

(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

28. September 2017 (28.09.2017)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer

WO 2017/162428 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:

C12N 9/54 (2006.01) C11D 3/386 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2017/055276

(22) Internationales Anmeldedatum:
7. März 2017 (07.03.2017)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2016 204 814.7 23. März 2016 (23.03.2016) DE

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

(72) Erfinder: MUSSMANN, Nina; Am Kuhbusch 109, 47877
Willich (DE). O'CONNELL, Timothy; Mehlbeerenstr.
10, 86899 Landsberg am Lech (DE). HERBST, Daniela;
Achenbachstraße 75, 40237 Düsseldorf (DE). PRÜSER,
Inken; Remscheider Str. 10, 40215 Düsseldorf (DE).
DEGERING, Christian; Hauptstraße 53, 40699 Erkrath
(DE). GRIEMERT, Sabine; Im Bleer Feld 4, 40789
Monheim am Rhein (DE). EGGERT, Thorsten; Im Poth
45, 45529 Hattingen (DE). LEGGEWIE, Christian;
Heidendoren 38, 45481 Mülheim an der Ruhr (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, 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)
- mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung (Regel 5 Absatz 2 Buchstabe a)

(54) Title: IMPROVED CLEANING PERFORMANCE ON PROTEIN SENSITIVE SOILING

(54) Bezeichnung : VERBESSERTE REINIGUNGSLEISTUNG AN PROTEIN SENSITIVEN ANSCHMUTZUNGEN

(57) Abstract: The invention relates to proteases having an amino acid sequence with at least 70% sequence identity to the amino acid sequence given in SEQ ID No. 1, across its whole length, and comprising an amino acid substitution on at least one of the positions P9, Q10, Q62, L82, P86, N130, T141, N187, S236 or T253, relating in each case to the numbering according to SEQ ID No. 1. The invention also relates to the production and use thereof. Said type of proteases have a very good cleaning performance.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Proteasen umfassend eine Aminosäuresequenz, die mindestens 70 % Sequenzidentität mit der in SEQ ID NO:1 angegebenen Aminosäuresequenz über deren Gesamtlänge aufweist und die eine Aminosäuresubstitution an mindestens einer der Positionen P9, Q10, Q62, L82, P86, N130, T141, N187, S236 oder T253, jeweils bezogen auf die Nummerierung gemäß SEQ ID NO:1, aufweisen sowie deren Herstellung und Verwendung. Derartige Proteasen zeigen eine sehr gute Reinigungsleistung.



WO 2017/162428 A1

„Verbesserte Reinigungsleistung an Protein sensitiven Anschmutzungen“

Die Erfindung liegt auf dem Gebiet der Enzymtechnologie. Die Erfindung betrifft Proteasen aus *Bacillus pumilus* deren Aminosäuresequenz, insbesondere im Hinblick auf den Einsatz in Wasch- und Reinigungsmitteln verändert wurden um ihnen eine bessere Reinigungsleistung zu verleihen, und die für sie codierende Nukleinsäuren sowie deren Herstellung. Die Erfindung betrifft ferner die Verwendungen dieser Proteasen und Verfahren in denen sie eingesetzt werden sowie diese enthaltende Mittel, insbesondere Wasch- und Reinigungsmittel.

Proteasen gehören zu den technisch bedeutendsten Enzymen überhaupt. Für Wasch- und Reinigungsmittel sind sie die am längsten etablierten und in praktisch allen modernen, leistungsfähigen Wasch- und Reinigungsmitteln enthaltenen Enzyme. Sie bewirken den Abbau proteinhaltiger Anschmutzungen auf dem Reinigungsgut. Hierunter sind wiederum Proteasen vom Subtilisin-Typ (Subtilasen, Subtilopeptidasen, EC 3.4.21.62) besonders wichtig, welche aufgrund der katalytisch wirksamen Aminosäuren Serin-Proteasen sind. Sie wirken als unspezifische Endopeptidasen und 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 sezernierten Subtilisine als bedeutendste Gruppe innerhalb der Subtilasen zu erwähnen.

Beispiele für die in Wasch- und Reinigungsmitteln bevorzugt eingesetzten Proteasen vom Subtilisin-Typ sind die Subtilisine BPN' und Carlsberg, die Protease PB92, die Subtilisine 147 und 309, die Protease aus *Bacillus lentus*, insbesondere aus *Bacillus lentus* DSM 5483, Subtilisin DY und die den Subtilasen, nicht mehr jedoch den Subtilisinen im engeren Sinne zuzuordnenden Enzyme Thermitase, Proteinase K und die Proteasen TW3 und TW7, sowie Varianten der genannten Proteasen, die eine gegenüber der Ausgangsprotease veränderte Aminosäuresequenz aufweisen. Proteasen werden durch aus dem Stand der Technik bekannte Verfahren gezielt oder zufallsbasiert verändert und so beispielsweise für den Einsatz in Wasch- und Reinigungsmitteln optimiert. Dazu gehören Punktmutagenese, Deletions- oder Insertionsmutagenese oder Fusion mit anderen Proteinen oder Proteinteilen. So sind für die meisten aus dem Stand der Technik bekannten Proteasen entsprechend optimierte Varianten bekannt.

In der europäischen Patentanmeldung EP 2016175 A1 ist beispielsweise eine für Wasch- und Reinigungsmittel vorgesehene Protease aus *Bacillus pumilus* offenbart. Generell sind nur ausgewählte Proteasen für den Einsatz in flüssigen Tensid-haltigen Zubereitungen überhaupt geeignet. Viele Proteasen zeigen in derartigen Zubereitungen keine ausreichende katalytische Leistung. Für die Anwendung von Proteasen in Reinigungsmitteln ist daher eine hohe katalytische Aktivität unter Bedingungen wie sie sich während eines Waschgangs darstellen besonders wünschenswert.

Folglich haben Protease- und Tensid-haltige flüssige Formulierungen aus dem Stand der Technik den Nachteil, dass die enthaltenen Proteasen unter Standard-Waschbedingungen keine zufriedenstellende proteolytische Aktivität aufweisen und die Formulierungen daher keine optimale Reinigungsleistung an Protease-sensitiven Anschmutzungen zeigen.

Überraschenderweise wurde jetzt festgestellt, dass eine Protease aus *Bacillus pumilus* oder eine hierzu hinreichend ähnliche Protease (bezogen auf die Sequenzidentität), die eine Aminosäuresubstitution an mindestens einer der Positionen P9, Q10, Q62, L82, P86, N130, T141, N187, S236 oder T253, jeweils bezogen auf die Nummerierung gemäß SEQ ID NO:1, aufweist, hinsichtlich der proteolytischen Aktivität unter Standard-Waschbedingungen gegenüber der Wildtypform verbessert ist und daher besonders für den Einsatz in Wasch- oder Reinigungsmitteln geeignet ist.

Gegenstand der Erfindung ist daher in einem ersten Aspekt eine Protease umfassend eine Aminosäuresequenz, die mindestens 70 % Sequenzidentität mit der in SEQ ID NO:1 angegebenen Aminosäuresequenz über deren Gesamtlänge aufweist und eine Aminosäuresubstitution an mindestens einer der Positionen P9, Q10, Q62, L82, P86, N130, T141, N187, S236 oder T253, jeweils bezogen auf die Nummerierung gemäß SEQ ID NO:1, aufweist.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung einer Protease umfassend das Substituieren einer Aminosäure an mindestens einer Position, die der Position Positionen 9, 10, 62, 82, 86, 130, 141, 187 oder 236 in SEQ ID NO:1 entspricht, in einer Ausgangsprotease, die mindestens 70 % Sequenzidentität zu der in SEQ ID NO:1 angegebenen Aminosäuresequenz über deren Gesamtlänge aufweist, vorzugsweise derart, dass die Protease mindestens eine der Aminosäuresubstitutionen P9H, Q10E, Q62E, L82F, P86S, P86A, N130D, T141K, N187H, S236A oder T253S aufweist.

Eine Protease im Sinne der vorliegenden Patentanmeldung umfasst daher sowohl die Protease als solche als auch eine mit einem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellte Protease. Alle Ausführungen zur Protease beziehen sich daher sowohl auf die Protease als solche wie auch auf die mittels entsprechender Verfahren hergestellten Proteasen.

Weitere Aspekte der Erfindung betreffen die für diese Proteasen codierenden Nukleinsäuren, erfindungsgemäße Proteasen oder Nukleinsäuren enthaltende nicht menschliche Wirtszellen sowie erfindungsgemäße Proteasen umfassende Mittel, insbesondere Wasch- und Reinigungsmittel, Wasch- und Reinigungsverfahren, und Verwendungen der erfindungsgemäßen Proteasen in Wasch- oder Reinigungsmitteln zur Entfernung von fetthaltigen Anschmutzungen.

„Mindestens eine“, wie hierin verwendet, bedeutete eine oder mehrere, d.h. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 oder mehr.

Die vorliegende Erfindung basiert auf der überraschenden Erkenntnis der Erfinder, dass eine Aminosäuresubstitution an mindestens einer der Positionen 9, 10, 62, 82, 86, 130, 141, 187 oder 236 der Protease aus *Bacillus pumilus* gemäß SEQ ID NO:1, in einer Protease, die eine zu der in SEQ ID NO:1 angegebenen Aminosäuresequenz zu mindestens 70% identische Aminosäuresequenz umfasst, derart, dass an mindestens einer der entsprechenden Positionen die Aminosäuren 9H, 10E, 62E, 82F, 86S, 86A, 130D, 141K, 187H, 236A oder 253S vorhanden sind, eine verbesserte katalytische Aktivität dieser veränderten Protease in Wasch- und Reinigungsmitteln bewirkt. Das ist insbesondere insoweit überraschend, als dass keine der oben genannten Aminosäuresubstitutionen zuvor mit einer erhöhten katalytischen Aktivität der Protease in Verbindung gebracht wurde.

Die erfindungsgemäßen Proteasen verfügen über eine erhöhte katalytische Aktivität in Wasch- oder Reinigungsmitteln. In vielfältigen Ausführungsformen besitzen die erfindungsgemäßen Proteasen eine proteolytische Aktivität, die bezogen auf die Wildtyp-Variante der Protease (SEQ ID NO:1) mindestens 110%, mindestens 115%, mindestens 120%, mindestens 125%, mindestens 130%, mindestens 135%, mindestens 140%, mindestens 145%, mindestens 150%, mindestens 155% oder mindestens 160% beträgt. Solche leistungsverbesserten Proteasen ermöglichen verbesserte Waschergebnisse an proteolytisch-sensitiven Anschmutzungen in einem weiten Temperaturbereich.

Die erfindungsgemäßen Proteasen weisen enzymatische Aktivität auf, das heißt, sie sind zur Hydrolyse von Peptiden und Proteinen befähigt, insbesondere in einem Wasch- oder Reinigungsmittel. Eine erfindungsgemäße Protease ist daher ein Enzym, welches die Hydrolyse von Amid/Peptidbindungen in Protein/Peptid-Substraten katalysiert und dadurch in der Lage ist, Proteine oder Peptide zu spalten. Ferner handelt es sich bei einer erfindungsgemäßen Protease vorzugsweise um eine reife (mature) Protease, d.h. um das katalytisch aktive Molekül ohne Signal- und/oder Propeptid(e). Soweit nicht anders angegeben beziehen sich auch die angegebenen Sequenzen auf jeweils reife (prozessierte) Enzyme.

