

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

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
12. Februar 2009 (12.02.2009)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2009/019157 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:

C12N 9/54 (2006.01) C12N 15/57 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2008/059844

(22) Internationales Anmeldedatum:
28. Juli 2008 (28.07.2008)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2007 036 756.4 3. August 2007 (03.08.2007) DE

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

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **WEBER, Angrit**
[DE/DE]; Am Basaltkegel 29, 53567 Buchholz (DE).
WIELAND, Susanne [DE/DE]; Schlossstrasse 25, 41541
Zons/Dormagen (DE). **MAURER, Karl-Heinz** [DE/DE];
Dechenstrasse 5, 40699 Erkrath (DE).

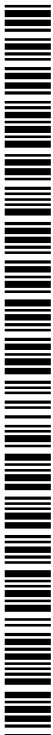
(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,

AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ,
LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK,
MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM,
ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,
TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF,
BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN,
TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- mit Angaben über hinterlegtes biologisches Material, eingereicht gemäss Regel 13bis, getrennt von der Beschreibung
- mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung in elektronischer Form getrennt veröffentlicht; auf Antrag vom Internationalen Büro erhältlich



WO 2009/019157 A1

(54) Title: NEW PROTEASES AND DETERGENT AND CLEANING AGENT COMPRISING SAID NEW PROTEASES

(54) Bezeichnung: NEUE PROTEASEN UND WASCH- UND REINIGUNGSMITTEL, ENTHALTEND DIESE NEUEN PROTEASEN

(57) Abstract: The present invention relates to new proteases of the subtilisin type, and sufficiently related proteins and the derivatives thereof, and to the production thereof and the use thereof. The invention further relates to detergents and cleaning agents having said new proteases of the subtilisin type, sufficiently related proteins and the derivatives thereof, corresponding washing and cleaning methods, and the use thereof.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft neue Proteasen vom Subtilisin-Typ sowie hinreichend verwandte Proteine und deren Derivate sowie deren Herstellung und deren Verwendung. Sie betrifft außerdem Wasch- und Reinigungsmittel mit diesen neuen Proteasen vom Subtilisin-Typ, hinreichend verwandten Proteinen und deren Derivaten, entsprechende Wasch- und Reinigungsverfahren und deren Verwendung.

Neue Proteasen und Wasch- und Reinigungsmittel, enthaltend diese neuen Proteasen

Die vorliegende Erfindung betrifft neue Proteasen vom Subtilisin-Typ sowie hinreichend verwandte Proteine und deren Derivate sowie deren Herstellung und deren Verwendung. Sie betrifft außerdem Wasch- und Reinigungsmittel mit diesen neuen Proteasen vom Subtilisin-Typ, hinreichend verwandten Proteinen und deren Derivaten, entsprechende Wasch- und Reinigungsverfahren und deren Verwendung.

Proteasen gehören zu den technisch bedeutendsten Enzymen überhaupt. Hierunter sind wiederum Proteasen vom Subtilisin-Typ (Subtilasen, Subtilopeptidasen, EC 3.4.21.62) besonders wichtig, welche aufgrund der katalytisch wirksamen Aminosäuren den Serin-Proteasen zugerechnet werden. Sie wirken als unspezifische Endopeptidasen, das heißt, sie hydrolysieren beliebige Säureamidbindungen, die im Inneren von Peptiden oder Proteinen liegen. Ihr pH-Optimum liegt meist im deutlich alkalischen Bereich. Einen Überblick über diese Familie bietet beispielsweise der Artikel „Subtilases: Subtilisin-like Proteases“ von R. Siezen, Seite 75-95 in „Subtilisin enzymes“, herausgegeben von R. Bott und C. Betzel, New York, 1996. Subtilasen werden natürlicherweise von Mikroorganismen gebildet; hierunter sind insbesondere die von Bacillus-Spezies gebildeten und sekretierten Subtilisine als bedeutendste Gruppe innerhalb der Subtilasen zu erwähnen.

Proteasen sind neben anderen Enzymen etablierte aktive Inhaltsstoffe von Wasch- und Reinigungsmitteln. Sie bewirken dabei den Abbau proteinhaltiger Anschmutzungen auf dem Reinigungsgut. Günstigenfalls ergeben sich Synergieeffekte zwischen den Enzymen und den übrigen Bestandteilen der betreffenden Mittel. Unter den Wasch- und Reinigungsmittelproteasen nehmen Subtilasen aufgrund ihrer günstigen enzymatischen Eigenschaften wie Stabilität oder pH-Optimum eine herausragende Stellung ein. Sie eignen sich daneben noch für eine Vielzahl weiterer technischer Verwendungsmöglichkeiten, beispielsweise als Bestandteile von Kosmetika oder in der organisch-chemischen Synthese.

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 Alkalische Protease aus Bacillus lentus, 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.

Das Subtilisin BPN', welches aus *Bacillus amyloliquefaciens*, beziehungsweise *B. subtilis* stammt, ist aus den Arbeiten von Vasantha et al. (1984) in *J. Bacteriol.*, Volume 159, S. 811-819 und von J. A. Wells et al. (1983) in *Nucleic Acids Research*, Volume 11, S. 7911-7925 bekannt. Subtilisin BPN' dient insbesondere hinsichtlich der Numerierung der Positionen als Referenzenzym der Subtilisine. Subtilisin Carlsberg ist in weiterentwickelter Form unter dem Handelsnamen Alcalase® von der Firma Novozymes A/S, Bagsværd, Dänemark, erhältlich. Sie wird in den Publikationen von E. L. Smith et al. (1968) in *J. Biol. Chem.*, Volume 243, S. 2184-2191, und von Jacobs et al. (1985) in *Nucl. Acids Res.*, Band 13, S. 8913-8926 beschrieben und wird natürlicherweise von *Bacillus licheniformis* gebildet. Die Protease PB92 wird natürlicherweise von dem alkaliphilen Bakterium *Bacillus nov. spec. 92* produziert und war unter dem Handelsnamen Maxacal® von der Fa. Gist-Brocades, Delft, Niederlande, erhältlich. In ihrer ursprünglichen Sequenz wird sie in der Patentanmeldung EP 283075 A2 beschrieben. Die Subtilisine 147 und 309 werden unter den Handelsnamen Esperase®, beziehungsweise Savinase® von der Firma Novozymes vertrieben. Sie stammen ursprünglich aus *Bacillus*-Stämmen, die mit der Anmeldung GB 1243784 A offenbart werden. Von der Protease aus *Bacillus lentus* DSM 5483 (WO 91/02792 A1) leiten sich die unter der Bezeichnung BLAP® geführten Varianten ab, die insbesondere in WO 92/21760 A1, WO 95/23221 A1, WO 02/088340 A2 und WO 03/038082 A2 beschrieben werden. Subtilisin DY ist ursprünglich von Nedkov et al. 1985 in *Biol. Chem Hoppe-Seyler*, Band 366, S. 421-430 beschrieben. Weitere verwendbare Proteasen sind beispielsweise die unter den Handelsnamen Durazym®, Release®, Everlase®, Nafizym, Natalase®, Kannase® und Ovozyme® von der Firma Novozymes, die unter den Handelsnamen, Purafect®, Purafect® OxP, Purafect® Prime und Properase® von der Firma Genencor, das unter dem Handelsnamen Protosol® von der Firma Advanced Biochemicals Ltd., Thane, Indien, das unter dem Handelsnamen Wuxi® von der Firma Wuxi Snyder Bioproducts Ltd., China, die unter den Handelsnamen Proleather® und Protease P® von der Firma Amano Pharmaceuticals Ltd., Nagoya, Japan, und das unter der Bezeichnung Proteinase K-16 von der Firma Kao Corp., Tokyo, Japan, erhältlichen Enzyme.

Die in erfindungsgemäßen Mitteln eingesetzten Proteasen stammen entweder ursprünglich aus Mikroorganismen, beispielsweise aus Mikroorganismen der Gattungen *Bacillus*, *Streptomyces*, *Humicola*, oder *Pseudomonas*, und/oder werden nach an sich bekannten biotechnologischen Verfahren durch geeignete Mikroorganismen produziert, beispielsweise durch transgene Expressionswirte der Gattungen *Bacillus* oder durch filamentöse Fungi.

Das klassische Vorgehen zur Gewinnung neuer Enzyme besteht darin, Mikroorganismen-haltige Proben aus natürlichen Habitaten zu entnehmen und unter den als geeignet angesehenen Bedingungen – zum Beispiel in alkalischem Milieu – zu kultivieren. Auf diese Weise erhält man Anreicherungskulturen von Mikroorganismen, die mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit auch

Enzyme, darunter Proteasen enthalten, welche unter den betreffenden Bedingungen aktiv sind. Hieraus werden dann beispielsweise über Ausplattieren auf proteinhaltigen Agarplatten und Ausmessen der gebildeten Lysehöfe die Mikroorganismen mit den leistungsfähigsten Enzyme ausgewählt und aufgereinigt beziehungsweise die betreffenden Gene kloniert. Solch ein Vorgehen wird beispielsweise in dem Lehrbuch „Alkalophilic Mikroorganisms. A new microbial world“ von K.Horikoshi und T.Akiba (1982), Japan Scientific Societies Press, Springer-Verlag, New York, Heidelberg, Berlin, ISBN 0-387-10924-2, Kapitel 2, Seiten 9-26 beschrieben.

Hinsichtlich der Anwendung von Proteasen in Wasch- und Reinigungsmitteln ist bekannt, dass Proteasen zur Verbesserung der Wasch- beziehungsweise Reinigungsleistung zusammen mit weiteren Enzymen, beispielsweise Amylasen, Cellulasen, Hemicellulasen, Mannanasen, β -Glucosidasen, Oxidasen, Oxidoreduktasen oder Lipasen eingesetzt werden können. Ebenso ist der Einsatz von Proteasen in Waschmitteln in Kombination mit anderen Wirkstoffen wie etwa Bleichmitteln oder Soil-Release-Wirkstoffen dem Fachmann bekannt.

Es ist ferner bekannt, dass einige für den Einsatz in Waschmitteln etablierte Proteasen auch für kosmetische Zwecke oder für die organisch-chemische Synthese geeignet sind.

Die hier beispielhaft dargestellten, diversen technischen Einsatzgebiete erfordern Proteasen mit unterschiedlichen Eigenschaften, was beispielsweise die Reaktionsbedingungen, die Stabilität oder die Substratspezifität angeht. Umgekehrt hängen die technischen Einsatzmöglichkeiten der Proteasen, beispielsweise im Kontext einer Wasch- oder Reinigungsmittelrezeptur, von weiteren Faktoren wie Stabilität des Enzyms gegenüber hohen Temperaturen, gegenüber oxidierenden Agentien, dessen Denaturierung durch Tenside, von Faltungseffekten oder von erwünschten Synergien mit anderen Inhaltsstoffen ab.

Somit besteht nach wie vor ein hoher Bedarf an technisch einsetzbaren Proteasen, die aufgrund der Vielzahl ihrer Einsatzgebiete in ihrer Gesamtheit ein breites Spektrum an Eigenschaften bis hin zu sehr subtilen Leistungsunterschieden abdecken.

Die Basis hierfür wird durch neue Proteasen erweitert, welche ihrerseits hinsichtlich spezieller Einsatzgebiete gezielt weiterentwickelt werden können.

Der vorliegenden Erfindung lag also die Aufgabe zugrunde, weitere, noch nicht bekannte Proteasen aufzufinden. Das jeweilige Wildtyp-Enzym sollte sich vorzugsweise dadurch auszeichnen, dass seine Leistung bei Verwendung in einem entsprechenden Mittel derjenigen der für diesen Zweck etablierten Enzyme zumindest nahe kommt und idealerweise übertrifft. Hierbei war insbesondere der Beitrag zur Leistung eines Wasch- oder Reinigungsmittels von Interesse.

Weitere Aufgaben der vorliegenden Erfindung werden darin gesehen, Proteasen, insbesondere vom Subtilisin-Typ, bereitzustellen, die gegenüber dem Stand der Technik eine verbesserte Stabilität gegenüber Temperatureinflüssen, pH-Wert-Schwankungen, denaturierenden oder oxidierenden Agentien, proteolytischem Abbau, hohen Temperaturen, sauren oder alkalischen Bedingungen oder gegenüber einer Veränderung der Redox-Verhältnisse aufweisen. Weitere Aufgaben können in einer verringerten Immunogenität bzw. verringerten allergenen Wirkung gesehen werden.

Eine weitere besondere Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, Proteasen ausfindig zu machen, die bei Temperaturen von 20 bis 60 °C eine gute Waschleistung, vorzugsweise eine verbesserte Waschleistung im Vergleich zu den im Stand der Technik offenbarten Proteasen, insbesondere denjenigen vom Subtilisin-Typ, aufweisen.

Eine weitere besondere Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, Proteasen ausfindig zu machen, die in Bezug auf die im Stand der Technik bekannten Proteasen eine verbesserte Waschleistung in Bezug auf zumindest eine Anschmutzung, vorzugsweise in Bezug auf mehrere Anschmutzungen, aufweisen.

Weitere Teilaufgaben bestanden darin, Nukleinsäuren zur Verfügung zu stellen, die für derartige Proteasen kodieren, und Vektoren, Wirtszellen und Herstellverfahren zur Verfügung zu stellen, die zur Gewinnung derartiger Proteasen genutzt werden können. Ferner sollten entsprechende Mittel, insbesondere Wasch- und Reinigungsmittel, entsprechende Wasch- und Reinigungsverfahren sowie entsprechende Verwendungsmöglichkeiten für derartige Proteasen zur Verfügung gestellt werden. Schließlich sollten technische Einsatzmöglichkeiten für die gefundenen Proteasen definiert werden.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst gemäß der Lehre des Anspruchs 1. Einen Gegenstand der Erfindung bildet somit eine Protease umfassend eine Aminosäuresequenz, die ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus

a) Aminosäuresequenz, die zu der in SEQ ID NO. 3 angegebenen Aminosäuresequenz zu mindestens 94,2% identisch ist.

b) Aminosäuresequenz, die zu der in SEQ ID NO. 2 angegebenen Aminosäuresequenz zu mindestens 59% identisch ist.

Hiermit sind als weitere Erfindungsgegenstände die zugehörigen Nukleinsäuren, entsprechende natürliche Zellen, geeignete Verfahren zu ihrer Identifizierung, insbesondere auf den Nukleinsäuren aufbauende molekularbiologische Verfahren und Verfahrenselemente sowie Mittel, Wasch- und

Reinigungsmittel, Wasch- und Reinigungsverfahren und über die betreffenden Proteasen gekennzeichnete Verwendungsmöglichkeiten verbunden.

Bereits das in SEQ ID NO.3 angegebene Enzym weist eine proteolytische Aktivität auf, so dass die Proteasen für ihre Anwendung in Wasch- und Reinigungsmitteln als geeignet anzusehen sind. Aufgrund der zur Verfügung gestellten DNA ist eine zusätzliche Optimierung dieses Enzyms, beispielsweise über weitere Punktmutationen möglich. Ferner kann diese DNA in Shuffling-Ansätze eingebracht und damit zur Erzeugung völlig neuartiger Proteasen genutzt werden.

Unter einem Enzym ist im Sinne der vorliegenden Anmeldung ein Protein zu verstehen, das eine bestimmte biokatalytische Funktion ausübt. Unter Protease im Sinne der vorliegenden Anmeldung wird ein Enzym verstanden, welches die Hydrolyse von Peptidbindungen katalysiert und dadurch in der Lage ist, Peptide oder Proteine zu spalten.

Ein Protein ist im Sinne der vorliegenden Anmeldung ein aus den natürlichen Aminosäuren zusammengesetztes, weitgehend linear aufgebautes, zur Ausübung seiner Funktion zumeist eine dreidimensionale Struktur annehmendes Polypeptid. Ein Peptid besteht aus Aminosäuren, die über Peptidbindungen miteinander kovalent verbunden sind. Die Bezeichnung Polypeptid verdeutlicht diesbezüglich den Sachverhalt, dass diese Peptidkette in der Regel aus vielen Aminosäuren besteht, die über Peptidbindungen miteinander verbunden sind. Aminosäuren können in einer L- und einer D-Konfiguration vorliegen, wobei die Aminosäuren, aus denen Proteine bestehen, in der L-Konfiguration vorliegen. Sie werden als proteinogene Aminosäuren bezeichnet. In der vorliegenden Anmeldung werden die proteinogenen, natürlich vorkommenden L-Aminosäuren mit den international gebräuchlichen 1- und 3-Buchstaben-Codes bezeichnet. Zahlreiche Proteine werden als sogenannte Präproteine, also zusammen mit einem Signalpeptid gebildet. Darunter ist dann der N-terminale Teil des Proteins zu verstehen, dessen Funktion zumeist darin besteht, die Ausschleusung des gebildeten Proteins aus der produzierenden Zelle in das Periplasma oder das umgebende Medium und/oder dessen korrekte Faltung zu gewährleisten. Anschließend wird das Signalpeptid unter natürlichen Bedingungen durch eine Signalpeptidase vom übrigen Protein abgespalten, so dass dieses seine eigentliche katalytische Aktivität ohne die zunächst vorhandenen N-terminalen Aminosäuren ausübt. Pro-Proteine sind inaktive Vorstufen von Proteinen. Deren Vorläufer mit Signalsequenz werden als Prä-Pro-Proteine bezeichnet. Für technische Anwendungen sind aufgrund ihrer enzymatischen Aktivität die maturen, d.h. reifen Peptide, d.h. die nach ihrer Herstellung prozessierten Enzyme gegenüber den Präproteinen bevorzugt. Die Proteine können von den sie produzierenden Zellen nach der Herstellung der Polypeptidkette modifiziert werden, beispielsweise durch Anknüpfung von Zuckermolekülen, Formylierungen, Aminierungen, usw. Solche Modifikationen werden als posttranslationale

Modifikationen bezeichnet. Diese posttranslationalen Modifizierungen können, müssen jedoch nicht einen Einfluss auf die Funktion des Proteins ausüben.

Im Sinne der vorliegenden Erfindung werden alle Enzyme, Proteine, Fragmente und Derivate, sofern sie nicht explizit als solche angesprochen zu werden brauchen, unter dem Oberbegriff Proteine zusammengefasst.

