

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
14. Dezember 2006 (14.12.2006)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2006/131555 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:
C08J 9/224 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2006/063037

(22) Internationales Anmeldedatum:
9. Juni 2006 (09.06.2006)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2005 027 039.5 10. Juni 2005 (10.06.2005) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **BASF AKTIENGESELLSCHAFT** [DE/DE];
67056 Ludwigshafen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **EXNER, Christian**

[DE/DE]; Am Herzel 48, 67433 Neustadt (DE). **BAUS, Ulf** [DE/DE]; Im Hallgarten 6b, 69221 Dossenheim (DE). **HOLOCH, Jan** [DE/DE]; Königsberger Str.22a, 69181 Leimen (DE). **BOLLSCHWEILER, Claus** [DE/DE]; Karl-Christ-Str.13, 69118 Heidelberg (DE). **SUBKOWSKI, Thomas** [DE/DE]; Wichernstr. 13, 68526 Ladenburg (DE). **KAROS, Marvin** [DE/DE]; Clementine-Bassermann-Str. 3, 68723 Schwetzingen (DE). **LEMAIRE, Hans-Georg** [DE/DE]; Mainstr.10, 67117 Limburgerhof (DE).

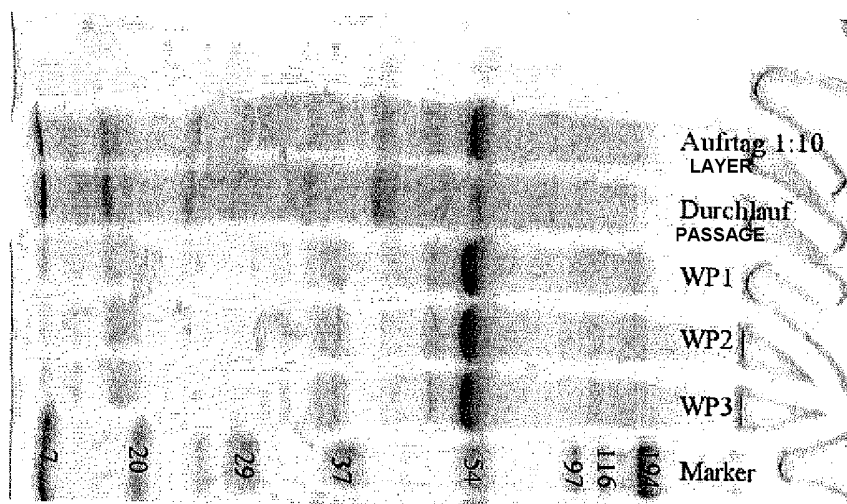
(74) Gemeinsamer Vertreter: **BASF AKTIENGESELLSCHAFT**; 67056 Ludwigshafen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: HYDROPHOBIN AS A COATING AGENT FOR EXPANDABLE OR EXPANDED THERMOPLASTIC POLYMER PARTICLES

(54) Bezeichnung: HYDROPHOBIN ALS BESCHICHTUNGSMITTEL FÜR EXPANDIERBARE ODER EXPANDIERTE, THERMOPLASTISCHE POLYMERPARTIKEL



(57) Abstract: The invention relates to expandable or expanded thermoplastic polymer particles provided with a coating containing hydrophobin, especially proteins of general structural formula (I): $X_n-C^1-X_{1-50}-C^2-X_{0-5}-C^3-X_{1-100}-C^4-X_{1-100}-C^5-X_{1-50}-C^6-X_{0-5}-C^7-X_{1-50}-C^8-X_m$ wherein X represents each of the 20 naturally occurring amino acids, n and m represent numbers between 0 and 500, and C represents cysteine. The invention also relates to the use of said particles as an antistatic agent.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2006/131555 A1



KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

- (84) **Bestimmungsstaaten** (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen
- mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung in elektronischer Form getrennt veröffentlicht; auf Antrag vom Internationalen Büro erhältlich

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) **Zusammenfassung:** Expandierbare oder expandierte, thermoplastische Polymer-Partikel mit einer Beschichtung enthaltend Hydrophobin, insbesondere Proteine der allgemeinen Strukturformel (I): $X_n-C^1-X_{1-50}-C^2-X_{0-5}-C^3-X_{1-100}-C^4-X_{1-100}-C^5-X_{1-50}-C^6-X_{0-5}-C^7-X_{1-50}-C^8-X_m$ enthält, wobei X für jede der 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren steht, n und m für Zahlen zwischen 0 und 500 stehen, C für Cystein steht, und deren Verwendung als Antistatikum.

Hydrophobin als Beschichtungsmittel für expandierbare oder expandierte, thermoplastische Polymerpartikel

Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft expandierbare oder expandierte, thermoplastische Polymerpartikel mit einer Beschichtung enthaltend Hydrophobin, sowie Verfahren zu deren Herstellung.

10

Um die störungsfrei Förderung von expandierbarem Polystyrol zu ermöglichen und die elektrostatische Aufladung der vorgeschäumten Polystyrolschaumpartikel zu vermindern, wird in der Regel eine Beschichtung der EPS-Partikel mit einem Antistatikum verwendet. Abrieb oder Abwaschung des Beschichtungsmittels von der Oberfläche der Partikel führt häufig zu nicht zufriedenstellenden antistatischen Eigenschaften. Des

15 weiteren kann die Beschichtung mit dem Antistatikum zur Verklebung der Partikel und schlechtem Rieselverhalten führen.

20

Die EP-A 470 455 beschreibt perlformige antistatische expandierbare Styrolpolymerisate mit einer Beschichtung aus einem quartärnären Ammoniumsalz und feinteiliger Kieselsäure, die sich durch ein gutes Rieselverhalten auszeichnen.

25

Hydrophobine sind kleine Proteine von etwa 100 bis 150 Aminosäuren, die charakteristisch für filamentöse Pilze, beispielsweise *Schizophyllum commune*, sind. Sie weisen in aller Regel 8 Cystein-Einheiten auf.

30

Hydrophobine können aus natürlichen Quellen isoliert werden. Unsere ältere Anmeldung DE 102005007480.4 offenbart ein Herstellungsverfahren für Hydrophobine.

35

Im Stand der Technik ist die Verwendung von Hydrophobinen für verschiedene Anwendungen vorgeschlagen worden.

40

WO 96/41882 schlägt die Verwendung von Hydrophobinen als Emulgatoren, Verdicker, oberflächenaktive Substanzen, zum Hydrophilieren hydrophober Oberflächen, zur Verbesserung der Wasserbeständigkeit hydrophiler Substrate, zur Herstellung von Öl-in-Wasser-Emulsionen oder von Wasser-in-Öl-Emulsionen vor. Weiterhin werden pharmazeutische Anwendungen wie die Herstellung von Salben oder Cremes sowie kosmetische Anwendungen wie Hautschutz oder die Herstellung von Haarshampoos oder Haarspülungen vorgeschlagen.

2

WO 01/57528 offenbart die Beschichtung von Fenstern, Kontaktlinsen, Biosensoren, medizinischen Vorrichtungen, Behältern zur Durchführung von Versuchen oder zur Lagerung, Schiffsrümpfen, festen Teilchen oder Rahmen oder Karosserie von Personenkraftwagen mit einer Hydrophobine enthaltenden Lösung bei einer Temperatur von
5 30 bis 80°C.

WO 03/53383 offenbart die Verwendung von Hydrophobin zum Behandeln von Keratin-Materialien in kosmetischen Anwendungen.