In verschiedenen Ausführungsformen enthält die erfindungsgemäße Protease mindestens eine Aminosäuresubstitution, die aus der Gruppe bestehend aus P9H, Q10E, Q62E, L82F, P86S, P86A,

N130D, T141K, N187H, S236A oder T253S, jeweils bezogen auf die Nummerierung gemäß SEQ ID NO:1, ausgewählt ist. In weiter bevorzugten Ausführungsformen enthält die erfindungsgemäße Protease eine der folgenden Aminosäuresubstitutionsvarianten: (i) P86S und S236A; (ii) Q62E; (iii) Q62E und L82F; (iv) Q10E; (v) N130D, T141K und T253S; (vi) P86A; (vii) P9H, Q62E und L82F; (viii) Q62E, L82F und N187H; (ix) Q62E und N130D; oder (x) P86S, N187H und S236A, wobei die Nummerierung jeweils bezogen ist auf die Nummerierung gemäß SEQ ID NO:1.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung umfasst die Protease eine Aminosäuresequenz, die zu der in SEQ ID NO:1 angegebenen Aminosäuresequenz über deren Gesamtlänge zu mindestens 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 90,5%, 91%, 91,5%, 92%, 92,5%, 93%, 93,5%, 94%, 94,5%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5% und 98,8% identisch ist, und die an mindestens einer der Positionen 9, 10, 62, 82, 86, 130, 141, 187 oder 236 in der Zählung gemäß SEQ ID NO:1, eine oder mehrere der Aminosäuresubstitutionen 9H, 10E, 62E, 82F, 86S, 86A, 130D, 141K, 187H, 236A oder 253S aufweist. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung bedeutet das Merkmal, dass eine Protease die angegebenen Substitutionen aufweist, dass sie mindestens eine der entsprechenden Aminosäuren an den entsprechenden Positionen enthält, d.h. nicht alle der 10 Positionen anderweitig mutiert oder, beispielsweise durch Fragmentierung der Protease, deletiert sind. Die Aminosäuresequenzen derartiger Proteasen, die erfindungsgemäß bevorzugt sind, sind in SEQ ID Nos: 2-11 angegeben.

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. Sequenzvergleiche (Alignments), insbesondere multiple Sequenzvergleiche, werden mit Computerprogrammen erstellt. Häufig genutzt werden beispielsweise die Clustal-Serie (vgl. beispielsweise Chenna et al. (2003): Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. Nucleic Acid Research 31, 3497-3500), T-Coffee (vgl. beispielsweise Notredame et al. (2000): T-Coffee: A novel method for multiple sequence alignments. J. Mol. Biol. 302, 205-217) oder Programme, die auf diesen Programmen beziehungsweise Algorithmen basieren. Ferner möglich sind Sequenzvergleiche (Alignments) mit dem Computer-Programm Vector NTI® Suite 10.3 (Invitrogen Corporation, 1600 Faraday Avenue, Carlsbad, Kali-

fornien, USA) mit den vorgegebenen Standardparametern, dessen AlignX-Modul für die Sequenzvergleiche auf ClustalW basiert. Soweit nicht anders angegeben, wird die hierin angegebene Sequenzidentität mit dem BLAST-Algorithmus bestimmt.

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.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung bedeutet die Angabe, dass eine Aminosäureposition einer numerisch bezeichneten Position in SEQ ID NO:1 entspricht daher, dass die entsprechende Position der numerisch bezeichneten Position in SEQ ID NO:1 in einem wie oben definierten Alignment zugeordnet ist.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung ist die Protease dadurch gekennzeichnet, dass ihre Reinigungsleistung gegenüber derjenigen einer Protease, die eine Aminosäuresequenz umfasst, die der in SEQ ID NO:1 angegebenen Aminosäuresequenz entspricht, nicht signifikant verringert ist, d.h. mindestens 80 % der Referenzwaschleistung besitzt, vorzugsweise mindestens 100 %, noch bevorzugter mindestens 110 % oder mehr. Die Reinigungsleistung kann in einem Waschsysteem bestimmt werden, das ein Waschmittel in einer Dosierung zwischen 4,5 und 7,0 Gramm pro Liter Waschflotte sowie die Protease enthält, wobei die zu vergleichenden Proteasen konzentrationsgleich (bezogen auf aktives Protein) eingesetzt sind und die Reinigungsleistung gegenüber einer Anschmutzung auf Baumwolle bestimmt wird durch Messung des Reinigungsgrades der gewaschenen Textilien. Beispielsweise kann der Waschvorgang für 60 Minuten bei einer Temperatur von 40°C erfolgen und das Wasser eine Wasserhärte zwischen 15,5 und 16,5° (deutsche Härte) aufweisen. Die Konzentration der Protease in dem für dieses Waschsysteem bestimmten Waschmit-

tel beträgt 0,001-0,1 Gew.-%, vorzugsweise 0,01 bis 0,06 Gew.-%, bezogen auf aktives, gereinigtes Protein.

Ein flüssiges Referenzwaschmittel für ein solches Waschsystem kann wie folgt zusammengesetzt sein (alle Angaben in Gewichts-Prozent): 4,4% Alkylbenzolsulfonsäure, 5,6% weitere anionische Tenside, 2,4% C12-C18 Na-Salze von Fettsäuren (Seifen), 4,4% nicht-ionische Tenside, 0,2% Phosphonate, 1,4% Zitronensäure, 0,95% NaOH, 0,01% Entschäumer, 2% Glycerin, 0,08% Konservierungsstoffe, 1% Ethanol, Rest demineralisiertes Wasser. Bevorzugt beträgt die Dosierung des flüssigen Waschmittels zwischen 4,5 und 6,0 Gramm pro Liter Waschflotte, beispielsweise 4,7, 4,9 oder 5,9 Gramm pro Liter Waschflotte. Bevorzugt wird gewaschen in einem pH-Wertebereich zwischen pH 8 und pH 10,5, bevorzugt zwischen pH 8 und pH 9.

Im Rahmen der Erfindung erfolgt die Bestimmung der Reinigungsleistung beispielsweise bei 40°C unter Verwendung eines flüssigen Waschmittels wie vorstehend angegeben, wobei der Waschvorgang vorzugsweise für 60 Minuten bei 600 rpm erfolgt.

Der Weißegrad, d.h. die Aufhellung der Anschmutzungen, als Maß für die Reinigungsleistung wird mit optischen Messverfahren bestimmt, bevorzugt photometrisch. Ein hierfür geeignetes Gerät ist beispielsweise das Spektrometer Minolta CM508d. Üblicherweise werden die für die Messung eingesetzten Geräte zuvor mit einem Weißstandard, bevorzugt einem mitgelieferten Weißstandard, kalibriert.

Durch den aktivitätsgleichen Einsatz der jeweiligen Protease wird sichergestellt, dass auch bei einem etwaigen Auseinanderklaffen des Verhältnisses von Aktivsubstanz zu Gesamtprotein (die Werte der spezifischen Aktivität) die jeweiligen enzymatischen Eigenschaften, also beispielsweise die Reinigungsleistung an bestimmten Anschmutzungen, verglichen werden. Generell gilt, dass eine niedrige spezifische Aktivität durch Zugabe einer größeren Proteinmenge ausgeglichen werden kann.

Ansonsten sind Verfahren zur Bestimmung der Proteaseaktivität dem Fachmann auf dem Gebiet der Enzymtechnologie geläufig und werden von ihm routinemäßig angewendet. Beispielsweise sind solche Verfahren offenbart in Tenside, Band 7 (1970), S. 125-132. Alternativ kann die Protease-Aktivität über die Freisetzung des Chromophors para-Nitroanilin (pNA) aus dem Substrat suc-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Phe-p-Nitroanilid (AAPF) bestimmt werden. 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 und das Messintervall 20s bis 60s. Die Proteaseaktivität wird üblicherweise in Protease-Einheiten (PE) angegeben. Geeignete Proteaseaktivitäten betragen bei-

spielsweise 2,25, 5 oder 10 PE pro ml Waschflotte. Die Proteaseaktivität ist jedoch nicht gleich Null.

Ein alternativer Test zur Feststellung der proteolytischen Aktivität der erfindungsgemäßen Proteasen ist ein optisches Messverfahren, bevorzugt ein photometrisches Verfahren. Der hierfür geeignete Test umfasst die Protease-abhängige Spaltung des Substratproteins Casein. Dieses wird durch die Protease in eine Vielzahl kleinerer Teilprodukte gespalten. Die Gesamtheit dieser Teilprodukte weist eine erhöhte Absorption bei 290 nm gegenüber nicht gespaltenem Casein auf, wobei diese erhöhte Absorption unter Verwendung eines Photometers ermittelt werden und somit ein Rückschluss auf die enzymatische Aktivität der Protease gezogen werden kann.

Die Proteinkonzentration kann mit Hilfe bekannter Methoden, zum Beispiel dem BCA-Verfahren (Bicinchoninsäure; 2,2'-Bichinoly-4,4'-dicarbonsäure) oder dem Biuret-Verfahren (A. G. Gornall, C. S. Bardawill und M.M. David, J. Biol. Chem., 177 (1948), S. 751-766) bestimmt werden. Die Bestimmung der Aktivproteinkonzentration kann diesbezüglich über eine Titration der aktiven Zentren unter Verwendung eines geeigneten irreversiblen Inhibitors und Bestimmung der Restaktivität (vgl. M. Bender et al., J. Am. Chem. Soc. 88, 24 (1966), S. 5890-5913) erfolgen.

Zusätzlich zu den vorstehend erläuterten Aminosäureveränderungen können erfindungsgemäße Proteasen weitere Aminosäureveränderungen, insbesondere Aminosäure-Substitutionen, -Insertionen oder -Deletionen, aufweisen. Solche Proteasen sind beispielsweise durch gezielte genetische Veränderung, d.h. durch Mutageneseverfahren, weiterentwickelt und für bestimmte Einsatzzwecke oder hinsichtlich spezieller Eigenschaften (beispielsweise hinsichtlich ihrer katalytischen Aktivität, Stabilität, usw.) optimiert. Ferner können erfindungsgemäße Nukleinsäuren in Rekombinationsansätze eingebracht und damit zur Erzeugung völlig neuartiger Proteasen oder anderer Polypeptide genutzt werden.

Das Ziel ist es, in die bekannten Moleküle gezielte Mutationen wie Substitutionen, Insertionen oder Deletionen einzuführen, um beispielsweise die Reinigungsleistung von erfindungsgemäßen Enzymen zu verbessern. Hierzu können insbesondere die Oberflächenladungen und/oder der isoelektrische Punkt der Moleküle und dadurch ihre Wechselwirkungen mit dem Substrat verändert werden. So kann beispielsweise die Nettoladung der Enzyme verändert werden, um darüber die Substratbindung insbesondere für den Einsatz in Wasch- und Reinigungsmitteln zu beeinflussen. Alternativ oder ergänzend kann durch eine oder mehrere entsprechende Mutationen die Stabilität oder katalytische Aktivität der Protease erhöht und dadurch ihre Reinigungsleistung verbessert werden. Vorteilhafte Eigenschaften einzelner Mutationen, z.B. einzelner Substitutionen, können sich ergänzen. Eine hinsichtlich bestimmter Eigenschaften bereits optimierter Proteasen, zum Beispiel hinsichtlich ihrer Stabilität bei Lagerung, kann daher im Rahmen der Erfindung zusätzlich weiterentwickelt sein.

