

(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  
07. Dezember 2017 (07.12.2017)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 2017/207546 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:

C11D 3/386 (2006.01) C11D 3/20 (2006.01)  
C11D 3/04 (2006.01) C12N 9/96 (2006.01)  
C07K 5/00 (2006.01)

SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN,  
GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz  
3)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2017/063000

(22) Internationales Anmeldedatum:  
30. Mai 2017 (30.05.2017)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
10 2016 209 406.8  
31. Mai 2016 (31.05.2016) DE

(71) Anmelder: HENKEL AG & CO. KGAA [DE/DE]; Hen-  
kelstr. 67, 40589 Düsseldorf (DE).

(72) Erfinder: O'CONNELL, Timothy; Mehlbeerenstr. 10,  
86899 Landsberg am Lech (DE). WEBER, Thomas; Her-  
renweg 7 b, 41541 Dormagen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für  
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,  
AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY,  
BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM,  
DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,  
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP,  
KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME,  
MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,  
OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA,  
SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN,  
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für  
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,  
GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST,  
SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ,  
RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ,  
DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT,  
LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI,

(54) Title: STABILIZED ENZYME-CONTAINING WASHING AND CLEANING COMPOSITIONS

(54) Bezeichnung: STABILISIERTE ENZYM-HALTIGE WASCH- UND REINIGUNGSMITTEL

(57) Abstract: The present invention relates to washing or cleaning compositions, preferably liquid washing compositions, comprising at least one protease, at least one compound of the formula (I) and/or of the formula (II) that acts as a protease inhibitor and is thus a suitable enzyme stabilizer, and a salt of the formula (III) that boosts the action of the protease inhibitor. The invention likewise provides the corresponding washing and cleaning methods, for the use of the compositions described herein, and for the use of a salt for increasing the action of a peptide stabilizer in a protease-containing washing or cleaning composition.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft Wasch- oder Reinigungsmittel, bevorzugt flüssige Waschmittel, enthaltend mindestens eine Protease, mindestens eine Verbindung der Formel (I) und/oder der Formel (II), die als Proteaseinhibitor wirkt und somit ein geeigneter Enzymstabilisator ist, sowie ein Salz der Formel (III), das die Wirkung des Proteaseinhibitors verstärkt. Ebenfalls Bestandteil der Erfindung sind die entsprechenden Wasch- und Reinigungsverfahren, die Verwendung der hierin beschriebenen Mittel sowie die Verwendung eines Salzes zur Erhöhung der Wirkung eines Peptidstabilisators in einem Protease-haltigen Wasch- oder Reinigungsmittel.



WO 2017/207546 A1

## Stabilisierte Enzym-haltige Wasch- und Reinigungsmittel

Die vorliegende Erfindung betrifft Wasch- oder Reinigungsmittel, bevorzugt flüssige Waschmittel, enthaltend mindestens eine Protease, mindestens eine Verbindung der Formel (I) und/oder der Formel (II), die als Proteaseinhibitor wirkt und somit ein geeigneter Enzymstabilisator ist, sowie ein Salz der Formel (III), welches die Wirkung des Proteaseinhibitors verstärkt. Ebenfalls Bestandteil der Erfindung sind die entsprechenden Wasch- und Reinigungsverfahren, die Verwendung der hierin beschriebenen Mittel sowie die Verwendung eines Salzes zur Erhöhung der Wirkung eines Peptidstabilisators in einem Protease-haltigen Wasch- oder Reinigungsmittel.

Der Einsatz von Enzymen in Wasch- und Reinigungsmitteln ist seit Jahrzehnten im Stand der Technik etabliert. Sie dienen dazu, das Leistungsspektrum der betreffenden Mittel entsprechend ihren speziellen Aktivitäten zu erweitern. Hierzu gehören insbesondere hydrolytische Enzyme wie Proteasen, Amylasen, Lipasen und Cellulasen. Die ersten drei genannten hydrolysieren Proteine, Stärke und Fette und tragen somit unmittelbar zur Schmutzentfernung bei. Cellulasen werden insbesondere wegen ihrer Gewebewirkung eingesetzt. Eine weitere Gruppe von Wasch- und Reinigungsmittelenzymen sind oxidative Enzyme, insbesondere Oxidasen, die ggf. im Zusammenspiel mit anderen Komponenten vorzugsweise dazu dienen, Anschmutzungen zu bleichen oder die bleichenden Agentien in situ zu erzeugen. Neben diesen Enzymen, die einer fortwährenden Optimierung unterworfen werden, werden laufend weitere Enzyme für den Einsatz in Wasch- und Reinigungsmitteln bereitgestellt, um insbesondere spezielle Anschmutzungen optimal angehen zu können, wie beispielsweise Pektinasen,  $\beta$ -Glucanasen, Mannanasen oder weitere Hemicellulasen (Glykosidasen) zur Hydrolyse insbesondere spezieller pflanzlicher Polymere.

Die am längsten etablierten und in praktisch allen modernen, leistungsfähigen Wasch- und Reinigungsmitteln enthaltenen Enzyme sind Proteasen und hierunter insbesondere Serin-Proteasen, zu denen erfindungsgemäß auch die Subtilasen gerechnet werden. Sie dienen dem Abbau proteinhaltiger Anschmutzungen auf dem Reinigungsgut. Allerdings hydrolysieren sie auch sich selbst (Autoproteolyse) und alle anderen in den betreffenden Mitteln enthaltenen Proteine, d.h. insbesondere Enzyme. Dies geschieht besonders während des Reinigungsvorgangs, d.h. in der wässrigen Waschflotte, wenn vergleichsweise günstige Reaktionsbedingungen vorliegen. Dies geschieht in geringerem Ausmaße aber auch während der Lagerung der betreffenden Mittel, weshalb mit einer langen Lagerung immer auch ein gewisser Verlust der Proteaseaktivität sowie der Aktivitäten der anderen Enzyme einhergeht. Besonders problematisch ist dies in gelförmigen oder flüssigen und insbesondere in wasserhaltigen Rezepturen, weil in diesem mit dem enthaltenen Wasser sowohl das Reaktionsmedium als auch das Hydrolyse-Reagenz zur Verfügung stellen.

Ein Ziel bei der Entwicklung von Wasch- und Reinigungsmittelrezepturen besteht darin, die enthaltenen Enzyme besonders während der Lagerung zu stabilisieren. Darunter wird der Schutz gegen verschiedene ungünstige Einflüsse verstanden, wie beispielsweise gegen Denaturierung oder Zerfall durch physikalische Einflüsse oder Oxidation. Ein Schwerpunkt dieser Entwicklungen besteht im Schutz der enthaltenen Proteine und/oder Enzyme gegen proteolytische Spaltung. Diese kann durch den Aufbau physikalischer Barrieren erfolgen, etwa durch Verkapselung der Enzyme in speziellen Enzymgranulaten oder durch Konfektionierung der Mittel in Zwei- oder Mehrkammersystemen. Der andere vielfach beschrittene Weg besteht darin, chemische Verbindungen zuzusetzen, die die Proteasen inhibieren und somit insgesamt als Stabilisatoren für Proteasen und die anderen enthaltenen Proteine und Enzyme wirken. Es muss sich dabei um reversible Proteaseinhibitoren handeln, da die Proteaseaktivität nur vorübergehend, insbesondere während der Lagerung, nicht aber mehr während des Reinigungsprozesses unterbunden werden soll.

Als reversible Proteaseinhibitoren sind im Stand der Technik Polyole, insbesondere Glycerin und 1,2-Propylenglycol, Benzamidin-Hydrochlorid, Borax, Borsäuren, Boronsäuren oder deren Salze oder Ester etabliert. Darunter sind vor allem Derivate mit aromatischen Gruppen, etwa ortho-, meta- oder para-substituierte Phenylboronsäuren zu erwähnen, insbesondere 4-Formylphenyl-Boronsäure, beziehungsweise die Salze oder Ester der genannten Verbindungen. Ein besonders guter Schutz ergibt sich, wenn Borsäurederivate zusammen mit Polyolen eingesetzt werden, da diese dann einen das Enzym stabilisierenden Komplex bilden können. Auch Peptidaldehide, das heißt Oligopeptide mit reduziertem C-Terminus, insbesondere solche aus 2 bis 50 Monomeren sind zu diesem Zweck beschrieben. Zu den peptidischen reversiblen Proteaseinhibitoren gehören unter anderem Ovomuroid und Leupeptin. Auch spezifische, reversible Peptid-Inhibitoren sowie Fusionsproteine aus Proteasen und spezifischen Peptid-Inhibitoren werden hierfür eingesetzt.

Weitere etablierte Enzymstabilisatoren sind Aminoalkohole wie Mono-, Di-, Triethanol- und -propanolamin und deren Mischungen, aliphatische Carbonsäuren bis zu C<sub>12</sub>, wie beispielsweise Bernsteinsäure, andere Dicarbonsäuren oder Salze der genannten Säuren. Auch endgruppenverschlossene Fettsäureamidalkoxylate sind für diesen Zweck etabliert. Bestimmte als Builder eingesetzte organische Säuren vermögen, wie in WO 97/18287 offenbart, zusätzlich zu ihrer Builder-Funktion auch ein Enzym zu stabilisieren.

Als Wasch- und Reinigungsmittelproteasen sind verschiedene Protease-Klassen etabliert, beispielsweise Metalloproteasen. Unter den Wasch- und Reinigungsmittelproteasen nehmen Proteasen vom Subtilisin-Typ (Subtilasen, Subtilopeptidasen, EC 3.4.21.62) aufgrund ihrer günstigen enzymatischen Eigenschaften wie Stabilität oder pH-Optimum allerdings eine herausragende Stellung ein. Sie werden aufgrund der katalytisch wirksamen Aminosäuren den Serin-Proteasen zugeordnet. Sie wirken als unspezifische Endopeptidasen, das heißt, sie hydrolysieren beliebige Säure-

reamidbindungen, die im Inneren von Peptiden oder Proteinen liegen. Ihr pH-Optimum liegt meist im deutlich alkalischen Bereich. Einen Überblick über diese Familie bietet beispielsweise der Artikel „Subtilases: Subtilisin-like Proteases" von R. Siezen, Seite 75-95 in „Subtilisin enzymes", herausgegeben von R. Bott und C. Betzel, New York, 1996. Subtilasen werden natürlicherweise von Mikroorganismen gebildet; hierunter sind insbesondere die von Bacillus-Spezies gebildeten und sekretierten Subtilisine als bedeutendste Gruppe innerhalb der Subtilasen zu erwähnen.