Durch Vergleich mit bekannten Enzymen, die beispielsweise in allgemein zugänglichen Datenbanken hinterlegt sind, lässt sich aus der Aminosäure- oder Nukleotid-Sequenz die enzymatische Aktivität eines betrachteten Enzyms folgern. Diese kann durch andere Bereiche des Proteins, die nicht an der eigentlichen Reaktion beteiligt sind, qualitativ oder quantitativ modifiziert werden. Dies könnte beispielsweise die Enzymstabilität, die Aktivität, die Reaktionsbedingungen oder die Substratspezifität betreffen.

Solch ein Vergleich geschieht dadurch, dass ähnliche Abfolgen in den Nukleotid- oder Aminosäuresequenzen der betrachteten Proteine einander zugeordnet werden. Dies nennt man Homologisierung. Eine tabellarische Zuordnung der betreffenden Positionen wird als Alignment bezeichnet. Bei der Analyse von Nukleotidsequenzen sind wiederum beide komplementären Stränge und jeweils allen drei möglichen Leserastern zu berücksichtigen; ebenso die Degeneriertheit des genetischen Codes und die organismenspezifische Verwendung der Codons (Codon-Usage). Inzwischen werden Alignments über Computerprogramme erstellt, wie beispielsweise durch die Algorithmen FASTA oder BLAST; dieses Vorgehen wird beispielsweise von D. J. Lipman und W. R. Pearson (1985) in Science, Band 227, S. 1435-1441 beschrieben.

Eine Zusammenstellung aller in den verglichenen Sequenzen übereinstimmenden Positionen wird als Konsensus-Sequenz bezeichnet.

Solch ein Vergleich erlaubt auch eine Aussage über die Ähnlichkeit oder Homologie der verglichenen Sequenzen zueinander. Diese wird in Prozent Identität, das heißt dem Anteil der identischen Nukleotide oder Aminosäurereste an denselben bzw. in einem Alignment einander entsprechenden Positionen wiedergegeben. Ein weiter gefaßter Homologiebegriff bezieht die konservierten Aminosäure-Austausche in diesen Wert mit ein. Es ist dann von Prozent Ähnlichkeit die Rede. Solche Aussagen können über ganze Proteine oder Gene oder nur über einzelne Bereiche getroffen werden.

Homologe Bereiche von verschiedenen Proteinen sind durch Übereinstimmungen in der Aminosäuresequenz definiert. Diese können auch durch identische Funktion gekennzeichnet sein. Sie geht bis zu völligen Identitäten in kleinsten Bereichen, sogenannten Boxen, die nur wenige

Aminosäuren umfassen und meist für die Gesamtaktivität essentielle Funktionen ausüben. Unter den Funktionen der homologen Bereiche sind kleinste Teilfunktionen der vom gesamten Protein ausgeübten Funktion zu verstehen, wie beispielsweise die Ausbildung einzelner Wasserstoffbrückenbindungen zur Komplexierung eines Substrats oder Übergangskomplexes.

Die erfindungsgemäßen Aminosäuresequenzen sind, wie in den Beispielen zur vorliegenden Anmeldung beschrieben, von Nukleinsäuren abgeleitet worden, die aus einem proteolytisch aktiven Bakterium aus einer Bodenprobe isoliert worden sind.

Eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz ist unter SEQ ID NO. 1 angegeben. Diese Nukleinsäure codiert für ein Polypeptid, welches eine für Subtilisine typische Einteilung in Signalpeptid, Propeptid und reife (mature) Protease aufweist. Das Gesamtlängenprotein ist unter SEQ ID NO. 2 und die reife (mature) Protease unter SEQ ID NO. 3 angegeben. Hiermit ist das tatsächlich aktive reife Protein gemeint, weil dieses die technisch relevante Funktion ausübt. Besonders bevorzugt ist daher die Aminosäuresequenz der reifen, aktiven Protease.

Wie in Beispiel 3 dargestellt ist, wurde zu dieser Protease in der "Non-redundant Genbank" (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.) ein Homologievergleich mit den bisher bekannten Proteasen durchgeführt.

Als hierzu nächstähnliches beschriebenes Enzym wurde die Protease identifiziert, die als SEQ ID NO.1 in der US-Patentanmeldung US 2004/0209343 offenbart ist. Die wie alle nachfolgenden Homologiewerte über das Computer-Programm Vector NTI[®] Suite 7.0, erhältlich von der Firma InforMax, Inc., Bethesda, USA, mit den vorgegebenen Default-Parametern ermittelte Identität auf Aminosäureebene beträgt 94,1% (vergleiche Figur 1), bezogen auf die Sequenz des reifen (mature) Enzyms gemäß SEQ ID NO.3, die 307 Aminosäuren umfasst. Somit handelt es sich bei der gefundenen Protease um ein neues Enzym. In den Schutzbereich eingeschlossen werden können somit alle Proteasen, die mindestens zu 94,2% identisch zu SEQ ID NO.3 sind. Zu der etablierten *B. lentus*-Alkalischen Protease (SEQ ID NO. 4, vgl. auch WO 97/21760 A1) ergibt sich über die Länge dieser Protease auf Aminosäureebene eine Identität von 36,5%, wiederum bezogen auf das reife Enzym. Bezogen auf das Gesamtlängen-Protein gemäß SEQ ID NO. 2 ergab die vorstehend beschriebene BLAST-Abfrage als nächstähnlichen Datenbank-Eintrag die Protease gemäß Datenbankeintrag AAB93489.1 („toxin degrading protease“). Die ermittelte Identität auf Aminosäureebene beträgt 58% bezogen auf die Sequenz des Gesamtproteins gemäß SEQ ID NO. 2. Daher werden alle Proteasen in den Schutzbereich eingeschlossen, die mindestens zu 59% identisch zu SEQ ID NO. 2 sind.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist die Protease dadurch gekennzeichnet, dass sie eine Aminosäuresequenz umfasst, die ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus

a) Aminosäuresequenz, die zu der in SEQ ID NO. 3 angegebenen Aminosäuresequenz zunehmend bevorzugt zu mindestens 94,5%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,5% und ganz besonders bevorzugt zu 100% identisch ist

b) Aminosäuresequenz, die zu der in SEQ ID NO. 2 angegebenen Aminosäuresequenz zu mindestens 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 94,5%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,5% und ganz besonders bevorzugt zu 100% identisch ist.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist die Protease dadurch gekennzeichnet, dass ihre Waschleistung mindestens derjenigen einer Protease entspricht, die eine Aminosäuresequenz umfasst, die der in SEQ ID NO. 4 angegebenen Aminosäuresequenz entspricht, wobei die Waschleistung in einem Waschsystem bestimmt wird, das ein Waschmittel in einer Dosierung zwischen 4,5 und 7,0 Gramm pro Liter Waschlösung sowie die Protease enthält, wobei die zu vergleichenden Proteasen aktivitätsgleich eingesetzt sind und die Waschleistung gegenüber einer oder mehrerer der Anschmutzungen Gras, Öl/Milch, Ganzei/Ruß bzw. Vollei/Pigment, Schokoladenmilch/Ruß, Kakao und Blut/Milch, jeweils auf Baumwoll- oder Polyestergewebe, insbesondere gegenüber einer oder mehrerer der Anschmutzungen Gras EMPA 164, Öl/Milch PC-10, Ganzei/Ruß bzw. Vollei/Pigment 10N, Schokoladenmilch/Ruß C-03, Kakao EMPA 112 und Blut/Milch C-05 auf Baumwolle 10N, bestimmt wird durch Messung des Weißheitsgrades der gewaschenen Textilien, der Waschvorgang für mindestens 30 Minuten, optional 60 Minuten, bei einer Temperatur von 40°C erfolgt und das Wasser eine Wasserhärte zwischen 15,5 und 16,5° deutscher Härte aufweist.

Erfindungsgemäß sind die Begriffe Ganzei/Ruß bzw. Vollei/Pigment hinsichtlich der Anschmutzungen als gleichwertig und einander entsprechend zu betrachten. Geeignete Anschmutzungen sind beispielsweise die kommerziell erhältlichen Anschmutzungen EMPA 164 (Gras) und EMPA112 (Kakao) der EMPA Testmaterialien AG (St. Gallen, Schweiz), 10N (Vollei/Pigment) der wfk Testgewebe GmbH (Brüggen-Bracht, Deutschland) sowie PC-10 (Milch/Öl), C-03 (Schokoladenmilch/Ruß) und C-05 (Blut/Milch) des Center For Testmaterials (CFT, Vlaardingen, Niederlande).

Ein bevorzugtes flüssiges Waschmittel für ein solches Waschsystem ist wie folgt zusammengesetzt (alle Angaben in Gewichts-Prozent): 0,3- 0,5% Xanthan Gum, 0,2-0,4% Anti-Schaummittel, 6-7% Glycerin, 0,3-0,5% Ethanol, 4-7% FAEOS (Fettalkoholethersulfat), 24-28% nichtionische Tenside, 1% Borsäure, 1-2% Natriumcitrat (Dihydrat), 2-4% Soda, 14-16% Kokosnuss-Fettsäuren, 0,5%

HEDP (1-Hydroxyethan-(1,1-di-phosphonsäure)), 0-0,4% PVP (Polyvinylpyrrolidon), 0-0,05% optischer Aufheller, 0-0,001% Farbstoff, Rest demineralisiertes Wasser. Bevorzugt beträgt die Dosierung des flüssigen Waschmittels zwischen 4,5 und 5,5 Gramm pro Liter Waschflotte, beispielsweise 4,9 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.

Ein bevorzugtes pulverförmiges Waschmittel für ein solches Waschsysteem ist wie folgt zusammengesetzt (alle Angaben in Gewichts-Prozent): 10 % lineares Alkylbenzolsulfonat (Natrium-Salz), 1,5 % C12-C18-Fettalkoholsulfat (Natrium-Salz), 2,0 % C12-C18-Fettalkohol mit 7 EO, 20 % Natriumcarbonat, 6,5 % Natriumhydrogencarbonat, 4,0 % amorphes Natriumdisilikat, 17 % Natriumcarbonat-peroxohydrat, 4,0 % TAED, 3,0 % Polyacrylat, 1,0 % Carboxymethylcellulose, 1,0 % Phosphonat, 25 % Natriumsulfat, Rest: optional Schauminhibitoren, optischer Aufheller, Duftstoffe und ggfs. Wasser ad 100%. Bevorzugt beträgt die Dosierung des flüssigen Waschmittels zwischen 6,0 und 7,0 Gramm pro Liter Waschflotte, beispielsweise 6,7 Gramm pro Liter Waschflotte. Bevorzugt wird gewaschen in einem pH-Wertebereich zwischen pH 9 und pH 11.

Der Weißheitsgrad, d.h. die Aufhellung der Anschmutzungen, wird bevorzugt 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 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 Waschleistung an bestimmten Anschmutzungen, verglichen werden. Generell gilt, dass eine niedrige spezifische Aktivität durch Zugabe einer größeren Proteinmenge ausgeglichen werden kann. Verfahren zur Bestimmung der Proteaseaktivitäten sind 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. Die Proteaseaktivität wird vorzugsweise in PE (Protease-Einheiten) angegeben. Beispielsweise geeignete Proteaseaktivitäten betragen 5 oder 10 PE (Protease-Einheiten) pro ml Waschflotte. Die Proteaseaktivität ist jedoch nicht gleich Null.

Proteine können auch über die Reaktion mit einem Antiserum oder einem bestimmten Antikörper zu Gruppen immunologisch verwandter Proteine zusammengefaßt werden. Die Angehörigen einer Gruppe zeichnen sich dadurch aus, dass sie dieselbe, von einem Antikörper erkannte antigene Determinante aufweisen. Einen weiteren Erfindungsgegenstand bilden daher Proteasen, dadurch

gekennzeichnet sind, dass sie mindestens eine und zunehmend bevorzugt zwei, drei oder vier übereinstimmende antigene Determinanten mit einer erfindungsgemäßen Protease aufweisen.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung ist eine erfindungsgemäße Protease natürlicherweise in einem Organismus vorhanden, der aus einem natürlichen Habitat isolierbar ist.

Diese Ausführungsform ist deshalb besonders vorteilhaft, weil dann der zugehörige Organismus selbst in Kultur genommen werden kann. Vorteilhafterweise lassen sich dann aus dessen Zellextrakten oder Kulturüberständen die erfindungsgemäßen Proteasen isolieren und herstellen.

Bevorzugt handelt es sich bei einem solchen Organismus um einen Mikroorganismus, vorzugsweise um einen Pilz, um ein gramnegatives oder um ein grampositives Bakterium, und hierunter besonders bevorzugt um eines der Gattung *Bacillus*.

Denn besonders für diese Organismen sind im Stand der Technik Kultivierungsmethoden bekannt und etabliert. Das gilt insbesondere für Bacilli, die in der technischen Enzymherstellung eine herausragende Rolle einnehmen. In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung ist eine erfindungsgemäße Protease dadurch gekennzeichnet, dass sie in dem Bakterienstamm *Bacillus* sp. DSM ID 01-189 natürlicherweise vorhanden ist.

Proteasen bzw. Enzyme im allgemeinen können durch verschiedene Verfahren, z.B. gezielte genetische Veränderung durch Mutageneseverfahren, weiterentwickelt und für bestimmte Einsatzzwecke oder hinsichtlich spezieller Eigenschaften, beispielsweise katalytische Aktivität, Stabilität, usw., optimiert werden. Änderungen der Nukleotidsequenz, wie sie beispielsweise durch an sich bekannte molekularbiologische Methoden herbeigeführt werden können, werden demnach als Mutationen bezeichnet. Je nach Art der Änderung kennt man beispielsweise Deletions-, Insertions- oder Substitutionsmutationen oder solche, bei denen verschiedene Gene oder Teile von Genen miteinander fusioniert (shuffling) werden; dies sind Genmutationen. Die zugehörigen Organismen werden als Mutanten bezeichnet. Die von mutierten Nukleinsäuren abgeleiteten Proteine werden als Varianten bezeichnet. So führen beispielsweise Deletions-, Insertions-, Substitutionsmutationen oder Fusionen zu deletions-, insertions-, substitutionsmutierten oder Fusionsgenen und auf Proteinebene zu entsprechenden Deletions-, Insertions- oder Substitutionsvarianten, beziehungsweise Fusionsproteinen. Die Strategie, in die bekannten Moleküle gezielte Punktmutationen einzuführen, etwa um die Waschleistung der Proteasen, beispielsweise Subtilisinen, zu verbessern, wird auch als Rationales Protein-Design bezeichnet. Eine ähnliche Strategie der Leistungsverbesserung besteht darin, die Oberflächenladungen und/oder den isoelektrischen Punkt der Moleküle und darüber ihre Wechselwirkungen mit dem Substrat zu verändern. So kann beispielsweise über Punktmutationen die Nettoladung der Subtilisine verändert

werden, um darüber die Substratbindung insbesondere für den Einsatz in Wasch- und Reinigungsmitteln zu beeinflussen. Eine weitere, insbesondere ergänzende Strategie besteht darin, die Stabilität der betreffenden Proteasen zu erhöhen und damit ihre Wirksamkeit zu erhöhen. Eine solche Stabilisierung kann beispielsweise über Kopplung an ein Polymer oder, insbesondere für Wasch- und Reinigungsmittel, durch Punktmutationen erfolgen.

Eine moderne Richtung der Enzymentwicklung besteht darin, Elemente aus bekannten, miteinander verwandten Proteinen über statistische Verfahren zu neuen Enzymen mit bislang nicht erreichten Eigenschaften zu kombinieren. Solche Verfahren werden auch unter dem Oberbegriff Directed Evolution zusammengefaßt. Dazu gehören beispielsweise die sogenannte „StEP“-Methode, „Random priming recombination“, „DNA-Shuffling“, „RACHITT“ oder „Recombining ligation reaction“ (RLR).

Für die Beschreibung von Punktmutationen, die genau eine Aminosäureposition betreffen (Aminosäureaustausche), wird 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.

Es ist aus dem Stand der Technik weiterhin allgemein bekannt, dass sich vorteilhafte Eigenschaften einzelner Mutationen, z.B. einzelner Punktmutationen, ergänzen können. Eine hinsichtlich bestimmter Eigenschaften bereits optimierte Protease, zum Beispiel hinsichtlich ihrer Stabilität gegenüber Tensiden oder anderen Komponenten, kann erfindungsgemäß zusätzlich weiterentwickelt werden.

Unter Fragmenten werden alle Proteine oder Peptide verstanden, die kleiner sind als natürliche Proteine und beispielsweise auch synthetisch erhalten werden können. Aufgrund ihrer Aminosäuresequenzen können sie den betreffenden vollständigen Proteinen zugeordnet werden. Sie können beispielsweise gleiche Strukturen annehmen oder proteolytische Aktivitäten oder Teilaktivitäten ausüben, wie beispielsweise die Komplexierung eines Substrats. Fragmente und Deletionsvarianten von Ausgangsproteinen sind prinzipiell gleichartig; während Fragmente eher kleinere Bruchstücke darstellen, fehlen den Deletionsmutanten eher nur kurze Bereiche, und damit nur einzelne Teilfunktionen.

Unter chimären oder hybriden Proteinen sind im Sinne der vorliegenden Anmeldung solche Proteine zu verstehen, deren Sequenz die Sequenzen oder Teilsequenzen von mindestens zwei

Ausgangsproteinen umfasst. Die Ausgangsproteine können diesbezüglich aus verschiedenen oder aus demselben Organismus stammen. Chimäre oder hybride Proteine können beispielsweise durch Rekombinationsmutagenese erhalten werden. Der Sinn einer solchen Rekombination kann beispielsweise darin bestehen, mithilfe des heranfusionsierten Proteinteils eine bestimmte enzymatische Funktion herbeizuführen oder zu modifizieren. Es ist dabei im Sinne der vorliegenden Erfindung unwesentlich, ob solch ein chimäres Protein aus einer einzelnen Polypeptidkette oder mehreren Untereinheiten besteht, auf welche sich unterschiedliche Funktionen verteilen können.

Unter durch Insertionsmutation erhaltene Proteine sind solche Varianten zu verstehen, die durch Einfügen eines Proteinfragments in die Ausgangssequenzen erhalten worden sind. Sie sind ihrer prinzipiellen Gleichartigkeit wegen den chimären Proteinen zuzuordnen. Sie unterscheiden sich von jenen lediglich im Größenverhältnis des unveränderten Proteinteils zur Größe des gesamten Proteins. In solchen insertionsmutierten Proteinen ist der Anteil an Fremdprotein geringer als in chimären Proteinen.

