



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 694 34 962 T2** 2008.01.17

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 723 579 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **694 34 962.3**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US94/11776**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **94 931 872.9**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1995/010591**

(86) PCT-Anmeldetag: **13.10.1994**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **20.04.1995**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **31.07.1996**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **02.05.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **17.01.2008**

(51) Int Cl.⁸: **C11D 3/386** (2006.01)

C12N 15/57 (2006.01)

A61K 8/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

136797 **14.10.1993** **US**

237938 **02.05.1994** **US**

(73) Patentinhaber:

**The Procter & Gamble Company, Cincinnati, Ohio,
US**

(74) Vertreter:

**TER MEER STEINMEISTER & Partner GbR
Patentanwälte, 81679 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU,
NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**BAECK, Andre, B-2820 Bonheiden, BE; GHOSH,
Chanchal Kumar, West Chester, OH 45069, US;
GRAYCAR, Thomas Paul, Pacifico, CA 94044, US;
BOTT, Richard Ray, Burlingame, CA 94010, US;
WILSON, Lori Jean, Millbrae, CA 94030, US;
BRODE, Philip Frederick, Cincinnati, OH 45252,
US; BARNETT, Bobby Lee, Cincinnati, OH 45240,
US; RUBINGH, Donn Nelson, Cincinnati, OH 45247,
US**

(54) Bezeichnung: **PROTEASEHALTIGE REINIGUNGSMITTEL**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Diese Anmeldung ist eine Teilfortsetzungsanmeldung der US-Anmeldung mit der Seriennummer 08/136,797, eingereicht am 14. Oktober 1993, und der US-Anmeldung mit der Seriennummer 08/237,938, eingereicht am 2. Mai 1994, die beide in ihrer Gesamtheit durch Bezugnahme hierin eingeschlossen sind.

TECHNISCHES GEBIET

[0002] Die vorliegende Erfindung betrifft eine Vielfalt an Reinigungszusammensetzungen, die neuartige Proteaseenzyme umfassen, bei denen es sich um Carbonylhydrolasevarianten handelt.

HINTERGRUND

[0003] Enzyme stellen die größte Klasse natürlich vorkommender Proteine dar. Jede Enzymklasse katalysiert (beschleunigt eine Reaktion, ohne verbraucht zu werden) im Allgemeinen eine andere Art von chemischer Reaktion. Eine Klasse von Enzymen, die als Proteasen bekannt sind, ist für ihre Fähigkeit zum Hydrolysieren (Zerlegen einer Verbindung in zwei oder mehr einfachere Verbindungen mit Aufnahme der H- und OH-Teile eines Wassermoleküls auf beiden Seiten der aufgespaltenen chemischen Bindung) anderer Proteine bekannt. Diese Fähigkeit zum Hydrolysieren von Proteinen wird durch Einbeziehung natürlich vorkommender und mittels Proteintechnik erzeugter Proteasen als Zusatzstoff für Wäschewaschmittelzubereitungen genutzt. Viele Flecken auf Kleidung sind proteinhaltig, und Proteasen mit breiter Spezifität können die Entfernung solcher Flecken wesentlich verbessern.

[0004] Bedauerlicherweise wird der Wirksamkeitsgrad dieser Proteine in ihrer natürlichen, bakteriellen Umgebung häufig nicht in die relativ unnatürliche Waschumgebung übertragen. Genauer sind Proteaseeigenschaften wie Wärmestabilität, pH-Stabilität, Oxidationsstabilität und Substratspezifität nicht notwendigerweise zur Verwendung außerhalb der natürlichen Umgebung des Enzyms optimiert.

[0005] Die Aminosäuresequenz des Proteaseenzym bestimmt die Eigenschaften der Protease. Eine Änderung der Aminosäuresequenz der Protease kann je nach Ort, Art und/oder Ausmaß der Änderung der Aminosäuresequenz die Eigenschaften des Enzyms in unterschiedlichen Graden ändern oder das Enzym sogar deaktivieren. Es wurden verschiedene Herangehensweisen angewendet, um durch Änderung der Aminosäuresequenz von Proteasen zu versuchen, ihre Eigenschaften zu verbessern, mit dem Ziel, die Wirksamkeit der Protease für Reinigungsanwendungen wie in der Waschumgebung zu steigern. Zu diesen Herangehensweisen zählt das Ändern der Aminosäuresequenz, um unter ganz unterschiedlichen Bedingungen die Wärmestabilität zu erhöhen und die Oxidationsstabilität zu verbessern.

[0006] Trotz der Vielfalt an im Stand der Technik beschriebenen Herangehensweisen besteht eine anhaltende Notwendigkeit für neue wirksame Proteasevarianten, die zur Reinigung einer Vielfalt an Oberflächen geeignet sind. Daher ist es eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, Reinigungszusammensetzungen bereitzustellen, die Proteaseenzyme enthalten, bei denen es sich um Carbonylhydrolasevarianten mit verbesserter proteolytischer Aktivität, Substratspezifität, Stabilität und/oder verbesserten Leistungseigenschaften handelt. Diese und andere Aufgaben werden aus der nachfolgenden ausführlichen Beschreibung leicht ersichtlich.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0007] Die vorliegende Erfindung betrifft Reinigungszusammensetzungen, umfassend:

(a) eine wirksame Menge an Proteaseenzym, bei dem es sich um eine Carbonylhydrolasevariante mit einer Aminosäuresequenz handelt, die nicht in der Natur vorkommt, und die von einer Vorläufer-Carbonylhydrolase abgeleitet ist, und wobei das Proteaseenzym eine *Bacillus-lentus*-Subtilisinvariante ist, die ausgewählt ist aus N76D/S103A; N76D/V104I; N76D/S99D/S101R; N76D/S99D/S103A; N76D/S99D/V104I; N76D/S101R/S103A; N76D/S101R/V104I; N76D/S103A/V104I; N76D/V104I/I107V; N76D/V104Y/I107V; N76D/V104I/N123S; N76D/S99D/S101R/S103A; N76D/S99D/S101R/V104I; N76D/S99D/S103A/V104I; N76D/S101R/S103A/V104I; N76D/S103A/V104I/N123S; N76D/V104I/I107V/N123S; N76D/S99D/S101R/S103A/V104I; N76D/S99D/S103A/V104I/N123S; N76D/S99D/S101R/S103A/V104I/N123S; N76D/S103A/V104I/S128G; N76D/S103A/V104I/T260P; N76D/S103A/V104I/S265N; N76D/S103A/V104I/D197E; N76D/S103A/V104I/S105A; N76D/S103A/V104I/L135I; N76D/S103A/V104I/L126F; N76D/S103A/V104I/L107T; N76D/S103A/V104I/L126F/S265N und N76D/S103A/V104I/M222A und Mischungen davon; wobei die bezifferte Position natürlich vorkommendem Subtilisin aus *Bacillus amyloliquefaciens* oder äquivalenten Ami-

nosäureresten in anderen Carbonylhydrolasen oder Subtilisinen (wie *Bacillus-lentus*-Subtilisin) entspricht; und
 (b) ein oder mehrere Reinigungszusammensetzungsmaterialien, die mit dem Proteaseenzym verträglich sind.

[0008] Die vorliegende Erfindung betrifft auch Verfahren zur Reinigung von Gegenständen, die einer Reinigung bedürfen, durch Inkontaktbringen des Gegenstands mit einem Proteaseenzym, bei dem es sich um eine Carbonylhydrolasevariante handelt, wie hier beschrieben. Daher umfasst die Erfindung ein Verfahren zur Reinigung von Textilien, umfassend das Inkontaktbringen, vorzugsweise unter Hin- und Herbewegen, der Textilien mit einer wässrigen Flotte, die das Proteaseenzym enthält. Das Verfahren kann bei Temperaturen von unter etwa 60°C durchgeführt werden, jedoch ist es natürlich bei Wäschewaschtemperaturen bis hin zum Kochen sehr wirksam. Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Reinigung von Geschirr durch Inkontaktbringen von Geschirr, das einer Reinigung bedarf, mit einem Proteaseenzym, wie hier beschrieben. Die Verfahren der vorliegenden Erfindung schließen auch Verfahren zur Körperreinigung ein, wobei die Verfahren das Inkontaktbringen des Körperteils eines Menschen oder niederen Tiers, der einer Reinigung bedarf, mit einem Proteaseenzym, wie hier beschrieben, umfassen.

KURZBESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0009] Die [Fig. 1A–C](#) zeigen die DNA- und die Aminosäuresequenz für *Bacillus-amyloliquefaciens*-Subtilisin und eine Teilrestriktionskarte dieses Gens (Seq.-ID Nr. 6).

[0010] [Fig. 2](#) zeigt die konservierten Aminosäurereste in Subtilisinen von *Bacillus amyloliquefaciens* (BPN') und *Bacillus lentus* (Wildtyp).

[0011] Die [Fig. 3A](#) und [Fig. 3B](#) zeigen die Aminosäuresequenz von vier Subtilisinen. Die obere Reihe zeigt die Aminosäuresequenz von Subtilisin aus *Bacillus amyloliquefaciens* (mitunter auch als Subtilisin BPN' bezeichnet) (Seq.-ID Nr. 7). Die zweite Reihe zeigt die Aminosäuresequenz von Subtilisin aus *Bacillus subtilis* (Seq.-ID Nr. 8). Die dritte Reihe zeigt die Aminosäuresequenz von Subtilisin aus *B. icheniformis* (Seq.-ID r. 9). Die vierte Reihe zeigt die Aminosäuresequenz von Subtilisin aus *Bacillus lentus* (in PCT WO89/06276 auch als Subtilisin 309 bezeichnet) (Seq.-ID Nr. 10). Das Symbol* kennzeichnet die Abwesenheit von spezifischen Aminosäureresten im Vergleich zu Subtilisin BPN'.

[0012] [Fig. 4](#) zeigt die Konstruktion des Plasmids GGA274.

[0013] [Fig. 5](#) zeigt die Konstruktion von GGT274, welches eine Zwischenverbindung für bestimmte in dieser Anmeldung verwendete Expressionsplasmide ist.

[0014] Die [Fig. 6A](#) und [Fig. 6B](#) zeigen die DNA- und die Aminosäuresequenz von Subtilisin aus *Bacillus lentus* (Seq.-ID Nr. 11). Das reife Subtilisinprotein wird durch die Codons kodiert, die mit dem Codon GCG (334-336), welches Ala entspricht, beginnen.

[0015] Die [Fig. 7A](#) und [Fig. 7B](#) zeigen die DNA- und die Aminosäuresequenz einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung (N76D/S103A/V104I) (Seq.-ID Nr. 12). Die DNA in dieser Figur wurde durch die beschriebenen Verfahren zur Kodierung von Aspartat an Position 76, Alanin an Position 103 und Isoleucin an Position 104 modifiziert. Das reife Subtilisinvarianten-Protein wird durch die Codons kodiert, die mit dem Codon GCG (334-336), welches Ala entspricht, beginnen.

[0016] [Fig. 8](#) zeigt die Konstruktion des Vektors pBCDAICAT.

[0017] [Fig. 9](#) zeigt die Konstruktion des Vektors pUCCATFNA.

[0018] [Fig. 10](#) zeigt die Stabilität eines bevorzugten Mutantenenzyms im Vergleich zum Wildtyp in einer flüssigen Reinigungsmittelformulierung.

AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

1. Proteaseenzyme:

[0019] Die Erfindung umfasst Proteaseenzyme, die keine natürlich vorkommenden Carbonylhydrolasevarian-

ten sind und Unterschiede hinsichtlich proteolytischer Aktivität, Stabilität, Substratspezifität, pH-Profil und/oder Leistungseigenschaften im Vergleich zu der Vorläufer-Carbonylhydrolase aufweisen, von der die Aminosäuresequenz der Variante abgeleitet ist. Die Vorläufer-Carbonylhydrolase kann eine natürlich vorkommende Carbonylhydrolase oder eine rekombinierte Hydrolase sein. Genauer besitzen solche Carbonylhydrolasevarianten eine Aminosäuresequenz, die nicht in der Natur vorkommt und die durch Ersetzung einer Mehrzahl von Aminosäureresten einer Vorläufer-Carbonylhydrolase durch andere Aminosäuren abgeleitet wird. Die Mehrzahl von Aminosäureresten des Vorläuferenzym entspricht Position +76 in Kombination mit einem oder mehreren der folgenden Reste +103, +104, wobei die bezifferte Position natürlich vorkommendem Subtilisin aus *Bacillus amyloliquefaciens* oder äquivalenten Aminosäureresten in anderen Carbonylhydrolasen oder Subtilisinen, wie *Bacillus-lentus*-Subtilisin, entspricht.

[0020] Die Carbonylhydrolasevarianten, die in den Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung geeignete Proteaseenzyme sind, umfassen die Ersetzung von Aminosäurerest +76 in Kombination mit einer oder mehreren zusätzlichen Modifikationen. Die Varianten-Proteaseenzyme, die für die vorliegende Erfindung geeignet sind, umfassen die Substitution, Deletion oder Einfügung von Aminosäureresten in den folgenden Kombinationen: 76/103; 76/104; 76/99/103; 76/99/104; 76/101/103; 76/101/104; 76/103/104; 76/104/107; 76/104/123; 76/99/101/103; 76/99/101/104; 76/99/103/104; 76/101/103/104; 76/103/104/123; 76/104/107/123; 76/99/101/103/104; 76/99/103/104/123; 76/99/101/103/104/123; 76/103/104/128; 76/103/104/260; 76/103/104/265; 76/103/104/197; 76/103/104/105; 76/103/104/135; 76/103/104/126; 76/103/104/107; 76/103/104/210; 76/103/104/126/265 und/oder 76/103/104/222. Vorzugsweise umfassen die für die vorliegende Erfindung geeigneten Variantenenzyme die Substitution, Deletion oder Einfügung eines Aminosäurerests in der folgenden Kombination von Resten: 76/104; 76/99/104; 76/103/104; 76/104/107; 76/101/103/104; 76/99/101/103/104 und 76/101/104 von *B.-amyloliquefaciens*-Subtilisin.

[0021] Varianten-DNA-Sequenzen, die solche Carbonylhydrolase- oder Subtilisinvarianten kodieren, sind von einer Vorläufer-DNA-Sequenz abgeleitet, die ein natürlich vorkommendes oder rekombiniertes Vorläuferenzym kodiert. Die Varianten-DNA-Sequenzen werden abgeleitet durch Modifizieren der Vorläufer-DNA-Sequenz zur Kodierung der Substitution eines oder mehrerer spezifischer, durch die Vorläufer-DNA-Sequenz kodierter Aminosäurereste, die den Positionen 76, 99, 101, 103, 104, 107, 123, 27, 105, 109, 126, 128, 135, 156, 166, 195, 197, 204, 206, 210, 216, 217, 218, 222, 260, 265 und/oder 274 in *Bacillus amyloliquefaciens* oder einer beliebigen Kombination davon entsprechen, wobei die Variante mindestens an den Positionen 76 und 103 oder 104 substituiert sein muss. Obwohl die zur Modifikation hierin identifizierten Aminosäurereste gemäß der auf *B. amyloliquefaciens* anwendbaren Nummerierung identifiziert werden (welche die herkömmliche Methode zur Identifizierung von Restpositionen in allen Subtilisinen geworden ist), ist die bevorzugte Vorläufer-DNA-Sequenz, die für die vorliegende Erfindung geeignet ist, die DNA-Sequenz von *Bacillus lentus*, wie in [Fig. 6](#) gezeigt (Seq.-ID Nr. 11).

[0022] Diese Varianten-DNA-Sequenzen kodieren die Einfügung oder Substitution des Aminosäurerests 76 in Kombination mit einer oder mehreren zusätzlichen Modifikationen. Die Varianten-DNA-Sequenzen kodieren die Substitution oder Einfügung von Aminosäureresten in den folgenden Kombinationen: 76/103; 76/104; 76/99/103; 76/99/104; 76/101/103; 76/101/104; 76/103/104; 76/104/107; 76/104/123; 76/107/123; 76/99/101/103; 76/99/101/104; 76/99/103/104; 76/101/103/104; 76/103/104/123; 76/104/107/123; 76/99/101/103/104; 76/99/103/104/123; 76/99/101/103/104/123; 76/103/104/128; 76/103/104/260; 76/103/104/265; 76/103/104/197; 76/103/104/105; 76/103/104/135; 76/103/104/126; 76/103/104/107; 76/103/104/210; 76/103/104/126/265 und/oder 76/103/104/222. Vorzugsweise kodieren die Varianten-DNA-Sequenzen für die Modifikation der folgenden Kombinationen von Resten: 76/104; 76/99/104; 76/103/104; 76/104/107; 76/101/103/104; 76/99/101/103/104 und 76/101/104. Diese rekombinierten DNA-Sequenzen kodieren Carbonylhydrolasevarianten mit einer neuartigen Aminosäuresequenz und im Allgemeinen mindestens einer Eigenschaft, die sich wesentlich von der gleichen Eigenschaft des Enzyms unterscheidet, das durch die DNA-Sequenz der Vorläufer-Carbonylhydrolase kodiert wird. Solche Eigenschaften umfassen proteolytische Aktivität, Substratspezifität, Stabilität, verändertes pH-Profil und/oder verbesserte Leistungseigenschaften.

[0023] Die hierin geeigneten Proteaseenzyme umfassen die Substitution beliebiger der neunzehn natürlich vorkommenden L-Aminosäuren an den bezeichneten Aminosäurerest-Positionen. Solche Substitutionen können in beliebigem Vorläufersubtilisin (prokaryotisch, eukaryotisch, von Säugetieren usw.) vorgenommen werden. In dieser gesamten Anmeldung wird durch gebräuchliche ein- und dreibuchstabige Codes auf verschiedene Aminosäuren verwiesen. Solche Codes sind in Dale, J. W., (1989), *Molecular Genetics of Bacteria*, John Wiley & Sons, Ltd., Anhang B, bestimmt.

[0024] Vorzugsweise umfasst die an den einzelnen identifizierten Aminosäurerest-Positionen vorzunehmende Substitution, ohne jedoch darauf beschränkt zu sein: Substitutionen an Position 76, einschließlich D, H, E, G, F, K, P und N; Substitutionen an Position 99, einschließlich D, T, N, Q, G und S; Substitutionen an Position 101, einschließlich G, D, K, L, A, E, S und R; Substitutionen an Position 103, einschließlich Q, T, D, E, Y, K, G, R, S und A; Substitutionen an Position 104, einschließlich aller neunzehn natürlich vorkommenden Aminosäuren; Substitutionen an Position 107, einschließlich V, L, M, Y, G, E, F, T, S, A, N und I; Substitutionen an Position 123, einschließlich N, T, I, G, A, C und S; Substitutionen an Position 27, einschließlich K, N, C, V und T; Substitutionen an Position 105, einschließlich A, D, G, R und N; Substitutionen an Position 107, einschließlich A, L, V, Y, G, F, T, S und A; Substitutionen an Position 109, einschließlich S, K, R, A, N und D; Substitutionen an Position 126, einschließlich A, F, I, V und G; Substitutionen an Position 128, einschließlich G, L und A; Substitutionen an Position 135, einschließlich A, F, I, S und V; Substitutionen an Position 156, einschließlich D, E, A, G, Q und K; Substitutionen an Position 166, einschließlich aller neunzehn natürlich vorkommenden Aminosäuren; Substitutionen an Position 195, einschließlich E; Substitutionen an Position 197, einschließlich E; Substitutionen an Position 204, einschließlich A, G, C, S und D; Substitutionen an Position 206, einschließlich L, Y, N, D und E; Substitutionen an Position 210, einschließlich L, I, S, C und F; Substitutionen an Position 216, einschließlich V, E, T und K; Substitutionen an Position 217, einschließlich aller neunzehn natürlich vorkommenden Aminosäuren; Substitutionen an Position 218, einschließlich S, A, G, T und V; Substitutionen an Position 222, einschließlich aller neunzehn natürlich vorkommenden Aminosäuren; Substitutionen an Position 260, einschließlich P, N, G, A, S, C, K und D; Substitutionen an Position 265, einschließlich N, G, A, S, C, K, Y und H; und Substitutionen an Position 274, einschließlich A und S. Die besonders bevorzugte Aminosäure bzw. die besonders bevorzugten Aminosäuren, die an solchen einzelnen Positionen zu substituieren sind, sind nachstehend in Tabelle I bestimmt. Obwohl in Tabelle I spezifische Aminosäuren aufgeführt sind, sei klargestellt, dass an den identifizierten Resten eine beliebige Aminosäure substituiert werden kann.

Tabelle I

Aminosäurerest	Bevorzugte zu substituierende/einzufügende Aminosäure
+76	D, H
+99	D, T, N, G
+101	R, G, D, K, L, A, E
+103	A, Q, T, D, E, Y, K, G, R
+104	I, Y, S, L, A, T, G, F, M, W, D, V, N
+107	V, L, Y, G, F, T, S, A, N
+123	S, T, I
+27	K
+105	A, D
+109	S, K, R
+126	A, I, V, F
+128	G, L
+135	I, A, S
+156	E, D, Q
+166	D, G, E, K, N, A, F, I, V, L
+195	E
+197	E
+204	A, G, C
+206	L
+210	I, S, C
+216	V
+217	H, I, Y, C, A, G, F, S, N, E, K
+218	S
+222	A, Q, S, C, I, K
+260	P, A, S, N, G
+265	N, A, G, S
+274	A, S

[0025] Diese Proteaseenzyme, die in-vitro-Mutationen in B.-lentus-Subtilisin an einem Aminosäurerest enthalten, der zu +76 in Bacillus-amyloliquefaciens-Subtilisin äquivalent ist, bilden Subtilisinvarianten, die eine veränderte Stabilität (z. B. eine modifizierte autoproteolytische Stabilität) gegenüber Vorläufersubtilisinen aufweisen. (Siehe Tabellen IV und VI.)

[0026] Ebenso bilden in-vitro-Mutationen an Resten, die zu +99, +101, +103, +104, +107, +123, +27, +105, +109, +126, +128, +135, +156, +166, +195, +197, +204, +206, +210, +216, +217, +218, +222, +260, +265 und/oder +274 in *Bacillus-amyloliquefaciens*-Subtilisin äquivalent sind, allein oder in Kombination miteinander und in beliebiger Kombination mit +76-Mutationen Subtilisinvarianten, die eine veränderte proteolytische Aktivität, eine veränderte Wärmestabilität, ein verändertes pH-Profil, eine veränderte Substratspezifität und/oder veränderte Leistungseigenschaften aufweisen.

[0027] Carbonylhydrolasen sind Proteaseenzyme, die Verbindungen hydrolysieren, die

O

C-X

-Bindungen enthalten, in denen X Sauerstoff oder Stickstoff ist. Sie schließen natürlich vorkommende Carbonylhydrolasen und rekombinierte Carbonylhydrolasen ein. Natürlich vorkommende Carbonylhydrolasen schließen hauptsächlich Hydrolasen ein, z. B. Peptidhydrolasen wie Subtilisine oder Metallproteasen. Peptidhydrolasen schließen α -Aminoacylpeptidhydrolase, Peptidylaminosäurehydrolase, Acylaminohydrolase, Serincarboxypeptidase, Metallcarboxypeptidase, Thiolproteinase, Carboxylproteinase und Metallproteinase ein. Serin-, Metall-, Thiol- und Säureproteasen sind eingeschlossen, ebenso wie Endo- und Exoproteasen.

[0028] „Rekombinierte Carbonylhydrolase“ bezieht sich auf eine Carbonylhydrolase, bei der die DNA-Sequenz, welche die natürlich vorkommende Carbonylhydrolase kodiert, modifiziert wird, um eine Mutanten-DNA-Sequenz zu erzeugen, welche die Substitution, Einfügung oder Deletion einer oder mehrerer Aminosäuren in der Aminosäuresequenz der Carbonylhydrolase kodiert. Geeignete Modifikationsverfahren sind hierin und in US-Patent 4,760,025 (RE 34,606), US-Patent 5,204,015 und US-Patent 5,185,258 eingeschlossen, deren Offenbarung durch Bezugnahme hierin eingeschlossen ist.

[0029] Subtilisine sind Bakterien- oder Pilzcarbonylhydrolasen, die im Allgemeinen so wirken, dass Peptidbindungen von Proteinen oder Peptiden aufgespalten werden. Wie hier verwendet, bedeutet „Subtilisin“ ein natürlich vorkommendes Subtilisin oder ein rekombiniertes Subtilisin. Eine Reihe von natürlich vorkommenden Subtilisinen wird bekanntermaßen von verschiedenen mikrobiellen Spezies gebildet und oftmals sezerniert. Die Aminosäuresequenzen der Mitglieder dieser Reihe sind nicht vollständig homolog. Die Subtilisine in dieser Reihe weisen jedoch die gleiche oder eine ähnliche Art von proteolytischer Aktivität auf. Diese Klasse von Serinproteasen weist eine gemeinsame Aminosäuresequenz auf, die eine katalytische Triade bestimmt, die sie von der Chymotrypsin-verwandten Klasse von Serinproteasen unterscheidet. Die Subtilisine und die Chymotrypsin-verwandten Serinproteasen weisen jeweils eine katalytische Triade auf, die Aspartat, Histidin und Serin umfasst. In den Subtilisin-verwandten Proteasen lautet die relative Reihenfolge dieser Aminosäuren, vom Amino- zum Carboxyterminus gesehen, Aspartat-Histidin-Serin. In den Chymotrypsin-verwandten Proteasen lautet die relative Reihenfolge jedoch Histidin-Aspartat-Serin. Daher bezieht sich Subtilisin hierin auf eine Serinprotease mit der katalytischen Triade von Subtilisin-verwandten Proteasen. Beispiele umfassen, ohne jedoch darauf beschränkt zu sein, die in [Fig. 3](#) hierin identifizierten Subtilisine.

[0030] „Rekombiniertes Subtilisin“ bezieht sich auf ein Subtilisin, bei dem die DNA-Sequenz, die das Subtilisin kodiert, modifiziert wird, um eine Varianten-(oder Mutanten-)DNA-Sequenz zu erzeugen, welche die Substitution, Deletion oder Einfügung einer oder mehrerer Aminosäuren in der Aminosäuresequenz von natürlich vorkommendem Subtilisin kodiert. Geeignete Verfahren zur Erzeugung einer solchen Modifikation, die mit den hierin offenbarten kombiniert werden können, schließen diejenigen ein, die in US-Patent 4,760,025 (RE 34,606), US-Patent 5,204,015 und US-Patent 5,185,258 offenbart sind.

[0031] „Nichtmenschliche Carbonylhydrolasen“ und die DNA, die sie kodiert, können aus vielen prokaryotischen und eukaryotischen Organismen gewonnen werden. Geeignete Beispiele für prokaryotische Organismen umfassen gramnegative Organismen wie *E. coli* oder *Pseudomonas* und grampositive Bakterien wie *Micrococcus* oder *Bacillus*. Beispiele für eukaryotische Organismen, aus denen Carbonylhydrolase und deren Gene gewonnen werden können, umfassen Hefe wie *Saccharomyces cerevisiae*, Pilze wie *Aspergillus* sp. und nichtmenschliche Säugetierquellen wie beispielsweise bovine sp., aus denen das Gen, das die Carbonylhydrolase Chymosin kodiert, gewonnen werden kann. Wie bei Subtilisinen kann eine Reihe von Carbonylhydrolasen aus verschiedenen verwandten Spezies gewonnen werden, die zwar Aminosäuresequenzen aufweisen, die zwischen den Mitgliedern dieser Reihe nicht vollständig homolog sind, jedoch trotzdem die gleiche oder eine ähnliche Art von biologischer Aktivität aufweisen. Somit weist nichtmenschliche Carbonylhydrolase, wie hier verwendet, eine funktionelle Definition auf, die sich auf Carbonylhydrolasen bezieht, die direkt oder indirekt mit prokaryotischen und eukaryotischen Quellen verbunden sind.

[0032] Eine „Carbonylhydrolasevariante“ besitzt eine Aminosäuresequenz, die von der Aminosäuresequenz

einer „Vorläufer-Carbonylhydrolase“ abgeleitet ist. Die Vorläufer-Carbonylhydrolasen (wie ein Subtilisin) umfassen natürlich vorkommende Carbonylhydrolasen (Subtilisin) und rekombinierte Carbonylhydrolasen (Subtilisin). Die Aminosäuresequenz der Carbonylhydrolasevariante wird durch Substitution, Deletion oder Einfügung einer oder mehrerer Aminosäuren der Vorläufer-Aminosäuresequenz von der Aminosäuresequenz der Vorläuferhydrolase „abgeleitet“. Eine solche Modifikation erfolgt an der „Vorläufer-DNA-Sequenz“, welche die Aminosäuresequenz der Vorläufer-Carbonylhydrolase (Subtilisin) kodiert, und nicht durch Manipulation des Vorläufer-Carbonylhydrolase-(Subtilisin-)Enzyms als solchem. Geeignete Verfahren für eine solche Manipulation der Vorläufer-DNA-Sequenz umfassen hierin offenbarte Verfahren sowie Verfahren, die Fachleuten bekannt sind (siehe zum Beispiel EP 0 328299, WO89/06279 und die US-Patente und -Anmeldungen, auf die hierin bereits verwiesen wurde).

