proteáza ¹	0,05	0,06	0,025	0,1	0,02	0,07
Amyláza ³	0,38	0,64	0,46	-	0,6	
BTA	0,15	0,15		-	0,2	
Parfém	0,2	0,2	0,05	0,1	0,2	
Síran/voda	23,45	16,87	22,26	30,08	21,7	25,4

Příklad 13

Tabletové detergentní přípravky A až H podle tohoto vynálezu jsou připravovány kompresí granulárního detergentního přípravku při tlaku 13 KN/cm^2 s využitím standardního dvanáctihlavého rotujícího lisu:

Složky	A	B	C	D	E	F	G	H
STPP	-	48,8	54,7	38,2	-	52,4	56,1	36,0
Citrát	20,0	-	-	-	35,9	-	-	-
Karbonát	20,0	5,0	14,0	15,4	8,0	23,0	20,0	28,0
Silikát	15,0	14,8	15,0	12,6	23,4	2,9	4,3	4,2
Proteáza ¹	0,05	0,09	0,05	0,03	0,06	0,03	0,03	0,1
Amyláza ¹	1,5	1,5	1,5	0,85	1,9	0,4	2,1	0,3
PB1	14,3	7,8	11,7	12,2	-	-	6,7	8,5
PB4	-	-	-	-	22,8	-	3,4	-
Peroxyuhličitan	-	-	-	-	-	10,4	-	-
Neionický	1,5	2,0	2,0	2,2	1,0	4,2	4,0	6,5
PAAC	-	-	0,016	0,009	-	-	-	-
MnTACN	-	-	-	-	0,007	-	-	-
TAED	2,7	2,4	-	-	-	2,1	0,7	1,6
HEDP	1,0	-	-	0,93	-	0,4	0,2	-
DETPMP	0,7	-	-	-	-	-	-	-
Parafín	0,4	0,5	0,5	0,55	-	-	0,5	-
BTA	0,2	0,3	0,3	0,33	0,3	0,3	0,3	-
Polykarboxylát	4,0	-	-	-	4,9	0,6	0,8	-
PEG	-	-	-	-	-	2,0	-	2,0
Glycerin	-	-	-	-	-	0,4	-	0,5
Parfém	-	-	-	0,05	0,20	0,2	0,2	0,2
Síran/voda	17,4	14,7	-	15,74	-	-	-	11,3
hmotnost tablety	20g	25g	20g	30g	18g	20g	25g	24,0
pH (1% roztok)	10,7	10,6	10,7	10,7	10,9	11,2	11,0	10,8

Příklad 14

Přípravek pro automatické mytí nádobí ve tvaru tablety s výplní

Složka	A (% R. M.)	B (g R. M.)	C (g R. M.)
Těleso tablety			
uhličitan sodný	15,348	3,500	5,25
STPP (12 % H ₂ O)	46,482	10,600	9,93
Gran HEDP	0,789	0,180	0,28
SKS 6	6,578	1,500	2,25
silikát	7,016	1,600	1,65
PB1	10,743	2,450	3,68
Termamyl 2x PCA	0,491	0,112	0,17
Savináza	0,526	0,120	0,18
Plurafac	3,508	0,800	0,9
BTA	0,263	0,060	0,09
PEG	1,140	0,260	-
PEG 4000	-	-	0,39
Winog	0,439	0,100	0,15
Parfém	0,101	0,023	0,01
Výplň			
kyselina citronová	0,987	0,225	0,23
hydrogenuhličitan	2,600	0,593	0,59
Sandolan EHRL barvivo	0,007	0,0017	0,0017
PEG 400/4000	0,395	0,090	-
PEG 400	-	-	0,02
PEG 4000	-	-	0,08
Proteáza ¹	0,05	0,268	0,27
Amyláza ³	1,412	0,322	0,32

Granulární přípravek na čištění tkanin

Granulární přípravek na čištění tkanin podle tohoto vynálezu obsahuje účinné množství jednoho nebo více proteázových enzymů, s výhodou od asi 0,001 % do asi 10 %, výhodněji od asi 0,005 % do asi 5 %, ještě výhodněji od asi 0,01 % do asi 1 % hmotnosti proteázového enzymu na hmotnost přípravku (viz. U. S. Patent 5,679,630, Příklady).

Příklad 15

Granulární přípravek na čištění tkanin

Složka	Příklad číslo:			
	A	B	C	D
Proteáza ¹	0,10	0,20	0,03	0,05
Proteáza ²	-	-	0,2	0,15
Amyláza ³	0,002	0,0005	0,04	0,005
C ₁₃ lineární alkylbenzensulfonát	22,00	22,00	22,00	22,00
Fosfát (jako tripolyfosfát sodný)	23,00	23,00	23,00	23,00
Uhlíčan sodný	23,00	23,00	23,00	23,00
Silikát sodný	14,00	14,00	14,00	14,00
Zeolit	8,20	8,20	8,20	8,20
Chelant (diethylentriaminpentaoctová kyselina)	0,40	0,40	0,40	0,40
Síran sodný	5,50	5,50	5,50	5,50
Voda	doplněno na 100 %			

²Proteáza jiná než ¹Proteáza včetně dalších proteáz užitečných podle tohoto vynálezu.

V příkladech 15C a D může být namísto Proteázy¹ a Proteázy² použita libovolná kombinace proteázových enzymů užitečných podle tohoto vynálezu, přičemž výsledky jsou v podstatě stejné.

Příklad 16

Granulární přípravek pro čištění tkanin

Složka	Příklad číslo:			
	A	B	C	D
Proteáza ¹	0,10	0,20	0,03	0,05
Proteáza ²	-	-	0,2	0,15
Amyláza ³	0,002	0,0005	0,04	0,005
C ₁₂ lineární alkylbenzensulfonát	22,00	22,00	22,00	22,00

2-butyloktanová kyselina	4,00	4,00	4,00	4,00
C ₁₂ -C ₁₄ sekundární (2,3)alkylsulfát	5,00	5,00	5,00	5,00
sodná sůl				
Citrát sodný	5,00	5,00	5,00	5,00
Optický zjasňovač	0,10	0,10	0,10	0,40
Síran sodný	17,00	17,00	17,00	17,00
Plnidlo, Voda, minority		doplněno na 100 %		

²Proteáza jiná než ¹Proteáza včetně dalších proteáz užitečných podle tohoto vynálezu.

V příkladech 16C a D může být namísto Proteázy¹ a Proteázy² použita libovolná kombinace proteázových enzymů užitečných podle tohoto vynálezu, přičemž výsledky jsou v podstatě stejné.

Příklad 17

Granulární přípravek na čištění tkanin

Příklad číslo:

Složka	A	B
Lineární alkylbenzensulfonát	11,4	10,70
Lůj alkylsulfát	1,80	2,40
C ₁₄ -C ₁₅ alkylsulfát	3,00	3,10
C ₁₄ -C ₁₅ alkohol 7krát ethoxylovaný	4,00	4,00
Lůjalkohol 11krát ethoxylovaný	1,80	1,80
Dispergant	0,07	0,1
Silikonová kapalina	0,80	0,80
Citrát trisodný	14,00	15,00
Kyselina citronová	3,00	2,50
Zeolit	32,50	32,10
Maleinová kys/akrylová kys. kopolymer	5,00	5,00
Diethylentriaminpentamethylen fosforečná kyselina	1,00	0,20

Proteáza ¹	0,1	0,01
Lipáza	0,36	0,40
Amyláza ³	0,30	0,30
Silikát sodný	2,00	2,50
Síran sodný	3,50	5,20
Polyvinylpyrrolidon	0,30	0,50
Peroxyborát	0,5	1
Fenolsulfonát	0,1	0,2
Peroxidáza	0,1	0,1
Minority	až do 100	až do 100

Příklad 18

Granulární přípravky na čištění tkanin

Příklad číslo:

Složka	A	B
sodný lineární C ₁₂ alkylbenzensulfonát	6,5	8,0
Síran sodný	15,0	18,0
Zeolit A	26,0	22,0
Nitrilotriacetát sodný	5,0	5,0
Polyvinylpyrrolidon	0,5	0,7
Tetraacetylethylendiamin	3,0	3,0
Kyselina boritá	4,0	-
Peroxyboritan	0,5	1
Fenolsulfonát	0,1	0,2
Proteáza ¹	0,02	0,05
Amyláza ³	0,005	0,002
Plnidla (např. silikáty, uhličitany, parfémy, voda)	až do 100	až do 100

Příklad 19

Kompaktní granulární přípravek na čištění tkanin

Složky	Hmotnostní %
Alkylsulfát	8,0
Alkylethoxysulfát	2,0
Směs C25 a C45 alkohol 3-krát až 7-krát ethoxylovaný	6,0
Amid polyhydroxymastné kyseliny	2,5
Zeolit	17,0
Vrstvený silikát/citrát	16,0
Uhličitan	7,0
Maleinová kyselina/akrylová kyselina kopolymer	5,0
Polymer uvolňující špínu	0,4
Karboxymethylcelulóza	0,4
Poly(4-vinylpyridin)-N-oxid	0,1
Kopolymer vinylimidazolu a vinylpyrrolidonu	0,1
PEG2000	0,2
Proteáza ¹	0,03
Lipáza	0,2
Celuláza	0,2
Amyláza ³	0,005
Tetraacetyلهthylendiamin	6,0
Perkarbonát	22,0
Ethylendiamindijantarová kyselina	0,3
Potlačovač pění	3,5
Disodná sůl 4,4'-bis(2-morfolino-4-anilino-s-triazin-6-ylamino)stilben-2,2'-disulfonátu	0,25
Disodná sůl 4,4'-bis(2-sulfostyryl)bifenyly	0,05
Voda, Parfém a minority	doplnit do 100

Příklad 20

Granulární přípravek na čištění tkanin

Složky	Hmotnostní %
Lineární alkylbenzensulfonát	7,6
C ₁₆ -C ₁₈ alkylsulfát	1,3
C ₁₄ a C ₁₅ alkohol 7-krát ethoxylovaný	4,0
Kokoalkyldimethylhydroxyethylamonium chlorid	1,4
Disperzant	0,07
Silikonová kapalina	0,8
Citrát trisodný	5,0
Zeolit 4A	15,0
Maleinová kyselina/akrylová kyselina kopolymer	4,0
Diethylenetriaminpentamethylenfosforečná kyselina	0,4
Peroxyboritan	15,0
Tetraacetylen diamin	5,0
Smektický jíl	10,0
Poly(oxyethylen) (MW 300,000)	0,3
Proteáza ¹	0,02
Lipáza	0,2
Amyláza ³	0,3
Celulóza	0,2
Silikát sodný	3,0
Uhličitan sodný	10,0
Karboxymethylcelulóza	0,2
Zjasňovače	0,2
Voda, parfém a minority	doplnit do 100

Příklad 21

Granulární přípravek na čištění tkanin

Složky	Hmotnostní %
Lineární alkylbenzensulfonát	6,92
Lůjalkylsulfát	2,05
C ₁₄ a C ₁₅ alkohol 7-krát ethoxylovaný	4,4
C ₁₂ a C ₁₅ alkoholethoxysulfát 3-krát ethoxylovaný	0,16
Kokoalkyldimethylhydroxyethylamonium chlorid	1,4
Zeolit	20,2
Citrát	5,5
Uhličitan	15,4
Silikát	3,0
Maleinová kyselina/akrylová kyselina kopolymer	4,0
Diethylentriaminpentamethylenfosforečná kyselina	0,4
Karboxymethylcelulóza	0,31
Polymer uvolňující špínu	0,30
Proteáza ¹	0,1
Lipáza	0,36
Celuláza	0,13
Amyláza ³	0,005
Perborát tetrahydrát	11,64
Perborát monohydrát	8,7
Tetraacetylenethyldiamin	5,0
Diethylentriaminpentamethylfosforečná kyselina	0,38
Síran hořečnatý	0,40
Zjasňovač	0,19
Parfém, silikon a potlačovače pění	0,85
Minority	doplnit do 100

Příklad 22

Granulární přípravky na čištění tkanin

Složka	A	B	C
Základní složky granulí			
LAS/AS/AES (63/35)	9,95	-	-
LAS/AS/AES (70/30)		12,05	7,70
Aluminosilikát	14,06	15,74	17,10
Uhličitan sodný	11,86	12,74	13,07
Silikát sodný	0,58	0,58	0,58
NaPAA tuhá	2,26	2,26	1,47
PEG tuhé	1,01	1,12	0,66
Zjasňovače	0,17	0,17	0,11
DTPA	-	-	0,70
Sulfát	5,46	6,64	4,25
DC-1400 deareant	0,02	0,02	0,02
Vlhkost	3,73	3,98	4,33
Minority	0,31	0,49	0,31
BOT nasprejovaný			
Neionický surfaktant	0,50	0,50	0,50
Složky aglomerátů			
LAS/AS (25/75)	11,70	9,60	10,47
Aluminosilikát	13,73	11,26	12,28
Uhličitan	8,11	6,66	7,26
PEG 4000	0,59	0,48	0,52
Vlhkost/minority	4,88	4,00	4,36
Funkční aditiva			
Uhličitan sodný	7,37	6,98	7,45
Peroxyboritan	1,03	1,03	2,56
AC základní povlak	-	1,00	-
NOBS	-	-	2,40
Polymer uvolňující špínu	0,41	0,41	0,31