Inversionsmutagenese, also eine partielle Sequenzumkehrung, kann als Sonderform sowohl der Deletion, als auch der Insertion angesehen werden. Dasselbe gilt für eine von der ursprünglichen Aminosäureabfolge abweichende Neugruppierung verschiedener Molekülteile. Sie kann sowohl als Deletionsvariante, als Insertionsvariante, als auch als Shuffling-Variante des ursprünglichen Proteins angesehen werden.

Unter Derivaten werden im Sinne der vorliegenden Anmeldung solche Proteine verstanden, deren reine Aminosäurekette chemisch modifiziert worden ist. Solche Derivatisierungen können beispielsweise biologisch im Zusammenhang mit der Proteinbiosynthese durch die Wirtszelle erfolgen. Hierfür können molekularbiologische Methoden eingesetzt werden. Sie können aber auch chemisch durchgeführt werden, etwa durch die chemische Umwandlung einer Seitenkette einer Aminosäure oder durch kovalente Bindung einer anderen Verbindung an das Protein. Bei solch einer Verbindung kann es sich beispielsweise auch um andere Proteine handeln, die beispielsweise über bifunktionelle chemische Verbindungen an erfindungsgemäße Proteine gebunden werden. Derartige Modifizierungen 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. Ebenso ist unter Derivatisierung die kovalente Bindung an einen makromolekularen Träger zu verstehen, genauso wie auch ein nichtkovalenter Einschluss in geeignete makromolekulare Käfigstrukturen.

Einen weiteren Gegenstand der Erfindung stellt somit eine Protease dar, die dadurch gekennzeichnet ist, dass sie aus einer erfindungsgemäßen Protease als Ausgangsmolekül erhaltbar ist durch Fragmentierung, Deletions-, Insertions- oder Substitutionsmutagenese und eine Aminosäuresequenz umfasst, die über eine Länge von mindestens 300 und zunehmend bevorzugt mindestens 290, 280, 270, 260, 250, 240, 230, 220, 210, 200, 190, 180, 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110, 100, 90, 80, 70, 60 und 50 zusammenhängenden Aminosäurepositionen mit dem Ausgangsmolekül übereinstimmt.

So ist es beispielsweise möglich, an den Termini oder in den Loops des Enzyms einzelne Aminosäuren zu deletieren, ohne daß dadurch die proteolytische Aktivität verlorengeht. Durch derartige Deletionen kann beispielsweise oftmals auch die Allergenizität betreffender Proteasen gesenkt und somit insgesamt ihre Einsetzbarkeit verbessert werden. Die Fragmentierung kommt dem nachstehend ausgeführten Aspekt der Insertions- oder Substitutionsmutagenese und/oder auch einer möglichen Fusion mit anderen Enzymen zugute. Hinsichtlich des beabsichtigten Einsatzes dieser Enzyme ist es besonders bevorzugt, wenn sie auch nach der Fragmentierung oder Deletionsmutagenese eine proteolytische Aktivität besitzen.

Auch Insertionen und Substitutionen in Subtilasen können vorteilhafte Wirkungen begründen. Prinzipiell gehören hierzu auch Einzelaustausche von Aminosäuren, es können aber auch mehrere zusammenhängende Aminosäuren gegen andere ausgetauscht werden. Hierzu gehören auch Neukombinationen von größeren Enzymabschnitten, so den oben genannten Fragmenten, mit anderen Proteasen oder Proteinen anderer Funktion. So ist es beispielsweise möglich, ein erfindungsgemäßes Protein oder Teile davon über peptidische Linker oder direkt als Fusionsprotein mit Bindungsdomänen aus anderen Proteinen, etwa der Cellulose-Bindungsdomäne, zu versehen und dadurch die Hydrolyse des Substrats effektiver zu gestalten. Ebenso können erfindungsgemäße Proteine beispielsweise auch mit Amylasen oder Cellulasen verknüpft werden, um eine Doppelfunktion auszuüben.

Einen weiteren Gegenstand der Erfindung stellt eine Protease dar, die dadurch gekennzeichnet ist, dass sie aus einer erfindungsgemäßen Protease als Ausgangsmolekül erhaltbar ist und einen oder mehrere Aminosäureaustausche in Positionen aufweist, die den Positionen 3, 4, 36, 42, 47, 56, 61, 69, 87, 96, 99, 101, 102, 104, 114, 118, 120, 130, 139, 141, 142, 154, 157, 188, 193, 199, 205, 211, 224, 229, 236, 237, 242, 243, 255 und 268 der Alkalischen Protease aus *Bacillus lentus* gemäß SEQ ID NO. 4 in einem Alignment zugeordnet sind. Die Aminosäurepositionen werden hierbei durch ein Alignment der Aminosäuresequenz einer erfindungsgemäßen Protease mit der Aminosäuresequenz der Alkalischen Protease aus *Bacillus lentus*, wie sie in SEQ ID NO. 4 angegeben ist, definiert. Auf diese Art und Weise werden so genannte homologe Positionen

bestimmt und einander zugeordnet. Ein Beispiel für ein solches Alignment ist in Figur 1 angegeben.

Eine endgültige Bestätigung in der Zuordnung homologer Positionen, d.h. insbesondere deren funktionelle Entsprechung, können letztlich nur Vergleichsversuche liefern, wonach die beiden auf der Basis eines Alignments einander zugeordneten Positionen in beiden miteinander verglichenen Proteasen auf die gleiche Weise punktmuiert werden und beobachtet wird, ob bei beiden die enzymatische Aktivität auf gleiche Weise verändert wird. Geht beispielsweise ein Aminosäureaustausch in einer bestimmten Position der *B. lentus*-Alkalische Protease (BLAP) mit einer Erhöhung von K_M oder einem anderen enzymatischen Parameter einher, und wird tendenziell die gleiche Verschiebung des K_M -Werts in einer erfindungsgemäßen Protease-Variante beobachtet, deren Aminosäureaustausch durch dieselbe eingeführte Aminosäure erreicht wurde, so ist hierin die Bestätigung dieses Erfindungsaspekts zu sehen.

Da die *B. lentus*-Alkalische Protease im Stand der Technik ein wichtiges Referenzmolekül zur Beschreibung neuer Proteasen und von Punktmutationen darstellt und die hier beschriebenen neuen Proteasen und somit auch ihre Sequenz bislang unbekannt sind, erscheint es vorteilhaft, in der Zuordnung der Punktmutationen auf die Zählung der Alkalische Protease aus *Bacillus lentus* (SEQ ID NO. 4) Bezug zu nehmen. Weiterhin richtet sich die Zählung im Allgemeinen nach dem reifen (maturen) Protein. Vorteilhafte Positionen für Sequenzveränderungen, beispielsweise durch Punktmutationen, der Alkalischen Protease aus *Bacillus lentus*, die übertragen auf homologe Positionen der erfindungsgemäßen Proteasen bevorzugt von Bedeutung sind und der Protease vorteilhafte funktionelle Eigenschaften verleihen, werden nachfolgend angegeben. Es sind die Positionen 3, 4, 36, 42, 47, 56, 61, 69, 87, 96, 99, 101, 102, 104, 114, 118, 120, 130, 139, 141, 142, 154, 157, 188, 193, 199, 205, 211, 224, 229, 236, 237, 242, 243, 255 und 268, zuzuordnen in einem Alignment mit SEQ ID NO. 4 und damit in der Zählung gemäß SEQ ID NO. 4. Vorteilhaft sind insbesondere beispielsweise Substitutionen 3T, 4I, 61A, 99G, 99A, 99S, 154D, 154E, 211D, 211G und 211E, sofern die entsprechend homologen Positionen nicht schon natürlicherweise von einer dieser bevorzugten Aminosäuren eingenommen werden.

In den genannten Positionen liegen in dem Wildtypmolekül der *B. lentus*-Alkalischen Protease folgende Aminosäurereste: S3, V4, S36, N42, A47, T56, G61, T69, E87, A96, R99, A101, I102, S104, N114, H118, A120, S130, S139, T141, S142, S154, S157, A188, V193, V199, G205, L211, A224, K229, S236, N237, N242, H243, N255 beziehungsweise T268.

Die Austausche 3T und 4I führen vermutlich über einen Stabilisierungseffekt auf das Molekül zu einer Verbesserung dessen Beitrags zur Waschleistung eines Wasch- oder Reinigungsmittels.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine zuvor beschriebene Protease, die zusätzlich stabilisiert ist, insbesondere durch Kopplung an ein Polymer.

Denn eine Erhöhung der Stabilität bei der Lagerung und/oder während des Einsatzes, beispielsweise beim Waschprozess führt dazu, daß ihre Aktivität länger anhält und damit in der Wirkung verstärkt wird. Als Stabilisierungsmöglichkeiten kommen alle im Stand der Technik beschriebenen und zweckmäßigen Strategien in Betracht.

Alternativ hierzu sind auch solche Stabilisierungen geeignet, die über Punktmutagenese des Moleküls selbst möglich sind (und aufgrund der Sequenzunterschiede bereits unter die oben beschriebenen Ausführungsformen fallen). Denn diese Stabilisierungen erfordern im Anschluß an die Proteingewinnung keine weiteren Arbeitsschritte. Einige hierfür geeignete Punktmutationen sind an sich aus dem Stand der Technik bekannt. So können Proteasen beispielsweise auch dadurch stabilisiert werden, dass man bestimmte Tyrosin-Reste gegen andere austauscht.

Weitere Möglichkeiten 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 gegen eine oder mehrere negativ geladene Aminosäuren und/oder durch Einführen von Punktmutationen 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 bzw. 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 Molekül auf mehrere Arten stabilisiert wird. Denn es kann davon ausgegangen werden, dass mehrere stabilisierende Mutationen additiv oder synergistisch wirken.

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

Unter Derivaten werden daher solche Proteine verstanden, die durch eine zusätzliche Modifikation aus den ausgeführten Proteinen erhalten werden. Bevorzugt handelt es sich hierbei um eine

chemische Modifikation der erfindungsgemäßen Proteine. Derartige Modifikationen können beispielsweise die Stabilität, Substratspezifität oder die Bindungsstärke an das Substrat oder die enzymatische Aktivität beeinflussen. Sie können auch dazu dienen, um die Allergenizität und/oder Immunogenizität des Proteins herabzusetzen und damit beispielsweise dessen Hautverträglichkeit zu erhöhen.

Solche Derivatisierungen, insbesondere chemische Modifikationen, können beispielsweise auf biologischem Wege erfolgen, etwa im Zusammenhang mit der Proteinbiosynthese durch den produzierenden Wirtsorganismus. Hier sind Kopplungen niedrigmolekularer Verbindungen wie von Lipiden oder Oligosacchariden besonders hervorzuheben.

Derivatisierungen können aber auch auf chemischem Wege durchgeführt werden, etwa durch die chemische Umwandlung einer Seitenkette oder durch kovalente Bindung einer anderen, beispielsweise makromolekularen Verbindung an das Protein, beispielsweise die Kopplung von Aminen an Carboxylgruppen eines Enzyms zur Veränderung des isoelektrischen Punkts. Es können ferner auch Makromoleküle wie Proteine, etwa über bifunktionelle chemische Verbindungen, an erfindungsgemäße Proteine gebunden werden. So ist es beispielsweise möglich, ein erfindungsgemäßes Protein auch über einen Nichtprotein-Linker mit einer spezifischen Bindungsdomäne zu versehen. Solche Derivate eignen sich besonders für den Einsatz in in Wasch- oder Reinigungsmitteln. Ferner können auch Protease-Inhibitoren über Linker, insbesondere Aminosäure-Linker, an die erfindungsgemäßen Proteine gebunden werden. Kopplungen mit sonstigen makromolekularen Verbindungen, wie etwa Polyethylenglykol, können das Protein auch hinsichtlich weiterer Eigenschaften wie Stabilität oder Hautverträglichkeit verbessern.

Unter Derivaten erfindungsgemäßer Proteine können im weitesten Sinne auch Präparationen dieser Proteine verstanden werden. Je nach Gewinnung, Aufarbeitung oder Präparation kann ein Protein mit diversen anderen Stoffen vergesellschaftet sein, beispielsweise aus der Kultur der produzierenden Mikroorganismen. Ein Protein kann auch, beispielsweise zur Erhöhung seiner Lagerstabilität, mit bestimmten 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 proteolytische Funktion entfaltet. Dies kann beispielsweise über entsprechende Begleitstoffe gesteuert werden. Insbesondere die gemeinsame Präparation von Proteasen mit Protease-Inhibitoren ist vorteilhaft und aus dem Stand der Technik bekannt.

Die Lösung einer Teilaufgabe und somit einen eigenständigen Erfindungsgegenstand bilden Nukleinsäuremoleküle, die für eine erfindungsgemäße Protease kodieren sowie Vektoren, enthaltend solche Nukleinsäuremoleküle.

Unter Nukleinsäuren sind im Sinne der vorliegenden Anmeldung die natürlicherweise aus Nukleotiden aufgebauten als Informationsträger dienenden Moleküle zu verstehen, die für die lineare Aminosäureabfolge in Proteinen oder Enzymen kodieren. Sie können als Einzelstrang, als ein zu diesem Einzelstrang komplementärer Einzelstrang oder als Doppelstrang vorliegen. Als der natürlicherweise dauerhaftere Informationsträger ist die Nukleinsäure DNA für molekularbiologische Arbeiten bevorzugt. Demgegenüber wird für die Realisierung der Erfindung in natürlicher Umgebung, wie beispielsweise in einer exprimierenden Zelle, eine RNA gebildet, weshalb erfindungswesentliche RNA-Moleküle ebenfalls Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung darstellen.

Bei DNA sind die Sequenzen beider komplementärer Stränge in jeweils allen drei möglichen Leserastern zu berücksichtigen. Ferner ist zu berücksichtigen, dass verschiedene Codon-Triplets für dieselben Aminosäuren codieren können, so dass eine bestimmte Aminosäure-Abfolge von mehreren unterschiedlichen und möglicherweise nur geringe Identität aufweisenden Nukleotidsequenzen abgeleitet werden kann, was als Degeneriertheit des genetischen Codes bezeichnet wird. Außerdem weisen verschiedene Organismen Unterschiede im Gebrauch dieser Codons auf. Aus diesen Gründen müssen sowohl Aminosäuresequenzen als auch Nukleotidsequenzen in die Betrachtung des Schutzbereichs einbezogen werden. Daher sind sämtliche Nukleotidsequenzen in die Erfindung mit eingeschlossen, die eine der vorstehend beschriebenen Proteasen kodieren können. Der Fachmann ist in der Lage, diese Nukleotidsequenzen zweifelsfrei zu bestimmen, da trotz der Degeneriertheit des genetischen Codes einzelnen Codons definierte Aminosäuren zuzuordnen sind. Daher kann der Fachmann ausgehend von einer sind jeweils nur als eine beispielhafte Codierung für eine bestimmte Aminosäurefolge anzusehen.

Die einem Protein entsprechende Informationseinheit wird auch im Sinne der vorliegenden Anmeldung als Gen bezeichnet.

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 Genen 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.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist das Nukleinsäuremolekül, das für eine erfindungsgemäße Protease kodiert, dadurch gekennzeichnet, dass es eine Nukleinsäuresequenz umfasst, die ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus

- a) Nukleinsäuresequenz, die zu der in SEQ ID NO. 1 angegebenen Nukleinsäuresequenz in einem Teilstück von mindestens 300 zusammenhängenden Nukleotiden mindestens zu 59% identisch ist
- b) Nukleinsäuresequenz, die zu der in SEQ ID NO. 1 angegebenen Nukleinsäuresequenz in den Positionen 343 bis 1269 mindestens zu 59% identisch ist
- c) Nukleinsäuresequenz, die zu der in SEQ ID NO. 1 angegebenen Nukleinsäuresequenz mindestens zu 59% identisch ist.

In weiteren Ausführungsformen der Erfindung ist das Nukleinsäuremolekül dadurch gekennzeichnet, dass es eine Nukleinsäuresequenz umfasst, die zu der in SEQ ID NO. 1 angegebenen Nukleinsäuresequenz in einem Teilstück von zunehmend bevorzugt 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100 zusammenhängenden Nukleinsäureresten mindestens zu 59% und zunehmend bevorzugt zu mindestens 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 94,5%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,5% und ganz besonders bevorzugt zu 100% identisch ist.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung ist das Nukleinsäuremolekül, das für eine erfindungsgemäße Protease kodiert, dadurch gekennzeichnet, dass es eine Nukleinsäuresequenz umfasst, die zu der in SEQ ID NO. 1 angegebenen Nukleinsäuresequenz in den Positionen 343 bis 1269 zunehmend bevorzugt zu mindestens 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 94,5%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,5% und ganz besonders bevorzugt zu 100% identisch ist. Mit diesen Positionen ist wie vorstehend erläutert der Bereich gemeint, der für das reife (mature), das heißt auch für das aktive Protein codiert. Auch das Stop-Codon ist einbezogen, denn dessen Existenz sorgt dafür, dass nicht ein größeres, evtl. nicht mehr funktionsfähiges, ungewolltes Fusionsprotein gebildet wird. Somit ist bei einer Klonierung darauf zu achten, dass an dieser Stelle ebenfalls ein Stop-Codon liegt, wenn nicht gezielt über den C-Terminus eine Proteinfusion herbeigeführt werden soll. Sollte sich später herausstellen, dass das reife (mature) Protein nur von einem Teil dieser Sequenz gebildet wird, so gilt der Schutzbereich entsprechend für diesen Teil.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung ist das Nukleinsäuremolekül dadurch gekennzeichnet, dass es eine Nukleinsäuresequenz umfasst, die zu der in SEQ ID NO. 1

angegebenen Nukleinsäuresequenz zunehmend bevorzugt zu mindestens 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 94,5%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,5% und ganz besonders bevorzugt zu 100% identisch ist.

Bevorzugt sind solche Nukleinsäuren, die für reife (mature) Proteine codieren, und zunehmend bevorzugt sind besonders solche, die für zunehmend aktivere Varianten der erfindungsgemäßen Proteine codieren.

Weiterhin bevorzugt sind solche Nukleinsäuren, von denen eines oder vorzugsweise mehrere Codons durch synonyme Codons ersetzt worden sind.