10 WO 03/10331 offenbart einen mit Hydrophobin beschichteten Sensor, beispielsweise eine Messelektrode, an den nicht kovalent weitere Substanzen, z.B. elektroaktive Substanzen, Antikörper oder Enzyme gebunden sind.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es daher den genannten Nachteilen abzu-
15 helfen und ein antistatisches Beschichtungsmittel für expandierbare oder expandierte thermoplastische Polymerpartikel zu finden, das beim Vorschäumen oder beim Verschäumen zu niedrigeren Dichten eine verringerte Neigung zum Verkleben der Partikel zeigt.

20 Demgemäß wurden die oben genannten expandierbaren oder expandierten, thermoplastische Polymer-Partikel gefunden.

Bevorzugt enthält die Beschichtung 1 bis 5000 ppm, insbesondere 10 bis 1000 ppm Hydrophobin, bezogen auf das thermoplastische Polymer. Die Beschichtung kann wei-
25 tere Antistatika und/oder Beschichtungshilfstoffe enthalten oder auf weiteren Beschichtungen mit anderen Beschichtungsmitteln aufgebracht werden. Besonders bevorzugt wird eine Beschichtung, die nur aus Hydrophobin oder Mischungen von Hydrophobin besteht und eine mono-molekulare Schicht auf den expandierbaren oder expandierten thermoplastischen Polymer-Partikel ausbildet.

30 Für die expandierbaren oder expandierten, thermoplastischen Polymer-Partikel werden bevorzugt Styrolpolymere, wie Polystyrol (EPS) oder Polyolefine, wie Polyethylen (EPE) oder Polypropylen (EPP) verwendet.

35 Expandierbare thermoplastische Polymer-Partikel sind solche, die durch z. B. mit Heißluft oder Wasserdampf zu expandierten, thermoplastischen Polymer-Partikel verschäumbar sind. Sie enthalten in der Regel chemische oder physikalische Treibmittel in Mengen von 2 bis 10 Gew.-%, bevorzugt 3 bis 7 Gew.-% bezogen auf das thermo-
40 plastische Polymer.

3

Bevorzugte physikalische Treibmittel sind Gase, wie Stickstoff oder Kohlendioxid oder aliphatische Kohlenwasserstoffe mit 2 bis 7 Kohlenstoffatomen, Alkohole, Ketone, Ether oder halogenierte Kohlenwasserstoffe. Besonders bevorzugt werden iso-Butan, n-Butan, iso-Pentan, n-Pentan, neo-Pentan, Hexan oder Gemische davon eingesetzt.

5

Des Weiteren können die expandierbaren und expandierten thermoplastischen Polymer-Partikel übliche Hilfsstoffe, wie Farbstoffe, Pigmente, Füllstoffe, IR-Absorber, wie Ruß, Aluminium oder Graphit, Stabilisatoren, Flammschutzmittel, wie Hexabromcyclododecan (HBCD), Flammschutzsynergisten, wie Dicumyl oder Dicumylperoxid, Keimbildner oder Gleitmittel in wirksamen Mengen enthalten.

10

Die erfindungsgemäßen, expandierbaren thermoplastische Polymer-Partikel können je nach Herstellverfahren kugel- bzw. perlförmig oder zylinderförmig sein und weisen in der Regel einen mittleren Teilchendurchmesser im Bereich von 0,05 bis 5 mm, insbesondere 0,3 bis 2,5 mm auf, die gegebenenfalls durch Siebung in einzelne Fraktionen aufgeteilt werden können.

15

Die expandierten thermoplastischen Polymer-Partikel haben entsprechend dem Expansionsgrad mittlere Teilchendurchmesser im Bereich von 1 bis 10 mm, insbesondere 2 bis 6 mm und eine Dichte im Bereich von 10 bis 200 kg/m³.

20

Die expandierbaren thermoplastischen Polymer-Partikel können beispielsweise durch Druckimprägnierung von thermoplastischen Polymer-Partikeln mit Treibmitteln in einem Kessel, durch Suspensionspolymerisation in Gegenwart von Treibmitteln oder durch Schmelzeimprägnierung in einem Extruder oder statischen Mischer und anschließende Druckunterwassergranulierung erhalten werden.

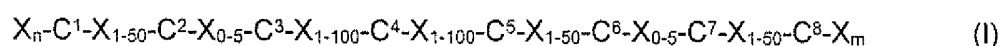
25

Expandierte thermoplastische Polymerpartikel können durch Verschäumen von expandierbaren thermoplastischen Polymer-Partikeln, z. B. mit Heißluft oder Wasserdampf in Druckvorschäumern, durch Druckimprägnierung von thermoplastischen Polymerpartikeln mit Treibmitteln in einem Kessel und anschließendem Entspannen oder durch Schmelzeextrusion einer treibmittelhaltigen Schmelze unter Aufschäumen und anschließender Granulierung.

30

Unter dem Begriff „Hydrophobine“ im Sinne dieser Erfindung sollen im Folgenden Proteine der allgemeinen Strukturformel (I)

35



40

verstanden werden, wobei X für jede der 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren (Phe, Leu, Ser, Tyr, Cys, Trp, Pro, His, Gln, Arg, Ile, Met, Thr, Asn, Lys, Val, Ala, Asp,

4

Glu, Gly) stehen kann. Dabei können X jeweils gleich oder verschieden sein. Hierbei stellen die bei X stehenden Indizes jeweils die Anzahl der Aminosäuren dar, C steht für Cystein, und die Indizes n und m stehen unabhängig voneinander für natürliche Zahlen von 0 und 500, bevorzugt von 15 bis 300.

5

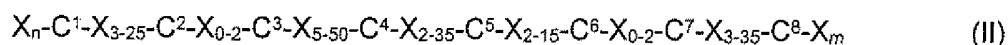
Die Polypeptide gemäß Formel (I) sind weiterhin durch die Eigenschaft charakterisiert, dass sie bei Raumtemperatur nach Beschichten einer Glasoberfläche eine Vergrößerung des Kontaktwinkels eines Wassertropfens von mindestens 20°, bevorzugt mindestens 25° und besonders bevorzugt 30° bewirken, jeweils verglichen mit dem Kontaktwinkel eines gleich großen Wassertropfens mit der unbeschichteten Glasoberfläche.

10

Die mit C¹ bis C⁸ benannten Cysteine können entweder reduziert vorliegen oder miteinander Disulfidbrücken ausbilden. Besonders bevorzugt ist die intramolekulare Ausbildung von C-C Brücken, insbesondere die mit mindestens einer, bevorzugt 2, besonders bevorzugt 3 und ganz besonders bevorzugt 4 intramolekularen Disulfidbrücken.

15

Bevorzugt werden Hydrophobine der allgemeinen Formel (II)

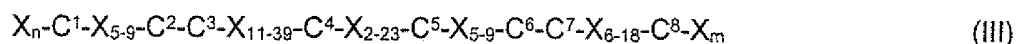


20

zur Ausführung der vorliegenden Erfindung eingesetzt, wobei X, C und die bei X und C stehenden Indizes die obige Bedeutung haben, jedoch stehen die Indizes n und m für Zahlen zwischen 0 und 300, und sich die Proteine weiterhin durch die oben erwähnte Kontaktwinkeländerung auszeichnen.

25

Besonders bevorzugt werden Hydrophobine der allgemeinen Formel (III)



30

eingesetzt, wobei X, C und die bei X und C stehenden Indizes die obige Bedeutung haben, die Indizes n und m für Zahlen zwischen 0 und 200 stehen, und sich die Proteine weiterhin durch die oben erwähnte Kontaktwinkeländerung auszeichnen.

Bei den Resten X_n und X_m kann es sich um Peptidsequenzen handeln, die natürlicherweise mit einem Hydrophobin verknüpft sind. Es kann sich aber auch bei einem oder beiden Resten um Peptidsequenzen handeln, die natürlicherweise nicht mit einem Hydrophobin verknüpft sind. Darunter sind auch solche Reste X_n und/oder X_m zu verstehen, bei denen eine natürlicherweise in einem Hydrophobin vorkommende Peptidsequenz durch eine nicht natürlicherweise in einem Hydrophobin vorkommende Peptidsequenz verlängert ist.