[0033] Spezifische Reste, die Position +76 in Kombination mit einer oder mehreren der folgenden Positionen +99, +101, +103, +104, +107, +123, +27, +105, +109, +126, +128, +135, +156, +166, +195, +197, +204, +206, +210, +216, +217, +218, +222, +260, +265 und/oder +274 von *Bacillus-amyloliquefaciens*-Subtilisin entsprechen, sind hierin für eine Mutation identifiziert. Die modifizierten Reste sind aus den folgenden Kombinationen ausgewählt: 76/103; 76/104; 76/99/103; 76/99/104; 76/101/103; 76/101/104; 76/103/104; 76/104/107; 76/104/123; 76/107/123; 76/99/101/103; 76/99/101/104; 76/99/103/104; 76/101/103/104; 76/103/104/123; 76/104/107/123; 76/99/101/103/104; 76/99/103/104/123; 76/99/101/103/104/123; 76/103/104/128; 76/103/104/260; 76/103/104/265; 76/103/104/197; 76/103/104/105; 76/103/104/135; 76/103/104/126; 76/103/104/107; 76/103/104/210; 76/103/104/126/265 und/oder 76/103/104/222; und am meisten bevorzugt sind 76/104; 76/99/104; 76/103/104; 76/104/107; 76/101/103/104; 76/99/101/103/104 und 76/101/104. Diese Aminosäure-Positionsnummern beziehen sich auf diejenigen, die der in **Fig. 1** dargestellten Sequenz von reifem *Bacillus-amyloliquefaciens*-Subtilisin zugewiesen sind. Die in der vorliegenden Erfindung geeigneten Proteaseenzyme sind jedoch nicht auf die Mutation dieses bestimmten Subtilisins beschränkt, sondern erstrecken sich auch auf Vorläufer-Carbonylhydrolasen, die Aminosäurereste an Positionen enthalten, die zu den bestimmten identifizierten Resten in *Bacillus-amyloliquefaciens*-Subtilisin „äquivalent“ sind. Vorzugsweise ist das Vorläufersubtilisin *Bacillus-lentus*-Subtilisin, und die Substitutionen, Deletionen oder Einfügungen werden an dem äquivalenten Aminosäurerest in *B. lentus* vorgenommen, der den vorstehend aufgeführten entspricht.

[0034] Ein Rest (eine Aminosäure) einer Vorläufer-Carbonylhydrolase ist äquivalent zu einem Rest von *Bacillus-amyloliquefaciens*-Subtilisin, wenn er entweder homolog ist (d. h. der Position in der Primär- oder Tertiärstruktur entspricht) oder analog zu einem spezifischen Rest oder Teil dieses Restes in *Bacillus-amyloliquefaciens*-Subtilisin ist (d. h. die gleiche oder eine ähnliche funktionelle Fähigkeit zur chemischen Verbindung, Reaktion oder Interaktion aufweist).

[0035] Um Homologie zu der Primärstruktur festzustellen, wird die Aminosäuresequenz einer Vorläufer-Carbonylhydrolase direkt mit der Primärsequenz von *Bacillus-amyloliquefaciens*-Subtilisin und besonders mit einer Reihe von Resten verglichen, die bekanntermaßen in Subtilisinen, deren Sequenz bekannt ist, invariant sind. **Fig. 2** hierin zeigt die konservierten Reste im Vergleich zwischen *Amyloliquefaciens*-Subtilisin und *B. lentus*-Subtilisin. Nach der Anordnung der konservierten Reste, die notwendige Einfügungen und Deletionen ermöglicht, um die Anordnung aufrechtzuerhalten (d. h. Vermeiden der Eliminierung von konservierten Resten durch willkürliche Deletion und Einfügung), werden die Reste bestimmt, die zu bestimmten Aminosäuren in der Primärsequenz von *Bacillus-amyloliquefaciens*-Subtilisin äquivalent sind. Bei der Anordnung von konservierten Resten sollten vorzugsweise 100% solcher Reste konserviert werden. Die Anordnung von mehr als 75% oder nur 50% konservierten Resten ist jedoch ebenfalls zur Bestimmung von äquivalenten Resten ausreichend. Die Konservierung der katalytischen Triade Asp32/His64/Ser221 sollte aufrechterhalten werden.

[0036] Beispielsweise sind in **Fig. 3** die Aminosäuresequenzen von Subtilisin aus *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* (carlsbergensis) und *Bacillus lentus* angeordnet, um für ein Höchstmaß an Homologie zwischen den Aminosäuresequenzen zu sorgen. Ein Vergleich dieser Sequenzen zeigt, dass in jeder Sequenz mehrere konservierte Reste enthalten sind. Diese konservierten Reste (im Vergleich zwischen BPN' und *B. lentus*) sind in **Fig. 2** identifiziert.

[0037] Diese konservierten Reste können somit verwendet werden, um die entsprechenden äquivalenten Aminosäurereste von *Bacillus-amyloliquefaciens*-Subtilisin in anderen Carbonylhydrolasen wie Subtilisin aus *Bacillus lentus* (PCT-Veröffentlichung Nr. WO89/06279, veröffentlicht am 13. Juli 1989), dem hierin bevorzugten Subtilisin-Vorläuferenzym, oder dem als PB92 bezeichneten Subtilisin (EP O 328 299), das in hohem Maße mit dem bevorzugten *Bacillus-lentus*-Subtilisin homolog ist, zu bestimmen. Die Aminosäuresequenzen bestimmter dieser Subtilisine sind in den **Fig. 3A** und **Fig. 3B** zusammen mit der Sequenz von *Bacillus-amyloliquefaciens*-Subtilisin angeordnet, um eine maximale Homologie der konservierten Reste zu erzielen. Wie zu

sehen ist, weist die Sequenz von Bacillus-lentus- im Vergleich zu Bacillus-amyloliquefaciens-Subtilisin mehrere Deletionen auf. So ist beispielsweise die äquivalente Aminosäure zu Val165 in Bacillus-amyloliquefaciens-Subtilisin in den anderen Subtilisinen von B. lentus und B. licheniformis Isoleucin.

[0038] So ist zum Beispiel sowohl in B. -amyloliquefaciens- als auch in B. -lentus-Subtilisin Asparagin (N) die Aminosäure an Position +76. In der bevorzugten Subtilisinvariante, die in der Erfindung geeignet ist, ist die Aminosäure, die zu +76 in Bacillus-amyloliquefaciens-Subtilisin äquivalent ist, jedoch durch Aspartat (D) substituiert. Ein Vergleich aller hierin zur Substitution identifizierten Aminosäurereste mit der bevorzugten Substitution für solche einzelnen Positionen ist in Tabelle II zu Veranschaulichungszwecken aufgeführt.

Tabelle II

	+76	+99	+101	+103	+104	+107	+123
B. amyloliquefaciens (Wildtyp)	N	D	S	Q	Y	I	N
B. lentus (Wildtyp)	N	S	S	S	V	I	N
Bevorzugteste Substitution	D	D	R	A	I/Y	V	S

[0039] Für eine Vorläufer-Carbonylhydrolase, deren Tertiärstruktur durch Röntgenkristallographie bestimmt wurde, können äquivalente Reste auch durch Bestimmung der Homologie auf der Ebene der Tertiärstruktur bestimmt werden. Äquivalente Reste sind als diejenigen definiert, bei denen die Atomkoordinaten von zwei oder mehr der Hauptkettenatome eines bestimmten Aminosäurerests der Vorläufer-Carbonylhydrolase und von Bacillus-amyloliquefaciens-Subtilisin (N auf N, CA auf CA, C auf C und O auf O) nach der Anordnung innerhalb von 0,13 nm und vorzugsweise 0,1 nm liegen. Die Anordnung wird erreicht, nachdem das beste Modell so ausgerichtet und positioniert wurde, dass sich eine maximale Überlappung der Atomkoordinaten von Nichtwasserstoff-Proteinatomen der jeweiligen Carbonylhydrolase mit dem Bacillus-amyloliquefaciens-Subtilisin ergibt. Das beste Modell ist das kristallographische Modell, das den niedrigsten R-Faktor für experimentelle Diffraktionsdaten bei der höchsten verfügbaren Auflösung ergibt.

$$R\text{-Faktor} = \frac{\sum_h |F_o(h)| - |F_c(h)|}{\sum_h |F_o(h)|}$$

[0040] Äquivalente Reste, die funktionell analog zu einem spezifischen Rest von Bacillus-amyloliquefaciens-Subtilisin sind, sind als diejenigen Aminosäuren der Vorläufer-Carbonylhydrolasen definiert, die eine solche Konformation annehmen können, dass sie Proteinstruktur, Substratbindung oder Katalyse in einer Weise ändern, modifizieren oder dazu beitragen, die für einen spezifischen Rest des Bacillus-amyloliquefaciens-Subtilisins definiert ist und diesem zugeschrieben wird. Ferner sind sie diejenigen Reste der Vorläufer-Carbonylhydrolase (für die eine Tertiärstruktur durch Röntgenkristallographie erhalten wurde), die eine analoge Position in dem Maße einnehmen, dass, obwohl die Hauptkettenatome des bestimmten Rests möglicherweise nicht die Äquivalenzkriterien auf der Grundlage der Einnahme einer homologen Position erfüllen, die Atomkoordinaten von mindestens zwei der Seitenkettenatome des Rests auf 0,13 nm genau mit den entsprechenden Seitenkettenatomen von Bacillus-amyloliquefaciens-Subtilisin übereinstimmen. Die Koordinaten der dreidimensionalen Struktur von Bacillus-amyloliquefaciens-Subtilisin sind in der EPO-Veröffentlichung Nr. 0 251 446 (entspricht der US-Patentanmeldung mit der Seriennummer 08/212,291, deren Offenbarung durch Bezugnahme hierin eingeschlossen ist) dargelegt und können wie vorstehend umrissen zur Bestimmung von äquivalenten Resten auf der Ebene der Tertiärstruktur verwendet werden.

[0041] Einige der für Substitution, Einfügung oder Deletion identifizierten Reste sind konservierte Reste, andere dagegen nicht. Im Falle von Resten, die nicht konserviert sind, ist die Ersetzung einer oder mehrerer Aminosäuren auf Substitutionen beschränkt, die eine Variante mit einer Aminosäuresequenz ergeben, die nicht einer in der Natur vorkommenden entspricht. Im Falle von konservierten Resten sollten solche Ersetzungen nicht zu einer natürlich vorkommenden Sequenz führen. Die in der vorliegenden Erfindung geeigneten Carbonylhydrolasevarianten schließen die reifen Formen von Carbonylhydrolasevarianten sowie die Pro- und Präproformen solcher Hydrolasevarianten ein. Die Präproformen stellen den bevorzugten Aufbau dar, da dies die Expression, Sekretion und Reifung der Carbonylhydrolasevarianten erleichtert.

[0042] „Prosequenz“ bezieht sich auf eine an den N-terminalen Teil der reifen Form einer Carboxylhydrolase gebundene Sequenz von Aminosäuren, deren Entfernung zum Auftreten der „reifen“ Form der Carboxylhydrolase führt. Viele proteolytische Enzyme kommen in der Natur als Translations-Proenzymprodukte vor und werden auf diese Weise exprimiert, wenn sie nach der Translation nicht verarbeitet werden. Eine bevorzugte Prosequenz für die Bildung von Carboxylhydrolasevarianten, besonders Subtilisinvarianten, ist die mutmaßliche Prosequenz von *Bacillus amyloliquefaciens*-Subtilisin, obwohl andere Subtilisin-Prosequenzen verwendet werden können. In den Beispielen wird die mutmaßliche Prosequenz des Subtilisins aus *Bacillus lentus* (ATCC 21536) verwendet.

[0043] Eine „Signalsequenz“ oder „Präsequenz“ bezieht sich auf eine beliebige an den N-terminalen Teil einer Carboxylhydrolase oder an den N-terminalen Teil einer Prohydrolase gebundene Sequenz von Aminosäuren, die an der Sekretion der reifen Form oder der Proform der Hydrolase beteiligt sein kann. Diese Definition von Signalsequenz ist eine funktionelle, die alle diejenigen durch den N-terminalen Teil des Subtilisins oder anderer sezernierbarer Carboxylhydrolasen kodierten Aminosäuresequenzen einschließen soll, die an der Bewirkung der Sekretion von Subtilisin oder anderen Carboxylhydrolasen unter nativen Bedingungen beteiligt sind. Die für die vorliegende Erfindung geeigneten Proteaseenzyme nutzen solche Sequenzen, um die Sekretion der Carboxylhydrolasevarianten, wie hier beschrieben, zu bewirken. Eine bevorzugte Signalsequenz, die in den Beispielen verwendet wird, umfasst die ersten sieben Aminosäurereste der Signalsequenz von *Bacillus subtilis*-Subtilisin, fusioniert mit dem Rest der Signalsequenz des Subtilisins aus *Bacillus lentus* (ATCC 21536).

[0044] Eine „Präpro“-Form einer Carboxylhydrolasevariante besteht aus der reifen Form der Hydrolase mit einer Prosequenz, die operabel mit dem Aminoterminus der Hydrolase verbunden ist, und einer „Prä“- oder „Signal“-Sequenz, die operabel mit dem Aminoterminus der Prosequenz verbunden ist.

[0045] „Expressionsvektor“ bezieht sich auf ein DNA-Konstrukt, das eine DNA-Sequenz enthält, die operabel mit einer geeigneten Steuersequenz verbunden ist, die in der Lage ist, die Expression der DNA in einem geeigneten Wirt zu bewirken.

[0046] Solche Steuersequenzen umfassen einen Promotor zur Bewirkung einer Transkription, eine fakultative Operatorsequenz zur Regulierung der Transkription, eine Sequenz, die geeignete mRNA-Ribosomenbindungsstellen kodiert, und Sequenzen, die das Ende von Transkription und Translation steuern. Der Vektor kann ein Plasmid, ein Phagenpartikel oder einfach ein potenzielles genomisches Insert sein. Sobald der Vektor in einen geeigneten Wirt transformiert wurde, kann er sich replizieren und unabhängig vom Wirtsgenom funktionieren oder sich in einigen Fällen in das Genom selbst integrieren. In der vorliegenden Beschreibung werden „Plasmid“ und „Vektor“ mitunter austauschbar verwendet, da das Plasmid gegenwärtig die am häufigsten verwendete Vektorform ist. Hierin eingeschlossen sind jedoch solche anderen Formen von Expressionsvektoren, die äquivalente Funktionen erfüllen und die im Stand der Technik bekannt sind oder bekannt werden.

[0047] Die in der vorliegenden Erfindung verwendeten „Wirtszellen“ sind im Allgemeinen prokaryotische oder eukaryotische Wirte, die vorzugsweise durch die in US-Patent 4,760,025 (RE 34,606) offenbarten Verfahren manipuliert wurden, damit sie keine enzymatisch aktive Endoprotease sezernieren können. Eine bevorzugte Wirtszelle zum Expressieren von Subtilisin ist der *Bacillus*-Stamm BG2036, der keine enzymatisch aktive neutrale Protease und alkalische Protease (Subtilisin) aufweist. Der Aufbau des Stamms BG2036 ist in US-Patent 5,264,366 ausführlich beschrieben. Andere Wirtszellen zum Expressieren von Subtilisin umfassen *Bacillus subtilis* I168 (ebenfalls in US-Patent 4,760,025 (RE 34,606) und US-Patent 5,264,366 beschrieben, deren Offenbarungen durch Bezugnahme hierin eingeschlossen sind) sowie einen beliebigen geeigneten *Bacillus*-Stamm wie *B. licheniformis*, *B. lentus* usw.

[0048] Wirtszellen werden mit Vektoren transformiert oder transfiziert, die mit Hilfe rekombinierter DNA-Techniken konstruiert wurden. Solche transformierten Wirtszellen sind in der Lage, entweder Vektoren zu replizieren, welche die Carboxylhydrolasevarianten kodieren, oder die gewünschte Carboxylhydrolasevariante zu exprimieren. Im Falle von Vektoren, welche die Prä- oder Präproform der Carboxylhydrolasevariante kodieren, werden solche Varianten, wenn sie exprimiert werden, in der Regel aus der Wirtszelle in das Wirtszellenmedium sezerniert.

[0049] „Operabel verbunden“ bedeutet bei der Beschreibung der Beziehung zwischen zwei DNA-Regionen einfach, dass sie funktionell in Beziehung zueinander stehen. Beispielsweise ist eine Präsequenz operabel mit einem Peptid verbunden, wenn sie als Signalsequenz fungiert, die an der Sekretion der reifen Form des Proteins beteiligt ist, die höchstwahrscheinlich die Aufspaltung der Signalsequenz einschließt. Ein Promotor ist

operabel mit einer Kodierungssequenz verbunden, wenn er die Transkription der Sequenz steuert; eine Ribosomenbindungsstelle ist operabel mit einer Kodierungssequenz verbunden, wenn sie so positioniert ist, dass sie eine Translation erlaubt.

[0050] Die Gene, welche die natürlich vorkommende Vorläufer-Carbonylhydrolase kodieren, können nach den allgemeinen Verfahren gewonnen werden, die Fachleuten bekannt sind. Die Verfahren umfassen im Allgemeinen das Synthetisieren von markierten Sonden mit mutmaßlichen Sequenzen, welche die Regionen der jeweiligen Hydrolase kodieren, die Herstellung von Genombibliotheken von Organismen, welche die Hydrolase expressieren, und das Screening der Bibliotheken auf das jeweilige Gen durch Hybridisierung an die Sonden. Anschließend werden positiv hybridisierende Klone kartiert und sequenziert. Das in den Beispielen verwendete B.-lentus-Gen wird geklont, wie in Beispiel 1 von US-Patent 5,185,258 beschrieben, dessen Offenbarung hierin eingeschlossen ist. Das in den Beispielen verwendete BPN'-Gen wird geklont, wie in Beispiel 1 in RE 34,606 beschrieben, dessen Offenbarung hierin eingeschlossen ist.

[0051] Anschließend wird die geklonte Carbonylhydrolase zur Transformation einer Wirtszelle verwendet, um die Hydrolase zu expressieren. Anschließend wird das Hydrolasegen in ein High-copy-number-Plasmid ligiert. Dieses Plasmid repliziert sich in Wirten in dem Sinne, dass es die wohl bekannten Elemente enthält, die zur Plasmidreplikation erforderlich sind: einen operabel mit dem jeweiligen Gen verbundenen Promotor (der, falls er vom Wirt erkannt, d. h. transkribiert, wird, als der eigene homologe Promotor des Gens bereitgestellt werden kann), eine Region für Transkriptionsende und Polyadenylierung (in bestimmten eukaryotischen Wirtszellen für die Stabilität der durch den Wirt aus dem Hydrolasegen transkribierten mRNA erforderlich), die exogen ist oder durch den endogenen Terminatorbereich des Hydrolasegens bereitgestellt wird, und wünschenswerterweise ein Selektionsgen, wie ein Gen für Antibiotikaresistenz, das die kontinuierliche Aufrechterhaltung von Kulturen plasmidinfizierter Wirtszellen durch Wachstum in antibiotikahaltigen Medien ermöglicht. High-copy-number-Plasmide enthalten auch einen Replikationsursprung für den Wirt und ermöglichen dadurch das Erzeugen einer großen Anzahl von Plasmiden im Zytoplasma ohne Chromosomenbeschränkungen. Es liegt jedoch innerhalb des Schutzzumfangs hierin, die multiplen Kopien des Hydrolasegens in das Wirtsgenom zu integrieren. Dies wird durch prokaryotische und eukaryotische Organismen erleichtert, die besonders anfällig für homologe Rekombination sind.

[0052] Die in den vorliegenden Beispielen verwendeten Gene sind ein natürliches B.-lentus-Gen und ein natürliches B.-amyloliquefaciens-Gen. Als Alternative kann ein synthetisches Gen, das eine natürlich vorkommende oder mutante Vorläufer-Carbonylhydrolase (Subtilisin) kodiert, hergestellt werden. Bei einer solchen Herangehensweise wird die DNA- und/oder die Aminosäuresequenz der Vorläuferhydrolase (Subtilisin) bestimmt. Danach werden multiple, überlappende synthetische Einzelstrang-DNA-Fragmente synthetisiert, die bei Hybridisierung und Ligation eine synthetische DNA bilden, welche die Vorläuferhydrolase kodiert. Ein Beispiel für die Konstruktion eines synthetischen Gens ist in Beispiel 3 von US-Patent 5,204,015 dargelegt, dessen Offenbarung durch Bezugnahme hierin eingeschlossen ist.

[0053] Sobald das natürlich vorkommende oder synthetische Vorläufer-Carbonylhydrolase-Gen geklont wurde, wird eine Reihe von Modifikationen durchgeführt, um die Nutzung des Gens über die Synthese der natürlich vorkommenden Vorläufer-Carbonylhydrolase hinaus zu erweitern. Solche Modifikationen umfassen die Bildung von rekombinierten Carbonylhydrolasen, wie in US-Patent 4,760,025 (RE 34,606) und in der EPO-Veröffentlichung Nr. 0 251 446 offenbart, und die Bildung von hierin beschriebenen Carbonylhydrolasevarianten.

[0054] Das folgende Kassettenmutagenese-Verfahren kann angewendet werden, um die Konstruktion und Identifikation der in der vorliegenden Erfindung geeigneten Carbonylhydrolasevarianten zu erleichtern, obwohl andere Verfahren, einschließlich ortsgerichteter Mutagenese, angewendet werden können. Zuerst wird das natürlich vorkommende Gen, das die Hydrolase kodiert, gewonnen und ganz oder teilweise sequenziert. Anschließend wird die Sequenz nach einer Stelle abgesucht, an der eine Mutation (Deletion, Einfügung oder Substitution) einer oder mehrerer Aminosäuren in dem kodierten Enzym vorgenommen werden soll. Die Sequenzen, die diese Stelle flankieren, werden auf das Vorhandensein von Restriktionsstellen für das Ersetzen eines kurzen Gensegments durch einen Oligonukleotid-Pool beurteilt, der verschiedene Mutanten kodiert, wenn er exprimiert wird. Solche Restriktionsstellen sind vorzugsweise nur einmal vorhandene Stellen innerhalb des Hydrolasegens, um die Ersetzung des Gensegments zu erleichtern. Es kann jedoch eine beliebige geeignete Restriktionsstelle, die nicht in übermäßig hoher Anzahl in dem Hydrolasegen vorhanden ist, verwendet werden, mit der Maßgabe, dass die durch die Restriktionsverdauung erzeugten Genfragmente in der richtigen Sequenz wieder zusammengesetzt werden können. Wenn an Orten innerhalb eines angemessenen Abstands von der ausgewählten Stelle (von 10 bis 15 Nukleotide) keine Restriktionsstellen vorhanden sind, werden solche Stellen erzeugt, indem Nukleotide in dem Gen so substituiert werden, dass in dem endgültigen Aufbau we-

der der Leserahmen noch die kodierte Aminosäure geändert werden. Eine Mutation des Gens, um seine Sequenz so zu ändern, dass sie mit der gewünschten Sequenz übereinstimmt, wird durch M13-Primerextension nach allgemein bekannten Verfahren erreicht. Die Aufgabe der Lokalisierung von geeigneten Flankenregionen und der Bewertung der erforderlichen Änderungen, um zwei geeignete Restriktionsstellen-Sequenzen zu finden, wird durch die Redundanz des genetischen Codes, eine Restriktionsenzymkarte des Gens und die große Anzahl verschiedener Restriktionsenzyme zur Routine. Es ist zu beachten, dass für den Fall, dass eine geeignete flankierende Restriktionsstelle verfügbar ist, das vorstehende Verfahren nur in Verbindung mit der Flankenregion angewendet werden muss, die keine Stelle enthält.

[0055] Sobald die natürlich vorkommende DNA oder die synthetische DNA geklont wurde, werden die Restriktionsstellen, welche die zu mutierenden Positionen flankieren, mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut, und eine Vielzahl von zu Endtermini komplementären Oligonukleotidkassetten wird in das Gen ligiert. Die Mutagenese wird durch dieses Verfahren vereinfacht, da alle Oligonukleotide so synthetisiert werden können, dass sie die gleichen Restriktionsstellen aufweisen, und keine synthetischen Linker erforderlich sind, um die Restriktionsstellen zu erzeugen.

[0056] Wie hier verwendet, ist proteolytische Aktivität als die Geschwindigkeit der Hydrolyse von Peptidbindungen pro Milligramm aktives Enzym definiert. Zur Messung der proteolytischen Aktivität bestehen zahlreiche wohl bekannte Verfahren (K. M. Kalisz, „Microbial Proteinases“, Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, Hrsg. A. Fiechter, 1988). Zusätzlich oder als Alternative zu modifizierter proteolytischer Aktivität können die Variantenenzyme der vorliegenden Erfindung andere modifizierte Eigenschaften wie K_m , K_{cat} , das Verhältnis K_{cat}/K_m und/oder eine modifizierte Substratspezifität und/oder ein modifiziertes pH-Aktivitätsprofil aufweisen. Diese Enzyme können auf das bestimmte Substrat zugeschnitten werden, das der Erwartung nach vorhanden ist, beispielsweise für hydrolytische Prozesse wie Wäschewaschanwendungen.

[0057] Eine Aufgabe kann darin liegen, eine Varianten-Carbonylhydrolase zu gewinnen, die eine veränderte proteolytische Aktivität im Vergleich zu der Vorläufer-Carbonylhydrolase aufweist, da die Erhöhung einer solchen Aktivität (numerisch größer) ermöglicht, dass das Enzym so verwendet wird, dass es an einem Zielsubstrat wirksamer ist. Ebenfalls von Interesse sind Variantenenzyme mit einer veränderten Wärmestabilität und/oder einer veränderten Substratspezifität im Vergleich zum Vorläufer. Vorzugsweise ist die zu mutierende Carbonylhydrolase ein Subtilisin. In den Beispielen werden spezifische Aminosäuren dargestellt, die dazu geeignet sind, solche Ergebnisse bei subtilisinartigen Carbonylhydrolasen an Resten zu erzielen, die zu +76, +99, +101, +103, +104, +107, +123, +27, +105, +109, +126, +128, +135, +156, +166, +195, +197, +204, +206, +210, +216, +217, +218, +222, +260, +265 und/oder +274 oder einer beliebigen Kombination davon in Bacillus-amyloliquefaciens-Subtilisin äquivalent sind. In einigen Fällen kann eine geringere proteolytische Aktivität wünschenswert sein. Dagegen kann es in einigen Fällen wünschenswert sein, die proteolytische Aktivität des Variantenenzym gegenüber seinem Vorläufer zu erhöhen. Darüber hinaus können Erhöhungen oder Verringerungen (Änderung) der Stabilität der Variante, ob alkalische Stabilität oder Wärmestabilität, wünschenswert sein. Erhöhungen oder Verringerungen von K_{cat} , K_m oder K_{cat}/K_m sind spezifisch für das Substrat, das zur Bestimmung dieser kinetischen Parameter verwendet wird.

[0058] Außerdem wurde festgestellt, dass zu +76 äquivalente Reste in Kombination mit einer Reihe von anderen Modifikationen in Subtilisin wichtig bei der Modulierung der Gesamtstabilität und/oder der proteolytischen Gesamtaktivität des Enzyms sind. Daher kann, wie in den Beispielen dargelegt, in den bevorzugten Proteaseenzymen das Asparagin (N) in Bacillus-lentus-Subtilisin an der äquivalenten Position +76 durch Aspartat (D) in Kombination mit der Modifikation eines oder mehrerer der folgenden Aminosäurereste +103, +104 substituiert werden, um eine verbesserte Stabilität und/oder eine verbesserte Aktivität des resultierenden Mutantenenzym zu erzielen.

[0059] Die am meisten bevorzugten Proteaseenzyme, die in dieser Erfindung geeignet sind, sind in den Beispielen dargelegt. Diese schließen die folgenden spezifischen Kombinationen von substituierten Resten ein: N76D/V104I; N76D/S99D/V104I; N76D/S103A/V104I; N76D/V104I/I107V; N76D/V104Y/I107V und N76D/S101R/S103A/V104I. Diese Substitutionen werden in Bacillus-lentus-Subtilisin (rekombiniert oder nativ) vorgenommen, obwohl die Substitutionen in beliebigem Bacillus-Subtilisin vorgenommen werden können.

[0060] Auf der Grundlage der mit diesem und anderen Varianten-Subtilisinen erzielten Ergebnisse ist offensichtlich, dass Reste in Carbonylhydrolasen (vorzugsweise Subtilisin), die den Positionen +76, +99, +101, +103, +104, +107, +123, +27, +105, +109, +126, +128, +135, +156, +166, +195, +197, +204, +206, +210, +216, +217, +218, +222, +260, +265 und/oder +274 in Bacillus amyloliquefaciens entsprechen, wichtig für die proteolytische Aktivität, die Leistung und/oder die Stabilität dieser Enzyme und die Reinigungs- oder Wasch-

leistung solcher Variantenenzyme sind.

[0061] Das Nachfolgende wird als Beispiel für die Herstellung von Proteaseenzymen, die in den Zusammenfassungen der vorliegenden Erfindung geeignet sind, aufgeführt.

Proteaseherstellungsbeispiel

Konstruktion für die Expression des GG36-Gens in *B. subtilis*

[0062] Die Klonung und die Konstruktion für die Expression des Subtilisingens aus *B. lentus* werden im Wesentlichen auf dieselbe Weise durchgeführt wie in US-Patent 5,185,258 beschrieben. Das Plasmid GGA274 (in [Fig. 4](#) hierin beschrieben) wird ferner auf die folgende Weise modifiziert, wie in [Fig. 5](#) gezeigt. Die PstI-Stelle, die während der Konstruktion des Plasmids GGA274 eingeführt wird, wird durch die nachfolgend beschriebene Oligonukleotid-gerichtete Mutagenese mit einem Oligonukleotid mit der folgenden Sequenz entfernt: 5' GAAGCTGCAACTCGTTAAA 3' (Seq.-ID Nr. 1). Der unterstrichene Rest „A“ eliminiert die Erkennungssequenz des Restriktionsenzym PstI und ändert den entsprechenden Aminosäurerest an Position 274 von Alanin in Threonin. Threonin an Position 274 ist der Wildtyp-Rest, der ursprünglich in den geklonten Gensequenzen von *B. lentus*-Subtilisin zu finden war. Das DNA-Segment, das Subtilisin kodiert, wird durch EcoRI- und BamHI-Verdau aus dem Plasmid GGA274 oder dessen Derivaten (GGT274 in [Fig. 5](#) gezeigt) exzidiert. Das DNA-Fragment wird für die Mutagenese zurück in Vektoren, die auf dem Bakteriophagen M13 basieren, wie MP19, subklont. Nach der Mutagenese werden der EcoRI- und der HindIII-Verdau, gefolgt von Klonung, durchgeführt, um das mutierte Subtilisingen wieder in ein Expressionsplasmid wie GGA274 für die Expression und die Wiedergewinnung mutierter Subtilisinproteine zurückzuführen.