Dieser Aspekt bezieht sich auf die heterologe Expression der betreffenden Proteasen. So besitzt jeder Organismus, insbesondere jeder Produktionsstamm, eine gewisse Codon-Usage. Hierbei kann es zu Engpässen in der Proteinbiosynthese kommen, wenn die auf der transgenen Nukleinsäure liegenden Codons in der Wirtszelle einer vergleichsweise geringen Zahl von beladenen tRNAs gegenüberstehen. Synonyme Codons codieren dagegen für dieselben Aminosäuren und können in Abhängigkeit vom Wirt besser translatiert werden. Dieses gegebenenfalls notwendige Umschreiben hängt somit ab von der Wahl des Expressionssystems. Insbesondere bei Proben aus unbekanntem, eventuell nicht kultivierbarem Organismus kann eine entsprechende Anpassung notwendig sein.

Die vorliegende Erfindung umfasst die Herstellung rekombinanter Proteine. Hierunter sind erfindungsgemäß alle gentechnischen oder mikrobiologischen Verfahren zu verstehen, die darauf beruhen, dass die Gene für die interessierenden Proteine in eine für die Produktion geeignete Wirtszelle eingebracht und von dieser transkribiert und translatiert werden. Geeigneterweise erfolgt die Einschleusung der betreffenden Gene über Vektoren, insbesondere Expressionsvektoren; aber auch über solche, die bewirken, dass das interessierende Gen in der Wirtszelle in ein bereits vorhandenes genetisches Element wie das Chromosom oder andere Vektoren eingefügt werden kann. Die funktionelle Einheit aus Gen und Promotor und eventuellen weiteren genetischen Elementen wird erfindungsgemäß als Expressionskassette bezeichnet. Sie muss dafür jedoch nicht notwendigerweise auch als physische Einheit vorliegen.

Unter Vektoren werden im Sinne der vorliegenden Erfindung aus Nukleinsäuren bestehende Elemente verstanden, die als kennzeichnenden Nukleinsäurebereich ein interessierendes Gen enthalten. Sie vermögen dieses 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 die Nukleinsäure geeigneterweise in einen Vektor kloniert. Ein weiterer molekularbiologischer Aspekt der Erfindung besteht somit in Vektoren mit den Genen für die entsprechenden Proteine. Dazu können beispielsweise solche gehören, die sich von bakteriellen Plasmiden, von Viren oder von Bacteriophagen ableiten, 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. Es ist dabei im Sinne der Erfindung unerheblich, ob sie sich extrachromosomal als eigene Einheiten etablieren oder in ein Chromosom bzw. chromosomale DNA integrieren. Welches der zahlreichen aus dem Stand der Technik bekannten Systeme gewählt wird, hängt vom Einzelfall ab. Ausschlaggebend können beispielsweise die erreichbare Kopienzahl, die zur Verfügung stehenden Selektionssysteme, darunter vor allem Antibiotikaresistenzen, oder die Kultivierbarkeit der zur Aufnahme der Vektoren befähigten Wirtszellen sein.

Die Vektoren bilden geeignete Ausgangspunkte für molekularbiologische und biochemische Untersuchungen des betreffenden Gens oder zugehörigen Proteins und für erfindungsgemäße Weiterentwicklungen und letztlich für die Amplifikation und Produktion erfindungsgemäßer Proteine.

Einen weiteren Gegenstand der Erfindung stellen somit Vektoren dar, die mindestens ein Nukleinsäuremolekül beinhalten, welches für eine erfindungsgemäße Protease kodiert, insbesondere ein Nukleinsäuremolekül, wie es vorstehend beschrieben ist. In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung ist der Vektor dadurch gekennzeichnet, dass der Vektor ein Klonierungsvektor oder ein Expressionsvektor ist. Klonierungsvektoren eignen sich neben der Lagerung, der biologischen Amplifikation oder der Selektion des interessierenden Gens für die Charakterisierung des betreffenden Gens, etwa über das Erstellen einer Restriktionskarte oder die Sequenzierung. Klonierungsvektoren sind auch deshalb bevorzugte Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung, weil sie eine transportierbare und lagerfähige Form der beanspruchten DNA darstellen. Sie sind auch bevorzugte Ausgangspunkte für molekularbiologische Techniken, die nicht an Zellen gebunden sind, wie beispielsweise die Polymerasekettenreaktion.

Expressionsvektoren sind chemisch den Klonierungsvektoren ähnlich, unterscheiden sich aber in jenen Teilsequenzen, die sie dazu befähigen, in den für die Produktion von Proteinen optimierten Wirtszellen oder Wirtsorganismen zu replizieren und dort das enthaltene Gen zur Expression zu

bringen, d.h. die genetische Information des interessierenden Gens in der Wirtszelle als Protein zu realisieren. Bevorzugte Ausführungsformen sind Expressionsvektoren, die selbst die zur Expression notwendigen genetischen Elemente tragen. Die Expression wird beispielsweise von Promotoren beeinflusst, welche die Transkription des Gens regulieren. So kann die Expression durch den natürlichen, ursprünglich vor diesem Gen lokalisierten Promotor erfolgen, aber auch nach gentechnischer Fusion sowohl durch einen auf dem Expressionsvektor bereitgestellten Promotor der Wirtszelle als auch durch einen modifizierten oder einen völlig anderen Promotor eines anderen Organismus oder einer anderen Wirtszelle.

Bevorzugte Ausführungsformen sind solche Expressionsvektoren, die über Änderungen der Kulturbedingungen oder Zugabe von bestimmten Verbindungen, wie beispielsweise die Zelldichte oder spezielle Faktoren, regulierbar sind, beispielsweise induzierbare Vektoren. Expressionsvektoren ermöglichen, dass das zugehörige Protein heterolog, also in einer anderen Zelle bzw. Wirtszelle als derjenigen, aus der es natürlicherweise gewonnen werden kann, produziert wird. Die Zellen können dabei durchaus zu verschiedenen Organismen zugehörig sein oder von verschiedenen Organismen stammen. Auch eine homologe Proteingewinnung aus einer das Gen natürlicherweise exprimierenden Wirtszelle über einen passenden Vektor liegt innerhalb des Schutzbereichs der vorliegenden Erfindung. Diese kann den Vorteil aufweisen, dass natürliche, mit der Translation in einem Zusammenhang stehende Modifikationsreaktionen an dem entstehenden Protein genauso durchgeführt werden, wie sie auch natürlicherweise ablaufen würden.

Eine weitere Ausführungsform stellen Expressionssysteme dar, bei denen zusätzliche Gene, beispielsweise solche, die auf anderen Vektoren zur Verfügung gestellt werden, die Produktion erfindungsgemäßer Proteine beeinflussen. Hierbei kann es sich um modifizierende Genprodukte handeln oder um solche, die mit dem erfindungsgemäßen Protein gemeinsam aufgereinigt werden sollen, etwa um dessen enzymatische Funktion zu beeinflussen. Dabei kann es sich beispielsweise um andere Proteine oder Enzyme, um Inhibitoren oder um solche Elemente handeln, die die Wechselwirkung mit verschiedenen Substraten beeinflussen.

Alternative Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung können auch zellfreie Expressionssysteme sein, bei denen die Proteinbiosynthese in vitro nachvollzogen wird. Derartige Expressionssysteme sind im Stand der Technik ebenfalls etabliert.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine nicht menschliche Wirtszelle, die eine erfindungsgemäße Protease oder ein Fragment derselben beinhaltet oder die zu deren Herstellung angeregt werden kann, vorzugsweise unter Einsatz eines Expressionsvektors. Die in-vivo-

Synthese eines erfindungsgemäßen Enzyms, also die durch lebende Zellen, erfordert den Transfer des zugehörigen Gens in eine Wirtszelle, deren sogenannte Transformation. 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 dem Expressionsvektor und/oder dessen stabile Etablierung angeht, beispielsweise einzellige Pilze oder Bakterien. Zudem 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. Häufig müssen aus der Fülle an verschiedenen im Stand der Technik zur Verfügung stehenden Systemen die optimalen Expressionssysteme für den Einzelfall experimentell ermittelt werden. Jedes erfindungsgemäße Protein kann auf diese Weise aus einer Vielzahl von Wirtszellen gewonnen werden. Auch solche Wirtszellen sind bevorzugt, die dadurch gekennzeichnet sind, dass sie nach Transformation mit einem der oben beschriebenen Vektoren erhalten worden sind. Dabei kann es sich beispielsweise auch um Klonierungsvektoren handeln, die zur Lagerung und/oder Modifikation beispielsweise in einen beliebigen Bakterienstamm oder eine andere erfindungsgemäße Wirtszelle eingebracht worden sind. Solche Schritte sind in der Lagerung und in der Weiterentwicklung betreffender genetischer Elemente allgemein verbreitet. Da aus diesen Wirtszellen die betreffenden genetischen Elemente in nachfolgende, zur Expression geeignete Wirtszellen unmittelbar übertragen werden können, handelt es sich auch bei den vorangegangenen Transformationsprodukten um Verwirklichungen des betreffenden Erfindungsgegenstands.

Bevorzugte Ausführungsformen stellen solche Wirtszellen dar, die aufgrund genetischer Regulationselemente, die beispielsweise auf dem Expressionsvektor 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 sehr wirtschaftliche Produktion der interessierenden Proteine.

Bevorzugte Wirtszellen sind prokaryontische oder bakterielle Zellen. Bakterien zeichnen sich gegenüber Eukaryonten in der Regel durch kürzere Generationszeiten und geringere Ansprüche an die Kultivierungsbedingungen aus. Dadurch können kostengünstige Verfahren zur Gewinnung erfindungsgemäßer Proteine etabliert werden. Bei gram-negativen Bakterien, wie beispielsweise *Escherichia coli* (*E. coli*), werden eine Vielzahl von Proteinen in den periplasmatischen Raum sekretiert, also in das Kompartiment zwischen den beiden die Zellen einschließenden Membranen. Dies kann für spezielle Anwendungen vorteilhaft sein. Grampositive Bakterien, wie beispielsweise Bacilli oder Actinomyceten oder andere Vertreter der Actinomycetales, besitzen demgegenüber

keine äußere Membran, so dass sekretierte Proteine sogleich in das die Zellen umgebende Nährmedium abgegeben werden, aus welchem sich nach einer weiteren bevorzugten Ausführungsform die exprimierten erfindungsgemäßen Proteine direkt aufreinigen lassen.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung stellen somit Wirtszellen dar, die dadurch gekennzeichnet sind, dass sie die Protease oder ein Fragment derselben in das die Wirtszelle umgebende Medium sezernieren.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist die erfindungsgemäße Wirtszelle dadurch gekennzeichnet, dass sie ein Bakterium ist, insbesondere eines, welches ausgewählt ist aus der Gruppe der Gattungen von *Escherichia*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Corynebakterium*, *Arthrobacter*, *Streptomyces*, *Stenotrophomonas* und *Pseudomonas*.

Besonders bevorzugt handelt es sich bei der Wirtszelle um ein Bakterium, welches 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 pumilus*, *Staphylococcus carnosus*, *Corynebacterium glutamicum*, *Arthrobacter oxidans*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces coelicolor* und *Stenotrophomonas maltophilia*.

Die Wirtszellen können hinsichtlich ihrer Anforderungen an die Kulturbedingungen verändert sein, andere oder zusätzliche Selektionsmarker aufweisen oder andere oder zusätzliche Proteine exprimieren. Es kann sich insbesondere um solche Wirtszellen handeln, die zusätzlich zu dem erfindungsgemäß hergestellten Protein noch weitere, insbesondere wirtschaftlich interessante Proteine exprimieren.

Die Wirtszelle kann aber auch eine eukaryontische Zelle sein, die dadurch gekennzeichnet ist, dass sie einen Zellkern besitzt. Eine weitere Ausführungsform 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 Systeme 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

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 Varianten eignen.

Die erfindungsgemäßen Wirtszellen werden in an sich bekannter 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 Produkt aus dem Medium entnommen werden kann.

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 des rekombinanten Proteins. Alle Fermentationsverfahren, die auf einem der oben ausgeführten Verfahren zur Herstellung der rekombinanten Proteine beruhen, stellen entsprechend bevorzugte Ausführungsformen dieses Erfindungsgegenstandes dar.

Hierbei müssen die für die eingesetzten Herstellungsverfahren, für die Wirtszellen und/oder die herzustellenden Proteine jeweils optimalen Bedingungen anhand der zuvor optimierten Kulturbedingungen der betreffenden Stämme nach dem Wissen des Fachmanns, beispielsweise hinsichtlich Fermentationsvolumen, Medienzusammensetzung, Sauerstoffversorgung oder Rührergeschwindigkeit experimentell ermittelt werden.

Fermentationsverfahren, die dadurch gekennzeichnet sind, dass die Fermentation über eine Zulaufstrategie durchgeführt wird, kommen ebenfalls in Betracht. Hierbei werden die Medienbestandteile, die durch die fortlaufende Kultivierung verbraucht werden, zugefüttert; man spricht auch von einer Zufütterungsstrategie. Hierdurch können beträchtliche Steigerungen sowohl in der Zelldichte, als auch in der Biotrockenmasse und/oder vor allem der Aktivität des interessierenden Proteins erreicht werden.

Analog dazu kann die Fermentation auch so gestaltet werden, dass unerwünschte Stoffwechselprodukte herausgefiltert oder durch Zugabe von Puffer oder jeweils passende Gegenionen neutralisiert werden.

Das hergestellte Protein kann nachträglich aus dem Fermentationsmedium geerntet werden. Dieses Fermentationsverfahren ist gegenüber der Produktaufbereitung aus der Trockenmasse bevorzugt, erfordert jedoch die Zurverfügungstellung geeigneter Sekretionsmarker und Transportsysteme. Ohne Sekretion ist u.U. die Aufreinigung des Proteins aus der Zellmasse erforderlich, auch dazu sind verschiedene Verfahren bekannt, wie Fällung z.B. durch Ammoniumsulfat oder Ethanol, oder die chromatographische Reinigung, wenn erforderlich bis zur Homogenität. Die Mehrzahl der beschriebenen technischen Verfahren dürfte jedoch mit einer angereicherten, stabilisierten Präparation auskommen.

Alle bereits oben ausgeführten Elemente können zu Verfahren kombiniert werden, um erfindungsgemäße Proteine herzustellen. Es ist dabei für jedes erfindungsgemäße Protein eine Vielzahl von Kombinationsmöglichkeiten an Verfahrensschritten denkbar. Das optimale Verfahren muß für jeden konkreten Einzelfall experimentell ermittelt werden.

Durch Expression oder Klonierung können die erfindungsgemäßen Proteasen in der für den technischen Einsatz erforderlichen Menge zur Verfügung gestellt werden.

Einen eigenständigen Erfindungsgegenstand stellen somit auch Verfahren zur Herstellung einer erfindungsgemäßen Protease dar. Dazu gehört jedes Verfahren, das zur Herstellung einer oben beschriebenen, erfindungsgemäßen Protease geeignet ist beziehungsweise das den Erhalt einer erfindungsgemäßen Protease ermöglicht. Hierzu zählen beispielsweise auch chemische Syntheseverfahren.

Demgegenüber bevorzugt sind jedoch alle im Stand der Technik etablierten, oben in einzelnen Aspekten bereits angesprochenen molekularbiologischen, mikrobiologischen beziehungsweise biotechnologischen Herstellverfahren, die auf den oben bezeichneten erfindungsgemäßen Proteinen, Nukleinsäuremolekülen, Vektoren oder Wirtszellen aufbauen. Hierfür kann entsprechend dem oben Gesagten beispielsweise auf die im Sequenzprotokoll unter SEQ ID NO. 1 angegebene Nukleinsäure oder hieraus erhaltene Mutanten oder Teilsequenzen zurückgegriffen werden.

Vorzugsweise handelt es sich dabei um Verfahren, die unter Einsatz einer zuvor bezeichneten Nukleinsäure, vorzugsweise unter Einsatz eines vorstehend beschriebenen Vektors und besonders bevorzugt vorzugsweise unter Einsatz einer zuvor bezeichneten, vorteilhafterweise gentechnisch modifizierten Wirtszelle erfolgen. Denn hierdurch wird die entsprechend bevorzugte genetische Information in mikrobiologisch verwertbarer Form zur Verfügung gestellt.

Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung können auf der Grundlage der zugehörigen Nukleinsäuresequenzen auch zellfreie Expressionssysteme sein, bei denen die Proteinbiosynthese in vitro nachvollzogen wird. Alle bereits oben ausgeführten Elemente können auch zu neuen Verfahren kombiniert werden, um erfindungsgemäße Proteine herzustellen. Es ist dabei für jedes erfindungsgemäße Protein eine Vielzahl von Kombinationsmöglichkeiten an Verfahrensschritten denkbar, so dass optimale Verfahren für jeden konkreten Einzelfall experimentell ermittelt werden müssen.

Entsprechend dem oben Gesagten sind unter den genannten Verfahren weiterhin solche bevorzugt, bei denen die Nukleotidsequenz in einem, vorzugsweise mehreren Codons an die Codon-Usage des Wirtsstamms angepasst worden ist.

Einen eigenen Erfindungsgegenstand stellt ein Mittel dar, das dadurch gekennzeichnet, dass es mindestens eine erfindungsgemäße Protease wie vorstehend beschrieben enthält.

Hiermit werden alle Arten von Mitteln, insbesondere Gemische, Rezepturen, Lösungen etc., deren Einsetzbarkeit durch Zugabe eines oben beschriebenen, erfindungsgemäßen Proteins verbessert wird, in den Schutzbereich der vorliegenden Erfindung eingeschlossen. Es kann sich dabei je nach Einsatzgebiet beispielsweise um feste Gemische, beispielsweise Pulver mit gefriergetrockneten oder verkapselten Proteinen, oder um geförmige oder flüssige Mittel handeln. Bevorzugte Rezepturen enthalten beispielsweise Puffersubstanzen, Stabilisatoren, Reaktionspartner und/oder Cofaktoren der Proteasen und/oder andere mit den Proteasen synergistische Inhaltsstoffe. Insbesondere sind darunter Mittel für die weiter unten ausgeführten Einsatzgebiete zu verstehen. Weitere Einsatzgebiete gehen aus dem Stand der Technik hervor und werden beispielsweise in dem Handbuch „Industrial enzymes and their applications“ von H. Uhlig, Wiley-Verlag, New York, 1998 dargestellt.

In bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung ist ein erfindungsgemäßes Mittel dadurch gekennzeichnet, dass es ein Waschmittel, Handwaschmittel, Spülmittel, Handgeschirrspülmittel, Maschinengeschirrspülmittel, Reinigungsmittel, Zahnprothesen- oder Kontaktlinsenpflegemittel, Nachspülmittel, Desinfektionsmittel, kosmetisches Mittel, pharmazeutisches Mittel oder ein Mittel zur Behandlung von Filtermedien, Textilien, Pelzen, Papier, Fellen oder Leder, ist, insbesondere ein Wäschewaschmittel oder ein Geschirrspülmittel.

Zu diesem Erfindungsgegenstand zählen alle denkbaren Wasch- bzw. Reinigungsmittelarten, sowohl Konzentrate als auch unverdünnt anzuwendende Mittel, zum Einsatz im kommerziellen Maßstab, in der Waschmaschine oder bei der Hand-Wäsche beziehungsweise -Reinigung. Dazu gehören beispielsweise Waschmittel für Textilien, Teppiche, oder Naturfasern, für die nach der

vorliegenden Erfindung 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 solche wird nach der vorliegenden Erfindung die Bezeichnung Reinigungsmittel verwendet.

Ein erfindungsgemäßes Mittel kann sowohl ein Mittel für Großverbraucher oder technische Anwender als auch ein Produkt für den Privatverbraucher sein, wobei alle im Stand der Technik etablierten Wasch- und Reinigungsmittelarten ebenfalls Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung darstellen.

Die erfindungsgemäßen Wasch- oder Reinigungsmittel, die als insbesondere pulverförmige Feststoffe, in nachverdichteter Teilchenform, als homogene Lösungen oder Suspensionen vorliegen können, können außer dem erfindungsgemäß eingesetzten Wirkstoff – einer erfindungsgemäßen Protease - im Prinzip alle bekannten und in derartigen Mitteln üblichen Inhaltsstoffe enthalten, wobei mindestens ein weiterer Inhaltsstoff in dem Mittel vorhanden ist. Die erfindungsgemäßen Mittel können insbesondere Buildersubstanzen, oberflächenaktive Tenside, Bleichmittel auf Basis organischer und/oder anorganischer Persauerstoffverbindungen, Bleichaktivatoren, wassermischbare organische Lösungsmittel, Enzyme, Sequestrierungsmittel, Elektrolyte, pH-Regulatoren und 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) der Mittel erweist sich als vorteilhaft, da ein solches Mittel eine verbesserte Reinigungsleistung durch sich ergebende Synergismen, insbesondere zwischen der Protease und dem weiteren Inhaltsstoff, aufweist. Dies bedeutet, dass das Mittel eine verbesserte Entfernung von Anschmutzungen, beispielsweise proteinhaltigen Anschmutzungen, bewirkt im Vergleich mit einem Mittel, welches entweder nur eine der beiden Komponenten beinhaltet, oder auch im Vergleich zur erwarteten Reinigungsleistung eines Mittels mit beiden Komponenten auf Grund der bloßen Addition der jeweiligen Einzelbeiträge dieser beiden Komponenten zur Reinigungsleistung des Mittels. Insbesondere durch die Kombination einer erfindungsgemäßen Protease mit einem der nachfolgend beschriebenen Tenside und/oder Buildersubstanzen und/oder Bleichmittel wird ein solcher Synergismus erreicht.

Die erfindungsgemäßen Mittel können ein Tensid oder mehrere Tenside enthalten, wobei insbesondere anionische Tenside, nichtionische Tenside und deren Gemische, aber auch kationische, zwitterionische und amphotere Tenside in Frage kommen.

Geeignete nichtionische Tenside sind insbesondere Alkylglykoside und Ethoxylierungs- und/oder Propoxylierungsprodukte von Alkylglykosiden oder linearen oder verzweigten Alkoholen mit jeweils 12 bis 18 C-Atomen im Alkylteil und 3 bis 20, vorzugsweise 4 bis 10 Alkylethergruppen. Weiterhin sind entsprechende Ethoxylierungs- und/oder Propoxylierungsprodukte von N-Alkyl-aminen, vicinalen Diolen, Fettsäureestern und Fettsäureamiden, die hinsichtlich des Alkylteils den genannten langkettigen Alkoholderivaten entsprechen, sowie von Alkylphenolen mit 5 bis 12 C-Atomen im Alkylrest brauchbar.

Als nichtionische Tenside werden vorzugsweise alkoxylierte, vorteilhafterweise ethoxylierte, insbesondere primäre Alkohole mit vorzugsweise 8 bis 18 C-Atomen und durchschnittlich 1 bis 12 Mol Ethylenoxid (EO) pro Mol Alkohol eingesetzt, in denen der Alkoholrest linear oder bevorzugt in 2-Stellung methylverzweigt sein kann beziehungsweise lineare und methylverzweigte Reste im Gemisch enthalten kann, so wie sie üblicherweise in Oxoalkoholresten vorliegen. Insbesondere sind jedoch Alkoholethoxylate mit linearen Resten aus Alkoholen nativen Ursprungs mit 12 bis 18 C-Atomen, z.B. aus Kokos-, Palm-, Talgfett- oder Oleylalkohol, und durchschnittlich 2 bis 8 EO pro Mol Alkohol bevorzugt. Zu den bevorzugten ethoxylierten Alkoholen gehören beispielsweise C₁₂-C₁₄-Alkohole mit 3 EO oder 4 EO, C₉-C₁₁-Alkohole mit 7 EO, C₁₃-C₁₅-Alkohole mit 3 EO, 5 EO, 7 EO oder 8 EO, C₁₂-C₁₈-Alkohole mit 3 EO, 5 EO oder 7 EO und Mischungen aus diesen, wie Mischungen aus C₁₂-C₁₄-Alkohol mit 3 EO und C₁₂-C₁₈-Alkohol mit 7 EO. Die angegebenen Ethoxylierungsgrade stellen statistische Mittelwerte dar, die für ein spezielles Produkt eine ganze oder eine gebrochene Zahl sein können. Bevorzugte Alkoholethoxylate weisen eine eingeeengte Homologenverteilung auf (narrow range ethoxylates, NRE). Zusätzlich zu diesen nichtionischen Tensiden können auch Fettalkohole mit mehr als 12 EO eingesetzt werden. Beispiele hierfür sind (Talg-) Fettalkohole mit 14 EO, 16 EO, 20 EO, 25 EO, 30 EO oder 40 EO. Insbesondere in Mitteln für den Einsatz in maschinellen Verfahren werden üblicherweise extrem schaumarme Verbindungen eingesetzt. Hierzu zählen vorzugsweise C₁₂-C₁₈-Alkylpolyethylenglykol-polypropylenglykolether mit jeweils bei zu 8 Mol Ethylenoxid- und Propylenoxideinheiten im Molekül. Man kann aber auch andere bekannt schaumarme nichtionische Tenside verwenden, wie zum Beispiel C₁₂-C₁₈-Alkylpolyethylenglykol-polybutylenglykolether mit jeweils bis zu 8 Mol Ethylenoxid- und Butylenoxideinheiten im Molekül sowie endgruppenverschlossene Alkylpolyalkylenglykolmischether. Besonders bevorzugt sind auch die hydroxylgruppenhaltigen alkoxylierten Alkohole, wie sie in der europäischen Patentanmeldung EP 0 300 305 beschrieben sind, sogenannte Hydroxymischether. Zu den nichtionischen Tensiden zählen auch Alkylglykoside der allgemeinen Formel RO(G)_x eingesetzt werden, in der R einen primären geradkettigen oder methylverzweigten, insbesondere in 2-Stellung methylverzweigten aliphatischen Rest mit 8 bis 22, vorzugsweise 12 bis 18 C-Atomen bedeutet und G für eine Glykoseeinheit mit 5 oder 6 C-Atomen, vorzugsweise für Glucose, steht. Der Oligomerisierungsgrad x, der die Verteilung von Monoglykosiden und Oligoglykosiden angibt, ist eine beliebige Zahl – die als analytisch zu bestimmende Größe auch

gebrochene Werte annehmen kann – zwischen 1 und 10; vorzugsweise liegt x bei 1,2 bis 1,4. Ebenfalls geeignet sind Polyhydroxyfettsäureamide der Formel (III), in der R¹CO für einen aliphatischen Acylrest mit 6 bis 22 Kohlenstoffatomen, R² für Wasserstoff, einen Alkyl- oder Hydroxyalkylrest mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen und [Z] für einen linearen oder verzweigten Polyhydroxyalkylrest mit 3 bis 10 Kohlenstoffatomen und 3 bis 10 Hydroxylgruppen steht:



Vorzugsweise leiten sich die Polyhydroxyfettsäureamide von reduzierenden Zuckern mit 5 oder 6 Kohlenstoffatomen, insbesondere von der Glucose ab. Zur Gruppe der Polyhydroxyfettsäureamide gehören auch Verbindungen der Formel (IV),



in der R³ für einen linearen oder verzweigten Alkyl- oder Alkenylrest mit 7 bis 12 Kohlenstoffatomen, R⁴ für einen linearen, verzweigten oder cyclischen Alkylrest oder einen Arylrest mit 2 bis 8 Kohlenstoffatomen und R⁵ für einen linearen, verzweigten oder cyclischen Alkylrest oder einen Arylrest oder einen Oxy-Alkylrest mit 1 bis 8 Kohlenstoffatomen steht, wobei C₁-C₄-Alkyl- oder Phenylreste bevorzugt sind, und [Z] für einen linearen Polyhydroxyalkylrest, dessen Alkylkette mit mindestens zwei Hydroxylgruppen substituiert ist, oder alkoxylierte, vorzugsweise ethoxylierte oder propoxylierte Derivate dieses Restes steht. [Z] wird auch hier vorzugsweise durch reduktive Aminierung eines Zuckers wie Glucose, Fructose, Maltose, Lactose, Galactose, Mannose oder Xylose erhalten. Die N-Alkoxy- oder N-Aryloxy-substituierten Verbindungen können dann beispielsweise durch Umsetzung mit Fettsäuremethylestern in Gegenwart eines Alkoxids als Katalysator in die gewünschten Polyhydroxyfettsäureamide überführt werden. Eine weitere Klasse bevorzugt eingesetzter nichtionischer Tenside, die entweder als alleiniges nichtionisches Tensid oder in Kombination mit anderen nichtionischen Tensiden, insbesondere zusammen mit alkoxylierten Fettalkoholen und/oder Alkylglykosiden, eingesetzt werden, sind alkoxylierte, vorzugsweise ethoxylierte oder ethoxylierte und propoxylierte Fettsäurealkylester, vorzugsweise mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen in der Alkylkette, insbesondere Fettsäuremethylester. Auch nichtionische Tenside vom Typ der Aminoxide, beispielsweise N-Kokosalkyl-N,N-dimethylaminoxid und N-Talgalkyl-N,N-dihydroxyethylaminoxid, und der Fettsäurealkanolamide können geeignet sein. Die Menge dieser nichtionischen Tenside beträgt vorzugsweise nicht mehr als die der ethoxylierten Fettalkohole, insbesondere nicht mehr als die Hälfte davon. Als weitere Tenside

kommen sogenannte Gemini-Tenside in Betracht. Hierunter werden im Allgemeinen solche Verbindungen verstanden, die zwei hydrophile Gruppen pro Molekül besitzen. Diese Gruppen sind in der Regel durch einen sogenannten "Spacer" voneinander getrennt. Dieser Spacer ist in der Regel eine Kohlenstoffkette, die lang genug sein sollte, dass die hydrophilen Gruppen einen ausreichenden Abstand haben, damit sie unabhängig voneinander agieren können. Derartige Tenside zeichnen sich im Allgemeinen durch eine ungewöhnlich geringe kritische Micellkonzentration und die Fähigkeit, die Oberflächenspannung des Wassers stark zu reduzieren, aus. In Ausnahmefällen werden unter dem Ausdruck Gemini-Tenside nicht nur derartig "dimere", sondern auch entsprechend "trimere" Tenside verstanden. Geeignete Gemini-Tenside sind beispielsweise sulfatierte Hydroxymischether oder Dimeralkohol-bis- und Trimeralkohol-tris-sulfate und -ethersulfate. Endgruppenverschlossene dimere und trimere Mischether zeichnen sich insbesondere durch ihre Bi- und Multifunktionalität aus. So besitzen die genannten endgruppenverschlossenen Tenside gute Netzeigenschaften und sind dabei schaumarm, so dass sie sich insbesondere für den Einsatz in maschinellen Wasch- oder Reinigungsverfahren eignen. Eingesetzt werden können aber auch Gemini-Polyhydroxyfettsäureamide oder Poly-Polyhydroxyfettsäureamide. Geeignet sind auch die Schwefelsäuremonoester der mit 1 bis 6 Mol Ethylenoxid ethoxylierten geradkettigen oder verzweigten C₇-C₂₁-Alkohole, wie 2-Methylverzweigte C₉-C₁₁-Alkohole mit im Durchschnitt 3,5 Mol Ethylenoxid (EO) oder C₁₂-C₁₈-Fettalkohole mit 1 bis 4 EO. Zu den bevorzugten Anionentensiden gehören auch die Salze der Alkylsulfobornsteinsäure, die auch als Sulfosuccinate oder als Sulfobornsteinsäureester bezeichnet werden, und die Monoester und/oder Diester der Sulfobornsteinsäure mit Alkoholen, vorzugsweise Fettalkoholen und insbesondere ethoxylierten Fettalkoholen darstellen. Bevorzugte Sulfosuccinate enthalten C₈- bis C₁₈-Fettalkoholreste oder Mischungen aus diesen. Insbesondere bevorzugte Sulfosuccinate enthalten einen Fettalkoholrest, der sich von ethoxylierten Fettalkoholen ableitet, die für sich betrachtet nichtionische Tenside darstellen. Dabei sind wiederum Sulfosuccinate, deren Fettalkohol-Reste sich von ethoxylierten Fettalkoholen mit eingengter Homologenverteilung ableiten, besonders bevorzugt. Ebenso ist es auch möglich, Alk(en)ylbornsteinsäure mit vorzugsweise 8 bis 18 Kohlenstoffatomen in der Alk(en)ylkette oder deren Salze einzusetzen. Als weitere anionische Tenside kommen Fettsäure-Derivate von Aminosäuren, beispielsweise von N-Methyltaurin (Tauride) und/oder von N-Methylglycin (Sarkoside) in Betracht. Insbesondere bevorzugt sind dabei die Sarkoside beziehungsweise die Sarkosinate und hier vor allem Sarkosinate von höheren und gegebenenfalls einfach oder mehrfach ungesättigten Fettsäuren wie Oleylsarkosinat. Als weitere anionische Tenside kommen insbesondere Seifen in Betracht. Geeignet sind insbesondere gesättigte Fettsäureseifen, wie die Salze der Laurinsäure, Myristinsäure, Palmitinsäure, Stearinsäure, hydrierten Erucasäure und Behensäure sowie insbesondere aus natürlichen Fettsäuren, zum Beispiel Kokos-, Palmkern- oder Talgfettsäuren, abgeleitete Seifengemische. Zusammen mit diesen Seifen oder als Ersatzmittel für Seifen können auch die bekannten Alkenylbornsteinsäuresalze eingesetzt werden.

Die anionischen Tenside, einschließlich der Seifen, können in Form ihrer Natrium-, Kalium- oder Ammoniumsalze sowie als lösliche Salze organischer Basen, wie Mono-, Di- oder Triethanolamin, vorliegen. Vorzugsweise liegen die anionischen Tenside in Form ihrer Natrium- oder Kaliumsalze, insbesondere in Form der Natriumsalze vor.

Tenside sind in erfindungsgemäßen Mitteln in Mengenanteilen von vorzugsweise 5 Gew.-% bis 50 Gew.-%, insbesondere von 8 Gew.-% bis 30 Gew.-%, enthalten.

Ein erfindungsgemäßes Mittel enthält vorzugsweise mindestens einen wasserlöslichen und/oder wasserunlöslichen, organischen und/oder anorganischen Builder. Zu den wasserlöslichen organischen Buildersubstanzen gehören Polycarbonsäuren, insbesondere Citronensäure und Zuckersäuren, monomere und polymere Aminopolycarbonsäuren, insbesondere Methylglycindiessigsäure, Nitrilotriessigsäure und Ethylendiamintetraessigsäure sowie Polyasparaginsäure, Polyphosphonsäuren, insbesondere Aminotris(methylenphosphonsäure), Ethylendiamintetrakis(methylenphosphonsäure) und 1-Hydroxyethan-1,1-diphosphonsäure, polymere Hydroxyverbindungen wie Dextrin sowie polymere (Poly-)carbonsäuren, insbesondere die durch Oxidation von Polysacchariden beziehungsweise Dextrinen zugänglichen Polycarboxylate, polymere Acrylsäuren, Methacrylsäuren, Maleinsäuren und Mischpolymere aus diesen, die auch geringe Anteile polymerisierbarer Substanzen ohne Carbonsäurefunktionalität einpolymerisiert enthalten können. Die relative Molekülmasse der Homopolymeren ungesättigter Carbonsäuren liegt im allgemeinen zwischen 3 000 und 200 000, die der Copolymeren zwischen 2 000 und 200 000, vorzugsweise 30 000 bis 120 000, jeweils bezogen auf freie Säure. Ein besonders bevorzugtes Acrylsäure-Maleinsäure-Copolymer weist eine relative Molekülmasse von 30 000 bis 100 000 auf. Handelsübliche Produkte sind zum Beispiel Sokalan® CP 5, CP 10 und PA 30 der Firma BASF. Geeignete, wenn auch weniger bevorzugte Verbindungen dieser Klasse sind Copolymere der Acrylsäure oder Methacrylsäure mit Vinylethern, wie Vinylmethylethern, Vinylester, Ethylen, Propylen und Styrol, in denen der Anteil der Säure mindestens 50 Gew.-% beträgt. Als wasserlösliche organische Buildersubstanzen können auch Terpolymere eingesetzt werden, die als Monomere zwei ungesättigte Säuren und/oder deren Salze sowie als drittes Monomer Vinylalkohol und/oder einem veresterten Vinylalkohol oder ein Kohlenhydrat enthalten. Das erste saure Monomer beziehungsweise dessen Salz leitet sich von einer monoethylenisch ungesättigten C₃-C₈-Carbonsäure und vorzugsweise von einer C₃-C₄-Monocarbonsäure, insbesondere von (Meth)-acrylsäure ab. Das zweite saure Monomer beziehungsweise dessen Salz kann ein Derivat einer C₄-C₈-Dicarbonsäure, wobei Maleinsäure besonders bevorzugt ist, und/oder ein Derivat einer Allylsulfonsäure, die in 2-Stellung mit einem Alkyl- oder Arylrest substituiert ist, sein. Derartige Polymere weisen im Allgemeinen eine relative Molekülmasse zwischen 1 000 und 200 000 auf. Weitere bevorzugte Copolymere sind solche, die als Monomere vorzugsweise Acrolein und Acrylsäure/Acrylsäuresalze beziehungsweise Vinylacetat aufweisen. Die organischen Buildersubstanzen können, insbesonde-

re zur Herstellung flüssiger Mittel, in Form wäßriger Lösungen, vorzugsweise in Form 30- bis 50-gewichtsprozentiger wäßriger Lösungen eingesetzt werden. Alle genannten Säuren werden in der Regel in Form ihrer wasserlöslichen Salze, insbesondere ihre Alkalisalze, eingesetzt.

