

(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  
12. März 2009 (12.03.2009)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2009/030632 A1**

(51) Internationale Patentklassifikation:

*CIID 3/20* (2006.01) *CIID 3/386* (2006.01)  
*CIID 3/28* (2006.01)

Jägerstrasse 9b, 40231 Düsseldorf (DE). **LOWIS, Daniela**  
[DE/DE]; Kirchstr. 30, 42781 Haan (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2008/061272

(22) Internationales Anmeldedatum:  
28. August 2008 (28.08.2008)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
10 2007 041 754.5  
4. September 2007 (04.09.2007) DE

(81) **Bestimmungsstaaten** (*soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart*): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, 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, 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, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) **Anmelder** (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): **HENKEL AG & CO. KGAA** [DE/DE]; Henkelstr. 67, 40589 Düsseldorf (DE).

(72) **Erfinder; und**

(75) **Erfinder/Anmelder** (*nur für US*): **GHOSH, Robin** [DE/DE]; Remscheider Str. 22, 40215 Düsseldorf (DE). **MICHELS, Andreas** [DE/DE]; Lindemannstr. 110, 40237 Düsseldorf (DE). **BESSLER, Cornelius** [DE/DE];

**Veröffentlicht:**

— *mit internationalem Recherchenbericht*



**WO 2009/030632 A1**

(54) **Title:** POLYCYCLIC COMPOUNDS AS ENZYME STABILIZERS

(54) **Bezeichnung:** POLYCYCLISCHE VERBINDUNGEN ALS ENZYMSTABILISATOREN

(57) **Abstract:** The present invention relates to laundry and cleaning agents containing polycyclic compounds that act as protease inhibitors and are therefore suitable enzyme stabilizers.

(57) **Zusammenfassung:** Die vorliegende Erfindung betrifft Wasch- und Reinigungsmittel, enthaltend polycyclische Verbindungen, die als Proteaseinhibitoren wirken und somit geeignete Enzymstabilisatoren sind.

## Polycyclische Verbindungen als Enzymstabilisatoren

Die vorliegende Erfindung betrifft Wasch- und Reinigungsmittel, enthaltend polycyclische Verbindungen, die als Proteaseinhibitoren wirken und somit geeignete Enzymstabilisatoren sind.

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 im Laufe einer langen Lagerung immer auch ein gewisser Verlust der Proteaseaktivität sowie der Aktivitäten der anderen Enzyme einhergeht. Besonders problematisch ist dies in geförmigen oder flüssigen und insbesondere in wasserhaltigen Rezepturen, weil in diesem mit dem enthaltenen Wasser sowohl das Reaktionsmedium als auch das Hydrolyse-Reagenz zur Verfügung stehen.

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 (s.u.). Ein besonders guter Schutz ergibt sich, wenn Borsäurederivate zusammen mit Polyolen eingesetzt werden, da sie dann einen das Enzym stabilisierenden Komplex bilden können. Auch Peptid-aldehyde, 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 zugerechnet. Sie wirken als unspezifische Endopeptidasen, das heißt, sie hydrolysieren beliebige Säureamidbindungen, 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 nehmen Borsäurederivate eine herausragende Stellung ein. Als Beispiele dafür gehen aus WO 92/19707 A1 meta-substituierte Phenylboronsäuren hervor. Para-substituierte Phenylboronsäuren als Protease-Inhibitoren offenbart EP 478050 A1. Die Protease-inhibierende Wirkung von Komplexen von Borsäuren und Borsäure-Derivaten mit aromatischen Verbindungen offenbart EP 511456 A1. Protease-inhibierende Derivate von Boronsäuren und Borinsäuren, darunter auch aromatische Verbindungen, offenbart WO 95/02046 A1. WO 95/29223 A1 offenbart dieselbe Wirkung von substituierten Naphthalenboronsäuren.

Ferner sind die Anmeldungen WO 96/21716 A1 und WO 96/41859 A1 zu erwähnen.

WO 96/21716 A1 zitiert die fünf soeben zitierten Anmeldungen und offenbart, daß alle darin aufgeführten Proteaseinhibitoren auch für den speziellen Zweck geeignet sind, Enzyme in Wasch- und Reinigungsmitteln zu stabilisieren. Eine Auswahl besonders leistungsfähiger Stabilisatoren hieraus offenbart WO 96/41859 A1.

Ferner gibt es Stand der Technik zur weiteren Steigerung der Wirkung dieser Stabilisatoren. So beschreibt die Anmeldung WO 93/11215 A1 den kombinierten Einsatz von 1,2-Propandiol und Borsäure oder verschiedenen Borsäure-Derivaten zum Stabilisieren flüssiger Waschmittelrezepturen, und EP 451924 A2 offenbart flüssige Waschmittelrezepturen, die durch den kombinierten Einsatz von Hydroxypolycarboxylsäuren, Calciumsalz und speziellen Borverbindungen stabilisiert werden.

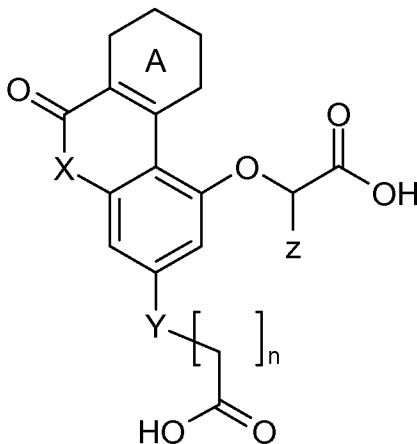
Unabhängig von ihrer stabilisierenden Wirkung weisen die Borsäurederivate jedoch einen entscheidenden Nachteil auf: Viele davon, wie beispielsweise Borat, bilden mit einigen anderen Wasch- bzw. Reinigungsmittel-inhaltsstoffen unerwünschte Nebenprodukte, so daß diese in den betreffenden Mitteln nicht mehr für den erwünschten Reinigungszweck zur Verfügung stehen oder sogar als Verunreinigung auf dem Waschgut zurückbleiben.