Oligonukleotid-gerichtete Mutagenese

[0063] Eine Oligonukleotid-gerichtete Mutagenese wird durchgeführt, wie in Zoller, M., et al. (1983), *Methods Enzymol.*, 100: 468-500, beschrieben. Als Beispiel wird ein synthetisches Oligonukleotid mit der Sequenz 5' GCTGCTCTAGACAATTCG 3' (Seq.-ID Nr. 2) verwendet, um den Aminosäurerest an Position 76 von Asparagin (N) in Asparaginsäure (D), oder N76D, zu ändern. Die unterstrichenen Reste „G“ und „C“ kennzeichnen Änderungen gegenüber der Wildtyp-Gensequenz. CA hält das Leucin an Position +75 und ändert die Aminosäuresequenz, um eine XbaI-Erkennungsregion des XbaI-Restriktionsenzym (TCTAGA) einzuführen, während durch die Änderung an GAC Asparagin an +76 in Aspartat geändert wird.

[0064] Für eine Mutagenese an den Positionen 99, 101, 103 und 104 können je nach der gewünschten Kombination von Mutationen verschiedene Oligonukleotide verwendet werden. Beispielsweise wird ein Oligonukleotid mit der Sequenz 5' GTATTAGGGGCGGACGGTCGAGGCGCCATCAGCTCGATT 3' (Seq.-ID Nr. 3) verwendet, um gleichzeitig die folgenden Änderungen vorzunehmen: S99D, S101R, S103A und V104I in einem einzigen Subtilisinmolekül. In ähnlicher Weise werden Oligonukleotide mit der Sequenz 5' TCAGGTT-CGGTCTCGAGCGTTGCCAAGGATTG 3' (Seq.-ID Nr. 4) und 5' CACGTTGCTAGCTTGAGTTTAG 3' (Seq.-ID Nr. 5) verwendet, um I107V bzw. N123S zu erzeugen. Die unterstrichenen Reste kennzeichnen wiederum Änderungen gegenüber den Wildtyp-Sequenzen, durch die gewünschte Änderungen von Aminosäuresequenzen oder Restriktionsenzym-Erkennungssequenzen erzielt werden.

Proteolytische Aktivität von Subtilisinvarianten

[0065] Unter Befolgung der vorstehenden Verfahren der Oligonukleotid-gerichteten Mutagenese werden die in Tabelle III aufgeführten Varianten hergestellt. Die proteolytische Aktivität dieser einzelnen Subtilisinvarianten ist in Tabelle III angegeben. Die kinetischen Parameter k_{cat} , K_M und k_{cat}/K_M werden für die Hydrolyse des synthetischen Peptidsubstrats Succinyl-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Phe-p-nitroanilid unter Anwendung des Verfahrens gemessen, das in P. Bonneau et al. (1991), *J. Am. Chem. Soc.*, Bd. 113, Nr. 3, S. 1030, beschrieben ist. Kurz gesagt, wird ein kleiner Aliquot der Stammlösung einer Subtilisinvariante in eine 1-cm-Küvette gegeben, die in 0,1 M Tris-HCL-Puffer, pH 8,6, gelöstes und auf 25°C thermostatisiertes Substrat enthält. Der Reaktionsfortschritt wird spektralphotometrisch durch Überwachung der Extinktion des Reaktionsprodukts p-Nitroanilin bei 410 nm verfolgt. Die kinetischen Parameter werden unter Anwendung eines Algorithmus für nichtlineare Regression erhalten, um die Reaktionsgeschwindigkeit und die Produktkonzentration für jede Reaktion an die Michaelis-Menten-Gleichung anzupassen.

Tabelle III

Kinetische Parameter k_{cat} , K_M und k_{cat}/K_M Gemessen für *Bacillus lentus* Subtilisin und Varianten

Protease Nr.	Enzymvarianten	$k_{\text{cat}}(\text{s}^{-1})$	$K_M(\text{M})$	$k_{\text{cat}}/K_M (\text{s}^{-1}\text{M}^{-1})$
-	B.-lentus-Subtilisin	170	0,00078	$2,18 \times 10^5$
-	N76D	219	0,0008	$2,74 \times 10^5$
1	N76D/S99D	88	0,00061	$1,44 \times 10^5$
2	N76D/S101R	371	0,0013	$2,85 \times 10^5$
3	N76D/S103A	400	0,0014	$2,86 \times 10^5$
4	N76D/V104I	459	0,0011	$4,17 \times 10^5$
5	N76D/I107V	219	0,0011	$1,99 \times 10^5$
6	N76D/N123S	115	0,0018	$6,40 \times 10^4$
7	N76D/S99D/S101R	146	0,00038	$3,84 \times 10^5$
8	N76D/S99D/S103A	157	0,0012	$1,31 \times 10^5$
9	N76D/S99D/V104I	247	0,00097	$2,55 \times 10^5$
10	N76D/S101R/S103A	405	0,00069	$5,90 \times 10^5$
11	N76D/S101R/V104I	540	0,00049	$1,10 \times 10^6$
12	N76D/S103A/V104I	832	0,0016	$5,20 \times 10^5$
13	N76D/V104I/I107V	497	0,00045	$1,10 \times 10^6$
14	N76D/V104Y/I107V	330	0,00017	$1,90 \times 10^6$
15	N76D/V104I/N123S	251	0,0026	$9,65 \times 10^4$
16	N76D/I107V/N123S	147	0,0035	$4,20 \times 10^4$
17	N76D/S99D/S101R/S103A	242	0,00074	$3,27 \times 10^5$
18	N76D/S99D/S101R/V104I	403	0,00072	$5,60 \times 10^5$
19	N76D/S99D/S103A/V104I	420	0,0016	$2,62 \times 10^5$
20	N76D/S101R/S103A/V104I	731	0,00065	$1,12 \times 10^6$
21	N76D/S103A/V104I/N123S	321	0,0026	$1,23 \times 10^5$
22	N76D/V104I/I107V/N123S	231	0,003	$7,70 \times 10^4$
23	N76D/S99D/S101R/S103A/V104I	624	0,00098	$6,37 \times 10^5$
24	N76D/S99D/S103A/V104I/N123S	194	0,0043	$4,51 \times 10^4$
25	N76D/S99D/S101R/S103A/V104I/N123S	311	0,0023	$1,35 \times 10^5$

[0066] Die in Tabelle III aufgeführten Ergebnisse lassen darauf schließen, dass alle getesteten Subtilisinvarianten proteolytische Aktivität beibehalten. Ferner macht eine detaillierte Analyse der Daten deutlich, dass die proteolytische Aktivität bei *Bacillus-lentus*-Subtilisin durch die verschiedenen Kombinationen von Substitutionen an Aminosäureresten, die zu den Positionen 76, 99, 101, 103, 104, 107 und 123 in *Bacillus amyloliquefaciens* äquivalent sind, erheblich verändert wird.

Wärmestabilität von Subtilisinvarianten

[0067] Ein Vergleich der beobachteten Wärmestabilität für *Bacillus-lentus*-Subtilisin und die Varianten der vorliegenden Erfindung, die durch das vorstehende Verfahren der Oligonukleotid-gerichteten Mutagenese hergestellt wurden, ist in Tabelle IV aufgeführt. Gereinigtes Enzym, 15 µg/ml in 0,1 M Glycin, 0,01% Tween-80, pH 10,0, mit oder ohne 50 mM CaCl_2 , wird in kleine Röhrchen aliquotiert und bei 10°C 5 Minuten lang, bei 10°C bis 60°C über 1 Minute und bei 60°C 20 Minuten lang inkubiert. Anschließend werden die Röhrchen 10 Minuten lang auf Eis gelegt. Aliquots aus den Röhrchen werden auf Enzymaktivität getestet, indem sie in 1-cm-Küvetten gegeben werden, die 1,2 mM des synthetischen Peptidsubstrats Succinyl-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Phe-p-nitroanilid, gelöst in 0,1 M Tris-HCL-Puffer, pH 8,6, thermostatiert auf 25°C, enthalten. Die anfängliche lineare Reaktionsgeschwindigkeit wird spektralphotometrisch durch Überwachung der Extinktion des Reaktionsprodukts p-Nitroanilin bei 410 nm als Funktion der Zeit verfolgt. Die Daten werden als prozentuale Aktivität vor dem Erhitzen angegeben. Die in Tabelle IV aufgeführten Ergebnisse lassen darauf schließen, dass unter der Testbedingung mit Zugabe von 50 mM CaCl_2 eine große Mehrzahl von Varianten eine Wärmestabilität zeigt, die mit *Bacillus-lentus*-Subtilisin vergleichbar ist (24 von 26). Unter der Testbedingung ohne Zugabe von 50 mM CaCl_2 ist eine große Mehrzahl von Varianten (19 von 26) wesentlich stabiler als *Bacillus-lentus*-Subtilisin. Ferner sind unter der Testbedingung ohne Zugabe von 50 mM CaCl_2 die Varianten N76D/S99D, N76D/V104I, N76D/S99D/V104I, N76D/S103A/V104I, N76D/V104I/I107V, N76D/V104Y/I107V und

N76D/S101R/S103A/V104I wesentlich stabiler als die Einzelsubstitutionsvariante N76D.

Tabelle IV

Gemessene Wärmestabilität für *Bacillus-lentus*-Subtilisin und Varianten

Bei pH 10, 60°C, +/- Zugabe von 50 mM CaCl₂

Enzym	Verbleibende anfängliche Aktivität (%)	
	-CaCl ₂	+CaCl ₂
B.-lentus-Subtilisin	2	96
N76D	34	97
N76D/S99D	49	98
N76D/S101R	0	82
N76D/S103A	26	92
N76D/V104I	58	98
N76D/I107V	32	96
N76D/N123S	0	97
N76D/S99D/S101R	30	100
N76D/S99D/S103A	36	100
N76D/S99D/V104I	48	97
N76D/S101R/S103A	26	100
N76D/S101R/V104I	38	100
N76D/S103A/V104I	58	100
N76D/V104I/I107V	60	97
N76D/V104Y/I107V	48	74
N76D/V104I/N123S	0	98
N76D/I107V/N123S	16	100
N76D/S99D/S101R/S103A	38	100
N76D/S99D/S101/V104I	33	100
N76D/S99D/S103A/V104I	38	98
N76D/S101R/S103A/V104I	40	99
N76D/S103A/V104I/N123S	1	98
N76D/V104I/I107V/N123S	3	99
N76D/S99D/S101R/S103A/V104I	36	99
N76D/S99D/S103A/V104I/N123S	2	95
N76D/S99D/S101R/S103A/V104I/N 123S	0	100

Oligonukleotid-gerichtete Mutagenese mit aus Phagemid erzeugter Einzelstrang-DNA-Vorlage

A. Konstruktion von B.-lentus-Varianten

[0068] Das Mutageneseprotokoll ist im Wesentlichen das gleiche wie vorstehend im Abschnitt über Oligonukleotid-gerichtete Mutagenese beschrieben. Die Einzelstrang-DNA-Vorlage wird durch das Phagemid-Verfahren erzeugt. Um den Phagemid-Vektor zur Erzeugung der Einzelstrang-DNA-Vorlage zu konstruieren, wird zunächst der Vektor pBCDAICAT konstruiert. Das Flussdiagramm für die Vektorkonstruktion ist in [Fig. 8](#) dargestellt. Zuerst wird das ClaI-ClaI-Fragment, welches das CAT-Gen aus dem Plasmid pC194 kodiert (Horinouchi, S., und Weisblum, B., J. Bacteriol., 150: 8-15, 1982) in die Accl-Stelle der Polylinker-Region von pUC19 (New England BioLabs, Beverly, MA) hineingeklont, um das Plasmid pUCCHL herzustellen, und das 0,6-kb-EcoRI-DraI-Fragment aus dem 5'-Ende der GG36DAI-kodierenden DNA wird in die Stellen EcoRI und EcoRV des Plasmids pBSKS (Stratagene, Inc., San Diego, CA) hineingeklont, um pBC2SK5 herzustellen. Die einzelne EcoRI-Stelle des Plasmids pBC2SK5 wird durch EcoRI-Verdauung eliminiert, gefolgt von Auffüllung mit T4-katalysierter DNA-Polymerase und Religation zur Erzeugung des Plasmids pBC2SK-5R, das nicht die EcoRI-Stelle aufweist. Das EcoRI-DraI-Fragment, das in pBCSK-5R hineingeklont wird, wird als ein PstI-HindIII-Fragment isoliert und in die PstI-HindIII-Stelle des pUCCHL (Teil des Polylinkers von pUC19) hineingeklont, um das Plasmid pUCCHL5R zu erzeugen. Die Kodierungssequenz des Gens GG36DAI wird als ein EcoRI-BamHI-Fragment exzidiert und in die EcoRI-BamHI-Stellen von pUCCHL5R hineingeklont, um pUCCAT herzustellen. Anschließend wird das große EcoRI-HindIII-Fragment von pUCCAT in die Stellen EcoRI und HindIII von BS2KS+ hineingeklont, um das Plasmid pBCDAICAT herzustellen.

[0069] Um Einzelstrang-DNA zu erzeugen, werden E.-coli-haltige pBCDAICAT nach dem Protokoll, das in Russel, M., Kidd, S., und Kelley, M. R., GENE 45: 333-338, 1986, beschrieben ist, mit dem Phagen R408 (erhältlich von Stratagene, San Diego, CA) infiziert. Sobald die Einzelstrang-DNA-Vorlage verfügbar ist, werden Standard-Mutageneseverfahren, wie vorstehend im Abschnitt über Oligonukleotid-gerichtete Mutagenese beschrieben, durchgeführt. Die Konstruktion bestimmter Mutanten wird nachfolgend zu Veranschaulichungszwecken ausführlich beschrieben.

[0070] Für die Konstruktion von *B. lentus* (GG36) N76D/S103A/V104I/L217H wird ein EcoRI-BamHI-DNA-Fragment, das GG36 N76D/S103A/V104I kodiert, bei der Konstruktion von pUCCAT (siehe [Fig. 8](#)) zur Erzeugung des Plasmids pBCDAICAT verwendet. Nachdem die Einzelstrang-DNA-Vorlage nach dem vorstehend beschriebenen Protokoll hergestellt wurde, wird ein Mutagenese-Primer mit der folgenden Sequenz

* * * * * x Clal

5' TAT GCC AGC CAC AAC GGT Ad T TCG ATG GCT 3' (Seq.-ID Nr. 13)

verwendet, um L217H herzustellen. Wie zuvor kennzeichnen die unterstrichenen Reste die Nukleotidänderungen, die vorgenommen werden, und x Clal weist daraufhin, dass die bestehende Clal-Stelle nach der Mutagenese eliminiert wird. Das Mutageneseprotokoll entspricht dem vorstehend im Abschnitt über Oligonukleotid-gerichtete Mutagenese beschriebenen. Nach der Mutagenese wird zunächst Plasmid-DNA auf die Eliminierung der Clal-Stelle hin gescreent, und diejenigen Klone, bei denen die Clal-Stelle fehlt, werden einer DNA-Sequenzanalyse unterzogen, um die DNA-Sequenz, welche die Änderung von L in H am 217. Aminosäurerest bewirkt hat, zu überprüfen.

B. Konstruktion von BPN'-Varianten und ihre Expression in *B. subtilis*

[0071] Die Konstruktion von *B. amyloliquefaciens* (BPN') N76D/Q103A/Y104I/Y217L wird in ähnlicher Weise durchgeführt, außer dass sie in zwei aufeinander folgenden Schritten erfolgt. Zuerst wird N76D in BPN' Y217L eingeführt, um BPN' N76D/Y217L herzustellen, und eine zweite Mutagenese wird durchgeführt, um BPN' N76D/Y217L in BPN' N76D/Q103A/Y104I/Y217L umzuwandeln. Zur Erzeugung der Einzelstrang-DNA-Vorlage für die erste Mutagenese wird ein EcoRI-BamHI-Fragment, das BPN' Y217L-Subtilisin kodiert (abgeleitet aus dem Y217L-Plasmid, das in Wells, J., et al., PNAS, 84, 5167, 1087, beschrieben ist), verwendet, um ein Plasmid pUCCATFNA zu konstruieren (siehe [Fig. 9](#)). Das Plasmid pUCCATFNA, das BPN' Y217L enthält, wird zur Konstruktion des Plasmids pBCFNACAT verwendet ([Fig. 9](#)). Einzelstrang-DNA wird erzeugt, wie vorstehend beschrieben. Um BPN' N76D/Y217L zu erzeugen, wird ein Oligonukleotid-Primer mit der Sequenz

* * * * * Xbal

5' C ACA GTT GCG GCT CTA GAT AAC TCA ATC GGT G 3' (Seq.-ID Nr. 14)

verwendet, um die Änderung N76D zu erzeugen. Anschließend wird Einzelstrang-DNA aus dem Plasmid pBCFNACAT, welches das BPN' N76D/Y217L enthält (das Plasmid pBCFNACAT nach N76D-Mutagenese) hergestellt und mit einem anderen Oligonukleotid mit der Sequenz

* * * * * x PvuII

5' GCT GAC GGT TCC GGC GCT ATT AGI TGG ATC ATT 3' (Seq.-ID Nr. 15)

mutagenisiert, um BPN' N76D/Q103A/Y104I/Y217L zu erhalten. Alle Schritte, die in die Klonung, die Herstellung von Einzelstrang-DNA, die Mutagenese und das Screening auf Mutanten eingeschlossen sind, werden wie vorstehend beschrieben durchgeführt. Die Expression des BPN'-Gens und seiner Varianten wird erreicht, indem Plasmid-DNA (pBCFNACAT, die das BPN'-Gen der verschiedenen Varianten enthält) direkt in einen proteasearmen Stamm von *Bacillus subtilis* integriert wird, wie in RE 34,606 beschrieben.

[0072] Zahlreiche Varianten werden gemäß den Lehren dieser Beispiele für die Proteaseherstellung hergestellt. Kinetische Daten und Stabilitätsdaten werden für solche Varianten generiert. Die kinetischen Daten werden unter Anwendung der vorstehend beschriebenen Verfahren generiert und sind in Tabelle V aufgeführt. Die Stabilitätsdaten werden generiert, wie hierin ausführlich beschrieben. Die Ergebnisse sind in Tabelle VI aufgeführt.

Wärmestabilitätstest-Verfahren

[0073] Gereinigtes Enzym wird einem Pufferaustausch in 0,1 M Glycin, pH 10,0, 0,01% Tween-80 unterzogen, indem das Enzym in eine Säule aus Sephadex G-25, das mit diesem Puffer äquilibriert ist, gegeben und unter Verwendung desselben Puffers aus der Säule eluiert wird.

[0074] Das einem Pufferaustausch unterzogene Enzym wird in ein Röhrchen gegeben, das 0,1 M Glycin, 0,01% Tween-80, pH 10,0, thermostatiert auf 60°C, enthält, um eine endgültige Enzymkonzentration von 15 µg/ml zu ergeben.

[0075] Aliquots werden zu verschiedenen Zeitpunkten aus der 60°C-Inkubation entfernt und sofort auf Enzymaktivität getestet, indem sie in eine 1-cm-Küvette gegeben werden, die 1,2 mM des synthetischen Peptidsubstrats Succinyl-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Phe-p-nitroanilid, gelöst in 0,1 M Tris-HCL-Puffer, pH 8,6, thermostatiert auf 25°C, enthält. Die anfängliche lineare Reaktionsgeschwindigkeit wird spektralphotometrisch durch Überwachung der Extinktion des Reaktionsprodukts p-Nitroanilin bei 410 nm als Funktion der Zeit verfolgt.

[0076] Die Halbwertszeit, bei der es sich um die Zeitdauer handelt, die für eine 50%ige Enzymdeaktivierung erforderlich ist, wird anhand des Diagramms erster Ordnung der Reaktionsgeschwindigkeit als Funktion der Inkubationszeit bei 60°C bestimmt.

[0077] Die Daten sind in Tabelle VI als Prozentsatz der Halbwertszeit aufgeführt, die für Bacillus-lentus-Subtilisin (GG36) unter identischen Bedingungen bestimmt wurde.

Tabelle V

Enzym	kcat (s^{-1})	KM (mM)	kcat/kM ($\text{s}^{-1}\text{M}^{-1}$)
B.-lentus-Subtilisin	170	0,78	2,20E + 05
N76D/S103G/V104I*	380	1,4	2,70E + 05
N76D/S103A/V104F	730	0,33	2,20E + 06
N76D/S103A/V104N	790	2,8	2,80E + 05

N76D/S103A/V104S	170	0,83	2,00E + 05
N76D/S103A/V104T	370	1,9	2,00E + 05
N76D/S103A/V104W	880	0,31	2,80E + 06
N76D/S103A/V104Y	690	0,5	1,40E + 06
K27R/N76D/V104Y/N123S	500	1,2	4,20E + 05
N76D/S101G/S103A/V104I*	620	1,3	4,80E + 05
N76D/S103A/V104I/S105A*	550	1,3	4,20E + 05
N76D/S103A/V104I/S105D*	440	1,7	2,60E + 05
N76D/S103A/V104T/I107A*	120	5,7	2,10E + 04
N76D/S103A/V104T/I107L*	310	3,2	9,70E + 04
N76D/S103A/V104I/L126A	90	2,2	4,10E + 04
N76D/S103A/V104I/L126F	180	1,9	9,50E + 04
N76D/S103A/V104I/L126I	100	2,4	4,20E + 04
N76D/S103A/V104I/L126V	64	3,2	2,00E + 04
N76D/S103A/V104I/S128G*	560	1,7	3,30E + 05
N76D/S103A/V104I/S128L*	430	3,8	1,10E + 05
N76D/S103A/V104I/L135A	140	0,76	1,80E + 05
N76D/S103A/V104I/L135F	390	0,69	5,70E + 05
N76D/S103A/V104I/L135I	110	0,73	1,50E + 05
N76D/S103A/V104I/L135V	140	0,86	1,60E + 05
N76D/S103A/V104I/S156E*	170	2,6	6,50E + 04
N76D/S103A/V104I/S166D*	160	3,5	4,60E + 04
N76D/S103A/V104I/D197E	510	1,4	3,60E + 05
N76D/S103A/V104I/N204A*	530	1,1	4,80E + 05
N76D/S103A/V104I/N204G*	580	1,4	4,10E + 05
N76D/S103A/V104I/N204C*	370	1,3	2,90E + 05
N76D/S103A/V104I/P210I*	500	1,2	4,20E + 05
N76D/S103A/V104I/L217H*	80	0,63	1,30E + 05
N76D/S103A/V104I/M222A	70	3,1	2,30E + 04
N76D/S103A/V104I/M222S	80	3,1	2,60E + 04
N76D/S103A/V104I/T260P	660	1,5	4,40E + 05
N76D/S103A/V104I/S265N	590	1,3	4,50E + 05
K27R/N76D/V104Y/I107V/N123S	220	1,4	1,60E + 05
K27R/N76D/V104V/N123S/D197E	430	1,1	3,90E + 05
K27R/N76D/V104Y/N123S/N204C	400	1,1	3,60E + 05
K27R/N76D/V104V/N123S/Q206L	440	1,2	3,70E + 05
K27R/N76D/V104Y/N123S/S216V	440	1,2	3,70E + 05
K27R/N76D/V104V/N123S/N218S	760	0,98	7,80E + 05
K27R/N76D/V104V/N123S/T260P	410	1,2	3,40E + 05
K27R/N76D/V104V/N123S/T274A	390	1	3,90E + 05
N76D/S103A/V104I/L126F/S265N	170	2,1	8,10E + 04
N76D/S103A/V104I/S156E/S 166D*	40	6,3	6,40E + 03
K27R/N76D/V104V/N123S/G195E/G197E	410	0,98	4,20E + 05
K27R/N76D/V104V/N123S/G195E/N218S	540	0,66	8,20E + 05
K27R/N76D/V104Y/N123S/D197E/N218S	770	0,79	9,80E + 05
K27R/N76D/V104Y/N123S/N204C/N218S	610	0,99	6,20E + 05
K27R/N76D/V104Y/N123S/Q206L/N218S	580	0,78	7,40E + 05
K27R/N76D/V104Y/N123S/N218S/T260P	660	1	6,60E + 05
K27R/N76D/V104Y/N123S/N218S/T274A	590	0,89	6,60E + 05
K27R/N76D/V104Y/Q109S/N123S/N218S/T274A	520	1	5,20E + 05
K27R/N76D/V104Y/N123S/G195E/D197E/N218S	460	0,65	7,10E + 05
B.-amyloliquefaciens-Subtilisin (BPN')	50	0,14	3,60E + 05
BPN'-N76D/Y217L*	380	0,46	8,30E + 05

* Diese Mutanten werden gemäß Oligonukleotid-gerichteter Mutagenese mit aus Phagemid erzeugter Einzelstrang-DNA-Vorlage hergestellt, alle anderen werden gemäß vorstehender Oligonukleotid-gerichteter Mutagenese hergestellt.

Tabelle VI

Enzym	Wärmestabilität (Halbwertszeit des nativen Enzyms in %)
B.-lentus-Subtilisin	100
N76D	590
N76D/S99D	840
N76D/S103A	390
N76D/V104I	660
N76D/I107V	710
N76D/N123S	70
N76D/S99D/S101R	610
N76D/S99D/S103A	590
N76D/S99D/V104I	910
N76D/S101R/S103A	930
N76D/S101R/V104I	500
N76D/S103A/V104I	460
N76D/S103G/V104I*	370
N76D/S103A/V104F	480
N76D/S103A/V104N	230
N76D/S103A/V104S	230
N76D/S103A/V104T	370
N76D/S103A/V104W	280
N76D/S103A/V104Y	400
N76D/V104I/I107V	940
N76D/V104Y/I107V	820
N76D/V104I/N123S	80
N76D/I107V/N123S	150
K27R/N76D/V104Y/N123S	100
N76D/S99D/S101R/S103A	570
N76D/S99D/S101R/V104I	1000
N76D/S99D/S103A/V104I	680
N76D/S101G/S103A/V104I*	390
N76D/S101R/S103A/V104I	470
N76D/S103A/V104I/S105A*	360

N76D/S103A/V104I/S105D*	370
N76D/S103A/V104T/I107A*	270
N76D/S103A/V104T/I107L*	230
N76D/S103A/V104I/N123S	110
N76D/V104I/I107V/N123S	220
N76D/S103A/V104I/L126A	270
N76D/S103A/V104I/L126F	950
N76D/S103A/V104I/L126I	410
N76D/S103A/V104I/L126V	320
N76D/S103A/V104I/S128G*	640
N76D/S103A/V104I/S128L*	760
N76D/S103A/V104I/L135A	230
N76D/S103A/V104I/L135F	200
N76D/S103A/V104I/L135I	510
N76D/S103A/V104I/L135V	500
N76D/S103A/V104I/S156E*	120
N76D/S103A/V104I/S166D*	590
N76D/S103A/V104I/D197E	460
N76D/S103A/V104I/N204A*	230
N76D/S103A/V104I/N204G*	240
N76D/S103A/V104I/N204C*	500
N76D/S103A/V104I/P210I*	1370
N76D/S103A/V104I/L217H*	60
N76D/S103A/V104I/M222A	520
N76D/S103A/V104I/M222S	490
N76D/S103A/V104I/T260P	490
N76D/S103A/V104I/S265N	360
K27R/N76D/V104Y/I107V/N123S	210
K27R/N76D/V104Y/N123S/D197E	120
K27R/N76D/V104Y/N123S/N204C	110
K27R/N76D/V104Y/N123S/Q206L	380
K27R/N76D/V104Y/N123S/S216V	140
IC27R/N76D/V104Y/N123S/N218S	270
K27R/N76D/V104V/N123S/T260P	40
K27R/N76D/V104Y/N123S/T274A	60
N76D/S99D/S101R/S103A/V104I	590
N76D/S99D/S103A/V104I/N123S	110
N76D/S103A/V104I/L126F/S265N	810
N76D/S103A/V104I/S156E/S166D*	220
K27R/N76D/V104Y/N123S/G195E/G197E	90
K27R/N76D/V104Y/N123S/G195E/N218S	250
K27R/N76D/V104Y/N123S/D197E/N218S	270
K27R/N76D/V104Y/N123S/N204C/N218S	460
K27R/N76D/V104Y/N123S/Q206L/N218S	1400
K27R/N76D/V104Y/N123S/N218S/T260P	310
IC27R/N76D/V104Y/N123S/N218S/T274A	180
N76D/S99D/S101R/S103A/V104I/N123S	90
K27R/N76D/V104Y/Q109S/N123S/N218S/T274A	230
K27R/N76D/V104Y/N123S/G195E/D197E/N218S	240
B.-amyloliquefaciens-Subtilisin (BPN')	100
BPN'-N76D/Y217L*	420

* Diese Mutanten werden gemäß Oligonukleotid-gerichteter Mutagenese mit aus Phagemid erzeugter Einzelstrang-DNA-Vorlage hergestellt, alle anderen werden gemäß vorstehender Oligonukleotid-gerichteter Mutagenese hergestellt.