Es wird deshalb besonders daran gearbeitet, reversible Inhibitoren gerade dieser Enzymklasse zur Verfügung zu stellen. Dabei haben sich Polyole wie Glycerin und 1,2-Propylenglycol aufgrund ihrer hohen notwendigen Einsatzkonzentrationen als unvorteilhaft erwiesen, weil die übrigen Wirkstoffe der betreffenden Mittel damit nur noch in entsprechend geringeren Anteilen enthalten sein können.

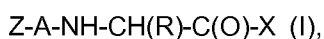
Unter den bereits in vergleichsweise niedriger Konzentration wirksamen Serin-Protease-Inhibitoren (Stabilisatoren) nehmen Borsäurederivate eine herausragende Stellung ein. Unabhängig von ihrer stabilisierenden Wirkung weisen die Borsäurederivate jedoch einen entscheidenden Nachteil auf: Viele davon, wie beispielsweise Borat, bilden mit einigen anderen Wasch- bzw. Reinigungsmittel-inhaltsstoffen unerwünschte Nebenprodukte, so dass diese in den betreffenden Mitteln nicht mehr für den erwünschten Reinigungszweck zur Verfügung stehen oder sogar als Verunreinigung auf dem Waschgut zurückbleiben.

Peptid-basierte Proteasestabilisatoren weisen die für Borsäurederivate genannten Nachteile nicht auf. Allerdings weisen Peptid-basierte Proteasestabilisatoren, wenn sie in moderaten Konzentrationen eingesetzt werden, im Vergleich zum Borsäure-Standardstabilisator (1 Gew.-% Borsäure bezogen auf das Gesamtgewicht des Mittels) eine signifikant verringerte Proteasestabilisator-Leistung auf.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es daher, Verbindungen zu identifizieren, die die Proteasestabilisator-Leistung von Peptid-basierten Proteasestabilisatoren steigern und für den Einsatz in Wasch- und Reinigungsmitteln geeignet sind. Hierbei war der Einsatz in insgesamt flüssigen, gelförmigen oder pastösen Wasch- und Reinigungsmitteln von besonderem Interesse, und darunter insbesondere in solchen, die Wasser enthalten.

Diese Aufgabe wird durch Wasch- oder Reinigungsmittel gelöst, die mindestens eine Protease, mindestens einen Enzymstabilisator und mindestens ein Salz enthalten, wobei der mindestens eine Enzymstabilisator ausgewählt wird aus Verbindungen

(I) der allgemeinen Strukturformel (I)



wobei A ein Aminosäurerest ist; X Wasserstoff ist; Z ein N-Verkappingsrest ausgewählt aus Phosphoramidat  $[(\text{R}'\text{O})_2(\text{O})\text{P-}]$ , Sulfenamid  $[(\text{SR}')_2\text{-}]$ , Sulfonamid  $[(\text{R}'(\text{O})_2\text{S-}]$ , Sulfonsäu-

re [SO<sub>3</sub>H], Phosphinamid [(R')<sub>2</sub>(O)P-], Sulfamoyl Derivaten [R'O(O)<sub>2</sub>S-], Thioharnstoff [(R')<sub>2</sub>N(O)C-], Thiocarbamat [R'O(S)C-], Phosphonat [R'-P(O)OH], Amidophosphat [R'O(OH)(O)P-], Carbamat (R'O(O)C-) und Harnstoff (R'NH(O)C-) ist, wobei jedes R' unabhängig ausgewählt wird aus geradkettigen oder verzweigten C1-C6 unsubstituierten Alkyl-, Phenyl-, C7-C9 Alkylaryl- und Cycloalkyl-Resten, wobei der Cycloalkylring ein C4-C8 Cycloalkylring sein kann und ein oder mehrere Heteroatome enthalten kann, die ausgewählt werden aus O, N, und S; und R ausgewählt wird aus geradkettigen oder verzweigten C1-C6 unsubstituierten Alkyl-, Phenyl und C7-C9 Alkylarylresten; und Stereoisomeren, Tautomeren und Salzen davon; oder

(II) der allgemeinen Strukturformel (II)

Y-B<sub>1</sub>-B<sub>0</sub>-X (II),

wobei X Wasserstoff ist; B<sub>1</sub> ein einzelner D- oder L-Aminosäurerest ist; B<sub>0</sub> ein Aminosäurerest ist und Y aus einem oder mehreren, bevorzugt ein oder zwei, Aminosäureresten und optional aus einem N-Verkappingsrest besteht, wobei der N-Verkappingsrest wie unter (I) definiert ist; und

wobei das mindestens eine Salz der allgemeinen Strukturformel (III)

(C<sup>E+</sup>)<sub>p</sub>(D<sup>F-</sup>)<sub>q</sub> (III) entspricht,

wobei C ein Kation ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Al<sup>3+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Li<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>, NR<sup>4+</sup> und Na<sup>+</sup> ist, wobei jedes R" unabhängig voneinander für H oder eine lineare oder verzweigte, substituierte oder unsubstituierte Alkyl-, Aryl- oder Alkenylgruppe steht, die alle optional ein oder mehrere Heteroatom(e) enthalten können; E eine ganze Zahl von 1 bis 3 ist und der Valenz/Wertigkeit des Kations entspricht; p der Anzahl an Kationen im Salz entspricht; D ein Anion ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, Cl<sup>-</sup>, C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>O(COO)<sub>3</sub><sup>3-</sup>, HCOO<sup>-</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, HSO<sub>4</sub><sup>-</sup>, C<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>2-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> und SO<sub>3</sub><sup>2-</sup> ist; F eine ganze Zahl von 1 bis 3 ist und der Valenz/Wertigkeit des Anions entspricht; q der Anzahl an Anionen im Salz entspricht; wobei die Nettoladung des Salzes 0 ist, d.h. es gilt ((E)·p) - ((F)·q) = 0.

Bevorzugte Reste R werden ausgewählt aus Methyl, iso-Propyl, sec-Butyl, iso-Butyl, -C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, -CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, und -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, so dass der Teil -NH-CH(R)-C(O)-X der Verbindung der Formel (I) von den Aminosäuren Ala, Val, Ile, Leu, PGly (Phenylglycin), Phe und HPhe (Homophenylalanine) abgeleitet ist, indem die Carboxylgruppe in eine Aldehyd- oder Trifluoromethylketongruppe umgewandelt wird. Obwohl solche Reste daher keine Aminosäuren sind (obwohl sie aus einem Aminosäurevorläufer synthetisiert sein können), wird hierin bei den beispielhaft aufgelisteten Enzymstabilisatoren der Einfachheit halber der Aldehydteil der Inhibitoren, der von der entsprechenden Aminosäuren abgeleitet ist, durch den Zusatz "H" nach der analogen Aminosäure bezeichnet (z.B., steht "-AlaH" für den Rest "-NHCH(CH<sub>3</sub>)C(O)H"). Trifluoromethylketone werden in gleicher Weise durch den Zusatz "CF<sub>3</sub>" nach der analogen Aminosäure gekennzeichnet (z.B., steht "-AlaCF<sub>3</sub>" für den Rest "-NHCH(CH<sub>3</sub>)C(O)CF<sub>3</sub>").

Diese und weitere Aspekte, Merkmale und Vorteile der Erfindung werden für den Fachmann aus dem Studium der folgenden detaillierten Beschreibung und Ansprüche ersichtlich. Dabei kann jedes Merkmal aus einem Aspekt der Erfindung in jedem anderen Aspekt der Erfindung eingesetzt werden. Ferner ist es selbstverständlich, dass die hierin enthaltenen Beispiele die Erfindung beschreiben und veranschaulichen sollen, diese aber nicht einschränken und insbesondere die Erfindung nicht auf diese Beispiele beschränkt ist. Alle Prozentangaben sind, sofern nicht anders angegeben, Gewichts-%. Numerische Bereiche, die in dem Format „von x bis y“ angegeben sind, schließen die genannten Werte ein. Wenn mehrere bevorzugte numerische Bereiche in diesem Format angegeben sind, ist es selbstverständlich, dass alle Bereiche, die durch die Kombination der verschiedenen Endpunkte entstehen, ebenfalls erfasst werden.

Die Aldehyde der vorliegenden Erfindung können aus den entsprechenden Aminosäuren hergestellt werden, wobei die C-terminale Carboxylgruppe der Aminosäure in eine Aldehydgruppe umgewandelt wird. Derartige Aldehyde können mittels bekannter Verfahren hergestellt werden, wie z.B. in U.S. Pat. Nr. 5015627, EP 0 185 930, EP 0 583 534 und DE 3200812 beschrieben.

Die Trifluoromethylketone können ebenfalls aus den korrespondierenden Aminosäuren hergestellt werden, indem die C-terminale Carboxylgruppe in eine Trifluoromethylketongruppe umgewandelt wird. Solche Trifluoromethylketone können mittels bekannter Verfahren, wie beispielsweise in der EP 0 583 535 beschrieben, hergestellt werden.

In bevorzugten Ausführungsformen ist der Substituent A ausgewählt aus Ala, Gly, Val, Ile, Leu, Phe und Lys.