Es stellte sich somit die Aufgabe, borfreie chemische Verbindungen zu identifizieren, die als Proteaseinhibitoren wirken und somit als Enzymstabilisatoren 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 folgende Mittel gelöst:

Wasch- oder Reinigungsmittel, enthaltend eine Protease und eine Verbindung der allgemeinen Strukturformel:



in der

A für einen beliebigen 5- oder 6-gliedrigen, ein- oder mehrfach ungesättigten Ring steht, der gegebenenfalls auch mindestens ein Heteroatom, insbesondere ausgewählt aus O und N, enthalten kann, wobei A vorzugsweise ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Benzo-, Thiopheno-, Pyrido-, Pyrimidino-, Imidazo-, Oxazo-, Pyrrazo- und Pyrrolo-Rest,

X und Y unabhängig voneinander für O, NR<sup>1</sup> oder CR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>, vorzugsweise für O, stehen, R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> und Z unabhängig voneinander für Wasserstoff, C<sub>1-6</sub>-Alkyl, insbesondere Methyl, Ethyl, Propyl, Butyl, Pentyl oder Hexyl, C<sub>1-6</sub>-Alkenyl, insbesondere Ethenyl, Propenyl, Butenyl, Pentenyl oder Hexenyl, Phenyl, Benzyl oder Halogen, insbesondere Fluor, Chlor, Brom oder Iod, vorzugsweise für Wasserstoff, stehen, n = 1 oder 2 beträgt.

In einer bevorzugten Ausführungsform stehen

A für einen Rest ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Benzo-, Thiopheno-, Pyrido-, Pyrimidino-, Imidazo-, Oxazo-, Pyrrazo- und Pyrrolo-Rest, besonders bevorzugt für einen Benzo-, Thiopheno- oder Pyrido-Rest, vor allem für einen Benzo-Rest,

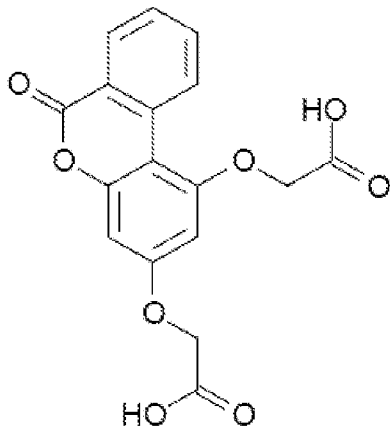
X für O oder NR<sup>1</sup>, besonders bevorzugt für O,

Y für O oder NH, besonders bevorzugt für O,

R<sup>1</sup> für Benzyl,

Z für Wasserstoff und  
n beträgt 1.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform handelt es sich um eine Verbindung der  
Strukturformel



([1-(carboxymethoxy)-6-oxo-6H-benzochromen-3-yl]oxy)acetic acid (CAS: 133540-71-3))

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. Hierfür geeignete Inhaltsstoffe werden weiter unten detailliert ausgeführt.

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 ausgeführt.

Ohne an diese Theorie gebunden sein wollen, wird erfindungsgemäß davon ausgegangen, daß die erfindungsrelevanten Verbindungen mit der erfindungsgemäß zu inhibierenden/stabilisierenden Protease einen Komplex ausbilden. Dieser sieht wahrscheinlich so aus, daß sich die erfindungsrelevante Verbindung in die Substratbindungstasche der Protease einlagert und dort nicht-kovalent gebunden wird. Auf diese Weise wird das aktive Zentrum der Protease durch eine nicht durch dieses Enzym hydrolysierbare Verbindung blockiert und steht nicht für eine Hydrolyse anderer zugewogener Proteine zur Verfügung. Hierbei handelt es sich um eine reversible Bindung, d.h. um ein Gleichgewicht zwischen Assoziation und Dissoziation. Der Gleichgewichtskoeffizient dieser Reaktion wird als Inhibitionskonstante oder  $K_i$  bezeichnet.

Der erste Vorteil der erfindungsrelevanten Verbindungen gegenüber dem Stand der Technik besteht neben ihrem gegenüber den Polyolen geringeren Volumenbedarf darin, daß sie günstige Inhibitionskonstanten bezüglich der in Wasch- und Reinigungsmitteln einsetzbaren Proteasen

aufweisen. Dies gilt beispielsweise für Serin-Proteasen, aber auch für Metalloproteasen. Die Inhibitoren binden somit reversibel, d.h. sie gehen nicht zu feste und nicht zu lose vorübergehende Wechselwirkungen mit dem Enzym ein. Vorteilhafterweise liegt damit während der Lagerung der Großteil der erfindungsrelevanten Protease in Form eines Protease-Inhibitor-Komplexes vor. Die Protease und ggf. weitere enthaltene Proteine, insbesondere weitere Enzyme werden auf diese Weise gegenüber einer Proteolyse durch dieses Enzym geschützt (gegen Proteolyse stabilisiert). Andererseits wird im Augenblick der Verdünnung des erfindungsgemäßen Mittels mit Wasser zur Herstellung einer wäßrigen Wasch- bzw. Reinigungsflotte während des Reinigungsvorgangs das Bindungsgleichgewicht in Richtung Dissoziation verschoben, so daß sich der Komplex auflöst und der Großteil der erfindungsrelevanten Protease proteolytisch aktiv wird. Es handelt sich bei den erfindungsrelevanten Verbindungen also gemäß der formulierten Aufgabe um funktionierende Protease-Inhibitoren und somit Enzym-Stabilisatoren für Wasch- und Reinigungsmittel.