2. Reinigungszusammensetzungsmaterialien:

[0078] Die Reinigungszusammensetzungen der vorliegenden Erfindung umfassen außerdem zusätzlich zu dem vorstehend beschriebenen Proteaseenzym ein oder mehrere mit dem Proteaseenzym verträgliche

Reinigungszusammensetzungsmaterialien. Der Ausdruck „Reinigungszusammensetzungsmaterialien“, wie hier verwendet, bedeutet ein beliebiges flüssiges, festes oder gasförmiges Material, das für die gewünschte bestimmte Art von Reinigungszusammensetzung und die Form des Produkts (z. B. Flüssigkeit, Granalie, Sprühzusammensetzung) ausgewählt wird, wobei die Materialien auch mit dem in der Zusammensetzung verwendeten Proteaseenzym verträglich sind. Die spezifische Auswahl von Reinigungszusammensetzungsmaterialien erfolgt auf einfache Weise, indem die zu reinigende Oberfläche oder der zu reinigende Gegenstand oder textile Stoff und die gewünschte Form der Zusammensetzung für die Reinigungsbedingungen während der Verwendung (z. B. während der Waschmittelverwendung) berücksichtigt werden. Der Ausdruck „verträglich“, wie hier verwendet, bedeutet, dass die Reinigungszusammensetzungsmaterialien die proteolytische Aktivität des Proteaseenzyms nicht in einem solchen Maße verringern, dass die Protease in Situationen des normalen Gebrauchs nicht wie gewünscht wirksam ist. Spezifische Reinigungszusammensetzungsmaterialien sind nachfolgend ausführlich beispielhaft beschrieben.

[0079] Eine wirksame Menge eines oder mehrerer der vorstehend beschriebenen Proteaseenzyme ist in Zusammensetzungen eingeschlossen, die zum Reinigen einer Vielfalt an Oberflächen geeignet ist, bei denen proteinhaltige Flecken entfernt werden müssen. Solche Reinigungszusammensetzungen umfassen Reinigungsmittelzusammensetzungen zum Reinigen harter Oberflächen in uneingeschränkter Form (z. B. flüssig und granulös), Waschmittelzusammensetzungen zum Reinigen von Textilien in uneingeschränkter Form (z. B. granulöse, flüssige und stückförmige Formulierungen), Geschirrspülzusammensetzungen (in uneingeschränkter Form), Mundreinigungszusammensetzungen in uneingeschränkter Form (z. B. Zahncreme-, Zahnpasta- und Mundspülformulierungen) und Zahnprothesenreinigungszusammensetzungen in uneingeschränkter Form (z. B. Flüssigkeit, Tablette). Wie hier verwendet, bezieht sich „wirksame Menge an Proteaseenzym“ auf die Menge an vorstehend beschriebenem Proteaseenzym, die erforderlich ist, um die in der spezifischen Reinigungszusammensetzung erforderliche enzymatische Aktivität zu erzielen. Solche wirksamen Mengen werden vom Fachmann ohne weiteres ermittelt und basieren auf zahlreichen Faktoren, wie der verwendeten speziellen Enzymvariante, der Reinigungsanwendung, der spezifischen Zusammensetzung der Reinigungszusammensetzung und darauf, ob eine flüssige oder trockene (z. B. granulöse, stückförmige) Zusammensetzung benötigt wird, und dergleichen.

[0080] Vorzugsweise umfassen die Reinigungszusammensetzungen der vorliegenden Erfindung von etwa 0,0001% bis etwa 10% ein oder mehrere Proteaseenzyme, mehr bevorzugt von etwa 0,001% bis etwa 1%, noch mehr bevorzugt von etwa 0,001% bis etwa 0,1%. Mehrere Beispiele für verschiedene Reinigungszusammensetzungen, in denen die Proteaseenzyme eingesetzt werden können, werden nachfolgend ausführlicher besprochen. Alle hierin verwendeten Anteile, Prozentangaben und Verhältnisse sind auf das Gewicht bezogen, sofern nicht anders angegeben.

[0081] Wie hier verwendet, umfassen „Reinigungszusammensetzungen für andere Oberflächen als Textilien“ Reinigungszusammensetzungen für harte Oberflächen, Geschirrspülzusammensetzungen, Mundreinigungszusammensetzungen, Zahnprothesenreinigungszusammensetzungen und Körperreinigungszusammensetzungen.

A. Reinigungszusammensetzungen für harte Oberflächen, Geschirr und Textilien

[0082] Die Proteaseenzyme können in einer beliebigen Reinigungsmittelzusammensetzung verwendet werden, bei der eine starke Schäumung und/oder eine gute Entfernung von unlöslichem Substrat gewünscht werden. Somit können die Proteaseenzyme mit verschiedenen herkömmlichen Bestandteilen verwendet werden, um vollständig formulierte Reiniger für harte Oberflächen, Geschirrspülzusammensetzungen, Zusammensetzungen zum Waschen von Textilien und dergleichen bereitzustellen. Solche Zusammensetzungen können in Form von Flüssigkeiten, Granalien, Stückformen und dergleichen vorliegen. Solche Zusammensetzungen können als moderne „konzentrierte“ Reinigungsmittel, die eine so hohe Menge wie 30 Gew.-% bis 60 Gew.-% Tenside enthalten, formuliert werden.

[0083] Die vorliegenden Reinigungszusammensetzungen können wahlweise, und vorzugsweise, verschiedene anionische, nichtionische, zwitterionische usw. Tenside enthalten. Solche Tenside sind typischerweise in Konzentrationen von etwa 0,1% bis etwa 60%, vorzugsweise von etwa 1% bis etwa 35% der Zusammensetzungen vorhanden.

[0084] Nichteinschränkende Beispiele für hierin geeignete Tenside umfassen die herkömmlichen C_{11} - C_{18} -Alkylbenzolsulfonate und primären und statistischen Alkylsulfate, die sekundären (2,3) C_{10} - C_{18} -Alkylsulfate der Formeln $CH_3(CH_2)_x(CHOSO_3^-M^+)CH_3$ und $CH_3(CH_2)_y(CHOSO_3^-M^+)CH_2CH_3$, worin x und (y + 1) ganze Zahlen

von mindestens etwa 7, vorzugsweise mindestens etwa 9 sind und M ein wasserlöslich machendes Kation, besonders Natrium, ist, die C₁₀-C₁₈-Alkylalkoxysulfate (besonders EO 1-7-Ethoxysulfate), C₁₀-C₁₈-Alkylalkoxycarboxylate (besonders die EO 1-7-Ethoxycarboxylate), die C₁₀-C₁₈-Alkylpolyglycoside und ihre entsprechenden sulfatierten Polyglycoside, alphasulfonierte C₁₂-C₁₈-Fettsäureester, C₁₂-C₁₈-Alkyl- und -Alkylphenolalkoxylate (besonders Ethoxylate und gemischtes Ethoxy/Propoxy), C₁₂-C₁₈-Betaine und -Sulfobetaine („Sultaine“), C₁₀-C₁₈-Aminoxide, C₈-C₂₄-Sarcosinate (besonders Oleoylsarcosinat) und dergleichen. Die Alkylalkoxysulfate (AES) und Alkylalkoxycarboxylate (ABC) sind hierin bevorzugt. (Die Verwendung solcher Tenside in Kombination mit den oben erwähnten Aminoxid- und/oder Betain- oder Sultaintensiden ist je nach den Wünschen des Herstellers ebenfalls bevorzugt.) Andere herkömmliche geeignete Tenside sind in Standardtexten aufgeführt. Besonders geeignete Tenside schließen die C₁₀-C₁₈-N-Methylglucamide ein, die in US-Patent 5,194,639, Connor et al., erteilt am 16. März 1993, durch Bezugnahme hierin eingeschlossen, offenbart sind.

[0085] Besonders geeignet ist die Klasse der nichtionischen Tenside, die Kondensate von Ethylenoxid mit einer hydrophoben Einheit sind, um ein Tensid mit einem durchschnittlichen Hydrophil-Lipophil-Gleichgewicht (HLB) im Bereich von 5 bis 17, vorzugsweise von 6 bis 14, mehr bevorzugt von 7 bis 12 bereitzustellen. Die hydrophobe (lipophile) Einheit kann aliphatische oder aromatische Eigenschaften aufweisen, und die Länge der Polyoxyethylengruppe, die mit einer beliebigen bestimmten hydrophoben Gruppe kondensiert wird, kann ohne weiteres eingestellt werden, um eine wasserlösliche Verbindung mit dem gewünschten Maß an Gleichgewicht zwischen hydrophilen und hydrophoben Elementen zu ergeben. Besonders bevorzugt sind die primären C₉-C₁₅-Alkoholethoxylate (oder gemischtes Ethoxy/Propoxy) mit 3-8 Mol Ethylenoxid pro Mol Alkohol, besonders die primären C₁₄-C₁₅-Alkohole mit 6-8 Mol Ethylenoxid pro Mol Alkohol, die primären C₁₂-C₁₅-Alkohole mit 3-5 Mol Ethylenoxid pro Mol Alkohol und Mischungen davon.

[0086] Eine große Vielfalt an anderen Bestandteilen, die in Reinigungsmittelzusammensetzungen geeignet sind, können in die vorliegenden Zusammensetzungen eingeschlossen werden, einschließlich anderer aktiver Bestandteile, Träger, hydrotroper Verbindungen, Verarbeitungshilfsmittel, Farbstoffe oder Pigmente, Lösungsmittel für flüssige Formulierungen usw. Wenn eine weitere Zunahme der Schäumung gewünscht wird, können Schaumverstärker wie die C₁₀-C₁₆-Alkolamide in die Zusammensetzungen eingeschlossen werden, typischerweise in Konzentrationen von etwa 1% bis etwa 10%. Die C₁₀-C₁₄-Monoethanol- und -Diethanolamide veranschaulichen eine typische Klasse solcher Schaumverstärker. Die Verwendung solcher Schaumverstärker mit stark schäumenden Zusatztensiden wie den oben genannten Aminoxiden, Betainen und Sultainen ist ebenfalls vorteilhaft. Falls gewünscht, können lösliche Magnesiumsalze wie MgCl₂, MgSO₄ und dergleichen in Konzentrationen von typischerweise von etwa 0,1% bis etwa 2% hinzugegeben werden, um für zusätzliche Schäumung zu sorgen.

[0087] Die vorliegenden flüssigen Reinigungsmittelzusammensetzungen können Wasser und andere Lösungsmittel als Träger enthalten. Niedermolekulare primäre oder sekundäre Alkohole, für die Methanol, Ethanol, Propanol und Isopropanol Beispiele sind, sind geeignet. Einwertige Alkohole werden für lösungsvermittelnde Tenside bevorzugt, jedoch können Polyole, wie diejenigen mit etwa 2 bis etwa 6 Kohlenstoffatomen und etwa 2 bis etwa 6 Hydroxygruppen (z. B. 1,3-Propandiol, Ethylenglycol, Glycerin und 1,2-Propandiol), ebenfalls verwendet werden. Die Zusammensetzungen können von etwa 5% bis etwa 90%, typischerweise von etwa 10% bis etwa 50% solche Träger enthalten.

[0088] Die vorliegenden Reinigungsmittelzusammensetzungen werden vorzugsweise so formuliert, dass während des Gebrauchs in wässrigen Reinigungsvorgängen das Waschwasser einen pH-Wert zwischen etwa 6,8 und etwa 11,0 aufweist. Endprodukte werden daher in der Regel in diesem Bereich formuliert. Verfahren zum Regulieren des pH-Werts bei empfohlenen Gebrauchskonzentrationen schließen die Verwendung von Puffer, Alkalien, Säuren usw. ein und sind Fachleuten wohl bekannt.

[0089] Beim Formulieren der Reinigungszusammensetzungen für harte Oberflächen und Textilreinigungszusammensetzungen der vorliegenden Erfindung kann der Hersteller nach Belieben verschiedene Builder in Konzentrationen von etwa 5 Gew.-% bis etwa 50 Gew.-% einsetzen. Typische Builder schließen die Zeolithe von 1-10 Mikrometern, Polycarboxylate wie Citrat und Oxydisuccinate, Schichtsilicate, Phosphate und dergleichen ein. Andere herkömmliche Builder sind in Standard-Formelbüchern aufgeführt.

[0090] Ebenso kann der Hersteller nach Belieben verschiedene zusätzliche Enzyme wie Cellulasen, Lipasen, Amylasen, Peroxidasen und Proteasen in solchen Zusammensetzungen einsetzen, typischerweise in Konzentrationen von etwa 0,001 Gew.-% bis etwa 1 Gew.-%. Verschiedene Reinigungs- und Textilpflegeenzyme sind im Stand der Technik für Wäschewaschmittel wohl bekannt.

[0091] Verschiedene Bleichmittelverbindungen, wie die Percarbonate, Perborate und dergleichen, können in solchen Zusammensetzungen verwendet werden, typischerweise in Konzentrationen von etwa 1 Gew.-% bis etwa 15 Gew.-%. Falls gewünscht, können solche Zusammensetzungen auch Bleichaktivatoren wie Tetraacetylenylendiamin, Nonanoyloxybenzolsulfonat und dergleichen enthalten, die ebenfalls im Stand der Technik bekannt sind. Die Gebrauchskonzentrationen liegen in der Regel im Bereich von etwa 1 Gew.-% bis etwa 10 Gew.-%.

[0092] Verschiedene Schmutzabweisemittel, besonders vom anionischen Oligoester-Typ, verschiedene Chelatbildner, besonders die Aminophosphonate und Ethylendiamindisuccinate, verschiedene Tonschmutzentfernungsmittel, besonders ethoxyliertes Tetraethylenpentamin, verschiedene Dispergiermittel, besonders Polyacrylate und Polyaspartate, verschiedene Aufheller, besonders anionische Aufheller, verschiedene Farbstoffübertragungshemmer, wie Polyvinylpyrrolidon, verschiedene Schaumunterdrücker, besonders Silikone und sekundäre Alkohole, verschiedene Textilweichmacher, besonders Smectittone und Tonflockungspolymere (z. B. Poly(oxyethylen)) und dergleichen können alle in Konzentrationen im Bereich von etwa 1 Gew.-% bis etwa 35 Gew.-% in solchen Zusammensetzungen verwendet werden. Standard-Formelbücher und veröffentlichte Patente enthalten viele ausführliche Beschreibungen solcher herkömmlichen Materialien.

[0093] Enzymstabilisatoren können in den Reinigungszusammensetzungen der vorliegenden Erfindung ebenfalls verwendet werden. Solche Enzymstabilisatoren umfassen Propylenglycol (vorzugsweise von etwa 1% bis etwa 10%), Natriumformiat (vorzugsweise von etwa 0,1% bis etwa 1%) und Calciumformiat (vorzugsweise von etwa 0,1% bis etwa 1%).

1. Reinigungszusammensetzungen für harte Oberflächen

[0094] Wie hier verwendet, bezieht sich „Reinigungszusammensetzung für harte Oberflächen“ auf flüssige und granulöse Reinigungsmittelzusammensetzungen zur Reinigung harter Oberflächen wie Fußböden, Wänden, Badezimmerfliesen und dergleichen. Erfindungsgemäße Reinigungszusammensetzungen für harte Oberflächen umfassen eine wirksame Menge eines oder mehrerer Proteaseenzyme, vorzugsweise von etwa 0,0001 Gew.-% bis etwa 10 Gew.-%, mehr bevorzugt von etwa 0,001 Gew.-% bis etwa 5 Gew.-%, noch mehr bevorzugt von etwa 0,001 Gew.-% bis etwa 1 Gew.-% der Zusammensetzung aktives Proteaseenzym. Zusätzlich dazu, dass sie ein oder mehrere Proteaseenzyme umfassen, umfassen solche Reinigungszusammensetzungen für harte Oberflächen in der Regel ein Tensid und einen wasserlöslichen maskierenden Builder. In bestimmten Spezialprodukten wie Scheibenreinigersprays werden die Tenside jedoch mitunter nicht verwendet, da sie einen film-/streifenartigen Rückstand auf der Glasoberfläche erzeugen können.

[0095] Der Tensidbestandteil, wenn vorhanden, kann eine so geringe Menge wie 0,1% der vorliegenden Zusammensetzungen umfassen, jedoch enthalten die Zusammensetzungen in der Regel von etwa 0,25% bis etwa 10%, mehr bevorzugt von etwa 1% bis etwa 5% Tensid.

[0096] In der Regel enthalten die Zusammensetzungen von etwa 0,5% bis etwa 50% einen Reinigungsbuilder, vorzugsweise von etwa 1% bis etwa 10%. Der pH-Wert sollte vorzugsweise im Bereich von etwa 8 bis 12 liegen. Herkömmliche pH-Wert-Regler wie Natriumhydroxid, Natriumcarbonat oder Salzsäure können verwendet werden, wenn eine Einstellung notwendig ist.

[0097] Lösungsmittel können in die Zusammensetzungen eingeschlossen werden. Geeignete Lösungsmittel umfassen, ohne jedoch darauf beschränkt zu sein, Glycolether, wie Diethylenglycolmonohexylether, Diethylenglycolmonobutylether, Ethylenglycolmonobutylether, Ethylenglycolmonohexylether, Propylenglycolmonobutylether, Dipropylenglycolmonobutylether, und Diole, wie 2,2,4-Trimethyl-1,3-pentandiol und 2-Ethyl-1,3-hexandiol. Wenn solche Lösungsmittel verwendet werden, sind sie in der Regel in Konzentrationen von etwa 0,5% bis etwa 15%, vorzugsweise von etwa 3% bis etwa 11% vorhanden.

[0098] Außerdem können stark flüchtige Lösungsmittel wie Isopropanol oder Ethanol in den vorliegenden Zusammensetzungen verwendet werden, um eine schnellere Verdampfung der Zusammensetzung von Oberflächen zu erleichtern, wenn die Oberfläche nach Auftragen der Zusammensetzung „in voller Stärke“ auf die Oberfläche nicht abgespült wird. Wenn flüchtige Lösungsmittel verwendet werden, sind sie in der Regel in Konzentrationen von etwa 2% bis etwa 12% in den Zusammensetzungen vorhanden.

[0099] Die Ausführungsform der Reinigungszusammensetzung für harte Oberflächen der vorliegenden Erfindung wird durch die folgenden nichteinschränkenden Beispiele veranschaulicht. (In den folgenden Beispielen verweist der Bezug auf „Protease Nr.“ in den Beispielen auf die in den Zusammensetzungen der vorliegenden

Erfindung geeignete Variante mit der jeweiligen Nummer in der vorstehenden Tabelle III.)

Beispiele 1-6

[0100]

Flüssige Reinigungszusammensetzungen für harte Oberflächen

	Beispiel Nr.					
Bestandteil	1	2	3	4	5	6
Protease Nr. 12	0,05	0,20	0,02	0,03	0,10	0,03
Protease Nr. 4	-	-	-	-	0,20	0,02
EDTA**	-	-	2,90	2,90	-	-
Na-Citrat	-	-	-	-	2,90	2,90
NaC ₁₂ -Alkylbenzol-sulfonat	1,95	-	1,95	-	1,95	-
NaC ₁₂ -Alkylsulfat	-	2,20	-	2,20	-	2,20
NaC ₁₂ -(Ethoxy)-*** sulfa	-	2,20	-	2,20	-	2,20
Na-Cumol-sulfonat	1,30	-	1,30	-	1,30	-
Hexylcarbital***	6,30	6,30	6,30	6,30	6,30	6,30
Wasser****	ad 100%					

** Na₄-Ethylendiarnidessigsäure

*** Diethylenglycolmonohehexylether

**** Alle Formulierungen auf pH 7 eingestellt

[0101] In den Beispielen 1-4 wird Protease Nr. 12 durch die in Tabelle III aufgeführten Proteasen Nr. 1-11 und 13-25, neben anderen, einschließlich der in den Tabellen V und VI beschriebenen zusätzlichen Proteasen, die in der vorliegenden Erfindung geeignet sind, mit im Wesentlichen ähnlichen Ergebnissen substituiert.

[0102] In den Beispielen 5 und 6 werden Protease Nr. 12 und Protease Nr. 4 durch eine beliebige Kombination der in den Tabellen III, V und VI aufgeführten, in der vorliegenden Erfindung geeigneten Proteaseenzyme, neben anderen, mit im Wesentlichen ähnlichen Ergebnissen substituiert.

Beispiele 7-12

[0103]

Sprühzusammensetzungen zur Reinigung harter Oberflächen und Entfernung von Haushaltsschimmel

	Beispiel Nr.					
Bestandteil	7	8	9	10	11	12
Protease Nr. 12	0,20	0,05	0,10	0,30	0,20	0,30
Protease Nr. 4	-	-	-	-	0,30	0,10
Natriumoc-tylsulfat	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Natriumdo-decylsulfat	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
Natriumhyd-oxid	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80
Silicat (Na)	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
Duftstoff	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35
Wasser	ad 100%					

[0104] Der Produkt-pH-Wert beträgt etwa 7.

[0105] In den Beispielen 7-10 wird Protease Nr. 12 durch die in Tabelle III aufgeführten Proteasen Nr. 1-11 und 13-25, neben anderen, einschließlich der in den Tabellen V und VI beschriebenen zusätzlichen Proteasen, die in der vorliegenden Erfindung geeignet sind, mit im Wesentlichen ähnlichen Ergebnissen substituiert.

[0106] In den Beispielen 11 und 12 werden Protease Nr. 12 und Protease Nr. 4 durch eine beliebige Kombination der in den Tabellen III, V und VI aufgeführten, in der vorliegenden Erfindung geeigneten Proteaseenzyme, neben anderen, mit im Wesentlichen ähnlichen Ergebnissen substituiert.

2. Geschirrspülzusammensetzungen

[0107] In einer anderen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfassen Geschirrspülzusammensetzungen ein oder mehrere Proteaseenzyme. Wie hier verwendet, bezieht sich „Geschirrspülzusammensetzung“ auf alle Formen für Zusammensetzungen zur Reinigung von Geschirr, einschließlich, jedoch nicht beschränkt auf, granulöse und flüssige Formen. Die Ausführungsform der Geschirrspülzusammensetzung der vorliegenden Erfindung wird durch die folgenden Beispiele veranschaulicht.

Beispiele 13-18

[0108]

Geschirrspulzusammensetzung

	Beispiel Nr.					
Bestandteil	13	14	15	16	17	18
Protease Nr. 12	0,05	0,50	0,02	0,40	0,10	0,03
Protease Nr. 4	-	-	-	-	0,40	0,02
C ₁₂ -C ₁₄ -N-Methylglucamid	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90
C ₁₂ -Ethoxy-(1)-sulfat	12,00	12,00	12,00	12,00	12,00	12,00
2-Methylundecansäure	4,50	4,50	-	4,50	4,50	-
C ₁₂ -Ethoxy-(2)-carboxylat	4,50	4,50	4,50	4,50	4,50	4,50
C ₁₂ -Alkoholethoxylat (4)	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
C ₁₂ -Aminoxid	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
Natriumcumolsulfonat	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Ethanol	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
Mg ⁺⁺ (als MgCl ₂)	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
Ca ⁺⁺ (als CaCl ₂)	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
Wasser	ad 100%					

[0109] Der Produkt-pH-Wert wird auf 7 eingestellt.

[0110] In den Beispielen 13-16 wird Protease Nr. 12 durch die in Tabelle III aufgeführten Proteasen Nr. 1-11 und 13-25, neben anderen, einschließlich der in den Tabellen V und VI beschriebenen zusätzlichen Proteasen, die in der vorliegenden Erfindung geeignet sind, mit im Wesentlichen ähnlichen Ergebnissen substituiert.

[0111] In den Beispielen 17 und 18 werden Protease Nr. 12 und Protease Nr. 4 durch eine beliebige Kombination der in den Tabellen III, V und VI aufgeführten, in der vorliegenden Erfindung geeigneten Proteaseenzyme, neben anderen, mit im Wesentlichen ähnlichen Ergebnissen substituiert.

Beispiel 19

[0112]

Granulöse Maschinen-Geschirrspülzusammensetzung

Bestandteil	A	B	C
Citronensäure	15,0	-	-
Citrat	4,0	29,0	15,0
Acrylat/Methacrylat-Co-polymer	6,0	-	-
Acrylsäure/Maleinsäure-Copolymer	-	3,7	-
Trockenzusatz-Carbonat	9,0	-	20,0
Alkalimetallsilicat	8,5	17,0	9,0
Paraffin	-	0,5	-
Benzotriazol	-	0,3	-
Termamyl 60T	1,5	1,5	1,0
Protease Nr. 12 (4,6% Prill)	1,6	1,6	1,6
Percarbonat (AvO)	1,5	-	-
Perboratmonohydrat	-	0,3	1,5
Perborattetrahydrat	-	0,9	-
Tetraacetylenhydramin	3,8	4,4	-
Diethylentriaminpentamethylphosphonsäure (Mg-Salz)	0,13	0,13	0,13
Alkylethoxysulfat – 3-fach ethoxyliert	3,0	-	-
Nichtionisches Alkylethoxypropoxy-Tensid	-	1,5	-
Schaumunterdrücker	2,0	-	-
Nichtionisches Tensid	-	-	2,0
Olin SLF18			
Sulfat	ad 100%		

[0113] In den Beispielen 19 A-C wird Protease Nr. 12 durch die in Tabelle III aufgeführten Proteasen Nr. 1-11 und 13-25, neben anderen, einschließlich der in den Tabellen V und VI beschriebenen zusätzlichen Proteasen, die in der vorliegenden Erfindung geeignet sind, mit im Wesentlichen ähnlichen Ergebnissen substituiert. Außerdem wird in den Beispielen 19 A-C Protease Nr. 12 durch eine beliebige Kombination der in den Tabellen III, V und VI aufgeführten, in der vorliegenden Erfindung geeigneten Proteasen, neben anderen, mit im Wesentlichen ähnlichen Ergebnissen substituiert.

3. Textilreinigungszusammensetzungen

[0114] In einer anderen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfassen Textilreinigungszusammensetzungen ein oder mehrere Proteaseenzyme. Wie hier verwendet, bezieht sich „Textilreinigungszusammensetzung“ auf alle Formen für Waschmittelzusammensetzungen zur Reinigung von Textilien, einschließlich, jedoch nicht beschränkt auf, granulöse Formen, flüssige Formen und Stückformen.

a. Granulöse Textilreinigungszusammensetzungen

[0115] Die granulösen Textilreinigungszusammensetzungen der vorliegenden Erfindung enthalten eine wirksame Menge eines oder mehrerer Proteaseenzyme, vorzugsweise von etwa 0,001 Gew.-% bis etwa 10 Gew.-%, mehr bevorzugt von etwa 0,005 Gew.-% bis etwa 5 Gew.-%, mehr bevorzugt von etwa 0,01 Gew.-% bis etwa 1 Gew.-% der Zusammensetzung aktives Proteaseenzym. Zusätzlich zu einem oder mehreren Proteaseenzymen umfassen die granulösen Textilreinigungszusammensetzungen in der Regel mindestens ein Tensid, einen oder mehrere Builder und, in einigen Fällen, ein Bleichmittel.

[0116] Die Ausführungsform der granulösen Textilreinigungszusammensetzung der vorliegenden Erfindung wird durch die folgenden Beispiele veranschaulicht.

[0117]

Granulöse Textilreinigungszusammensetzung

	Beispiel Nr.			
Bestandteil	20	21	22	23
Protease Nr. 12 (4% Prill)	0,10	0,20	0,03	0,05
Protease Nr. 4 (4% Prill)	-	-	0,02	0,05
Lineares C ₁₃ -Alkylbenzolsulfonat	22,00	22,00	22,00	22,00
Phosphat (als Natrium-tripolyphosphate)	23,00	23,00	23,00	23,00
Natriumcarbonat	23,00	23,00	23,00	23,00
Natriumsilicat	14,00	14,00	14,00	14,00
Zeolith	8,20	8,20	8,20	8,20
Chelant (Diethylentriamin-pentaessigsäure)	0,40	0,40	0,40	0,40
Natriumsulfat	5,50	5,50	5,50	5,50
Wasser	ad 100%			

[0118] In den Beispielen 20-21 wird Protease Nr. 12 durch die in Tabelle III aufgeführten Proteasen Nr. 1-11 und 13-25, neben anderen, einschließlich der in den Tabellen V und VI beschriebenen zusätzlichen Proteasen, die in der vorliegenden Erfindung geeignet sind, mit im Wesentlichen ähnlichen Ergebnissen substituiert.

[0119] In den Beispielen 22 und 23 werden Protease Nr. 12 und Protease Nr. 4 durch eine beliebige Kombination der in den Tabellen III, V und VI aufgeführten, in der vorliegenden Erfindung geeigneten Proteaseenzyme, neben anderen, mit im Wesentlichen ähnlichen Ergebnissen substituiert.

[0120]

Granulöse Textilreinigungszusammensetzung

	Beispiel Nr.			
Bestandteil	24	25	26	27
Protease Nr. 12 (4% Prill)	0,10	0,20	0,03	0,05
Protease Nr. 4 (4% Prill)	-	-	0,02	0,05
C ₁₂ -Alkylbenzolsulfonat	12,00	12,00	12,00	12,00
Zeolith A (1-10 Mikrometer)	26,00	26,00	26,00	26,00
2-Butyloctansäure	4,00	4,00	4,00	4,00
Sekundäres (2,3) C ₁₂ -C ₁₄ -Alkylsulfat,	5,00	5,00	5,00	5,00
Na-Salz				
Natriumcitrat	5,00	5,00	5,00	5,00
Optischer Aufheller	0,10	0,10	0,10	0,10
Natriumsulfat	17,00	17,00	17,00	17,00
Füllstoffe, Wasser, geringfügige Bestandteile	ad 100%			

[0121] In den Beispielen 24 und 25 wird Protease Nr. 12 durch die in Tabelle III aufgeführten Proteasen Nr. 1-11 und 13-25, neben anderen, einschließlich der in den Tabellen V und VI beschriebenen zusätzlichen Proteasen, die in der vorliegenden Erfindung geeignet sind, mit im Wesentlichen ähnlichen Ergebnissen substituiert.

[0122] In den Beispielen 26 und 27 werden Protease Nr. 12 und Protease Nr. 4 durch eine beliebige Kombination der in den Tabellen III, V und VI aufgeführten, in der vorliegenden Erfindung geeigneten Proteaseenzyme, neben anderen, mit im Wesentlichen ähnlichen Ergebnissen substituiert.

