

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

(19) Weltorganisation für geistiges
Eigentum

Internationales Büro

(43) Internationales
Veröffentlichungsdatum

17. September 2015 (17.09.2015)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer

WO 2015/135757 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:

C12N 9/18 (2006.01) C11D 3/386 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2015/053991

(22) Internationales Anmeldedatum:

26. Februar 2015 (26.02.2015)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:

10 2014 204 374.3 11. März 2014 (11.03.2014) DE

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

(72) Erfinder: WEBER, Thomas; Herrenweg 7 b, 41541
Dormagen (DE). HELLMUTH, Hendrik; Grafenberger
Allee 155, 40237 Düsseldorf (DE). O'CONNELL,
Timothy; Peter-Roos-Straße 16, 40547 Düsseldorf (DE).
ZIMMERMANN, Wolfgang; Dittrichring 16, 04109
Leipzig (DE). WEI, Ren; Holsteinstraße 50, 04317
Leipzig (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW,

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

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

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz
3)

— mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung (Regel 5
Absatz 2 Buchstabe a)

(54) Title: PET-ESTERASES AND USE THEREOF

(54) Bezeichnung : PET-ESTERASEN UND DEREN VERWENDUNG

(57) Abstract: The invention relates to esterases and esterase variants and to their use in the hydrolysis of polyesters, in addition to in processes for the treatment and care of laundry articles and fabrics, in particular for improving the wearability of the latter and for preventing, reducing or eliminating pilling in fabrics containing polyester. The invention also relates to methods for increasing the hydrophilic properties of polyester fibres and for decomposing polyesters in laundry fibres. The invention further relates to the production of said esterases and to agents containing same.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Esterasen und Esterase-Varianten und deren Anwendung zur Hydrolyse von Polyestern sowie in Verfahren zur Behandlung und Pflege von Wäsche und Textilien, insbesondere dem Verbessern des Tragekomforts und dem Schutz vor oder zur Verminderung bzw. Verhinderung des Pillings bei Polyester enthaltenden Textilien sowie Verfahren zur Erhöhung der Hydrophilizität von Polyesterfasern und Abbau von Polyestern aus Wäschefasern. Ferner betrifft die Erfindung auch die Herstellung der Esterasen und Mittel die diese enthalten



WO 2015/135757 A1

„PET-Esterasen und deren Verwendung“

Die Erfindung liegt auf dem Gebiet der Enzymtechnologie. Die Erfindung betrifft Esterasen und insbesondere deren Anwendung zur Hydrolyse von Polyestern sowie in Verfahren zur Behandlung und Pflege von Wäsche und Textilien, insbesondere dem Verbessern des Tragekomforts und dem Schutz vor oder zur Verminderung bzw. Verhinderung des Pillings bei Polyester enthaltenden Textilien sowie Verfahren zur Erhöhung der Hydrophilizität von Polyesterfasern und Abbau von Polyestern aus Wäschefasern. Schließlich betrifft die Erfindung auch Esterasen als solche, deren Herstellung und Mittel die diese enthalten.

Unter Pilling versteht man das durch Reiben bewirkte Herausziehen feiner Fäserchen aus Geweben oder -gewirken, die sich zu Faserkügelchen ("Pills", "Knötchen") zusammenrollen und dann nur noch durch wenige Einzelfasern mit der Oberfläche der Gewebe oder Gewirke verbundenen sind. Bei Kunstfasern haften die kleinen Faserkügelchen fest auf der Oberfläche der Gewebe. Neben der Beeinträchtigung der Optik und Haptik und dem einhergehenden Wertverlust des Textils kann es durch das Pilling zu Folgeschäden an aufliegenden Textilschichten durch Reibung kommen. Der Einsatz von Cellulasen für die Anti-Pilling-Ausrüstung von Baumwolle und anderen natürlichen Fasern bzw. Textilien ist bekannt. Allerdings sind die Cellulasen nur wenig zur Behandlung der Bildung von Knötchen oder Kügelchen bei Kunstfasern, wie beispielsweise Polyestern oder Polyacrylfasern, geeignet.