Derartige organische Buildersubstanzen können gewünschtenfalls in Mengen bis zu 40 Gew.-%, insbesondere bis zu 25 Gew.-% und vorzugsweise von 1 Gew.-% bis 8 Gew.-% enthalten sein. Mengen nahe der genannten Obergrenze werden vorzugsweise in pastenförmigen oder flüssigen, insbesondere wasserhaltigen, erfindungsgemäßen Mitteln eingesetzt.

Als wasserlösliche anorganische Buildermaterialien kommen insbesondere Alkalisilikate, Alkalicarbonate und Alkaliphosphate, die in Form ihrer alkalischen, neutralen oder sauren Natrium- oder Kaliumsalze vorliegen können, in Betracht. Beispiele hierfür sind Trinatriumphosphat, Tetranatriumdiphosphat, Dinatriumdihydrogendiphosphat, Pentanatriumtriphosphat, sogenanntes Natriumhexametaphosphat, oligomeres Trinatriumphosphat mit Oligomerisierungsgraden von 5 bis 1000, insbesondere 5 bis 50, sowie die entsprechenden Kaliumsalze beziehungsweise Gemische aus Natrium- und Kaliumsalzen. Als wasserunlösliche, wasserdispergierbare anorganische Buildermaterialien werden insbesondere kristalline oder amorphe Alkalialumosilikate, in Mengen von bis zu 50 Gew.-%, vorzugsweise nicht über 40 Gew.-% und in flüssigen Mitteln insbesondere von 1 Gew.-% bis 5 Gew.-%, eingesetzt. Unter diesen sind die kristallinen Natriumalumosilikate in Waschmittelqualität, insbesondere Zeolith A, P und gegebenenfalls X, allein oder in Mischungen, beispielsweise in Form eines Co-Kristallisats aus den Zeolithen A und X (Vegobond® AX, ein Handelsprodukt der Condea Augusta S.p.A.), bevorzugt. Mengen nahe der genannten Obergrenze werden vorzugsweise in festen, teilchenförmigen Mitteln eingesetzt. Geeignete Alumosilikate weisen insbesondere keine Teilchen mit einer Korngröße über 30 µm auf und bestehen vorzugsweise zu wenigstens 80 Gew.-% aus Teilchen mit einer Größe unter 10 µm. Ihr Calciumbindevermögen, das nach den Angaben der deutschen Patentschrift DE 24 12 837 bestimmt werden kann, liegt in der Regel im Bereich von 100 bis 200 mg CaO pro Gramm.

Geeignete Substitute beziehungsweise Teilsubstitute für das genannte Alumosilikat sind kristalline Alkalisilikate, die allein oder im Gemisch mit amorphen Silikaten vorliegen können. Die in den erfindungsgemäßen Mitteln als Gerüststoffe brauchbaren Alkalisilikate weisen vorzugsweise ein molares Verhältnis von Alkalioxid zu SiO₂ unter 0,95, insbesondere von 1:1,1 bis 1:12 auf und können amorph oder kristallin vorliegen. Bevorzugte Alkalisilikate sind die Natriumsilikate, insbesondere die amorphen Natriumsilikate, mit einem molaren Verhältnis Na₂O:SiO₂ von 1:2 bis 1:2,8. Als kristalline Silikate, die allein oder im Gemisch mit amorphen Silikaten vorliegen können, werden vorzugsweise kristalline Schichtsilikate der allgemeinen Formel Na₂Si_xO_{2x+1} · y H₂O eingesetzt, in der x, das sogenannte Modul, eine Zahl von 1,9 bis 22, insbesondere 1,9 bis 4 und y eine Zahl von 0 bis 33 ist und bevorzugte Werte für x 2, 3 oder 4 sind. Bevorzugte kristalline Schichtsi-

likate sind solche, bei denen x in der genannten allgemeinen Formel die Werte 2 oder 3 annimmt. Insbesondere sind sowohl β - als auch δ -Natriumdisilikate ($\text{Na}_2\text{Si}_2\text{O}_5 \cdot y \text{H}_2\text{O}$) bevorzugt. Auch aus amorphen Alkalisilikaten hergestellte, praktisch wasserfreie kristalline Alkalisilikate der obengenannten allgemeinen Formel, in der x eine Zahl von 1,9 bis 2,1 bedeutet, können in erfindungsgemäßen Mitteln eingesetzt werden. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform erfindungsgemäßer Mittel wird ein kristallines Natriumschichtsilikat mit einem Modul von 2 bis 3 eingesetzt, wie es aus Sand und Soda hergestellt werden kann. Kristalline Natriumsilikate mit einem Modul im Bereich von 1,9 bis 3,5 werden in einer weiteren bevorzugten Ausführungsform erfindungsgemäßer Mittel eingesetzt. Kristalline schichtförmige Silikate der oben angegebenen Formel (I) werden von der Fa. Clariant GmbH unter dem Handelsnamen Na-SKS vertrieben, z.B. Na-SKS-1 ($\text{Na}_2\text{Si}_{22}\text{O}_{45} \cdot x\text{H}_2\text{O}$, Kenyait), Na-SKS-2 ($\text{Na}_2\text{Si}_{14}\text{O}_{29} \cdot x\text{H}_2\text{O}$, Magadiit), Na-SKS-3 ($\text{Na}_2\text{Si}_8\text{O}_{17} \cdot x\text{H}_2\text{O}$) oder Na-SKS-4 ($\text{Na}_2\text{Si}_4\text{O}_9 \cdot x\text{H}_2\text{O}$, Makatit). Von diesen eignen sich vor allem Na-SKS-5 (α - $\text{Na}_2\text{Si}_2\text{O}_5$), Na-SKS-7 (β - $\text{Na}_2\text{Si}_2\text{O}_5$, Natrosilit), Na-SKS-9 ($\text{NaHSi}_2\text{O}_5 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), Na-SKS-10 ($\text{NaHSi}_2\text{O}_5 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, Kanemit), Na-SKS-11 (t - $\text{Na}_2\text{Si}_2\text{O}_5$) und Na-SKS-13 (NaHSi_2O_5), insbesondere aber Na-SKS-6 (δ - $\text{Na}_2\text{Si}_2\text{O}_5$). In einer bevorzugten Ausgestaltung erfindungsgemäßer Mittel setzt man ein granulares Compound aus kristallinem Schichtsilikat und Citrat, aus kristallinem Schichtsilikat und oben genannter (co-)polymerer Polycarbonsäure, oder aus Alkalisilikat und Alkalicarbonat ein, wie es beispielsweise unter dem Namen Nabion® 15 im Handel erhältlich ist.

Buildersubstanzen sind in den erfindungsgemäßen Mitteln vorzugsweise in Mengen bis zu 75 Gew.-%, insbesondere 5 Gew.-% bis 50 enthalten.

Als für den Einsatz in erfindungsgemäßen Mitteln geeignete Persauerstoffverbindungen kommen insbesondere organische Persäuren beziehungsweise persaure Salze organischer Säuren, wie Phthalimidopercaprionsäure, Perbenzoesäure oder Salze der Diperdodecandisäure, Wasserstoffperoxid und unter den Waschbedingungen Wasserstoffperoxid abgebende anorganische Salze, zu denen Perborat, Percarbonat, Persilikat und/oder Persulfat wie Caroat gehören, in Betracht. Sofern feste Persauerstoffverbindungen eingesetzt werden sollen, können diese in Form von Pulvern oder Granulaten verwendet werden, die auch in im Prinzip bekannter Weise umhüllt sein können. Falls ein erfindungsgemäßes Mittel Persauerstoffverbindungen enthält, sind diese in Mengen von vorzugsweise bis zu 50 Gew.-%, insbesondere von 5 Gew.-% bis 30 Gew.-%, vorhanden. Der Zusatz geringer Mengen bekannter Bleichmittelstabilisatoren wie beispielsweise von Phosphonaten, Boraten beziehungsweise Metaboraten und Metasilikaten sowie Magnesiumsalzen wie Magnesiumsulfat kann zweckdienlich sein.

Als Bleichaktivatoren können Verbindungen, die unter Perhydrolysebedingungen aliphatische Peroxocarbonsäuren mit vorzugsweise 1 bis 10 C-Atomen, insbesondere 2 bis 4 C-Atomen, und/oder gegebenenfalls substituierte Perbenzoesäure ergeben, eingesetzt werden. Geeignet sind

Substanzen, die O- und/oder N-Acylgruppen der genannten C-Atomzahl und/oder gegebenenfalls substituierte Benzoylgruppen tragen. Bevorzugt sind mehrfach acylierte Alkylendiamine, insbesondere Tetraacetylethylendiamin (TAED), acylierte Triazinderivate, insbesondere 1,5-Diacetyl-2,4-dioxohexahydro-1,3,5-triazin (DADHT), acylierte Glykolorile, insbesondere Tetraacetylglykoloril (TAGU), N-Acylimide, insbesondere N-Nonanoylsuccinimid (NOSI), acylierte Phenolsulfonate, insbesondere n-Nonanoyl- oder Isononanoxyloxybenzolsulfonat (n- bzw. iso-NOBS), Carbonsäureanhydride, insbesondere Phthalsäureanhydrid, acylierte mehrwertige Alkohole, insbesondere Triacetin, Ethylenglykoldiacetat, 2,5-Diacetoxy-2,5-dihydrofuran und Enolester sowie acetyliertes Sorbitol und Mannitol beziehungsweise deren beschriebene Mischungen (SORMAN), acylierte Zuckerderivate, insbesondere Pentaacetylglukose (PAG), Pentaacetylfruktose, Tetraacetylxylose und Octaacetylactose sowie acetyliertes, gegebenenfalls N-alkyliertes Glucamin und Gluconolacton, und/oder N-acylierte Lactame, beispielsweise N-Benzoylcaprolactam. Die hydrophil substituierten Acylacetale und die Acyllactame werden ebenfalls bevorzugt eingesetzt. Auch Kombinationen konventioneller Bleichaktivatoren können eingesetzt werden. Derartige Bleichaktivatoren können, insbesondere bei Anwesenheit obengenannter Wasserstoffperoxid-liefernder Bleichmittel, im üblichen Mengenbereich, vorzugsweise in Mengen von 0,5 Gew.-% bis 10 Gew.-%, insbesondere 1 Gew.-% bis 8 Gew.-%, bezogen auf gesamtes Mittel, enthalten sein, fehlen bei Einsatz von Percarbonsäure als alleinigem Bleichmittel jedoch vorzugsweise ganz.

Zusätzlich zu den konventionellen Bleichaktivatoren oder an deren Stelle können auch Sulfonimine und/oder bleichverstärkende Übergangsmetallsalze beziehungsweise Übergangsmetallkomplexe als sogenannte Bleichkatalysatoren enthalten sein.

Zu den in den erfindungsgemäßen Mitteln, insbesondere wenn sie in flüssiger oder pastöser Form vorliegen, neben Wasser verwendbaren organischen Lösungsmitteln gehören Alkohole mit 1 bis 4 C-Atomen, insbesondere Methanol, Ethanol, Isopropanol und tert.-Butanol, Diöle mit 2 bis 4 C-Atomen, insbesondere Ethylenglykol und Propylenglykol, sowie deren Gemische und die aus den genannten Verbindungsklassen ableitbaren Ether. Derartige wassermischbare Lösungsmittel sind in den erfindungsgemäßen Mitteln vorzugsweise in Mengen nicht über 30 Gew.-%, insbesondere von 6 Gew.-% bis 20 Gew.-%, vorhanden.

Zur Einstellung eines gewünschten, sich durch die Mischung der übrigen Komponenten nicht von selbst ergebenden pH-Werts können die erfindungsgemäßen Mittel system- und umweltverträgliche Säuren, insbesondere Citronensäure, Essigsäure, Weinsäure, Äpfelsäure, Milchsäure, Glykolsäure, Bernsteinsäure, Glutarsäure und/oder Adipinsäure, aber auch Mineralsäuren, insbesondere Schwefelsäure, oder Basen, insbesondere Ammonium- oder Alkalihydroxide, enthalten.

Derartige pH-Regulatoren sind in den erfindungsgemäßen Mitteln in Mengen von vorzugsweise nicht über 20 Gew.-%, insbesondere von 1,2 Gew.-% bis 17 Gew.-%, enthalten.

Vergrauungsinhibitoren haben die Aufgabe, den von der Textilfaser abgelösten Schmutz in der Flotte suspendiert zu halten. Hierzu sind wasserlösliche Kolloide meist organischer Natur geeignet, beispielsweise Stärke, Leim, Gelatine, Salze von Ethercarbonsäuren oder Ethersulfonsäuren der Stärke oder der Cellulose oder Salze von sauren Schwefelsäureestern der Cellulose oder der Stärke. Auch wasserlösliche, saure Gruppen enthaltende Polyamide sind für diesen Zweck geeignet. Weiterhin lassen sich andere als die obengenannten Stärkederivate verwenden, zum Beispiel Aldehydstärken. Bevorzugt werden Celluloseether, wie Carboxymethylcellulose (Na-Salz), Methylcellulose, Hydroxyalkylcellulose und Mischether, wie Methylhydroxyethylcellulose, Methylhydroxypropylcellulose, Methylcarboxymethylcellulose und deren Gemische, beispielsweise in Mengen von 0,1 bis 5 Gew.-%, bezogen auf die Mittel, eingesetzt.

Erfindungsgemäße Textilwaschmittel können als optische Aufheller beispielsweise Derivate der Diaminostilbendisulfonsäure beziehungsweise deren Alkalimetallsalze enthalten, obgleich sie für den Einsatz als Colorwaschmittel vorzugsweise frei von optischen Aufhellern sind. Geeignet sind zum Beispiel Salze der 4,4'-Bis(2-anilino-4-morpholino-1,3,5-triazinyl-6-amino)stilben-2,2'-disulfonsäure oder gleichartig aufgebaute Verbindungen, die anstelle der Morpholino-Gruppe eine Diethanolaminogruppe, eine Methylaminogruppe, eine Anilinogruppe oder eine 2-Methoxyethylaminogruppe tragen. Weiterhin können Aufheller vom Typ der substituierten Diphenylstyryle anwesend sein, zum Beispiel die Alkalisalze des 4,4'-Bis(2-sulfostyryl)-diphenyls, 4,4'-Bis(4-chlor-3-sulfostyryl)-diphenyls, oder 4-(4-Chlorstyryl)-4'-(2-sulfostyryl)-diphenyls. Auch Gemische der vorgenannten optischen Aufheller können verwendet werden.

Insbesondere beim Einsatz in maschinellen Verfahren kann es von Vorteil sein, den Mitteln übliche Schauminhibitoren zuzusetzen. Als Schauminhibitoren eignen sich beispielsweise Seifen natürlicher oder synthetischer Herkunft, die einen hohen Anteil an C₁₈-C₂₄-Fettsäuren aufweisen. Geeignete nichttensidartige Schauminhibitoren sind beispielsweise Organopolysiloxane und deren Gemische mit mikrofeiner, gegebenenfalls silanierter Kieselsäure sowie Paraffine, Wachse, Mikrokristallinwachse und deren Gemische mit silanierter Kieselsäure oder Bisfettsäurealkylen-diamiden. Mit Vorteilen werden auch Gemische aus verschiedenen Schauminhibitoren verwendet, zum Beispiel solche aus Silikonen, Paraffinen oder Wachsen. Vorzugsweise sind die Schauminhibitoren, insbesondere Silicon- und/oder Paraffin-haltige Schauminhibitoren, an eine granulare, in Wasser lösliche beziehungsweise dispergierbare Trägersubstanz gebunden. Insbesondere sind dabei Mischungen aus Paraffinen und Bistearylethylendiamid bevorzugt.

Die zu wählenden Inhaltsstoffe wie auch die Bedingungen, unter denen das Mittel eingesetzt wird, wie beispielsweise Temperatur, pH-Wert, Ionenstärke, Redox-Verhältnisse oder mechanische Einflüsse, sollten für das jeweilige Reinigungsproblem optimiert sein. So liegen übliche Temperaturen für Wasch- und Reinigungsmittel in Bereichen von 10°C bei manuellen Mitteln über 40°C und 60°C bis hin zu 95° bei maschinellen Mitteln oder bei technischen Anwendungen. Da bei modernen Wasch- und Spülmaschinen die Temperatur meist stufenlos einstellbar ist, sind auch alle Zwischenstufen der Temperatur eingeschlossen. Vorzugsweise werden die Inhaltsstoffe der betreffenden Mittel aufeinander abgestimmt. Bevorzugt sind Synergien hinsichtlich der Reinigungsleistung. Besonders bevorzugt diesbezüglich sind Synergien, die in einem Temperaturbereich zwischen 20°C und 60°C vorhanden sind, da auch die in den erfindungsgemäßen Mitteln enthaltene Protease in diesem Temperaturbereich katalytisch aktiv ist.