Das N-terminale Ende der Enzymstabilisatoren gemäß Formel (I), und optional das der Enzymstabilisatoren gemäß Formel (II), wird durch eine Schutzgruppe, die den N-Terminus verkappt geschützt, wobei die Gruppe ausgewählt wird aus Carbamaten, Harnstoffen, Sulfonamiden, Phosphonamiden, Thioharnstoffen, Sulfenamiden, Sulfonsäuren, Phosphinamiden, Thiocarbamaten, Amidophosphaten und Phosphonamiden. In einer bevorzugten Ausführungsform wird das N-terminale Ende jedoch durch eine Methyl-, Ethyl- oder Benzylcarbamatgruppe [ $\text{CH}_3\text{O}-(\text{O})\text{C}-$ ;  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}-(\text{O})\text{C}-$ ; oder  $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{O}-(\text{O})\text{C}-$ ], eine Methyl-, Ethyl- oder Benzylharnstoffgruppe [ $\text{CH}_3\text{NH}-(\text{O})\text{C}-$ ;  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NH}-(\text{O})\text{C}-$ ; oder  $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{NH}-(\text{O})\text{C}-$ ], eine Methyl-, Ethyl- oder Benzylsulfonamidgruppe [ $\text{CH}_3\text{SO}_2-$ ;  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{SO}_2-$ ; oder  $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{SO}_2-$ ], oder eine Methyl-, Ethyl oder Benzylamidophosphatgruppe [ $\text{CH}_3\text{O}(\text{OH})(\text{O})\text{P}-$ ;  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}(\text{OH})(\text{O})\text{P}-$ ; oder  $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{O}(\text{OH})(\text{O})\text{P}-$ ] geschützt.

Die Synthese der N-Verkappungsgruppen kann beispielsweise den folgenden Dokumenten entnommen werden: Protective Groups in Organic Chemistry, Greene, T., Wuts, P., John Wiley & Sons, New York, 1991, pp 309-405; March, J, Advanced Organic Chemistry, Wiley Interscience,

1985, pp. 445, 469, Carey, F. Sundberg, R., Advanced Organic Chemistry, Part B, Plenum Press, New York, 1990, pp. 686-89; Atherton, E., Sheppard, R., Solid Phase Peptide Synthesis, Pierce Chemical, 1989, pp. 3-4; Grant, G., Synthetic Peptides, W. H. Freeman & Co. 1992, pp. 77-103; Stewart, J., Young, J., Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd Edition, IRL Press, 1984, pp. 3,5,11,14-18, 28-29. Bodansky, M., Principles of Peptide Synthesis, Springer-Verlag, 1988, pp. 62, 203, 59-69; Bodansky, M., Peptide Chemistry, Springer-Verlag, 1988, pp. 74-81, Bodansky, M., Bodansky, A., The Practice of Peptide Synthesis, Springer-Verlag, 1984, pp. 9-32.

Die erfindungsgemäßen Mittel umfassen Salze der Formel (III). Diese Salze sind in den hierin beschriebenen Mittel einer Konzentration von 50-2000 mM, bevorzugt in einer Konzentration von 70-1500 mM, weiter bevorzugt in einer Konzentration von 100-1000 mM, noch weiter bevorzugt in einer Konzentration von 150-500 mM und ferner bevorzugt in einer Konzentration von 200 mM enthalten. In weiteren Ausführungsformen der Erfindung ist das Salz nach Strukturformel (III)  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .

Der Begriff „Alkyl“, wie hierin verwendet, bezieht sich auf eine aliphatische Kohlenwasserstoffgruppe, die gerade oder verzweigt sein kann und 1 bis 20 Kohlenstoffatome in der Kette umfasst. Der Begriff „Aryl“, wie hierin verwendet, bezieht sich auf ein aromatisches monocyclisches oder multicyclisches Ringsystem, das 6 bis 14 Kohlenstoffatome umfasst. Der Begriff „Alkenyl“, wie hierin verwendet, bezieht sich auf eine aliphatische Kohlenwasserstoffgruppe, die wenigstens eine Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindung enthält und die gerade oder verzweigt sein kann und 2 bis 15 Kohlenstoffatome in der Kette umfasst.

Die erfindungsgemäßen Mittel können alternativ oder zusätzlich zum Enzymstabilisator der Formel (I) einen Enzymstabilisator der Formel  $\text{Y-B}_1\text{-B}_0\text{-X}$  (II) enthalten, wobei X Wasserstoff ist;  $\text{B}_1$  ein einzelner D- oder L-Aminosäurerest ist;  $\text{B}_0$  ein Aminosäurerest ist und Y aus einem oder mehreren, bevorzugt ein oder zwei, Aminosäureresten und optional aus einem N-Verkappungsrest besteht, wobei der N-Verkappungsrest wie oben definiert ist.

In bevorzugten Ausführungsformen ist  $\text{B}_0$  ein D- oder L-Aminosäurerest, ausgewählt aus Tyr, m-Tyrosin, 3,4-Dihydroxyphenylalanin, Phe, Val, Met, Nva, Leu, Ile und Nle, und/oder  $\text{B}_1$  ist ein D- oder L-Aminosäurerest mit einer (optional substituierten) kleinen aliphatischen Seitengruppe, bevorzugt Ala, Cys, Gly, Pro, Ser, Thr, Val, Nva oder Nle. In weiteren bevorzugten Ausführungsformen ist  $\text{Y B}_2, \text{B}_3\text{-B}_2, \text{Z-B}_2, \text{Z-B}_3\text{-B}_2$  ist, wobei  $\text{B}_2$  und  $\text{B}_3$  jeweils unabhängig voneinander ein Aminosäurerest sind und Z ein N-Verkappungsrest ist, wobei der N-Verkappungsrest wie oben definiert ist. In weiter bevorzugten Ausführungsformen ist  $\text{B}_2$  ausgewählt aus Val, Gly, Ala, Arg, Leu, Phe und Thr, und/oder ist  $\text{B}_3$  ausgewählt aus Phe, Tyr, Trp, Phenylglycin, Leu, Val, Nva, Nle und Ile.

Sofern nicht anders angegeben, sind die Aminosäuren in den oben genannten Formeln über Peptidbindungen verknüpft und alle Peptide oder peptid-ähnlichen Verbindungen sind, sofern nicht anders angegeben, immer vom N- zum C-Terminus dargestellt.

Die erfindungsgemäßen Mittel können den mindestens einen Enzymstabilisator nach Strukturformel (I) und/oder (II) in einer Konzentration von 0,01-50 mM, bevorzugt in einer Konzentration von 0,05-5 mM, weiter bevorzugt in einer Konzentration von 0,1-0,5 mM enthalten. Falls mehrere Enzymstabilisatoren der Formeln (I) und/oder (II) enthalten sind, beziehen sich diese Angaben auf die Gesamtkonzentration.

Beispielhafte Enzymstabilisatoren der Formeln (I) und (II), die erfindungsgemäß eingesetzt werden können, umfassen, sind aber nicht beschränkt auf Cbz-Arg-Ala-Tyr-H, Ac-Gly-Ala-Tyr-H, Cbz-Gly-Ala-Tyr-H, Cbz-Gly-Ala-Tyr-H, Cbz-Val-Ala-Tyr-H, Cbz-Gly-Ala-Phe-H, Cbz-Gly-Ala-Val-H, Cbz-Gly-Gly-Tyr-H, Cbz-Gly-Gly-Phe-H, Cbz-Arg-Val-Tyr-H, Cbz-Leu-Val-Tyr-H, Ac-Leu-Gly-Ala-Tyr-H, Ac-Phe-Gly-Ala-Tyr-H, Ac-Tyr-Gly-Ala-Tyr-H, Ac-Phe-Gly-Ala-Leu-H, Ac-Phe-Gly-Ala-Phe-H, Ac-Phe-Gly-Val-Tyr-H, Ac-Phe-Gly-Ala-Met-H, Ac-Trp-Leu-Val-Tyr-H, MeO-CO-Val-Ala-Leu-H, MeNCO-Val-Ala-Leu-H, MeO-CO-Phe-Gly-Ala-Leu-H, MeO-CO-Phe-Gly-Ala-Phe-H, MeSO<sub>2</sub>-Phe-Gly-Ala-Leu-H, MeSO<sub>2</sub>-Val-Ala-Leu-H, PhCH<sub>2</sub>O(OH)(O)P-Val-Ala-Leu-H, EtSO<sub>2</sub>-Phe-Gly-Ala-Leu-H, PhCH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>-Val-Ala-Leu-H, PhCH<sub>2</sub>O(OH)(O)P-Leu-Ala-Leu-H, PhCH<sub>2</sub>O(OH)(O)P-Phe-Ala-Leu-H, MeO(OH)(O)P-Leu-Gly-Ala-Leu-H, α-MAPI, β-MAPI, Phe-urea-Arg-Val-Tyr-H, Phe-urea-Gly-Gly-Tyr-H, Phe-urea-Gly-Ala-Phe-H, Phe-urea-Gly-Ala-Tyr-H, Phe-urea-Gly-Ala-Leu-H, Phe-urea-Gly-Ala-Nva-H, Phe-urea-Gly-Ala-Nle-H, Tyr-urea-Arg-Val-Tyr-H, Tyr-urea-Gly-Ala-Tyr-H, Phe-Cys-Ser-Arg-Val-Phe-H, Phe-Cys-Ser-Arg-Val-Tyr-H, Phe-Cys-Ser-Gly-Ala-Tyr-H, Antipain, GE20372A, GE20372B, Chymostatin A, Chymostatin B und Chymostatin C.

Wie hierin verwendet, bezieht sich der Ausdruck „Cbz“ auf die Benzyloxycarbonyl-Gruppe mit der Summenformel C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>O. Diese wird als Schutzgruppe verwendet. Weitere terminale Gruppen in den Enzymstabilisatoren der vorliegenden Erfindung können sein: „Ph“: Phenyl; „Ac“: Acetyl und „Me“: Methyl. Der Ausdruck „urea“, wie hierin verwendet, ist gleichbedeutend mit Harnstoff.

In verschiedenen Ausführungsformen umfasst die Erfindung auch alle Stereoisomere, insbesondere Enantiomere und Diastereomere, Tautomere und Salze der vorstehend beschriebenen Verbindungen.

Unter einem Wasch- oder Reinigungsmittel sind erfindungsgemäß alle Mittel zu verstehen, die sich zum Waschen oder Reinigen von insbesondere Textilien und/oder festen Oberflächen eignen. Weitere geeignete Inhaltsstoffe werden weiter unten detailliert beschrieben.

Unter einer Protease sind erfindungsgemäß alle Enzyme zu verstehen, die in der Lage sind, Säureamidverknüpfungen von Proteinen zu hydrolysieren. Auch die Proteasen werden weiter unten detailliert beschrieben.