40

Falls es sich bei X_n und/oder X_m um natürlicherweise nicht mit Hydrophobinen verknüpfte Peptidsequenzen handelt, sind derartige Sequenzen in der Regel mindestens 20, bevorzugt mindestens 35, besonders bevorzugt mindestens 50 und ganz besonders bevorzugt mindestens 100 Aminosäuren lang. Ein derartiger, natürlicherweise nicht mit einem Hydrophobin verknüpfter Rest soll im Folgenden auch als Fusionspartner bezeichnet werden. Damit soll ausgedrückt werden, dass die Proteine aus mindestens einem Hydrophobinteil und einem Fusionspartner bestehen können, die in der Natur nicht zusammen in dieser Form vorkommen.

Der Fusionspartner kann aus einer Vielzahl von Proteinen ausgewählt werden. Es können auch mehrere Fusionspartner mit einem Hydrophobinteil verknüpft werden, beispielsweise am Aminoterminus (X_n) und am Carboxyterminus (X_m) des Hydrophobinteils. Es können aber auch beispielsweise zwei Fusionspartnerteile mit einer Position (X_n oder X_m) des erfindungsgemäßen Proteins verknüpft werden.

Besonders geeignete Fusionspartnerteile sind Proteine, die natürlicherweise in Mikroorganismen, insbesondere in *E. coli* oder *Bacillus subtilis* vorkommen. Beispiele für solche Fusionspartnerteile sind die Sequenzen yaad (SEQ ID NO:15 und 16), ya-ae (SEQ ID NO:17 und 18), und Thioredoxin. Gut geeignet sind auch Fragmente oder Derivate dieser genannten Sequenzen, die nur einen Teil, bevorzugt 70-99%, besonders bevorzugt 80-98% der genannten Sequenzen umfassen, oder bei denen einzelne Aminosäuren, bzw. Nukleotide gegenüber der genannten Sequenz verändert sind, wobei sich die Prozentangaben jeweils auf die Anzahl der Aminosäuren bezieht.

Die erfindungsgemäß verwendeten Proteine können auch noch in ihrer Polypeptidsequenz modifiziert sein, beispielsweise durch Glycosilierung, Acetylierung oder auch durch chemische Quervernetzung beispielsweise mit Glutardialdehyd.

Eine Eigenschaft der erfindungsgemäß verwendeten Proteine ist die Änderung von Oberflächeneigenschaften, wenn die Oberflächen mit den Proteinen beschichtet werden. Die Änderung der Oberflächeneigenschaften lässt sich experimentell dadurch bestimmen, dass der Kontaktwinkel eines Wassertropfens vor und nach der Beschichtung der Oberfläche mit dem Protein gemessen wird und die Differenz der beiden Messungen ermittelt wird.

Die Durchführung von Kontaktwinkelmessungen ist dem Fachmann prinzipiell bekannt. Die Messungen beziehen sich auf Raumtemperatur sowie Wassertropfen von 5 μ l. Die genauen experimentellen Bedingungen für eine beispielhaft geeignete Methode zur Messung des Kontaktwinkels sind im experimentellen Teil dargestellt. Unter den dort genannten Bedingungen besitzen die erfindungsgemäß verwendeten Proteine die Eigenschaft, den Kontaktwinkel um mindestens 20°, bevorzugt mindestens 25°, beson-

ders bevorzugt mindestens 30° zu vergrößern, jeweils verglichen mit dem Kontaktwinkel eines gleich großen Wassertropfens mit der unbeschichteten Glasoberfläche.

5 Im Hydrophobinteil der bisher bekannten Hydrophobine sind die Positionen der polaren und unpolaren Aminosäuren konserviert, was sich in einem charakteristischen Hydrophobizitätsplot äußert. Unterschiede in den biophysikalischen Eigenschaften und in der Hydrophobizität führten zur Einteilung der bisher bekannten Hydrophobine in zwei Klassen, I und II (Wessels et al. 1994, Ann. Rev. Phytopathol., 32, 413-437).

10 Die assemblierten Membranen aus Klasse I Hydrophobinen sind hochgradig unlöslich (selbst gegenüber 1% Na-Dodecylsulfat (SDS) bei erhöhter Temperatur) und können nur durch konzentrierte Trifluoressigsäure (TFA), bzw. Ameisensäure wieder dissoziiert werden. Im Gegensatz dazu sind die assemblierten Formen von Klasse II Hydrophobinen weniger stabil. Sie können bereits durch 60%iges Ethanol, bzw. 1% SDS (bei
15 Raumtemperatur) wieder aufgelöst werden.

Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen zeigt, dass die Länge des Bereichs zwischen Cystein C³ und C⁴ bei Klasse II Hydrophobinen deutlich kürzer ist, als bei Hydrophobinen der Klasse I. Klasse II Hydrophobine weisen weiterhin mehr geladene Aminosäuren als Klasse I auf.
20

Besonders bevorzugte Hydrophobine zur Ausführung der vorliegenden Erfindung sind die Hydrophobine des Typs dewA, rodA, hypA, hypB, sc3, basf1, basf2, die im nachfolgenden Sequenzprotokoll strukturell charakterisiert sind. Es kann sich auch nur um
25 Teile oder Derivate davon handeln. Es können auch mehrere Hydrophobinteile, bevorzugt 2 oder 3, gleicher oder unterschiedlicher Struktur miteinander verknüpft und mit einer entsprechenden geeigneten Polypeptidsequenz, die natürlicherweise nicht mit einem Hydrophobin verbunden ist, verknüpft werden.

30 Besonders geeignet zur Durchführung der vorliegenden Erfindung sind weiterhin die Fusionsproteine mit den in SEQ ID NO: 20, 22, 24 dargestellten Polypeptidsequenzen sowie den dafür codierenden Nukleinsäuresequenzen, insbesondere den Sequenzen gemäss SEQ ID NO: 19, 21, 23. Auch Proteine, die sich ausgehend von den in SEQ ID NO. 22, 22 oder 24 dargestellten Polypeptidsequenzen durch Austausch, Insertion
35 oder Deletion von mindestens einer, bis hin zu 10. bevorzugt 5, besonders bevorzugt 5% aller Aminosäuren ergeben, und die die biologische Eigenschaft der Ausgangsproteine noch zu mindestens 50% besitzen, sind besonders bevorzugte Ausführungsformen. Unter biologischer Eigenschaft der Proteine wird hierbei die bereits beschriebene Vergrößerung des Kontaktwinkels um mindestens 20° verstanden.

40

Die erfindungsgemäß verwendeten Proteine lassen sich chemisch durch bekannte Verfahren der Peptidsynthese, beispielsweise durch Festphasensynthese nach Merrifield herstellen.

- 5 Natürlich vorkommende Hydrophobine lassen sich aus natürlichen Quellen mittels geeigneter Methoden isolieren. Beispielhaft sei auf Wösten et. al., Eur. J Cell Bio. 63, 122-129 (1994) oder WO 96/41882 verwiesen.

10 Die Herstellung von Fusionsproteinen kann bevorzugt durch gentechnische Verfahren erfolgen, bei denen eine für den Fusionspartner und eine für den Hydrophobinteil codierende Nukleinsäuresequenz, insbesondere DNA-Sequenz, so kombiniert werden, dass in einem Wirtsorganismus durch Genexpression der kombinierten Nukleinsäuresequenz das gewünschte Protein erzeugt wird. Ein derartiges Herstellverfahren ist in unserer älteren Anmeldung DE 102005007480.4 offenbart.