Beispiele 28 und 29

[0123]

Granulöse Textilreinigungszusammensetzungen

Bestandteile	Beispiel Nr.	
	28	29
Lineares Alkylbenzolsulfonat	11,4	10,70
Talgalkylsulfat	1,80	2,40
C ₁₄₋₁₅ -Alkylsulfat	3,00	3,10
C ₁₄₋₁₅ -Alkohol, 7-fach ethoxyliert	4,00	4,00
Talgalkohol, 11-fach ethoxyliert	1,80	1,80
Dispergiermittel	0,07	0,1
Silikonflüssigkeit	0,80	0,80
Trinatriumcitrat	14,00	15,00
Citronensäure	3,00	2,50
Zeolith	32,50	32,10
Maleinsäure/Acrylsäure-Copolymer	5,00	5,00
Diethylentriaminpentamethylenphosphonsäure	1,00	0,20
Protease Nr. 12 (4% Prill)	0,30	0,30
Lipase	0,36	0,40
Amylase	0,30	0,30
Natriumsilicat	2,00	2,50
Natriumsulfat	3,50	5,20
Polyvinylpyrrolidon	0,30	0,50
Perborat	0,5	1
Phenolsulfonat	0,1	0,2
Peroxidase	0,1	0,1
Geringfügige Bestandteile	Up to 100	Up to 100

Beispiele 30 und 31

[0124]

Granulöse Textilreinigungszusammensetzungen

Bestandteile	Beispiel Nr.	
	30	31
Lineares C ₁₂ -Natriumalkylbenzolsulfonat	6,5	8,0
Natriumsulfat	15,0	18,0
Zeolith A	26,0	22,0
Natriumnitrilotriacetat	5,0	5,0
Polyvinylpyrrolidon	0,5	0,7
Tetraacetylenethyldiamin	3,0	3,0
Borsäure	4,0	-
Perborat	0,5	1
Phenolsulfonat	0,1	0,2
Protease Nr. 12 (4% Prill)	0,4	0,4
Füllstoffe (z. B. Silicate, Carbonate, Duftstoffe, Wasser)	Up to 100	Up to 100

Beispiel 32

[0125]

Kompakte granulöse Textilreinigungszusammensetzung

Bestandteile	Gewichtsprozent
Alkylsulfat	8,0
Alkylethoxysulfat	2,0
Mischung aus C25- und C45-Alkohol, 3- und 7-fach ethoxyliert	6,0
Polyhydroxyfettsäureamid	2,5
Zeolith	17,0
Schichtsilicat/Citrat	16,0
Carbonat	7,0
Maleinsäure/Acrylsäure-Copolymer	5,0
Schmutzabweisungspolymer	0,4
Carboxymethylcellulose	0,4
Poly(4-vinylpyridin)-N-oxid	0,1
Copolymer aus Vinylimidazol und Vinylpyrrolidon	0,1
PEG2000	0,2
Protease Nr. 12 (4% Prill)	0,5
Lipase	0,2
Cellulase	0,2
Tetraacetylenethyldiamin	6,0
Percarbonat	22,0
Ethyldiamindibbernsteinsäure	0,3
Schaumunterdrücker	3,5
Dinatrium-4,4'-bis-(2-morpholino-4-anilino-s-triazin-6-ylamino)-stilben-2,2'-disulfonat	0,25
Dinatrium-4,4'-bis-(2-sulfostyryl)-biphenyl	0,05
Wasser, Duftstoff und geringfügige Bestandteile	Up to 100

Beispiel 33

[0126]

Granulöse Textilreinigungszusammensetzung

Bestandteil	Gewichtsprozent
Lineares Alkylbenzolsulfonat	7,6
C ₁₆ -C ₁₈ -Alkylsulfat	1,3
C ₁₄₋₁₅ -Alkohol, 7-fach ethoxyliert	4,0
Kokosalkyldimethylhydroxyethylammoniumchlorid	1,4
Dispergiertmittel	0,07
Silikonflüssigkeit	0,8
Trinatriumcitrat	5,0
Zeolith 4A	15,0
Maleinsäure/Acrylsäure-Copolymer	4,0
Diethylentriaminpentamethylenphosphonsäure	0,4
Perborat	15,0
Tetraacetylenethyldiamin	5,0
Smectitton	10,0
Poly(oxyethylen) (MG 300.000)	0,3
Protease Nr. 12 (4% Prill)	0,4
Lipase	0,2
Amylase	0,3
Cellulase	0,2
Natriumsilicat	3,0
Natriumcarbonat	10,0
Carboxymethylcellulose	0,2
Aufheller	0,2
Wasser, Duftstoff und geringfügige Bestandteile	Up to 100

Beispiel 34

[0127]

Granulöse Textilreinigungszusammensetzung

Bestandteil	Gewichtsprozent
Lineares Alkylbenzolsulfonat	6,92
Talgalkylsulfat	2,05
C ₁₄₋₁₅ -Alkohol, 7-fach ethoxyliert	4,4
C ₁₂₋₁₅ -Alkylethoxysulfat – 3-fach ethoxyliert	0,16
Zeolith	20,2
Citrat	5,5
Carbonat	15,4
Silicat	3,0
Maleinsäure/Acrylsäure-Copolymer	4,0
Carboxymethylcellulase	0,31
Schmutzabweisungspolymer	0,30
Protease Nr. 12 (4% Prill)	0,2
Lipase	0,36
Cellulase	0,13
Perborattetrahydrat	11,64
Perboratmonohydrat	8,7
Tetraacetylethylendiamin	5,0
Diethylentriaminpentamethylphosphonsäure	0,38
Magnesiumsulfat	0,40
Aufheller	0,19
Duftstoff, Silikon, Schaumunterdrücker	0,85
Geringfügige Bestandteile	Up to 100

[0128] In jedem der Beispiele 28-34 hierin wird Protease Nr. 12 durch die in Tabelle III aufgeführten Proteasen Nr. 1-11 und 13-25, neben anderen, einschließlich der in den Tabellen V und VI beschriebenen zusätzlichen Proteasen, die in der vorliegenden Erfindung geeignet sind, mit im Wesentlichen ähnlichen Ergebnissen substituiert. Außerdem wird in den Beispielen 28-34 Protease Nr. 12 durch eine beliebige Kombination der in den Tabellen III, V und VI aufgeführten, in der vorliegenden Erfindung geeigneten Proteasen, neben anderen, mit im Wesentlichen ähnlichen Ergebnissen substituiert.

b. Flüssige Textilreinigungszusammensetzungen

[0129] Flüssige Textilreinigungszusammensetzungen der vorliegenden Erfindung umfassen eine wirksame Menge eines oder mehrerer Proteaseenzyme, vorzugsweise von etwa 0,0001 Gew.-% bis etwa 10 Gew.-%, mehr bevorzugt von etwa 0,001 Gew.-% bis etwa 1 Gew.-% und am meisten bevorzugt von etwa 0,001 Gew.-% bis etwa 0,1 Gew.-% der Zusammensetzung aktives Proteaseenzym. Solche flüssigen Textilreinigungszusammensetzungen umfassen in der Regel zusätzlich ein anionisches Tensid, eine Fettsäure, einen wasserlöslichen Reinigungsbuilder und Wasser.

[0130] Die Ausführungsform der flüssigen Textilreinigungszusammensetzung der vorliegenden Erfindung wird durch die folgenden Beispiele veranschaulicht.

Beispiele 35-39

[0131]

Flüssige Textilreinigungszusammensetzungen

	Beispiel Nr.				
Bestandteil	35	36	37	38	39
Protease Nr. 12	0,05	0,03	0,30	0,03	0,10
Protease Nr. 4	-	-	-	0,01	0,20
C ₁₂ -C ₁₄ -Alkylsulfat, Na	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00
2-Butyloctansäure	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Natriumcitrat	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
C ₁₀ -Alkoholethoxylat (3)	13,00	13,00	13,00	13,00	13,00
Monoethanolamin	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50
Wasser/Propylen glycol/Ethanol (100:1:1)	ad 100%				

[0132] In den Beispielen 35-37 wird Protease Nr. 12 durch die in Tabelle III aufgeführten Proteasen Nr. 1-11 und 13-25, neben anderen, einschließlich der in den Tabellen V und VI beschriebenen zusätzlichen Proteasen, die in der vorliegenden Erfindung geeignet sind, mit im Wesentlichen ähnlichen Ergebnissen substituiert.

[0133] In den Beispielen 38 und 39 werden Protease Nr. 12 und Protease Nr. 4 durch eine beliebige Kombination der in den Tabellen III, V und VI aufgeführten, in der vorliegenden Erfindung geeigneten Proteaseenzyme, neben anderen, mit im Wesentlichen ähnlichen Ergebnissen substituiert.

Beispiele 40-41

[0134]

Flüssige Textilreinigungszusammensetzungen

	Beispiel Nr.	
Bestandteil	40	41
C ₁₂₋₁₄ -Alkenylbernsteinsäure	3,0	8,0
Citronensäuremonohydrat	10,0	15,0
C ₁₂₋₁₅ -Natriumalkylsulfat	8,0	8,0
Natriumsulfat von C ₁₂₋₁₅ -Alkohol, 2-fach ethoxyliert	-	3,0
C ₁₂₋₁₅ -Alkohol, 7-fach ethoxyliert	-	8,0
C ₁₂₋₁₅ -Alkohol, 5-fach ethoxyliert	8,0	-
Diethylentriaminpenta(methylenphosphonsäure)	0,2	-
Ölsäure	1,8	-
Ethanol	4,0	4,0
Propandiol	2,0	2,0
Protease Nr. 12	0,2	0,2
Polyvinylpyrrolidon	1,0	2,0
Schaumunterdrücker	0,15	0,15
NaOH		bis pH 7,5
Perborat	0,5	1
Phenolsulfonat	0,1	0,2
Peroxidase	0,4	0,1
Wasser und geringfügige Bestandteile	ad 100 Teile	

[0135] In jedem der Beispiele 40 und 41 hierin wird Protease Nr. 12 durch die in Tabelle III aufgeführten Proteasen Nr. 1-11 und 13-25, neben anderen, einschließlich der in den Tabellen V und VI beschriebenen zusätzlichen Proteasen, die in der vorliegenden Erfindung geeignet sind, mit im Wesentlichen ähnlichen Ergebnissen substituiert. Außerdem wird in den Beispielen 40 und 41 Protease Nr. 12 durch eine beliebige Kombination der in den Tabellen III, V und VI aufgeführten, in der vorliegenden Erfindung geeigneten Proteasen, neben anderen, mit im Wesentlichen ähnlichen Ergebnissen substituiert.

c. Stückförmige Textilreinigungszusammensetzungen

[0136] Stückförmige Textilreinigungszusammensetzungen der vorliegenden Erfindung, die zur Handwäsche von verschmutzten Textilien geeignet sind, enthalten eine wirksame Menge eines oder mehrerer Proteaseenzyme, vorzugsweise von etwa 0,001 Gew.-% bis etwa 10 Gew.-%, mehr bevorzugt von etwa 0,01 Gew.-% bis etwa 1 Gew.-% der Zusammensetzung.

[0137] Die Ausführungsform der stückförmigen Textilreinigungszusammensetzung der vorliegenden Erfindung wird durch die folgenden Beispiele veranschaulicht.

Beispiele 42-45

[0138]

Stückförmige Textilreinigungszusammensetzungen

	Beispiel Nr.			
Bestandteil	42	43	44	45
Protease Nr. 12	0,3	-	0,1	0,02
Protease Nr. 4	-	-	0,4	0,03
C ₁₂ -C ₁₆ -Alkylsulfat, Na	20,0	20,0	20,0	20,00
C ₁₂ -C ₁₄ -N-Methylglucamid	5,0	5,0	5,0	5,00
C ₁₁ -C ₁₃ -Alkylbenzolsulfonat, Na	10,0	10,0	10,0	10,00
Natriumcarbonat	25,0	25,0	25,0	25,00
Natriumpyrophosphat	7,0	7,0	7,0	7,00
Natriumtripolyphosphat	7,0	7,0	7,0	7,00
Zeolith A (0,1-0,10 µ)	5,0	5,0	5,0	5,00
Carboxymethylcellulose	0,2	0,2	0,2	0,20
Polyacrylat (MG 1400)	0,2	0,2	0,2	0,20
Kokos-monoethanolamid	5,0	5,0	5,0	5,00
Aufheller, Duftstoff	0,2	0,2	0,2	0,20
CaSO ₄	1,0	1,0	1,0	1,00
MgSO ₄	1,0	1,0	1,0	1,00
Wasser	4,0	4,0	4,0	4,00
Füllstoff*	ad 100%			

* Kann aus geeigneten Materialien wie CaCO₃, Talk, Ton, Silicaten und dergleichen ausgewählt werden.

[0139] In den Beispielen 42 und 43 wird Protease Nr. 12 durch die in Tabelle III aufgeführten Proteasen Nr. 1-11 und 13-25, neben anderen, einschließlich der in den Tabellen V und VI beschriebenen zusätzlichen Proteasen, die in der vorliegenden Erfindung geeignet sind, mit im Wesentlichen ähnlichen Ergebnissen substituiert.

[0140] In den Beispielen 44 und 45 werden Protease Nr. 12 und Protease Nr. 4 durch eine beliebige Kombination der in den Tabellen III, V und VI aufgeführten, in der vorliegenden Erfindung geeigneten Proteaseenzyme, neben anderen, mit im Wesentlichen ähnlichen Ergebnissen substituiert.

B. Weitere Reinigungszusammensetzungen

[0141] Neben den vorstehend besprochenen Reinigungszusammensetzungen für harte Oberflächen, Geschirrspülzusammensetzungen und Textilreinigungszusammensetzungen können ein oder mehrere Proteaseenzyme in eine Vielfalt an anderen Reinigungszusammensetzungen eingeschlossen werden, bei denen die Hydrolyse eines unlöslichen Substrats erwünscht ist. Solche zusätzlichen Reinigungszusammensetzungen umfassen, ohne jedoch darauf beschränkt zu sein, Mundreinigungszusammensetzungen, Zahnprothesenreinigungszusammensetzungen und Kontaktlinsenreinigungszusammensetzungen.

1. Mundreinigungszusammensetzungen

[0142] In einer anderen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird eine pharmazeutisch annehmbare Menge eines oder mehrerer Proteaseenzyme in Zusammensetzungen eingeschlossen, die zum Entfernen von proteinhaltigen Flecken von Zähnen oder Zahnprothesen geeignet sind. Wie hier verwendet, bezieht sich „Mundreinigungszusammensetzungen“ auf Zahncremes, Zahnpasten, Zahngel, Zahnpulver, Mundspülungen, Mundsprays, Mundgel, Kaugummi, Pastillen, Beutel, Tabletten, Biogel, Prophylaxepasten, Zahnbehandlungslösungen und dergleichen. Vorzugsweise umfassen Mundreinigungszusammensetzungen der vorliegenden Erfindung von etwa 0,0001 Gew.-% bis etwa 20 Gew.-% ein oder mehrere Proteaseenzyme, mehr bevorzugt von etwa 0,001 Gew.-% bis etwa 10 Gew.-%, noch mehr bevorzugt von etwa 0,01 Gew.-% bis etwa 5 Gew.-% der Zusammensetzung und einen pharmazeutisch annehmbaren Träger. Wie hier verwendet, bedeutet „pharmazeutisch annehmbar“, dass Arzneimittel, Medikamente oder inerte Bestandteile, die der Ausdruck beschreibt, zur Verwendung in Kontakt mit den Geweben von Menschen und niederen Tieren ohne übermäßige Toxizität, Unverträglichkeit, Instabilität, Reizung, Allergiereaktion und dergleichen bei einem angemessenen Nutzen/Risiko-Verhältnis geeignet sind.

[0143] Typischerweise umfassen die pharmazeutisch annehmbaren Mundreinigungsträgerbestandteile der Mundreinigungszusammensetzungen im Allgemeinen von etwa 50 Gew.-% bis etwa 99,99 Gew.-%, vorzugsweise von etwa 65 Gew.-% bis etwa 99,99 Gew.-%, mehr bevorzugt von etwa 65 Gew.-% bis etwa 99 Gew.-% der Zusammensetzung.

[0144] Die pharmazeutisch annehmbaren Trägerbestandteile und fakultativen Bestandteile, die in die Mundreinigungszusammensetzungen der vorliegenden Erfindung eingeschlossen werden können, sind Fachleuten wohl bekannt. Eine große Vielfalt an Zusammensetzungsarten, Trägerbestandteilen und fakultativen Bestandteilen, die in den Mundreinigungszusammensetzungen geeignet sind, sind in US-Patent 5,096,700, Seibel, erteilt am 17. März 1992, US-Patent 5,028,414, Sampathkumar, erteilt am 2. Juli 1991, und US-Patent 5,028,415, Benedict, Bush und Sunberg, erteilt am 2. Juli 1991, die alle durch Bezugnahme hierin eingeschlossen sind, offenbart.

[0145] Die Ausführungsform der Mundreinigungszusammensetzung der vorliegenden Erfindung wird durch die folgenden Beispiele veranschaulicht.

Beispiele 46-49

[0146]

Zahncremezusammensetzung

	Beispiel Nr.			
Bestandteil	46	47	48	49
Protease Nr. 12	2,000	3,500	1,500	2,000
Sorbit (70% wässrige Lösung)	35,000	35,000	35,000	35,000
PEG-6*	1,000	1,000	1,000	1,000
Silica-Dental-schleifmittel**	20,000	20,000	20,000	20,000
Natriumfluorid	0,243	0,243	0,243	0,243
Titandioxid	0,500	0,500	0,500	0,500
Natriumsaccharin	0,286	0,286	0,286	0,286
Natriumalkylsulfat (27,9% wässrige Lösung)	4,000	4,000	4,000	4,000
Geschmacksstoff	1,040	1,040	1,040	1,040
Carboxyvinylpolymer***	0,300	0,300	0,300	0,300
Carrageenan****	0,800	0,800	0,800	0,800
Wasser	ad 100%			

* PEG-6 = Polyethylenglycol mit einem Molekulargewicht von 600.

** Ausgefälltes Siliciumdioxid, gekennzeichnet als Zeodent 119, angeboten von J. M. Huber.

*** Carbopol, angeboten von B. F. Goodrich Chemical Company.

**** Iota-Carrageenan, angeboten von Hercules Chemical Company.

[0147] In den Beispielen 46-49 wird Protease Nr. 12 durch die in Tabelle 111 aufgeführten Proteasen Nr. 1-11 und 13-25, neben anderen, einschließlich der in den Tabellen V und VI beschriebenen zusätzlichen Proteasen, die in der vorliegenden Erfindung geeignet sind, mit im Wesentlichen ähnlichen Ergebnissen substituiert. Außerdem wird in den Beispielen 46-49 Protease Nr. 12 durch eine beliebige Kombination der in den Tabellen III, V, VI aufgeführten, in der vorliegenden Erfindung geeigneten Proteaseenzyme, neben anderen, mit im Wesentlichen ähnlichen Ergebnissen substituiert.

Beispiele 50-53

[0148]

Mundspülungszusammensetzung

	Beispiel Nr.			
Bestandteil	50	51	52	53
Protease Nr. 12	3,00	7,50	1,00	5,00
SDA 40-Alkohol	8,00	8,00	8,00	8,00
Geschmacksstoff	0,08	0,08	0,08	0,08
Emulgator	0,08	0,08	0,08	0,08
Natriumfluorid	0,05	0,05	0,05	0,05
Glycerin	10,00	10,00	10,00	10,00
Süßstoff	0,02	0,02	0,02	0,02
Benzoessäure	0,05	0,05	0,05	0,05
Natriumhydroxid	0,20	0,20	0,20	0,20
Farbstoff	0,04	0,04	0,04	0,04
Wasser	ad 100%			

[0149] In den Beispielen 50-53 wird Protease Nr. 12 durch die in Tabelle III aufgeführten Proteasen Nr. 1-11 und 13-25, neben anderen, einschließlich der in den Tabellen V und VI beschriebenen zusätzlichen Proteasen, die in der vorliegenden Erfindung geeignet sind, mit im Wesentlichen ähnlichen Ergebnissen substituiert. Außerdem wird in den Beispielen 50-53 Protease Nr. 12 durch eine beliebige Kombination der in den Tabellen III, V und VI aufgeführten, in der vorliegenden Erfindung geeigneten Proteaseenzyme, neben anderen, mit im Wesentlichen ähnlichen Ergebnissen substituiert.

Beispiele 54-57

[0150]

Pastillenzusammensetzung

	Beispiel Nr.			
Bestandteil	54	55	56	57
Protease Nr. 12	0,01	0,03	0,10	0,02
Sorbit	17,50	17,50	17,50	17,50
Mannit	17,50	17,50	17,50	17,50
Stärke	13,60	13,60	13,60	13,60
Süßstoff	1,20	1,20	1,20	1,20
Geschmacksstoff	11,70	11,70	11,70	11,70
Farbstoff	0,10	0,10	0,10	0,10
Maisstärkesirup	ad 100%			

[0151] In den Beispielen 54-57 wird Protease Nr. 12 durch die in Tabelle III aufgeführten Proteasen Nr. 1-11 und 13-25, neben anderen, einschließlich der in den Tabellen V und VI beschriebenen zusätzlichen Proteasen, die in der vorliegenden Erfindung geeignet sind, mit im Wesentlichen ähnlichen Ergebnissen substituiert. Außerdem wird in den Beispielen 54-57 Protease Nr. 12 durch eine beliebige Kombination der in den Tabellen III, V und VI aufgeführten, in der vorliegenden Erfindung geeigneten Proteaseenzyme, neben anderen, mit im Wesentlichen ähnlichen Ergebnissen substituiert.

Beispiele 58-61

[0152]

Kaugummizusammensetzung

	Beispiel Nr.			
Bestandteil	58	59	60	61
Protease Nr. 12	0,03	0,02	0,10	0,05
Sorbitkristalle	38,44	38,40	38,40	38,40
Paloja-T-Kaumas-se*	20,00	20,00	20,00	20,00
Sorbit (70% wässrige Lösung)	22,00	22,00	22,00	22,00
Mannit	10,00	10,00	10,00	10,00
Glycerin	7,56	7,56	7,56	7,56
Geschmacksstoff	1,00	1,00	1,00	1,00

* Geliefert von L. A. Dreyfus Company.

[0153] In den Beispielen 58-61 wird Protease Nr. 12 durch die in Tabelle III aufgeführten Proteasen Nr. 1-11 und 13-25, neben anderen, einschließlich der in den Tabellen V und VI beschriebenen zusätzlichen Proteasen, die in der vorliegenden Erfindung geeignet sind, mit im Wesentlichen ähnlichen Ergebnissen substituiert. Außerdem wird in den Beispielen 58-61 Protease Nr. 12 durch eine beliebige Kombination der in den Tabellen III, V und VI aufgeführten, in der vorliegenden Erfindung geeigneten Proteaseenzyme, neben anderen, mit im Wesentlichen ähnlichen Ergebnissen substituiert.

2. Zahnprothesenreinigungszusammensetzungen

[0154] In einer anderen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfassen Zahnprothesenreinigungszusammensetzungen zum Reinigen von Zahnprothesen außerhalb der Mundhöhle ein oder mehrere Proteaseenzyme. Solche Zahnprothesenreinigungszusammensetzungen umfassen eine wirksame Menge eines oder mehrerer Proteaseenzyme, vorzugsweise von etwa 0,0001 Gew.-% bis etwa 50 Gew.-% ein oder mehrere Proteaseenzyme, mehr bevorzugt von etwa 0,001 Gew.-% bis etwa 35 Gew.-%, noch mehr bevorzugt von etwa 0,01 Gew.-% bis etwa 20 Gew.-% der Zusammensetzung, und einen Zahnprothesenreinigungsträger. Verschiedene Formate für Zahnprothesenreinigungszusammensetzungen, wie Sprudletabletten und dergleichen, sind im Stand der Technik wohl bekannt (siehe zum Beispiel US-Patent 5,055,305, Young, durch Bezugnahme hierin eingeschlossen) und sind im Allgemeinen für den Einschluss eines oder mehrerer Proteaseenzyme zur Entfernung proteinhaltiger Flecken von Zahnprothesen geeignet.

[0155] Die Ausführungsform der Zahnprothesenreinigungszusammensetzung der vorliegenden Erfindung wird durch die folgenden Beispiele veranschaulicht.

Beispiele 62-65

[0156]

Zweischichtige sprudelnde Zahnprothesenreinigungstablette

	Beispiel Nr.			
Bestandteil	62	63	64	65
Saure Schicht				
Protease Nr. 12	1,0	1,5	0,01	0,05
Weinsäure	24,0	24,0	24,00	24,00
Natriumcarbonat	4,0	4,0	4,00	4,00
Sulfaminsäure	10,0	10,0	10,00	10,00
PEG 20.000	4,0	4,0	4,00	4,00
Natriumhydrogen-carbonat	24,5	24,5	24,50	24,50
Kaliumpersulfat	15,0	15,0	15,00	15,00
Natriumsäurepyrophosphat	7,0	7,0	7,00	7,00
Pyrogenes Silica	2,0	2,0	2,00	2,00
Tetraacetylen-diamin	7,0	7,0	7,00	7,00
Ricinoleylsulfosuccinat	0,5	0,5	0,50	0,50
Geschmacksstoff	1,0	1,0	1,00	1,00
Alkalische Schicht				
Natriumperborat-monohydrat	32,0	32,0	32,00	32,00
Natriumhydrogen-carbonat	19,0	19,0	19,00	19,00
EDTA	3,0	3,0	3,00	3,00
Natriumtripolyphosphat	12,0	12,0	12,00	12,00
PEG 20.000	2,0	2,0	2,00	2,00
Kaliumpersulfat	26,0	26,0	26,00	26,00
Natriumcarbonat	2,0	2,0	2,00	2,00
Pyrogenes Silica	2,0	2,0	2,00	2,00
Farbstoff/Geschmacksstoff	2,0	2,0	2,00	2,00

[0157] In den Beispielen 62-65 wird Protease Nr. 12 durch die in Tabelle 111 aufgeführten Proteasen Nr. 1-11 und 13-25, neben anderen, einschließlich der in den Tabellen V und VI beschriebenen zusätzlichen Proteasen, die in der vorliegenden Erfindung geeignet sind, mit im Wesentlichen ähnlichen Ergebnissen substituiert. Außerdem wird in den Beispielen 62-65 Protease Nr. 12 durch eine beliebige Kombination der in den Tabellen 111, V und VI aufgeführten, in der vorliegenden Erfindung geeigneten Proteaseenzyme, neben anderen, mit im Wesentlichen ähnlichen Ergebnissen substituiert.

3. Körperreinigungszusammensetzungen

[0158] In einer anderen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfassen Körperreinigungszusammensetzungen zum Reinigen der Haut (in flüssiger Form und in Stückform) ein oder mehrere der Proteaseenzyme. Solche Zusammensetzungen umfassen typischerweise von etwa 0,001 Gew.-% bis etwa 5 Gew.-% Proteaseenzym, vorzugsweise von etwa 0,005 Gew.-% bis etwa 2 Gew.-% und am meisten bevorzugt von etwa 0,01 Gew.-% bis etwa 0,8 Gew.-% der Zusammensetzung. Bevorzugte Körperreinigungszusammensetzungen, in die Proteaseenzyme, wie hier beschrieben, eingeschlossen werden können, werden in den US-Paten-

tanmeldungen SN 08/121,623 und SN 08/121,624, beide von Visscher et al., eingereicht am 14. September 1993, deren Offenbarungen in ihrer Gesamtheit durch Bezugnahme hierin eingeschlossen sind, gelehrt. Solche Zusammensetzungen werden durch die folgenden Beispiele veranschaulicht.

Beispiel 66

[0159]

Flüssige seifenhaltige Körperreinigungszusammensetzungen

Bestandteil	Gewichtsprozent
Seife (K oder Na)	15,00
30% Laurat	
30% Myristat	
25% Palmitat	
15% Stearat	
Fettsäuren (vorstehende Anteile)	4,50
Na-Laurylsarcosinat	6,00
Natriumlaureth-3-sulfat	0,66
Cocamidopropylbetain	1,33
Glycerin	15,00
Propylenglycol	9,00
Polyquaternium 10	0,80
Ethylenglycoldistearat (EDTA)	1,50
Propylparaben	0,10
Methylparaben	0,20
Protease Nr. 12	0,10
KOH oder NaOH	Falls zur Einstellung des pH-Werts erforderlich
Calciumsulfat	3
Essigsäure	3
Wasser	ad 100

Beispiel 67

[0160]

Strückförmige Körperreinigungszusammensetzungen

Bestandteil	Gewichtsprozent
Natriumcocoylisethionat	47,20
Natriumcetearylsulfat	9,14
Paraffin	9,05
Natriumseife (in situ)	3,67
Natriumisethionat	5,51
Natriumchlorid	0,45
Titandioxid	0,4
Trinatrium-EDTA	0,1
Trinatrium-Etidronat	0,1
Duftstoff	1,20
Na ₂ SO ₄	0,87
Protease Nr. 12	0,10
Wasser/geringfügige Bestandteile	ad 100

[0161] In den Beispielen 66-67 wird Protease Nr. 12 durch die in Tabelle III aufgeführten Proteasen Nr. 1-11 und 13-25, neben anderen, einschließlich der in den Tabellen V und VI beschriebenen zusätzlichen Proteasen, die in der vorliegenden Erfindung geeignet sind, mit im Wesentlichen ähnlichen Ergebnissen substituiert. Außerdem wird in den Beispielen 66-67 Protease Nr. 12 durch eine beliebige Kombination der in den Tabellen III, V und VI aufgeführten, in der vorliegenden Erfindung geeigneten Proteaseenzyme, neben anderen, mit im Wesentlichen ähnlichen Ergebnissen substituiert.