Celuláza	0,33	0,33	0,24
Proteáza ¹	0,1	0,05	0,15
Amyláza ³	0,002	0,005	0,04
AE-vločky	0,40	0,40	0,29
Kapalina nasprejovaná			
Parfém	0,42	0,42	0,42
Neionické sprejování	1,00	1,00	0,50
Miority		doplnit do 100	

Příklad 23

Granulární prostředek na čištění tkanin

	A	B
Surfaktant		
-Na LAS	6,40	-
-KLAS	-	9,90
-AS/AE3S	6,40	4,39
-TAS	0,08	0,11
-C24AE5	3,48	-
-Genagen	-	1,88
-N-kokoyl-N-methyl glukamin (lin)	1,14	2,82
hydroxyethyl amonium chlorid	1,00	1,40
Pojidlo		
-Zeolit	20,59	13,39
-SKS-6	10,84	10,78
-Kyselina citronová	2,00	-
Pufr		
-Uhličitan	9,60	12,07
-Hydrogenuhlíčan	2,00	2,00
-Síran	2,64	-
-Silikát	0,61	0,16
Polymer		
-Akrylová kyselina/maleinová kyselina kopolymer (Na)	1,17	1,12
-CMC	0,45	0,24

-Polymer	0,34	0,18
-Hexamethylendiamin tetra-E24	1,00	1,00
ethoxylát, dikvarternizovaný s methylchloridem		

Enzymy

-Proteáza ¹	0,03	0,03
(% čistého enzymu)		
-Celuláza	0,26	0,26
-Amyláza ³	0,65	0,73
-Lipáza	0,27	0,15

Bělidlo

-TAED (100%)	3,85	3,50
-Fenolsulfonát ester N-nonanoyl-6-aminokapronová kyselina	-	2,75
-Peroxyuhličitan	16,20	18,30
-HEDP	0,48	0,48
-EDDS	0,30	0,30

Různé

-Jablečné částice		2,20 + bicarb.
-Zjasňovač 15/49	0,077/0,014	0,07/0,014
-Zinečný ftalokyaninsulfonát	0,0026	0,0026
-Polydimethylsiloxan s trimethylsilylovou koncovou blokující skupinou	0,25	0,24
-Mýdlo	-	1,00
-Parfém	0,45	0,55
CELKEM	100	100

Příklad 24

Granulární prostředek na čištění tkanin

	A	B
	%	%
Surfaktant		
Na LAS	6,8	0,4
KLAS	-	10,9
FAS	0,9	0,1
AS	0,6	1,5
C25AE3S	0,1	-
AE5	4,2	-
N-kokoyl-N-methylglukamin	-	1,8
Genagen	-	1,2
C8-10 dimethylhydroxyethyl amonium chlorid	-	1,0
Pojidlo		
SKS-6	3,3	9,0
Zeolit	17,2	18,9
Kyselina citronová	1,5	-
Pufr		
Uhličitan	21,10	15,0
Hydrogenuhlíčan sodný	-	2,60
Síran	15,2	5,5
Kyselina jablečná	-	2,9
Silikát	0,1	-
Polymer		
Akrylová kyselina/maleinová kyselina kopolymer (Na)	2,2	0,9
Hexamethylendiamin tetra-E24 ethoxylát dikvarternizovaný s methylchloridem	0,5	0,7
Polymer	0,1	0,1
CMC	0,2	0,1
Enzymy		
Proteáza ¹	0,02	0,05
(% čistého enzymu)		
Lipáza	0,18	0,14
Amyláza ³	0,64	0,73
Celuláza	0,13	0,26

Bělídlo

TAED	2,2	2,5
Fenolsulfonát ester N-nonanoyl-6-aminokapronové kyseliny	-	1,96
Peroxyuhličitan sodný	-	13,1
PB4	15,6	-
EDDS	0,17	0,21
MgSO ₄	0,35	0,47
HEDP	0,15	0,34
Různé		
Zjasňovač	0,06	0,04
Zinečný ftalokyaninsulfonát	0,0015	0,0020
Polydimethylsiloxan s trimethylsilylovou koncovými blokujícími skupinami	0,04	0,14
Mýdlo	0,5	0,7
Parfém	0,35	0,45
Tečky	0,5	0,6

Příklad 25

Granulární detergentní přípravky pro praní prádla 25 A-C jsou obzvláště užitečné v evropských pračkách a připravují se v souladu s tímto vynálezem:

Složka	A	B	C
LAS	7,0	5,61	4,76
TAS	-	-	1,57
C45AS	6,0	2,24	3,89
C25E3S	1,0	0,76	1,18
C45E7		-	2,0
C25E3	4,0	5,5	-

QAS	0,8	2,0	2,0
STPP		-	-
Zeolit A	25,0	19,5	19,5
kyselina citronová	2,0	2,0	2,0
NaSKS-6	8,0	10,6	10,6
Uhlíčitan I	8,0	10,0	8,6
MA/AA	1,0	2,6	1,6
CMC	0,5	0,4	0,4
PB4	-	12,7	-
Peroxyuhličitan	-	-	19,7
TAED		3,1	5,0
Citrat	7,0	-	-
DTPMP	0,25	0,2	0,2
HEDP	0,3	0,3	0,3
QEA I	0,9	1,2	1,0
Proteáza	0,02	0,05	0,035
Lipáza	0,15	0,25	0,15
Celluláza	0,28	0,28	0,28
Amyláza	0,4	0,7	0,3
PVPI/ PVNO	0,4	-	0,1
fotoaktivované bělidlo (ppm)	15 ppm	27 ppm	27 ppm

Zjasňovač 1	0,08	0,19	0,19
Zjasňovač 2	-	0,04	0,04
Parfém	0,3	0,3	0,3
Šumivé granule (kyselina mléčná 40%, hydrogenuhličitan sodný 40 %, uhličitan sodný 20%)	15	15	5
Silikonové protipěnové čínidlo	0,5	2,4	2,4
Minority/inerty do 100 %			

Příklad 26

Následující formulace jsou příklady přípravků podle tohoto vynálezu, které mohou být buď ve formě granulí nebo ve formě tablet.

Složka	26
Základní produkt	
C45 AS/TAS	3,0
LAS	8,0
C25AE3S	1,0
NaSKS-6	9,0
C25AE5/AE3	5,0
Zeolit A	10,0
SKS-6 (I) (za sucha přidávaný)	2,0
MA/AA	2,0
citronová kyselina	1,5
EDDS	0,5
HEDP	0,2
PBI	10,0
NACA OBS	2,0
TAED	2,0
uhličitan	8,0
síran	2,0
Amyláza ³	0,3
Lipáza	0,2
Proteáza ¹	0,02
Minority (zjasňovač/SRP1/ CMC/fotobělidlo/MgSO4/ PVPVI/potlačovač pění/	0,5
Parfém	0,5

Příklad 27

Následující granulární prostředky pro praní prádla 27 A-E jsou obzvláště užitečné v japonských pračkách a jsou připravovány v souladu s tímto vynálezem:

Složka	A	B	C	D	E
LAS	23,57	23,57	21,67	21,68	21,68
FAS	4,16	4,16	3,83	3,83	3,83
Neionický surfaktant	3,30	3,30	2,94	3,27	3,27
Bis(hydroxyethyl)methyl alkyl amoniumchlorid	0,47	0,47	1,20	1,20	1,20
SKS-6	7,50	7,50	5,17	5,76	5,06
Polyakrylátový kopolymer (m. h. 11000) (kyselina maleinová/ kyselina akrylová v poměru 4:6)	7,03	7,03	14,36	14,36	14,36
Zeolit	11,90	11,40	10,69	11,34	11,34
Uhličitan	14,90	14,82	11,71	11,18	11,18
Silikát	12,00	12,00	12,37	12,38	12,38
Proteáza ¹	0,016	0,016	0,046	0,046	0,046
Lipáza	-	-	0,28	-	-
Amyláza ²	-	-	0,62	-	-
Celuláza	-	-	0,48	-	0,70
NOBS	3,75	3,75	2,70	2,70	2,70
PBI	3,53	-	2,60	-	-

Peroxyuhličitan sodný	-	4,21	-	3,16	3,16
SRP	0,52	0,52	0,70	0,70	0,70
Zjasňovač	0,31	0,31	0,28	0,28	0,50
AE- vločky	0,17	0,20	0,17	0,17	0,17
Polydimethylsiloxan	-	-	0,68	0,68	0,68
Parfém	0,06	0,06	0,08	-	-
Parfém	-	-	-	0,23	0,23
Hydrofobní srážený oxid křemičitý	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30
PEG4000	0,19	0,19	0,17	0,17	0,17
Minority/inerty do 100 %					

Kapalné prostředky pro čištění tkanin

Kapalné prostředky pro čištění tkanin podle tohoto vynálezu s výhodou zahrnují účinné množství jednoho nebo více proteázových enzymů, s výhodou od 0,0001 % do asi 10 %, výhodněji od 0,001 % do asi 1 % a nejvýhodněji od asi 0,001 % do asi 0,1 % hmotnosti aktivního enzymu na hmotnost přípravku (Viz. U. S. Patent 5,679,630 Příklady).

Příklad 28

Kapalný prostředek na čištění tkanin

Složka	Example No.				
	A	B	C	D	E
Proteáza1	0,05	0,03	0,30	0,03	0,10
Proteáza 2	-	-	-	0,1	0,20
Amyláza 3					
C12-C14 alkylsulfát sodný	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00
2-butyloktanová kyselina	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
citrát sodný	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
C10 alkohol ethoxylát (3)	13,00	13,00	13,00	13,00	13,00
Monoethanolamin	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50
Voda/própylenglykol/ethanol (100:1:1)	doplněno na 100 %				

²Proteáza jiná než ¹Proteáza včetně dalších proteáz užitečných podle tohoto vynálezu.

V příkladech 28D a E může být namísto Proteázy¹ a Proteázy² použita libovolná kombinace proteázových enzymů užitečných podle tohoto vynálezu, přičemž výsledky jsou v podstatě stejné.

Příklady 29

Kapalné prostředky na čištění tkanin

Složka	Příklad č.	
	A	B
C ₁₂ -C ₁₄ alkenyljantarová kyselina	3,0	8,0
Monohydrát kyseliny citronové	10,0	15,0
Sodný C ₁₂ -C ₁₅ alkylsulfát	8,0	8,0
Sodný sulfát C ₁₂ -C ₁₅ alkohol 2-krát ethoxylovaný	-	3,0
C ₁₂ -C ₁₅ alkohol 7-krát ethoxylovaný	-	8,0
C ₁₂ -C ₁₅ alkohol 5-krát ethoxylovaný	8,0	-
Diethylentriaminpenta(methylenfosforečná kyselina)	0,2	-
Kyselina olejová	1,8	-
Ethanol	4,0	4,0
Propandiol	2,0	2,0
Proteáza ¹	0,01	0,02
Amyláza ³	0,005	0,002
Polyvinylpyrrolidon	1,0	2,0
Potlačovač pění	0,15	0,15
NaOH	až do pH 7,5	
Peroxyboritan	0,5	1
Fenolsulfonát	0,1	0,2
Peroxidáza	0,4	0,1
Voda a minority	doplnit do 100 %	

Příklad 30

Kapalné přípravky pro čištění tkanin

	Příklad č.
Složka	28
NaLAS (100 %)	16
Neodol	21,5
Citrát	6,8
EDDS	1,2
Dispergant	1,3
Peroxyboritan	12
Fenolsulfonátový ester N-nonanoyl-6-aminokapro- nové kyseliny	6
Proteáza ¹ (% čistého enzymu)	0,03
Amyláza ³	0,40
Carezym	0,03
Rozpouštědlo (BPP)	18,5
Polymer	0,1
Uhličitan	10
FWA 15	0,2
TiO ₂	0,5
PEG 8000	0,4
Parfém	1,0-1,2
Potlačovač pění	0,06
Voda a minority	až do 100 %

Příklad 31

Kapalné prostředky pro čištění tkanin

	Příklady č.	
Složky	A	B
D1 H ₂ O	38,43	-
MEA	0,48	9,0
NaOH	4,40	1,0
Pdiol	4,00	10,0
Kyselina citronová	2,50	2,0

DTPA	0,50	1,0
FWA Premix (Br 15/MEA/Ni 23-9)	0,15	0,15
Na C25AE1.80S	23,50	-
AE3S (H)	-	4,0
C11.8HLAS	3,00	14,0
Neodol	2,00	6,0
EtOH	0,50	2,0
Ca formiát	0,10	0,10
Borax premix (Borax/MEA/Pdiol/citronová kys.)	2,50	-
C10 APA	1,50	-
TEPA 105	1,20	-
FA C12-18	5,00	-
Neptune LC	0,50	-
Barvivo	0,0040	0,0015
Celuláza	0,053	0,2
Amyláza ³	0,15	0,2
Proteáza ¹	0,1	0,1
DC 2-3597	0,12	0,2
Řepkový FA	6,50	4,0
Voda a minority		až do 100 %

Příklady 32

Kapalný přípravek pro čištění tkanin

Složka	30
NaOH	5,50
Pdiol	6,90
Kyselina citronová	1,50
DTPA	1,50
FWA Premix (Br 15/MEA/Ni 23-9)	0,15
AE3S (H)	2,50
LAS (H)	13,0
Neodol	2,00
EtOH	3,50
Ca formiát	0,10
Kyselina boritá	1,00
Jíly	4,00
Amyláza ³	0,15
Proteáza ¹	0,02

Mastné kyseliny	16,50
Voda a minority	až do 100 %

Příklad 34

Kapalné přípravky na čištění tkanin

Následující kapalný přípravek je obzvlášť vhodný pro japonské pračky a připravuje se pomocí tohoto vynálezu.