15

Geeignete Wirtsorganismen (Produktionsorganismen) für das genannte Herstellverfahren können dabei Prokaryonten (einschließlich der Archaea) oder Eukaryonten sein, besonders Bakterien einschliesslich Halobacterien und Methanococcen, Pilze, Insektenzellen, Pflanzenzellen und Säugerzellen, besonders bevorzugt *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Pichia pastoris*, *Pseudomonas spec.*, Lactobacillen, *Hansenula polymorpha*, *Trichoderma reesei*, SF9 (bzw. verwandte Zellen) u.a.

20

25 Gegenstand der Erfindung ist außerdem die Verwendung von Expressionskonstrukten, enthaltend unter der genetischen Kontrolle regulativer Nukleinsäuresequenzen, eine für ein erfindungsgemäß verwendetes Polypeptid kodierende Nukleinsäuresequenz, sowie Vektoren, umfassend wenigstens eines dieser Expressionskonstrukte.

30

Vorzugsweise umfassen eingesetzte Konstrukte 5'-stromaufwärts von der jeweiligen kodierenden Sequenz einen Promotor und 3'-stromabwärts eine Terminatorsequenz sowie gegebenenfalls weitere übliche regulative Elemente, und zwar jeweils operativ verknüpft mit der kodierenden Sequenz.

35

Unter einer "operativen Verknüpfung" versteht man die sequentielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und gegebenenfalls weiterer regulativer Elemente derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann.

40

Beispiele für operativ verknüpfbare Sequenzen sind Targeting-Sequenzen sowie Enhancer, Polyadenylierungssignale und dergleichen. Weitere regulative Elemente umfassen selektierbare Marker, Amplifikationssignale, Replikationsursprünge und derglei-

chen. Geeignete regulatorische Sequenzen sind z. B. beschrieben in Goeddel, Gene Expression Technology : Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990).

5 Zusätzlich zu diesen Regulationssequenzen kann die natürliche Regulation dieser Sequenzen vor den eigentlichen Strukturgenen noch vorhanden sein und gegebenenfalls genetisch verändert worden sein, so dass die natürliche Regulation ausgeschaltet und die Expression der Gene erhöht wurde.

10 Ein bevorzugtes Nukleinsäurekonstrukt enthält vorteilhaft auch eine oder mehrere der schon erwähnten "Enhancer"-Sequenzen, funktionell verknüpft mit dem Promotor, die eine erhöhte Expression der Nukleinsäuresequenz ermöglichen. Auch am 3'-Ende der DNA-Sequenzen können zusätzliche vorteilhafte Sequenzen inseriert werden, wie weitere regulatorische Elemente oder Terminatoren.

15 Die Nukleinsäuren können in einer oder mehreren Kopien im Konstrukt enthalten sein. Im Konstrukt können noch weitere Marker, wie Antibiotikaresistenzen oder Auxotrophien komplementierende Gene, gegebenenfalls zur Selektion auf das Konstrukt enthalten sein.

20 Vorteilhafte Regulationssequenzen für das Verfahren sind beispielsweise in Promotoren wie cos-, tac-, trp-, tet-, trp-, tet-, lpp-, lac-, lpp-lac-, lacIq-T7-, T5-, T3-, gal-, trc-, ara-, rhaP(rhaPBAD) SP6-, lambda-PR-oder imlambda-P-Promotor enthalten, die vorteilhaft in gram-negativen Bakterien Anwendung finden. Weitere vorteilhafte Regulationssequenzen sind beispielsweise in den gram-positiven Promotoren amy und SP02, in den Hefe-oder Pilzpromotoren ADC1, MFalpha, AC, P-60, CYC1, GAPDH, TEF, rp28, ADH enthalten.

25 Es können auch künstliche Promotoren für die Regulation verwendet werden.

30 Das Nukleinsäurekonstrukt wird zur Expression in einem Wirtsorganismus vorteilhafterweise in einen Vektor, wie beispielsweise einem Plasmid oder einem Phagen inseriert, der eine optimale Expression der Gene im Wirt ermöglicht. Unter Vektoren sind außer Plasmiden und Phagen auch alle anderen dem Fachmann bekannten Vektoren, also z. B. Viren, wie SV40, CMV, Baculovirus und Adenovirus, Transposons, IS-Elemente, Phasmide, Cosmide, und lineare oder zirkuläre DNA, sowie das Agrobacterium-System zu verstehen.

35 Diese Vektoren können autonom im Wirtsorganismus repliziert oder chromosomal repliziert werden. Diese Vektoren stellen eine weitere Ausgestaltung der Erfindung dar. Geeignete Plasmide sind beispielsweise in E. coli pLG338, pACYC184, pBR322,

pUC18, pUC19, pKC30, pRep4, pHS1, pKK223-3, pDHE19.2, pHS2, pPLc236, pMBL24, pLG200, pUR290, pIN-III³-B1, tgt11 oder pBdCl, in *Streptomyces* pIJ101, pIJ364, pIJ702 oder pIJ361, in *Bacillus* pUB110, pC194 oder pBD214, in *Corynebacterium* pSA77 oder pAJ667, in Pilzen pALS1, pIL2 oder pBB116, in Hefen 2alpha, pAG-1, YEp6, YEp13 oder pEMBLYe23 oder in Pflanzen pLGV23, pGHlac+, pBIN19, pAK2004
5 oder pDH51. Die genannten Plasmide stellen eine kleine Auswahl der möglichen Plasmide dar. Weitere Plasmide sind dem Fachmann bekannt und können beispielsweise aus dem Buch Cloning Vectors (Eds. Pouwels P. H. et al. Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018) entnommen werden.

10

Vorteilhaft enthält das Nukleinsäurekonstrukt zur Expression der weiteren enthaltenen Gene zusätzlich noch 3'-und/oder 5'-terminale regulatorische Sequenzen zur Steigerung der Expression, die je nach ausgewähltem Wirtorganismus und Gen oder Gene für eine optimale Expression ausgewählt werden.

15

Diese regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression der Gene und der Proteinexpression ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtorganismus bedeuten, dass das Gen erst nach Induktion exprimiert oder überexprimiert wird, oder dass es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird.

20

Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei vorzugsweise die Genexpression der eingeführten Gene positiv beeinflussen und dadurch erhöhen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der
25 Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird.

In einer weiteren Ausgestaltungsform des Vektors kann der das Nukleinsäurekonstrukt oder die Nukleinsäure enthaltende Vektor auch vorteilhaft in Form einer linearen DNA in die Mikroorganismen eingeführt werden und über heterologe oder homologe Re-
30 kombination in das Genom des Wirtorganismus integriert werden. Diese lineare DNA kann aus einem linearisierten Vektor wie einem Plasmid oder nur aus dem Nukleinsäurekonstrukt oder der Nukleinsäure bestehen.

35 Für eine optimale Expression heterologer Gene in Organismen ist es vorteilhaft die Nukleinsäuresequenzen entsprechend des im Organismus verwendeten spezifischen "codon usage" zu verändern. Der "codon usage" lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene des betreffenden Organismus leicht ermitteln.

40 Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer geeigneten kodierenden Nukleotidsequenz sowie einem Terminator-

oder Polyadenylierungssignal. Dazu verwendet man gängige Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E. F. Fritsch und J. Sambrook, *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T. J. Silhavy, M. L. Berman und L. W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F. M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience (1987) beschrieben sind.

Das rekombinante Nukleinsäurekonstrukt bzw. Genkonstrukt wird zur Expression in einem geeigneten Wirtsorganismus, vorteilhaft in einen wirtsspezifischen Vektor inseriert, der eine optimale Expression der Gene im Wirt ermöglicht. Vektoren sind dem Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus "Cloning Vectors" (Pouwels P. H. et al., Hrsg, Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985) entnommen werden.