Für die Beschreibung von Substitutionen, die genau eine Aminosäureposition betreffen (Aminosäureaustausche), wird hierin folgende Konvention angewendet: zunächst wird die natürlicherweise vorhandene Aminosäure in Form des international gebräuchlichen Einbuchstaben-Codes bezeichnet, dann folgt die zugehörige Sequenzposition und schließlich die eingefügte Aminosäure. Mehrere Austausche innerhalb derselben Polypeptidkette werden durch Schrägstriche voneinander getrennt. Bei Insertionen sind nach der Sequenzposition zusätzliche Aminosäuren benannt. Bei Deletionen ist die fehlende Aminosäure durch ein Symbol, beispielsweise einen Stern oder einen Strich, ersetzt oder vor der entsprechenden Position ein Δ angegeben. Beispielsweise beschreibt P9H die Substitution von Prolin an Position 9 durch Histidin, P9HT die Insertion von Threonin nach der Aminosäure Histidin an Position 9 und P9* oder Δ P9 die Deletion von Prolin an Position 9. Diese Nomenklatur ist dem Fachmann auf dem Gebiet der Enzymtechnologie bekannt.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist daher eine Protease, die dadurch gekennzeichnet ist, dass sie aus einer Protease wie vorstehend beschrieben als Ausgangsmolekül erhältlich ist durch ein- oder mehrfache konservative Aminosäuresubstitution, wobei die Protease in der Zählung gemäß SEQ ID NO:1 noch mindestens eine der erfindungsgemäßen Aminosäuresubstitutionen an den Positionen, die Positionen 9, 10, 62, 82, 86, 130, 141, 187 und 236 in SEQ ID NO:1 entsprechen, aufweist, wie vorstehend beschrieben. Der Begriff "konservative Aminosäuresubstitution" bedeutet den Austausch (Substitution) eines Aminosäurerestes gegen einen anderen Aminosäurerest, wobei dieser Austausch nicht zu einer Änderung der Polarität oder Ladung an der Position der ausgetauschten Aminosäure führt, z. B. der Austausch eines unpolaren Aminosäurerestes gegen einen anderen unpolaren Aminosäurerest. Konservative Aminosäuresubstitutionen im Rahmen der Erfindung umfassen beispielsweise: G=A=S, I=V=L=M, D=E, N=Q, K=R, Y=F, S=T, G=A=I=V=L=M=Y=F=W=P=S=T.

Alternativ oder ergänzend ist die Protease dadurch gekennzeichnet, dass sie aus einer erfindungsgemäßen Protease als Ausgangsmolekül erhältlich ist durch Fragmentierung, Deletions-, Insertions- oder Substitutionsmutagenese und eine Aminosäuresequenz umfasst, die über eine Länge von mindestens 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270 oder 275 zusammenhängenden Aminosäuren mit dem Ausgangsmolekül übereinstimmt, wobei die im Ausgangsmolekül enthaltene(n) Aminosäuresubstitution(en) an einer oder mehreren der Positionen, die Positionen 9, 10, 62, 82, 86, 130, 141, 187 und 236 in SEQ ID NO:1 entsprechen, noch vorhanden ist/sind.

So ist es beispielsweise möglich, an den Termini oder in den Loops des Enzyms einzelne Aminosäuren zu deletieren, ohne dass dadurch die proteolytische Aktivität verloren oder vermindert wird. Ferner kann durch derartige Fragmentierung, Deletions-, Insertions- oder Substitutionsmutagenese beispielsweise auch die Allergenizität betreffender Enzyme gesenkt und somit insgesamt ihre Einsetzbarkeit verbessert werden. Vorteilhafterweise behalten die Enzyme auch nach der Mutagenese ihre proteolytische Aktivität, d.h. ihre proteolytische Aktivität entspricht mindestens derjenigen des

Ausgangsenzyms, d.h. in einer bevorzugten Ausführungsform beträgt die proteolytische Aktivität mindestens 80, vorzugsweise mindestens 90 % der Aktivität des Ausgangsenzyms. Auch weitere Substitutionen können vorteilhafte Wirkungen zeigen. Sowohl einzelne wie auch mehrere zusammenhängende Aminosäuren können gegen andere Aminosäuren ausgetauscht werden.

Alternativ oder ergänzend ist die Protease dadurch gekennzeichnet, dass sie aus einer erfindungsgemäßen Protease als Ausgangsmolekül erhältlich ist durch ein- oder mehrfache konservative Aminosäuresubstitution, wobei die Protease mindestens eine der Aminosäuresubstitutionen P9H, Q10E, Q62E, L82F, P86S, P86A, N130D, T141K, N187H, S236A oder T253S an den Positionen, die den Positionen 9, 10, 62, 82, 86, 130, 141, 187 und 236 gemäß SEQ ID NO:1 entsprechen, aufweist.

In weiteren Ausführungsformen ist die Protease dadurch gekennzeichnet, dass sie aus einer erfindungsgemäßen Protease als Ausgangsmolekül erhältlich ist durch Fragmentierung, Deletions-, Insertions- oder Substitutionsmutagenese und eine Aminosäuresequenz umfasst, die über eine Länge von mindestens 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270 oder 275 zusammenhängenden Aminosäuren mit dem Ausgangsmolekül übereinstimmt, wobei die Protease mindestens eine der Aminosäuresubstitutionen P9H, Q10E, Q62E, L82F, P86S, P86A, N130D, T141K, N187H, S236A oder T253S an den Positionen, die den Positionen 9, 10, 62, 82, 86, 130, 141, 187 und 236 gemäß SEQ ID NO:1 entsprechen, umfasst.

Die weiteren Aminosäurepositionen werden hierbei durch ein Alignment der Aminosäuresequenz einer erfindungsgemäßen Protease mit der Aminosäuresequenz der Protease aus *Bacillus pumilus*, wie sie in SEQ ID NO:1 angegeben ist, definiert. Weiterhin richtet sich die Zuordnung der Positionen nach dem reifen (maturen) Protein. Diese Zuordnung ist insbesondere auch anzuwenden, wenn die Aminosäuresequenz einer erfindungsgemäßen Protease eine höhere Zahl von Aminosäureresten umfasst als die Protease aus *Bacillus pumilus* gemäß SEQ ID NO:1. Ausgehend von den genannten Positionen in der Aminosäuresequenz der Protease aus *Bacillus pumilus* sind die Veränderungspositionen in einer erfindungsgemäßen Protease diejenigen, die eben diesen Positionen in einem Alignment zugeordnet sind.

Vorteilhafte Positionen für Sequenzveränderungen, insbesondere Substitutionen, der Protease aus *Bacillus pumilus*, die übertragen auf homologe Positionen der erfindungsgemäßen Proteasen bevorzugt von Bedeutung sind und der Protease vorteilhafte funktionelle Eigenschaften verleihen, sind demnach die Positionen, die in einem Alignment den Positionen 9, 10, 62, 82, 86, 130, 141, 187 und 236 in SEQ ID NO:1 entsprechen, d.h. in der Zählung gemäß SEQ ID NO:1. An den genannten Positionen liegen in dem Wildtypmolekül der Protease aus *Bacillus pumilus* folgende Aminosäurereste: P9, Q10, Q62, L82, P86, N130, T141, N187, S236 und T253.

Eine weitere Bestätigung der korrekten Zuordnung der zu verändernden Aminosäuren, d.h. insbesondere deren funktionelle Entsprechung, können Vergleichsversuche liefern, wonach die beiden auf der Basis eines Alignments einander zugeordneten Positionen in beiden miteinander verglichenen Proteasen auf die gleiche Weise verändert werden und beobachtet wird, ob bei beiden die enzymatische Aktivität auf gleiche Weise verändert wird. Geht beispielsweise ein Aminosäureaustausch in einer bestimmten Position der Protease aus *Bacillus pumilus* gemäß SEQ ID NO:1 mit einer Veränderung eines enzymatischen Parameters einher, beispielsweise mit der Erhöhung des K_M -Wertes, und wird eine entsprechende Veränderung des enzymatischen Parameters, beispielsweise also ebenfalls eine Erhöhung des K_M -Wertes, in einer erfindungsgemäßen Protease-Variante beobachtet, deren Aminosäureaustausch durch dieselbe eingeführte Aminosäure erreicht wurde, so ist hierin eine Bestätigung der korrekten Zuordnung zu sehen.

Alle genannten Sachverhalte sind auch auf die erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung einer Protease anwendbar. Demnach umfasst ein erfindungsgemäßes Verfahren ferner einen oder mehrere der folgenden Verfahrensschritte:

- a) Einbringen einer ein- oder mehrfachen konservativen Aminosäuresubstitution, wobei die Protease mindestens eine der Aminosäuresubstitutionen P9H, Q10E, Q62E, L82F, P86S, P86A, N130D, T141K, N187H, S236A oder T253S an den Positionen, die den Positionen 9, 10, 62, 82, 86, 130, 141, 187 und 236 gemäß SEQ ID NO:1 entsprechen, umfasst;
- b) Veränderung der Aminosäuresequenz durch Fragmentierung, Deletions-, Insertions- oder Substitutionsmutagenese derart, dass die Protease eine Aminosäuresequenz umfasst, die über eine Länge von mindestens 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270 oder 275 zusammenhängenden Aminosäuren mit dem Ausgangsmolekül übereinstimmt, wobei die Protease mindestens eine der Aminosäuresubstitutionen P9H, Q10E, Q62E, L82F, P86S, P86A, N130D, T141K, N187H, S236A oder T253S an den Positionen, die den Positionen 9, 10, 62, 82, 86, 130, 141, 187 und 236 gemäß SEQ ID NO:1 entsprechen, umfasst.

Sämtliche Ausführungen gelten auch für die erfindungsgemäßen Verfahren.

In weiteren Ausgestaltungen der Erfindung ist die Protease beziehungsweise die mit einem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellte Protease noch mindestens zu 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 90,5%, 91%, 91,5%, 92%, 92,5%, 93%, 93,5%, 94%, 94,5%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, oder 98,8% identisch zu der in SEQ ID NO:1 angegebenen Aminosäuresequenz über deren Gesamtlänge. Alternativ ist die Protease beziehungsweise die mit einem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellte Protease noch mindestens zu 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%,

90,5%, 91%, 91,5%, 92%, 92,5%, 93%, 93,5%, 94%, 94,5%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, oder 98% identisch zu einer der in SEQ ID Nos:2-11 angegebenen Aminosäuresequenzen über deren Gesamtlänge. Die Protease beziehungsweise die mit einem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellte Protease weist eine Aminosäuresubstitution an mindestens einer der Positionen P9, Q10, Q62, L82, P86, N130, T141, N187, S236 oder T253, jeweils bezogen auf die Nummerierung gemäß SEQ ID NO:1, auf. In bevorzugteren Ausführungsformen ist die Aminosäuresubstitution mindestens eine ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus P9H, Q10E, Q62E, L82F, P86S, P86A, N130D, T141K, N187H, S236A und T253S, jeweils bezogen auf die Nummerierung gemäß SEQ ID NO:1. In weiter bevorzugten Ausführungsformen umfasst die Protease eine der folgenden Aminosäuresubstitutionsvarianten: (i) P86S und S236A; (ii) Q62E; (iii) Q62E und L82F; (iv) Q10E; (v) N130D, T141K und T253S; (vi) P86A; (vii) P9H, Q62E und L82F; (viii) Q62E, L82F und N187H; (ix) Q62E und N130D; oder (x) P86S, N187H und S236A.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine zuvor beschriebene Protease, die zusätzlich stabilisiert ist, insbesondere durch eine oder mehrere Mutationen, beispielsweise Substitutionen, oder durch Kopplung an ein Polymer. Eine Erhöhung der Stabilität bei der Lagerung und/oder während des Einsatzes, beispielsweise beim Waschprozess, führt dazu, dass die enzymatische Aktivität länger anhält und damit die Reinigungsleistung verbessert wird. Grundsätzlich kommen alle im Stand der Technik beschriebenen und/oder zweckmäßigen Stabilisierungsmöglichkeiten in Betracht. Bevorzugt sind solche Stabilisierungen, die über Mutationen des Enzyms selbst erreicht werden, da solche Stabilisierungen im Anschluss an die Gewinnung des Enzyms keine weiteren Arbeitsschritte erfordern. Beispiele für hierfür geeignete Sequenzveränderungen sind vorstehend genannt. Weitere geeignete Sequenzveränderungen sind aus dem Stand der Technik bekannt.