Složka	34
AE2.5S	15,00
AS	5,50
N-kokoyl N-methylglukamin	5,00
Neionický surfaktant	4,50
Kyselina citronová	3,00
Mastná kyselina	5,00
Báze	0,97
Monoethanolamin	5,10
1,2-Propandiol	7,44
EtOH	5,50
HXS	1,90
Kyselina boritá	3,50
Ethoxylovaný tetraethylen	3,00
pentaimin	
SRP	0,30
Proteáza ¹	0,069
Amyláza ³	0,06
Celuláza	0,08
Lipáza	0,18
Zjasňovač	0,10
Minority/inerty do 100 %	

Příklad 35

Kapalné přípravky na čištění tkanin

Následující kapalný přípravek je obzvlášť vhodný pro japonské pračky pro praní jemného prádla a připravuje se pomocí tohoto vynálezu.

Složka	34
AE2.5S	2,16
AS	3,30
N-kokoyl N-methylglukamin	1,10
Neionický surfaktant	10,00
Kyselina citronová	0,40
Mastná kyselina	0,70
Báze	0,85
Monoethanolamin	1,01

1,2-Propandiol	1,92
EtOH	0,24
HXS	2,09
Proteáza ¹	0,01
Amyláza ³	0,06
Minority/inerty do 100 %	

Kusové čisticí prostředky na tkaniny

Kusové čisticí prostředky na tkaniny podle tohoto vynálezu vhodné pro ruční mytí zašpiněných tkanin typicky obsahují účinné množství jednoho nebo více proteázových enzymů, s výhodou od asi 0,001 % do asi 10 %, výhodněji od asi 0,01 % do asi 1 % hmotnosti aktivního proteázového enzymu na hmotnost přípravku (viz. U. S. Patent 5,679,630 Příklady).

Příklad 36

Kusové čisticí prostředky na tkaniny

Složka	Příklady č.			
	A	B	C	D
Proteáza 1	0,3	-	0,1	0,02
Proteáza 2	-	-	0,4	0,1
Amyláza 3	0,01	0,02	0,002	0,005
C12-C16 alkylsulfát sodný	20,0	20,0	20,0	20,00
C12-C14 N-methylglukamid	5,0	5,0	5,0	5,00
C11-C13 alkylbenzensulfonát sodný	10,0	10,0	10,0	10,00
uhličitan sodný	25,0	25,0	25,0	25,00
tripolyfosfát sodný	7,0	7,0	7,0	7,00
Zeolit A (0,1-10 μ)	5,0	5,0	5,0	5,00
Karboxymethylcelulóza	0,2	0,2	0,2	0,20
Polyakrylát (m. h. 1400)	0,2	0,2	0,2	0,20
kokosový monoethanolamid	5,0	5,0	5,0	5,00
Zjasňovač, parfém	0,2	0,2	0,2	0,20
CaSO ₄	1,0	1,0	1,0	1,00
MgSO ₄	1,0	1,0	1,0	1,00
Voda	4,0	4,0	4,0	4,00
Plnidlo *	doplněno do 100 %			

* Může být vybrán z konvenčních materiálů jako jsou CaCO₃, talek, jí, silikáty a pod.

²Proteáza jiná než Proteáza¹ včetně dalších proteáz užitečných podle tohoto vynálezu.

V příkladech 28D a E může být namísto Proteázy¹ a Proteázy² použita libovolná kombinace proteázových enzymů užitečných podle tohoto vynálezu, přičemž výsledky jsou

v podstatě stejné.

Zatímco byly popsány konkrétní provedení předmětu vynálezu, bude odborníkům v oboru zřejmé, že mohou být provedeny různé změny a modifikace aniž bychom se vzdálili od platnosti a rozsahu vynálezu.

Přípravky podle tohoto vynálezu mohou být vhodně připraveny libovolným procesem vybraným pracovníkem provádějícím formulaci, přičemž nikoliv vyčerpávající příklady lze nalézt v U. S. 5,691,297 (Nassano et al.) vydaném 11. listopadu 1997, U. S. 5,574,005 (Welch et al.) vydaném 12. listopadu 1996, U. S. 5,569,645 (Dinniwell et al.), vydaném 29. října 1996, U. S. 5,565,422 (Del Greco et al.), vydaném 15. října 1996, U. S. 5,516,448 (Capeci et al.) vydaném 14. května 1996, U. S. 5,489,392 (Capeci et al.) vydaném 6. února 1996, U. S. 5,486,303 (Capeci et al.) vydaném 23. ledna 1996, které jsou zde všechny zahrnuty jako reference.

Kromě výše uvedených příkladů mohou být čisticí přípravky podle tohoto vynálezu formulovány do vhodných detergentních prostředků na praní prádla, jejichž nikoliv vyčerpávající příklady lze nalézt v U. S. 5,679,630 (Baech et al.) vydaném 21. října 1997, U. S. 5,565,145 (Watson et al.) vydaném 15. října 1996, U. S. 5,478,489 (Fredj et al.) vydaném 26. prosince 1995, U. S. 5,470,507 (Fredj et al.) vydaném 28. listopadu 1995, U. S. 5,466,802 (Panandiker et al.) vydaném 14. listopadu 1995, U. S. 5,460,752 (Fredj et al.) vydaném 24. října 1995, U. S. 5,458,810 (Fredj et al.) vydaném 17. října 1995, U. S. 5,458,809 (Fredj et al.) vydaném 17. října 1995, U. S. 5,288,431 (Huber et al.) vydaném 22. února 1994, které jsou zde všechny zahrnuty jako reference.

Zatímco byl detailně popsán vynález s odkazy na preferovaná provedení a příklady, bude odborníkům v oboru zřejmé, že mohou být provedeny různé změny a modifikace aniž bychom se vzdálili od platnosti a rozsahu vynálezu, neboť vynález není omezen pouze popisy ve specifikacích.

Průmyslová využitelnost

Vynález popisuje nové čisticí prostředky zahrnující proteázové varianty, vzniklé substitucí aminokyselinových zbytků ve vybraných polohách přirozeně se vyskytujícího subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens*. Tyto čisticí prostředky jsou vhodné jako prací prostředky pro praní prádla, čisticí prostředky na mytí nádobí nebo prostředky pro osobní hygienu.

Seznam sekvencí

Sekvence ID č. 1

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

Gly Ala Ile Glu Asn Tyr Leu Asn Lys Thr Ser Trp Asn His Ser Val
 275 280 285
 Phe Asp Val Pro Leu His Tyr Asn Leu Tyr Asn Ala Ser Asn Ser Gly
 290 295 300
 Gly Tyr Tyr Asp Met Arg Asn Ile Leu Asn Gly Ser Val Val Gln Lys
 305 310 315 320
 His Pro Thr His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Ser Gln Pro
 325 330 335
 Gly Glu Ala Leu Glu Ser Phe Val Gln Gln Trp Phe Lys Pro Leu Ala
 340 345 350
 Tyr Ala Leu Val Ieu Thr Arg Glu Gln Gly Tyr Pro Ser Val Phe Tyr
 355 360 365
 Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Thr His Gly Val Pro Ala Met Lys Ser
 370 375 380
 Lys Ile Asp Pro Ieu Leu Gln Ala Arg Gln Thr Phe Ala Tyr Gly Thr
 385 390 395 400
 Gln His Asp Tyr Phe Asp His His Asp Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu
 405 410 415
 Gly Asn Ser Ser His Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asp
 420 425 430
 Gly Pro Gly Gly Asn Lys Trp Met Tyr Val Gly Lys Asn Lys Ala Gly
 435 440 445
 Gln Val Trp Arg Asp Ile Thr Gly Asn Arg Thr Gly Thr Val Thr Ile
 450 455 460
 Asn Ala Asp Gly Trp Gly Asn Phe Ser Val Asn Gly Gly Ser Val Ser
 465 470 475 480
 Val Trp Val Lys Gln
 485

Sekvence ID č. 2

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

Gly Ala Leu Glu Asn Tyr Leu Asn Lys Thr Asn Trp Asn His Ser Val
 275 280 285
 Phe Asp Val Pro Leu His Tyr Asn Leu Tyr Asn Ala Ser Asn Ser Gly
 290 295 300
 Gly Asn Tyr Asp Met Ala Lys Leu Leu Asn Gly Thr Val Val Gln Lys
 305 310 315
 His Pro Met His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Ser Gln Pro
 320 325 330 335
 Gly Glu Ser Leu Glu Ser Phe Val Gln Glu Trp Phe Lys Pro Leu Ala
 340 345 350
 Tyr Ala Leu Ile Leu Thr Arg Glu Gln Gly Tyr Pro Ser Val Phe Tyr
 355 360 365
 Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Thr His Ser Val Pro Ala Met Lys Ala
 370 375 380
 Lys Ile Asp Pro Ile Leu Glu Ala Arg Gln Asn Phe Ala Tyr Gly Thr
 385 390 395
 Gln His Asp Tyr Phe Asp His His Asn Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu
 400 405 410 415
 Gly Asn Thr Thr His Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asp
 420 425 430
 Gly Pro Gly Gly Glu Lys Trp Met Tyr Val Gly Gln Asn Lys Ala Gly
 435 440 445
 Gln Val Trp His Asp Ile Thr Gly Asn Lys Pro Gly Thr Val Thr Ile
 450 455 460
 Asn Ala Asp Gly Trp Ala Asn Phe Ser Val Asn Gly Gly Ser Val Ser
 465 470 475
 Ile Trp Val Lys Arg
 480

Sekvence ID č. 3

His-His-Asn-Gly-Thr-Asn-Gly-Thr-Met-Met-Gln-Tyr-Phe-Glu-Trp-Tyr-Leu-Pro-
Asn-Asp

Sekvence ID č. 4

AAPFNGTMMQ	YFEWYLPDDG	TLWTKVANE	NNLSSLGITA	LWLPPAYKGT
SRSDVGYGVY	DLYDLGEFNO	KGAVRTKYGT	KAQYLQAIQA	
	AAHAGMQVYA			
DVVFDPKGGG	DGTEWVDAVE	VNPSDRNQE	SGTYQIQAWT	KDFPGRGNT
YSSFKWRWYH	FDGVDWDESR	KLSRIYKFRG	IGKAWDWEVD	
TENGNIDYLM				
YADLMDHPE	VVTELKSWGK	WYVNTTNIDG	FRLDAVKHIK	FSFFPDWLSO
VRSOTGKPLF	TVGEYWSYD	NKLHNYIMKT	NGTMSLFDAP	LHNKFYTASK
SGGTDFMRTL	MTNTLMKDOP	TLAVTFVDNH	DTEPGQALQS	
	WVDPWFKPLA			
YAFILTRQEG	YPCVFYGDYY	GIPOYNIPSL	KSKIDPLLIA	RRDYAYGTQH
DYLDHSDIIG	WTREGVTEKP	GSGLAALITD	GPGGSKWMYV	
GKOHAGKVFY				
DLTGNRSDTV	TINSDGWGEF	KVNGGSVSVW	VPRKTTVSTI	AWSITTRPWT
DEFVRWTEPR	LVAWP			