Kunstfasertextilien, insbesondere Polyester-Textilien, haben zudem den Nachteil, dass sie sehr glatte, hydrophobe Oberflächen haben. Durch die damit verbundene schlechte Benetzbarkeit mit Wasser zeigen sie oftmals einen schlechten Schweißtransport und Tragekomfort und neigen zur Geruchsbildung. Die Hydrophilierung der Fasern ist sehr aufwendig und bisher sind im Haushaltsmaßstab, beispielsweise in der Waschmaschine, keine ausreichend leistungsfähigen Systeme verfügbar.

Durch den Faserabrieb im Waschprozess der Haushalte kommt es zu einer kontinuierlichen Freisetzung von Polyesterpartikeln, insbesondere Polyethylenterephthalat-Nanopartikeln in die Umwelt. Eine weitere Quelle für derartige Partikel sind Getränkeflaschen und Verpackungsfolien.

Es besteht daher Bedarf an Systemen, die bei Textilien aus Polyester einerseits die bereits entstandene Knötchenbildung vermindern (Depilling) und andererseits einen Schutz der Fasern vor dem Pilling bieten, so dass also die unschöne Knötchenbildung gar nicht erst entsteht. Ferner besteht Bedarf an Systemen, die Polyesterfasern, insbesondere PET-Fasern, hydrophiler machen

können und freigesetzte PET-Nanopartikel abbauen können. Da alle diese Erfordernisse den Abbau der Polyester erfordern, insbesondere über Esterolyse, ist die der vorliegenden Erfindung zugrunde liegende Aufgabe die Bereitstellung von Enzymen mit verbesserter PET-Esterolyse.

Esterasen im Allgemeinen stellen eine Gruppe hydrolytischer Enzyme mit einer natürlicherweise vorkommenden breiten Vielfalt hinsichtlich der Substrate und des Reaktionstyps dar. Die Substratspezifität und die Aktivierung der Esterasen unterscheiden sich von denen der echten Lipasen für die bekannt ist, dass sie durch die Lipid/Wasser- Grenzfläche aktiviert werden, bevor sie wasserunlösliche Substrate mit langkettigen Fettsäureestern hydrolysieren. Während für die Textilbehandlung und -pflege Lipasen standardmäßig eingesetzt werden, sind geeignete Esterasen, die die oben aufgelisteten Eigenschaften haben, bisher kaum bekannt. Beispiele für in Wasch- und Reinigungsmitteln einsetzbare Esterasen sind beispielsweise in der DE 10 2005 037 659 A1 beschrieben. Allerdings zeigen diese Esterasen keine zufriedenstellende Aktivität für PET-Fasern.

Die Erfinder der vorliegenden Erfindung haben nun eine Gruppe von Esterasen identifiziert, die sich durch eine gute Aktivität für die hydrolytische Spaltung von Polyestern, insbesondere PET auszeichnen.

In einem ersten Aspekt richtet sich die Erfindung daher auf die Verwendung einer Esterase oder eines Mittels, das eine Esterase enthält, insbesondere eines Mittels zur Wäsche- und/oder Textilbehandlung, zur Hydrolyse von Polyestern, insbesondere Polyethylenterephthalat (PET), wobei die Esterase eine Aminosäuresequenz umfasst, die mindestens 70 %, vorzugsweise mindestens 80 %, noch bevorzugter mindestens 85 %, am bevorzugtesten mindestens 90 % Sequenzidentität mit der in SEQ ID NO. 1 angegebenen Aminosäuresequenz über deren Gesamtlänge aufweist.

Ein weiterer Aspekt betrifft Verfahren zum Verbessern des Tragekomforts und/oder Vermindern von Pilling von Polyester-haltigen Textilien, insbesondere PET-haltigen Textilien, durch das in Kontakt bringen der Polyester-haltigen Textilien mit einer Esterase oder einem Mittel, das eine Esterase enthält, insbesondere einem Mittel zur Wäsche- und/oder Textilbehandlung, wobei die Esterase wie oben definiert ist.