Waschleistungstest

[0162] Die Waschleistung der in den Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung geeigneten Varianten wird durch Messen der Entfernung von Flecken von EMPA 116-Gewebemustern (Blut/Milch/Ruß auf Baumwolle) (Testfabrics, Inc., Middlesex, NJ 07030) bewertet.

[0163] Sechs EMPA 116-Muster, zugeschnitten auf 7,3 × 11,4 cm (3 × 4 1/2 Zoll) mit gezackten Rändern werden in die einzelnen Gefäße eines Terg-O-Tometers, Modell 7243S (United States Testing Co., Inc., Hoboken, NJ), gelegt, die 1000 ml Wasser, Härte 3,9 g/l (15 gpg) (Ca⁺⁺:Mg⁺⁺::3:1::w:w), 7 g Waschmittel und Enzym, wie jeweils zutreffend, enthalten. Der Waschmittelgrundbestandteil ist WFK1-Waschmittel von wfk-Testgewebe GmbH, Adlerstraße 42, Postfach 13 07 62, D-47759 Krefeld, Deutschland:

Bestandteil	% der Endformulierung
Zeolith A	25%
Natriumsulfat	25%
Wasserfreie Soda	10%
Lineares Alkylbenzolsulfonat	8,8%
Alkoholethoxylat (7-8 EO)	4,5%
Natriumseife	3%
Natriumsilicat (SiO ₂ :Na ₂ O::3,3:1)	3%

[0164] Zu diesem Grundwaschmittel wird Folgendes hinzugefügt:

Bestandteil	% der Endformulierung
Natriumperboratmonohydrat	13%
Copolymer (Sokalan CP5)	4%
TAED (Mykon ATC Green)	3%
Enzym	0,5%
Aufheller (Tinopal AMS-GX)	0,2%

[0165] Natriumperboratmonohydrat ist von Degussa Corporation, Ridgefield-Park, NJ 07660, erhältlich. Sokalan CP5 ist von BASF Corporation, Parsippany, NJ 07054, erhältlich. Mykon ATC Green (TAED, Tetraacetylendiamin) ist von Warwick International, Limited, Mostyn, Holywell, Clwyd CH8 9HE, England, erhältlich. Tinopal AMS GX ist von Ciba-Geigy Corporation, Greensboro, NC 27419, erhältlich.

[0166] Sechs EMPA 116-Muster werden in Waschmittel mit Enzym 30 Minuten lang bei 60°C gewaschen und anschließend zweimal 5 Minuten lang jeweils in 1000 ml Wasser gespült. Die Enzyme werden in Endkonzentrationen von 0,05 bis 1 ppm für Standardkurven und 0,25 ppm für Routineanalysen hinzugegeben. Die Muster werden getrocknet und gebügelt, und der Reflexionsgrad der Muster wird anhand des L-Werts auf der L*a*b*-Skala eines Minolta-Chromameters, Modell CR-200 (Minolta Corporation, Ramsey, NJ 07446), gemessen. Die Leistung wird protokolliert als Prozentsatz der Leistung von B.-lentus-(GG36)Protease und berechnet durch Dividieren der Menge an B.-lentus-(GG36)Protease durch die Menge an Variantenprotease, die für die gleiche Fleckenentfernungsleistung benötigt wird, X 100. Die Daten sind in Tabelle VII aufgeführt.

Tabelle VII

Enzym	Waschleistung
B.-lentus-Subtilisin	100
N76D	310
N76D/S103A	230
N76D7V104I	130
N76D/V107V	160
N76D/S99D/S101R	370
N76D/S99D/S103A	290
N76D/S101R/S103A	130
N76D/S101R/V104I	300
N76D/S103A/V104I	320
N76D/S103G/V104I	160
N76D/S103A/V104F	210
N76D/S103A/V104N	110
N76D/S103A/V104T	170
N76D7V104I/I107V	210
N76D/S99D/S101R/S103A	220
N76D/S99D/S101R/V104I	140
N76D/S101G/S103A/V104I	170
N76D/S101R/S103A/V104I	150
N76D/S103A/V104I/S105A	170
N76D/S103A/V104T/I107A	120
N76D/S103A/V104T/I107L	110
N76D/S103A/V104I/L126F	110
N76D/S103A/V104I/S128G	280
N76D/S103A/V104I/L135I	160
N76D/S103A/V104I/L135V	160
N76D/S103A/V104I/D197E	170
N76D/S103A/V104I/N204A	160
N76D/S103A/V104I/N204G	150
N76D/S103A/V104I/P210I	470
N76D/S103A/V104I/M222A	100
N76D/S103A/V104I/T260P	280
N76D/S103A/V104I/S265N	190

Beispiel 69

Proteasestabilität in einer Flüssigwaschmittelformulierung

[0167] Ein Vergleich zwischen Proteasestabilität und -deaktivierung in einer Flüssigwaschmittelformulierung wird für *Bacillus-lentus*-Subtilisin und dessen Variantenenzym N76D/S103A/V104I gemäß dem hierin umrissenen Verfahren vorgenommen. Die Waschmittelformulierung für die Untersuchung ist eine im Handel erhältliche Flasche Tide Ultra-Flüssigwäschewaschmittel, die in den USA von The Procter & Gamble Company hergestellt wird. Eine Wärmebehandlung der Waschmittelformulierung ist notwendig, um Protease in situ zu deaktivieren.

[0168] Dies wird durch Inkubieren des Waschmittels bei 96°C für einen Zeitraum von 4,5 Stunden erreicht. Anschließend werden konzentrierte Zubereitungen des *B.-lentus*-Subtilisins und der Variante N76D/S103A/V104I im Bereich von 20 Gramm/Liter Enzym bei Raumtemperatur bis zu einer Endkonzentration von 0,3 Gramm/Liter Enzym in der Waschmittelformulierung zu dem wärmebehandelten Tide Ultra hinzugegeben. Anschließend wird das wärmebehandelte Waschmittel mit Protease in einem auf 50°C thermostatierten Wasserbad inkubiert. Aus den Inkubationsröhrchen werden in Zeitintervallen von 0, 24, 46, 76 und 112 Stunden Aliquots entnommen und durch Zugabe in eine 1-cm-Küvette mit 1,2 mM des synthetischen Peptidsubstrats Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pnitroanilid, gelöst in 0,1 M Tris-HCL-Puffer, pH 8,6, und auf 25°C thermostatiert, auf Enzymaktivität getestet. Die anfängliche lineare Reaktionsgeschwindigkeit wird spektralphotometrisch durch Überwachung der Extinktion des Reaktionsprodukts p-Nitroanilin bei 410 nm als Funktion der Zeit verfolgt. Wie in [Fig. 10](#) gezeigt, wird bei der Variante N76D/S103A/V104I eine wesentlich höhere Stabilität gegenüber Deaktivierung beobachtet als bei dem nativen *B.-lentus*-Enzym. Die geschätzten Halbwertszeiten für die Deaktivierung in der Tide Ultra-Waschmittelformulierung betragen für die zwei Enzyme unter den angegebenen Testbe-

dingungen 45 Stunden für B.-lentus-Subtilisin und 125 Stunden für die Variante N76D/S103A/V104I.

SEQUENZAUFLISTUNG

(1) ALLGEMEINE INFORMATIONEN:

(i) ANMELDER: Baeck, Andre (NMN)

Ghosh, Chanchal K.

Graycar, Thomas P.

Bott, Richard R.

Wilson, Lori J.

Brode, Philip F. III.

Barnett, Bobby L.

Rubingh, Donn N.

(ii) TITEL DER ERFINDUNG: Proteasehaltige
Reinigungszusammensetzungen

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 15

(iv) POSTADRESSE:

(A) EMPFÄNGER: The Procter & Gamble Company

(B) STRASSE: 11810 East River Road

(C) ORT: Cincinnati

(D) BUNDESSTAAT: OH

(E) LAND: USA

(F) PLZ: 45253-8707

(v) COMPUTERLESBARE FORM:

- (A) ART DES MEDIUMS: Diskette
- (B) COMPUTER: IBM PC-kompatibel
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release 1,0, Version 1,25

(vi) AKTUELLE DATEN DER ANMELDUNG:

- (A) ANMELDUNGSNUMMER:
- (B) DATUM DER EINREICHUNG: 13. Okt. 1994
- (C) KLASSIFIZIERUNG:

(viii) INFORMATIONEN ZUM PATENTANWALT/VERTRETER:

- (A) NAME: Zerby, Kim William
- (B) REGISTRIERUNGSNUMMER: 32,323
- (C) REFERENZ-/EINTRAGUNGSNUMMER: 5040R

(ix) KONTAKTINFORMATIONEN:

- (A) TELEFON: (513) 627-2885
- (B) TELEFAX: (513) 627-0318

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ-ID NR. 1:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 19 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure

(C) STRÄNGE: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DER MOLEKÜLE: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID NR. 1:

GAAGCTGCAA CTCGTTAAA

19

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ-ID NR. 2:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 18 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRÄNGE: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DER MOLEKÜLE: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID NR. 2:

GCTGCTCTAG ACAATTCTG

18

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ-ID NR. 3:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 39 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRÄNGE: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DER MOLEKÜLE: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID NR. 3:

GTATTAGGGG CGGACGGTCG AGGCGCCATC AGCTCGATT 39

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ-ID NR. 4:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 33 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRÄNGE: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DER MOLEKÜLE: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID NR. 4:

TCAGGTTCCG TCTCGAGCGT TGCCCAAGGA TTG 33

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ-ID NR. 5:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 22 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRÄNGE: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DER MOLEKÜLE: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID NR. 5:

CACGTTGCTA GCTTGAGTTT AG

22

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ-ID NR. 6:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 1497 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRÄNGE: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DER MOLEKÜLE: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID NR. 6:

GGTCTACTAA AATATTATTC CATACTATAC AATTAATACA CAGAATAATC TGTCTATTGG 60

DE 694 34 962 T2 2008.01.17

TTATTCTGCA AATGAAAAA AGGAGAGGAT AAAGAGTGAG AGGCAAAAA GTATGGATCA 120

GTTTGCTGTT TGCTTTAGCG TTAATCTTTA CGATGGCGTT CGGCAGCACA TCCTCTGCCC 180

AGGCGGCAGG GAAATCAAAC GGGGAAAAGA AATATATTGT CGGGTTTAAA CAGACAATGA 240

GCACGATGAG CGCCGCTAAG AAGAAAGATG TCATTTCTGA AAAAGGCGGG AAAGTGCAAA 300

AGCAATTCAA ATATGTAGAC GCAGCTTCAG TCACATTAAA CGAAAAAGCT GTAAAAGAAT 360

TGAAAAAGA CCCGAGCGTC GCTTACGTTG AAGAAGATCA CGTAGCACAT GCGTACGCGC 420

AGTCCGTGCC TTACGGCGTA TCACAAATTA AAGCCCCTGC TCTGCACTCT CAAGGCTACA 480

CTGGATCAAA TGTTAAAGTA GCGGTTATCG ACAGCGGTAT CGATTCTTCT CATCCTGATT 540

TAAAGGTAGC AAGCGGAGCC AGCATGGTTC CTTCTGAAAC AAATCCTTTC CAAGACAACA 600

ACTCTCACGG AACTCACGTT GCCGGCACAG TTGCGGCTCT TAATAACTCA ATCGGTGTAT 660

TAGGCGTTGC GCCAAGCGCA TCACTTTACG CTGTAAAAGT TCTCGGTGCT GACGGTTCCG 720

GCCAATACAG CTGGATCATT AACGGAATCG AGTGGGCGAT CGCAAACAAT ATGGACGTTA 780

TTAACATGAG CCTCGGCGGA CCTTCTGGTT CTGCTGCTTT AAAAGCGGCA GTTGATAAAG 840

CCGTTGCATC CGGCGTCGTA GTCGTTGCGG CAGCCGGTAA CGAAGGCACT TCCGGCAGCT 900

CAAGCACAGT GGGCTACCCT GGTAAATACC CTTCTGTCAT TGCAGTAGGC GCTGTTGACA 960

GCAGCAACCA AAGAGCATCT TTCTCAAGCG TAGGACCTGA GCTTGATGTC ATGGCACCTG 1020

GCGTATCTAT CCAAAGCACG CTCCTGGAA ACAAATACGG GCGGTACAAC GGTACGTCAA 1080

TGGCATCTCC GCACGTTGCC GGAGCGGCTG CTTTGATTCT TTCTAAGCAC CCGAACTGGA 1140

CAAACACTCA AGTCCGCAGC AGTTTAGAAA ACACCACTAC AAAACTTGGT GATTCTTTGT 1200

ACTATGGAAA AGGGCTGATC AACGTACAAG CGGCAGCTCA GTAAACATA AAAAACCGGC 1260

CTTGCCCCG CCGGTTTTT ATTATTTTTC TTCCTCCGCA TGTTCATCC GCTCCATAAT 1320

CGACGGATGG CTCCCTCTGA AAATTTTAAC GAGAAACGGC GGGTTGACCC GGCTCAGTCC 1380

CGTAACGGCC AACTCCTGAA ACGTCTCAAT CGCCGCTTCC CGGTTTCCGG TCAGCTCAAT 1440

GCCATAACGG TCGGCGGCGT TTCCTGATA CCGGGAGACG GCATTCGTAA TCGGATC 1497

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ-ID NR. 7:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 275 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRÄNGE: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DER MOLEKÜLE: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID NR. 7:

Ala Gln Ser Val Pro Tyr Gly Val Ser Gln Ile Lys Ala Pro Ala Leu

1 5 10 15

His Ser Gln Gly Tyr Thr Gly Ser Asn Val Lys Val Ala Val Ile Asp

20 25 30

Ser Gly Ile Asp Ser Ser His Pro Asp Leu Lys Val Ala Gly Gly Ala

35 40 45

Ser Met Val Pro Ser Glu Thr Asn Pro Phe Gln Asp Asn Asn Ser His

50 55 60

Gly Thr His Val Ala Gly Thr Val Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly

65 70 75 80

DE 694 34 962 T2 2008.01.17

Val Leu Gly Val Ala Pro Ser Ala Ser Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu

85

90

95

Gly Ala Asp Gly Ser Gly Gln Tyr Ser Trp Ile Ile Asn Gly Ile Glu

100

105

110

Trp Ala Ile Ala Asn Asn Met Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly

115

120

125

Pro Ser Gly Ser Ala Ala Leu Lys Ala Ala Val Asp Lys Ala Val Ala

130

135

140

Ser Gly Val Val Val Val Ala Ala Ala Gly Asn Glu Gly Thr Ser Gly

145

150

155

160

Ser Ser Ser Thr Val Gly Tyr Pro Gly Lys Tyr Pro Ser Val Ile Ala

165

170

175

Val Gly Ala Val Asp Ser Ser Asn Gln Arg Ala Ser Phe Ser Ser Val

180

185

190

Gly Pro Glu Leu Asp Val Met Ala Pro Gly Val Ser Ile Gln Ser Thr

195

200

205

Leu Pro Gly Asn Lys Tyr Gly Ala Tyr Asn Gly Thr Ser Met Ala Ser

210

215

220

Pro His Val Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lys His Pro Asn

225

230

235

240

Trp Thr Asn Thr Gln Val Arg Ser Ser Leu Glu Asn Thr Thr Thr Lys

245

250

255

Leu Gly Asp Ser Phe Tyr Tyr Gly Lys Gly Leu Ile Asn Val Gln Ala

260

265

270

Ala Ala Gln

275

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ-ID NR. 8:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 275 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRÄNGE: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DER MOLEKÜLE: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID NR. 8:

Ala Gln Ser Val Pro Tyr Gly Ile Ser Gln Ile Lys Ala Pro Ala Leu

1 5 10 15

His Ser Gln Gly Tyr Thr Gly Ser Asn Val Lys Val Ala Val Ile Asp

20 25 30

Ser Gly Ile Asp Ser Ser His Pro Asp Leu Asn Val Arg Gly Gly Ala

35 40 45

Ser Phe Val Pro Ser Glu Thr Asn Pro Tyr Gln Asp Gly Ser Ser His

50 55 60

Gly Thr His Val Ala Gly Thr Ile Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly

65 70 75 80

Val Leu Gly Val Ser Pro Ser Ala Ser Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu

85 90 95

Asp Ser Thr Gly Ser Gly Gln Tyr Ser Trp Ile Ile Asn Gly Ile Glu

100 105 110

Trp Ala Ile Ser Asn Asn Met Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly

115 120 125

DE 694 34 962 T2 2008.01.17

Pro Thr Gly Ser Thr Ala Leu Lys Thr Val Val Asp Lys Ala Val Ser

130

135

140

Ser Gly Ile Val Val Ala Ala Ala Ala Gly Asn Glu Gly Ser Ser Gly

145

150

155

160

Ser Thr Ser Thr Val Gly Tyr Pro Ala Lys Tyr Pro Ser Thr Ile Ala

165

170

175

Val Gly Ala Val Asn Ser Ser Asn Gln Arg Ala Ser Phe Ser Ser Ala

180

185

190

Gly Ser Glu Leu Asp Val Met Ala Pro Gly Val Ser Ile Gln Ser Thr

195

200

205

Leu Pro Gly Gly Thr Tyr Gly Ala Tyr Asn GLy Thr Ser Met Ala Thr

210

215

220

Pro His Val Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lys His Pro Thr

225

230

235

240

Trp Thr Asn Ala Gln Val Arg Asp Arg Leu Glu Ser Thr Ala Thr Tyr

245

250

255

Leu Gly Asn Ser Phe Tyr Tyr Gly Lys Gly Leu Ile Asn Val Gln Ala

260

265

270

Ala Ala Gln

275

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ-ID NR. 9:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 274 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRÄNGE: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DER MOLEKÜLE: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID NR. 9:

Ala Gln Thr Val Pro Tyr Gly Ile Pro Leu Ile Lys Ala Asp Lys Val

1 5 10 15

Gln Ala Gln Gly Phe Lys Gly Ala Asn Val Lys Val Ala Val Leu Asp

20 25 30

Thr Gly Ile Gln Ala Ser His Pro Asp Leu Asn Val Val Gly Gly Ala

35 40 45

Ser Phe Val Ala Gly Glu Ala Tyr Asn Thr Asp Gly Asn Gly His Gly

DE 694 34 962 T2 2008.01.17

50

55

60

Thr His Val Ala Thr Val Ala Ala Leu Asp Asn Thr Thr Gly Val

65

70

75

80

Leu Gly Val Ala Pro Ser Val Ser Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Asn

85

90

95

Ser Ser Gly Ser Gly Ser Tyr Ser Gly Ile Val Ser Gly Ile Glu Trp

100

105

110

Ala Thr Thr Asn Gly Met Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly Ala

115

120

125

Ser Gly Ser Thr Ala Met Lys Gln Ala Val Asp Asn Ala Tyr Ala Arg

130

135

140

Gly Val Val Val Val Ala Ala Ala Gly Asn Ser Gly Asn Ser Gly Ser

145

150

155

160

Thr Asn Thr Ile Gly Tyr Pro Ala Lys Tyr Asp Ser Val Ile Ala Val

165

170

175

Gly Ala Val Asp Ser Asn Ser Asn Arg Ala Ser Phe Ser Ser Val Gly

180

185

190

DE 694 34 962 T2 2008.01.17

Ala Glu Leu Glu Val Met Ala Pro Gly Ala Gly Val Tyr Ser Thr Tyr

195

200

205

Pro Thr Asn Thr Tyr Ala Thr Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Ser Pro

210

215

220

His Val Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lys His Pro Asn Leu

225

230

235

240

Ser Ala Ser Gln Val Arg Asn Arg Leu Ser Ser Thr Ala Thr Tyr Leu

245

250

255

Gly Ser Ser Phe Tyr Tyr Gly Lys Gly Leu Ile Asn Val Glu Ala Ala

260

265

270

Ala Gln

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ-ID NR. 10:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 269 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRÄNGE: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DER MOLEKÜLE: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID NR. 10:

Ala Gln Ser Val Pro Trp Gly Ile Ser Arg Val Gln Ala Pro Ala Ala

1 5 10 15

His Asn Arg Gly Leu Thr Gly Ser Gly Val Lys Val Ala Val Leu Asp

20 25 30

Thr Gly Ile Ser Thr His Pro Asp Leu Asn Ile Arg Gly Gly Ala Ser

35 40 45

Phe Val Pro Gly Glu Pro Ser Thr Gln Asp Gly Asn Gly His Gly Thr

50 55 60

His Val Ala Gly Thr Ile Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly Val Leu

65 70 75 80

Gly Val Ala Pro Ser Ala Glu Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Gly Ala

85 90 95

Ser Gly Ser Gly Ser Val Ser Ser Ile Ala Gln Gly Leu Glu Trp Ala

100 105 110

Gly Asn Asn Gly Met His Val Ala Asn Leu Ser Leu Gly Ser Pro Ser

DE 694 34 962 T2 2008.01.17

115

120

125

Pro Ser Ala Thr Leu Glu Gln Ala Val Asn Ser Ala Thr Ser Arg Gly

130

135

140

Val Leu Val Val Ala Ala Ser Gly Asn Ser Gly Ala Gly Ser Ile Ser

145

150

155

160

Tyr Pro Ala Arg Tyr Ala Asn Ala Met Ala Val Gly Ala Thr Asp Gln

165

170

175

Asn Asn Asn Arg Ala Ser Phe Ser Gln Tyr Gly Ala Gly Leu Asp Ile

180

185

190

Val Ala Pro Gly Val Asn Val Gln Ser Thr Tyr Pro Gly Ser Thr Tyr

195

200

205

Ala Ser Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Ala

210

215

220

Ala Ala Leu Val Lys Gln Lys Asn Pro Ser Trp Ser Asn Val Gln Ile

225

230

235

240

Arg Asn His Leu Lys Asn Thr Ala Thr Ser Leu Gly Ser Thr Asn Leu

245

250

255

Tyr Gly Ser Gly Leu Val Asn Ala Glu Ala Ala Thr Arg

260

265

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ-ID NR. 11:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 1140 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRÄNGE: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DER MOLEKÜLE: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID NR. 11:

ATGAAGAAAC CGTTGGGGAA AATTGTCGCA AGCACC GCAC TACTCATTTC TGTGCTTTT 60

AGTTCATCGA TCGCATCGGC TGCTGAAGAA GCAAAGAAA AATATTTAAT TGGCTTTAAT 120

GAGCAGGAAG CTGTCAGTGA GTTTGTAGAA CAAGTAGAGG CAAATGACGA GGTCGCCATT 180

CTCTCTGAGG AAGAGGAAGT CGAAATTGAA TTGCTTCATG AATTTGAAAC GATTCCTGTT 240

TTATCCGTTG AGTTAAGCCC AGAAGATGTG GACGCGCTTG AACTCGATCC AGCGATTTCT 300

DE 694 34 962 T2 2008.01.17

TATATTGAAG AGGATGCAGA AGTAACGACA ATGGCGCAAT CAGTGCCATG GGGAATTAGC	360
CGTGTGCAAG CCCAGCTGC CCATAACCGT GGATTGACAG GTTCTGGTGT AAAAGTTGCT	420
GTCCTCGATA CAGGTATTTT CACTCATCCA GACTTAAATA TTCGTGGTGG CGCTAGCTTT	480
GTACCAGGGG AACCATCCAC TCAAGATGGG AATGGGCATG GCACGCATGT GGCCGGGACG	540
ATTGCTGCTT TAAACAATTC GATTGGCGTT CTTGGCGTAG CGCCGAGCGC GGAAGTATAC	600
GCTGTTAAAG TATTAGGGGC GAGCGGTTCA GGTTCGGTCA GCTCGATTGC CCAAGGATTG	660
GAATGGGCAG GGAACAATGG CATGCACGTT GCTAATTTGA GTTTAGGAAG CCCTTCGCCA	720
AGTGCCACAC TTGAGCAAGC TGTTAATAGC GCGACTTCTA GAGGCGTTCT TGTTGTAGCG	780
GCATCTGGGA ATTCAGGTGC AGGCTCAATC AGCTATCCGG CCCGTTATGC GAACGCAATG	840
GCAGTCGGAG CTAAGTACCA AAACAACAAC CGCGCCAGCT TTTCACAGTA TGGCGAGGG	900
CTTGACATTG TCGCACCAGG TGTAACGTG CAGAGCACAT ACCCAGGTTC AACGTATGCC	960
AGCTTAAACG GTACATCGAT GGCTACTCCT CATGTTGCAG GTGCAGCAGC CCTTGTTAAA	1020
CAAAAGAACC CATCTTGGTC CAATGTACAA ATCCGCAATC ATCTAAAGAA TACGGCAACG	1080

AGCTTAGGAA GCACGAACTT GTATGGAAGC GGACTTGTCA ATGCAGAAGC GGCAACACGC 1140

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ-ID NR. 12:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 1140 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRÄNGE: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DER MOLEKÜLE: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID NR. 12:

ATGAAGAAAC CGTTGGGGAA AATTGTCGCA AGCACCGCAC TACTCATTTT TGTGCTTTT 60

AGTTCATCGA TCGCATCGGC TGCTGAAGAA GCAAAGAAA AATATTTAAT TGGCTTTAAT 120

GAGCAGGAAG CTGTCAGTGA GTTTGTAGAA CAAGTAGAGG CAAATGACGA GGTCGCCATT 180

CTCTCTGAGG AAGAGGAAGT CGAAATTGAA TTGCTTCATG AATTTGAAAC GATTCCTGTT 240

TTATCCGTTG AGTTAAGCCC AGAAGATGTG GACGCGCTTG AACTCGATCC AGCGATTTCT 300

TATATTGAAG AGGATGCAGA AGTAACGACA ATGGCGCAAT CAGTGCCATG GGGAATTAGC 360

DE 694 34 962 T2 2008.01.17

CGTGTGCAAG CCCAGCTGC CCATAACCGT GGATTGACAG GTTCTGGTGT AAAAGTTGCT 420

GTCCTCGATA CAGGTATTTT CACTCATCCA GACTTAAATA TTCGTGGTGG CGCTAGCTTT 480

GTACCAGGGG AACCATCCAC TCAAGATGGG AATGGGCATG GCACGCATGT GGCCGGGACG 540

ATTGCTGCTT TAGACAACTC GATTGGCGTT CTTGGCGTAG CGCCGAGCGC GGAAGTATAC 600

GCTGTAAAG TATTAGGGGC GAGCGGTTC GCGCCATCA GCTCGATTGC CCAAGGATTG 660

GAATGGGCAG GGAACAATGG CATGCACGTT GCTAATTTGA GTTTAGGAAG CCCTTCGCCA 720

AGTGCCACAC TTGAGCAAGC TGTTAATAGC GCGACTTCTA GAGGCGTTCT TGTTGTAGCG 780

GCATCTGGGA ATTCAGGTGC AGGCTCAATC AGCTATCCGG CCCGTTATGC GAACGCAATG 840

GCAGTCGGAG CTAAGTACCA AAACAACAAC CGCGCCAGCT TTTCACAGTA TGGCGCAGGG 900

CTTGACATTG TCGCACCAGG TGTAACGTG CAGAGCACAT ACCCAGGTTT AACGTATGCC 960

AGCTTAAACG GTACATCGAT GGCATACTCCT CATGTTGCAG GTGCAGCAGC CCTTGTAA 1020

CAAAAGAACC CATCTTGGTC CAATGTACAA ATCCGCAATC ATCTAAAGAA TACGGCAACG 1080

AGCTTAGGAA GCACGAACTT GTATGGAAGC GGAATTGTCA ATGCAGAAGC GGCAACACGC 1140

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ-ID NR. 13:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 30 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRÄNGE: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DER MOLEKÜLE: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID NR. 13:

TATGCCAGCC ACAACGGTAC TTCGATGGCT

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ-ID NR. 14:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 31 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRÄNGE: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DER MOLEKÜLE: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID NR. 14:

CACAGTTGCG GCTCTAGATA ACTCAATCGG T

(2) INFORMATIONEN ZUR SEQ-ID NR. 15:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 33 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRÄNGE: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DER MOLEKÜLE: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID NR. 15:

GCTGACGGTT CCGGCGCTAT TAGTTGGATC ATT

Patentansprüche

1. Reinigungszusammensetzung, welche Folgendes umfasst:

(a) eine wirksame Menge an Proteaseenzym, bei dem es sich um eine Carbonylhydrolasevariante mit einer Aminosäuresequenz handelt, die nicht in der Natur vorkommt, und die von einer Vorläufer-Carbonylhydrolase abgeleitet ist, und wobei das Proteaseenzym eine Bacillus-lentus-Subtilisinvariante ist, die ausgewählt ist aus N76D/S103A; N76D/V104I; N76D/S99D/S103A; N76D/S99D/V104I; N76D/S101R/S103A; N76D/S101R/V104I; N76D/S103A/V104I; N76D/V104I/I107V; N76D/V104Y/I107V; N76D/V104I/N123S; N76D/S99D/S101R/S103A; N76D/S99D/S101R/V104I; N76D/S99D/S103A/V104I; N76D/S101R/S103A/V104I; N76D/S103A/V104I/N123S; N76D/V104I/I107V/N123S; N76D/S99D/S101R/S103A/V104I; N76D/S99D/S103A/V104I/N123S; N76D/S99D/S101R/S103A/V104I/N123S; N76D/S103A/V104I/S128G; N76D/S103A/V104I/T260P; N76D/S103A/V104I/S265N; N76D/S103A/V104I/D197E; N76D/S103A/V104I/S105A; N76D/S103A/V104I/L135I; N76D/S103A/V104I/L126F; N76D/S103A/V104T/L107T; N76D/S103A/V104I/L126F/S265N und N76D/S103A/V104I/M222A und Mischungen davon; wobei die beziferte Position natürlich vorkommendem Subtilisin von Bacillus amyloliquefaciens entspricht; und

(b) ein oder mehrere Reinigungszusammensetzungsmaterialien, die mit dem Proteaseenzym verträglich sind.