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Čistící prostředek na tkaniny, mytí nádobí a/nebo čištění pevných povrchů,

v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje:

a) účinné množství proteázové varianty, kde zmíněná proteázová varianta zahrnuje substituci aminokyselinového zbytku s jiným přirozeně se vyskytujícím aminokyselinovým zbytkem v poloze odpovídající pozici 103 u subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens* v kombinaci se substitucí aminokyselinového zbytku s jiným přirozeně se vyskytujícím aminokyselinovým zbytkem v jedné nebo více polohách odpovídajících pozicím 1, 3, 4, 8, 9, 10, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 24, 27, 33, 37, 38, 42, 43, 48, 55, 57, 58, 61, 62, 68, 72, 75, 76, 77, 78, 79, 86, 87, 89, 97, 98, 99, 101, 102, 104, 106, 107, 109, 111, 114, 116, 117, 119, 121, 123, 126, 128, 130, 131, 133, 134, 137, 140, 141, 142, 146, 147, 158, 159, 160, 166, 167, 170, 173, 174, 177, 181, 182, 183, 184, 185, 188, 192, 194, 198, 203, 204, 205, 206, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 222, 224, 227, 228, 230, 232, 236, 237, 238, 240, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 265, 268, 269, 270, 271, 272, 274 a 275 subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens*; kde když zmíněná varianta zahrnuje substituci aminokyselinového zbytku v pozicích 103 a 76, obsahuje také substituci aminokyselinového zbytku v jedné nebo více aminokyselinových poloh jiných než odpovídá aminokyselinovým pozicím 27, 99, 101, 104, 107, 109, 123, 128, 166, 204, 206, 210, 216, 217, 218, 222, 260, 265 nebo 274 subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens*;

b) amylázovou variantu, kde zmíněná amylázová varianta je vybrána ze skupiny obsahující:

i) α -amylázu charakterizovanou tím, že má specifickou aktivitu nejméně o 25 % vyšší než je specifická aktivita Termamyl® při teplotě v rozsahu od 25 °C do 55 °C a při hodnotách pH v rozsahu od 8 do 10, měřeno pomocí stanovení α -amylázové aktivity Phadebas® a/nebo

ii) α -amylázu podle i) zahrnující aminokyselinovou sekvenci popsanou v Sekvence ID č. 1 nebo α -amylázu, která je alespoň z 80 % homologická s aminokyselinovou sekvencí Sekvence ID č. 1 a/nebo

iii) α -amylázu podle i) zahrnující aminokyselinovou sekvenci popsanou v Sekvence ID č. 2 nebo α -amylázu, která je alespoň z 80 % homologická s aminokyselinovou sekvencí Sekvence ID č. 2 a/nebo

iv) α -amylázu podle i) zahrnující následující aminokyselinovou N-terminální sekvenci: His-His-Asn-Gly-Thr-Asn-Gly-Thr-Met-Met-Gln-Tyr-Phe-Glu-Trp-Tyr-Leu-Pro-Asn-Asp,

Sekvence ID č. 3 nebo α -amylázu, která je N-terminálně alespoň z 80 % homologická s aminokyselinovou sekvencí Sekvence ID č. 3 a/nebo

v) α -amylázu podle i) až iv), kde α -amyláza se získává z alkalofilních druhů *Bacillus* a/nebo

vi) α -amylázu podle v), kde amylázu lze získat z libovolného z kmenů NCIB 12289, NCIB 12512, NCIB 12513 a DSM 935 a/nebo

vii) α -amylázu vykazující pozitivní imunologickou křížovou reaktivitu s protilátkami vzniklými proti α -amyláze, mající sekvenci aminokyselin odpovídající Sekvence ID č. 1, Sekvence ID č. 2 nebo Sekvence ID č. 3 a/nebo

viii) variantu mateřské α -amylázy, kde mateřská α -amyláza 1) má jednu z aminokyselinových sekvencí Sekvence ID č. 1, Sekvence ID č. 2 nebo Sekvence ID č. 4, nebo 2) vykazuje alespoň 80 % homologii s jednou nebo více ze zmíněných aminokyselinových sekvencí a/nebo vykazuje imunologickou křížovou reaktivitu s protilátkou vzniklou proti α -amyláze, mající jednu ze zmíněných aminokyselinových sekvencí a/nebo je kódována DNA sekvencí, která hybridizuje se stejným vzorkem jako DNA sekvence kódující α -amylázu mající jednu ze zmíněných aminokyselinových sekvencí, kde jsou varianty: A) nejméně jeden aminokyselinový zbytek zmíněné matečné α -amylázy byl vypuštěn a/nebo B) nejméně jeden aminokyselinový zbytek zmíněné matečné α -amylázy byl nahrazen jiným aminokyselinovým zbytkem a/nebo C) nejméně jeden aminokyselinový zbytek byl inzerován do zmíněné matečné α -amylázy; přičemž zmíněná varianta má α -amylázovou aktivitu a vykazuje ve srovnání s matečnou α -amylázou následující vlastnosti: zvýšená termostabilita, zvýšená stabilita vůči oxidaci, snížená závislost na Ca iontech, zvýšená stabilita a/nebo α -amylolytická aktivita při neutrálním až relativně vysokém pH, zvýšená α -amylolytická aktivita při relativně vyšší teplotě a zvýšení nebo snížení isoelektrického bodu, pI, takže pI hodnoty α -amylázové varianty lépe vyhovují pH v médiu a

c) jeden nebo více čistících doplňkových materiálů.

2. Čistící prostředek podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zmíněná proteázová varianta je odvozena od subtilisinu *Bacillus*, s výhodou subtilisinu *Bacillus lentus* nebo subtilisinu 309.

3. Čistící prostředek podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zmíněná proteázová varianta zahrnuje substituce aminokyselinového zbytku v poloze 103 a jedné nebo více následujících pozic 236 a 245, s výhodou pozic 103 a 236 a na jedné nebo více z následujících pozic 12, 61, 62, 68, 76, 97, 98, 101, 102, 104, 109, 130, 131, 159, 183, 185, 205, 209, 210, 211, 212, 213, 215, 217, 230, 232, 248, 252, 257, 260, 270 a 275 nebo v pozicích 103 a 245 a na jedné nebo více z následujících poloh 12, 61, 62, 68, 76, 97, 98, 101, 102, 104, 109, 130, 131, 159, 170, 182, 185, 205, 209, 210, 211, 212, 213, 215, 217, 222, 230, 232, 248, 252, 257, 260, 261, 270 a 275, výhodněji v polohách 103, 236 a 245 a v jedné nebo více z následujících poloh 12, 61, 62, 68, 76, 97, 98, 101, 102, 104, 109, 130, 131, 159, 183, 185, 205, 209, 210, 211, 212, 213, 215, 217, 230, 232, 248, 252, 257, 260, 270 a 275.

4. Čistící prostředek podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zmíněná proteázová varianta zahrnuje soubor substitucí vybraných z následující skupiny obsahující:

12/102/103/104/159/212/232/236/245/248/252; 12/76/103/104/130/170/185/222/243/245;
 12/76/103/104/130/222/245/261; 12/76/103/104/222/245;
 12/76/103/104/130/222/245;
 61/68/103/104/159/232/236/245/248/252; 62/103/104/159/213/232/236/245/248/252;
 62/103/104/109/159/213/232/236/245/248/252; 62/103/104/159/232/236/245/248/252;
 62/101/103/104/159/212/213/232/236/245/248/252;
 62/103/104/130/159/213/232/236/245/248/252;
 68/103/104/159/232/236/245/248/252/270;
 68/103/104/159/185/232/236/245/248/252; 68/103/104/159/210/232/236/245/248/252;
 68/103/104/159/185/210/232/236/245/248/252; 68/103/104/159/213/232/236/245/248/252;
 68/103/104/159/230/232/236/245; 68/76/103/104/159/209/232/236/245;
 68/103/104/232/236/245/248/257/275; 68/103/104/213/232/236/245/248/252;
 68/103/104/159/232/236/245/248/252; 68/103/104/159/209/232/236/245;
 68/76/103/104/159/236;
 68/76/103/104/159/236/245;
 68/76/103/104/159/232/236/245;
 68/103/104/159/232/236/245;
 68/76/103/104/159/211/232/236/245;
 68/76/103/104/159/215/232/236/245;
 68/103/104/159/210/232/236/245;
 68/103/104/159/213/232/236/245/260;
 68/76/103/104/159/213/232/236/245/260;
 68/103/104/159/236;
 68/76/103/104/159/236/245;
 68/103/104/159/210/232/236/245/260;
 68/103/104/159/236/245;
 68/76/103/104/159/183/232/236/245/248/252;
 68/76/103/104/159/236/245;
 68/103/104/232/236/245/257/275;
 68/103/104/159/213/232/236/245;
 76/103/222/245;
 76/103/104/159/232/236/245;
 76/103/104/159/213/232/236/245/260;
 76/103/104/159;
 76/103/104/131/159/232/236/245/248/252;
 76/103/104/222/245;
 97/103/104/159/232/236/245/248/252;
 98/102/103/104/159/212/232/236/245/248/252; 98/103/104/159/232/236/245/248/252;
 101/103/104/159/232/236/245/248/252;
 102/103/104/159/232/236/245/248/252;
 103/104/159/232/236/245;
 103/104/159/232/236/245/248/252;
 103/104/159/205/209/232/236/245/257;
 103/104/159/232/245/248/252;

103/104/159/205/209/210/232/236/245/257;	103/104/159/213/232/236/245/248/252;
103/104/159/217/232/236/245/248/252;	103/104/130/159/232/236/245/248/252;
103/104/159/230/236/245;	103/104/159/236/245;
103/104/159/248/252/270;	103/104/131/159/232/236/245/248/252;
103/104/159/205/209/232/236/245; a	103/104/159/232/236/245/257.

5. Čistící prostředek podle nároku 4, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zmíněná proteázová varianta zahrnuje soubor substitucí vybraných z následující skupiny obsahující:

12R/76D/103A/104T/130T/222S/245R;
 12R/76D/103A/104I/222S/245R;
 12R/102A/103A/104I/159D/212G/232V/236H/245R/248D/252K;
 12R/76D/103A/104T/130G/222S/245R/261D;
 12R/76D/103A/104T/130G/170S/185D/222S/243D/245R;
 61E/68A/103A/104I/159D/232V/236H/245R/248D/252K;
 62D/103A/104I/109R/159D/213R/232V/236H/245R/248D/252K;
 62D/103A/104I/159D/213R/232V/236H/245R/248D/252K;
 62D/103A/104I/159D/232V/236H/245R/248D/252K;
 62D/103A/104I/130G/159D/213R/232V/236H/245R/248D/252K;
 62D/101G/103A/104I/159D/212G/213R/232V/236H/245R/248D/252K;
 68A/76D/103A/104I/159D/213R/232V/236H/245R/260A;
 68A/103A/104I/159D/236H;
 68A/103A/104I/159D/236H/245R;
 68A/76D/103A/104I/159D/210I/232V/236H/245R/260A;
 68A/103A/104I/159D/183D/232V/236H/245R/248D/252K;
 68A/103A/104I/159D/209W/232V/236H/245R;
 68A/76D/103A/104I/159D/211R/232V/236H/245R;
 68A/76D/103A/104I/159D/215R/232V/236H/245R;
 68A/103A/104I/159D/213R/232V/236H/245R/260A;
 68A/76D/103A/104I/159D/236H;
 68A/76D/103A/104I/159D/236H/245R;
 68A/76D/103A/104I/159D/232V/236H/245R;
 68A/103A/104I/159D/232V/236H/245R/252K;
 68A/103A/104I/159D/232V/236H/245R;
 68A/103A/104I/159D/232V/236H/245R/257V;
 68A/103A/104I/159D/185D/232V/236H/245R/248D/252K;
 68A/103A/104I/159D/210L/232V/236H/245R/248D/252K;
 68A/103A/104I/159D/185D/210L/232V/236H/245R/248D/252K;

68A/103A/104I/159D/213E/232V/236H/245R/248D/252K;
 68A/103A/104I/159D/230V/232V/236H/245R;
 68A/76D/103A/104I/159D/209W/232V/236H/245R;
 68A/103A/104I/232V/236H/245R/248D/257V/275H;
 68A/103A/104I/232V/236H/245R/257V/275H;
 68A/103A/104I/213E/232V/236H/245R/248D/252K;
 68A/103A/104I/159D/232V/236H/245R/248D/252K;
 68A/103A/104I/159D/210I/232V/236H/245R;
 68A/103A/104I/159D/210L/232V/236H/245R;
 68A/103A/104I/159D/213G/232V/236H/245R;
 68A/103A/104I/159D/232V/236H/245R/248D/252K/270A;
 76D/103A/222S/245R;
 76D/103A/104I/159D/232V/236H/245R;
 76D/103A/104I/159D;
 76D/103A/104I/222S/245R;
 76D/103A/104I/131V/159D/232V/236H/245R/248D/252K;
 76D/103A/104I/159D/213R/232V/236H/245R/260A;
 97E/103A/104I/159D/232V/236H/245R/248D/252K;
 98L/103A/104I/159D/232V/236H/245R/248D/252K;
 98L/102A/103A/104I/159D/212G/232V/236H/245R/248D/252K;
 101G/103A/104I/159D/232V/236H/245R/248D/252K;
 102A/103A/104I/159D/232V/236H/245R/248D/252K;
 103A/104I/159D/232V/236H/245R/248D/252K;
 103A/104I/159D/213R/232V/236H/245R/248D/252K;
 103A/104I/130G/159D/232V/236H/245R/248D/252K;
 103A/104I/159D/230V/236H/245R;
 103A/104I/159D/217E/232V/236H/245R/248D/252K;
 103A/104I/159D/236H/245R;
 103A/104I/159D/248D/252K/270V;
 103A/104I/159D/232V/236H/245R;
 103A/104I/159D/205I/209W/232V/236H/245R;
 103A/104I/159D/232V/236H/245R/257V;
 103A/104I/159D/205I/209W/232V/236H/245R/257V;
 103A/104I/131V/159D/232V/236H/245R/248D/252K;
 103A/104I/159D/205I/209W/210I/232V/236H/245R/257V; a
 103A/104I/159D/232V/245R/248D/252K.