Noch ein weiterer Aspekt richtet sich auf Verfahren zum Hydrophilieren von PET-Fasern und/oder Abbau von PET-Polymer aus Textilfasern durch das in Kontakt bringen des PET mit einer Esterase oder einem Mittel, das eine Esterase enthält, insbesondere einem Mittel zur Wäsche- und/oder Textilbehandlung, wobei die Esterase wie oben definiert ist.

Weitere Aspekte der Erfindung betreffen neue Esterasen, die eine Aminosäuresequenz umfassen, die mindestens 70 % vorzugsweise mindestens 80 %, noch bevorzugter mindestens 85 %, am be-

vorzugtesten mindestens 90 % Sequenzidentität mit der in SEQ ID NO. 1 angegebenen Aminosäuresequenz über deren Gesamtlänge aufweisen und die

- (i) die Aminosäuren R18 und S136 an den Positionen, die den Positionen 18 und 136 gemäß SEQ ID NO:1 entsprechen, aufweisen;
- (ii) die Aminosäuren R18, S136 und V178 an den Positionen, die den Positionen 18, 136 und 178 gemäß SEQ ID NO:1 entsprechen, aufweisen;
- (iii) die Aminosäuren R18, S136 und S213 an den Positionen, die den Positionen 18, 136 und 213 gemäß SEQ ID NO:1 entsprechen, aufweisen;
- (iv) die Aminosäuren V178 und S213 an den Positionen, die den Positionen 178 und 213 gemäß SEQ ID NO:1 entsprechen, aufweisen; oder
- (v) die Aminosäuren R18, S136, V178 und S213 an den Positionen, die den Positionen 18, 136, 178 und 213 gemäß SEQ ID NO:1 entsprechen, aufweisen,

und Mittel, insbesondere Wasch- und Reinigungsmittel, die diese enthalten, entsprechende Wasch- und Reinigungsverfahren sowie Nukleinsäuren die diese Esterasen kodieren, und Vektoren, Wirtszellen und Herstellverfahren, die zur Gewinnung derartiger Esterasen genutzt werden können.

Unter dem Begriff einer Esterase wird ein Enzym mit Esteraseaktivität verstanden, d.h. ein Enzym, das katalytisch aktiv ist und bei dem sich durch das chemische Verhalten der eigentlich aktiven Reste allein oder ggf. zusätzlich durch das Einwirken modifizierender Teile eine Hydrolyse von Ester-Bindungen ergibt. Aktive Enzyme sind auch solche Esterasen, deren Aktivität zu einem gegebenen Zeitpunkt, etwa durch einen Inhibitor, blockiert ist. Entscheidend ist ihre prinzipielle Eignung zur entsprechenden Esterase-Reaktion. Bevorzugte Esterasen im Sinne der Erfindung sind insbesondere solche Enzyme, die in der Lage sind, die Hydrolyse von Polyethylenterephthalat (PET) zu katalysieren.

Bei den hierin als Esterase bezeichneten Proteinen handelt es sich vorzugsweise um reife (mature) Esterasen, d.h. um das katalytisch aktive Molekül ohne Signal- und/oder Propeptid(e). Soweit nicht anders angegeben beziehen sich auch die angegebenen Sequenzen jeweils auf reife Enzyme.

In verschiedenen Ausführungsformen der Erfindung umfasst die Esterase eine Aminosäuresequenz, die zu der in SEQ ID NO. 1 angegebenen Aminosäuresequenz über deren Gesamtlänge zu mindestens 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 90,5%, 91%, 91,5%, 92%, 92,5%, 93%, 93,5%, 94%, 94,5%, 95%, 95,5%, 96%, 96,5%, 97%, 97,5%, 98%, 98,5%, 98,7%, 98,8%, 99,0 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % und 100 % identisch ist.