2. Reinigungszusammensetzungen nach Anspruch 1, wobei die Reinigungszusammensetzungsmaterialien ausgewählt sind aus der Gruppe, bestehend aus Tensiden, Lösungsmitteln, Puffer, Enzymen, Schmutzabweisemitteln, Tonschmutzentfernungsmitteln, Dispergierungsmitteln, Authellern, Schaumunterdrückern, Textilweichmachern, Schaumverstärkern, Enzymstabilisatoren, Buildern, Bleichmitteln, Farbstoffen, Duftstoffen und Mischungen davon.

3. Reinigungszusammensetzungen nach Anspruch 1, wobei die Reinigungszusammensetzungsmaterialien mindestens etwa 1% Tensid, bezogen auf das Gewicht der Zusammensetzung, umfassen, wobei das Ten-

sid Materialien enthält, die ausgewählt sind aus der Gruppe, bestehend aus Alkylbenzolsulfonaten, primären Alkylsulfaten, sekundären Alkylsulfaten, Alkylalkoxysulfaten, Alkylalkoxycarboxylaten, Alkylpolyglycosiden und ihren entsprechenden sulfatierten Polyglycosiden, alphasulfonierten Fettsäureestern, Alkyl- und Alkylphenolalkoxylaten, Betainen und Sulfobetainen, Aminoxiden, N-Methylglucamiden, nichtionischen primären Alkoholethoxylaten, nichtionischem primärem gemischtem Alkohol-Ethoxy/Propoxy und Mischungen davon.

4. Reinigungszusammensetzung nach Anspruch 3, die ferner mindestens 5% Builder umfasst, der ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus Zeolithen, Polycarboxylaten, Schichtsilicaten, Phosphaten und Mischungen davon.

5. Reinigungszusammensetzungen nach Anspruch 1, wobei die Reinigungszusammensetzungsmaterialien mindestens ein Bleichmittel umfassen.

6. Reinigungszusammensetzungen nach Anspruch 5, wobei das Reinigungsmittel ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus Percarbonaten, Perboraten und Mischungen davon, und optional ferner mindestens einen Bleichaktivator umfasst.

7. Reinigungszusammensetzungen nach Anspruch 1, wobei die Reinigungszusammensetzungsmaterialien mindestens ein Enzym umfassen, das ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus Cellulasen, Lipasen, Amylasen, Proteasen, Peroxidasen und Mischungen davon.

8. Reinigungszusammensetzungen nach Anspruch 1, wobei die Reinigungszusammensetzungsmaterialien mindestens einen Textilweichmacher umfassen.

9. Reinigungszusammensetzung nach Anspruch 1, die ferner Reinigungszusammensetzungsmaterialien umfasst, die ausgewählt sind aus der Gruppe, bestehend aus Lösungsmitteln, Puffern, Enzymen, Schmutzabweisemitteln, Tonschmutzentfernungsmitteln, Dispergierungsmitteln, Aufhellern, Schaumunterdrückern, Textilweichmachern, Schaumverstärkern, Enzymstabilisatoren, Bleichmitteln, Farbstoffen, Duftstoffen und Mischungen davon.

10. Reinigungszusammensetzung nach Anspruch 1, die ferner mindestens ein Bleichmittel umfasst.

11. Reinigungszusammensetzung nach Anspruch 1, die ferner mindestens ein Enzym umfasst, das ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus Cellulasen, Lipasen, Amylasen, Proteasen, Peroxidasen und Mischungen davon.

12. Textilreinigungszusammensetzung nach Anspruch 1 in Form einer Flüssigkeit, eines Granulats oder in Stückform.

13. Reinigungszusammensetzung nach Anspruch 1, wobei das Proteaseenzym eine Subtilisinvariante ist, die ausgewählt ist aus N76D/V104I, N76D/S99D/V104I, N76D/S103A/V104I, N76D/V104I/I107V, N76D7V104V/I107V, N76D/S101R/S103A/V104I, N76D/S99D/S101R/S103A/V104I, N76D/S101R/V104I und Mischungen davon.

14. Textilreinigungszusammensetzung nach Anspruch 1, wobei das Proteaseenzym eine Bacillus-subtilisin-Variante ist, die ausgewählt ist aus N76D/V104I, N76D/S103A/V104I und Mischungen davon.

15. Textilreinigungszusammensetzung, die Folgendes umfasst:

- (a) von etwa 0,0001% bis etwa 10% Proteaseenzym, bei dem es sich um eine N76D/S103A/V104I-Subtilisinvariante handelt, die von Bacillus-lentus-Subtilisin abgeleitet ist;
- (b) mindestens etwa 5% Tensid;
- (c) mindestens etwa 5% Builder; und
- (d) optional ein oder mehrere Reinigungszusammensetzungsmaterialien, die mit dem Proteaseenzym verträglich sind und die ausgewählt sind aus der Gruppe, bestehend aus Lösungsmitteln, Puffern, Enzymen, Schmutzabweisemitteln, Tonschmutzentfernungsmitteln, Dispergierungsmitteln, Aufhellern, Schaumunterdrückern, Textilweichmachern, Schaumverstärkern, Enzymstabilisatoren, Bleichmitteln, Farbstoffen, Duftstoffen und Mischungen davon.

16. Reinigungszusammensetzung nach Anspruch 15, wobei das Tensid ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus Alkylbenzolsulfonaten, primären Alkylsulfaten, sekundären Alkylsulfaten, Alkylalkoxysulfaten,

Alkylalkoxycarboxylaten, Alkylpolyglycosiden und ihren entsprechenden sulfatierten Polyglycosiden, alpha-sulfonierten Fettsäureestern, Alkyl- und Alkylphenolalkoxylaten, Betainen und Sulfobetainen, Aminoxiden, N-Methylglucamiden, nichtionischen primären Alkoholethoxylaten, nichtionischem primärem gemischtem Alkohol-Ethoxy/Propoxy und Mischungen davon, und wobei ferner der Builder ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus Zeolithen, Polycarboxylaten, Schichtsilicaten, Phosphaten und Mischungen davon.

17. Textilreinigungszusammensetzung nach Anspruch 16, die ferner ein oder mehrere Reinigungszusammensetzungsmaterialien umfasst, die ausgewählt sind aus der Gruppe, bestehend aus Bleichmitteln, Textilweichmachern und Enzymen.

18. Textilreinigungszusammensetzung nach Anspruch 15 in Form einer granulösen Textilreinigungszusammensetzung, die mindestens 30% Tensid umfasst.

19. Geschirrspülzusammensetzung, die Folgendes umfasst:

- (a) 0,0001% bis 10% Proteaseenzym, bei dem es sich um eine Carboxylhydrolasevariante mit einer Aminosäuresequenz handelt, die in der Natur nicht vorkommt und die abgeleitet ist von einer Subtilisinvorläufer-Carboxylhydrolase, und wobei das Proteaseenzym eine Bacillus-lentus-Subtilisinvariante ist, die ausgewählt ist aus N76D/S103A; N76D/V104I; N76D/S99D/S103A; N76D/S99D/V104I; N76D/S101R/S103A; N76D/S101R/V104I; N76D/S103A/V104I; N76D/V104I/I107V; N76D/V104Y/I107V; N76D/V104I/N123S; N76D/S99D/S101R/S103A; N76D/S99D/S101R/V104I; N76D/S99D/S103A/V104I; N76D/S101R/S103A/V104I; N76D/S103A/V104I/N123S; N76D/V104I/I107V/N123S; N76D/S99D/S101R/S103A/V104I; N76D/S99D/S103A/V104I/N123S; N76D/S99D/S101R/S103A/V104I/N123S; N76D/S103A/V104I/S128G; N76D/S103A/V104I/T260P; N76D/S103A/V104I/S265N; N76D/S103A/V104I/D197E; N76D/S103A/V104I/S105A; N76D/S103A/V104I/L135I; N76D/S103A/V104I/L126F; N76D/S103A/V104T/L107T; N76D/S103A/V104I/L126F/S265N, wobei die bezifferte Position natürlich vorkommendem Subtilisin von Bacillus amyloliquefaciens entspricht; und N76D/S103A/V104I/M222A und Mischungen davon;
- (b) etwa 0,1% bis etwa 10% Tensid; und
- (c) optional ein oder mehrere Reinigungszusammensetzungsmaterialien, die mit dem Proteaseenzym verträglich sind, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Lösungsmitteln, Puffern, Enzymen, Dispergierungsmitteln, Schaumunterdrückern, Enzymstabilisatoren, Bleichmitteln, Farbstoffen, Duftstoffen und Mischungen davon.

20. Geschirrspülzusammensetzung nach Anspruch 19, wobei das Proteaseenzym eine N76D/S103A/V104I-Subtilisinvariante ist, die von Bacillus-lentus-Subtilisin abgeleitet ist.

21. Körperreinigungszusammensetzung, die Folgendes umfasst:

- (a) etwa 0,001 Gew.-% bis etwa 5 Gew.-% Proteaseenzym, bei dem es sich um eine Carboxylhydrolasevariante mit einer Aminosäuresequenz handelt, die in der Natur nicht vorkommt, und die von einer Vorläufer-Carboxylhydrolase abgeleitet ist, und wobei das Proteaseenzym eine Bacillus-lentus-Subtilisinvariante ist, die ausgewählt ist aus N76D/S103A; N76D/V104I; N76D/S99D/S103A; N76D/S99D/V104I; N76D/S101R/S103A; N76D/S101R/V104I; N76D/S103A/V104I; N76D/V104I/I107V; N76D/V104Y/I107V; N76D/V104I/N123S; N76D/S99D/S101R/S103A; N76D/S99D/S101R/V104I; N76D/S99D/S103A/V104I; N76D/S101R/S103A/V104I; N76D/S103A/V104I/N123S; N76D/V104I/I107V/N123S; N76D/S99D/S101R/S103A/V104I; N76D/S99D/S103A/V104I/N123S; N76D/S99D/S101R/S103A/V104I/N123S; N76D/S103A/V104I/S128G; N76D/S103A/V104I/T260P; N76D/S103A/V104I/S265N; N76D/S103A/V104I/D197E; N76D/S103A/V104I/S105A; N76D/S103A/V104I/L135I; N76D/S103A/V104I/L126F; N76D/S103A/V104T/L107T; N76D/S103A/V104I/L126F/S265N und N76D/S103A/V104I/M222A und Mischungen davon; wo die bezifferte Position natürlich vorkommendem Subtilisin von Bacillus amyloliquefaciens entspricht, und.
- (b) zu 0,01 Gew.-% bis 95 Gew.-% ein Tensidsystem; und
- (c) optional zu 0,05% bis 50% einen Enzymstabilisator.

22. Zusammensetzung nach Anspruch 20, wobei das Proteaseenzym einen Anteil von etwa 0,001 Gew.-% bis etwa 2 Gew.-% hat.

23. Zusammensetzung nach Anspruch 20, wobei das Proteaseenzym einen Anteil von etwa 0,01 Gew.-% bis etwa 0,8 Gew.-% hat.

24. Zusammensetzung nach Anspruch 20, wobei das Tensidsystem ein Tensid umfasst, das ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus anionischen Carboxylaten, Aminoxiden, Alkylglucosiden, Glucoseamiden, Alkylsulfaten, Alkylethersulfaten, Acylisethionaten, Alkylsulfosuccinaten, Alkylphosphateestern, ethoxylierten Phosphateestern, Alkylglycerylethersulfonaten oder Mischungen davon.

25. Zusammensetzung nach Anspruch 20, wobei das Tensidsystem ein Tensid umfasst, das ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus Seifen, Acylglutamaten, Alkylsarcosinaten, Lauraminoxiden, Kokosaminoxiden, Kokosamidopropylaminoxiden, Decylglucosiden, Laurylsulfaten, Laurethsulfaten, C₁₂-C₁₈-Acylisethionaten oder Mischungen davon.

26. Zusammensetzung nach Anspruch 25, wobei das Tensid eine Seife mit einem Anteil von mindestens 2 Gew.-% der Zusammensetzung ist.

27. Zusammensetzung nach Anspruch 26, wobei die Seife in einem Anteil von mindestens 10 Gew.-% der Zusammensetzung vorliegt.

28. Zusammensetzung nach Anspruch 27, wobei die Seife in einem Anteil von mindestens 25 Gew.-% der Zusammensetzung vorliegt.

29. Zusammensetzung nach Anspruch 25, wobei das Verhältnis von Seife zu Proteaseenzym 2.000:1 bis 8:1 ist.

30. Zusammensetzung nach Anspruch 29, wobei das Verhältnis von Seife zu Proteaseenzym 400:1 bis 40:1 ist.

31. Zusammensetzung nach Anspruch 25, wobei das Proteaseenzym eine Carboxylhydrolasevariante mit einer Aminosäuresequenz, die in der Natur nicht vorkommt, ist und abgeleitet ist von einer Subtilisinvorläufer-Carboxylhydrolase, und wobei das Proteaseenzym eine Bacillus-lentus-Subtilisinvariante ist, die ausgewählt ist aus N76D/S103A; N76D/V104I; N76D/S99D/S103A; N76D/S99D/V104I; N76D/S101R/S103A; N76D/S101R/V104I; N76D/S103A/V104I; N76D/V104I/I107V; N76D/V104Y/I107V; N76D/V104I/N123S; N76D/S99D/S101R/S103A; N76D/S99D/S101R/V104I; N76D/S99D/S103A/V104I; N76D/S101R/S103A/V104I; N76D/S103A/V104I/N123S; N76D/V104I/I107V/N123S; N76D/S99D/S101R/S103A/V104I; N76D/S99D/S103A/V104I/N123S; N76D/S99D/S101R/S103A/V104I/N123S; N76D/S103A/V104I/S128G; N76D/S103A/V104I/T260P; N76D/S103A/V104I/S265N; N76D/S103A/V104I/D197E; N76D/S103A/V104I/S105A; N76D/S103A/V104I/L135I; N76D/S103A/V104I/L126F; N76D/S103A/V104T/L107T; N76D/S103A/V104I/L126F/S265N und N76D/S103A/V104I/M222A; wobei die bezifferte Position natürlich vorkommendem Subtilisin von Bacillus amyloliquefaciens entspricht; und Mischungen davon.

32. Verfahren zur Reinigung von Textilien, wobei das Verfahren das Inkontaktbringen eines textilen Stoffes, der gereinigt werden muss, mit einem Proteaseenzym, bei dem es sich um eine N76D/S103A/V104I-Subtilisinvariante handelt, die von Bacillus-lentus-Subtilisin abgeleitet ist, umfasst.

33. Verfahren zur Reinigung von Geschirr, wobei das Verfahren das Inkontaktbringen von Geschirr, das gereinigt werden muss, mit einem Proteaseenzym, bei dem es sich um eine N76D/S103A/V104I-Subtilisinvariante handelt, die von Bacillus-lentus-Subtilisin abgeleitet ist, umfasst.

Es folgen 20 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

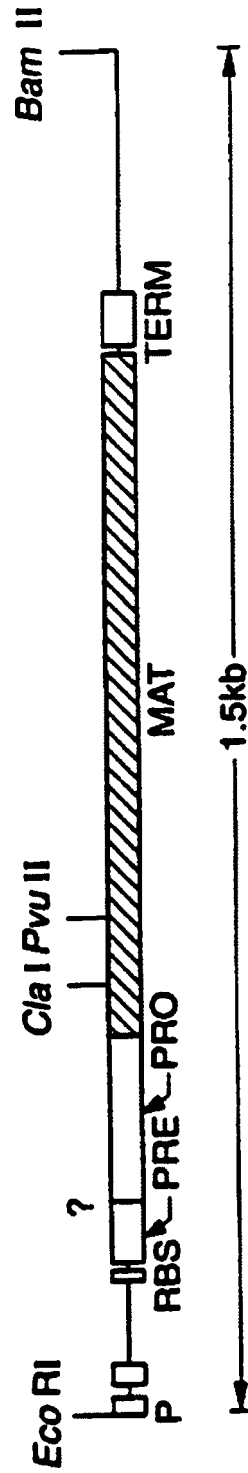


FIG. 1A

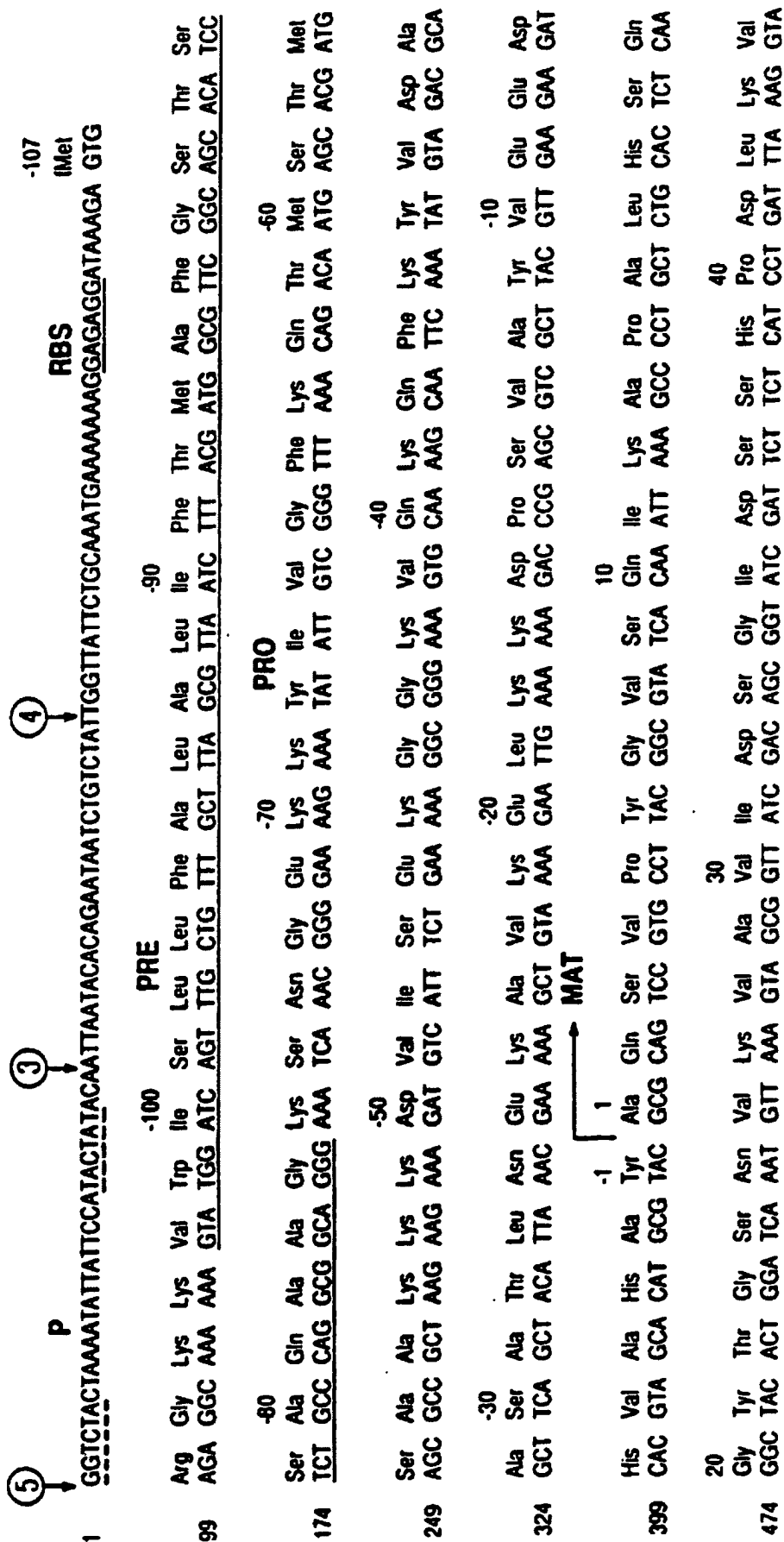


FIG. 1B - 1

50
 Ala Gly Gly Ala Ser Met Val Val Pro Ser Glu Thr Asn Pro Phe Gln Asp Asp 60 Asp
 549 GCA GGC GGA GCC AGC ATG GTT CCT TCT TCT GAA ACA AAT CCT TTC CAA GAC AAC AAC TCT CAC²GGA ACT His Thr Gly His Val Ala
 70
 Gly Thr Val Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly Val Leu Gly Val Ala Pro Ser Ala Ser 90
 624 GGC ACA GTT GCG GCT CTT AAT AAC TCA ATC GGT GTA TTA GGC GTT GCG CCA AGC GCA TCA CTT TAC Tyr Ala Val Lys
 100
 Asp Ala 100
 Val Leu Gly Ala Asp Gly Ser Gly Gln Tyr Ser Trp Ile Asn Gly Ile Glu Trp Ala Ile Ala Asn Asn Met
 699 GTT CTC GGT GCT GAC GGT TCC GGC CAA TAC AGC TGG ATC ATT AAC GGA ATC GAG TGG GCG ATC GCA AAC AAT ATG
 110
 120
 Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly Pro Ser Gly Ser Ala Ala Leu Lys Ala Val Asp 140
 774 GAC GTT ATT AAC ATG AGC CTC GGC GGA CCT TCT GGT TCT GCT GCT TTA AAA GCG GCA GTT GAT AAA GCC GTT GCA
 130
 150
 Ser Gly Val Val Val Val Ala Ala Gly Asn Glu Gly Thr Ser Thr 160
 849 TCC GGC GTC GTA GTC GTT GCG GCA GCC GGT AAC GAA GGC ACT TCC GGC AGC TCA AGC ACA GTG GGC TAC CCT Gly
 170
 180
 Lys Tyr Pro Ser Val Ile Ala Val Gly Ala Val Asp Ser Ser Ser Asn Gln Arg Ala Ser Phe Ser Ser 190
 924 AAA TAC CCT TCT GTC ATT GCA GTA GGC GCT GTT GAC AGC AGC AAC CAA AGA GCA TCT TTC TCA AGC GTA GGA CCT
 200
 210
 Glu Leu Asp Val Met Ala Pro Gly Val Ser Ile Gln Ser Thr Leu Pro Gly Asn Lys Tyr Gly Ala Tyr Asn Gly
 999 GAG CTT GAT GTC ATG GCA CCT GGC GTA TCT ATC CAA AGC ACG CTT CCT GGA AAC AAA TAC GGG GCG TAC AAC GGT
 220
 230
 Thr Ser Met Ala Ser Pro His Val Val Ala Gly Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lys His Pro Asn Thr 240
 1074 ACG TCA ATG GCA TCT CCG CAC GTT GCC GGA GCG GCT GCT TTG ATT CTT TCT AAG CAC CCG AAC TGG ACA AAC ACT

FIG. 1B - 2

FIG. 1B - 3

FIG. 1B

FIG. 1B-1

FIG. 1B-2

FIG. 1B-3

KONSERVIERTE RESTE IN SUBTILISINEN VON
BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS

1	10	20
A Q S V P . G	A P A . H . .	G
21	30	40
. T G S . V K V A V . D . G		H P
41	50	60
D L . . . G G A S . V P		Q D
61	70	80
. N . H G T H V A G T . A A L N N S I G		
81	90	100
V L G V A P S A . L Y A V K V L G A . G		
101	110	120
S G . . S . L . . G . E W A . N		
121	130	140
V . N . S L G . P S . S		A . .
141	150	160
. G V . V V A A . G N . G . . .		
161	170	180
. Y P . . Y		A V G A .
181	190	200
D . . N . . A S F S . . G . . L D . . A		
201	210	220
P G V . . Q S T . P G . . Y . . .		N G T
221	230	240
S M A . P H V A G A A A L . . .		K . . .
241	250	260
W . . . Q . R . . L . N T . . .		L G . .
261	270	
. . Y G . G L . N . . A A . .		

FIG._2

VERGLEICH VON SUBTILISINSEQUENZEN VON

*B. amyloliquefaciens**B. subtilis**B. licheniformis**B. lentus*

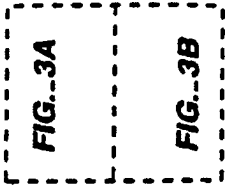
01	10	20	30	
A Q S V P Y G V S Q I K A P A L H S Q G Y T G S N V K V A V I D S G I D S S H P				
A Q S V P Y G I S Q I K A P A L H S Q G Y T G S N V K V A V I D S G I D S S H P				
A Q T V P Y G I P L I K A D K V Q A H N R G L T G S G V K V A V L D T G I Q A S H P				
A Q S V P W G I S R V Q A P A A H N R G L T G S G V K V A V L D T G I S T * H P				
41	50	60	70	
D L K V A G G A S M V P S E T N P F Q D N N S H G T H V A G T V A A L N N S I G				
D L N V R G G A S F V P S E T N P F Y Q D D G S S H G T H V A G T V A A L N N S I G				
D L N V V G G A S F V A G E A Y N * T D D G N G H G T H V A G T V A A L N N T T G				
D L N I R G G A S F V P G E * P S T Q D D G N G H G T H V A G T V A A L N N S I G				
81	90	100	110	
V L G V A P S A S L Y A V K V L G A D G S G Q Y S W I I N G I E W A I A N N M D				
V L G V S P S A S L Y A V K V L D S T G S G Q Y S W I I N G I E W A I A N N M D				
V L G V A P S V S L Y A V K V L N S S G S G S Y S G I V S G I E W A T N N G M D				
V L G V A P S A E L Y A V K V L G A S G S G S V S S I A Q G L E W A G N N G M H				
121	130	140	150	
V I N M S L G G P S G S A A L K A A V D K A V A S G V V V A A A G N E G T S G				
V I N M S L G G P T G S T A L K K T V V D K A V S S G I V V A A A A G N E G S S G				
V I N M S L G G A S G S T A M K Q A V D N A Y A R G V V V A A A A G N S G N S G				
V A N L S L G S P S A T L E Q A V N S A T S R G V L V A A A A G N S G A G S				

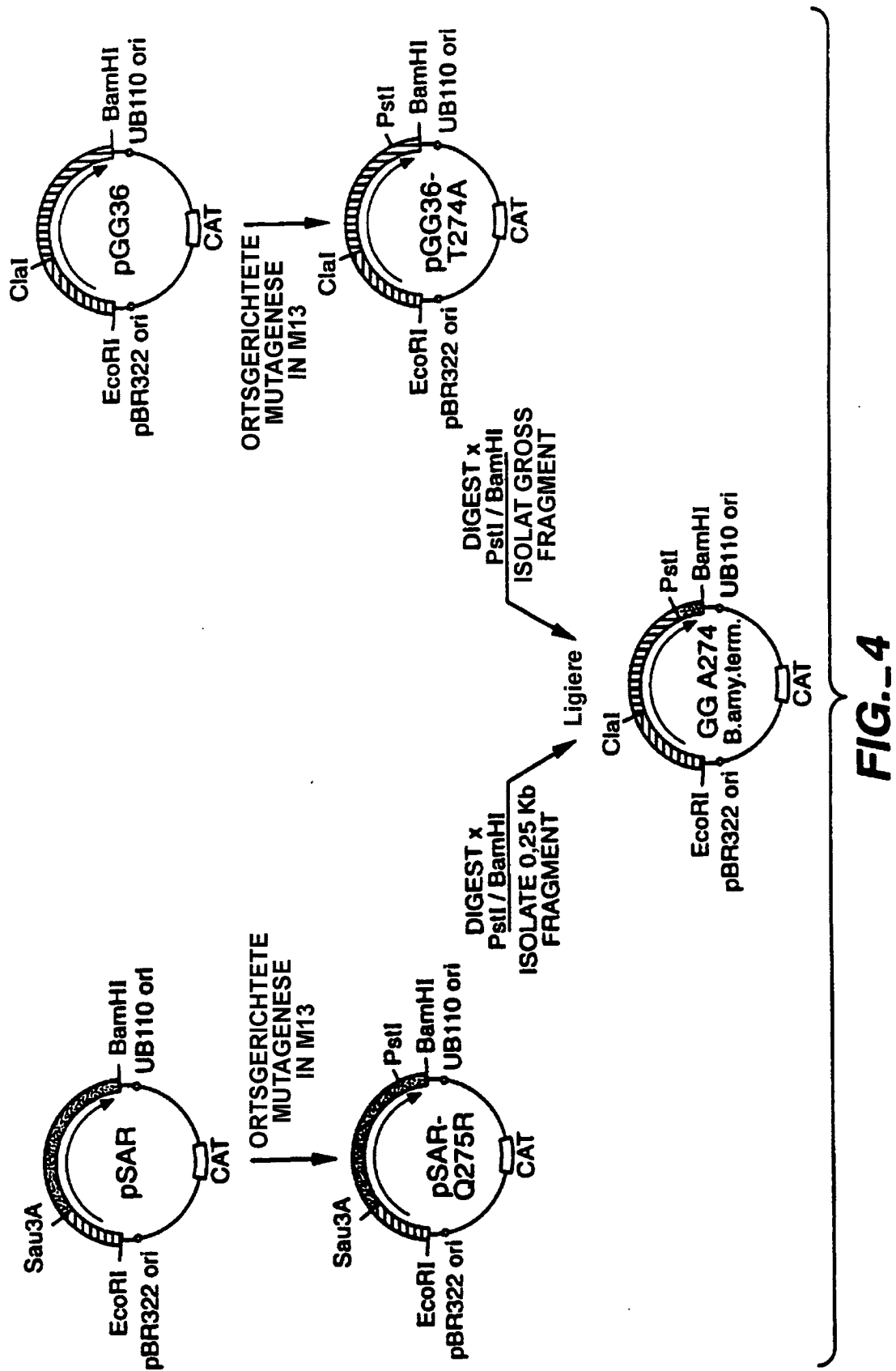
FIG._3A

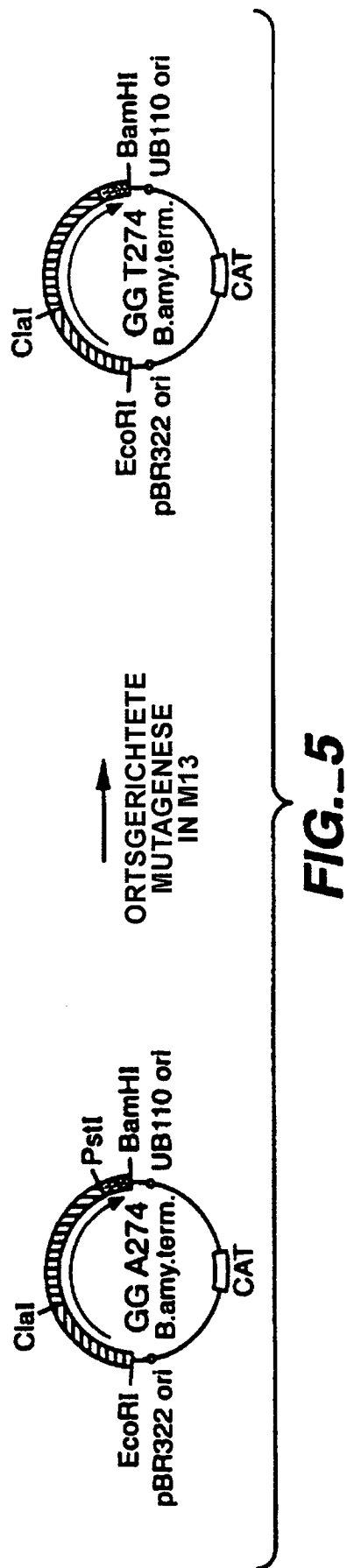
161 S S S T V G Y P G K Y P S V I A V G A V D S S N Q R A S F S S V G P E L D V M A
170 S T S T V G Y P A K Y P S T I A V G A V N S S N Q R A S F S S A G S E L D V M A
S T N T I G Y P A K Y P D S V I A V G A V D S S N Q R A S F S S V G A E L D E V M A
* * * I S Y P A R Y A N A M A V G A T D Q N N N R A S F S S Q Y G A G L D I V A
180
190
201 P G V S I Q S T L P G N K Y G A Y N G T S M A S P H V A G A A A L I L S K H P N
210 P G V S I Q S T L P G G T Y G A T Y G A T L N G T S M A T P H V A G A A A L I L S K H P T
P G A G V Y S T Y P G S T Y A S L N G T S M A T P H V A G A A A L I L S K H P N
P G V N V Q S T Y P G S T Y A S L N G T S M A T P H V A G A A A L I L S K H P S
220
230
241 W T N T Q V R S S L E N T T T K L G D S F Y Y G K G L I N V Q A A A Q
250 W T N A Q V R D R L E S S T A T Y L G N S F Y Y G K G L I N V Q A A A Q
L S A S Q V R N R L S S T A T Y L G S S F Y Y G K G L I N V E A A A Q
W S N V Q I R N H L K N T A T S L G S T N L Y G S G L V N A E A A T R
260
270