Mit Hilfe der Vektoren sind rekombinante Mikroorganismen herstellbar, welche beispielsweise mit wenigstens einem Vektor transformiert sind und zur Produktion der erfindungsgemäß verwendeten Proteine eingesetzt werden können. Vorteilhafterweise werden die oben beschriebenen rekombinanten Konstrukte in ein geeignetes Wirtssystem eingebracht und exprimiert. Dabei werden vorzugsweise dem Fachmann bekannte geläufige Klonierungs- und Transfektionsmethoden, wie beispielsweise Co-Präzipitation, Protoplastenfusion, Elektroporation, retrovirale Transfektion und dergleichen, verwendet, um die genannten Nukleinsäuren im jeweiligen Expressionssystem zur Expression zu bringen. Geeignete Systeme werden beispielsweise in *Current Protocols in Molecular Biology*, F. Ausubel et al., Hrsg., Wiley Interscience, New York 1997, oder Sambrook et al. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*. 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 beschrieben.

Es sind auch homolog rekombinierte Mikroorganismen herstellbar. Dazu wird ein Vektor hergestellt, der zumindest einen Abschnitt eines erfindungsgemäß zu verwendenden Gens oder einer kodierenden Sequenz enthält, worin gegebenenfalls wenigstens eine Aminosäure-Deletion, -Addition oder -Substitution eingebracht worden ist, um die Sequenz zu verändern, z. B. funktionell zu disruptieren ("Knockout"- Vektor). Die eingebrachte Sequenz kann z. B. auch ein Homologes aus einem verwandten Mikroorganismus sein oder aus einer Säugetier-, Hefe- oder Insektenquelle abgeleitet sein. Der zur homologen Rekombination verwendete Vektor kann alternativ derart ausgestaltet sein, dass das endogene Gen bei homologer Rekombination mutiert oder anderweitig verändert ist, jedoch noch das funktionelle Protein kodiert (z. B. kann der stromaufwärts gelegene regulatorische Bereich derart verändert sein, dass dadurch die Expression des endogenen Proteins verändert wird). Der veränderte Abschnitt des erfindungsgemäß verwendeten Gens ist im homologen Rekombinationsvektor. Die Kon-

struktion geeigneter Vektoren zur homologen Rekombination ist z. B. beschrieben in Thomas, K. R. und Capecchi, M. R. (1987) Cell 51 : 503.

Als rekombinante Wirtsorganismen für die erfindungsgemäß verwendete Nukleinsäure
5 oder dem Nukleinsäurekonstrukt kommen prinzipiell alle prokaryontischen oder euka-
ryontischen Organismen in Frage. Vorteilhafterweise werden als Wirtsorganismen Mik-
roorganismen wie Bakterien, Pilze oder Hefen verwendet. Vorteilhaft werden gram-
positive oder gram-negative Bakterien, bevorzugt Bakterien der Familien Enterobacte-
riaceae, Pseudomonadaceae, Rhizobiaceae, Streptomycetaceae oder Nocardiaceae,
10 besonders bevorzugt Bakterien der Gattungen Escherichia, Pseudomonas, Streptomy-
ces, Nocardia, Burkholderia, Salmonella, Agrobacterium oder Rhodococcus verwendet.

Die im Herstellverfahren für Fusionsproteine verwendeten Organismen werden je nach
Wirtsorganismus in dem Fachmann bekannter Weise angezogen bzw. gezüchtet. Mik-
15 roorganismen werden in der Regel in einem flüssigen Medium, das eine Kohlenstoff-
quelle meist in Form von Zuckern, eine Stickstoffquelle meist in Form von organischen
Stickstoffquellen wie Hefeextrakt oder Salzen wie Ammoniumsulfat, Spurenelemente
wie Eisen-, Mangan- und Magnesiumsalze sowie gegebenenfalls Vitamine enthält, bei
Temperaturen zwischen 0 und 100 °C, bevorzugt zwischen 10 bis 60 °C unter Sauer-
20 stoffbegasung angezogen. Dabei kann der pH-Wert der Nährlüssigkeit auf einem fes-
ten Wert gehalten werden, das heißt während der Anzucht reguliert werden oder nicht.
Die Anzucht kann "batch"-weise, "semi-batch"-weise oder kontinuierlich erfolgen. Nähr-
stoffe können zu Beginn der Fermentation vorgelegt oder semikontinuierlich oder kon-
tinuierlich nachgefüttert werden. Die Enzyme können nach dem in den Beispielen be-
25 schriebenen Verfahren aus den Organismen isoliert werden oder als Rohextrakt für die
Reaktion verwendet werden.

Erfindungsgemäß verwendete Proteine oder funktionelle, biologisch aktive Fragmente
davon, können mittels eines rekombinanten Verfahrens hergestellt werden, bei dem
30 man einen Proteine-produzierenden Mikroorganismus kultiviert, gegebenenfalls die
Expression der Proteine induziert und diese aus der Kultur isoliert. Die Proteine können
so auch in großtechnischem Maßstab produziert werden, falls dies erwünscht ist. Der
rekombinante Mikroorganismus kann nach bekannten Verfahren kultiviert und fermen-
tiert werden. Bakterien können beispielsweise in TB- oder LB-Medium und bei einer
35 Temperatur von 20 bis 40 °C und einem pH-Wert von 6 bis 9 vermehrt werden. Im Ein-
zelnen werden geeignete Kultivierungsbedingungen beispielsweise in T. Maniatis, E. F.
Fritsch and J. Sambrook, Molecular Cloning : A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor
Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) beschrieben.

40 Die Zellen werden dann, falls die erfindungsgemäß verwendeten Proteine nicht in das
Kulturmedium sezerniert werden, aufgeschlossen und das Produkt nach bekannten

Proteinisolierungsverfahren aus dem Lysat gewonnen. Die Zellen können wahlweise durch hochfrequenten Ultraschall, durch hohen Druck, wie z. B. in einer French-Druckzelle, durch Osmolyse, durch Einwirkung von Detergenzien, lytischen Enzymen oder organischen Lösungsmitteln, durch Homogenisatoren oder durch Kombination
5 mehrerer der aufgeführten Verfahren aufgeschlossen werden.

Eine Aufreinigung der erfindungsgemäß verwendeten Proteine kann mit bekannten, chromatographischen Verfahren erzielt werden, wie Molekularsieb-Chromatographie (Gelfiltration), wie Q- Sepharose-Chromatographie, Ionenaustausch-Chromatographie
10 und hydrophobe Chromatographie, sowie mit anderen üblichen Verfahren wie Ultrafiltration, Kristallisation, Aussalzen, Dialyse und nativer Gelelektrophorese. Geeignete Verfahren werden beispielsweise in Cooper, F. G., Biochemische Arbeitsmethoden, Verlag Water de Gruyter, Berlin, New York oder in Scopes, R., Protein Purification, Springer Verlag, New York, Heidelberg, Berlin beschrieben.

15 Vorteilhaft kann es sein, zur Isolierung des rekombinanten Proteins Vektorsysteme oder Oligonukleotide zu verwenden, die die cDNA um bestimmte Nukleotidsequenzen verlängern und damit für veränderte Proteine oder Fusionsproteine kodieren, die beispielsweise einer einfacheren Reinigung dienen. Derartige geeignete Modifikationen
20 umfassen als Anker fungierende sogenannte "Tags", wie beispielsweise die als Hexa-Histidin-Anker bekannte Modifikation oder Epitope, die als Antigene von Antikörpern erkannt werden können (beschrieben zum Beispiel in Harlow, E. and Lane, D., 1988, Antibodies : A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor (N. Y.) Press). Weitere geeignete Tags sind z.B. HA, Calmodulin-BD, GST, MBD; Chitin-BD, Steptavidin-BD-Avi-
25 Tag, Flag-Tag, T7 etc. Diese Anker können zur Anheftung der Proteine an einen festen Träger, wie z. B. einer Polymermatrix, dienen, die beispielsweise in einer Chromatographiesäule eingefüllt sein kann, oder an einer Mikrotiterplatte oder an einem sonstigen Träger verwendet werden kann. Die entsprechenden Reinigungsprotokolle sind
30 von den kommerziellen Affinitäts-Tag-Anbietern erhältlich.