Weitere Möglichkeiten der Stabilisierung sind beispielsweise:

- Veränderung der Bindung von Metallionen, insbesondere der Calcium-Bindungsstellen, beispielsweise durch Austauschen von einer oder mehreren der an der Calcium-Bindung beteiligten Aminosäure(n) gegen eine oder mehrere negativ geladene Aminosäuren und/oder durch Einführen von Sequenzveränderungen in mindestens einer der Folgen der beiden Aminosäuren Arginin/Glycin;
- Schutz gegen den Einfluss von denaturierenden Agentien wie Tensiden durch Mutationen, die eine Veränderung der Aminosäuresequenz auf oder an der Oberfläche des Proteins bewirken;
- Austausch von Aminosäuren, die nahe dem N-Terminus liegen, gegen solche, die vermutlich über nicht-kovalente Wechselwirkungen mit dem Rest des Moleküls in Kontakt treten und somit einen Beitrag zur Aufrechterhaltung der globulären Struktur leisten.

Bevorzugte Ausführungsformen sind solche, bei denen das Enzym auf mehrere Arten stabilisiert wird, da mehrere stabilisierende Mutationen additiv oder synergistisch wirken.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine Protease wie vorstehend beschrieben, die dadurch gekennzeichnet ist, dass sie mindestens eine chemische Modifikation aufweist. Eine Protease mit einer solchen Veränderung wird als Derivat bezeichnet, d.h. die Protease ist derivatisiert.

Unter Derivaten werden im Sinne der vorliegenden Anmeldung demnach solche Proteine verstanden, deren reine Aminosäurekette chemisch modifiziert worden ist. Solche Derivatisierungen können beispielsweise *in vivo* durch die Wirtszelle erfolgen, die das Protein exprimiert. Diesbezüglich sind Kopplungen niedrigmolekularer Verbindungen wie von Lipiden oder Oligosacchariden besonders hervorzuheben. Derivatisierungen können aber auch *in vitro* durchgeführt werden, etwa durch die chemische Umwandlung einer Seitenkette einer Aminosäure oder durch kovalente Bindung einer anderen Verbindung an das Protein. Beispielsweise ist die Kopplung von Aminen an Carboxylgruppen eines Enzyms zur Veränderung des isoelektrischen Punkts möglich. Eine solche andere Verbindung kann auch ein weiteres Protein sein, das beispielsweise über bifunktionelle chemische Verbindungen an ein erfindungsgemäßes Protein gebunden wird. Ebenso ist unter Derivatisierung die kovalente Bindung an einen makromolekularen Träger zu verstehen, oder auch ein nichtkovalenter Einschluss in geeignete makromolekulare Käfigstrukturen. Derivatisierungen können beispielsweise die Substratspezifität oder die Bindungsstärke an das Substrat beeinflussen oder eine vorübergehende Blockierung der enzymatischen Aktivität herbeiführen, wenn es sich bei der angekoppelten Substanz um einen Inhibitor handelt. Dies kann beispielsweise für den Zeitraum der Lagerung sinnvoll sein. Derartige Modifikationen können ferner die Stabilität oder die enzymatische Aktivität beeinflussen. Sie können ferner auch dazu dienen, die Allergenizität und/oder Immunogenizität des Proteins herabzusetzen und damit beispielsweise dessen Hautverträglichkeit zu erhöhen. Beispielsweise können Kopplungen mit makromolekularen Verbindungen, beispielsweise Polyethylenglykol, das Protein hinsichtlich der Stabilität und/oder Hautverträglichkeit verbessern.

Unter Derivaten eines erfindungsgemäßen Proteins können im weitesten Sinne auch Präparationen dieser Proteine verstanden werden. Je nach Gewinnung, Aufarbeitung oder Präparation kann ein Protein mit diversen anderen Stoffen kombiniert sein, beispielsweise aus der Kultur der produzierenden Mikroorganismen. Ein Protein kann auch, beispielsweise zur Erhöhung seiner Lagerstabilität, mit anderen Stoffen gezielt versetzt worden sein. Erfindungsgemäß sind deshalb auch alle Präparationen eines erfindungsgemäßen Proteins. Das ist auch unabhängig davon, ob es in einer bestimmten Präparation tatsächlich diese enzymatische Aktivität entfaltet oder nicht. Denn es kann gewünscht sein, dass es bei der Lagerung keine oder nur geringe Aktivität besitzt, und erst zum Zeitpunkt der Verwendung seine enzymatische Funktion entfaltet. Dies kann beispielsweise über entsprechende Begleitstoffe gesteuert werden. Insbesondere die gemeinsame Präparation von Proteasen mit spezifischen Inhibitoren ist diesbezüglich möglich.

Unter allen vorstehend beschriebenen Proteasen beziehungsweise Proteasevarianten und/oder Derivaten sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung diejenigen besonders bevorzugt, deren katalytische Aktivität mindestens einer derjenigen der Proteasen gemäß SEQ ID Nos: 2-11 entspricht, und/oder deren Reinigungsleistung mindestens einer derjenigen der Proteasen gemäß SEQ ID Nos: 2-11 entspricht, wobei die Reinigungsleistung in einem Waschsystem bestimmt wird wie vorstehend beschrieben.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine Nukleinsäure, die für eine erfindungsgemäße Protease codiert, sowie ein Vektor enthaltend eine solche Nukleinsäure, insbesondere ein Klonierungsvektor oder ein Expressionsvektor.

Hierbei kann es sich um DNA- oder RNA-Moleküle handeln. Sie können als Einzelstrang, als ein zu diesem Einzelstrang komplementärer Einzelstrang oder als Doppelstrang vorliegen. Insbesondere bei DNA-Molekülen sind die Sequenzen beider komplementärer Stränge in jeweils allen drei möglichen Leserastern zu berücksichtigen. Ferner ist zu berücksichtigen, dass verschiedene Codons, also Basentriplets, für die gleichen Aminosäuren codieren können, so dass eine bestimmte Aminosäuresequenz von mehreren unterschiedlichen Nukleinsäuren codiert werden kann. Auf Grund dieser Degeneriertheit des genetischen Codes sind sämtliche Nukleinsäuresequenzen in diesen Erfindungsgegenstand mit eingeschlossen, die eine der vorstehend beschriebenen Proteasen codieren können. Der Fachmann ist in der Lage, diese Nukleinsäuresequenzen zweifelsfrei zu bestimmen, da trotz der Degeneriertheit des genetischen Codes einzelnen Codons definierte Aminosäuren zuzuordnen sind. Daher kann der Fachmann ausgehend von einer Aminosäuresequenz für diese Aminosäuresequenz codierende Nukleinsäuren problemlos ermitteln. Weiterhin können bei erfindungsgemäßen Nukleinsäuren ein oder mehrere Codons durch synonyme Codons ersetzt sein. Dieser Aspekt bezieht sich insbesondere auf die heterologe Expression der erfindungsgemäßen Enzyme. So besitzt jeder Organismus, beispielsweise eine Wirtszelle eines Produktionsstammes, eine bestimmte Codon-Verwendung. Unter Codon-Verwendung wird die Übersetzung des genetischen Codes in Aminosäuren durch den jeweiligen Organismus verstanden. Es kann zu Engpässen in der Proteinbiosynthese kommen, wenn die auf der Nukleinsäure liegenden Codons in dem Organismus einer vergleichsweise geringen Zahl von beladenen tRNA-Molekülen gegenüberstehen. Obwohl für die gleiche Aminosäure codierend führt das dazu, dass in dem Organismus ein Codon weniger effizient translatiert wird als ein synonymes Codon, das für dieselbe Aminosäure codiert. Auf Grund des Vorliegens einer höheren Anzahl von tRNA-Molekülen für das synonyme Codon kann dieses in dem Organismus effizienter translatiert werden.

Einem Fachmann ist es über heutzutage allgemein bekannte Methoden, wie beispielsweise die chemische Synthese oder die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in Verbindung mit molekularbiologischen und/oder proteinchemischen Standardmethoden möglich, anhand bekannter DNA- und/oder Aminosäuresequenzen die entsprechenden Nukleinsäuren bis hin zu vollständigen Ge-

nen herzustellen. Derartige Methoden sind beispielsweise aus Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, 3. Edition Cold Spring Laboratory Press. bekannt.

Unter Vektoren werden im Sinne der vorliegenden Erfindung aus Nukleinsäuren bestehende Elemente verstanden, die als kennzeichnenden Nukleinsäurebereich eine erfindungsgemäße Nukleinsäure enthalten. Sie vermögen diese in einer Spezies oder einer Zelllinie über mehrere Generationen oder Zellteilungen hinweg als stabiles genetisches Element zu etablieren. Vektoren sind insbesondere bei der Verwendung in Bakterien spezielle Plasmide, also zirkulare genetische Elemente. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird eine erfindungsgemäße Nukleinsäure in einen Vektor kloniert. Zu den Vektoren zählen beispielsweise solche, deren Ursprung bakterielle Plasmide, Viren oder Bacteriophagen sind, oder überwiegend synthetische Vektoren oder Plasmide mit Elementen verschiedenster Herkunft. Mit den weiteren jeweils vorhandenen genetischen Elementen vermögen Vektoren sich in den betreffenden Wirtszellen über mehrere Generationen hinweg als stabile Einheiten zu etablieren. Sie können extrachromosomal als eigene Einheiten vorliegen oder in ein Chromosom oder chromosomale DNA integrieren.

Expressionsvektoren umfassen Nukleinsäuresequenzen, die sie dazu befähigen, in den sie enthaltenden Wirtszellen, vorzugsweise Mikroorganismen, besonders bevorzugt Bakterien, zu replizieren und dort eine enthaltene Nukleinsäure zur Expression zu bringen. Die Expression wird insbesondere von dem oder den Promotoren beeinflusst, welche die Transkription regulieren. Prinzipiell kann die Expression durch den natürlichen, ursprünglich vor der zu exprimierenden Nukleinsäure lokalisierten Promotor erfolgen, aber auch durch einen auf dem Expressionsvektor bereitgestellten Promotor der Wirtszelle oder auch durch einen modifizierten oder einen völlig anderen Promotor eines anderen Organismus oder einer anderen Wirtszelle. Im vorliegenden Fall wird zumindest ein Promotor für die Expression einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure zur Verfügung gestellt und für deren Expression genutzt. Expressionsvektoren können ferner regulierbar sein, beispielsweise durch Änderung der Kultivierungsbedingungen oder bei Erreichen einer bestimmten Zelldichte der sie enthaltenden Wirtszellen oder durch Zugabe von bestimmten Substanzen, insbesondere Aktivatoren der Genexpression. Ein Beispiel für eine solche Substanz ist das Galactose-Derivat Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG), welches als Aktivator des bakteriellen Lactose-Operons (lac-Operons) verwendet wird. Im Gegensatz zu Expressionsvektoren wird die enthaltene Nukleinsäure in Klonierungsvektoren nicht exprimiert.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine nicht menschliche Wirtszelle, die eine erfindungsgemäße Nukleinsäure oder einen erfindungsgemäßen Vektor beinhaltet, oder die eine erfindungsgemäße Protease beinhaltet, insbesondere eine, die die Protease in das die Wirtszelle umgebende Medium sezerniert. Bevorzugt wird eine erfindungsgemäße Nukleinsäure oder ein erfindungsgemäßer Vektor in einen Mikroorganismus transformiert, der dann eine erfindungsgemäße Wirts-

zelle darstellt. Alternativ können auch einzelne Komponenten, d.h. Nukleinsäure-Teile oder -Fragmente einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure derart in eine Wirtszelle eingebracht werden, dass die dann resultierende Wirtszelle eine erfindungsgemäße Nukleinsäure oder einen erfindungsgemäßen Vektor enthält. Dieses Vorgehen eignet sich besonders dann, wenn die Wirtszelle bereits einen oder mehrere Bestandteile einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure oder eines erfindungsgemäßen Vektors enthält und die weiteren Bestandteile dann entsprechend ergänzt werden. Verfahren zur Transformation von Zellen sind im Stand der Technik etabliert und dem Fachmann hinlänglich bekannt. Als Wirtszellen eignen sich prinzipiell alle Zellen, das heißt prokaryotische oder eukaryotische Zellen. Bevorzugt sind solche Wirtszellen, die sich genetisch vorteilhaft handhaben lassen, was beispielsweise die Transformation mit der Nukleinsäure oder dem Vektor und dessen stabile Etablierung angeht, beispielsweise einzellige Pilze oder Bakterien. Ferner zeichnen sich bevorzugte Wirtszellen durch eine gute mikrobiologische und biotechnologische Handhabbarkeit aus. Das betrifft beispielsweise leichte Kultivierbarkeit, hohe Wachstumsraten, geringe Anforderungen an Fermentationsmedien und gute Produktions- und Sekretionsraten für Fremdproteine. Bevorzugte erfindungsgemäße Wirtszellen sezernieren das (transgen) exprimierte Protein in das die Wirtszellen umgebende Medium. Ferner können die Proteasen von den sie produzierenden Zellen nach deren Herstellung modifiziert werden, beispielsweise durch Anknüpfung von Zuckermolekülen, Formylierungen, Aminierungen, usw. Solche posttranslationale Modifikationen können die Protease funktionell beeinflussen.