In einer weiteren Ausführungsform umfasst ein erfindungsgemäßes Mittel, insbesondere ein Wasch- oder Reinigungsmittel, ferner

- 5 Gew.-% bis 70 Gew.-%, insbesondere 5 Gew.-% bis 30 Gew.-% Tenside und/oder
- 10 Gew.-% bis 65 Gew.-%, insbesondere 12 Gew.-% bis 60 Gew.-% wasserlösliches oder wasserdispergierbares anorganisches Buildermaterial und/oder
- 0,5 Gew.-% bis 10 Gew.-%, insbesondere 1 Gew.-% bis 8 Gew.-%, wasserlösliche organische Buildersubstanzen und/oder
- 0,01 bis 15 Gew.-% feste anorganische und/oder organische Säuren beziehungsweise saure Salze und/oder
- 0,01 bis 5 Gew.-% Komplexbildner für Schwermetalle und/oder
- 0,01 bis 5 Gew.-% Vergrauungsinhibitor und/oder
- 0,01 bis 5 Gew.-% Farbübertragungsinhibitor und/oder
- 0,01 bis 5 Gew.-% Schauminhibitor.

Optional kann das Mittel ferner optische Aufheller umfassen, bevorzugt von 0,01 bis 5 Gew.-%.

Die Herstellung erfindungsgemäßer fester Mittel bietet keine Schwierigkeiten und kann auf bekannte Weise, zum Beispiel durch Sprühtrocknen oder Granulation, erfolgen, wobei Enzyme und eventuelle weitere thermisch empfindliche Inhaltsstoffe wie zum Beispiel Bleichmittel gegebenenfalls später separat zugesetzt werden. Zur Herstellung erfindungsgemäßer Mittel mit erhöhtem Schüttgewicht, insbesondere im Bereich von 650 g/l bis 950 g/l, ist ein Extrusionschritt aufweisendes Verfahren bevorzugt.

Zur Herstellung von erfindungsgemäßen Mitteln in Tablettenform, die einphasig oder mehrphasig, einfarbig oder mehrfarbig und insbesondere aus einer Schicht oder aus mehreren, insbesondere aus zwei Schichten bestehen können, geht man vorzugsweise derart vor, dass man alle Bestandteile – gegebenenfalls je einer Schicht – in einem Mischer miteinander vermischt und das

Gemisch mittels herkömmlicher Tablettenpressen, beispielsweise Exzenterpressen oder Rundläuferpressen, mit Preßkräften im Bereich von etwa 50 bis 100 kN, vorzugsweise bei 60 bis 70 kN verpreßt. Insbesondere bei mehrschichtigen Tabletten kann es von Vorteil sein, wenn mindestens eine Schicht vorverpreßt wird. Dies wird vorzugsweise bei Preßkräften zwischen 5 und 20 kN, insbesondere bei 10 bis 15 kN durchgeführt. Man erhält so problemlos bruchfeste und dennoch unter Anwendungsbedingungen ausreichend schnell lösliche Tabletten mit Bruch- und Biegefestigkeiten von normalerweise 100 bis 200 N, bevorzugt jedoch über 150 N. Vorzugsweise weist eine derart hergestellte Tablette ein Gewicht von 10 g bis 50 g, insbesondere von 15 g bis 40 g auf. Die Raumform der Tabletten ist beliebig und kann rund, oval oder eckig sein, wobei auch Zwischenformen möglich sind. Ecken und Kanten sind vorteilhafterweise abgerundet. Runde Tabletten weisen vorzugsweise einen Durchmesser von 30 mm bis 40 mm auf. Insbesondere die Größe von eckig oder quaderförmig gestalteten Tabletten, welche überwiegend über die Dosiervorrichtung beispielsweise der Geschirrspülmaschine eingebracht werden, ist abhängig von der Geometrie und dem Volumen dieser Dosiervorrichtung. Beispielhaft bevorzugte Ausführungsformen weisen eine Grundfläche von (20 bis 30 mm) x (34 bis 40 mm), insbesondere von 26x36 mm oder von 24x38 mm auf.

Flüssige beziehungsweise pastöse erfindungsgemäße Mittel in Form von übliche Lösungsmittel enthaltenden Lösungen werden in der Regel durch einfaches Mischen der Inhaltsstoffe, die in Substanz oder als Lösung in einen automatischen Mischer gegeben werden können, hergestellt.

Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung umfassen somit alle derartigen festen, pulverförmigen, flüssigen, gelförmigen oder pastösen Darreichungsformen der Mittel, die gegebenenfalls auch aus mehreren Phasen bestehen können sowie in komprimierter oder nicht komprimierter Form vorliegen können. Eine weitere Ausführungsform der Erfindung stellen daher Mittel dar, die dadurch gekennzeichnet sind, dass sie als Einkomponentensystem vorliegen. Solche Mittel bestehen bevorzugt aus einer Phase. Selbstverständlich können erfindungsgemäße Mittel aber auch aus mehreren Phasen bestehen. In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung ist das Wasch- oder Reinigungsmittel daher dadurch gekennzeichnet sind, dass es in mehrere Komponenten aufgeteilt ist.

Zu den erfindungsgemäßen festen Darreichungsformen zählen ferner Extrudate, Granulate, Tabletten oder Pouches, die sowohl in Großbinden als auch portionsweise abgepackt vorliegen können. Alternativ liegt das Mittel als rieselfähiges Pulver vor, 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.

Ferner können erfindungsgemäße Mittel auch flüssig, gelförmig oder pastös sein. Eine weitere Ausführungsform der Erfindung ist daher dadurch gekennzeichnet, dass das Wasch- oder

Reinigungsmittel in flüssiger, gelförmiger oder pastöser Form vorliegt, insbesondere in Form eines nicht-wässrigen Flüssigwaschmittels oder einer nicht-wässrigen Paste oder in Form eines wässrigen Flüssigwaschmittels oder einer wasserhaltigen Paste.

Bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Mittel dadurch gekennzeichnet, dass es die Protease in einer Menge von 2 µg bis 20 mg, vorzugsweise von 5 µg bis 17,5 mg, besonders bevorzugt von 20 µg bis 15 mg und ganz besonders bevorzugt von 50 µg bis 10 mg pro g des Mittels enthält.

Das erfindungsgemäße Wasch- oder Reinigungsmittel kann in einem Behältnis, vorzugsweise einem luftdurchlässigen Behältnis, verpackt sein, aus dem es kurz vor Gebrauch oder während des Waschvorgangs freigesetzt wird. Insbesondere kann ferner 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.

Erfindungsgemäße Mittel können ausschließlich eine Protease enthalten. Alternativ können sie auch weitere Proteasen oder andere Enzyme in einer für die Wirksamkeit des Mittels zweckmäßigen Konzentration enthalten. Einen weiteren Gegenstand der Erfindung stellen somit Mittel dar, die ferner eines oder mehrere weitere Enzyme umfassen, wobei prinzipiell alle im Stand der Technik für diese Zwecke etablierten Enzyme einsetzbar sind. Als weitere Enzyme bevorzugt einsetzbar sind alle Enzyme, die in dem erfindungsgemäßen Mittel eine katalytische Aktivität entfalten können, insbesondere Proteasen, Amylasen, Cellulasen, Hemicellulasen, Mannanasen, Tannasen, Xylanasen, Xanthanasen, β-Glucosidasen, Carrageenasen, Oxidasen, Oxidoreduktasen oder Lipasen, sowie vorzugsweise deren Gemische. Diese Enzyme sind im Prinzip natürlichen Ursprungs; ausgehend von den natürlichen Molekülen stehen für den Einsatz in Wasch- und Reinigungsmitteln verbesserte Varianten zur Verfügung, die entsprechend bevorzugt eingesetzt werden. Erfindungsgemäße Mittel enthalten Enzyme vorzugsweise in Gesamtmengen von 1×10^{-8} bis 5 Gewichts-Prozent bezogen auf aktives Protein. Bevorzugt sind die Enzyme von 0,001 bis 5 Gew.-%, weiter bevorzugt von 0,01 bis 5 Gew.-%, noch weiter bevorzugt von 0,05 bis 4 Gew.-% und besonders bevorzugt von 0,075 bis 3,5 Gew.-% in erfindungsgemäßen Mitteln enthalten, wobei jedes enthaltene Enzym in den genannten Mengenverhältnissen vorliegen 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. Besonders bevorzugt unterstützen die weiteren Enzyme die Wirkung des Mittels, beispielsweise

die Reinigungsleistung eines Wasch- oder Reinigungsmittels, hinsichtlich bestimmter Anschmutzungen oder Flecken. Besonders bevorzugt zeigen die Enzyme synergistische Effekte hinsichtlich ihrer Wirkung gegenüber bestimmter Anschmutzungen oder Flecken, d.h. die in der Mittelzusammensetzung enthaltenen Enzyme unterstützen sich in ihrer Reinigungsleistung gegenseitig. Synergistische Effekte können nicht nur zwischen verschiedenen Enzymen, sondern auch zwischen einem oder mehreren Enzymen und weiteren Inhaltsstoffen des erfindungsgemäßen Mittels auftreten. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist das erfindungsgemäße Mittel somit dadurch gekennzeichnet, dass es mindestens ein weiteres Enzym enthält, welches eine Protease, Amylase, Cellulase, Hemicellulase, Mannanase, Tannase, Xylanase, Xanthanase, β -Glucosidase, Carrageenase, Oxidase, Oxidoreduktase oder eine Lipase ist.

Die in erfindungsgemäßen Mitteln eingesetzten Enzyme stammen entweder ursprünglich aus Mikroorganismen, etwa der Gattungen *Bacillus*, *Streptomyces*, *Humicola*, oder *Pseudomonas*, und/oder werden nach an sich bekannten biotechnologischen Verfahren durch geeignete Mikroorganismen produziert, beispielsweise durch transgene Expressionswirte der Gattungen *Bacillus* oder durch filamentöse Fungi.

Die Proteaseaktivität in derartigen Mitteln kann nach der in Tenside, Band 7 (1970), S. 125-132 beschriebenen Methode ermittelt werden. Sie wird in PE (Protease-Einheiten) angegeben.

Bei dem Vergleich der Leistungen zweier Waschmittelenzyme muss zwischen proteingleichem und aktivitätsgleichem Einsatz unterschieden werden. Insbesondere bei gentechnisch erhaltenen, weitgehend nebenaktivitätsfreien Präparationen ist der proteingleiche Einsatz angebracht. Denn damit ist eine Aussage darüber möglich, ob dieselben Proteinmengen – als Maß für den Ertrag der fermentativen Produktion – zu vergleichbaren Ergebnissen führen. Klaffen die jeweiligen Verhältnisse von Aktivsubstanz zu Gesamtprotein (die Werte der spezifischen Aktivität) auseinander, so ist ein aktivitätsgleicher Vergleich zu empfehlen, weil hierüber die jeweiligen enzymatischen Eigenschaften verglichen werden. Generell gilt, daß eine niedrige spezifische Aktivität durch Zugabe einer größeren Proteinmenge ausgeglichen werden kann. Hierbei handelt es sich letztlich um eine ökonomische Erwägung.

Einen eigenen Erfindungsgegenstand stellt die Verwendung eines oben beschriebenen erfindungsgemäßen Mittels zur Entfernung von protease-sensitiven Anschmutzungen auf Textilien oder harten Oberflächen, d.h. zur Reinigung von Textilien oder von harten Oberflächen, dar.

Denn erfindungsgemäße Mittel können, insbesondere entsprechend den oben beschriebenen Eigenschaften, dazu verwendet werden, um von Textilien oder von harten Oberflächen proteinhaltige Verunreinigungen zu beseitigen. Ausführungsformen stellen beispielsweise die

Handwäsche, die manuelle Entfernung von Flecken von Textilien oder von harten Oberflächen oder die Verwendung im Zusammenhang mit einem maschinellen Verfahren dar.

In einer bevorzugten Ausführungsform dieser Verwendung werden die betreffenden erfindungsgemäßen Mittel, vorzugsweise Wasch- beziehungsweise Reinigungsmittel, nach einer der oben ausgeführten Ausführungsform bereitgestellt.

Einen weiteren Erfindungsgegenstand stellen Verfahren zur Reinigung von Textilien oder von harten Oberflächen dar, bei denen wenigstens in einem der Verfahrensschritte ein erfindungsgemäßes Mittel verwendet wird. Das Verfahren zur Reinigung von Textilien oder harten Oberflächen ist demnach dadurch gekennzeichnet, dass in mindestens einem Verfahrensschritt ein erfindungsgemäßes Mittel angewendet ist.

Hierunter fallen sowohl manuelle als auch maschinelle Verfahren, wobei maschinelle Verfahren aufgrund ihrer präziseren Steuerbarkeit, was beispielsweise die eingesetzten Mengen und Einwirkzeiten angeht, 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 dieses Mittels behandelt wird. Entsprechendes gilt für Verfahren zur Reinigung von allen anderen Materialien als Textilien, welche unter dem Begriff harte Oberflächen zusammengefasst werden. Alle denkbaren Wasch- oder Reinigungsverfahren können in wenigstens einem der Verfahrensschritte um ein erfindungsgemäßes Mittel bereichert werden, und stellen dann Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung dar.

Da bevorzugte erfindungsgemäße Enzyme natürlicherweise bereits eine proteinauflösende Aktivität besitzen und diese auch in Medien entfalten, die sonst keine Reinigungskraft besitzen, wie beispielsweise in bloßem Puffer, kann ein einzelner Teilschritt eines solchen Verfahrens zur maschinellen Reinigung von Textilien darin bestehen, daß gewünschtenfalls neben stabilisierenden Verbindungen, Salzen oder Puffersubstanzen als einzige reinigungsaktive Komponente ein erfindungsgemäßes Enzym aufgebracht wird. Dies stellt eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung dar.

Einen weiteren Gegenstand der Erfindung stellen Verfahren zur Reinigung von Textilien oder harten Oberflächen dar, die dadurch gekennzeichnet sind, dass in mindestens einem

Verfahrensschritt eine erfindungsgemäße Protease proteolytisch aktiv ist, insbesondere derart, dass die Protease in einer Menge von 40 µg bis 4 g, vorzugsweise von 50 µg bis 3 g, besonders bevorzugt von 100 µg bis 2 g und ganz besonders bevorzugt von 200 µg bis 1 g pro Anwendung eingesetzt ist.

Alternative Ausführungsformen dieses Erfindungsgegenstandes stellen auch Verfahren zur Behandlung von Textilrohstoffen oder zur Textilpflege dar, bei denen in wenigstens einem der Verfahrensschritte 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.

Es kann sich dabei beispielsweise um Verfahren handeln, in denen Materialien zur Verarbeitung in Textilien vorbereitet werden, etwa zur Antifilzausrüstung, oder beispielsweise um Verfahren, welche die Reinigung getragener Textilien um eine pflegende Komponente bereichern. Wegen der oben beschriebenen Wirkung von Proteasen auf natürliche, proteinhaltige Rohstoffe handelt es sich in bevorzugten Ausführungsformen um Verfahren zur Behandlung von Textilrohstoffen, Fasern oder Textilien mit natürlichen Bestandteilen, insbesondere mit Wolle oder Seide.

Erfindungsgemäße Enzyme sind entsprechend der vorstehenden Ausführungen vorteilhaft in erfindungsgemäßen Mitteln, insbesondere Wasch- und Reinigungsmitteln, und Verfahren, insbesondere Wasch- und Reinigungsverfahren, einsetzbar. Sie können dazu verwendet werden, um von Textilien oder von harten Oberflächen proteinhaltige Verunreinigungen zu beseitigen. Ausführungsformen stellen beispielsweise die Handwäsche, die manuelle Entfernung von Flecken von Textilien oder von harten Oberflächen oder die Verwendung im Zusammenhang mit einem maschinellen Verfahren dar.

Einen weiteren Gegenstand der Erfindung bildet daher die Verwendung einer erfindungsgemäßen Protease, wie sie vorstehend beschreiben wurde zur Reinigung von Textilien oder von harten Oberflächen. Bevorzugt wird die Protease in einer Menge von 40 µg bis 4 g, vorzugsweise von 50 µg bis 3 g, besonders bevorzugt von 100 µg bis 2 g und ganz besonders bevorzugt von 200 µg bis 1 g pro Anwendung eingesetzt.

In einer bevorzugten Ausführungsform dieser Verwendung werden die betreffenden erfindungsgemäßen Enzyme im Rahmen eines erfindungsgemäßen Mittels, vorzugsweise eines erfindungsgemäßen Wasch- beziehungsweise Reinigungsmittels, bereitgestellt.

Eine weitere Ausführungsform dieses Erfindungsgegenstands stellt die Verwendung einer erfindungsgemäßen Protease zur Aktivierung oder Deaktivierung von Inhaltsstoffen von Wasch- oder Reinigungsmitteln dar.

Denn Protein-Bestandteile von Wasch- oder Reinigungsmitteln können durch das Einwirken einer Protease inaktiviert werden. Diesen ansonsten eher unerwünschten Effekt gezielt einzusetzen, ist ebenfalls ein Aspekt der vorliegenden Erfindung. Ebenso ist es wie oben beschrieben möglich, daß durch Proteolyse eine andere Komponente erst aktiviert wird, etwa, wenn sie ein Hybridprotein aus dem eigentlichen Enzym und dem dazu passenden Inhibitor darstellt. Ein anderes Beispiel für eine solche Regulation ist die, bei der eine aktive Komponente zum Schutz oder zur Kontrolle ihrer Aktivität in einem Material verkapselt vorliegt, das durch Proteolyse angegriffen wird.

Erfindungsgemäße Proteasen können somit zu Inaktivierungs-, Aktivierungs- oder Freisetzungsreaktionen verwendet werden, insbesondere in mehrphasigen Mitteln.

Entsprechend dem oben Gesagten stellen auch folgende Verwendungen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung dar:

- Die Verwendung einer erfindungsgemäßen Protease zur Gewinnung oder Behandlung von Rohmaterialien oder Zwischenprodukten in der Textilherstellung, insbesondere zum Entfernen von Schutzschichten auf Geweben;
- die Verwendung einer erfindungsgemäßen Protease zur Behandlung von Textilrohstoffen oder zur Textilpflege und hierunter bevorzugt
- die entsprechende Verwendung für Textilrohstoffe, Fasern oder Textilien mit natürlichen Bestandteilen und ganz besonders für solche mit Wolle oder Seide.

Die vorliegende Erfindung wird auch in Form von solchen eine erfindungsgemäße Protease enthaltenden Mitteln verwirklicht, bei denen es sich um Kosmetika handelt. Hierunter werden alle Arten von reinigenden und pflegenden Mitteln für menschliche Haut oder Haar verstanden, insbesondere reinigende Mittel.