Der zweite Vorteil der erfindungsrelevanten Verbindungen gegenüber dem Stand der Technik besteht darin, daß sie als Elemente lediglich C, H, N und O und gegebenenfalls Halogenide und/oder Schwefel aufweisen und insbesondere frei von Bor sind. Sie bilden somit nicht die unerwünschten, auf Bor zurückzuführenden Nebenprodukte mit anderen Wasch- oder Reinigungsmittel-inhaltsstoffen.

Ferner verfügen sie insbesondere aufgrund der in jedem aromatischen Ring enthaltenen Carboxylgruppen über eine gute Wasserlöslichkeit, so daß sie in entsprechende Mittel einfach eingearbeitet werden können und ein Ausfällen während der Lagerung vermieden wird.

Grundsätzlich wirken die genannten Verbindungen vermutlich deshalb als reversible Inhibitoren, weil sie ähnlich dem Substrat der Proteasen, strukturell an die Bedingungen der Bindungstasche angepasst sind. Umgekehrt lassen sich also grundsätzlich alle Proteasen durch die erfindungsrelevanten Verbindungen inhibieren, so diese erfindungsgemäß als Protease-Inhibitoren geeignet 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, und zwar anhand einer Variante des Subtilisins aus *Bacillus lentus* DSM 5483.

Weitere Gegenstände der vorliegenden Erfindung betreffen:

- die Verwendung einer oben beschriebenen Verbindung als reversibler Inhibitor und/oder Stabilisator einer Protease, im Rahmen einer Wasch- oder Reinigungsmittelrezeptur;
- Wasch- oder Reinigungsverfahren, in dem eine Protease zur Wirkung kommt, die mit einer oben beschriebenen Verbindung 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 einer oben beschriebenen Verbindung zur Herstellung eines Wasch- oder Reinigungsmittels.

Erfindungsgemäß sind solche Wasch- oder Reinigungsmittel bevorzugt, in denen die stabilisierende Verbindung bezüglich der enthaltenen Protease eine Inhibitionskonstante ( $K_i$ ) von 0,01 bis 10 mM, vorzugsweise 0,1 bis 5, besonders bevorzugt 0,5 bis 2 aufweist.

Die Inhibitionskonstante  $K_i$  kann auf folgende Weise ermittelt werden:

Für die Charakterisierung eines reversiblen Inhibitors der enzymatischen Aktivität, ist die Inhibitionskonstante  $K_i$  eine charakteristische und entscheidende Größe.  $K_i$  beschreibt das Gleichgewicht zwischen Enzym, Inhibitor und Enzym-Inhibitor Komplex für eine reversible Bindung. Der Enzym-Inhibitor Komplex ist dabei katalytisch nicht aktiv und inhibiert die Reaktion durch Herabsetzung der Konzentration von freiem Enzym, das noch zur Bindung von Substrat zur Verfügung steht. Der  $K_i$  ist dementsprechend definiert als:

$$K_i = [I] \times [E]/[EI]$$

Darin bedeuten  $[E]$ ,  $[I]$  und  $[EI]$  die jeweiligen molaren Gleichgewichtskonzentrationen von Enzym (E), Inhibitor (I) und dem Enzym-Inhibitor-Komplex (EI). Dieser Definition entsprechend ist eine Substanz mit einem kleinen  $K_i$  unter den jeweiligen Testbedingungen ein guter Inhibitor.

Die Bestimmung des  $K_i$  erfolgt auf der Grundlage des Aktivitätstests der Protease in Anwesenheit des entsprechenden Inhibitors. Über die etablierte Michaelis-Menten-Kinetik werden die enzymatischen Parameter  $K_m$ , und  $k_{cat}$  in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen des Inhibitors bestimmt. Durch die Bestimmung der Anfangshydrolyse-Rate ( $v_{Anf.}$ ) bei verschiedenen Substratkonzentrationen  $[S]$  und Einpassung der experimentellen Daten in Gleichung 1 erhält man  $K_i$ .

$$\text{Gleichung 1: } v_{Anf.} = k_{cat} \times [S] \times E_0 / (K_m \times (1 + [I]/K_i) + S)$$

Hierin steht  $[I]$  wiederum für die Inhibitor-Konzentration.

Alternativ kann  $K_i$  unter Verwendung der Cheng-Prusoff-Gleichung (Gleichung 2) über den  $IC_{50}$ -Wert bestimmt werden. Die Bestimmung des  $IC_{50}$ -Werts erfolgt über die Bestimmung der proteolytischen Aktivität an einem Substrat in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen des Inhibitors und Anpassung der experimentellen Daten an eine sigmoidale Dosis-Wirkungs-Gleichung mit variabler Steigung (Pseudo-Hill-Steigungen). Es handelt sich dabei um den Wert der Hälfte der Inhibitor-Konzentration, die nötig wäre, um eine vollständige Inhibition zu erzielen.

$K_i$  ergibt sich damit aus folgender Gleichung 2:

Gleichung 2:  $K_i = IC_{50}/(1 + [S]/K_d)$

Darin bedeuten [S] die Substratkonzentration im Test und  $K_d$  die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante für das Substrat, die bei  $IC_{50}$  als identisch zu  $K_m$  für das Substrat gesetzt werden kann.

Die auf diese Weise bestimmbaren  $K_i$ -Werte kennzeichnen die untersuchte Verbindung in bezug auf die im Versuch eingesetzte Protease. In Beispiel 2 wurde dies für die Bacillus lentus-Alkalische Protease F49 (gemäß WO 95/23221 A1) durchgeführt. Da es sich dabei um eine typische Subtilisin-Protease handelt, sind die mit diesem Enzym erhaltenen Werte auch für andere Serin-Proteasen, insbesondere andere Subtilisin-Proteasen typisch. Der exakte Wert für eine interessierende Protease muß im Zweifel anhand der jeweils konkreten Protease ermittelt werden.