Weitere bevorzugte Ausführungsformen stellen solche Wirtszellen dar, die aufgrund genetischer Regulationselemente, die beispielsweise auf dem Vektor zur Verfügung gestellt werden, aber auch von vornherein in diesen Zellen vorhanden sein können, in ihrer Aktivität regulierbar sind. Beispielsweise durch kontrollierte Zugabe von chemischen Verbindungen, die als Aktivatoren dienen, durch Änderung der Kultivierungsbedingungen oder bei Erreichen einer bestimmten Zelldichte können diese zur Expression angeregt werden. Dies ermöglicht eine wirtschaftliche Produktion der erfindungsgemäßen Proteine. Ein Beispiel für eine solche Verbindung ist IPTG wie vorstehend beschrieben.

Bevorzugte Wirtszellen sind prokaryontische oder bakterielle Zellen. Bakterien zeichnen sich durch kurze Generationszeiten und geringe Ansprüche an die Kultivierungsbedingungen aus. Dadurch können kostengünstige Kultivierungsverfahren oder Herstellungsverfahren etabliert werden. Zudem verfügt der Fachmann bei Bakterien in der Fermentationstechnik über einen reichhaltigen Erfahrungsschatz. Für eine spezielle Produktion können aus verschiedensten, im Einzelfall experimentell zu ermittelnden Gründen wie Nährstoffquellen, Produktbildungsrate, Zeitbedarf usw., gramnegative oder grampositive Bakterien geeignet sein.

Bei gramnegativen Bakterien wie beispielsweise *Escherichia coli* wird eine Vielzahl von Proteinen in den periplasmatischen Raum sezerniert, also in das Kompartiment zwischen den beiden die

Zellen einschließenden Membranen. Dies kann für spezielle Anwendungen vorteilhaft sein. Ferner können auch gramnegative Bakterien so ausgestaltet werden, dass sie die exprimierten Proteine nicht nur in den periplasmatischen Raum, sondern in das das Bakterium umgebende Medium ausschleusen. Grampositive Bakterien wie beispielsweise Bacilli oder Actinomyceten oder andere Vertreter der *Actinomycetales* besitzen demgegenüber keine äußere Membran, so dass sezernierte Proteine sogleich in das die Bakterien umgebende Medium, in der Regel das Nährmedium, abgegeben werden, aus welchem sich die exprimierten Proteine aufreinigen lassen. Sie können aus dem Medium direkt isoliert oder weiter prozessiert werden. Zudem sind grampositive Bakterien mit den meisten Herkunftsorganismen für technisch wichtige Enzyme verwandt oder identisch und bilden meist selbst vergleichbare Enzyme, so dass sie über eine ähnliche Codon-Verwendung verfügen und ihr Protein-Syntheseapparat naturgemäß entsprechend ausgerichtet ist.

Erfindungsgemäße Wirtszellen können hinsichtlich ihrer Anforderungen an die Kulturbedingungen verändert sein, andere oder zusätzliche Selektionsmarker aufweisen oder noch andere oder zusätzliche Proteine exprimieren. Es kann sich insbesondere auch um solche Wirtszellen handeln, die mehrere Proteine oder Enzyme transgen exprimieren.

Die vorliegende Erfindung ist prinzipiell auf alle Mikroorganismen, insbesondere auf alle fermentierbaren Mikroorganismen, besonders bevorzugt auf solche der Gattung *Bacillus*, anwendbar und führt dazu, dass sich durch den Einsatz solcher Mikroorganismen erfindungsgemäße Proteine herstellen lassen. Solche Mikroorganismen stellen dann Wirtszellen im Sinne der Erfindung dar.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung ist die Wirtszelle dadurch gekennzeichnet, dass sie ein Bakterium ist, bevorzugt eines, das ausgewählt ist aus der Gruppe der Gattungen von *Escherichia*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Corynebakterium*, *Arthrobacter*, *Streptomyces*, *Stenotrophomonas* und *Pseudomonas*, weiter bevorzugt eines, das ausgewählt ist aus der Gruppe von *Escherichia coli*, *Klebsiella planticola*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus alcalophilus*, *Bacillus globigii*, *Bacillus gibsonii*, *Bacillus clausii*, *Bacillus halodurans*, *Bacillus pumilus*, *Staphylococcus carnosus*, *Corynebacterium glutamicum*, *Arthrobacter oxidans*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces coelicolor* und *Stenotrophomonas maltophilia*.

Die Wirtszelle kann aber auch eine eukaryontische Zelle sein, die dadurch gekennzeichnet ist, dass sie einen Zellkern besitzt. Einen weiteren Gegenstand der Erfindung stellt daher eine Wirtszelle dar, die dadurch gekennzeichnet ist, dass sie einen Zellkern besitzt. Im Gegensatz zu prokaryontischen Zellen sind eukaryontische Zellen in der Lage, das gebildete Protein posttranslational zu modifizieren. Beispiele dafür sind Pilze wie Actinomyceten oder Hefen wie *Saccharomyces* oder *Kluyveromyces*. Dies kann beispielsweise dann besonders vorteilhaft sein, wenn die Proteine im Zusammenhang mit ihrer Synthese spezifische Modifikationen erfahren sollen, die derartige Sys-

teme ermöglichen. Zu den Modifikationen, die eukaryontische Systeme besonders im Zusammenhang mit der Proteinsynthese durchführen, gehören beispielsweise die Bindung niedermolekularer Verbindungen wie Membrananker oder Oligosaccharide. Derartige Oligosaccharid-Modifikationen können beispielsweise zur Senkung der Allergenizität eines exprimierten Proteins wünschenswert sein. Auch eine Coexpression mit den natürlicherweise von derartigen Zellen gebildeten Enzymen, wie beispielsweise Cellulasen, kann vorteilhaft sein. Ferner können sich beispielsweise thermophile pilzliche Expressionssysteme besonders zur Expression temperaturbeständiger Proteine oder Varianten eignen.

Die erfindungsgemäßen Wirtszellen werden in üblicher Weise kultiviert und fermentiert, beispielsweise in diskontinuierlichen oder kontinuierlichen Systemen. Im ersten Fall wird ein geeignetes Nährmedium mit den Wirtszellen beimpft und das Produkt nach einem experimentell zu ermittelnden Zeitraum aus dem Medium geerntet. Kontinuierliche Fermentationen zeichnen sich durch Erreichen eines Fließgleichgewichts aus, in dem über einen vergleichsweise langen Zeitraum Zellen teilweise absterben aber auch nachwachsen und gleichzeitig aus dem Medium das gebildete Protein entnommen werden kann.

Erfindungsgemäße Wirtszellen werden bevorzugt verwendet, um erfindungsgemäße Proteasen herzustellen. Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist daher ein Verfahren zur Herstellung einer Protease umfassend

- a) Kultivieren einer erfindungsgemäßen Wirtszelle, und
- b) Isolieren der Protease aus dem Kulturmedium oder aus der Wirtszelle.

Dieser Erfindungsgegenstand umfasst bevorzugt Fermentationsverfahren. Fermentationsverfahren sind an sich aus dem Stand der Technik bekannt und stellen den eigentlichen großtechnischen Produktionsschritt dar, in der Regel gefolgt von einer geeigneten Aufreinigungsmethode des hergestellten Produktes, beispielsweise der erfindungsgemäßen Proteasen. Alle Fermentationsverfahren, die auf einem entsprechenden Verfahren zur Herstellung einer erfindungsgemäßen Protease beruhen, stellen Ausführungsformen dieses Erfindungsgegenstandes dar.

Fermentationsverfahren, die dadurch gekennzeichnet sind, dass die Fermentation über eine Zulaufstrategie durchgeführt wird, kommen insbesondere in Betracht. Hierbei werden die Medienbestandteile, die durch die fortlaufende Kultivierung verbraucht werden, zugefüttert. Hierdurch können beträchtliche Steigerungen sowohl in der Zelldichte als auch in der Zellmasse beziehungsweise Trockenmasse und/oder insbesondere in der Aktivität der interessierenden Protease erreicht werden. Ferner kann die Fermentation auch so gestaltet werden, dass unerwünschte Stoffwechselprodukte herausgefiltert oder durch Zugabe von Puffer oder jeweils passende Gegenionen neutralisiert werden.

Die hergestellte Protease kann aus dem Fermentationsmedium geerntet werden. Ein solches Fermentationsverfahren ist gegenüber einer Isolation der Protease aus der Wirtszelle, d.h. einer Produktaufbereitung aus der Zellmasse (Trockenmasse) bevorzugt, erfordert jedoch die Zurverfügungstellung von geeigneten Wirtszellen oder von einem oder mehreren geeigneten Sekretionsmarkern oder -mechanismen und/oder Transportsystemen, damit die Wirtszellen die Protease in das Fermentationsmedium sezernieren. Ohne Sekretion kann alternativ die Isolation der Protease aus der Wirtszelle, d.h. eine Aufreinigung derselben aus der Zellmasse, erfolgen, beispielsweise durch Fällung mit Ammoniumsulfat oder Ethanol, oder durch chromatographische Reinigung.

Alle vorstehend ausgeführten Sachverhalte können zu Verfahren kombiniert werden, um erfindungsgemäße Protease herzustellen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Mittel, das dadurch gekennzeichnet ist, dass es eine erfindungsgemäße Protease wie vorstehend beschrieben enthält. Bevorzugt ist das Mittel als ein Wasch- oder Reinigungsmittel.

Zu diesem Erfindungsgegenstand zählen 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.

Die erfindungsgemäßen Wasch- oder Reinigungsmittel, die als pulverförmige Feststoffe, in nachverdichteter Teilchenform, als homogene Lösungen oder Suspensionen vorliegen können, können neben einer erfindungsgemäßen Protease alle bekannten und in derartigen Mitteln üblichen Inhaltsstoffe enthalten, wobei bevorzugt mindestens ein weiterer Inhaltsstoff in dem Mittel vorhanden

ist. Die erfindungsgemäßen Mittel können insbesondere Tenside, Builder (Gerüststoffe), Bleichmittel, wie insbesondere Persauerstoffverbindungen, und/oder Bleichaktivatoren enthalten. Ferner können sie wassermischbare organische Lösungsmittel, weitere Enzyme, Sequestrierungsmittel, Elektrolyte, pH-Regulatoren und/oder weitere Hilfsstoffe wie optische Aufheller, Vergrauungsinhibitoren, Schaumregulatoren sowie Farb- und Duftstoffe sowie Kombinationen hiervon enthalten.