Denn Proteasen spielen auch im Zellerneuerungsprozeß der menschlichen Haut (Desquamation) eine entscheidende Rolle. Dementsprechend werden Proteasen auch als bioaktive Komponenten in Hautpflegemitteln verwendet, um den Abbau der in trockener Haut vermehrten Desmosomenstrukturen zu unterstützen. Wie vorstehend ausführlich erläutert können erfindungsgemäße Proteasen weiterentwickelt werden, beispielsweise über Aminosäuresubstitutionen und/oder Punktmutationen. Somit eignen sich auch erfindungsgemäße Proteasen, insbesondere solche, die etwa nach Mutagenese oder durch Zugabe entsprechender, mit ihnen wechselwirkender Stoffe in ihrer Aktivität kontrolliert sind, als aktive Komponenten in Haut- oder Haar-Reinigungs- oder Pflegemitteln. Besonders bevorzugt sind solche Präparationen dieser

Enzyme, die wie oben beschrieben, beispielsweise durch Kopplung an makromolekulare Träger stabilisiert und/oder durch Punktmutationen an hochallergenen Positionen derivatisiert sind, so daß sie für den Menschen eine höhere Hautverträglichkeit aufweisen.

Dementsprechend werden auch entsprechende kosmetische Reinigungs- und Pflegeverfahren und die Verwendung derartiger proteolytischer Enzyme zu kosmetischen Zwecken in diesen Erfindungsgegenstand einbezogen, insbesondere in entsprechenden Mitteln, wie beispielsweise Shampoos, Seifen oder Waschlotionen, oder in Pflegemitteln, die beispielsweise in Form von Cremes angeboten werden. Auch die Verwendung in einem schälenden Arzneimittel, beziehungsweise zu dessen Herstellung ist eingeschlossen.

Neben dem Einsatz in Wasch- und Reinigungsmitteln und Kosmetika sind im Stand der Technik zahlreiche Anwendungsmöglichkeiten von Proteasen, insbesondere Subtilasen etabliert. Einen Überblick hierüber bietet beispielsweise das Handbuch „Industrial enzymes and their applications“ von H. Uhlig, Wiley-Verlag, New York, 1998. All diese Techniken können durch erfindungsgemäße Proteasen bereichert werden. Hierzu gehören insbesondere folgende Einsatzgebiete:

- die Verwendung einer erfindungsgemäßen Alkalischen Proteasen zur biochemischen Analyse oder zur Synthese von niedermolekularen Verbindungen oder von Proteinen;
- darunter bevorzugt die Verwendung zur Endgruppenbestimmung im Rahmen einer Peptid-Sequenzanalyse;
- die Verwendung einer erfindungsgemäßen Alkalischen Proteasen zur Präparation, Reinigung oder Synthese von Naturstoffen oder biologischen Wertstoffen, vorzugsweise im Rahmen entsprechender Mittel oder Verfahren;
- die Verwendung einer erfindungsgemäßen Alkalischen Proteasen zur Synthese von Proteinen oder anderen niedermolekularen chemischen Verbindungen;
- die Verwendung einer erfindungsgemäßen Alkalischen Proteasen zur Behandlung von natürlichen Rohstoffen, insbesondere zur Oberflächenbehandlung, ganz besonders in einem Verfahren zur Behandlung von Leder, vorzugsweise im Rahmen entsprechender Mittel oder Verfahren;
- die Verwendung einer erfindungsgemäßen Alkalischen Proteasen zur Behandlung von photographischen Filmen, insbesondere zur Entfernung von gelatinhaltigen oder ähnlichen Schutzschichten; und
- die Verwendung einer erfindungsgemäßen Alkalischen Proteasen zur Herstellung von Lebensmitteln oder von Futtermitteln.

Grundsätzlich wird der Einsatz erfindungsgemäßer Proteasen in allen weiteren Technikgebieten in den Schutzbereich der vorliegenden Anmeldung eingeschlossen, für die es sich als geeignet herausstellt.

Die nachfolgenden Beispiele erläutern die Erfindung weiter, ohne sie jedoch darauf einzuschränken.

Beispiele

Alle molekularbiologischen Arbeitsschritte folgen Standardmethoden, wie sie beispielsweise in dem Handbuch von Fritsch, Sambrook und Maniatis „Molecular cloning: a laboratory manual“, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, 1989, oder vergleichbaren einschlägigen Werken angegeben sind. Enzyme und Baukästen (Kits) wurden nach den Angaben der jeweiligen Hersteller eingesetzt.

Beispiel 1

Isolierung und Identifizierung des proteolytisch aktiven Bakterienstamms DSM ID 01-189
0,1g einer Bodenprobe wurden in 1ml sterilen 0,9%iger NaCl-Lösung suspendiert und auf milchpulverhaltigen Agarplatten (1,5% Agar, 0,5% NaCl, 0,1% K_2HPO_4 , 0,1% Hefeextrakt, 2% Pepton, 1% Milchpulver, pH10) ausplattiert. Anhand eines Klärungshofes wurde ein proteolytisch aktives Bakterium isoliert und anhand der bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) verfügbaren Stamminformationen als *Bacillus* sp. identifiziert und unter der Hinterlegungsnummer DSM ID 01-189 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) hinterlegt.

Beispiel 2

Isolierung und Klonierung der neuen Serinprotease aus dem Boden

Das proteolytisch aktive Bakterium *Bacillus* sp. DSM ID 01-189 wurde in Horikoshi-Medium pH9 (0,1% K_2HPO_4 , 0,5% Hefeextrakt, 1% Pepton, 0,02% $MgSO_4$, 0,3% Na_2CO_3) 72 h bei 37°C und 200 rpm kultiviert. Die chromosomale DNA dieses Bakteriums wurde nach Standardmethoden präpariert, mit dem Restriktionsenzym *Sau* 3A behandelt und die erhaltenen Fragmente in den Vektor pAWA22 kloniert. Dabei handelt es sich um einen von pBC16 abgeleiteten Expressionsvektor für den Einsatz in *Bacillus*-Spezies (Bernhard et al. (1978), J. Bacteriol., Band 133 (2), S. 897 ff.). Dieser Vektor wurde in den Protease-negativen Wirtstamm *Bacillus subtilis* DB 104 (Kawamura und Doi (1984), J. Bacteriol., Band 160 (1), S. 442-444) transformiert.

Die Transformanten wurden zunächst auf DM3-Medium regeneriert und dann auf milchpulverhaltigen Agarplatten (TBY-Skimmilch-Platten; siehe Beispiel 1) überimpft. Proteolytisch aktive Klone wurden anhand ihrer Lysehöfe identifiziert. Aus den erhaltenen proteolytisch aktiven Klonen wurde einer ausgewählt, dessen Plasmid (Vektor) isoliert und das in diesem Vektor enthaltene Genfragment (Insert) nach Standardmethoden sequenziert.

Das ca. 2kb große Insert enthält einen offenen Leserahmen von etwa 1kb, dessen Nukleinsäuresequenz (DNA-Sequenz) für eine Protease des Typs hochalkalischer Subtilisine kodiert (SEQ ID NO. 1). Die Sequenz wurde mittels PCR amplifiziert, in der E.coli Vektor pUC19 kloniert und gemäß dem Budapester Vertrag bei der DSMZ-Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Inhoffenstraße 7B, D-38124 Braunschweig) unter der Nummer DSM 19494 hinterlegt.

Beispiel 3

Bestimmung der Ähnlichkeiten der Aminosäuresequenz der reifen Protease (SEQ ID NO. 3)
 Es wurde ein Homologievergleich mit den bisher bekannten Proteasen in der "Non-redundant Genbank" (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.) durchgeführt. Die angegebenen Identitätswerte wurden mit dem Computer-Programm Vector NTI[®] Suite 7.0 (erhältlich von der Firma InforMax, Inc., Bethesda, USA) mit den vorgegebenen Default-Parametern ermittelt. Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle 1 zusammengestellt.

Tabelle 1:

% Identität	AAB93489. _mature	CAB46075.1 _mature (B.sphaericus)	SUBT_BACS9 _mature	S25835 _mature	SEQ ID NO.1 der US2004/0209343
SEQ ID NO.3	72,4	72,7	67,2	67,5	94,1

Wie vorstehend bereits beschrieben, wurde als nächstähnliches Enzym die Protease identifiziert, die als SEQ ID NO.1 in der US-Patentanmeldung US 2004/0209343 offenbart ist. Die ermittelte Identität auf Aminosäureebene beträgt 94,1% bezogen auf das reife (mature) Enzym gemäß SEQ ID NO.3. Weitere Identitätswerte zu Aminosäuresequenzen nachfolgender Datenbankeinträge, die in dem Homologievergleich niedrigere Identitätswerte ergaben, sind in der vorstehenden Tabelle 1 ebenfalls angegeben.

Beschreibung der Figuren

Figur 1: Alignment der erfindungsgemäßen reifen Protease (SEQ ID NO. 3) mit Proteasen aus dem Stand der Technik, errechnet mit dem Programm Vector NTI Suite Ver.7 (Fa. InforMax, Inc. Bethesda, USA) unter Standardparametern.

Darin bedeuten:

SEQ ID NO.3: Erfindungsgemäße Alkalische Protease gemäß SEQ ID NO. 3 (reifes Enzym)

US 2004/0209343 (SEQ ID NO.1): Protease gemäß SEQ ID NO.1 der US-Patentanmeldung US 2004/0209343

Blap WT: Alkalische Protease aus *Bacillus lentus* DSM 5483 (WO 92/21760 A1)

Patentansprüche

1. Protease umfassend eine Aminosäuresequenz, die ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus

- a) Aminosäuresequenz, die zu der in SEQ ID NO. 3 angegebenen Aminosäuresequenz zu mindestens 94,2% identisch ist
- b) Aminosäuresequenz, die zu der in SEQ ID NO. 2 angegebenen Aminosäuresequenz zu mindestens 59% identisch ist,

insbesondere eine, die ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus

- a) Aminosäuresequenz, die zu der in SEQ ID NO. 3 angegebenen Aminosäuresequenz zunehmend bevorzugt zu mindestens 94,5%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,5% und ganz besonders bevorzugt zu 100% identisch ist
- b) Aminosäuresequenz, die zu der in SEQ ID NO. 2 angegebenen Aminosäuresequenz zu mindestens 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 94,5%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 99%, 99,5% und ganz besonders bevorzugt zu 100% identisch ist.

2. Protease nach Anspruch 1, die natürlicherweise in einem Organismus vorhanden ist, der aus einem natürlichen Habitat isolierbar ist, insbesondere in einem Mikroorganismus, vorzugsweise einem Pilz, einem gramnegativen oder einem grampositiven Bakterium, hierunter besonders bevorzugt einem der Gattung Bacillus, insbesondere einem Bakterienstamm Bacillus sp. DSM ID 01-189.

3. Protease, dadurch gekennzeichnet, dass sie aus einer Protease nach einem der Ansprüche 1 oder 2 als Ausgangsmolekül erhaltbar ist durch Fragmentierung, Deletions-, Insertions- oder Substitutionsmutagenese und eine Aminosäuresequenz umfasst, die über eine Länge von mindestens 300 und zunehmend bevorzugt mindestens 290, 280, 270, 260, 250, 240, 230, 220, 210, 200, 190, 180, 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110, 100, 90, 80, 70, 60 und 50 zusammenhängenden Aminosäurepositionen mit dem Ausgangsmolekül übereinstimmt.

4. Protease, dadurch gekennzeichnet, dass sie aus einer Protease nach einem der Ansprüche 1 bis 3 als Ausgangsmolekül erhaltbar ist und einen oder mehrere Aminosäureaustausche in Positionen aufweist, die den Positionen 3, 4, 36, 42, 47, 56, 61, 69, 87, 96, 99, 101, 102, 104,

114, 118, 120, 130, 139, 141, 142, 154, 157, 188, 193, 199, 205, 211, 224, 229, 236, 237, 242, 243, 255 und 268 der Alkalischen Protease aus *Bacillus lentus* gemäß SEQ ID NO. 4 in einem Alignment zugeordnet sind.

5. Nukleinsäuremolekül, kodierend für eine Protease nach einem der Ansprüche 1 bis 4, insbesondere eines, das eine Nukleinsäuresequenz umfasst, die ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus
 - a) Nukleinsäuresequenz, die zu der in SEQ ID NO. 1 angegebenen Nukleinsäuresequenz in einem Teilstück von mindestens 300 zusammenhängenden Nukleotiden mindestens zu 59% identisch ist
 - b) Nukleinsäuresequenz, die zu der in SEQ ID NO. 1 angegebenen Nukleinsäuresequenz in den Positionen 343 bis 1269 mindestens zu 59% identisch ist
 - c) Nukleinsäuresequenz, die zu der in SEQ ID NO. 1 angegebenen Nukleinsäuresequenz mindestens zu 59% identisch ist.
6. Vektor enthaltend ein Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 5, insbesondere ein Klonierungsvektor oder ein Expressionsvektor.
7. Nicht menschliche Wirtszelle, die eine Protease nach einem der Ansprüche 1 bis 4 oder ein Fragment derselben beinhaltet oder die zu deren Herstellung angeregt werden kann, vorzugsweise unter Einsatz eines Vektors gemäß Anspruch 6, insbesondere eine, die die Protease oder ein Fragment derselben in das die Wirtszelle umgebende Medium sezerniert.
8. Wirtszelle nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass sie einen Zellkern besitzt.
9. Wirtszelle nach Anspruch 7, 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 pumilus*, *Staphylococcus carnosus*, *Corynebacterium glutamicum*, *Arthrobacter oxidans*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces coelicolor* und *Stenotrophomonas maltophilia*.

10. Verfahren zur Herstellung einer Protease gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, insbesondere unter Einsatz eines Nukleinsäuremoleküls nach Anspruch 5, vorzugsweise unter Einsatz eines Vektors nach Anspruch 6, besonders bevorzugt unter Einsatz einer Wirtszelle nach einem der Ansprüche 7 bis 9.
11. Mittel, dadurch gekennzeichnet, dass es mindestens eine Protease nach einem der Ansprüche 1 bis 4 enthält, insbesondere ein Waschmittel, Handwaschmittel, Spülmittel, Handgeschirrspülmittel, Maschinengeschirrspülmittel, Reinigungsmittel, Zahnprothesen- oder Kontaktlinsenpflegemittel, Nachspülmittel, Desinfektionsmittel, kosmetisches Mittel, pharmazeutisches Mittel oder ein Mittel zur Behandlung von Filtermedien, Textilien, Pelzen, Papier, Fellen oder Leder, ist, insbesondere ein Wäschewaschmittel oder ein Geschirrspülmittel.
12. Mittel nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass es als Einkomponentensystem vorliegt oder dass es in mehrere Komponenten aufgeteilt ist, und insbesondere eines, das die Protease in einer Menge von 2 µg bis 20 mg, vorzugsweise von 5 µg bis 17,5 mg, besonders bevorzugt von 20 µg bis 15 mg und ganz besonders bevorzugt von 50 µg bis 10 mg pro g des Mittels enthält.
13. Mittel nach einem der Ansprüche 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, dass es 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 dass es in pastöser oder in flüssiger Form vorliegt.
14. Mittel nach einem der Ansprüche 11 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Protease mit einer bei Raumtemperatur oder bei Abwesenheit von Wasser für die Protease undurchlässigen Substanz umhüllt ist.
15. Mittel nach einem der Ansprüche 11 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass es eines oder mehrere weitere Enzyme umfasst, insbesondere eine Protease, Amylase, Cellulase, Hemicellulase, Mannanase, Tannase, Xylanase, Xanthanase, β-Glucosidase, Carrageenase, Oxidase, Oxidoreduktase oder eine Lipase.
16. Verwendung eines Mittels nach einem der Ansprüche 11 bis 15 zur Entfernung von protease-sensitiven Verschmutzungen auf Textilien oder harten Oberflächen.
17. Verfahren zur Reinigung von Textilien oder harten Oberflächen, dadurch gekennzeichnet, dass in mindestens einem Verfahrensschritt ein Mittel nach einem der Ansprüche 11 bis 15 angewendet ist.

18. Verfahren zur Reinigung von Textilien oder harten Oberflächen, dadurch gekennzeichnet, dass in mindestens einem Verfahrensschritt eine Protease nach einem der Ansprüche 1 bis 4 proteolytisch aktiv ist, insbesondere derart, dass die Protease in einer Menge von 40 µg bis 4 g, vorzugsweise von 50 µg bis 3 g, besonders bevorzugt von 100 µg bis 2 g und ganz besonders bevorzugt von 200 µg bis 1 g pro Anwendung eingesetzt ist.
19. Verwendung einer Protease nach einem der Ansprüche 1 bis 4 zur Reinigung von Textilien oder von harten Oberflächen, insbesondere derart, dass die Protease in einer Menge von 40 µg bis 4 g, vorzugsweise von 50 µg bis 3 g, besonders bevorzugt von 100 µg bis 2 g und ganz besonders bevorzugt von 200 µg bis 1 g pro Anwendung eingesetzt ist.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2008/059844

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N9/54 C12N15/57		
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		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, Sequence Search, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/067737 A (NOVOZYMES AS [DK]; SVENDSEN ALLAN [DK]; DRABORG HENRIETTE [DK] NOVOZYM) 12 August 2004 (2004-08-12) sequence 1	3-19
X	WO 02/29024 A (NOVOZYMES AS [DK]) 11 April 2002 (2002-04-11) sequence 2	1,2,5-19
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
29 Oktober 2008		07/11/2008
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Espen, Josée

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2008/059844

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004067737 A	12-08-2004	EP 1590454 A2	02-11-2005
WO 0229024 A	11-04-2002	AU 9164901 A	15-04-2002

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

INV. C12N9/54 C12N15/57

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

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
C12N

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

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

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

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 2004/067737 A (NOVOZYMES AS [DK]; SVENDSEN ALLAN [DK]; DRABORG HENRIETTE [DK] NOVOZYM) 12. August 2004 (2004-08-12) Sequenz 1	3-19
X	WO 02/29024 A (NOVOZYMES AS [DK]) 11. April 2002 (2002-04-11) Sequenz 2	1, 2, 5-19

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

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

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

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

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

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

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

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

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

& Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

29. Oktober 2008

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

07/11/2008

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Espen, Josée

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2008/059844

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 2004067737 A	12-08-2004	EP 1590454 A2	02-11-2005
WO 0229024 A	11-04-2002	AU 9164901 A	15-04-2002