In erfindungsgemäßen Wasch- oder Reinigungsmitteln, die in einer bevorzugten Ausführung in überwiegend fester Form vorliegen und in einer zweiten Ausführung in überwiegend flüssiger, pastöser oder Gelform vorliegen, ist die Protease insbesondere in einem Gehalt von 2 µg bis 20 mg pro g des Mittels, vorzugsweise von 5 µg bis 17,5 mg pro g des Mittels, besonders bevorzugt von 20 µg bis 15 mg pro g des Mittels, ganz besonders bevorzugt von 50 µg bis 10 µg des Mittels enthalten.

Der Stabilisator ist in erfindungsgemäßen Mitteln insbesondere in einem Gehalt bis zu 50 mg pro g des Mittels, vorzugsweise bis zu 10 mg besonders bevorzugt bis zu 7 mg ganz besonders bevorzugt bis zu 5 mg pro g des Mittels enthalten. Weiterhin ist bevorzugt, dass der Stabilisator in einem Gehalt von 0,01 bis  $100 \times K_i$  (bezogen auf die enthaltene Protease), vorzugsweise 0,1 bis  $10 \times K_i$  besonders bevorzugt 1 bis  $5 \times K_i$  enthalten ist.

Vorzugsweise liegt das molare Verhältnis von Stabilisator zur Protease im Bereich von 1:1 bis 1.000:1, insbesondere von 1:1 bis 500:1, besonders bevorzugt von 1:1 bis 100:1, ganz besonders bevorzugt von 1:1 bis 20:1.

Neben dem Stabilisator 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.

Bei der erfindungsgemäß stabilisierten beziehungsweise reversibel inhibierten Protease handelt es sich vorzugsweise um eine Serin-Protease, insbesondere um eine Subtilase, besonders bevorzugt um ein Subtilisin. 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:

- Die Alkalische Protease aus *Bacillus amyloliquefaciens* (BPN'),
- Die Alkalische Protease aus *Bacillus licheniformis* (Subtilisin Carlsberg),
- Die Alkalische Protease PB92,
- Subtilisin 147 und/oder 309 (Savinase)
- Die Alkalische Protease aus *Bacillus lentus*, vorzugsweise aus *Bacillus lentus* (DSM 5483),
- Die Alkalische Protease aus *Bacillus alcalophilus* (DSM 11233),
- die Alkalische Protease aus *Bacillus gibsonii* (DSM 14391) oder eine hierzu mindestens zu 70% identische Alkalische Protease,
- die Alkalische Protease aus *Bacillus* sp. (DSM 14390) oder eine hierzu mindestens zu 98,5% identische Alkalische Protease,
- die Alkalische Protease aus *Bacillus* sp. (DSM 14392) oder eine hierzu mindestens zu 98,1% identische Alkalische Protease,
- die Alkalische Protease aus *Bacillus gibsonii* (DSM 14393) oder eine hierzu mindestens zu 70% identische Alkalische Protease,
- die in SEQ ID NO. 4 der Anmeldung WO 2005/063974 A1 beschriebene Alkalische Protease oder eine hierzu mindestens zu 40% identische Alkalische Protease,
- die in SEQ ID NO. 4 der Anmeldung WO 2005/103244 A1 beschriebene Alkalische Protease oder eine hierzu mindestens zu 80% identische Alkalische Protease,
- die in SEQ ID NO. 7 der Anmeldung WO 2005/103244 A1 beschriebene Alkalische Protease oder eine hierzu mindestens zu 80% identische Alkalische Protease und
- die in SEQ ID NO. 2 der Anmeldung DE 102005028295.4 beschriebene Protease oder eine hierzu mindestens zu 66% identische Protease.

In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei der Protease um eine Variante mit einer Punktmutation in dem Bereich der Positionen 95 bis 103 (Zählung gemäß Subtilisin 309) handelt, vorzugsweise mit einer Insertion einer einzelnen Aminosäure zwischen Position 99 und 100, besonders bevorzugt ausgehend von Subtilisin 147 und/oder 309 (Subtilisin 309), bzw. einer Variante davon. Insbesondere handelt es sich bei der Protease um eine Variante mit einer Punktmutation in Position 217 (Zählung gemäß der Wildtyp-Protease aus *Bacillus amyloliquefaciens*; BPN') handelt, vorzugsweise mit einer Substitution einer einzelnen Aminosäure in dieser Position, besonders bevorzugt mit der Aminosäuresubstitution X217L, ganz besonders bevorzugt ausgehend von der Wildtyp-Protease aus *Bacillus amyloliquefaciens* (BPN'), bzw. einer Variante davon. In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei der Protease um eine Variante mit einer Aminosäureänderung gegenüber einer mit der Alkalischen Protease aus *Bacillus lentus* homologisierbaren Ausgangs-Protease in einer oder mehreren der folgenden Positionen: 3, 4, 36, 42, 43, 47, 56, 61, 69, 87, 96, 99, 101, 102, 104, 114, 118, 120, 130, 139, 141, 142, 154, 157, 188, 193, 199, 205, 211, 224, 229, 236, 237, 242, 243, 250, 253, 255 und 268, in der Zählung

der Alkalischen Protease aus *Bacillus lentus*, vorzugsweise mit einer Aminosäureänderung gegenüber dem Ausgangsmolekül in einer oder mehreren der folgenden Positionen: 3, 4, 43, 61, 188, 193, 199, 211, 224, 250 und 253, besonders bevorzugt mit einem oder mehreren der Aminosäureaustausche X3T, X4I, X43V, X61A, X188P, X193M, X199I, X211D, X211E, X211G, X211N oder X211Q, X224V, X250G und X253N, ganz besonders bevorzugt ausgehend von der Alkalische Protease aus *Bacillus lentus* DSM 5483, bzw. einer Variante davon.