Die Bestimmung der Identität von Nukleinsäure- oder Aminosäuresequenzen erfolgt durch einen Sequenzvergleich. Dieser Sequenzvergleich basiert auf dem im Stand der Technik etablierten und

üblicherweise genutzten BLAST-Algorithmus (vgl. beispielsweise Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) "Basic local alignment search tool." J. Mol. Biol. 215:403-410, und Altschul, Stephan F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Hheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997): "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs"; Nucleic Acids Res., 25, S.3389-3402) und geschieht prinzipiell dadurch, dass ähnliche Abfolgen von Nukleotiden oder Aminosäuren in den Nukleinsäure- oder Aminosäuresequenzen einander zugeordnet werden. Eine tabellarische Zuordnung der betreffenden Positionen wird als Alignment bezeichnet. Ein weiterer im Stand der Technik verfügbarer Algorithmus ist der FASTA-Algorithmus. Sequenzvergleiche (Alignments), insbesondere multiple Sequenzvergleiche, werden mit Computerprogrammen erstellt. Häufig genutzt werden beispielsweise die Clustal-Serie (vgl. beispielsweise Chenna et al. (2003): Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. Nucleic Acid Research 31, 3497-3500), T-Coffee (vgl. beispielsweise Notredame et al. (2000): T-Coffee: A novel method for multiple sequence alignments. J. Mol. Biol. 302, 205-217) oder Programme, die auf diesen Programmen beziehungsweise Algorithmen basieren. In der vorliegenden Patentanmeldung wurden alle Sequenzvergleiche (Alignments) mit dem Computer-Programm Vector NTI® Suite 10.3 (Invitrogen Corporation, 1600 Faraday Avenue, Carlsbad, Kalifornien, USA) mit den vorgegebenen Standardparametern erstellt, dessen AlignX-Modul für die Sequenzvergleiche auf ClustalW basiert.

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

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung bedeutet die Angabe, dass eine Aminosäureposition einer numerisch bezeichneten Position in SEQ ID NO:1 entspricht daher, dass die ent-

sprechende Position der numerisch bezeichneten Position in SEQ ID NO:1 in einem wie oben definierten Alignment zugeordnet ist.

Die hierin beschriebenen Esterasen können gegenüber der Aminosäuresequenz, die in SEQ ID NO:1 angegeben ist, eine oder mehrere Aminosäureveränderungen, insbesondere Aminosäure-Substitutionen, -Insertionen oder -Deletionen, aufweisen. Solche Esterasen sind beispielsweise durch gezielte genetische Veränderung, d.h. durch Mutageneseverfahren, weiterentwickelt und für bestimmte Einsatzzwecke oder hinsichtlich spezieller Eigenschaften (beispielsweise hinsichtlich ihrer katalytischen Aktivität, Stabilität, usw.) optimiert. Ferner können erfindungsgemäße Nukleinsäuren in Rekombinationsansätze eingebracht und damit zur Erzeugung völlig neuartiger Esterasen oder anderer Polypeptide genutzt werden.

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

Für die Beschreibung von Substitutionen, die genau eine Aminosäureposition betreffen (Aminosäureaustausche), wird folgende Konvention angewendet: zunächst wird die natürlicherweise vorhandene Aminosäure in Form des international gebräuchlichen Einbuchstaben-Codes bezeichnet, dann folgt die zugehörige Sequenzposition und schließlich die eingefügte Aminosäure. Mehrere Austausche innerhalb derselben Polypeptidkette werden durch Schrägstriche voneinander getrennt. Bei Insertionen sind nach der Sequenzposition zusätzliche Aminosäuren benannt. Bei Deletionen ist die fehlende Aminosäure durch ein Symbol, beispielsweise einen Stern oder einen Strich, ersetzt oder vor der entsprechenden Position ein Δ angegeben. Beispielsweise beschreibt A95G die Substitution von Alanin an Position 95 durch Glycin, A95AG die Insertion von Glycin nach der Aminosäure Alanin an Position 95 und A95* oder Δ A95 die Deletion von Alanin an Position 95. Diese Nomenklatur ist dem Fachmann auf dem Gebiet der Enzymtechnologie bekannt.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind daher die hierin beschriebenen Verwendungen und Verfahren, die dadurch gekennzeichnet ist, dass die verwendete Esterase (a) aus der in SEQ ID