Die wie beschrieben hergestellten Proteine können sowohl direkt als Fusionsproteine als auch nach Abspaltung und Abtrennung des Fusionspartners als „reine“ Hydrophobine verwendet werden.

35 Wenn eine Abtrennung des Fusionspartners vorgesehen ist, empfiehlt es sich eine potentielle Spaltstelle (spezifische Erkennungsstelle für Proteasen) in das Fusionsprotein zwischen Hydrophobinteil und Fusionspartnerteil einzubauen. Als Spaltstelle geeignet sind insbesondere solche Peptidsequenzen geeignet, die ansonsten weder im Hydrophobinteil noch im Fusionspartnerteil vorkommen, was sich mit bioinformatischen
40 Tools leicht ermitteln lässt. Besonders geeignet sind beispielsweise BrCN-Spaltung an

Methionin, oder durch Protease vermittelte Spaltung mit Faktor Xa-, Enterokinase-, Thrombin, TEV-Spaltung (Tobacco etch virus Protease).

Die Beschichtung der expandierbaren oder expandierten, thermoplastischen Polymer-Partikel kann vor oder nach dem Verschäumen, beispielsweise durch Auftrommeln von Hydrophobin in einem Schaufelmischer (Fa. Lödige) oder durch in Kontaktbringen der Oberfläche der Polymer-Partikel mit einer Hydrophobin-haltigen Lösung, beispielsweise durch Tauchen oder Sprühen, erfolgen. Bei der Herstellung durch Extrusion einer treibmittelhaltigen Schmelze kann das Hydrophobin auch dem Wasserkreislauf des Unterwassergranulators zugegeben werden.

Bevorzugt wird zur Beschichtung der expandierbaren oder expandierten, thermoplastischen Polymer-Partikel eine wässrige Lösung mit einer Konzentration von 1 bis 100 g/l Hydrophobin und einem pH-Wert im Bereich von 5 bis 9 verwendet. Das Aufbringen der Hydrophobin-haltige Lösung erfolgt in der Regel bei einer Temperatur im Bereich von 0 bis 140°C, bevorzugt im Bereich von 30 bis 80°C.

Die erfindungsgemäßen expandierbaren und expandierten, thermoplastische Polymerpartikel sind antistatisch ausgerüstet, zeigen eine geringe Neigung zur Verklebung beim Vorschäumen, jedoch eine gute Verschweißung beim Verschäumen zu Formteilen.

Beispiele:

Beispiel 1

25 Vorarbeiten für die Klonierung von yaad-His₆ / yaaE-His₆

Mit Hilfe der Oligonukleotide Hal570 und Hal571 (Hal 572/ Hal 573) wurde eine Polymerase Kettenreaktion durchgeführt. Als Template DNA wurde genomische DNA des Bakteriums *Bacillus subtilis* verwendet. Das erhaltene PCR Fragment enthielt die codierende Sequenz des Gens yaad / yaaE aus *Bacillus subtilis*, und an den Enden je eine NcoI bzw. BglII Restriktionsschnittstelle. Das PCR Fragment wurde gereinigt und mit den Restriktionsendonukleasen NcoI und BglII geschnitten. Dieses DNA Fragment wurde als Insert verwendet, und in den zuvor mit den Restriktionsendonukleasen NcoI und BglII linearisierten Vektor pQE60 der Firma Qiagen kloniert. Die so entstandenen Vektoren pQE60YAAD#2 / pQE60YaaE#5 können zur Expression von Proteinen bestehend aus, YAAD::HIS₆ bzw. YAAE::HIS₆ verwendet werden.

Hal570: gcgcgcccatggctcaaacaggtactga

Hal571: gcagatctccagccggttcttcatac

40 Hal572: ggocatgggattaacaataggtgtactagg

Hal573: gcagatcttacaagtccttttgcttatattcc

Beispiel 2

Klonierung von yaad-Hydrophobin DewA-His₆

- 5 Mit Hilfe der Oligonukleotide KaM 416 und KaM 417 wurde eine Polymerase Kettenreaktion durchgeführt. Als Template DNA wurde genomische DNA des Schimmelpilzes *Aspergillus nidulans* verwendet. Das erhaltene PCR Fragment enthielt die codierende Sequenz des Hydrophobin Gens *dewA* und einer N-Terminalen FaktorXa Proteinase Schnittstelle. Das PCR Fragment wurde gereinigt und mit der Restriktionsendonuklease BamHI geschnitten. Dieses DNA Fragment wurde als Insert verwendet, und in den
- 10 zuvor mit der Restriktionsendonuklease BglII linearisierten Vektor pQE60YAAD#2 kloniert.

- Der so entstandene Vektor #508 kann zur Expressions eines Fusionsproteins bestehend aus, YAAD::Xa::*dewA*::His₆ verwendet werden.
- 15

KaM416: GCAGCCCATCAGGGATCCCTCAGCCTTGGTACCAGCGC

KaM417: CCCGTAGCTAGTGGATCCATTGAAGGCCGCAT-
GAAGTTCTCCGTCTCCGC

20

Beispiel 3

Klonierung von yaad-Hydrophobin RodA-His₆

- Die Klonierung des Plasmids #513 erfolgte analog zu Plasmid #508 unter Verwendung der Oligonukleotide KaM 434 und KaM 435.
- 25

KaM434: GCTAAGCGGATCCATTGAAGGCCGCATGAAGTTCTCCATTGCTGC

KaM435: CCAATGGGGATCCGAGGATGGAGCCAAGGG

30 Beispiel 4

Klonierung von yaad-Hydrophobin BASF1-His₆

- Die Klonierung des Plasmids #507 erfolgte analog zu Plasmid #508 unter Verwendung der Oligonukleotide KaM 417 und KaM 418.

- 35 Als Template DNA wurde ein künstlich synthetisierte DNA Sequenz - Hydrophobin BASF1 -eingesetzt (siehe Anhang).

KaM417: CCCGTAGCTAGTGGATCCATTGAAGGCCGCAT-
GAAGTTCTCCGTCTCCGC

- 40 KaM418: CTGCCATTCAGGGGATCCCATATGGAGGAGGGAGACAG

15

Beispiel 5

Klonierung von yaad-Hydrophobin BASF2-His₆

Die Klonierung des Plasmids #506 erfolgte analog zu Plasmid #508 unter Verwendung
5 der Oligonukleotide KaM 417 und KaM 418.

Als Template DNA wurde ein künstlich synthetisierte DNA Sequenz - Hydrophobin
BASF2 -eingesetzt (siehe Anhang).

KaM417: CCCGTAGCTAGTGGATCCATTGAAGGCCGCAT-

10 GAAGTTCTCCGTCTCCGC

KaM418: CTGCCATTCAGGGGATCCCATATGGAGGAGGGAGACAG

Beispiel 6

Klonierung von yaad-Hydrophobin SC3-His₆

15

Die Klonierung des Plasmids #526 erfolgte analog zu Plasmid #508 unter Verwendung
der Oligonukleotide KaM464 und KaM465.

Als Template DNA wurde cDNA von Schizophyllum commune eingesetzt (siehe An-
hang).