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

Erfindungsgemäße Mittel enthalten vorzugsweise mindestens einen Komplexbildner und/oder Buildersubstanzen, wobei es sich bei dem Builder insbesondere um einen Zeolith-Builder handelt, und/oder ein nichtionisches Tensid, wobei es sich bei dem nichtionischen Tensid vorzugsweise um einen Hydroxymischether handelt, und/oder optischen Aufheller, wobei es sich bei dem optischen Aufheller um Diphenylverbindungen, insbesondere um Distyryl-Biphenyl-derivate, und/oder um Stilbentriazin-Derivate handelt.

## Beispiele

## Beispiel 1

Untersuchung der Protease-Restaktivität in Gegenwart eines Inhibitors

Zum Nachweis, dass die erfindungsgemäßen Verbindungen eine die Protease-Aktivität inhibierende Wirkung ausüben, wird die proteolytische Restaktivität der Bacillus lentus-Alkalische Protease F49 (gemäß WO 95/23221 A1) in Anwesenheit dieser Verbindungen ermittelt.

In parallelen Reaktionsansätzen werden in 100 mM Tris-Puffer, pH 6,8, 0,1% (w/v) Brij<sup>TM</sup>35 das Substrat Succinyl Alanin-Alanin-Prolin-Phenylalanin-para-Nitroanilid (AAPFpNA; Bachem L-1400) und  $5 \times 10^{-9}$  bzw.  $1 \times 10^{-8}$  M der Protease vorgelegt. Hinzu kommen die zu testenden Verbindungen in einer Endkonzentration von 10 mM. Sie werden jeweils in wasserfreiem DMSO gelöst, wobei Effekte von DMSO auf die enzymatische Aktivität über die entsprechende Referenz mit derselben Menge DMSO, aber ohne die betreffende Verbindung korrigiert werden. Die Inkubation erfolgte für 5 min bei pH 8,6 und 25°C. Dabei entspricht 1 U  $1 \mu\text{mol}$  gespaltenem Substrat pro Minute.

Unter Verwendung von [1-(carboxymethoxy)-6-oxo-6H-benzochromen-3-yl]oxy)acetic acid (CAS: 133540-71-3) konnte so eine Inhibierung der proteolytischen Restaktivität auf eine Restaktivität von kleiner 50 % erreicht werden.

## Beispiel 2

Untersuchung der Lagerstabilität proteasehaltiger Wasch- und Reinigungsmittel in Gegenwart von Protease-Inhibitoren

Als Basisrezeptur wird ein Flüssigwaschmittel mit folgender Zusammensetzung angesetzt (alle Angaben in Gewichts-Prozent): 0,3-0,5% Xanthan Gum, 0,2-0,4% Anti-Schaummittel, 6-7% Glycerin, 0,3-0,5% Ethanol, 4-7% FAEOS, 24-28% Nichtionische Tenside, 1% Borsäure, 1-2% Natriumcitrat (Dihydrat), 2-4% Soda, 14-16% Kokosnuss-Fettsäuren, 0,5% HEDP, 0-0,4% PVP, 0-0,05% optischer Aufheller, 0-0,001% Farbstoff, Rest: demineralisiertes Wasser.

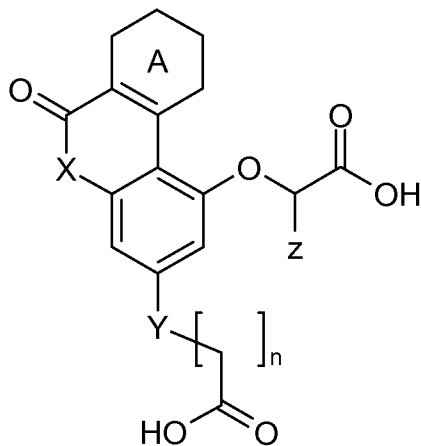
Diese Rezeptur wird mit den zu testenden, inhibierenden Verbindungen und 1.275.000 HPE/I B. lentus-Alkalische Protease F 49 versetzt. Die in HPE angegebene Protease-Aktivität (Henkel-Protease-Einheiten) wird nach van Raay, Saran und Verbeek, gemäß der Veröffentlichung „Zur Bestimmung der proteolytischen Aktivität in Enzymkonzentraten und enzymhaltigen Wasch-, Spül- und Reinigungsmitteln“ in Tenside (1970), Band 7, S. 125 – 132, bestimmt.

Die Lagerung erfolgt über verschieden lange Zeiträume in luftdicht verschlossenen Gefäßen bei 30°C.

Zur Auswertung werden die Anfangswerte für die proteolytische Aktivität des betreffenden Mittels mit den nach der Lagerung bestimmten Werten verglichen. Je höher die nach der Lagerung verbleibende Aktivität ist, desto besser ist die enthaltene Protease während der Lagerung inaktiviert und desto besser eignet sich die betreffende Verbindung als erfindungsgemäßer Stabilisator.

## Patentansprüche

1. Wasch- oder Reinigungsmittel, enthaltend eine Protease und einen Enzymstabilisator der allgemeinen Strukturformel:



in der

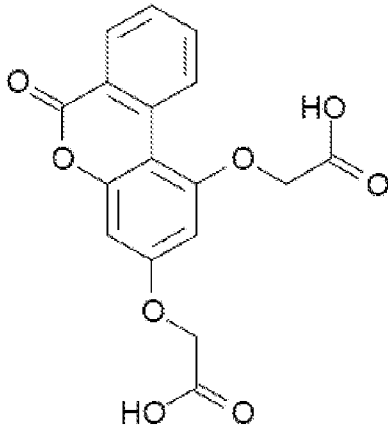
A für einen beliebigen 5- oder 6-gliedrigen, ein- oder mehrfach ungesättigten Ring steht, der gegebenenfalls auch mindestens ein Heteroatom, insbesondere ausgewählt aus O und N, enthalten kann,

X und Y unabhängig voneinander für O, NR<sup>1</sup> oder CR<sup>1</sup>R<sup>2</sup> stehen,

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> und Z unabhängig voneinander für Wasserstoff, C<sub>1-6</sub>-Alkyl, C<sub>1-6</sub>-Alkenyl, Phenyl, Benzyl oder Halogen stehen,

n = 1 oder 2 beträgt.