Ohne an eine Theorie gebunden sein zu wollen, wird erfindungsgemäß davon ausgegangen, dass die Zugabe eines Salzes der Formel (III) den Enzym-Peptidstabilisator-Komplex durch das Entfernen von freien reaktiven Wassermolekülen stabilisiert. Dies erhöht die Bindungseffizienz des Peptidstabilisators an das Enzym und/oder erhöht die Ionenstärke, wodurch letztendlich der Enzym-Peptidstabilisator-Komplex stabilisiert wird.

Der erste Vorteil der erfindungsrelevanten Verbindungen gegenüber dem Stand der Technik besteht darin, dass die oben genannten Vorteile von Peptidstabilisatoren genutzt werden können (z.B. Vermeiden des Bildens von unerwünschten Nebenprodukten im erfindungsgemäßen Mittel durch die unerwünschte Reaktionen des Stabilisators mit anderen Inhaltsstoffen des Mittels). Durch die Verwendung mindestens eines Salzes der Formel (III) ist es überraschenderweise möglich, die Peptidstabilisatoren in moderaten Konzentrationen (0,01-50 mM) einzusetzen, ohne dass das Mittel im Vergleich zum Standardstabilisator (Borsäure) eine signifikant verringerte Protease-stabilisator-Leistung aufweist. Die Protease und ggf. weitere enthaltene Proteine, insbesondere weitere Enzyme werden auf diese Weise gegenüber einer Proteolyse durch dieses Enzym geschützt (gegen Proteolyse stabilisiert) und sind so auch nach einer Lagerung uneingeschränkt leistungsfähig.

Ferner verfügen die erfindungsrelevanten Verbindungen über eine gute Wasserlöslichkeit, so dass sie in entsprechende Mittel einfach eingearbeitet werden können und ein Ausfallen während der Lagerung vermieden wird.

Die genannten Enzym-Inhibitoren (Stabilisatoren) wirken vermutlich deshalb als reversible Inhibitoren, weil sie ähnlich dem Substrat der Proteasen, strukturell an die Bedingungen der Bindungstasche angepasst sind. Dies gilt insbesondere für Serin-Proteasen, wie anhand der Beispiele zur vorliegenden Anmeldung mit der positiven Wirkung der dort experimentell beschriebenen Verbindungen anhand von Serin-Proteasen, konkret Subtilasen, noch spezieller Subtilisinen gezeigt worden ist.

Weitere Gegenstände der vorliegenden Erfindung betreffen:

- Wasch- oder Reinigungsverfahren, in dem eine Protease zur Wirkung kommt, die mit den oben beschriebenen Verbindungen (A) der Formel (I) und/oder (II) und (B) der Formel (III) inhibiert und/oder stabilisiert ist;
- die Verwendung eines erfindungsgemäßen Wasch- oder Reinigungsmittels zum Waschen und/oder Reinigen von Textilien und/oder harten Oberflächen; sowie

- die Verwendung einer Protease und der oben beschriebenen Verbindungen nach (A) Formel (I) und/oder (II) und (B) Formel (III) zur Herstellung eines Wasch- oder Reinigungsmittels.

In erfindungsgemäßen Wasch- oder Reinigungsmitteln, die in einer Ausführungsform in überwiegend fester Form vorliegen und in einer anderen Ausführungsform in überwiegend flüssiger, pastöser oder Gelform vorliegen, ist das Enzym, d.h. die Protease, in einer Menge von 0,05-5 Gew.-%, vorzugsweise 0,05-2 Gew.-%, und der Enzymstabilisator in einer Menge von 0,05-15 Gew.-%, vorzugsweise 0,05-5 Gew.-%, bezogen auf das Gesamtgewicht des Wasch- oder Reinigungsmittels in diesem enthalten.

In verschiedenen Ausführungsformen können das Enzym und der Enzymstabilisator in einer Enzymzusammensetzung vorformuliert vorliegen. Wie aus der vorherigen Ausführungen ersichtlich, bildet das Enzym-Protein nur einen Bruchteil des Gesamtgewichts üblicher Enzym-Zubereitungen. Bevorzugt eingesetzte Protease-Zubereitungen enthalten zwischen 0,1 und 40 Gew.-%, bevorzugt zwischen 0,2 und 30 Gew.-%, besonders bevorzugt zwischen 0,4 und 20 Gew.-% und insbesondere zwischen 0,8 und 10 Gew.-% des Enzymproteins. In solchen Zusammensetzungen kann der Enzymstabilisator in einer Menge von 0,05-35 Gew.-%, vorzugsweise 0,05-10 Gew.-% bezogen auf das Gesamtgewicht in der Enzymzusammensetzung enthalten sein. Diese Enzymzusammensetzung, die ebenfalls ein Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist, kann dann in erfindungsgemäßen Wasch- oder Reinigungsmitteln eingesetzt werden und zwar in Mengen, die zu den oben angegebenen Endkonzentrationen im Wasch- oder Reinigungsmittel führen.

Die Proteinkonzentration kann mit Hilfe bekannter Methoden, zum Beispiel dem BCA-Verfahren (Bicinchoninsäure; 2,2'-Bichinoly-4,4'-dicarbonsäure) oder dem Biuret-Verfahren bestimmt werden. Die Bestimmung der Aktivproteinkonzentration erfolgt diesbezüglich über eine Titration der aktiven Zentren unter Verwendung eines geeigneten irreversiblen Inhibitors (für Proteasen beispielsweise Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)) und Bestimmung der Restaktivität (vgl. M. Bender et al., J. Am. Chem. Soc. 88, 24 (1966), S. 5890-5913).

Neben dem Enzymstabilisator gemäß der oben angegebenen allgemeinen Formel kann ein erfindungsgemäßes Mittel mindestens einen weiteren Stabilisator, insbesondere ein Polyol, wie Glycerin oder 1,2-Ethylenglycol, und/oder ein Antioxidans, enthalten.

Die eingesetzten Proteasen sind alkalische Serin-Proteasen. Sie wirken als unspezifische Endopeptidasen, das heißt, sie hydrolysieren beliebige Säureamidbindungen, die im Inneren von Peptiden oder Proteinen liegen und bewirken dadurch den Abbau proteinhaltiger Anschmutzungen auf dem Reinigungsgut. Ihr pH-Optimum liegt meist im deutlich alkalischen Bereich.

Bei der erfindungsgemäß stabilisierten, bzw. reversibel inhibierten Protease handelt es sich daher vorzugsweise um eine Serin-Protease, insbesondere um eine Subtilase, besonders bevorzugt um ein Subtilisin. Das Subtilisin kann dabei ein Wildtypenzym oder eine Subtilisin-Variante sein, wobei das Wildtypenzym bzw. das Ausgangsenzym der Variante vorzugsweise aus einer der folgenden ausgewählt ist:

- der Alkalischen Protease aus *Bacillus amyloliquefaciens* (BPN<sup>1</sup>),
- der Alkalischen Protease aus *Bacillus licheniformis* (Subtilisin Carlsberg),
- der Alkalischen Protease PB92,
- Subtilisin 147 und/oder 309 (Savinase)
- der Alkalischen Protease aus *Bacillus lentus*, vorzugsweise aus *Bacillus lentus* (DSM 5483),
- der Alkalischen Protease aus *Bacillus alcalophilus* (DSM 11233),
- der Alkalischen Protease aus *Bacillus gibsonii* (DSM 14391) oder einer hierzu mindestens zu 70% identischen Alkalischen Protease,
- der Alkalischen Protease aus *Bacillus* sp. (DSM 14390) oder einer hierzu mindestens zu 98,5% identischen Alkalischen Protease, und
- der Alkalischen Protease aus *Bacillus* sp. (DSM 14392) oder einer hierzu mindestens zu 98,1 % identischen Alkalischen Protease.

In verschiedenen Ausführungsformen der Erfindung ist die erfindungsgemäß stabilisierte Protease eine Protease ausgewählt aus der Gruppe aus Proteasen gemäß SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 und SEQ ID NO:3. In alternativen Ausführungsformen werden Kombinationen zweier oder dreier Proteasen gemäß SEQ ID NO: 1 / SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:1 / SEQ ID NO:3; SEQ ID NO:2 / SEQ ID NO:3 oder SEQ ID NO:1 / SEQ ID NO:2 / SEQ ID NO:3 erfindungsgemäß stabilisiert.

Obwohl im Folgenden immer auf eine Protease Bezug genommen wird, ist es selbstverständlich auch möglich eine Kombination von zwei oder mehr Proteasen einzusetzen.

„Variante“, wie hierin in Zusammenhang mit Proteasen verwendet, bezieht sich auf natürliche oder artifiziell erzeugte Variationen einer nativen Protease, die eine gegenüber der Referenzform abgewandelte Aminosäuresequenz aufweisen. Eine solche Variante kann einzelne oder mehrere Punktmutationen, d.h. Substitutionen einer natürlicherweise an der entsprechenden Position vorkommenden Aminosäure durch eine andere, Insertionen (Einfügen von einer oder mehreren Aminosäuren) und/oder Deletionen (Entfernen von einer oder mehreren Aminosäuren) aufweisen, insbesondere eine oder mehrere Punktmutationen. Derartige Varianten haben vorzugsweise mindestens 50, vorzugsweise 60 oder mehr, noch bevorzugter 70, 80, 90, 100 % oder mehr der Enzymaktivität der Referenzform. In verschiedenen Ausführungsformen hat eine derartige Variante eine Aminosäuresequenz, die zu der als Referenz dienenden Sequenz über deren Gesamtlänge zu mindestens 70, vorzugsweise 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, oder 99 % identisch ist. Die Varianten haben vorzugsweise dieselbe Länge wie die Referenzsequenz. Varianten können sich gegenüber

der Referenzform durch verbesserte Eigenschaften auszeichnen, wie beispielsweise höhere Enzymaktivität, höhere Stabilität, geänderte Substratspezifität, etc..

Die Bestimmung der Identität von Nukleinsäure- oder Aminosäuresequenzen erfolgt durch einen Sequenzvergleich. Dieser Sequenzvergleich basiert auf dem im Stand der Technik etablierten und üblicherweise genutzten BLAST-Algorithmus (vgl. beispielsweise Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) "Basic local alignment search tool." J. Mol. Biol. 215:403-410, und Altschul, Stephan F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Hheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997): "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs"; Nucleic Acids Res., 25, S.3389-3402) und geschieht prinzipiell dadurch, dass ähnliche Abfolgen von Nukleotiden oder Aminosäuren in den Nukleinsäure- oder Aminosäuresequenzen einander zugeordnet werden. Eine tabellarische Zuordnung der betreffenden Positionen wird als Alignment bezeichnet. Ein weiterer im Stand der Technik verfügbarer Algorithmus ist der FASTA-Algorithmus.