NO. 1 angegebenen Aminosäuresequenz besteht oder (b) aus einer Esterase mit der in SEQ ID NO:1 angegebenen Aminosäuresequenz als Ausgangsmolekül erhältlich ist durch

- (i) ein- oder mehrfache Aminosäuresubstitution an den Positionen, die den Positionen 1, 9, 13, 18, 19, 23, 25, 26, 28, 32, 33, 46, 47, 48, 61, 64, 89, 90, 92, 105, 113, 114, 157, 183, 204, 234, 245, 246, 249, und 253 gemäß SEQ ID NO:1 entsprechen; und/oder
- (ii) ein- oder mehrfache Aminosäuresubstitution an den Positionen, die den Positionen 3, 12, 24, 30, 35, 49, 60, 63, 65, 72, 73, 87, 95, 98, 108, 109, 110, 112, 117, 121, 122, 131, 142, 151, 163, 165, 174, 175, 177, 182, 187, 194, 195, 212, 213, 232, 238, 248 und 256 gemäß SEQ ID NO:1 entsprechen; und/oder
- (iii) durch ein- oder mehrfache Aminosäuresubstitution an den Positionen, die den Positionen 4, 5, 11, 14, 17, 21, 22, 31, 43, 50, 53, 57, 62, 68, 74, 78, 82, 83, 85, 88, 101, 102, 106, 107, 116, 124, 126, 136, 138, 141, 149, 152, 153, 158, 178, 190, 197, 202, 207, 209, 216, 219 und 250 gemäß SEQ ID NO:1 entsprechen; und/oder
- (iv) durch ein- oder mehrfache Aminosäuresubstitution an den Positionen, die den Positionen 2, 27, 41, 42, 44, 45, 51, 54, 56, 58, 66, 67, 75, 79, 81, 86, 91, 96, 104, 111, 120, 125, 127, 135, 144, 156, 159, 160, 162, 171, 172, 181, 184, 186, 188, 205, 210, 211, 217, 221, 222, 223, 230, 236, 237, 239, 247, 251, 252 und 254 gemäß SEQ ID NO:1 entsprechen; und/oder
- (v) durch eine oder mehrere Aminosäuresubstitutionen ausgewählt aus der Gruppe A001D, A001M, Y004N, N009D, N009L, N009M, N009Q, N009Y, A013F, A013Q, A013Y, R018E, R018H, S023A, S023E, S023Q, S025A, S025C, S025D, S025E, S025N, E026A, E026C, E026F, E026H, E026I, E026K, E026M, E026Q, E026R, E026S, E026T, E026V, E026W, E026Y, N028I, N028K, N028P, N028Q, N028T, N028Y, S030D, L032A, L032E, L032Q, S033Q, S035E, S035I, S035Q, S035V, Y043R, R046D, R046I, R046N, R046Q, R046T, S057C, Y060C, T061D, T061M, T061P, G062A, T063C, E064A, E064K, E064Q, E064R, A065G, A065K, A065Y, E072H, R073L, R073Y, T083V, D085E, I087L, T088D, T088E, T089A, T089C, T089D, T089E, T089G, T089L, T089P, T089V, L090E, L090Q, L090S, L090T, Q092D, Q092E, Q092G, Q092H, Q092N, Q092S, Q092Y, S095D, S095E, S095Q, N101E, N105A, N105D, N105E, N105G, N105M, N105Q, N105S, M107L, I108L, I108Y, N109T, R110H, S113C, S113D, S113E, S113H, S113P, T114D, T114E, S117Q, A125S, V126A, M131A, M131F, M131L, S136A, S136V, S141E, P151A, P151C, P151I, P151L, P151S, P151V, L152I, T153C, T153L, H156D, L157A, L157C, L157H, L157I, L157K, L157N, L157Q, L157S, L157T, L157W, L157Y, N158E, N160D, D174A, D174C, D174E, D174G, D174H, D174K, D174M, D174Q, D174R, D174S, D174T, D174V, L175C, L175D, L175E, L175G, L175N, L175Q, T177D, I178L, A182D, A182E, T183D, T183E, T183H, T183Q, T183S, H184Y, P187A, P187E, P187M, P187V, F188M, N190E, S194D, S194E, S197A, E202V, D204A, D204C, D204E, D204F, D204G, D204H, D204I, D204K, D204L, D204M, D204N, D204P, D204Q, D204R,