2. Wasch- oder Reinigungsmittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass A für einen Rest ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Benzo-, Thiopheno-, Pyrido-, Pyrimidino-, Imidazo-, Oxazo-, Pyrrazo- und Pyrrolo-Rest steht.
3. Wasch- oder Reinigungsmittel nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass X für O oder NR<sup>1</sup> steht, wobei R<sup>1</sup> für Benzyl steht.
4. Wasch- oder Reinigungsmittel nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass Y für O oder NH steht.
5. Wasch- oder Reinigungsmittel nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem Enzymstabilisator um eine Verbindung der Strukturformel



handelt.

6. Wasch- oder Reinigungsmittel nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die stabilisierende Verbindung bezüglich der enthaltenen Protease eine Inhibitionskonstante ( $K_i$ ) von 0,01 bis 10 mM, vorzugsweise 0,1 bis 5, besonders bevorzugt 0,5 bis 2 aufweist.
7. Wasch- oder Reinigungsmittel nach einem der Ansprüche 1 bis 6 in überwiegend fester Form.
8. Wasch- oder Reinigungsmittel nach einem der Ansprüche 1 bis 6 in überwiegend flüssiger, pastöser oder Gelform.
9. Wasch- oder Reinigungsmittel nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die Protease in einem Gehalt von 2  $\mu\text{g}$  bis 20 mg pro g des Mittels, vorzugsweise von 5  $\mu\text{g}$  bis 17,5 mg pro g des Mittels, besonders bevorzugt von 20  $\mu\text{g}$  bis 15 mg pro g des Mittels, ganz besonders bevorzugt von 50  $\mu\text{g}$  bis 10  $\mu\text{g}$  des Mittels enthalten ist.
10. Wasch- oder Reinigungsmittel nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei der Stabilisator in einem Gehalt bis zu 50 mg pro g des Mittels, vorzugsweise bis zu 10 mg besonders bevorzugt bis zu 7 mg ganz besonders bevorzugt bis zu 5 mg pro g des Mittels enthalten ist.
11. Wasch- oder Reinigungsmittel nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei das molare Verhältnis von Stabilisator zur Protease im Bereich von 1:1 bis 1.000:1, insbesondere von 1:1 bis 500:1, besonders bevorzugt von 1:1 bis 100:1, ganz besonders bevorzugt von 1:1 bis 20:1 liegt.

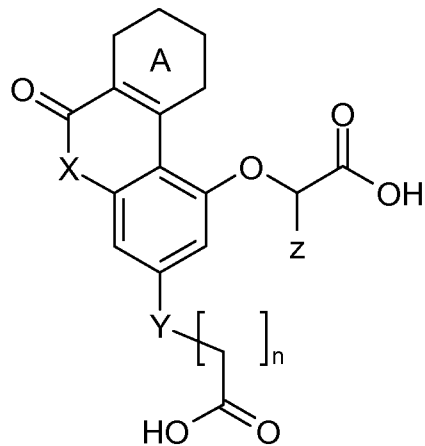
12. Wasch- oder Reinigungsmittel nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei der Stabilisator in einem Gehalt von 0,01 bis  $100 \times K_i$  (bezogen auf die enthaltene Protease), vorzugsweise 0,1 bis  $10 \times K_i$  besonders bevorzugt 1 bis  $5 \times K_i$  enthalten ist.
13. Wasch- oder Reinigungsmittel nach einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei es sich bei der Protease um eine Serin-Protease, vorzugsweise um eine Subtilase, besonders bevorzugt um ein Subtilisin handelt.
14. Wasch- oder Reinigungsmittel nach Anspruch 13, wobei es sich bei dem Subtilisin um ein Wildtypenzym oder um eine Subtilisin-Variante handelt, wobei das Wildtypenzym bzw. das Ausgangsenzym der Variante aus einer der folgenden ausgewählt ist:
- Die Alkalische Protease aus *Bacillus amyloliquefaciens* (BPN'),
  - Die Alkalische Protease aus *Bacillus licheniformis* (Subtilisin Carlsberg),
  - Die Alkalische Protease PB92,
  - Subtilisin 147 und/oder 309 (Savinase)
  - Die Alkalische Protease aus *Bacillus lentus*, vorzugsweise aus *Bacillus lentus* (DSM 5483),
  - Die Alkalische Protease aus *Bacillus alcalophilus* (DSM 11233),
  - die Alkalische Protease aus *Bacillus gibsonii* (DSM 14391) oder eine hierzu mindestens zu 70% identische Alkalische Protease,
  - die Alkalische Protease aus *Bacillus* sp. (DSM 14390) oder eine hierzu mindestens zu 98,5% identische Alkalische Protease,
  - die Alkalische Protease aus *Bacillus* sp. (DSM 14392) oder eine hierzu mindestens zu 98,1% identische Alkalische Protease,
  - die Alkalische Protease aus *Bacillus gibsonii* (DSM 14393) oder eine hierzu mindestens zu 70% identische Alkalische Protease,
  - die in SEQ ID NO. 4 der Anmeldung WO 2005/063974 A1 beschriebene Alkalische Protease oder eine hierzu mindestens zu 40% identische Alkalische Protease,
  - die in SEQ ID NO. 4 der Anmeldung WO 2005/103244 A1 beschriebene Alkalische Protease oder eine hierzu mindestens zu 80% identische Alkalische Protease,
  - die in SEQ ID NO. 7 der Anmeldung WO 2005/103244 A1 beschriebene Alkalische Protease oder eine hierzu mindestens zu 80% identische Alkalische Protease und
  - die in SEQ ID NO. 2 der Anmeldung DE 102005028295.4 beschriebene Protease oder eine hierzu mindestens zu 66% identische Protease.
- 15: Wasch- oder Reinigungsmittel nach einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei es sich bei der Protease um eine Variante handelt, die zu der Ausgangsprotease auf Aminosäureebene über die Gesamtlänge der Variante eine Sequenzidentität von mindestens 90%, vorzugsweise mindestens 92,5%, besonders bevorzugt mindestens 95% und ganz besonders bevorzugt

mindestens 97,5% aufweist, unabhängig davon, ob sie von dieser selbst oder von einem anderen Enzym abgeleitet worden ist.