Insbesondere eine Kombination einer erfindungsgemäßen Protease mit einem oder mehreren weiteren Inhaltsstoff(en) des Mittels ist vorteilhaft, da ein solches Mittel in bevorzugten erfindungsgemäßen Ausgestaltungen eine verbesserte Reinigungsleistung durch sich ergebende Synergismen aufweist. Insbesondere durch die Kombination einer erfindungsgemäßen Protease mit einem Tensid und/oder einem Builder (Gerüststoff) und/oder einer Persauerstoffverbindung und/oder einem Bleichaktivator kann ein solcher Synergismus erreicht werden. Allerdings kann in bevorzugten Ausführungsformen das erfindungsgemäße Mittel keine Borsäure enthalten.

Vorteilhafte Inhaltsstoffe erfindungsgemäßer 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. Auf diese Offenbarung wird ausdrücklich Bezug genommen und der dortige Offenbarungsgehalt in die vorliegende Patentanmeldung einbezogen.

Ein erfindungsgemäßes Mittel enthält die Protease vorteilhafterweise in einer Menge von 2µg bis 20mg, vorzugsweise von 5µg bis 17,5mg, besonders bevorzugt von 20µg bis 15mg und ganz besonders bevorzugt von 50µg bis 10mg pro g des Mittels. Ferner kann die in dem Mittel enthaltene Protease, und/oder weitere Inhaltsstoffe des Mittels, mit einer bei Raumtemperatur oder bei Abwesenheit von Wasser für das Enzym undurchlässigen Substanz umhüllt sein, welche unter Anwendungsbedingungen des Mittels durchlässig für das Enzym wird. Eine solche Ausführungsform der Erfindung ist somit dadurch gekennzeichnet, dass die Protease mit einer bei Raumtemperatur oder bei Abwesenheit von Wasser für die Protease undurchlässigen Substanz umhüllt ist. Weiterhin kann auch das Wasch- oder Reinigungsmittel selbst in einem Behältnis, vorzugsweise einem luftdurchlässigen Behältnis, verpackt sein, aus dem es kurz vor Gebrauch oder während des Waschvorgangs freigesetzt wird.

In weiteren Ausführungsformen der Erfindung ist das Mittel dadurch gekennzeichnet, dass es

- (a) in fester Form vorliegt, insbesondere als rieselfähiges Pulver mit einem Schüttgewicht von 300 g/l bis 1200 g/l, insbesondere 500 g/l bis 900 g/l, oder
- (b) in pastöser oder in flüssiger Form vorliegt, und/oder
- (c) in gelförmiger oder dosierbeutel förmiger (Pouches) Form vorliegt, und/oder
- (d) als Einkomponentensystem vorliegt, oder
- (e) in mehrere Komponenten aufgeteilt ist.

Diese Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung umfassen alle festen, pulverförmigen, flüssigen, gelförmigen oder pastösen Darreichungsformen erfindungsgemäßer 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 Flüssigwaschmittels oder einer nicht-wässrigen Paste oder in Form eines wässrigen Flüssigwaschmittels oder einer wasserhaltigen 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.

Erfindungsgemäße Wasch- oder Reinigungsmittel können ausschließlich eine Protease enthalten. Alternativ können sie auch weitere hydrolytische Enzyme oder andere Enzyme in einer für die Wirksamkeit des Mittels zweckmäßigen Konzentration enthalten. Eine weitere Ausführungsform der Erfindung stellen somit Mittel dar, die ferner eines oder mehrere weitere Enzyme umfassen. Als weitere Enzyme bevorzugt einsetzbar sind alle Enzyme, die in dem erfindungsgemäßen Mittel eine katalytische Aktivität entfalten können, insbesondere eine Lipase, Amylase, Cellulase, Hemicellulase, Mannanase, Tannase, Xylanase, Xanthanase, Xyloglucanase, β -Glucosidase, Pektinase, Carrageenase, Perhydrolase, Oxidase, Oxidoreduktase oder andere - von den erfindungsgemäßen Protease unterscheidbare - Protease, sowie deren Gemische. Weitere Enzyme sind in dem Mittel vorteilhafterweise jeweils in einer Menge von 1×10^{-8} bis 5 Gewichts-Prozent bezogen auf aktives Protein enthalten. Zunehmend bevorzugt ist jedes weitere Enzym in einer Menge von 1×10^{-7} -3 Gew.-%, von 0,00001-1 Gew.-%, von 0,00005-0,5 Gew.-%, von 0,0001 bis 0,1 Gew.-% und besonders bevorzugt von 0,0001 bis 0,05 Gew.-% in erfindungsgemäßen Mitteln enthalten, bezogen auf aktives Protein. Besonders bevorzugt zeigen die Enzyme synergistische Reinigungsleistungen gegenüber bestimmten Anschmutzungen oder Flecken, d.h. die in der Mittelzusammensetzung enthaltenen Enzyme unterstützen sich in ihrer Reinigungsleistung gegenseitig. Ganz besonders bevorzugt liegt ein solcher Synergismus vor zwischen der erfindungsgemäß enthaltenen Protease und einem weiteren Enzym eines erfindungsgemäßen Mittels, darunter insbesondere zwischen der genannten Protease und einer Amylase und/oder einer Lipase und/oder einer Mannanase und/oder einer Cellulase und/oder einer Pektinase. Synergistische Effekte können nicht nur zwischen verschiedenen Enzymen, sondern auch zwischen einem oder mehreren Enzymen und weiteren Inhaltsstoffen des erfindungsgemäßen Mittels auftreten.

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

erfindungsgemäße Protease katalytisch aktiv wird, insbesondere derart, dass die Protease in einer Menge von 40µg bis 4g, vorzugsweise von 50µg bis 3g, besonders bevorzugt von 100µg bis 2g und ganz besonders bevorzugt von 200µg bis 1g eingesetzt wird.

In verschiedenen Ausführungsformen zeichnet sich das oben beschriebene Verfahren dadurch aus, dass die Protease bei einer Temperatur von 0-100°C, bevorzugt 0-60°C, weiter bevorzugt 20-45°C und am meisten bevorzugt bei 40°C eingesetzt 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 erfindungsgemäßen Wasch- oder Reinigungsmittels oder einer erfindungsgemäßen Protease bereichert werden und stellen dann Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung dar. Alle Sachverhalte, Gegenstände und Ausführungsformen, die für erfindungsgemäße Protease und sie enthaltende Mittel beschrieben sind, sind auch auf diesen Erfindungsgegenstand anwendbar. Daher wird an dieser Stelle ausdrücklich auf die Offenbarung an entsprechender Stelle verwiesen mit dem Hinweis, dass diese Offenbarung auch für die vorstehenden erfindungsgemäßen Verfahren gilt.

Da erfindungsgemäße Proteasen natürlicherweise bereits eine hydrolytische Aktivität besitzen und diese auch in Medien entfalten, die sonst keine Reinigungskraft besitzen wie beispielsweise in bloßem Puffer, kann ein einzelner und/oder der einzige Schritt eines solchen Verfahrens darin bestehen, dass als einzige reinigungsaktive Komponente eine erfindungsgemäße Protease mit der Anschmutzung in Kontakt gebracht wird, bevorzugt in einer Pufferlösung oder in Wasser. Dies stellt eine weitere Ausführungsform dieses Erfindungsgegenstandes dar.

Alternative Ausführungsformen dieses Erfindungsgegenstandes stellen auch Verfahren zur Behandlung von Textilrohstoffen oder zur Textilpflege dar, bei denen in wenigstens einem Verfahrensschritt eine erfindungsgemäße Protease aktiv wird. Hierunter sind Verfahren für Textilrohstoffe, Fasern oder Textilien mit natürlichen Bestandteilen bevorzugt, und ganz besonders für solche mit Wolle oder Seide.

Schließlich erfasst die Erfindung auch die Verwendung der hierin beschriebenen Proteasen in Wasch- oder Reinigungsmitteln, beispielsweise wie oben beschrieben, zur (verbesserten) Entfernung von proteinhaltigen Anschmutzungen, beispielsweise von Textilien oder harten Oberflächen.

Alle Sachverhalte, Gegenstände und Ausführungsformen, die für erfindungsgemäße Protease und sie enthaltende Mittel beschrieben sind, sind auch auf diesen Erfindungsgegenstand anwendbar. Daher wird an dieser Stelle ausdrücklich auf die Offenbarung an entsprechender Stelle verwiesen mit dem Hinweis, dass diese Offenbarung auch für die vorstehende erfindungsgemäße Verwendung gilt.

BeispieleBeispiel 1: WaschtestÜbersicht über die Mutationen:

Diese Erfindung betrifft eine alkalische Protease vom Subtilisin Typ aus *Bacillus pumilus*. Von dieser Protease wurden durch Zufallsmutagenese Varianten hergestellt, welche dann u.a. auf verbesserte Waschleistung gescreent wurden.

Variante	Sequenz			SEQ ID NO:
Mutante 1	P86S	S236A		2
Mutante 2	Q62E			3
Mutante 3	Q62E	L82F		4
Mutante 4	Q10E			5
Mutante 5	N130D	T141K	T253S	6
Mutante 6	P86A			7
Mutante 7	P9H	Q62E	L82F	8
Mutante 8	Q62E	L82F	N187H	9
Mutante 9	Q62E	N130D		10
Mutante 10	P86S	N187H	S236A	11

Verwendete Waschmittelmatrix

Dies ist eine handelsübliche Waschmittelmatrix, die für den Waschtest verwendet wurde:

Chemischer Name	Gew.-% Aktivsub- stanz im Rohmaterial	Gew.-% Aktivsub- stanz in der Formulierung
Wasser demin.	100	Rest
Alkylbenzolsulfonsäure	96	4,4
Anionische Tenside	70	5,6
C12-C18 Fettsäure Na-Salz	30	2,4
Nicht-ionische Tenside	100	4,4
Phosphonate	40	0,2
Zitronensäure	100	1,4
NaOH	50	0,95
Entschäumer	t.q.	0,01
Glycerin	100	2
Konservierungsmittel	100	0,08
Ethanol	93	1
Ohne opt. Aufheller, Parfüm, Farbstoff und Enzyme.		

Dosierung 4,7 g/L

Protease-Aktivitätsassays

Die Aktivität der Protease wird durch die Freisetzung des Chromophors para-Nitroanilin aus dem Substrat Succinyl Alanin-Alanin-Prolin-Phenylalanin-para-Nitroanilid (AAPFpNA; Bachem L-1400) bestimmt. Die Freisetzung des pNA verursacht eine Zunahme der Extinktion bei 410 nm, deren zeitlicher Verlauf ein Maß für die enzymatische Aktivität ist.

Die Messung erfolgte bei einer Temperatur von 25°C, bei pH 8,6 und einer Wellenlänge von 410 nm. Die Messzeit betrug 5 min bei einem Messintervall von 20 bis 60 Sekunden.

Messansatz:

10 µL AAPF-Lösung (70 mg/mL)

1000 µL Tris/HCl (0,1 M; pH 8,6 mit 0,1% Brij 35)

10 µL verdünnte Proteaselösung

Kinetik erstellt über 5 min bei 25°C (410 nm)

Waschtest und Ergebnisse

Mini-Waschtest mit *Bacillus subtilis* Kulturüberständen, die die gescreenten Proteasemutanten durch heterologe Expression enthalten. Die Überstände werden aktivitätsgleich zum Benchmark = Wildtyp-Protease mit einer marktüblichen Konzentration für Proteasen in Waschmittel eingesetzt.