D204S, D204T, D204V, D204W, T207D, T207G, F209C, F209E, A210T, N212I, N212L, N212M, N212T, N212V, I213C, I213E, I213F, I213H, I213K, I213Q, I213R, I213S, I213Y, G219A, N232C, N232M, T234H, R245V, D246A, D246C, D246H, D246P, D246T, L248I, F249G, F249K, F249N, F249P, G250P, E253A, E253C, E253F, E253G, E253H, E253I, E253K, E253L, E253N, E253Q, E253R, E253S, E253T, E253V, E253W, E253Y, R256I und R256L, wobei die angegebenen Positionen den Positionen gemäß SEQ ID NO:1 entsprechen; und/oder

- (vi) durch eine oder mehrere Aminosäuresubstitutionen ausgewählt aus der Gruppe A001E, A001F, A001G, A001H, A001K, A001L, A001N, A001R, A001S, A001T, A001V, A001W, A001Y, Y004F, E005A, E005L, N009A, N009E, N009H, N009S, N009T, N009V, T011N, D012A, D012H, A013C, A013D, A013E, A013K, A013L, A013M, A013S, A013T, L014F, L014I, L014M, A017G, A017K, A017M, A017Q, A017S, R018A, R018G, R018I, R018N, R018Q, R018S, R018V, R018W, S019A, S019C, S019F, S019H, S019K, S019L, S019M, S019N, S019R, S019T, S019V, S019W, P021L, F022Y, S023C, S023D, S023F, S023G, S023H, S023I, S023K, S023L, S023M, S023P, S023T, S023Y, V024F, V024I, V024L, V024M, V024T, V024W, V024Y, S025G, S025K, S025L, S025M, S025Q, S025R, S025T, S025V, E026G, E026L, E026N, N028A, N028E, N028F, N028G, N028H, N028L, N028M, N028S, N028V, N028W, S030A, S030E, S030N, S030P, S030T, R031K, L032G, L032H, L032I, L032K, L032M, L032N, L032R, L032S, L032T, L032Y, S033A, S033D, S033H, S033K, S033M, S033N, S033V, S035D, S035H, S035L, S035N, S035R, S035Y, T041K, Y044F, R046A, R046E, R046K, R046L, R046S, R046V, E047D, N048A, N048C, N048D, N048E, N048G, N048H, N048I, N048K, N048L, N048M, N048P, N048Q, N048R, N048Y, N049A, N049D, N049G, N049M, N049Q, T050L, Y051F, A053G, S057A, S057V, Y060L, Y060V, T061A, T061G, T061S, T061Y, G062T, T063D, T063H, T063K, T063N, E064M, E064V, E064W, E064Y, A065N, A065Q, A065R, A065S, S066D, S066T, I067L, A068Q, E072A, E072L, E072M, E072Q, E072S, I074V, I082F, I082M, T083C, D085N, I087C, I087M, T088N, T088S, T089H, T089I, T089K, T089N, T089Q, T089S, L090A, L090F, L090M, L090W, L090Y, Q092A, Q092L, E098Q, N101A, N101D, N101Q, A102H, L104V, N105H, H106W, I108C, I108T, I108V, N109E, N109F, N109H, N109K, N109M, N109S, N109Y, R110A, R110C, R110E, R110F, R110G, R110L, R110M, R110N, R110Q, R110S, A111T, S113A, S113F, S113G, S113K, S113L, S113N, S113Q, S113T, S113V, S113Y, T114A, T114C, T114H, T114I, T114K, T114M, T114N, T114Q, T114R, T114S, T114V, R116S, S117D, S117E, S117G, S117I, S121A, S122G, S122H, S122K, S122N, R138E, R138Q, S141Q, Q142E, Q142I, Q142L, Q142M, P144K, P151G, L152M, L157F, L157M, L157R, L157V, N158H, N160E, S162E, S163E, S163N, S163T, T165K, T165M, T165Q, T165R, T165Y, I171F, G172A, L175A, L175H, L175S, T177K, T177R, T177V, V181P, A182H, A182N, A182Q, A182S, T183A, T183I, T183K, T183R,