16. Wasch- oder Reinigungsmittel nach einem der Ansprüche 1 bis 13, wobei es sich bei der Protease um eine Variante mit einer Punktmutation in dem Bereich der Positionen 95 bis 103 (Zählung gemäß Subtilisin 309) handelt, vorzugsweise mit einer Insertion einer einzelnen Aminosäure zwischen Position 99 und 100, besonders bevorzugt ausgehend von Subtilisin 147 und/oder 309 (Subtilisin 309), bzw. einer Variante davon.
17. Wasch- oder Reinigungsmittel nach einem der Ansprüche 1 bis 14, wobei es sich bei der Protease um eine Variante mit einer Punktmutation in Position 217 (Zählung gemäß der Wildtyp-Protease aus *Bacillus amyloliquefaciens*; BPN') handelt, vorzugsweise mit einer Substitution einer einzelnen Aminosäure in dieser Position, besonders bevorzugt mit der Aminosäuresubstitution X217L, ganz besonders bevorzugt ausgehend von der Wildtyp-Protease aus *Bacillus amyloliquefaciens* (BPN'), bzw. einer Variante davon.
18. Wasch- oder Reinigungsmittel nach einem der Ansprüche 1 bis 15, wobei es sich bei der Protease um eine Variante mit einer Aminosäureänderung gegenüber einer mit der Alkalischen Protease aus *Bacillus lentus* homologisierbaren Ausgangs-Protease in einer oder mehreren der folgenden Positionen handelt: 3, 4, 36, 42, 43, 47, 56, 61, 69, 87, 96, 99, 101, 102, 104, 114, 118, 120, 130, 139, 141, 142, 154, 157, 188, 193, 199, 205, 211, 224, 229, 236, 237, 242, 243, 250, 253, 255 und 268, in der Zählung der Alkalischen Protease aus *Bacillus lentus*, vorzugsweise mit einer Aminosäureänderung gegenüber dem Ausgangsmolekül in einer oder mehreren der folgenden Positionen: 3, 4, 43, 61, 188, 193, 199, 211, 224, 250 und 253, besonders bevorzugt mit einem oder mehreren der Aminosäureaustausche X3T, X4I, X43V, X61A, X188P, X193M, X199I, X211D, X211E, X211G, X211N oder X211Q, X224V, X250G und X253N, ganz besonders bevorzugt ausgehend von der Alkalische Protease aus *Bacillus lentus* DSM 5483, bzw. einer Variante davon.
19. Wasch- oder Reinigungsmittel nach einem der Ansprüche 1 bis 16, enthaltend mindestens einen weiteren Stabilisator.
20. Wasch- oder Reinigungsmittel nach Anspruch 17, wobei es sich bei dem mindestens einen weiteren Stabilisator um ein Polyol, insbesondere Glycerin oder 1,2-Ethylenglycol, und/oder um ein Antioxidans handelt.

21. Wasch- oder Reinigungsmittel nach einem der Ansprüche 1 bis 18, enthaltend ein oder mehrere weitere Enzyme ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Proteasen, Amylasen, Hemicellulasen, Cellulasen, Lipasen und Oxidoreduktasen.
22. Wasch- oder Reinigungsmittel nach Anspruch 19, wobei es sich bei der Amylase um eine  $\alpha$ -Amylase handelt.
23. Wasch- oder Reinigungsmittel nach Anspruch 19 oder 20, wobei es sich bei der Hemicellulase um eine  $\beta$ -Glucanase, eine Pektinase, eine Pullulanase und/oder eine Mannanase handelt.
24. Wasch- oder Reinigungsmittel nach einem der Ansprüche 19 bis 21, wobei es sich bei der Cellulase um ein Cellulase-Gemisch oder eine Einkomponentencellulase, vorzugsweise bzw. überwiegend um eine Endoglucanase und/oder eine Cellobiohydrolase handelt.
25. Wasch- oder Reinigungsmittel nach einem der Ansprüche 19 bis 22, wobei es sich bei der Oxidoreduktase um eine Oxidase, insbesondere eine Cholin-Oxidase, oder um eine Perhydrolase handelt.
26. Wasch- oder Reinigungsmittel nach einem der Ansprüche 1 bis 23, enthaltend mindestens einen Komplexbildner und/oder Buildersubstanzen.
27. Wasch- oder Reinigungsmittel nach Anspruch 24, wobei es sich bei dem Builder um einen Zeolith-Builder handelt.
28. Wasch- oder Reinigungsmittel nach einem der Ansprüche 1 bis 25, enthaltend ein nichtionisches Tensid.
29. Mittel nach Anspruch 26, wobei es sich bei dem nichtionischen Tensid um einen Hydroxymischether handelt.
30. Wasch- oder Reinigungsmittel nach einem der Ansprüche 1 bis 27, enthaltend optischen Aufheller.
31. Wasch- oder Reinigungsmittel nach Anspruch 28, wobei es sich bei dem optischen Aufheller um Diphenylverbindungen, insbesondere um Distyryl-Biphenylderivate, und/oder um Stilbentriazin-Derivate handelt.