Solch ein Vergleich erlaubt auch eine Aussage über die Ähnlichkeit der verglichenen Sequenzen zueinander. Sie wird üblicherweise in Prozent Identität, das heißt dem Anteil der identischen Nukleotide oder Aminosäurereste an denselben oder in einem Alignment einander entsprechenden Positionen angegeben. Der weiter gefasste Begriff der Homologie bezieht bei Aminosäuresequenzen konservierte Aminosäure-Austausche in die Betrachtung mit ein, also Aminosäuren mit ähnlicher chemischer Aktivität, da diese innerhalb des Proteins meist ähnliche chemische Aktivitäten ausüben. Daher kann die Ähnlichkeit der verglichenen Sequenzen auch Prozent Homologie oder Prozent Ähnlichkeit angegeben sein. Identitäts- und/oder Homologieangaben können über ganze Polypeptide oder Gene oder nur über einzelne Bereiche getroffen werden. Homologe oder identische Bereiche von verschiedenen Nukleinsäure- oder Aminosäuresequenzen sind daher durch Übereinstimmungen in den Sequenzen definiert. Solche Bereiche weisen oftmals identische Funktionen auf. Sie können klein sein und nur wenige Nukleotide oder Aminosäuren umfassen. Oftmals üben solche kleinen Bereiche für die Gesamtaktivität des Proteins essentielle Funktionen aus. Es kann daher sinnvoll sein, Sequenzübereinstimmungen nur auf einzelne, gegebenenfalls kleine Bereiche zu beziehen. Soweit nicht anders angegeben beziehen sich Identitäts- oder Homologieangaben in der vorliegenden Anmeldung aber auf die Gesamtlänge der jeweils angegebenen Nukleinsäure- oder Aminosäuresequenz.

„Funktionale Fragmente“, wie hierin verwendet, bezieht sich auf enzymatisch aktive Polypeptide, die im Vergleich zu der als Referenz dienenden Sequenz N- und/oder C-terminal um mindestens eine, vorzugsweise zwei oder mehr Aminosäuren verkürzt sind. Die Aktivität solcher Fragmente beträgt mindestens 50 %, vorzugsweise mindestens 60, 70, 80, 90, 95 oder 100 % der Aktivität des Referenzzyms.

Im Allgemeinen kann die Messung der Enzymaktivität - abgestimmt auf den jeweiligen Enzymtyp - in fachüblicher Art und Weise erfolgen. Methoden zur Aktivitätsbestimmung sind dem Fachmann auf dem Gebiet der Enzymtechnologie geläufig und werden von ihm routinemäßig angewendet. Verfahren zur Bestimmung der Proteaseaktivität sind beispielsweise offenbart in Tenside, Band 7 (1970), S. 125-132. Die proteolytische Aktivität kann ferner bestimmt werden über die Freisetzung des Chromophors para-Nitroanilin (pNA) aus dem Substrat suc-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Phe-p- Nitroanilid (suc-AAPF-pNA). Die Protease spaltet das Substrat und setzt pNA frei. Die Freisetzung des pNA verursacht eine Zunahme der Extinktion bei 410 nm, deren zeitlicher Verlauf ein Maß für die enzymatische Aktivität ist (vgl. Del Mar et al., 1979). Die Messung kann bei einer Temperatur von 25°C, bei pH 8,6 und einer Wellenlänge von 410 nm erfolgen. Die Messzeit kann 5 min. betragen bei einem Messintervall von 20s bis 60s.

In den hierin beschriebenen Mitteln können die einzusetzenden Enzyme ferner zusammen mit Begleitstoffen, etwa aus der Fermentation, konfektioniert sein. In flüssigen Formulierungen werden die Enzyme bevorzugt als Enzymflüssigformulierung(en) eingesetzt.

Die Proteasen werden in der Regel nicht in Form des reinen Proteins sondern vielmehr in Form stabilisierter, lager- und transportfähiger Zubereitungen bereitgestellt. Zu diesen vorkonfektionierten Zubereitungen zählen beispielsweise die durch Granulation, Extrusion oder Lyophilisierung erhaltenen festen Präparationen oder, insbesondere bei flüssigen oder gelförmigen Mitteln, Lösungen der Enzyme, vorteilhafterweise möglichst konzentriert, wasserarm und/oder mit Stabilisatoren oder weiteren Hilfsmitteln versetzt.

Alternativ können die Enzyme sowohl für die feste als auch für die flüssige Darreichungsform verkapselt werden, beispielsweise durch Sprühtrocknung oder Extrusion der Enzymlösung zusammen mit einem vorzugsweise natürlichen Polymer oder in Form von Kapseln, beispielsweise solchen, bei denen die Enzyme wie in einem erstarrten Gel eingeschlossen sind oder in solchen vom Kern-Schale-Typ, bei dem ein enzymhaltiger Kern mit einer Wasser-, Luft- und/oder Chemikalien- undurchlässigen Schutzschicht überzogen ist. In aufgelagerten Schichten können zusätzlich weitere Wirkstoffe, beispielsweise Stabilisatoren, Emulgatoren, Pigmente, Bleich- oder Farbstoffe aufgebracht werden. Derartige Kapseln werden nach an sich bekannten Methoden, beispielsweise durch Schüttel- oder Rollgranulation oder in Fluid-bed-Prozessen aufgebracht. Vorteilhafterweise sind derartige Granulate, beispielsweise durch Aufbringen polymerer Filmbildner, staubarm und aufgrund der Beschichtung lagerstabil.

Weiterhin ist es möglich, zwei oder mehrere Enzyme zusammen zu konfektionieren, so dass ein einzelnes Granulat mehrere Enzymaktivitäten aufweist.

Erfindungsgemäße Mittel können neben der Protease ein oder mehrere weitere Enzyme enthalten, insbesondere aus folgender Gruppe: Amylasen, Hemicellulasen, Cellulasen, Lipasen und Oxidoreduktasen.

Bei der/den Amylase(n) handelt es sich vorzugsweise um eine  $\alpha$ -Amylase. Bei der Hemicellulase handelt es sich vorzugsweise um eine  $\beta$ -Glucanase, eine Pektinase, eine Pullulanase und/oder eine Mannanase. Bei der Cellulase handelt es sich vorzugsweise um ein Cellulase-Gemisch oder eine Einkomponenten-Cellulase, vorzugsweise bzw. überwiegend um eine Endoglucanase und/oder eine Cellobiohydrolase. Bei der Oxidoreduktase handelt es sich vorzugsweise um eine Oxidase, insbesondere eine Cholin-Oxidase, oder um eine Perhydrolase.

Die hierin beschriebenen Mittel umfassen alle denkbaren Wasch- oder Reinigungsmittelarten, sowohl Konzentrate als auch unverdünnt anzuwendende Mittel, zum Einsatz im kommerziellen Maßstab, in der Waschmaschine oder bei der Handwäsche beziehungsweise -reinigung. Dazu gehören beispielsweise Waschmittel für Textilien, Teppiche, oder Naturfasern, für die die Bezeichnung Waschmittel verwendet wird. Dazu gehören beispielsweise auch Geschirrspülmittel für Geschirrspülmaschinen oder manuelle Geschirrspülmittel oder Reiniger für harte Oberflächen wie Metall, Glas, Porzellan, Keramik, Kacheln, Stein, lackierte Oberflächen, Kunststoffe, Holz oder Leder, für die die Bezeichnung Reinigungsmittel verwendet wird, also neben manuellen und maschinellen Geschirrspülmitteln beispielsweise auch Scheuermittel, Glasreiniger, WC-Duftspüler, usw. Zu den Wasch- und Reinigungsmittel im Rahmen der Erfindung zählen ferner Waschhilfsmittel, die bei der manuellen oder maschinellen Textilwäsche zum eigentlichen Waschmittel hinzudosiert werden, um eine weitere Wirkung zu erzielen. Ferner zählen zu Wasch- und Reinigungsmittel im Rahmen der Erfindung auch Textilvor- und Nachbehandlungsmittel, also solche Mittel, mit denen das Wäschestück vor der eigentlichen Wäsche in Kontakt gebracht wird, beispielsweise zum Anlösen hartnäckiger Verschmutzungen, und auch solche Mittel, die in einem der eigentlichen Textilwäsche nachgeschalteten Schritt dem Waschgut weitere wünschenswerte Eigenschaften wie angenehmen Griff, Knitterfreiheit oder geringe statische Aufladung verleihen. Zu letztgenannten Mittel werden u.a. die Weichspüler gerechnet.

Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung umfassen alle festen, pulverförmigen, flüssigen, gelförmigen oder pastösen Darreichungsformen hierin beschriebener Mittel, die gegebenenfalls auch aus mehreren Phasen bestehen können sowie in komprimierter oder nicht komprimierter Form vorliegen können. Das Mittel kann als rieselfähiges Pulver vorliegen, insbesondere mit einem Schüttgewicht von 300 g/l bis 1200 g/l, insbesondere 500 g/l bis 900 g/l oder 600 g/l bis 850 g/l. Zu den festen Darreichungsformen des Mittels zählen ferner Extrudate, Granulate, Tabletten oder Pouches. Alternativ kann das Mittel auch flüssig, gelförmig oder pastös sein, beispielsweise in Form eines nicht-wässrigen Flüssigwasch- oder -geschirrspülmittels oder einer nicht-wässrigen Paste oder in Form eines wässrigen Flüssigwasch- oder -geschirrspülmittels oder einer wasserhal-

tigen Paste. Weiterhin kann das Mittel als Einkomponentensystem vorliegen. Solche Mittel bestehen aus einer Phase. Alternativ kann ein Mittel auch aus mehreren Phasen bestehen. Ein solches Mittel ist demnach in mehrere Komponenten aufgeteilt.