FIG._3B

FIG._3







10 30 50
 ATGAAGAAACCGTTGGGAAATGTGCGAAGCACCGCACTACTTCTGTGCTTTT
 MetLysLysProLeuGlyLysIleValAlaSerThrAlaLeuLeuIleSerValAlaPhe

70 90 110
 AGTTCATCGATCGCATCGGCTGCTGAAGCAAGCAAAATAATTTAATTGGCTTTAAT
 SerSerSerIleAlaSerAlaAlaGluGluAlaLysGluLysTyrLeuIleGlyPheAsn

130 150 170
 GAGCAGGAAGCTGTCAGTGAGTTGTAGAACAAAGTAGAGGCAAAATGACGAGTGCCATT
 GluGlnGluAlaValSerGluPheValGluGlnValGluAlaAsnAspGluValAlaIle

190 210 230
 CTCTCTGAGGAAGAGTCGAAATTGAATTGCTTCATGAATTTGAAACGATTCCCTGTT
 LeuSerGluGluGluGluValGluIleGluLeuLeuHisGluPheGluThrIleProVal

250 270 290
 TTATCCGTTGAGTTAAGCCAGAGATGTGGACGGCTTGAACTCGATCCAGCGATTCT
 LeuSerValGluLeuSerProGluAspValAspAlaLeuGluLeuAspProAlaIleSer

310 330 350
 TATATTGAGAGGATGCAGAGTAACGACAATGGCGCAATCAGTGCCATGGGGAATTAGC
 TyrIleGluGluAspAlaGluValThrThrMetAlaGlnSerValProTyrGlyIleSer

370 390 410
 CGTGTCAGAGCCCGAGCTGCCCATAAACCGTGGATTGACAGGTTCTGGTGTAAAGTTGCT
 ArgValGlnAlaProAlaAlaHisAsnArgGlyLeuThrGlySerGlyValLysValAla

FIG._6A

430 450 470
 GTCCTGATACAGGTATTTCCACTCATCCAGACTTAAATATTCGTGGTGGCGTAGCTTT
 ValLeuAspThrGlyIleSerThrHisProAspLeuAsnIleArgGlyGlyAlaSerPhe

 490 510 530
 GTACCAGGGGAACCATCCACTCAAGATGGGAATGGCATGGCACGCATGTGGCCGGGACG
 ValProGlyGluProSerThrGlnAspGlyAsnGlyHisGlyThrHisValAlaGlyThr

 550 570 590
 ATTGCTGCTTTAAACAATTTCGATTGGCGTTCTTGGCGTAGCGCGGAGCGGGAACATAC
 IleAlaAlaLeuAsnAsnSerIleGlyValLeuGlyValAlaProSerAlaGluLeuTyr

 610 630 650
 GCTGTAAAGTATTAGGGCGGAGCGGTTTCAGGTTTCGGTCAGCTCGATTGCCCAAGGATTG
 AlaValIleValLeuGlyAlaSerGlySerGlySerValSerSerIleAlaGlnGlyLeu

 670 690 710
 GAATGGGCAGGGAACAATGGCATGCACGTTGCTAATTGAGTTTAGGAAGCCCTTCGCCA
 GluTrpAlaGlyAsnAsnGlyMetHisValAlaAsnLeuSerLeuGlySerProSerPro

 730 750 770
 AGTGCCACACTTGAGCAAGCTGTTAATAGCGCGACTTCTAGAGCGGTTCTTGTGTAGCG
 SerAlaThrLeuGluGlnAlaValAsnSerAlaThrSerArgGlyValLeuValValAla

 790 810 830
 GCATCTGGGAATTCAGGTGCAGGCTCAATCAGCTATCCGGCCCGTTATGCCAAGCAATG
 AlaSerGlyAsnSerGlyAlaGlySerIleSerTyrProAlaArgTyrAlaAsnAlaMet

FIG._6B

850	870	890
GCAGTCGGAGCTACTGACCAAAACAACCGCGCCAGCTTTTCACAGTATGGCGCAGGG		
AlaValGlyAlaThrAspGlnAsnAsnAsnArgAlaSerPheSerGlnTyrGlyAlaGly		
910	930	950
CTTGACATTGTCGCCACCAGGTGTAAACGTGCAGAGCACATACCCAGGTTCAACGTATGCC		
LeuAspIleValAlaProGlyValAsnValGlnSerThrTyrProGlySerThrTyrAla		
970	990	1010
AGCTTAAACGGTACATCGATGGCTACTCCTCATGTTGCAGGTGCAGCCCTTGTATAA		
SerLeuAsnGlyThrSerMetAlaThrProHleValAlaGlyAlaAlaLeuValLys		
1030	1050	1070
CAAAAGAACCCATCTTGGTCCAATGTACAAATCCGCAATCATCTAAAGAATACGGCAACG		
GlnLysAsnProSerTrpSerAsnValGlnIleArgAsnHleLeuLysAsnThrAlaThr		
1090	1110	1130
AGCTTAGGAAGCACGAACCTTGATGGAGCGGACTTGTCAATGCAGAAGCGGCAACACGC		
SerLeuGlySerThrAsnLeuTyrGlySerGlyLeuValAsnAlaGluAlaAlaThrArg		

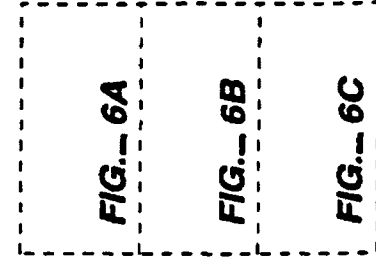
FIG._ 6C**FIG._ 6**

FIG. 7A

430 450 470
 GTCCTGATACAGGTATTCCACTCATCCAGACTTAATAATTCGTGGTGGCGTAGCTTT
 ValLeuAspThrGlyIleSerThrHisProAspLeuAsnIleArgGlyGlyAlaSerPhe

 490 510 530
 GTACCAGGGGAACCATCCACTCAAGATGGGAATGGCATGGCACGCATGTGGCCGGACG
 ValProGlyGluProSerThrGlnAspGlyAsnGlyHisGlyThrHisValAlaGlyThr

 550 570 590
 ATTGCTGCTTTAGACAACTCGATTGGCGTTCTTGGCGTAGCCCGAGCGCGGAACATATAC
 IleAlaAlaLeuAspAsnSerIleGlyValLeuGlyValAlaProSerAlaGluLeuTyr

 610 630 650
 GCTGTAAAGTATTAGGGCGAGCGGTTCAGGGCCATCAGCTCGATTGCCCAAGGATTG
 AlaValIleValLeuGlyAlaSerGlySerGlyAlaIleSerSerIleAlaGlnGlyLeu

 670 690 710
 GAATGGGCAGGGAACAATGGCATGCACGTTGCTAATTGAGTTTAGGAAGCCCTTCGCCA
 GluTrpAlaGlyAsnAsnGlyMethIleValAlaAsnLeuSerLeuGlySerProSerPro

 730 750 770
 AGTGCCACACTTGAGCAAGCTGTTAATAGCGCGACTTCTAGAGCGGTTCTTGTGTAGCG
 SerAlaThrLeuGluGlnAlaValAsnSerAlaThrSerArgGlyValLeuValValAla

 790 810 830
 GCATCTGGGAATTCAGGTGCAGGCTCAATCAGCTATCCGGCCCGTTATGCCAAGCAATG
 AlaSerGlyAsnSerGlyAlaGlySerIleSerTyrProAlaArgTyrAlaAsnAlaMet

FIG._7B

850 870 890
GCAGTCGGAGCTACTGACCAAAACAACCGCGCCAGCTTTTCACAGTATGGCGCAGGG
AlaValGlyAlaThrAspGlnAsnAsnAsnArgAlaSerPheSerGlnTyrGlyAlaGly
910 930 950
CTTGACATTGTCGCCACCAGGTGTAAACGTGCAGAGCACATACCAGGTTTCAACGTATGCC
LeuAspIleValAlaProGlyValAsnValGlnSerThrTyrProGlySerThrTyrAla
970 990 1010
AGCTTAAACGGTACATCGATGGCTACTCCTCATGTTGCAGGTGCAGCCCTTGTTAAA
SerLeuAsnGlyThrSerMetAlaThrProHisValAlaGlyAlaAlaLeuValLys
1030 1050 1070
CAAAAGAACCCCATCTTGGTCCAATGTACAAATCCGCAATCATCTAAAGAATACGGCAACG
GlnLysAsnProSerTrpSerAsnValGlnIleArgAsnHisLeuLysAsnThrAlaThr
1090 1110 1130
AGCTTAGGAAGCACGAACTTGTATGGAGCGGACTTGTCAATGCAGAGCGGCAACACGC
SerLeuGlySerThrAsnLeuTyrGlySerGlyLeuValAsnAlaGluAlaAlaThrArg

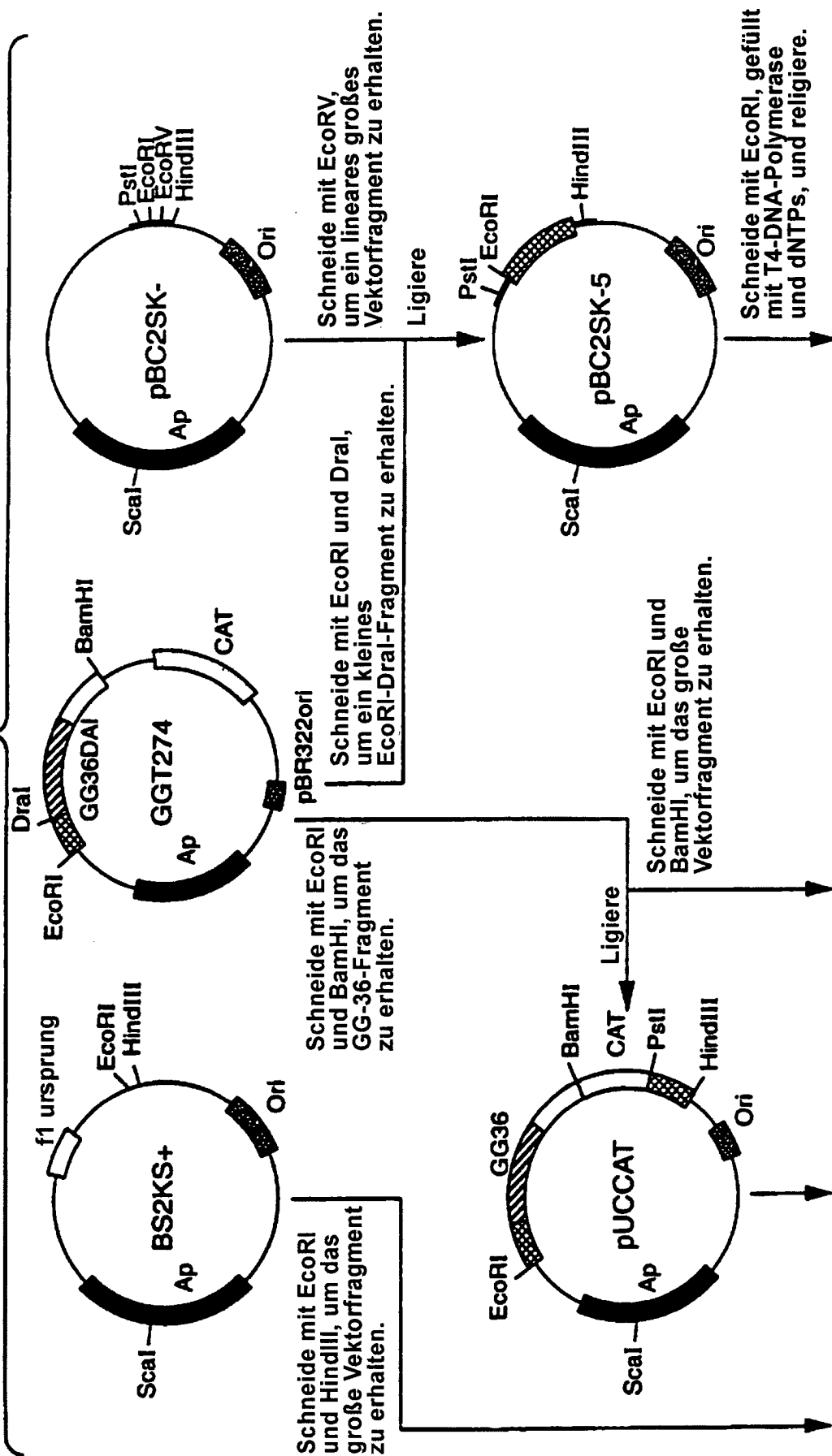
FIG._7C

FIG._ 7A

FIG._ 7B

FIG._ 7C

FIG._7

FIG. 8A

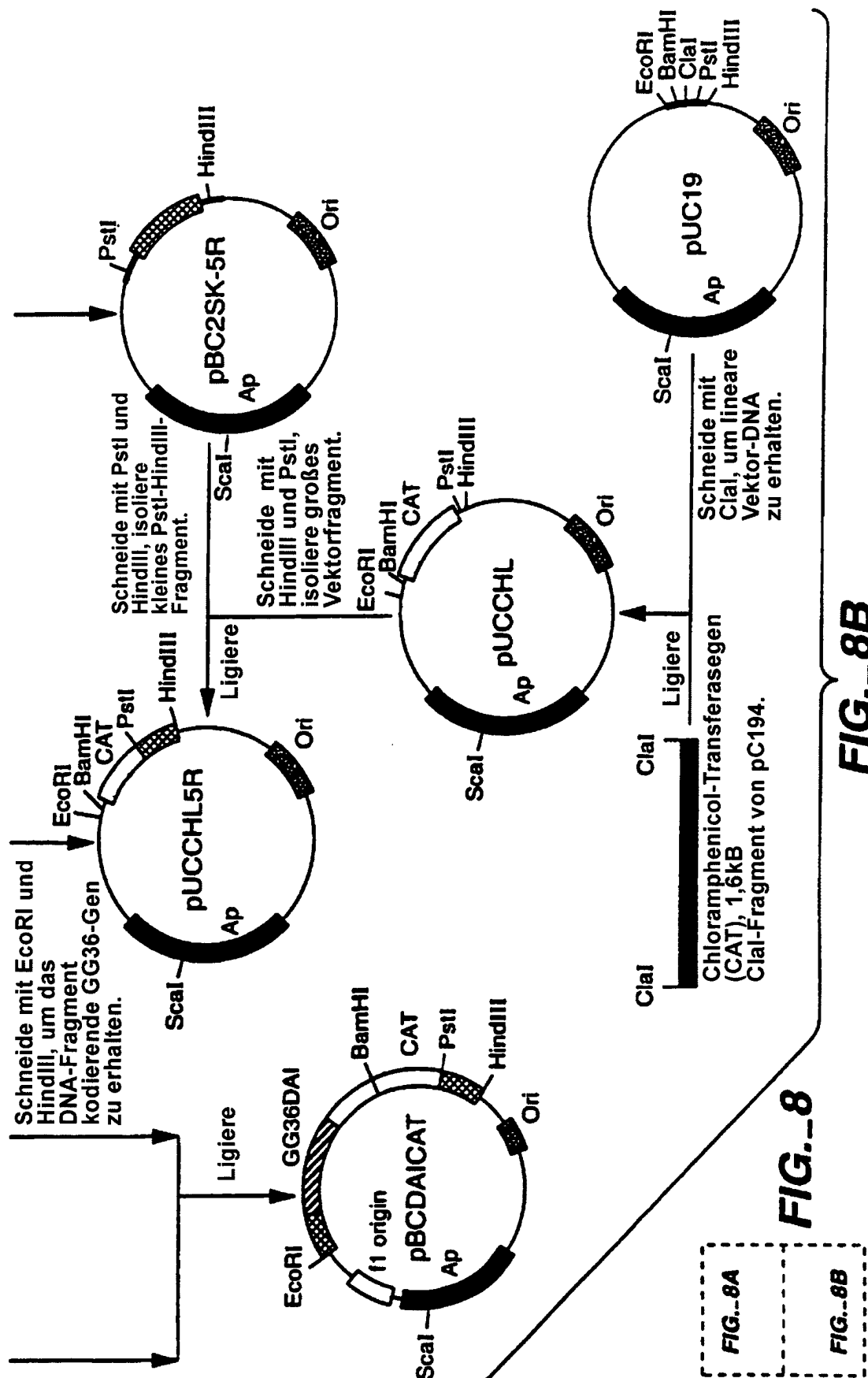
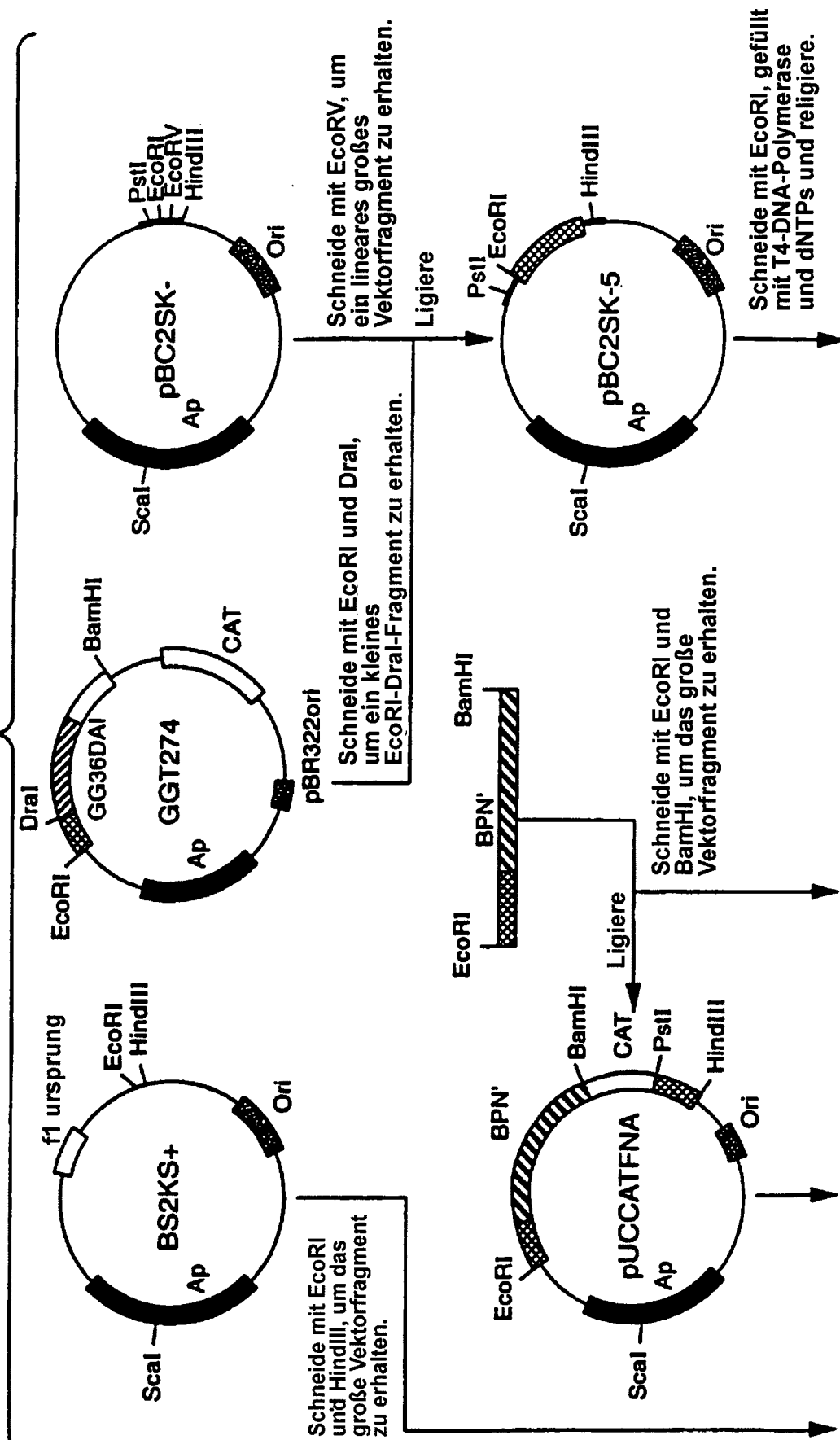
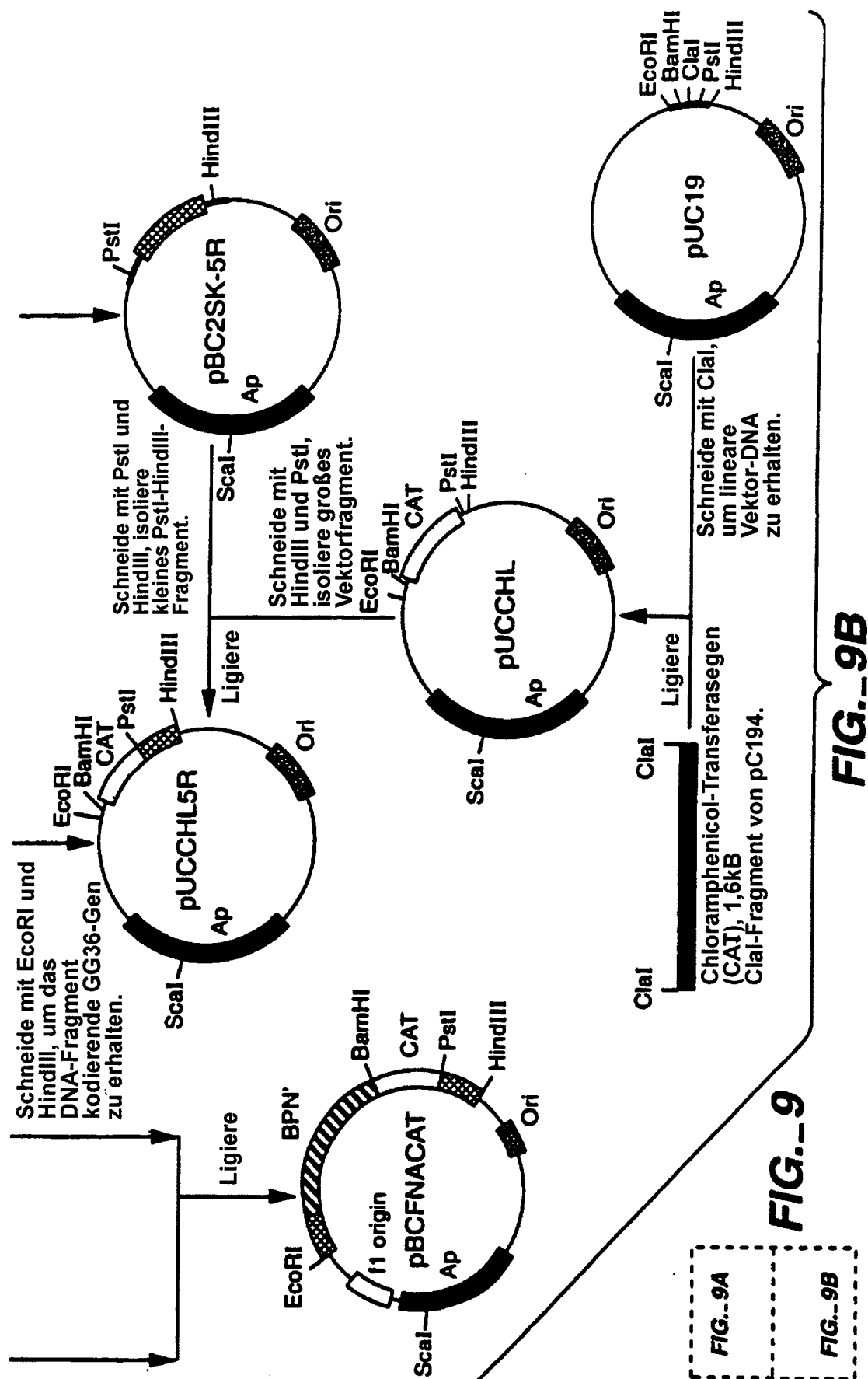


FIG. 9A



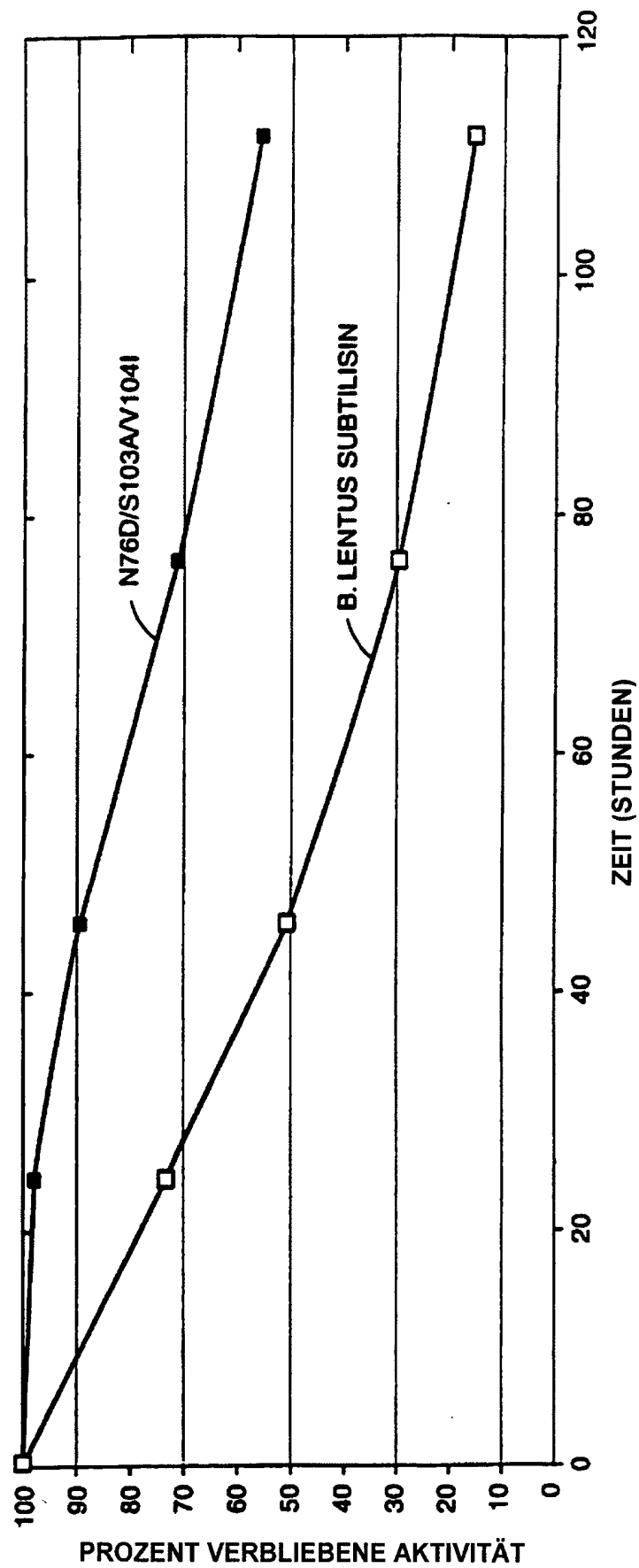


FIG. 10