T183Y, H184F, K186R, P187K, P187Q, P187T, S195D, S195E, S195H, S195N, S195T, E202G, E202I, E202L, E202Q, G205Q, T207N, F209W, N212A, N212Y, I213L, I213M, G219Q, Y221F, S222C, S222T, V230Q, N232D, N232G, N232K, N232L, T234A, T234D, T234E, T234I, T234Q, T234S, T237N, T237S, R245A, R245C, R245E, R245G, R245H, R245K, R245L, R245M, R245Q, R245S, R245T, D246G, D246I, D246K, D246Q, D246S, D246V, G247K, L248A, L248D, L248E, L248K, L248M, L248Q, L248S, F249C, F249H, F249L, F249M, F249Q, F249R, F249S, F249T, F249V, F249Y, E251G, V252I, E254C, R256C, R256D, R256E, R256H, R256M, R256Q, R256T, R256V und R256W, wobei die angegebenen Positionen den Positionen gemäß SEQ ID NO:1 entsprechen; und/oder

- (vii) durch eine oder mehrere Aminosäuresubstitutionen ausgewählt aus der Gruppe A001C, A001P, A001Q, Y004W, E005W, N009C, N009F, N009G, N009I, D012V, A013H, A013I, R018F, R018M, R018P, R018T, S019G, S019I, S019Q, S019Y, S023R, S023V, V024K, S025F, S025I, L032D, L032V, S033E, S033F, S033I, S033L, S033R, S035A, S035M, Y043W, R046C, R046F, R046H, R046M, E047C, E047H, N048S, N048V, N048W, N049C, T050Q, V054I, T061H, T061I, T061V, T063S, E064G, E064I, E064L, E064N, A065C, A065L, A065M, I067V, A068H, A068K, A068T, E072K, E072N, R073F, T083I, I087Y, T089M, T089W, L090K, L090V, Q092K, Q092M, Q092T, S095C, E098D, E098T, N101W, A102C, N105Y, M107V, I108Q, R110K, R110T, S113W, T114P, S117A, S117C, S117M, S117N, S117P, S117T, S121G, S121K, S121N, S121P, S121R, S121T, S122A, S122C, S122D, S122E, S122R, S122T, M127S, R138T, Q142R, Q142V, A149C, P151T, L157E, L157P, N158V, S163D, S163M, T165L, T165V, D174N, L175K, T177H, T177Q, T177Y, I178V, V181T, T183C, T183F, T183M, T183N, P187L, P187S, S194M, S194Q, S194T, S195C, S195W, S197E, S197K, E202C, G205N, P211V, N212C, I213A, I217T, G219T, N232A, N232E, N232F, N232H, N232Y, T234K, T234L, T234N, T234R, T234V, Q238E, Q238P, Q238R, F239Y, D246E, D246M, D246R, D246W, L248C, L248P, L248V, F249W, G250K, G250R, E253M, E254K und R256K, wobei die angegebenen Positionen den Positionen gemäß SEQ ID NO:1 entsprechen; und/oder
- (viii) durch eine oder mehrere Aminosäuresubstitutionen ausgewählt aus der Gruppe N002A, N002L, P003A, P003E, P003G, P003H, P003I, P003K, P003L, P003M, P003Q, P003S, P003T, P003V, T011H, D012E, D012S, A013G, A013P, L014Y, R018L, S019E, F022E, F022M, V024C, V024Q, E026P, N028C, N028D, L032F, L032P, S033Y, T041R, I042V, Y043K, E047F, E047L, E047M, E047P, E047S, E047V, E047W, N049E, N049F, N049L, N049Y, T050E, T050V, Y060G, Y060M, G062Q, G062S, T063A, T063G, E064T, A065D, A065E, A065H, A065T, E072D, E072V, E072W, D085C, I087E, T088G, T089Y, L090R, Q092V, N101S, N105I, N105K, N105L, N105R, H106F, I108M, I108N, N109R, S112G, S112P, S112T, T114F, T114G, T114Y, R116I, R116K, R116T, R116V, S117H, D120L, S122L, S122Q, S122V,