Bedingungen: 40°C, 16°dH Wasser, 1 h

Anschmutzungen:

1. CFT CS038 (Eigelb mit Pigment (eingetrocknet) auf Baumwolle; Center for Testmaterials Cft B.V., Vlaardingen, NL)
2. CFT PC-10 (Erdnussöl, Pigment, Milch auf Polyester/Baumwolle; Center for Testmaterials Cft B.V., Vlaardingen, NL)
3. WfK 10N (Ei/Pigment auf Baumwolle, wfk - Cleaning Technology Institute e.V., Krefeld, DE)
4. CFT C-03 (Kakao/Russ auf Baumwolle; Center for Testmaterials Cft B.V., Vlaardingen, NL)
5. EMPA 112 (Kakao auf Baumwolle; Swisstatest Testmaterialien AG, St. Gallen, CH)
6. CFT C-05 (Blut, Milch, Tinte auf Baumwolle; Center for Testmaterials Cft B.V., Vlaardingen, NL)

Ausgestanzte Gewebe (Durchmesser = 10 mm) in Mikrotiterplatte vorlegen, Waschlauge auf 40°C vortemperieren, Endkonzentration 4,7 g/L, Lauge und Enzym auf die Anschmutzung geben, für 1 h bei 40°C und 600 rpm inkubieren, anschließend die Anschmutzung mehrmals mit klarem Wasser spülen, trocken lassen und mit einem Farbmessgerät die Helligkeit bestimmen. Je heller das Gewebe wird, desto besser ist die Reinigungsleistung. Gemessen wird der L-Wert = Helligkeit, je höher desto heller. Angegeben ist die Summe der 6 Anschmutzungen in % bezogen auf den Wildtyp.

Variante	Waschleistung (delta L) (bezogen auf Waschleistung der WT-Protease (SEQ ID NO:1))
Mutante 1	142%
Mutante 2	146%
Mutante 3	142%
Mutante 4	162%
Mutante 5	148%
Mutante 6	167%
Mutante 7	156%
Mutante 8	129%
Mutante 9	112%
Mutante 10	121%

Patentansprüche

1. Protease umfassend eine Aminosäuresequenz, die mindestens 70 % Sequenzidentität mit der in SEQ ID NO:1 angegebenen Aminosäuresequenz über deren Gesamtlänge aufweist und die eine Aminosäuresubstitution an mindestens einer der Positionen P9, Q10, Q62, L82, P86, N130, T141, N187, S236 oder T253, jeweils bezogen auf die Nummerierung gemäß SEQ ID NO:1, aufweist.
2. Protease nach Anspruch 1, wobei die mindestens eine Aminosäuresubstitution aus der Gruppe bestehend aus P9H, Q10E, Q62E, L82F, P86S, P86A, N130D, T141K, N187H, S236A oder T253S, jeweils bezogen auf die Nummerierung gemäß SEQ ID NO:1, ausgewählt ist.
3. Protease nach einem der Ansprüche 1 oder 2, wobei die Protease eine der folgenden Aminosäuresubstitutionsvarianten aufweist:
 - (i) P86S und S236A;
 - (ii) Q62E;
 - (iii) Q62E und L82F;
 - (iv) Q10E;
 - (v) N130D, T141K und T253S;
 - (vi) P86A;
 - (vii) P9H, Q62E und L82F;
 - (viii) Q62E, L82F und N187H;
 - (ix) Q62E und N130D; oder
 - (x) P86S, N187H und S236A.
4. Protease, dadurch gekennzeichnet, dass
 - (a) sie aus einer Protease nach Anspruch 1-3 als Ausgangsmolekül erhältlich ist durch ein- oder mehrfache konservative Aminosäuresubstitution, wobei die Protease mindestens eine der Aminosäuresubstitutionen P9H, Q10E, Q62E, L82F, P86S, P86A, N130D, T141K, N187H, S236A oder T253S an den Positionen, die den Positionen 9, 10, 62, 82, 86, 130, 141, 187 und 236 gemäß SEQ ID NO:1 entsprechen, aufweist; und/oder
 - (b) sie aus einer Protease nach Anspruch 1-3 als Ausgangsmolekül erhältlich ist durch Fragmentierung, Deletions-, Insertions- oder Substitutionsmutagenese und eine Aminosäuresequenz umfasst, die über eine Länge von mindestens 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270 oder 275 zusammenhängenden Aminosäuren mit dem Ausgangsmolekül übereinstimmt, wobei die Protease mindestens eine der Aminosäuresubstitutionen P9H, Q10E, Q62E, L82F, P86S, P86A, N130D, T141K, N187H, S236A oder T253S an den Positionen,

die den Positionen 9, 10, 62, 82, 86, 130, 141, 187 und 236 gemäß SEQ ID NO:1 entsprechen, umfasst.

5. Verfahren zur Herstellung einer Protease umfassend das Substituieren einer Aminosäure an mindestens einer der Positionen, die Positionen 9, 10, 62, 82, 86, 130, 141, 187 und 236 in SEQ ID NO:1 entsprechen, in einer Ausgangsprotease, die mindestens 70 % Sequenzidentität zu der in SEQ ID NO:1 angegebenen Aminosäuresequenz über deren Gesamtlänge aufweist, vorzugsweise derart, dass die Protease an mindestens einer Position die Aminosäuresubstitution P9H, Q10E, Q62E, L82F, P86S, P86A, N130D, T141K, N187H, S236A oder T253S umfasst.
6. Verfahren nach Anspruch 5, ferner umfassend einen oder beide der folgenden Verfahrensschritte:
 - (a) Substituieren mindestens einer Aminosäure durch ein- oder mehrfache konservative Aminosäuresubstitution, wobei die Protease mindestens eine der Aminosäuresubstitutionen P9H, Q10E, Q62E, L82F, P86S, P86A, N130D, T141K, N187H, S236A oder T253S an den Positionen, die den Positionen 9, 10, 62, 82, 86, 130, 141, 187 und 236 gemäß SEQ ID NO:1 entsprechen, umfasst;
 - b) Veränderung der Aminosäuresequenz durch Fragmentierung, Deletions-, Insertions- oder Substitutionsmutagenese derart, dass die Protease eine Aminosäuresequenz umfasst, die über eine Länge von mindestens 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270 oder 275 zusammenhängenden Aminosäuren mit dem Ausgangsmolekül übereinstimmt, wobei die Protease mindestens eine der Aminosäuresubstitutionen P9H, Q10E, Q62E, L82F, P86S, P86A, N130D, T141K, N187H, S236A oder T253S an den Positionen, die den Positionen 9, 10, 62, 82, 86, 130, 141, 187 und 236 gemäß SEQ ID NO:1 entsprechen, umfasst.
7. Nukleinsäure kodierend für eine Protease nach einem der Ansprüche 1-4 oder kodierend für eine nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 5 oder 6 erhaltliche Protease.
8. Vektor enthaltend eine Nukleinsäure nach Anspruch 7, insbesondere ein Klonierungsvektor oder ein Expressionsvektor.
9. Nicht-menschliche Wirtszelle, die eine Nukleinsäure nach Anspruch 7 oder einen Vektor nach Anspruch 8 beinhaltet, oder die eine Protease nach einem der Ansprüche 1-4 beinhaltet, oder die eine nach einem Verfahren der Ansprüche 5 oder 6 erhaltliche Protease beinhaltet.
10. Verfahren zur Herstellung einer Protease umfassend
 - a) Kultivieren einer Wirtszelle gemäß Anspruch 9; und
 - b) Isolieren der Protease aus dem Kulturmedium oder aus der Wirtszelle.

11. Mittel, insbesondere ein Wasch- oder Reinigungsmittel, dadurch gekennzeichnet, dass es mindestens eine Protease nach einem der Ansprüche 1-4 oder eine nach einem Verfahren der Ansprüche 5 oder 6 erhältliche Protease enthält.
12. Verfahren zur Reinigung von Textilien oder harten Oberflächen, dadurch gekennzeichnet, dass in mindestens einem Verfahrensschritt ein Mittel nach Anspruch 11 angewendet wird, oder dass in mindestens einem Verfahrensschritt eine Protease nach einem der Ansprüche 1-4 oder eine nach einem Verfahren der Ansprüche 5 oder 6 erhältliche Protease angewendet wird.
13. Verwendung einer Protease nach einem der Ansprüche 1-4 oder einer nach einem Verfahren der Ansprüche 5 oder 6 erhältlichen Protease in einem Wasch- oder Reinigungsmittel zur Entfernung von peptid- oder proteinhaltigen Anschmutzungen.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2017/055276

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N9/54 C11D3/386
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)
C12N 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 practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data, Sequence Search, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PHILIP N. BRYAN: "Protein engineering of subtilisin", BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. PROTEIN STRUCTURE AND MOLECULAR ENZYMOLOGY, vol. 1543, no. 2, 1 December 2000 (2000-12-01), pages 203-222, XP55251064, AMSTERDAM; NL ISSN: 0167-4838, DOI: 10.1016/S0167-4838(00)00235-1 table 1	1-13
X	----- WO 2011/036263 A1 (NOVOZYMES AS [DK]; KNOETZEL JUERGEN CARSTEN FRANZ [DK]; HOCKAUF MARIA) 31 March 2011 (2011-03-31) page 3, line 6 ----- -/-	1-13



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

5 May 2017

Date of mailing of the international search report

29/05/2017

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

Petri, Bernhard

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2017/055276

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 03/062380 A2 (GENENCOR INT [US]; POULOSE AYROOKARAN J [US]) 31 July 2003 (2003-07-31) page 7, lines 6, 12; figure 2; table 1 -----	1-13
X	WO 2014/207228 A1 (NOVOZYMES AS [DK]) 31 December 2014 (2014-12-31) page 16, lines 8-13 -----	1-13
X	WO 96/28566 A2 (PROCTER & GAMBLE [US]) 19 September 1996 (1996-09-19) claim 1 -----	1-13
X	WO 95/30010 A1 (PROCTER & GAMBLE [US]) 9 November 1995 (1995-11-09) lines 4-5 - page 9 -----	1-13
X	WO 03/054127 A2 (DIREVO BIOTECH AG [DE]) 3 July 2003 (2003-07-03) sequence 32 -----	1-13
X	WO 03/006602 A2 (NOVOZYMES AS [DK]; FANOE TINA SEJERSGAARD [DK]; VON DER OSTEN CLAUS [D]) 23 January 2003 (2003-01-23) claim 1 -----	1-13
X	CN 1 258 745 A (SHANGHAI BIOLOG ENGINEERING RE [CN]) 5 July 2000 (2000-07-05) sequence 1 -----	1-13
X	WO 2011/014278 A1 (DANISCO US INC [US]; PISARCHIK ALEXANDER [US]; SCHMIDT BRIAN F [US]) 3 February 2011 (2011-02-03) figure 3; sequences 76, 113 -----	1-13
X	DE 10 2006 022224 A1 (HENKEL KGAA [DE]) 15 November 2007 (2007-11-15) claim 13; sequence 2 -----	1-13
X	DATABASE UniProt [Online] 4 April 2006 (2006-04-04), "SubName: Full=Subtilisin-like serine proteinase {ECO:0000313 EMBL:AAX14553.1}";", XP002769868, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:Q29ZA8 Database accession no. Q29ZA8 sequence ----- -/--	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2017/055276

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DATABASE UniProt [Online] 23 September 2008 (2008-09-23), "SubName: Full=Subtilisin Carlsberg {ECO:0000313 EMBL:EDW22774.1}; EC=3.4.21.62 {ECO:0000313 EMBL:EDW22774.1}"; XP002769869, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:B4AFK7 Database accession no. B4AFK7 sequence -----	1-13
A	DATABASE UniProt [Online] 21 July 1986 (1986-07-21), "RecName: Full=Subtilisin Carlsberg; EC=3.4.21.62; Flags: Precursor"; XP002769870, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:P00780 Database accession no. P00780 sequence -----	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2017/055276