Die hierin beschriebenen Wasch- oder Reinigungsmittel, die als pulverförmige Feststoffe, in nachverdichteter Teilchenform, als homogene Lösungen oder Suspensionen vorliegen können, können ferner zusätzlich alle bekannten und in derartigen Mitteln üblichen Inhaltsstoffe enthalten, wobei bevorzugt mindestens ein weiterer Inhaltsstoff in dem Mittel vorhanden ist. Die hierin beschriebenen Mittel können insbesondere Tenside, Builder (Gerüststoffe), Bleichmittel oder Bleichaktivatoren enthalten. Ferner können sie wassermischbare organische Lösungsmittel, Sequestrierungsmittel, Elektrolyte, pH-Regulatoren und/oder weitere Hilfsstoffe wie optische Aufheller, Vergrauungsinhibitoren, Schaumregulatoren sowie Farb- und Duftstoffe sowie Kombinationen hiervon enthalten.

Vorteilhafte Inhaltsstoffe hierin beschriebener Mittel sind offenbart in der internationalen Patentanmeldung WO2009/121725, dort beginnend auf Seite 5, vorletzter Absatz, und endend auf Seite 13 nach dem zweiten Absatz. Beispielhafte Formulierungen von Wasch- oder Reinigungsmitteln, die die hierin beschriebene Protease, Enzymstabilisator und Salz enthalten können, sind in den Patentschriften US6165966, Beispiel 1, 2 und 3; WO2009118375, Beispiel 1 und WO2013004636, Tabelle 1 und 3 offenbart. Auf diese Offenbarung wird ausdrücklich Bezug genommen und der dortige Offenbarungsgehalt in die vorliegende Patentanmeldung einbezogen.

Ein weiterer Erfindungsgegenstand ist ein Verfahren zur Reinigung von Textilien oder harten Oberflächen, das dadurch gekennzeichnet ist, dass in mindestens einem Verfahrensschritt ein hierin beschriebenes Mittel angewendet wird.

Hierunter fallen sowohl manuelle als auch maschinelle Verfahren, wobei maschinelle Verfahren bevorzugt sind. Verfahren zur Reinigung von Textilien zeichnen sich im allgemeinen dadurch aus, dass in mehreren Verfahrensschritten verschiedene reinigungsaktive Substanzen auf das Reinigungsgut aufgebracht und nach der Einwirkzeit abgewaschen werden, oder dass das Reinigungsgut in sonstiger Weise mit einem Waschmittel oder einer Lösung oder Verdünnung dieses Mittels behandelt wird. Entsprechendes gilt für Verfahren zur Reinigung von allen anderen Materialien als Textilien, insbesondere von harten Oberflächen. Alle denkbaren Wasch- oder Reinigungsverfahren können in wenigstens einem der Verfahrensschritte um die Anwendung eines hierin beschriebenen Wasch- oder Reinigungsmittels bereichert werden und stellen dann Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung dar.

Ein weiterer Erfindungsgegenstand ist die Verwendung eines hierin beschriebenen Mittels zur Reinigung oder zum Waschen von Textilien oder zur Reinigung von harten Oberflächen.

Alle Sachverhalte, Gegenstände und Ausführungsformen, die für hierin beschriebene Mittel beschrieben sind, sind auch auf die vorstehend genannten Verfahren und Verwendungen anwendbar. Daher wird an dieser Stelle ausdrücklich auf die Offenbarung an entsprechender Stelle verwiesen mit dem Hinweis, dass diese Offenbarung auch für die vorstehenden beschriebenen Verfahren und Verwendungen gilt.

Beispiele

Beispiel 1:

Verwendeter Peptid-Stabilisator:

Als Peptid-Stabilisator/Peptid-Inhibitor (PI) wird das Peptid Methoxycarbonyl-Val-Ala-Leu-Aldehyd verwendet, das von der Firma Bachem (Bubendor, Schweiz) synthetisiert wurde.

Enzym-Kinetik-Assay mit dem Substrat AAPF:

Die proteolytische Aktivität wurde über die Freisetzung des Chromophors para-Nitroanilin (pNA) aus dem Substrat suc-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Phe-p-Nitroanilid (suc-AAPF-pNA) bestimmt. Die Protease spaltet das Substrat und setzt pNA frei. Die Freisetzung des pNA verursacht eine Zunahme der Extinktion bei 410 nm, deren zeitlicher Verlauf ein Maß für die enzymatische Aktivität ist (vgl. Del Mar et al., 1979). Die Messung erfolgt bei einer Temperatur von 25°C, bei pH 8,6 und einer Wellenlänge von 410 nm. Die Messzeit beträgt 5 min. bei einem Messintervall von 20s bis 60s.

Ergebnisse zur Protease-Stabilisator-Leistung:

Die stabilisierende Wirkung des Peptid-Stabilisators/Peptid-Inhibitors wurde im Vergleich zu der Wirkung von Na-Borat bei verschiedenen Konzentrationen gemessen (durch inkubieren der Formulierung bei 30 ° C für die angegebene Anzahl von Tagen):

<b>Inkubationszeit (in Tagen)</b>	7	14	28	42
	% RA	% RA	% RA	% RA
1% Protease gem. SEQ ID NO:1 mit:				
1% Borat	90	90	84	86
0,1 mM PI	89	84	80	80
0,5 mM PI	91	83	78	80
1% Protease gem. SEQ ID NO:2 mit:				
1% Borat		95		
0,1 mM PI		91		
1% Protease gem. SEQ ID NO:3 mit:				
1% Borat	90			
0,1 mM PI	87			
0,5 mM PI	84			

Wie oben zu erkennen ist, ist die Lagerstabilität der Proteasen durch den Wechsel von Borsäure auf den Peptid-Inhibitor (PI) herabgesetzt.

Um die Wirkung des Modellsalzes ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) auf den Peptid-Inhibitor (Stabilisator) zu testen, wurden die jeweiligen Proteasen (SEQ ID Nos. 1-3) mit Borat oder mit dem Peptidinhibitor gelagert, wobei die Lagerung mit Peptidinhibitor zusätzlich unter Verwendung des Modellsalzes stattfand.

Die relative Stabilität des Enzyms in beiden Ansätzen (1. mit Peptidinhibitor; 2. Mit Peptidinhibitor und Salz) wurde in Bezug auf die Stabilität mit Borat berechnet.

Inkubationszeit (in Tagen)	7	14	28	42
	% RA	% RA	% RA	% RA
1% Protease gem. SEQ ID NO:1 mit:				
0,1 mM PI	99	93	96	93
0,5 mM PI	101	93	94	93
200 mM $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 0,1 mM PI	108	103	110	121
200 mM $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 0,5 mM PI	120	114	118	130
1% Protease gem. SEQ ID NO:2 mit:				
0,1 mM PI	96	96	99	
200 mM $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 0,1 mM PI	94	100	102	
1% Protease gem. SEQ ID NO:3 mit:				
0,5 mM PI	93			
200 mM $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 0,5 mM PI	113			

Wie oben zu erkennen ist, bewirkt die Zugabe von Salz eine erhöhte Stabilität des Enzyms in der Gegenwart des Peptid-Inhibitor auf einen Wert, der sogar über dem beobachteten mit Stabilisierung durch Borat liegt.

#### Beispiel 2:

##### Beispielhafte Waschmittel-Formulierungen:

Die unten angegebenen Formulierungen können, falls nicht angegeben, mit einer Protease, einem Enzymstabilisator und einem Salz, wie oben beschrieben, ergänzt werden.

(A)

	Gew.-% Reinsubstanz
Verdicker	0,3-0,5
Anti-Schaummittel	0,2-0,4
Glycerin	1-7
Ethanol	1-7
Anionische Tenside	1-10
Nichtionische Tenside	0-20
Fettsäuren	0-10
Natriumcitrat (Dihydrat)	0,5-4
Soda	0,5-4
HEDP	0,5-4
PVP	0,1-4
Optische Aufheller	0-2
Farbstoff	0-0,0001
Wasser	Rest

(B)

	A	B	C	D	E	F	G	H
C9-13-Alkylbenzolsulfonat, Na-Salz	9	10	6	7	5	15	15	9
C12-18-Fettalkohol mit 7 EO	8	9	6	7	5	6	11	10
C12-18-Fettalkoholsulfat mit 2 EO	-	-	8	7	10	2	2	5
C12-18-Fettsäure, Na-Salz	4	3	3	3	4	2	4	7
Zitronensäure	2	3	3	2	2	2	2	3
Natriumhydroxid, 50%	3	3	2	3	3	3	3	4
Enzyme (Amylase, Protease, Cellulase)	+	+	+	+	+	+	+	+
Parfüm	1	0,5	0,5	1	1	1	1	1
Propandiol	-	-	-	-	-	5	5	-
Ethanol	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	5
PVA/Maleinsäure-Copolymer	0,1	-	0,1	-	-	-	-	-
Optischer Aufheller	-	0,1	-	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2
Trübungsmittel	0,2	-	-	-	-	-	-	-
Phosphonsäure, Na-Salz	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Polymer	2	2	2	2	2	2	2	2
Wasser	auf 100							

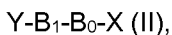
## Patentansprüche

1. Wasch- oder Reinigungsmittel, bevorzugt ein Flüssigwaschmittel, enthaltend
- (A) mindestens eine Protease;
- (B) mindestens einen Enzymstabilisator, wobei der mindestens eine Enzymstabilisator ausgewählt wird aus Verbindungen
- (I) der allgemeinen Strukturformel (I)



wobei A ein Aminosäurerest ist; X Wasserstoff ist; Z ein N-Verkappingsrest ausgewählt aus Phosphoramidat [(R'O)<sub>2</sub>(O)P-], Sulfenamid [(SR')<sub>2</sub>-], Sulfonamid [(R'(O)<sub>2</sub>S-], Sulfonsäure [SO<sub>3</sub>H], Phosphinamid [(R')<sub>2</sub>(O)P-], Sulfamoyl Derivaten [R'O(O)<sub>2</sub>S-], Thioharnstoff [(R')<sub>2</sub>N(O)C-], Thiocarbamat [R'O(S)C-], Phosphonat [R'-P(O)OH], Amidophosphat [R'O(OH)(O)P-], Carbamat (R'O(O)C-) und Harnstoff (R'NH(O)C-) ist, wobei jedes R' unabhängig ausgewählt wird aus geradkettigen oder verzweigten C1-C6 unsubstituierten Alkyl-, Phenyl-, C7-C9 Alkylaryl- und Cycloalkyl-Resten, wobei der Cycloalkylring ein C4-C8 Cycloalkylring sein kann und ein oder mehrere Heteroatome enthalten kann, die ausgewählt werden aus O, N, und S; und R ausgewählt wird aus geradkettigen oder verzweigten C1-C6 unsubstituierten Alkyl-, Phenyl und C7-C9 Alkylarylresten; und Stereoisomeren, Tautomeren und Salzen davon; oder