32. Verwendung einer Verbindung der allgemeinen Strukturformel:



in der

A für einen beliebigen 5- oder 6-gliedrigen, ein- oder mehrfach ungesättigten Ring steht, der gegebenenfalls auch mindestens ein Heteroatom, insbesondere ausgewählt aus O und N, enthalten kann,

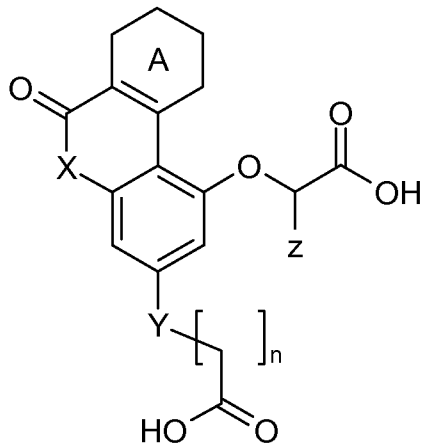
X und Y unabhängig voneinander für O, NR<sup>1</sup> oder CR<sup>1</sup>R<sup>2</sup> stehen,

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> und Z unabhängig voneinander für Wasserstoff, C<sub>1-6</sub>-Alkyl, C<sub>1-6</sub>-Alkenyl, Phenyl, Benzyl oder Halogen stehen,

n = 1 oder 2 beträgt,

als reversibler Inhibitor einer Protease im Rahmen einer Wasch- oder Reinigungsmittelrezeptur.

33. Wasch- oder Reinigungsverfahren, in dem eine Protease zur Wirkung kommt, die mit einer Verbindung der allgemeinen Strukturformel inhibiert und/oder stabilisiert ist:



in der

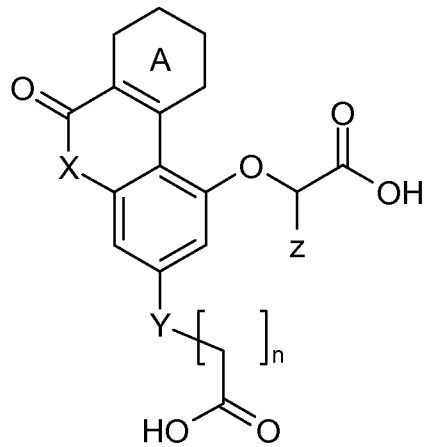
A für einen beliebigen 5- oder 6-gliedrigen, ein- oder mehrfach ungesättigten Ring steht, der gegebenenfalls auch mindestens ein Heteroatom, insbesondere ausgewählt aus O und N, enthalten kann,

X und Y unabhängig voneinander für O, NR<sup>1</sup> oder CR<sup>1</sup>R<sup>2</sup> stehen,

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> und Z unabhängig voneinander für Wasserstoff, C<sub>1-6</sub>-Alkyl, C<sub>1-6</sub>-Alkenyl, Phenyl, Benzyl oder Halogen stehen,

n = 1 oder 2 beträgt.

34. Wasch- oder Reinigungsverfahren nach Anspruch 31, wobei ein Wasch- oder Reinigungsmittel nach einem der Ansprüche 1 bis 29 zum Einsatz kommt.
35. Verwendung eines Wasch- oder Reinigungsmittels nach einem der Ansprüche 1 bis 29 zum Waschen und/oder Reinigen von Textilien und/oder harten Oberflächen.
36. Verwendung einer Protease und einer Verbindung der allgemeinen Strukturformel:



in der

A für einen beliebigen 5- oder 6-gliedrigen, ein- oder mehrfach ungesättigten Ring steht, der gegebenenfalls auch mindestens ein Heteroatom, insbesondere ausgewählt aus O und N, enthalten kann,

X und Y unabhängig voneinander für O, NR<sup>1</sup> oder CR<sup>1</sup>R<sup>2</sup> stehen,

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> und Z unabhängig voneinander für Wasserstoff, C<sub>1-6</sub>-Alkyl, C<sub>1-6</sub>-Alkenyl, Phenyl, Benzyl oder Halogen stehen,

n = 1 oder 2 beträgt,

zur Herstellung eines Wasch- oder Reinigungsmittels.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2008/061272

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C11D3/20 C11D3/28 C11D3/386		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C11D		
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, PAJ, CHEM ABS Data, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2006/007864 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT) 26 January 2006 (2006-01-26) page 82; example 349	1-36
A	JP 02 304080 A (TOYO PHARMA KK; DAISO CO LTD) 17 December 1990 (1990-12-17) abstract; table 2	1-36
A	US 6 214 596 B1 (ASGHARIAN BAHRAM ET AL) 10 April 2001 (2001-04-10) column 5, line 11 - line 26	1-36
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> 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.		
*&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 20 November 2008		Date of mailing of the international search report 08/12/2008
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

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2008/061272

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2006007864	A	26-01-2006	NONE
JP 2304080	A	17-12-1990	NONE
US 6214596	B1	10-04-2001	NONE

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP2008/061272

<b>A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES</b> INV. C11D3/20      C11D3/28      C11D3/386		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
<b>B. RECHERCHIERTE GEBIETE</b> Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) C11D		
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, PAJ, CHEM ABS Data, WPI Data		
<b>C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN</b>		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 2006/007864 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT) 26. Januar 2006 (2006-01-26) Seite 82; Beispiel 349	1-36
A	JP 02 304080 A (TOYO PHARMA KK; DAISO CO LTD) 17. Dezember 1990 (1990-12-17) Zusammenfassung; Tabelle 2	1-36
A	US 6 214 596 B1 (ASGHARIAN BAHRAM ET AL) 10. April 2001 (2001-04-10) Spalte 5, Zeile 11 - Zeile 26	1-36
<input type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> 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 *&* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 20. November 2008		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts 08/12/2008
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

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2008/061272

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 2006007864 A	26-01-2006	KEINE	
JP 2304080 A	17-12-1990	KEINE	
US 6214596 B1	10-04-2001	KEINE	