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2011036263	A1	31-03-2011	
		AU 2010299799 A1	05-04-2012
		BR 112012006487 A2	22-11-2016
		CA 2775045 A1	31-03-2011
		CN 102648273 A	22-08-2012
		EP 2480650 A1	01-08-2012
		JP 5947213 B2	06-07-2016
		JP 2013505711 A	21-02-2013
		JP 2016052334 A	14-04-2016
		MX 339581 B	01-06-2016
		RU 2012116529 A	27-10-2013
		US 2012172280 A1	05-07-2012
		WO 2011036263 A1	31-03-2011
WO 03062380	A2	31-07-2003	
		AU 2003210551 A1	02-09-2003
		BR 0306956 A	11-04-2006
		CA 2472723 A1	31-07-2003
		EP 1530631 A2	18-05-2005
		EP 2287320 A1	23-02-2011
		EP 2287321 A1	23-02-2011
		JP 5328002 B2	30-10-2013
		JP 5863679 B2	17-02-2016
		JP 2005529584 A	06-10-2005
		JP 2013116110 A	13-06-2013
		JP 2015198660 A	12-11-2015
		MX PA04006811 A	11-10-2004
		US 2005170488 A1	04-08-2005
		US 2012052553 A1	01-03-2012
		US 2013157341 A1	20-06-2013
		US 2015232829 A1	20-08-2015
		WO 03062380 A2	31-07-2003
WO 2014207228	A1	31-12-2014	
		EP 3013950 A1	04-05-2016
		US 2016145595 A1	26-05-2016
		WO 2014207228 A1	31-12-2014
WO 9628566	A2	19-09-1996	
		AU 4868896 A	02-10-1996
		BR 9607356 A	15-06-1999
		CA 2214348 A1	19-09-1996
		CN 1183119 A	27-05-1998
		CZ 9702793 A3	12-11-1997
		EP 0813596 A2	29-12-1997
		HU 9800765 A2	28-07-1998
		JP H11501812 A	16-02-1999
		MA 23818 A1	01-10-1996
		US 6455295 B1	24-09-2002
		WO 9628566 A2	19-09-1996
		ZA 9601631 B	06-09-1996
WO 9530010	A1	09-11-1995	
		AU 2159195 A	29-11-1995
		BR 9507597 A	07-10-1997
		CA 2189426 A1	09-11-1995
		CN 1151761 A	11-06-1997
		CZ 9603216 A3	14-05-1997
		EP 0758388 A1	19-02-1997
		JP H09511652 A	25-11-1997
		PE 27897 A1	13-08-1997
		US 6436690 B1	20-08-2002
		WO 9530010 A1	09-11-1995

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2017/055276

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03054127	A2	03-07-2003	AU 2002358746 A1 09-07-2003 EP 1321513 A1 25-06-2003 EP 1461409 A2 29-09-2004 WO 03054127 A2 03-07-2003
WO 03006602	A2	23-01-2003	AT 409744 T 15-10-2008 AU 2002316816 A1 29-01-2003 CN 1537163 A 13-10-2004 DK 200101090 A 16-08-2001 EP 1409659 A2 21-04-2004 JP 4383858 B2 16-12-2009 JP 2004537994 A 24-12-2004 NZ 530237 A 26-05-2006 NZ 541095 A 29-02-2008 US 2004197894 A1 07-10-2004 US 2008167213 A1 10-07-2008 US 2011152155 A1 23-06-2011 US 2013225466 A1 29-08-2013 US 2014018283 A1 16-01-2014 US 2015024990 A1 22-01-2015 US 2017096654 A1 06-04-2017 WO 03006602 A2 23-01-2003 ZA 200309666 B 03-08-2004
CN 1258745	A	05-07-2000	NONE
WO 2011014278	A1	03-02-2011	AR 076311 A1 01-06-2011 BR 112012002163 A2 03-11-2015 CA 2769420 A1 03-02-2011 CN 102575242 A 11-07-2012 EP 2459714 A1 06-06-2012 JP 5852568 B2 03-02-2016 JP 2013500714 A 10-01-2013 US 2011171718 A1 14-07-2011 WO 2011014278 A1 03-02-2011
DE 102006022224	A1	15-11-2007	CN 101506361 A 12-08-2009 DE 102006022224 A1 15-11-2007 EP 2016175 A1 21-01-2009 JP 2009536630 A 15-10-2009 US 2009170745 A1 02-07-2009 WO 2007131656 A1 22-11-2007

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 INV. C12N9/54 C11D3/386
 ADD.

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

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
 C12N 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, WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data, Sequence Search, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	PHILIP N. BRYAN: "Protein engineering of subtilisin", BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. PROTEIN STRUCTURE AND MOLECULAR ENZYMOLOGY, Bd. 1543, Nr. 2, 1. Dezember 2000 (2000-12-01), Seiten 203-222, XP55251064, AMSTERDAM; NL ISSN: 0167-4838, DOI: 10.1016/S0167-4838(00)00235-1 Tabelle 1	1-13
X	----- WO 2011/036263 A1 (NOVOZYMES AS [DK]; KNOETZEL JUERGEN CARSTEN FRANZ [DK]; HOCKAUF MARIA) 31. März 2011 (2011-03-31) Seite 3, Zeile 6 ----- -/-	1-13



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

5. Mai 2017

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

29/05/2017

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

Petri, Bernhard

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 03/062380 A2 (GENENCOR INT [US]; POULOSE AYROOKARAN J [US]) 31. Juli 2003 (2003-07-31) Seite 7, Zeilen 6, 12; Abbildung 2; Tabelle 1 -----	1-13
X	WO 2014/207228 A1 (NOVOZYMES AS [DK]) 31. Dezember 2014 (2014-12-31) Seite 16, Zeilen 8-13 -----	1-13
X	WO 96/28566 A2 (PROCTER & GAMBLE [US]) 19. September 1996 (1996-09-19) Anspruch 1 -----	1-13
X	WO 95/30010 A1 (PROCTER & GAMBLE [US]) 9. November 1995 (1995-11-09) Zeilen 4-5 - Seite 9 -----	1-13
X	WO 03/054127 A2 (DIREVO BIOTECH AG [DE]) 3. Juli 2003 (2003-07-03) Sequenz 32 -----	1-13
X	WO 03/006602 A2 (NOVOZYMES AS [DK]; FANOE TINA SEJERSGAARD [DK]; VON DER OSTEN CLAUS [D] 23. Januar 2003 (2003-01-23) Anspruch 1 -----	1-13
X	CN 1 258 745 A (SHANGHAI BIOLOG ENGINEERING RE [CN]) 5. Juli 2000 (2000-07-05) Sequenz 1 -----	1-13
X	WO 2011/014278 A1 (DANISCO US INC [US]; PISARCHIK ALEXANDER [US]; SCHMIDT BRIAN F [US]) 3. Februar 2011 (2011-02-03) Abbildung 3; Sequenzen 76, 113 -----	1-13
X	DE 10 2006 022224 A1 (HENKEL KGAA [DE]) 15. November 2007 (2007-11-15) Anspruch 13; Sequenz 2 -----	1-13
X	DATABASE UniProt [Online] 4. April 2006 (2006-04-04), "SubName: Full=Subtilisin-like serine proteinase {ECO:0000313 EMBL:AAX14553.1}"; XP002769868, gefunden im EBI accession no. UNIPROT:Q29ZA8 Database accession no. Q29ZA8 Sequenz ----- -/-	1-13

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	DATABASE UniProt [Online] 23. September 2008 (2008-09-23), "SubName: Full=Subtilisin Carlsberg {ECO:0000313 EMBL:EDW22774.1}; EC=3.4.21.62 {ECO:0000313 EMBL:EDW22774.1};" , XP002769869, gefunden im EBI accession no. UNIPROT:B4AFK7 Database accession no. B4AFK7 Sequenz -----	1-13
A	DATABASE UniProt [Online] 21. Juli 1986 (1986-07-21), "RecName: Full=Subtilisin Carlsberg; EC=3.4.21.62; Flags: Precursor;" , XP002769870, gefunden im EBI accession no. UNIPROT:P00780 Database accession no. P00780 Sequenz -----	1-13

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2017/055276

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 2011036263 A1	31-03-2011	AU 2010299799 A1 BR 112012006487 A2 CA 2775045 A1 CN 102648273 A EP 2480650 A1 JP 5947213 B2 JP 2013505711 A JP 2016052334 A MX 339581 B RU 2012116529 A US 2012172280 A1 WO 2011036263 A1	05-04-2012 22-11-2016 31-03-2011 22-08-2012 01-08-2012 06-07-2016 21-02-2013 14-04-2016 01-06-2016 27-10-2013 05-07-2012 31-03-2011
WO 03062380 A2	31-07-2003	AU 2003210551 A1 BR 0306956 A CA 2472723 A1 EP 1530631 A2 EP 2287320 A1 EP 2287321 A1 JP 5328002 B2 JP 5863679 B2 JP 2005529584 A JP 2013116110 A JP 2015198660 A MX PA04006811 A US 2005170488 A1 US 2012052553 A1 US 2013157341 A1 US 2015232829 A1 WO 03062380 A2	02-09-2003 11-04-2006 31-07-2003 18-05-2005 23-02-2011 23-02-2011 30-10-2013 17-02-2016 06-10-2005 13-06-2013 12-11-2015 11-10-2004 04-08-2005 01-03-2012 20-06-2013 20-08-2015 31-07-2003
WO 2014207228 A1	31-12-2014	EP 3013950 A1 US 2016145595 A1 WO 2014207228 A1	04-05-2016 26-05-2016 31-12-2014
WO 9628566 A2	19-09-1996	AU 4868896 A BR 9607356 A CA 2214348 A1 CN 1183119 A CZ 9702793 A3 EP 0813596 A2 HU 9800765 A2 JP H11501812 A MA 23818 A1 US 6455295 B1 WO 9628566 A2 ZA 9601631 B	02-10-1996 15-06-1999 19-09-1996 27-05-1998 12-11-1997 29-12-1997 28-07-1998 16-02-1999 01-10-1996 24-09-2002 19-09-1996 06-09-1996
WO 9530010 A1	09-11-1995	AU 2159195 A BR 9507597 A CA 2189426 A1 CN 1151761 A CZ 9603216 A3 EP 0758388 A1 JP H09511652 A PE 27897 A1 US 6436690 B1 WO 9530010 A1	29-11-1995 07-10-1997 09-11-1995 11-06-1997 14-05-1997 19-02-1997 25-11-1997 13-08-1997 20-08-2002 09-11-1995

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2017/055276

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 03054127	A2	03-07-2003	AU 2002358746 A1 09-07-2003 EP 1321513 A1 25-06-2003 EP 1461409 A2 29-09-2004 WO 03054127 A2 03-07-2003
WO 03006602	A2	23-01-2003	AT 409744 T 15-10-2008 AU 2002316816 A1 29-01-2003 CN 1537163 A 13-10-2004 DK 200101090 A 16-08-2001 EP 1409659 A2 21-04-2004 JP 4383858 B2 16-12-2009 JP 2004537994 A 24-12-2004 NZ 530237 A 26-05-2006 NZ 541095 A 29-02-2008 US 2004197894 A1 07-10-2004 US 2008167213 A1 10-07-2008 US 2011152155 A1 23-06-2011 US 2013225466 A1 29-08-2013 US 2014018283 A1 16-01-2014 US 2015024990 A1 22-01-2015 US 2017096654 A1 06-04-2017 WO 03006602 A2 23-01-2003 ZA 200309666 B 03-08-2004
CN 1258745	A	05-07-2000	KEINE
WO 2011014278	A1	03-02-2011	AR 076311 A1 01-06-2011 BR 112012002163 A2 03-11-2015 CA 2769420 A1 03-02-2011 CN 102575242 A 11-07-2012 EP 2459714 A1 06-06-2012 JP 5852568 B2 03-02-2016 JP 2013500714 A 10-01-2013 US 2011171718 A1 14-07-2011 WO 2011014278 A1 03-02-2011
DE 102006022224	A1	15-11-2007	CN 101506361 A 12-08-2009 DE 102006022224 A1 15-11-2007 EP 2016175 A1 21-01-2009 JP 2009536630 A 15-10-2009 US 2009170745 A1 02-07-2009 WO 2007131656 A1 22-11-2007