(II) der allgemeinen Strukturformel (II)



wobei X Wasserstoff ist; B<sub>1</sub> ein einzelner D- oder L-Aminosäurerest ist; B<sub>0</sub> ein Aminosäurerest ist und Y aus einem oder mehreren, bevorzugt ein oder zwei, Aminosäureresten und optional aus einem N-Verkappingsrest besteht, wobei der N-Verkappingsrest wie unter (I) definiert ist; und

(C) mindestens ein Salz der allgemeinen Strukturformel (III)

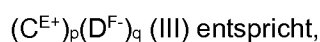
(C<sup>E+</sup>)<sub>p</sub>(D<sup>F-</sup>)<sub>q</sub> (III) entspricht,

wobei C ein Kation ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Al<sup>3+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Li<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>, NR''<sub>4</sub><sup>+</sup> und Na<sup>+</sup> ist, wobei jedes R'' unabhängig voneinander für H oder eine lineare oder verzweigte, substituierte oder unsubstituierte Alkyl-, Aryl- oder Alkenylgruppe steht, die alle optional ein oder mehrere Heteroatom(e) enthalten können; E eine ganze Zahl von 1 bis 3 ist und der Valenz des Kations entspricht; p der Anzahl an Kationen im Salz entspricht; D ein Anion ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, Cl<sup>-</sup>, C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>O(COO)<sub>3</sub><sup>3-</sup>, HCOO<sup>-</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, HSO<sub>4</sub><sup>-</sup>, C<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>2-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> und SO<sub>3</sub><sup>2-</sup> ist; F eine ganze Zahl von

1 bis 3 ist und der Valenz des Anions entspricht; q der Anzahl an Anionen im Salz entspricht; wobei die Nettoladung des Salzes 0 ist.

2. Wasch- oder Reinigungsmittel nach Anspruch 1, wobei
  - (A) das Wasch- oder Reinigungsmittel das Salz nach Strukturformel (III) in einer Konzentration von 50-2000 mM, bevorzugt in einer Konzentration von 200 mM, enthält;
  - (B) das Wasch- oder Reinigungsmittel den Enzymstabilisator nach Strukturformel (I) und/oder (II) in einer Konzentration von 0,01-50 mM, bevorzugt in einer Konzentration von 0,1-0,5 mM, enthält; und/oder
  - (C) das Salz nach Strukturformel (III)  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ist.
  
3. Wasch- oder Reinigungsmittel nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass
  - (A) A ausgewählt ist aus Ala, Gly, Val, Ile, Leu, Phe und Lys;
  - (B) R ausgewählt ist aus Methyl, iso-Propyl, sec-Butyl, iso-Butyl,  $-\text{C}_6\text{H}_5$ ,  $-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$ , und  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$ ; und/oder
  - (C) Z ausgewählt ist aus Methyl-, Ethyl- oder Benzylcarbamatgruppen  $[\text{CH}_3\text{O}-(\text{O})\text{C}-$ ;  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}-(\text{O})\text{C}-$ ; oder  $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{O}-(\text{O})\text{C}-$ ], Methyl-, Ethyl- oder Benzylharnstoffgruppen  $[\text{CH}_3\text{NH}-(\text{O})\text{C}-$ ;  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NH}-(\text{O})\text{C}-$ ; oder  $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{NH}-(\text{O})\text{C}-$ ], Methyl-, Ethyl- oder Benzylsulfonamidgruppen  $[\text{CH}_3\text{SO}_2-$ ;  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{SO}_2-$ ; oder  $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{SO}_2-$ ], und eine Methyl-, Ethyl oder Benzylamidophosphatgruppen  $[\text{CH}_3\text{O}(\text{OH})(\text{O})\text{P}-$ ;  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}(\text{OH})(\text{O})\text{P}-$ ; oder  $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{O}(\text{OH})(\text{O})\text{P}-$ ].
  
4. Wasch- oder Reinigungsmittel nach einem der Ansprüche 1-3, dadurch gekennzeichnet, dass
  - (A)  $\text{B}_0$  ein D- oder L-Aminosäurerest ist, ausgewählt aus Tyr, m-Tyrosin, 3,4-Dihydroxyphenylalanin, Phe, Val, Met, Nva, Leu, Ile und Nle;
  - (B)  $\text{B}_1$  ein Aminosäurerest mit einer (optional substituierten) kleinen aliphatischen Seitengruppe, bevorzugt Ala, Cys, Gly, Pro, Ser, Thr, Val, Nva oder Nle ist.
  
5. Wasch- oder Reinigungsmittel nach einem der Ansprüche 1-4, dadurch gekennzeichnet, dass Y  $\text{B}_2$ ,  $\text{B}_3-\text{B}_2$ , Z- $\text{B}_2$ , Z- $\text{B}_3-\text{B}_2$  ist, wobei  $\text{B}_2$  und  $\text{B}_3$  jeweils unabhängig voneinander ein Aminosäurerest sind und Z ein N-Verkappingsrest ist, wobei der N-Verkappingsrest wie in Anspruch 1 unter (I) definiert ist.
  
6. Wasch- oder Reinigungsmittel nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass
  - (A)  $\text{B}_2$  ausgewählt ist aus Val, Gly, Ala, Arg, Leu, Phe und Thr, und/oder
  - (B)  $\text{B}_3$  ausgewählt ist aus Phe, Tyr, Trp, Phe-nylglycin, Leu, Val, Nva, Nle und lie.

7. Wasch- oder Reinigungsmittel nach einem der Ansprüche 1-6, dadurch gekennzeichnet, dass der mindestens eine Enzymstabilisator ausgewählt wird aus Cbz-Arg-Ala-Tyr-H, Ac-Gly-Ala-Tyr-H, Cbz-Gly-Ala-Tyr-H, Cbz-Gly-Ala-Tyr-H, Cbz-Val-Ala-Tyr-H, Cbz-Gly-Ala-Phe-H, Cbz-Gly-Ala-Val-H, Cbz-Gly-Gly-Tyr-H, Cbz-Gly-Gly-Phe-H, Cbz-Arg-Val-Tyr-H, Cbz-Leu-Val-Tyr-H, Ac-Leu-Gly-Ala-Tyr-H, Ac-Phe-Gly-Ala-Tyr-H, Ac-Tyr-Gly-Ala-Tyr-H, Ac-Phe-Gly-Ala-Leu-H, Ac-Phe-Gly-Ala-Phe-H, Ac-Phe-Gly-Val-Tyr-H, Ac-Phe-Gly-Ala-Met-H, Ac-Trp-Leu-Val-Tyr-H, MeO-CO-Val-Ala-Leu-H, MeNCO-Val-Ala-Leu-H, MeO-CO-Phe-Gly-Ala-Leu-H, MeO-CO-Phe-Gly-Ala-Phe-H, MeSO<sub>2</sub>-Phe-Gly-Ala-Leu-H, MeSO<sub>2</sub>-Val-Ala-Leu-H, PhCH<sub>2</sub>O(OH)(O)P-Val-Ala-Leu-H, EtSO<sub>2</sub>-Phe-Gly-Ala-Leu-H, PhCH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>-Val-Ala-Leu-H, PhCH<sub>2</sub>O(OH)(O)P-Leu-Ala-Leu-H, PhCH<sub>2</sub>O(OH)(O)P-Phe-Ala-Leu-H, MeO(OH)(O)P-Leu-Gly-Ala-Leu-H, α-MAPI, β-MAPI, Phe-urea-Arg-Val-Tyr-H, Phe-urea-Gly-Gly-Tyr-H, Phe-urea-Gly-Ala-Phe-H, Phe-urea-Gly-Ala-Tyr-H, Phe-urea-Gly-Ala-Leu-H, Phe-urea-Gly-Ala-Nva-H, Phe-urea-Gly-Ala-Nle-H, Tyr-urea-Arg-Val-Tyr-H, Tyr-urea-Gly-Ala-Tyr-H, Phe-Cys-Ser-Arg-Val-Phe-H, Phe-Cys-Ser-Arg-Val-Tyr-H, Phe-Cys-Ser-Gly-Ala-Tyr-H, Antipain, GE20372A, GE20372B, Chymostatin A, Chymostatin B und Chymostatin C.
8. Wasch- oder Reinigungsmittel nach einem der Ansprüche 1-7, dadurch gekennzeichnet, dass die mindestens eine Protease in einer Menge von 0,05-5 Gew.-%, vorzugsweise 0,05-2 Gew.-%, und der mindestens eine Enzymstabilisator in einer Menge von 0,05-15 Gew.-%, vorzugsweise zu 0,05-5 Gew.-%, bezogen auf das Gesamtgewicht des Wasch- oder Reinigungsmittels in diesem enthalten sind.
9. Verwendung eines Wasch- oder Reinigungsmittels nach einem der Ansprüche 1-8 zum Waschen von Textilien oder Reinigen von festen Oberflächen.
10. Verfahren zur Reinigung von Textilien oder harten Oberflächen, dadurch gekennzeichnet, dass in mindestens einem Verfahrensschritt ein Wasch- oder Reinigungsmittel nach einem der Ansprüche 1-8 angewendet wird.
11. Verwendung eines Salzes zur Erhöhung der Wirkung eines Peptidstabilisators in einem Protease-haltigen Wasch- oder Reinigungsmittel, wobei das Salz der allgemeinen Strukturformel (III)



wobei C ein Kation ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Al<sup>3+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Li<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>, NR<sup>n</sup><sub>4</sub><sup>+</sup> und Na<sup>+</sup> ist, wobei jedes R<sup>n</sup> unabhängig voneinander für H oder eine lineare oder verzweigte, substituierte oder unsubstituierte Alkyl-, Aryl- oder Alkenylgruppe steht, die alle optional ein oder mehrere Heteroatom(e) enthalten können; E eine ganze Zahl von 1 bis 3 ist und der Valenz des Kations entspricht; p der Anzahl an Kationen im Salz ent-

spricht; D ein Anion ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{COO})_3^{3-}$ ,  $\text{HCOO}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{HSO}_4^-$ ,  $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  und  $\text{SO}_3^{2-}$  ist; F eine ganze Zahl von 1 bis 3 ist und der Valenz des Anions entspricht; q der Anzahl an Anionen im Salz entspricht; wobei die Nettoladung des Salzes 0 ist.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No  
PCT/EP2017/063000