6. Čistící prostředek podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že doplňkové čistící materiály jsou vybrány ze skupiny obsahující surfaktanty, rozpouštědla, pufrы, enzymy, činidla pro odstraňování skvrn, činidla pro uvolňování špíny, dispergační činidla, zjasňovače, činidla pro potlačení pění, změkčovače tkanin, zpěnívače, enzymové stabilizátory, plnidla, další bělicí činidla, barviva, parfémь, chelatující látky a jejich směsi.

7. Čistící prostředek podle nároku 6, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zmíněné doplňkové čistící materiály zahrnují alespoň jeden deterdivní surfaktant, s výhodou rozvětvený surfaktant, výhodněji rozvětvený surfaktant se střední délkou řetězce.

8. Čistící prostředek podle nároku 7, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zmíněné doplňkové čistící materiály zahrnují alespoň 0,1 % surfaktantu na hmotnost přípravku, kde zmíněné surfaktant obsahující materiály jsou vybrány ze skupiny obsahující alkylbenzensulfonáty, primární alkylsulfáty, sekundární alkylsulfáty, alkylalkoxysulfáty, alkylalkoxykarboxyláty, alkylpolyglykosidy a jejich odpovídající sulfátované polyglykosidy, α -sulfonované estery mastných kyselin, alkyl a alkylfenolalkoxyláty, betainy a sulfobetainy, aminoxidy, N-methylglukamidy, ethoxyláty neionických primárních alkoholů, směsné ethoxyláty/propoxyláty neionických primárních alkoholů a jejich směsi.

9. Čistící prostředek podle nároku 8, v y z n a č u j í c í s e t í m, že dále zahrnují alespoň 5 % plnidla vybraného ze skupiny obsahující zeolity, polykarboxyláty, vrstvené silikáty, fosfáty a jejich směsi.

10. Čistící prostředek podle nároku 6, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zmíněné doplňkové čistící materiály zahrnují alespoň jeden deterdivní enzym vybraný ze skupiny obsahující celulózy, lipázy, další amylázy, fosfolipázy, další proteázy, peroxidázy a jejich směsi.

11. Čistící prostředek podle nároku 6, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zmíněné doplňkové čistící materiály zahrnují alespoň jedno bělicí činidlo vybrané ze skupiny obsahující peroxyuhličitany, peroxyboráty a jejich směsi a nepovinně dále zahrnují alespoň jeden bělicí aktivátor s výhodou vybraný ze skupiny obsahující benzoyloxybenzensulfonát, nonanoyloxybenzensulfonát, dekanoyloxybenzensulfonát, oktanoyloxybenzensulfonát, perhydrolyzovatelné estery, sodná sůl

4-[N-(nonanoyl)aminoheksanoyloxy]benzensulfonátu, lauryloxybenzensulfonát, 10-undecenoyloxybenzensulfonát a dekanoyloxybenzoovou kyselinu a jejich směsi a dále nepovinně zahrnuje katalyzátor bělení, s výhodou 3-(3,4-dihydroisochinolinium)-propansulfonát.

12. Čistící prostředek podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že čistící prostředek je přípravek pro čištění tkanin, s výhodou ve formě kapaliny, granulí, kusů, tablet, gelu, prášku nebo pěny, zahrnující alespoň 5 % surfaktantu a alespoň 5 % plnidla na hmotnost přípravku.

13. Čistící prostředek podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zmíněný čistící prostředek je prostředek pro čištění tkanin, zahrnující:

a) od 0,0001 % do asi 10 % hmotnosti zmíněné proteázové varianty;

b) od 0,0001 % do asi 0,1 % hmotnosti zmíněné amylázové varianty;

c) alespoň 5 % hmotnosti surfaktantu s výhodou vybraného ze skupiny obsahující alkylbenzensulfonáty, primární alkylsulfáty, sekundární alkylsulfáty, alkylalkoxysulfáty, alkylalkoxykarboxyláty, alkylpolyglykosidy a jejich odpovídající sulfátované polyglykosidy, α -sulfonované estery mastných kyselin, alkyl a alkylfenolalkoxyláty, betainy a sulfobetainy, aminoxidy, N-methylglukamidy, ethoxyláty neionických primárních alkoholů, směsné ethoxyláty/propoxyláty neionických primárních alkoholů a jejich směsi, a kde dále plnidlo je vybráno ze skupiny obsahující zeolity, polykarboxyláty, vrstvené silikáty, fosfáty a jejich směsi a

d) alespoň 5 % hmotnosti plnidla s výhodou vybraného ze skupiny obsahující zeolity, polykarboxyláty, vrstvené silikáty, fosfáty a jejich směsi.

14. Čistící prostředek podle nároku 25, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je ve formě koncentrovaného granulárního čisticího prostředku na tkaniny obsahujícího alespoň 15 % surfaktantu.

15. Způsob čištění tkaniny, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zmíněný způsob zahrnuje kontaktování tkaniny s čisticím prostředkem podle nároků 12 nebo 13.

16. Čistící prostředek podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zmíněný čistící prostředek je prostředkem pro mytí nádobí, s výhodou ve formě kapaliny, granulí, prášku, gelu nebo tablet, zahrnující

- a) od 0,0001 % do asi 10 % hmotnosti zmíněné proteázové varianty;
- b) od 0,0001 % do asi 0,1 % hmotnosti zmíněného přípravku na mytí nádobí amylázové varianty; a
- c) od 0,1 % do 10 % hmotnosti surfaktantu.

17. Způsob čištění nádobí, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zmíněný způsob zahrnuje kontaktování nádobí s čistícím prostředkem podle nároku 16.

18. Čistící osobní prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje:

a) účinné množství proteázové varianty, kde zmíněná proteázová varianta zahrnuje substituci aminokyselinového zbytku s jiným přirozeně se vyskytujícím aminokyselinovým zbytkem v poloze odpovídající pozici 103 u subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens* v kombinaci se substitucí aminokyselinového zbytku s jiným přirozeně se vyskytujícím aminokyselinovým zbytkem v jedné nebo více polohách odpovídajících pozicím 1, 3, 4, 8, 9, 10, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 24, 27, 33, 37, 38, 42, 43, 48, 55, 57, 58, 61, 62, 68, 72, 75, 76, 77, 78, 79, 86, 87, 89, 97, 98, 99, 101, 102, 104, 106, 107, 109, 111, 114, 116, 117, 119, 121, 123, 126, 128, 130, 131, 133, 134, 137, 140, 141, 142, 146, 147, 158, 159, 160, 166, 167, 170, 173, 174, 177, 181, 182, 183, 184, 185, 188, 192, 194, 198, 203, 204, 205, 206, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 222, 224, 227, 228, 230, 232, 236, 237, 238, 240, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 265, 268, 269, 270, 271, 272, 274 a 275 subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens*; kde když zmíněná varianta zahrnuje substituci aminokyselinového zbytku v pozicích 103 a 76, obsahuje také substituci aminokyselinového zbytku v jedné nebo více aminokyselinových poloh jiných než odpovídá aminokyselinovým pozicím 27, 99, 101, 104, 107, 109, 123, 128, 166, 204, 206, 210, 216, 217, 218, 222, 260, 265 nebo 274 subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens*;

b) amylázovou variantu, kde zmíněná amylázová varianta je vybrána ze skupiny obsahující:

i) α -amylázu charakterizovanou tím, že má specifickou aktivitu nejméně o 25 % vyšší než je specifická aktivita Termamyl® při teplotě v rozsahu od 25 °C do 55 °C a při hodnotách pH v rozsahu od 8 do 10, měřeno pomocí stanovení α -amylázové aktivity Phadebas® a/nebo

ii) α -amylázu podle i) zahrnující aminokyselinovou sekvenci popsanou v Sekvence ID č. 1 nebo α -amylázu, která je alespoň z 80 % homologická s aminokyselinovou sekvencí Sekvence ID č. 1 a/nebo

iii) α -amylázu podle i) zahrnující aminokyselinovou sekvenci popsanou v Sekvence ID č. 2 nebo α -amylázu, která je alespoň z 80 % homologická s aminokyselinovou sekvencí Sekvence ID č. 2 a/nebo

iv) α -amylázu podle i) zahrnující následující aminokyselinovou N-terminální sekvenci: His-His-Asn-Gly-Thr-Asn-Gly-Thr-Met-Met-Gln-Tyr-Phe-Glu-Trp-Tyr-Leu-Pro-Asn-Asp, Sekvence ID č. 3 nebo α -amylázu, která je N-terminálně alespoň z 80 % homologická s aminokyselinovou sekvencí Sekvence ID č. 3 a/nebo

v) α -amylázu podle i) až iv), kde α -amyláza se získává z alkalofilních druhů *Bacillus* a/nebo

vi) α -amylázu podle v), kde amylázu lze získat z libovolného z kmenů NCIB 12289, NCIB 12512, NCIB 12513 a DSM 935 a/nebo

vii) α -amylázu vykazující pozitivní imunologickou křížovou reaktivitu s protilátkami vzniklými proti α -amyláze, mající sekvenci aminokyselin odpovídající Sekvence ID č. 1, Sekvence ID č. 2 nebo Sekvence ID č. 3 a/nebo

viii) variantu mateřské α -amylázy, kde mateřská α -amyláza 1) má jednu z aminokyselinových sekvencí Sekvence ID č. 1, Sekvence ID č. 2 nebo Sekvence ID č. 4, nebo 2) vykazuje alespoň 80 % homologii s jednou nebo více ze zmíněných aminokyselinových sekvencí a/nebo vykazuje imunologickou křížovou reaktivitu s protilátkou vzniklou proti α -amyláze, mající jednu ze zmíněných aminokyselinových sekvencí a/nebo je kódována DNA sekvencí, která hybridizuje se stejným vzorkem jako DNA sekvence kódující α -amylázu mající jednu ze zmíněných aminokyselinových sekvencí, kde jsou varianty: A) nejméně jeden aminokyselinový zbytek zmíněné matečné α -amylázy byl vypuštěn a/nebo B) nejméně jeden aminokyselinový zbytek zmíněné matečné α -amylázy byl nahrazen jiným aminokyselinovým zbytkem a/nebo C) nejméně jeden aminokyselinový zbytek byl inzerován do zmíněné matečné α -amylázy; přičemž zmíněná varianta má α -amylázovou aktivitu a vykazuje ve srovnání s matečnou α -amylázou následující vlastnosti: zvýšená termostabilita, zvýšená stabilita vůči oxidaci, snížená závislost na Ca iontech, zvýšená stabilita a/nebo α -amylolytická aktivita při neutrálním až relativně vysokém pH, zvýšená α -amylolytická aktivita při relativně vyšší teplotě a zvýšení nebo snížení isoelektrického bodu, pI, takže pI hodnoty α -amylázové varianty lépe vyhovují pH v médiu a

c) jeden nebo více čistících doplňkových materiálů.

19. Čistící osobní prostředek podle nároku 18, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje:

a) od 0,001 % do asi 5 %, s výhodou od 0,001 % do asi 2 %, výhodněji od 0,002 % do asi 0,8 % hmotnosti zmíněné proteázové varianty,

b) od 0,0001 % do asi 0,1 % hmotnosti čistícího osobního prostředku zmíněné amylázové varianty,

c) od 0,1 % do asi 95 % hmotnosti surfaktantového systému s výhodou zahrnujícího surfaktant vybraný ze skupiny obsahující anionické karboxyláty, aminoxidy, alkylglukosidy, glukosamidy, alkylsulfáty, alkylethersulfáty, acylisethionáty, alkylsulfosukcináty, alkylfosfátové estery, ethoxylované fosfátové estery, alkylglycerylethersulfonáty a jejich směsi, výhodněji zahrnující surfaktant vybraný ze skupiny obsahující mýdla, acylglutamáty, alkylsarkosináty, lauraminoxidy, kokaminoxidy, kokamindopropylaminoxidy, decylglukosidy, laurylsulfáty, laurethsulfáty, C₁₂-C₁₈ acylisethionáty a jejich směsi a

d) případně od 0,05 % do asi 50 % hmotnosti enzymového stabilizátoru.

20. Čistící osobní prostředek podle nároku 19, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zmíněným surfaktantem je mýdlo v úrovních kolem 2 %, s výhodou alespoň 10 %, výhodněji nejméně 25 % hmotnosti čistícího přípravku.

21. Čistící osobní prostředek podle nároku 20, v y z n a č u j í c í s e t í m, že poměr mýdla k proteázové variantě je od 2000:1 do asi 8:1, s výhodou od 400:1 do asi 40:1.