20

KaM464: CGTTAAGGATCCGAGGATGTTGATGGGGGTGC

KaM465: GCTAACAGATCTATGTTGCGCCCGTCTCCCCGTCGT

Beispiel 7

25 Fermentation des rekombinanten E.coli Stammes yaad-Hydrophobin DewA-His₆

Inokulation von 3ml LB Flüssigmedium mit einem yaad-Hydrophobin DewA-His₆ expri-
mierenden E.coli Stamm in 15ml Greiner Röhrchen. Inkubation für 8h bei 37°C auf ei-
nem Schüttler mit 200 UpM. Je 2 1l Erlenmeyer Kolben mit Schikanen und 250ml LB
30 Medium (+ 100µg/ml Ampicillin) werden mit jeweils 1ml der Vorkultur angeimpft und 9h
bei 37°C auf einem Schüttler mit 180 UpM inkubiert.

13.5l LB-Medium (+100µg/ml Ampicillin) in einem 20l Fermenter mit 0,5l Vorkultur
(OD_{600nm} 1:10 gegen H₂O gemessen) animpfen. Bei einer OD_{600nm} von ~3.5 Zugabe von
140ml 100mM IPTG. Nach 3h Fermenter auf 10°C abkühlen und Fermentationsbrühe
35 abzentrifugieren. Zellpellet zur weiteren Aufreinigung verwenden.

Beispiel 8

Reinigung des rekombinanten Hydrohobin-Fusionsproteins

40 (Reinigung von Hydrophobin-Fusionsproteinen, die ein C-terminales His₆-tag besitzen)

100 g Zellpellet (100 – 500 mg Hydrophobin) werden mit 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,5 auf 200 ml Gesamtvolumen aufgefüllt und resuspendiert. Die Suspension wird mit einem Ultraturrax Typ T25 (Janke und Kunkel; IKA-Labortechnik) für 10 Minuten behandelt und anschliessend für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit 500 Einheiten Benzonase (Merck, Darmstadt; Best.-Nr. 1.01697.0001) zum Abbau der Nukleinsäuren inkubiert. Vor dem Zellaufschluss wird mit einer Glaskartusche (P1) filtriert. Zum Zellaufschluß und für das Scheren der restlichen genomischen DNA werden zwei Homogenisatorläufe bei 1.500 bar durchgeführt (Microfluidizer M-110EH; Microfluidics Corp.). Das Homogenisat wird zentrifugiert (Sorvall RC-5B, GSA-Rotor, 250 ml Zentrifugenbecher, 60 Minuten, 4°C, 12.000 Upm, 23.000 g), der Überstand auf Eis gestellt und das Pellet in 100 ml Natriumphosphatpuffer, pH 7,5 resuspendiert. Zentrifugation und Resuspendieren werden dreimal wiederholt, wobei der Natriumphosphatpuffer bei der dritten Wiederholung 1 % SDS enthält. Nach der Resuspension wird für eine Stunde gerührt und eine abschliessende Zentrifugation durchgeführt (Sorvall RC-5B, GSA-Rotor, 250 ml Zentrifugenbecher, 60 Minuten, 4°C, 12.000 Upm, 23.000 g). Gemäß SDS-PAGE Analyse ist das Hydrophobin nach der abschliessenden Zentrifugation im Überstand enthalten (Abbildung 1). Die Versuche zeigen, dass das Hydrophobin wahrscheinlich in Form von Einschlusskörpern in den entsprechenden E.coli Zellen enthalten ist. 50 ml des Hydrophobin-enhaltenden Überstandes werden auf eine 50 ml Nickel-Sepharose High Performance 17-5268-02 Säule aufgetragen (Amersham), die mit 50 mM Tris-Cl pH 8,0 Puffer äquibriert wurde. Die Säule wird mit 50 mM Tris-Cl pH 8,0 Puffer gewaschen und das Hydrophobin anschliessend mit 50 mM Tris-Cl pH 8,0 Puffer, der 200 mM Imidazol enthält, eluiert. Zur Entfernung des Imidazols wird die Lösung gegen 50 mM Tris-Cl pH 8,0 Puffer dialysiert.

Abbildung 1 zeigt die Reinigung des hergestellten Hydrophobins:

Spur 1: Auftrag Nickel-Sepharose Säule (1:10 Verdünnung)
Spur 2: Durchlauf = Eluat Waschschrift
Spuren 3 - 5: OD 280 Maxima der Elutionsfraktionen

Das Hydrophobin der Abbildung 1 besitzt ein Molekulargewicht von ca. 53 kD. Die kleineren Banden repräsentieren zum Teil Abbauprodukte des Hydrophobins.

Beispiel 9

Anwendungstechnische Prüfung; Charakterisierung des Hydrophobins durch Kontaktwinkeländerung eines Wassertropfens auf Glas

Substrat:

17

Glas (Fensterglas, Süddeutsche Glas, Mannheim):

- Konzentration Hydrophobin: 100 µg/mL
- Inkubation von Glasplättchen über Nacht (Temperatur 80°C) in 50mM Na-Acetat pH 4 + 0,1% Polyoxyethylen(20)sorbitanmonolaureat (Tween® 20)
- 5 - danach Beschichtung waschen in destilliertem Wasser
- danach Inkubation 10min / 80°C / 1% Natrium-Dodecylsulfat (SDS) -Lösung in dest. Wasser
- Waschen in dest. Wasser

- 10 Die Proben werden an der Luft getrocknet und der Kontaktwinkel (in Grad) eines Tropfens von 5 µl Wasser bei Raumtemperatur bestimmt.

- 15 Die Kontaktwinkelmessung wurde auf einem Gerät Dataphysics Contact Angle System OCA 15+, Software SCA 20.2.0. (November 2002) bestimmt. Die Messung erfolgte gemäss den Herstellerangaben.

- 20 Unbehandeltes Glas ergab einen Kontaktwinkel von $30 \pm 5^\circ$; eine Beschichtung mit dem funktionellen Hydrophobin gemäss Beispiel 8 (yaad-dewa-his₆) ergab Kontaktwinkel von $75 \pm 5^\circ$.

Beispiel 10 und 11

Beschichtung von EPS-Perlen mit Hydrophobin pQE60+YaaD+Xa+dewa+HIS6

Beschichtungsmittel:

- 25 Wässrige Lösung von Hydrophobin pQE60+YaaD+Xa+dewa+HIS6 (SEQ ID NO: 19), welches gemäß Beispiel 8 vorbehandelt wurde. (50 mM NaH₂PO₄, pH 7.5, Konzentration Hydrophobin 6.08 g/l)

- 30 Durch Suspensionspolymerisation hergestellte, unbeschichtete, expandierbare Polystyrol (EPS)-Perlen mit einem Perlgrößenbereich von 0,7 bis 1,0 mm (Styropor® F 315/N) wurde getrocknet und wie folgt beschichtet:

- 35 50 g EPS-Perlen wurden in einem 500 ml Schraubdeckelglas eingewogen, mit 10 ml bzw. 20 ml der Hydrophobin-Lösung versetzt und 24 Stunden bei Raumtemperatur auf einem „Rollstuhl“ bewegt. Anschließend wurde die mit Hydrophobin beschichteten EPS-Perlen auf einem Filterpapier ausgelegt und 5 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet.

Vergleichsversuch V1

40

18

Beispiel 10 wurde wiederholt mit dem Unterschied, dass anstelle der Hydrophobin-Lösung 10 ml destilliertes Wasser verwendet wurde.