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
 INV. C11D3/386 C11D3/04 C07K5/00 C11D3/20 C12N9/96  
 ADD.  
 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)  
 C11D C07K C12N

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 practicable, 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.
X	WO 2013/004635 A1 (NOVOZYMES A/S) 10 January 2013 (2013-01-10) page 1, line 28 - line 35; claims; examples	1-11
X	WO 2009/118375 A2 (NOVOZYMES AS) 1 October 2009 (2009-10-01) cited in the application	1-10
Y	claims; examples	11
X	WO 2007/141736 A2 (PROCTER & GAMBLE) 13 December 2007 (2007-12-13)	1-10
Y	claims; examples	11
X	WO 98/13459 A1 (PROCTER & GAMBLE) 2 April 1998 (1998-04-02) claims; examples	1-11
	----- -/--	

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 application or patent 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
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  6 September 2017	Date of mailing of the international search report  21/09/2017
---	--

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2017/063000

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98/13460 A1 (PROCTER & GAMBLE) 2 April 1998 (1998-04-02)	1-10
Y	claims; examples -----	11
X	WO 2007/145963 A2 (PROCTER & GAMBLE; SAUNDERS CHARLIE WINSTON) 21 December 2007 (2007-12-21)	1-10
Y	claims; examples -----	11
Y	DE 10 2013 202450 A1 (HENKEL AG & CO KGAA) 14 August 2014 (2014-08-14) paragraphs [0008] - [0010]; examples -----	11
Y	EP 2 285 944 B1 (NOVOZYMES AS) 13 March 2013 (2013-03-13) claim 1; examples -----	11
Y	US 2007/179071 A1 (THOELE MELTON S) 2 August 2007 (2007-08-02) paragraphs [0049], [0050]; claims; examples -----	11

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2017/063000

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 2013004635	A1	10-01-2013	BR 112013033816 A2	14-02-2017
			CN 103649289 A	19-03-2014
			EP 2726590 A1	07-05-2014
			JP 2014518304 A	28-07-2014
			US 2014228274 A1	14-08-2014
			WO 2013004635 A1	10-01-2013
WO 2009118375	A2	01-10-2009	BR PI0909084 A2	11-08-2015
			CN 101981049 A	23-02-2011
			CN 107090014 A	25-08-2017
			EP 2271660 A2	12-01-2011
			JP 5973166 B2	23-08-2016
			JP 2011515449 A	19-05-2011
			JP 2015180736 A	15-10-2015
			RU 2010143597 A	10-05-2012
			RU 2013156600 A	27-06-2015
			US 2011039752 A1	17-02-2011
			WO 2009118375 A2	01-10-2009
WO 2007141736	A2	13-12-2007	BR PI0712344 A2	31-01-2012
			CA 2654310 A1	13-12-2007
			EP 2049641 A2	22-04-2009
			JP 2009540042 A	19-11-2009
			US 2008004200 A1	03-01-2008
			WO 2007141736 A2	13-12-2007
WO 9813459	A1	02-04-1998	AR 009816 A1	03-05-2000
			AT 227769 T	15-11-2002
			CA 2266527 A1	02-04-1998
			CN 1238001 A	08-12-1999
			DE 69717133 D1	19-12-2002
			DE 69717133 T2	10-07-2003
			EP 0929639 A1	21-07-1999
			JP 2000506930 A	06-06-2000
			WO 9813459 A1	02-04-1998
WO 9813460	A1	02-04-1998	AR 009815 A1	03-05-2000
			BR 9712111 A	31-08-1999
			CA 2266497 A1	02-04-1998
			CN 1238004 A	08-12-1999
			EP 0929640 A1	21-07-1999
			JP 2000506931 A	06-06-2000
			JP 2001187798 A	10-07-2001
			US 6162783 A	19-12-2000
			WO 9813460 A1	02-04-1998
WO 2007145963	A2	21-12-2007	BR PI0712113 A2	31-01-2012
			CA 2652792 A1	21-12-2007
			EP 2038393 A2	25-03-2009
			JP 2009537665 A	29-10-2009
			US 2008009431 A1	10-01-2008
			WO 2007145963 A2	21-12-2007
DE 102013202450	A1	14-08-2014	DE 102013202450 A1	14-08-2014
			EP 2956533 A1	23-12-2015
			WO 2014124948 A1	21-08-2014
EP 2285944	B1	13-03-2013	EP 2285944 A1	23-02-2011

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2017/063000

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		US 2011015110 A1	20-01-2011
		WO 2009140481 A1	19-11-2009
-----			
US 2007179071 A1	02-08-2007	US 2007179071 A1	02-08-2007
		WO 2008121115 A1	09-10-2008
-----			

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP2017/063000

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
 INV. C11D3/386 C11D3/04 C07K5/00 C11D3/20 C12N9/96  
 ADD.  
 Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE  
 Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole )  
 C11D C07K C12N

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.
X	WO 2013/004635 A1 (NOVOZYMES A/S) 10. Januar 2013 (2013-01-10) Seite 1, Zeile 28 - Zeile 35; Ansprüche; Beispiele	1-11
X	WO 2009/118375 A2 (NOVOZYMES AS) 1. Oktober 2009 (2009-10-01) in der Anmeldung erwähnt	1-10
Y	Ansprüche; Beispiele	11
X	WO 2007/141736 A2 (PROCTER & GAMBLE) 13. Dezember 2007 (2007-12-13)	1-10
Y	Ansprüche; Beispiele	11
X	WO 98/13459 A1 (PROCTER & GAMBLE) 2. April 1998 (1998-04-02) Ansprüche; Beispiele	1-11
	----- -/--	

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" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. 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 Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absenddatum des internationalen Recherchenberichts
6. September 2017	21/09/2017

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter  Hillebrecht, Dieter
--	--

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 98/13460 A1 (PROCTER & GAMBLE) 2. April 1998 (1998-04-02)	1-10
Y	Ansprüche; Beispiele -----	11
X	WO 2007/145963 A2 (PROCTER & GAMBLE; SAUNDERS CHARLIE WINSTON) 21. Dezember 2007 (2007-12-21)	1-10
Y	Ansprüche; Beispiele -----	11
Y	DE 10 2013 202450 A1 (HENKEL AG & CO KGAA) 14. August 2014 (2014-08-14) Absätze [0008] - [0010]; Beispiele -----	11
Y	EP 2 285 944 B1 (NOVOZYMES AS) 13. März 2013 (2013-03-13) Anspruch 1; Beispiele -----	11
Y	US 2007/179071 A1 (THOELE MELTON S) 2. August 2007 (2007-08-02) Absätze [0049], [0050]; Ansprüche; Beispiele -----	11

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2017/063000

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung		
WO 2013004635 A1	10-01-2013	BR 112013033816 A2	14-02-2017		
		CN 103649289 A	19-03-2014		
		EP 2726590 A1	07-05-2014		
		JP 2014518304 A	28-07-2014		
		US 2014228274 A1	14-08-2014		
		WO 2013004635 A1	10-01-2013		
		WO 2009118375 A2	01-10-2009	BR PI0909084 A2	11-08-2015
CN 101981049 A	23-02-2011				
CN 107090014 A	25-08-2017				
EP 2271660 A2	12-01-2011				
JP 5973166 B2	23-08-2016				
JP 2011515449 A	19-05-2011				
JP 2015180736 A	15-10-2015				
RU 2010143597 A	10-05-2012				
RU 2013156600 A	27-06-2015				
US 2011039752 A1	17-02-2011				
WO 2009118375 A2	01-10-2009				
WO 2007141736 A2	13-12-2007			BR PI0712344 A2	31-01-2012
				CA 2654310 A1	13-12-2007
		EP 2049641 A2	22-04-2009		
		JP 2009540042 A	19-11-2009		
		US 2008004200 A1	03-01-2008		
		WO 2007141736 A2	13-12-2007		
WO 9813459 A1	02-04-1998	AR 009816 A1	03-05-2000		
		AT 227769 T	15-11-2002		
		CA 2266527 A1	02-04-1998		
		CN 1238001 A	08-12-1999		
		DE 69717133 D1	19-12-2002		
		DE 69717133 T2	10-07-2003		
		EP 0929639 A1	21-07-1999		
		JP 2000506930 A	06-06-2000		
		WO 9813459 A1	02-04-1998		
		WO 9813460 A1	02-04-1998	AR 009815 A1	03-05-2000
BR 9712111 A	31-08-1999				
CA 2266497 A1	02-04-1998				
CN 1238004 A	08-12-1999				
EP 0929640 A1	21-07-1999				
JP 2000506931 A	06-06-2000				
JP 2001187798 A	10-07-2001				
US 6162783 A	19-12-2000				
WO 9813460 A1	02-04-1998				
WO 2007145963 A2	21-12-2007			BR PI0712113 A2	31-01-2012
		CA 2652792 A1	21-12-2007		
		EP 2038393 A2	25-03-2009		
		JP 2009537665 A	29-10-2009		
		US 2008009431 A1	10-01-2008		
		WO 2007145963 A2	21-12-2007		
DE 102013202450 A1	14-08-2014	DE 102013202450 A1	14-08-2014		
		EP 2956533 A1	23-12-2015		
		WO 2014124948 A1	21-08-2014		
EP 2285944 B1	13-03-2013	EP 2285944 A1	23-02-2011		

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2017/063000

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
		US 2011015110 A1	20-01-2011
		WO 2009140481 A1	19-11-2009
-----			
US 2007179071 A1	02-08-2007	US 2007179071 A1	02-08-2007
		WO 2008121115 A1	09-10-2008
-----			