22. Způsob osobního čištění, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje kontaktování části lidského nebo zvířecího těla s čistícím prostředkem podle nároku 18.

23. Čistící prostředek na tkaniny, mytí nádobí a/nebo čištění pevných povrchů, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnují:

a) účinné množství proteázové varianty, kde zmíněná proteázová varianta zahrnuje substituci aminokyselinového zbytku s jiným přirozeně se vyskytujícím aminokyselinovým zbytkem v jedné nebo více polohách odpovídajících pozicím 62, 212, 230, 232, 252 a 257 u subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens*;

b) amylázovou variantu, kde zmíněná amylázová varianta je vybrána ze skupiny obsahující:

i) α -amylázu charakterizovanou tím, že má specifickou aktivitu nejméně o 25 % vyšší než je specifická aktivita Termamyl[®] při teplotě v rozsahu od 25 °C do 55 °C a při hodnotách pH v rozsahu od 8 do 10, měřeno pomocí stanovení α -amylázové aktivity Phadebas[®] a/nebo

ii) α -amylázu podle i) zahrnující aminokyselinovou sekvenci popsanou v Sekvence ID č. 1 nebo α -amylázu, která je alespoň z 80 % homologická s aminokyselinovou sekvencí Sekvence ID č. 1 a/nebo

iii) α -amylázu podle i) zahrnující aminokyselinovou sekvenci popsanou v Sekvence ID č. 2 nebo α -amylázu, která je alespoň z 80 % homologická s aminokyselinovou sekvencí Sekvence ID č. 2 a/nebo

iv) α -amylázu podle i) zahrnující následující aminokyselinovou N-terminální sekvenci: His-His-Asn-Gly-Thr-Asn-Gly-Thr-Met-Met-Gln-Tyr-Phe-Glu-Trp-Tyr-Leu-Pro-Asn-Asp, Sekvence ID č. 3 nebo α -amylázu, která je N-terminálně alespoň z 80 % homologická s aminokyselinovou sekvencí Sekvence ID č. 3 a/nebo

v) α -amylázu podle i) až iv), kde α -amyláza se získává z alkalofilních druhů Bacillus a/nebo

vi) α -amylázu podle v), kde amylázu lze získat z libovolného z kmenů NCIB 12289, NCIB 12512, NCIB 12513 a DSM 935 a/nebo

vii) α -amylázu vykazující pozitivní imunologickou křížovou reaktivitu s protilátkami vzniklými proti α -amyláze, mající sekvenci aminokyselin odpovídající Sekvence ID č. 1, Sekvence ID č. 2 nebo Sekvence ID č. 3 a/nebo

viii) variantu mateřské α -amylázy, kde mateřská α -amyláza 1) má jednu z aminokyselinových sekvencí Sekvence ID č. 1, Sekvence ID č. 2 nebo Sekvence ID č. 4, nebo 2) vykazuje alespoň 80 % homologii s jednou nebo více ze zmíněných aminokyselinových sekvencí a/nebo vykazuje imunologickou křížovou reaktivitu s protilátkou vzniklou proti α -amyláze, mající jednu ze zmíněných aminokyselinových sekvencí a/nebo je kódována DNA sekvencí, která hybridizuje se stejným vzorkem jako DNA sekvence kódující α -amylázu mající jednu ze zmíněných aminokyselinových sekvencí, kde jsou varianty: A) nejméně jeden aminokyselinový zbytek zmíněné matečné α -amylázy byl vypuštěn a/nebo B) nejméně jeden aminokyselinový zbytek zmíněné matečné α -amylázy byl nahrazen jiným aminokyselinovým zbytkem a/nebo C) nejméně jeden aminokyselinový zbytek byl inzerován do zmíněné matečné α -amylázy; přičemž zmíněná varianta má α -amylázovou aktivitu a vykazuje ve srovnání

s matečnou α -amylázou následující vlastnosti: zvýšená termostabilita, zvýšená stabilita vůči oxidaci, snížená závislost na Ca iontech, zvýšená stabilita a/nebo α -amylolytická aktivita při neutrálním až relativně vysokém pH, zvýšená α -amylolytická aktivita při relativně vyšší teplotě a zvýšení nebo snížení isoelektrického bodu, pI, takže pI hodnoty α -amylázové varianty lépe vyhovují pH v médiu a

c) jeden nebo více čistících doplňkových materiálů.

24. Čistící prostředek podle nároku 23, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zmíněná proteázová varianta je odvozena ze subtilisinu *Bacillus lentus* nebo subtilisinu 309.

25. Čistící prostředek podle nároku 23, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zmíněná proteázová varianta zahrnuje substituce aminokyselinových zbytků v jedné nebo více z následujících pozic vybraných ze skupiny obsahující:

1) pozice 62 a jedna nebo více z následujících poloh 103, 104, 109, 159, 213, 232, 236, 245, 248 a 252;

2) pozice 212 a jedna nebo více z následujících poloh 12, 98, 102, 103, 104, 159, 232, 236, 245, 248 a 252;

3) pozice 230 a jedna nebo více z následujících poloh 68, 103, 104, 159, 232, 236 a 245;

4) pozice 232 a jedna nebo více z následujících poloh 12, 61, 62, 68, 97, 98, 101, 102, 103, 104, 109, 130, 131, 159, 183, 185, 205, 209, 210, 212, 213, 217, 230, 236, 245, 248, 252, 257, 260, 270 a 275;

5) pozice 232 a jedna nebo více z následujících poloh 103, 104, 236 a 245;

6) pozice 232 a 103 a jedna nebo více z následujících poloh 12, 61, 62, 68, 76, 97, 98, 101, 102, 103, 104, 109, 130, 131, 159, 183, 185, 205, 209, 210, 212, 213, 217, 230, 236, 245, 248, 252, 257, 260, 270 a 275;

7) pozice 232 a 104 a jedna nebo více z následujících poloh 12, 61, 62, 68, 76, 97, 98, 101, 102, 103, 104, 109, 130, 131, 159, 183, 185, 205, 209, 210, 212, 213, 217, 230, 236, 245, 248, 252, 257, 260, 270 a 275;

8) pozice 232 a 236 a jedna nebo více z následujících poloh 12, 61, 62, 68, 76, 97, 98, 101, 102, 103, 104, 109, 130, 131, 159, 183, 185, 205, 209, 210, 212, 213, 217, 230, 236, 245, 248, 252, 257, 260, 270 a 275;

9) pozice 232 a 245 a jedna nebo více z následujících poloh 12, 61, 62, 68, 76, 97, 98, 101, 102, 103, 104, 109, 130, 131, 159, 183, 185, 205, 209, 210, 212, 213, 217, 230, 236, 245, 248, 252, 257, 260, 270 a 275;

10) pozice 232, 103, 104, 236 a 245 a jedna nebo více z následujících poloh 12, 61, 62, 68, 76, 97, 98, 101, 102, 103, 104, 109, 130, 131, 159, 183, 185, 205, 209, 210, 212, 213, 217, 230, 236, 245, 248, 252, 257, 260, 270 a 275;

11) pozice 252 a jedna nebo více z následujících poloh 12, 61, 62, 68, 97, 98, 101, 102, 103, 104, 109, 130, 131, 159, 183, 185, 210, 212, 213, 217, 232, 236, 245, 248 a 270;

12) pozice 252 a jedna nebo více z následujících poloh 103, 104, 236 a 245;

13) pozice 252 a 103 a jedna nebo více z následujících poloh 12, 61, 62, 68, 97, 98, 101, 102, 103, 104, 109, 130, 131, 159, 183, 185, 210, 212, 213, 217, 232, 236, 245, 248 a 270;

14) pozice 252 a 104 a jedna nebo více z následujících poloh 12, 61, 62, 68, 97, 98, 101, 102, 103, 104, 109, 130, 131, 159, 183, 185, 210, 212, 213, 217, 232, 236, 245, 248 a 270;

15) pozice 252 a 236 a jedna nebo více z následujících poloh 12, 61, 62, 68, 97, 98, 101, 102, 103, 104, 109, 130, 131, 159, 183, 185, 210, 212, 213, 217, 232, 236, 245, 248 a 270;

16) pozice 252 a 245 a jedna nebo více z následujících poloh 12, 61, 62, 68, 97, 98, 101, 102, 103, 104, 109, 130, 131, 159, 183, 185, 210, 212, 213, 217, 232, 236, 245, 248 a 270;

17) pozice 252, 103, 104, 236 a 245 a jedna nebo více z následujících poloh 12, 61, 62, 68, 97, 98, 101, 102, 103, 104, 109, 130, 131, 159, 183, 185, 210, 212, 213, 217, 232, 236, 245, 248 a 270;

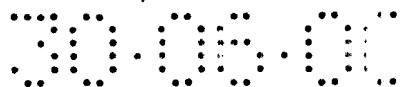
18) pozice 257 a jedna nebo více z následujících poloh 68, 103, 104, 205, 209, 210, 232, 236, 245 a 275.

26. Čistící prostředek podle nároku 23, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zmíněná proteázová varianta zahrnuje soubor substitucí vybraných ze skupiny obsahující:

12/102/103/104/159/212/232/236/245/248/252; 61/68/103/104/159/232/236/245/248/252;
 62/103/104/130/159/213/232/236/245/248/252; 62/103/104/159/213/232/236/245/248/252;
 62/103/104/109/159/213/232/236/245/248/252; 62/103/104/159/232/236/245/248/252;
 62/101/103/104/159/212/213/232/236/245/248/252;
 68/103/104/159/232/236/245/248/252/270;
 68/103/104/159/185/232/236/245/248/252; 68/103/104/159/210/232/236/245/248/252;
 68/103/104/159/185/210/232/236/245/248/252; 68/103/104/159/213/232/236/245/248/252;
 68/103/104/159/230/232/236/245; 68/76/103/104/159/209/232/236/245;
 68/103/104/232/236/245/248/257/275; 68/103/104/213/232/236/245/248/252;
 68/103/104/159/232/236/245/248/252; 68/103/104/159/209/232/236/245;
 68/76/103/104/159/232/236/245; 68/103/104/159/232/236/245/252;
 68/103/104/159/232/236/245; 68/103/104/159/232/236/245/257;
 68/76/103/104/159/211/232/236/245; 68/76/103/104/159/215/232/236/245;
 68/103/104/159/210/232/236/245; 68/103/104/159/213/232/236/245/260;
 68/76/103/104/159/213/232/236/245/260; 68/76/103/104/159/210/232/236/245/260;
 68/103/104/159/183/232/236/245/248/252; 68/103/104/232/236/245/257/275;
 68/103/104/159/213/232/236/245; 76/103/104/159/232/236/245;
 76/103/104/159/213/232/236/245/260; 76/103/104/131/159/232/236/245/248/252;
 97/103/104/159/232/236/245/248/252; 98/103/104/159/232/236/245/248/252;
 98/102/103/104/159/212/232/236/245/248/252; 101/103/104/159/232/236/245/248/252;
 102/103/104/159/232/236/245/248/252; 103/104/159/232/236/245;
 103/104/159/248/252/270; 103/104/159/232/236/245/248/252;
 103/104/159/205/209/232/236/245/257 103/104/159/232/245/248/252;
 103/104/159/205/209/210/232/236/245/257; 103/104/159/213/232/236/245/248/252;
 103/104/159/217/232/236/245/248/252; 103/104/130/159/232/236/245/248/252;
 103/104/131/159/232/236/245/248/252; 103/104/159/205/209/232/236/245; a
 103/104/159/232/236/245/257.