- 5 Die beschichteten EPS-Perlen der Beispiele 10 und 11 und des Vergleichsversuches wurden jeweils für 2 Minuten bei 100°C im Rauscherkasten zu Polystyrol-Schaumperlen vorgeschäumt und nach 3 Tagen Lagerung zu Formteilen verschweißt. Zur Beurteilung der Güte der Verschweißung wurden die Formteile nach 2 Tagen Lagerung in der Mitte durchgebrochen.
- 10 Zur Beurteilung der antistatischen Eigenschaften wurde der Oberflächenwiderstand der vorgeschäumten und getrockneten Polystyrolschaumperlen gemessen.

Tabelle 1

Beispiel	Hydrophobin-Lösung	Verklebung der vorgeschäumten EPS-Perlen	Verschweißung	Antistatik (Oberflächenwiderstand)
10	10 ml	wenig	Sehr gut	$< 10^{10}$ Ohm.
11	20 ml	wenig	gut	
V1	0 ml	Stark	schlecht	$> 10^{14}$ Ohm

Zuordnung der Sequenznamen zu DNA- und Polypeptidsequenzen im Sequenzprotokoll

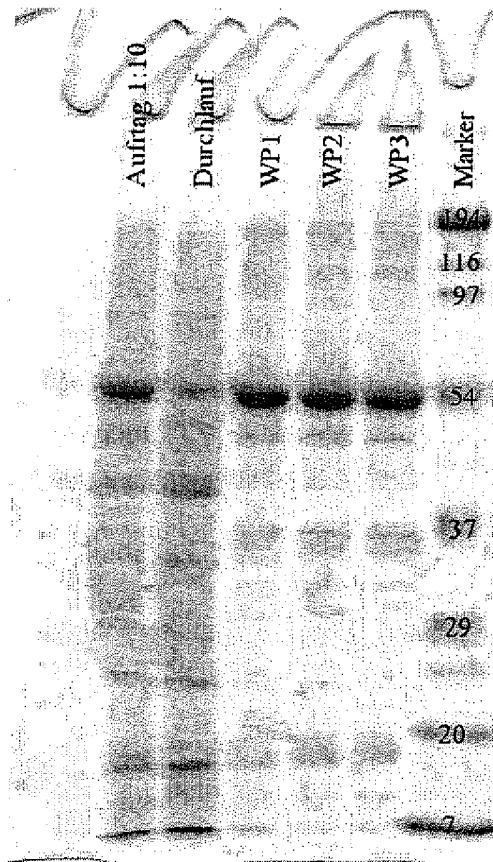
dewA DNA- und Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 1
dewA Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 2
rodA DNA- und Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 3
rodA Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 4
hypA DNA- und Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 5
hypA Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 6
hypB DNA- und Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 7
hypB Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 8
sc3 DNA- und Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 9
sc3 Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 10
basf1 DNA- und Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 11
basf1 Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 12
basf2 DNA- und Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 13
basf2 Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 14
yaad DNA- und Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 15
yaad Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 16
yaae DNA- und Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 17
yaae Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 18
yaad-Xa-dewA-his ₆ DNA- und Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 19
yaad-Xa-dewA-his Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 20
yaad-Xa-rodA-his DNA- und Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 21
yaad-Xa-rodA-his Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 22
yaad-Xa-basf1-his DNA- und Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 23
yaad-Xa-basf1-his Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 24

Patentansprüche

1. Expandierbare oder expandierte, thermoplastische Polymer-Partikel mit einer Beschichtung enthaltend Hydrophobin.
- 5
2. Expandierbare oder expandierte, thermoplastische Polymer-Partikel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Beschichtung 1 bis 5000 ppm Hydrophobin, bezogen auf das thermoplastische Polymer, enthält.
- 10
3. Expandierbare oder expandierte, thermoplastische Polymer-Partikel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das thermoplastische Polymer aus Polystyrol oder Polyolefin besteht.
- 15
4. Expandierbare oder expandierte, thermoplastische Polymer-Partikel nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass sie einen mittleren Teilchendurchmesser im Bereich von 0,05 bis 5 mm aufweisen.
- 20
5. Expandierbare oder expandierte, thermoplastische Polymer-Partikel nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Beschichtung ein Hydrophobin der allgemeinen Formel (II)
- $$X_n-C^1-X_{3-25}-C^2-X_{0-2}-C^3-X_{5-50}-C^4-X_{2-35}-C^5-X_{2-15}-C^6-X_{0-2}-C^7-X_{3-35}-C^8-X_m \quad (II)$$
- enthält, wobei X für jede der 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren steht, n und m für Zahlen zwischen 0 und 500 stehen, C für Cystein steht.
- 25
6. Expandierbare oder expandierte, thermoplastische Polymer-Partikel nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Beschichtung ein Hydrophobin der allgemeinen Formel (III)
- 30
- $$X_n-C^1-X_{5-9}-C^2-C^3-X_{11-39}-C^4-X_{2-23}-C^5-X_{5-9}-C^6-C^7-X_{6-18}-C^8-X_m \quad (III)$$
- enthält.
- 35
7. Expandierbare oder expandierte, thermoplastische Polymer-Partikel nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Beschichtung ein Hydrophobin des Typs dewA, rodA, hjypA, hypB, sc3, basf1 oder basf2 enthält.
- 40
8. Verfahren zur Beschichtung von expandierbaren oder expandierten, thermoplastischen Polymer-Partikel, dadurch gekennzeichnet, dass man die Oberfläche der Polymer-Partikel mit einer Hydrophobin-haltigen Lösung in Kontakt bringt.

- 5
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass als Hydrophobin-haltige Lösung eine wässrige Lösung mit einer Konzentration von 1 bis 100 g/l Hydrophobin und einem pH-Wert im Bereich von 5 bis 9 verwendet wird.
 10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass man die Oberfläche mit der Hydrophobin-haltige Lösung bei einer Temperatur im Bereich von 0 bis 140°C in Kontakt bringt.

Abbildung 1



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2006/063037

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C08J9/224

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C08J

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 470 455 A2 (BASF AG [DE]) 12 February 1992 (1992-02-12) claim 1	1
A	WO 2005/033316 A2 (BASF AG [DE]; OSTERMANN KAI [DE]; ROEDEL GERHARD [DE]) 14 April 2005 (2005-04-14) claim 27	1

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 October 2006

Date of mailing of the international search report

18/10/2006

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Von Kuzenko, Michael

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No PCT/EP2006/063037

Patent document cited in search report	A2	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0470455	A2	12-02-1992	AT 128475 T	15-10-1995
			AU 647160 B2	17-03-1994
			AU 8162191 A	13-02-1992
			CA 2048426 A1	07-02-1992
			DE 4024871 A1	13-02-1992
			ES 2077122 T3	16-11-1995
			JP 4239541 A	27-08-1992
			US 5110835 A	05-05-1992
WO 2005033316	A2	14-04-2005	CA 2537492 A1	14-04-2005
			DE 10342794 A1	21-04-2005
			EP 1664306 A2	07-06-2006

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2006/063037

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
INV. C08J9/224

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
C08J

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP 0 470 455 A2 (BASF AG [DE]) 12. Februar 1992 (1992-02-12) Anspruch 1	1
A	WO 2005/033316 A2 (BASF AG [DE]; OSTERMANN KAI [DE]; ROEDEL GERHARD [DE]) 14. April 2005 (2005-04-14) Anspruch 27	1

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

12. Oktober 2006

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

18/10/2006

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Von Kuzenko, Michael

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2006/063037

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0470455	A2	12-02-1992	AT 128475 T 15-10-1995
			AU 647160 B2 17-03-1994
			AU 8162191 A 13-02-1992
			CA 2048426 A1 07-02-1992
			DE 4024871 A1 13-02-1992
			ES 2077122 T3 16-11-1995
			JP 4239541 A 27-08-1992
			US 5110835 A 05-05-1992
WO 2005033316	A2	14-04-2005	CA 2537492 A1 14-04-2005
			DE 10342794 A1 21-04-2005
			EP 1664306 A2 07-06-2006