27. Čistící prostředek podle nároku 26, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zmíněná proteázová varianta zahrnuje soubor substitucí vybraných ze skupiny obsahující:

12R/102A/103A/104I/159D/212G/232V/236H/245R/248D/252K;
 61E/68A/103A/104I/159D/232V/236H/245R/248D/252K;
 62D/103A/104I/109R/159D/213R/232V/236H/245R/248D/252K;
 62D/103A/104I/159D/213R/232V/236H/245R/248D/252K;
 62D/103A/104I/159D/232V/236H/245R/248D/252K;
 62D/103A/104I/130G/159D/213R/232V/236H/245R/248D/252K;
 62D/101G/103A/104I/159D/212G/213R/232V/236H/245R/248D/252K;
 68A/76D/103A/104I/159D/213R/232V/236H/245R/260A;
 68A/76D/103A/104I/159D/210I/232V/236H/245R/260A;
 68A/103A/104I/159D/183D/232V/236H/245R/248D/252K;
 68A/103A/104I/159D/209W/232V/236H/245R;
 68A/76D/103A/104I/159D/211R/232V/236H/245R;
 68A/76D/103A/104I/159D/215R/232V/236H/245R;
 68A/103A/104I/159D/213R/232V/236H/245R/260A;
 68A/76D/103A/104I/159D/232V/236H/245R;
 68A/103A/104I/159D/232V/236H/245R/252K;
 68A/103A/104I/159D/232V/236H/245R;
 68A/103A/104I/159D/232V/236H/245R/257V;
 68A/103A/104I/159D/185D/232V/236H/245R/248D/252K;
 68A/103A/104I/159D/210L/232V/236H/245R/248D/252K;
 68A/103A/104I/159D/185D/210L/232V/236H/245R/248D/252K;
 68A/103A/104I/159D/213E/232V/236H/245R/248D/252K;
 68A/103A/104I/159D/230V/232V/236H/245R;
 68A/76D/103A/104I/159D/209W/232V/236H/245R;
 68A/103A/104I/232V/236H/245R/248D/257V/275H;
 68A/103A/104I/232V/236H/245R/257V/275H;
 68A/103A/104I/213E/232V/236H/245R/248D/252K;
 68A/103A/104I/159D/232V/236H/245R/248D/252K;
 68A/103A/104I/159D/210I/232V/236H/245R;
 68A/103A/104I/159D/210L/232V/236H/245R;



68A/103A/104I/159D/213G/232V/236H/245R;
 68A/103A/104I/159D/232V/236H/245R/248D/252K/270A;
 76D/103A/104I/159D/232V/236H/245R;
 76D/103A/104I/131V/159D/232V/236H/245R/248D/252K;
 76D/103A/104I/159D/213R/232V/236H/245R/260A;
 97E/103A/104I/159D/232V/236H/245R/248D/252K;
 98L/103A/104I/159D/232V/236H/245R/248D/252K;
 98L/102A/103A/104I/159D/212G/232V/236H/245R/248D/252K;
 101G/103A/104I/159D/232V/236H/245R/248D/252K;
 102A/103A/104I/159D/232V/236H/245R/248D/252K;
 103A/104I/159D/232V/236H/245R/248D/252K;
 103A/104I/159D/213R/232V/236H/245R/248D/252K;
 103A/104I/130G/159D/232V/236H/245R/248D/252K;
 103A/104I/159D/217E/232V/236H/245R/248D/252K;
 103A/104I/159D/248D/252K/270V;
 103A/104I/159D/232V/236H/245R;
 103A/104I/159D/205I/209W/232V/236H/245R;
 103A/104I/159D/232V/236H/245R/257V;
 103A/104I/159D/205I/209W/232V/236H/245R/257V;
 103A/104I/131V/159D/232V/236H/245R/248D/252K;
 103A/104I/159D/205I/209W/210I/232V/236H/245R/257V; a
 103A/104I/159D/232V/245R/248D/252K.

28. Čistící prostředek podle nároku 23, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zmíněné doplňkové čistící materiály jsou vybrány ze skupiny obsahující surfaktanty, rozpouštědla, puřry, enzymy, činidla pro odstraňování skvrn, činidla pro uvolňování špíny, dispergační činidla, zjasňovače, činidla pro potlačení pěnění, změkčovače tkanin, zpěňovače, enzymové stabilizátory, plnidla, další bělicí činidla, barviva, parfémy, chelatující látky a jejich směsi.

29. Čistící prostředek podle nároku 28, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zmíněné doplňkové čistící materiály zahrnují alespoň jeden deterdivní surfaktant, s výhodou rozvětvený surfaktant, výhodněji rozvětvený surfaktant se středně dlouhým řetězcem.

30. Čistící prostředek podle nároku 28, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zmíněné doplňkové čistící materiály zahrnují alespoň 0,1 % surfaktantu na hmotnost přípravku, kde zmíněné surfaktant obsahující materiály jsou vybrány ze skupiny obsahující alkylbenzensulfonáty, primární alkylsulfáty, sekundární alkylsulfáty, alkylalkoxysulfáty, alkylalkoxykarboxyláty,

alkylpolyglykosidy a jejich odpovídající sulfátované polyglykosidy, α -sulfonované estery mastných kyselin, alkyl a alkylfenolalkoxyláty, betainy a sulfobetainy, aminoxidy, N-methylglukamidy, ethoxyláty neionických primárních alkoholů, směsné ethoxyláty/propoxyláty neionických primárních alkoholů a jejich směsi.

31. Čistící prostředek podle nároku 30, v y z n a č u j í c í s e t í m, že dále zahrnuje alespoň 5 % plnidla vybraného ze skupiny obsahující zeolity, polykarboxyláty, vrstvené silikáty, fosfáty a jejich směsi.

32. Čistící prostředek podle nároku 28, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zmíněné doplňkové čistící materiály zahrnují alespoň jeden deterdivní enzym vybraný ze skupiny obsahující celulózy, lipázy, amylázy, fosfolipázy, další proteázy, peroxidázy a jejich směsi.

33. Čistící prostředek podle nároku 28, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zmíněné doplňkové čistící materiály zahrnují alespoň jedno bělicí činidlo vybrané ze skupiny obsahující peroxyuhličitany, peroxyboráty a jejich směsi a nepovinně dále zahrnují alespoň jeden bělicí aktivátor s výhodou vybraný ze skupiny obsahující benzoxyloxybenzensulfonát (BOBS), nonanoyloxybenzensulfonát, dekanoyloxybenzensulfonát, oktanoyloxybenzensulfonát, perhydrolyzovatelné estery, sodná sůl 4-[N-(nonanoyl)aminohekanoyloxy]benzensulfonátu, lauryloxybenzensulfonát, 10-undecenoyloxybenzensulfonát a dekanoyloxybenzoovou kyselinu a jejich směsi a dále nepovinně zahrnuje katalyzátor bělení, s výhodou 3-(3,4-dihydroisochinolinium)-propansulfonát.

34. Čistící prostředek podle nároku 23, v y z n a č u j í c í s e t í m, že čistící přípravek je přípravek pro čištění tkanin, s výhodou ve formě kapaliny, granulí, kusů, tablet, gelu, prášku nebo pěny, zahrnující alespoň 5 % surfaktantu a alespoň 5 % plnidla na hmotnost přípravku.

35. Čistící prostředek podle nároku 23, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zmíněný čistící prostředek je prostředek pro čištění tkanin, zahrnující:

- a) od 0,0001 % do asi 10 % hmotnosti zmíněné proteázové varianty;
- b) od 0,0001 % do asi 0,1 % hmotnosti zmíněné amylázové varianty;

c) alespoň 5 % hmotnosti surfaktantu s výhodou vybraného ze skupiny obsahující alkylbenzensulfonáty, primární alkylsulfáty, sekundární alkylsulfáty, alkylalkoxysulfáty, alkylalkoxykarboxyláty, alkylpolyglykosidy a jejich odpovídající sulfátované polyglykosidy, α -sulfonované estery mastných kyselin, alkyl a alkylfenolalkoxyláty, betainy a sulfobetainy, aminoxidy, N-methylglukamidy, ethoxyláty neionických primárních alkoholů, směsné ethoxyláty/propoxyláty neionických primárních alkoholů a jejich směsi, a kde dále plnidlo je vybráno ze skupiny obsahující zeolity, polykarboxyláty, vrstvené silikáty, fosfáty a jejich směsi a

d) alespoň 5 % hmotnosti plnidla s výhodou vybraného ze skupiny obsahující zeolity, polykarboxyláty, vrstvené silikáty, fosfáty a jejich směsi.

36. Čistící prostředek podle nároku 35, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je ve formě koncentrovaného granulárního čistícího prostředku na tkaniny obsahujícího alespoň 15 % surfaktantu.

37. Způsob čištění tkaniny, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zmíněný způsob zahrnuje kontaktování tkaniny s čistícím prostředkem podle nároků 34 nebo 35.

38. Čistící prostředek podle nároku 23, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zmíněný čistící prostředek je prostředkem pro mytí nádobí, s výhodou ve formě kapaliny, granulí, prášku, gelu nebo tablet, zahrnující:

a) od 0,0001 % do asi 10 % hmotnosti zmíněné proteázové varianty;

b) od 0,1 % do 10 % hmotnosti surfaktantu.

39. Způsob čištění nádobí, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zmíněný způsob zahrnuje kontaktování nádobí s čistícím prostředkem podle nároku 38.

40. Čistící osobní prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnují:

a) účinné množství proteázové varianty, kde zmíněná proteázová varianta zahrnuje substituci aminokyselinového zbytku s jiným přirozeně se vyskytujícím aminokyselinovým zbytkem v jedné nebo více polohách odpovídajících pozicím 62, 212, 230, 232, 252 a 257 u subtilisinu *Bacillus amyloliquefaciens*;

b) amylázovou variantu, kde zmíněná amylázová varianta je vybrána ze skupiny obsahující:

i) α -amylázu charakterizovanou tím, že má specifickou aktivitu nejméně o 25 % vyšší než je specifická aktivita Termamyl[®] při teplotě v rozsahu od 25 °C do 55 °C a při hodnotách pH v rozsahu od 8 do 10, měřeno pomocí stanovení α -amylázové aktivity Phadebas[®] a/nebo

ii) α -amylázu podle i) zahrnující aminokyselinovou sekvenci popsanou v Sekvence ID č. 1 nebo α -amylázu, která je alespoň z 80 % homologická s aminokyselinovou sekvencí Sekvence ID č. 1 a/nebo

iii) α -amylázu podle i) zahrnující aminokyselinovou sekvenci popsanou v Sekvence ID č. 2 nebo α -amylázu, která je alespoň z 80 % homologická s aminokyselinovou sekvencí Sekvence ID č. 2 a/nebo

iv) α -amylázu podle i) zahrnující následující aminokyselinovou N-terminální sekvenci: His-His-Asn-Gly-Thr-Asn-Gly-Thr-Met-Met-Gln-Tyr-Phe-Glu-Trp-Tyr-Leu-Pro-Asn-Asp, Sekvence ID č. 3 nebo α -amylázu, která je N-terminálně alespoň z 80 % homologická s aminokyselinovou sekvencí Sekvence ID č. 3 a/nebo

v) α -amylázu podle i) až iv), kde α -amyláza se získává z alkalofilních druhů Bacillus a/nebo

vi) α -amylázu podle v), kde amylázu lze získat z libovolného z kmenů NCIB 12289, NCIB 12512, NCIB 12513 a DSM 935 a/nebo

vii) α -amylázu vykazující pozitivní imunologickou křížovou reaktivitu s protilátkami vzniklými proti α -amyláze, mající sekvenci aminokyselin odpovídající Sekvence ID č. 1, Sekvence ID č. 2 nebo Sekvence ID č. 3 a/nebo

viii) variantu mateřské α -amylázy, kde mateřská α -amyláza 1) má jednu z aminokyselinových sekvencí Sekvence ID č. 1, Sekvence ID č. 2 nebo Sekvence ID č. 4, nebo 2) vykazuje alespoň 80 % homologii s jednou nebo více ze zmíněných aminokyselinových sekvencí a/nebo vykazuje imunologickou křížovou reaktivitu s protilátkou vzniklou proti α -amyláze, mající jednu ze zmíněných aminokyselinových sekvencí a/nebo je kódována DNA sekvencí, která hybridizuje se stejným vzorkem jako DNA sekvence kódující α -amylázu mající jednu ze zmíněných aminokyselinových sekvencí, kde jsou varianty: A) nejméně jeden aminokyselinový zbytek zmíněné mateřské α -amylázy byl vypuštěn a/nebo B) nejméně jeden aminokyselinový zbytek zmíněné mateřské α -amylázy byl nahrazen jiným aminokyselinovým zbytkem a/nebo C) nejméně jeden aminokyselinový zbytek byl inzerován do zmíněné mateřské α -amylázy; přičemž zmíněná varianta má α -amylázovou aktivitu a vykazuje ve srovnání

s matečnou α -amylázou následující vlastnosti: zvýšená termostabilita, zvýšená stabilita vůči oxidaci, snížená závislost na Ca iontech, zvýšená stabilita a/nebo α -amylolytická aktivita při neutrálním až relativně vysokém pH, zvýšená α -amylolytická aktivita při relativně vyšší teplotě a zvýšení nebo snížení isoelektrického bodu (pI) takže pI hodnoty α -amylázové varianty lépe vyhovují pH v médiu a

c) jeden nebo více čistících doplňkových materiálů.

41. Čistící osobní prostředek podle nároku 40, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje:

a) od 0,001 % do asi 5 %, s výhodou od 0,001 % do asi 2 %, výhodněji od 0,002 % do asi 0,8 % hmotnosti zmíněné proteázové varianty,

b) od 0,0001 % do asi 0,1 % hmotnosti čistícího osobního prostředku zmíněné amylázové varianty,

c) od 0,1 % do asi 95 % hmotnosti surfaktantového systému s výhodou zahrnujícího surfaktant vybraný ze skupiny obsahující anionické karboxyláty, aminoxidy, alkylglukosidy, glukosamidy, alkylsulfáty, alkylethersulfáty, acylisethionáty, alkylsulfosukcináty, alkylfosfátové estery, ethoxylované fosfátové estery, alkylglycerylethersulfonáty a jejich směsi, výhodněji zahrnující surfaktant vybraný ze skupiny obsahující mýdla, acylglutamáty, alkylsarkosináty, lauraminoxidy, kokaminoxidy, kokamindopropylaminoxidy, decylglukosidy, laurylsulfáty, laurethsulfáty, C₁₂-C₁₈ acylisethionáty a jejich směsi a

d) případně od 0,05 % do asi 50 % hmotnosti enzymového stabilizátoru.

42. Čistící osobní prostředek podle nároku 41, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zmíněným surfaktantem je mýdlo v úrovních kolem 2 %, s výhodou alespoň 10 %, výhodněji nejméně 25 % hmotnosti čistícího přípravku.

43. Čistící osobní prostředek podle nároku 42, v y z n a č u j í c í s e t í m, že poměr mýdla k proteázové variantě je od 2000:1 do asi 8:1, s výhodou od 400:1 do asi 40:1.

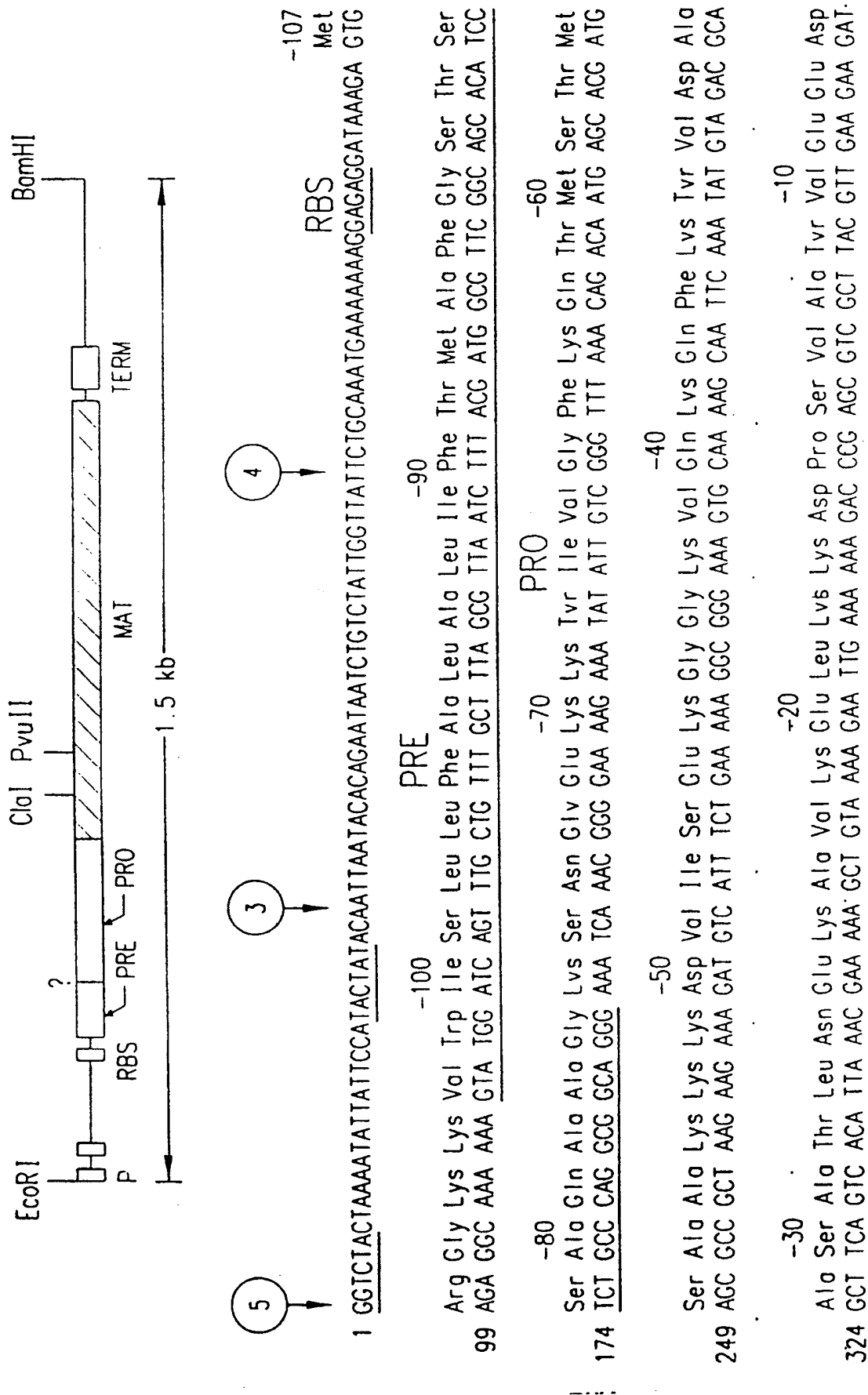
44. Způsob osobního čištění, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje kontaktování části lidského nebo zvířecího těla s čistícím prostředkem podle nároku 40.

45. Způsob předčištění tkanin, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje kontaktování tkaniny před praním s vodným roztokem obsahujícím surfaktant s bělicím přípravkem podle nároku 12 nebo 13.

46. Způsob předčištění tkanin, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje kontaktování tkaniny před praním s vodným roztokem obsahujícím surfaktant s bělicím přípravkem podle nároku 34 nebo 35.

Obrázek 1A

1/6



MAT

His Bal Ala His Ala Tyr Ala Gln Ser Val Pro Tyr Gly Val Ser Gln Ile Lys Ala Pro Ala Leu His Ser Gln
399 CAC GTA GCA CAT GCG TAC GCG CAG TCC GTG CCG GTC TAC GGC GTA TCA CAA ATT AAA GCC CCT GCT CTG CAC TCT CAA

474 GGC Tyr Thr Gly Ser Asn Val Lys Val Ala Val Ile Asp Ser Gly Ile Asp Ser Ser His Pro Asn Leu Ivs Val
30 40
Gly Tyr Thr Gly Ser Asn Val Lys Val Ala Val Ile Asp Ser Gly Ile Asp Ser Ser His Pro Asn Leu Ivs Val
474 GGC TAC ACT GGA TCA AAT GTT AAA GTA GCG GTT ATC GAC AGC GGT ATC GAT TCT TCT CAT CCT CAT TTA AAG GTA

Ala Gly Gly Ala Ser Met Val Pro Ser Glu Thr Asn Pro Phe Gln Asp Asn Asn Ser His Glv Thr His Val Ala
549 GCA AGC GGA GCC AGC ATG GTT CCT TCT GAA ACA AAT CCT TTC CAA GAC AAC AAC TCT CAC GGA ACT CAC GTT GCC

70	Thr	Val	Ala	Ala	Leu	Asn	Asn	Ser	Ile	Gly	Val	Leu	Gly	Val	Ala	Pro	Ser	Ala	Ser	Leu	Ser	Ala	90
624	GCC	ACA	GTT	GCG	GCT	CTT	AAT	AAC	TCA	ATC	GGT	GTA	TIA	GGC	GTT	GCG	CCA	AGC	GCA	TCA	CTT	TAC	GCT

Asp Ala 100
 Val Leu Gly Ala Asp Gly Ser Gly Gln Tyr Ser Trp Ile Ile Asn Gly Ile Glu Trp Ala Ile Ala Asn Asn Met
 699 GTT CTC GGT GCT GAC GGT TCC GGC CAA TAC AGC TGG ATC ATT AAC GGA ATC GAG TCG GCG ATC GCA AAC AAT ATG

120 Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly Pro Ser Gly Ser Ala Ala Leu Lvs Ala Val Asp Lvs Ala Val Ala
Asp Val
774 GAC GTT ATT AAC ATG ACC CTC GGC GGA CCT TCT GGT TCT GCT GCT TTA AAA GCG GCA GTT CAT AAA GCC GTT GCA

849 Ser Gly Val Val Val Ala Ala Ala Gly Asn Glu Gly Thr Ser Gly Thr Ser Thr Val Gly Tyr Pro Gly
TCC GGC GTC GTA GTC GTT GCG GCA GCC GGT AAC GAA GGC ACT ICC GGC AGC TCA AGC ACA GTC GGC TAC CCT GGT

PV 2000-1478

Obrázek 1B

Obrázek 1C

3/6

```

170      180      190
Lvs Tvr Pro Ser Val Ile Ala Val Glv Ala Val Asp Ser Ser Asn Gln Arp Ala Ser Phe Ser Ser Vsl Glv Pro
924 AAA TAC CCT TCT GTC ATT GCA GTA GGC GCT GTT GAC AGC AGC AAC CAA AGA GCA TCT TTC TCA AGC GTA GGA CCT

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

      220      230      240
Thr Ser Met Ala Ser Pro His Val Ala Gly Aal Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lvs His Pro Asn Trp Thr Asn Thr
1074 ACG TCA ATG GCA TCT CCG CAC GAT GCC GGA GCG GCT GCT TTG ATT CTT TCT AAG CAC CCG AAC TGG ACA AAC ACT

      250 Gln      260
Gln Val Aro Ser Ser Leu Glu Asn Thr Thr Lvs Leu Gly Asp Ser Phe Tyr Tyr Glv Lvs Glv Leu Ile Asn
1149 CAA GTC CGC AGC AGT TTA GAA AAC ACC ACT ACA AAA CTT GGT GAT TCT TTG TAC TAT GGA AAA GGG CTG ATC AAC

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

      TERM
1316 ATAATCGACGGATGGCTCCCTCTGAAAAATTTAACGAGAAACGGCGGGTTGACCCGGGTCAGTCCCGTAACGGGCCAACTCCTGAAAACGTCCTCAATCGCCG
1416 CTTCGGGTTTCGGGTCACTCAATGCCATAACGGTCGGCGCGGTTTCTCTGATACCGGGAGACGGCATTCGTAAATCGGATC

```

4/6

Zychované zbytky v subtilisinech z *Bacillus amyloliquefaciens*

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

Obrázek 2

Obrázek 3A

5/6

Srovnání sekvencí subtilisinů z:

- B. amyloliquefaciens
- B. subtilis
- B. licheniformis
- B. lentus

01	10	20	30							
AQSV	YPYGV	SIKAP	ALHS	QGYTG	SNV	KVAV	IDS	GI	DSS	HP
AQSV	YPYGI	SIKAP	ALHS	QGYTG	SNV	KVAV	IDS	GI	DSS	HP
AQSV	YPYGI	PLIKAP	ADKV	QAQGF	KGAN	VKVAV	LD	TG	IQAS	HP
AQSV	YPWGI	SRVQA	PAAH	NRGL	TGSG	VKVAV	LD	TG	IST	*HP
41	50	60	70							
DLKV	AGGAS	MPSE	INPF	QDNN	SHG	THV	AGT	VAA	LNN	SI
DLNV	VRGAS	FVPS	ETNP	YQDGS	SHG	THV	AGT	VAA	LNN	SI
DLNV	VVGAS	FVAGE	AYN*	TDGN	GHHG	THV	AGT	VAA	LNN	SI
DLNI	RGAS	FVPG	E*PS	TQDGN	GHHG	THV	AGT	VAA	LNN	SI
81	90	100	110							
VLGV	APSA	SLYAV	KVLG	ADGS	GQY	SWI	ING	IEW	AI	NNMD
VLGV	SPSA	SLYAV	KVLG	ADGS	GQY	SWI	ING	IEW	AI	NNMD
VLGV	APSA	SLYAV	KVLG	ADGS	GQY	SWI	ING	IEW	AI	NNMD
VLGV	APSA	ELYAV	KVLG	ADGS	GQY	SWI	ING	IEW	AI	NNMD
121	130	140	150							
VINM	SLGG	PSG	SAAL	KAAV	DKAV	ASGV	VVA	AGN	EGT	SG
VINM	SLGG	PSTG	STALK	TVVD	KAVS	SGIV	VVA	AGN	EGS	SG
VINM	SLGG	ASTG	STAM	KQAV	VDNA	YARG	VVA	AGN	SGN	SG
VANL	SLGS	PSAT	LEQA	VNSA	TSRG	VLV	VVA	AGN	SGA	GS

Obrázek 3B

6/6

161	170	180	190
SSSTVGYPPGKYPSVIAVGAVDSSNQRASSFSSVGPELDVMA			
STSTVGYPPAKYPSSTIAVGAVNSSNQRASSFSSAGSELDVMA			
STNTIGYPPAKYDSVIAVGAVDSSNSNRASSFSSVGAELDVMA			
* * * I S Y P A R Y A N A M A V G A T D Q N N R A S F S Q Y G A G L D I V A			
201	210	220	230
PGVSIQSTLPGGNKYGAYNGTSMASPHVAGAAALILSKHPN			
PGVSIQSTLPGGTYGAYNGTSMATPHVAGAAALILSKHPT			
PGAGVYSTYPTNTYATLNGTSMASPHVAGAAALILSKHPN			
PGVNVQSTYPGSTYASLNGTSMATPHVAGAAALVKQKPS			
241	250	260	270
WTNTQVRSSELENTTTTKLGDSSFYYGKGLINVQAAQ			
WTNAQVRRDRLESTATYLGNSFFYYGKGLINVQAAQ			
LSASQVRRRLSSSTATYLGSSFFYYGKGLINVEAAQ			
WSNVQIRNHLKNTATSLGSTNL YGSGLVNAEATR			