- S122Y, L124A, L124M, L124P, M127V, G135A, S136T, R138A, S141A, Q142D, Q142K, Q142N, S163A, S163G, T165H, I171V, T177M, T177N, A182C, K186L, P187I, N190H, N190Y, S194C, S197Y, F209D, F209N, N212S, I217V, V223T, V230A, T234G, T234M, T234Y, Y236F, Q238C, Q238D, Q238G, Q238M, Q238S, R245N, R245P, D246Y, G247R, L248R, F249A, F249E und R256N, wobei die angegebenen Positionen den Positionen gemäß SEQ ID NO:1 entsprechen; und/oder
- (ix) durch eine oder mehrere Aminosäuresubstitutionen ausgewählt aus der Gruppe N009W, D012I, D012L, A013R, A017N, R018Y, P021D, P021T, P021Y, F022H, F022K, S023N, V024N, S025H, S025Y, E027N, S030C, S030K, R031Q, R031V, S033C, S035C, S035W, I042Q, P045A, P045T, R046P, R046Y, E047Q, A053L, A053V, I056M, S057T, P058G, Y060A, Y060F, Y060S, Y060W, T061C, T061K, T061L, T061N, T061Q, T061R, T061W, G062D, T063E, T063P, E064H, E064S, E072F, E072G, E072R, R073I, R073T, R073V, R073W, I074A, I074C, I074G, I074T, A075S, G078A, G078S, F079G, V081G, I082G, I082K, I082Q, T083M, T083N, D085G, T086G, T086N, I087Q, I087S, I087T, I087W, T088C, L090C, L090D, L090G, L090H, L090N, D091E, D091Y, Q092C, Q092P, S095A, S095L, S095V, S095Y, R096Y, A102Y, N105C, N105F, N105V, N105W, M107S, I108K, I108P, N109Q, R110Y, S112F, S112I, S112L, S112W, S112Y, S113M, V126T, M131G, M131I, M131S, M131V, S136C, R138D, R138M, Q142A, A149I, T153N, L157D, L157G, N158C, N158D, N158I, N158W, K159T, S163C, T177C, T177E, T177S, I178F, I178Y, A182G, A182Y, T183L, P187C, N190S, S195F, S195Q, S195Y, D204Y, A210S, K216N, K216Q, K216Y, G219L, N232R, N232W, R245I, L248F, F249D, G250S, G250T, E251Q, E253D und E253P, wobei die angegebenen Positionen den Positionen gemäß SEQ ID NO:1 entsprechen; und/oder
- (x) durch Fragmentierung, Deletions-, Insertions- oder Substitutionsmutagenese und eine Aminosäuresequenz umfasst, die über eine Länge von mindestens 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 255, 256, 257, 258, 259 oder 260 zusammenhängenden Aminosäuren mit dem Ausgangsmolekül übereinstimmt.

Die erfindungsgemäßen Esterasen können (a) eine Aminosäuresequenz umfassen, die ausgewählt ist aus denen, die in SEQ ID NOs:1-5 angegeben sind oder daraus besteht; oder (b) aus einer Esterase, die die Aminosäuresequenz nach SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 oder SEQ ID NO:5 umfasst, als Ausgangsmolekül erhältlich sein durch

- (i) ein- oder mehrfache Aminosäuresubstitution an den Positionen, die den Positionen 1, 9, 13, 19, 23, 25, 26, 28, 32, 33, 46, 47, 48, 61, 64, 89, 90, 92, 105, 113, 114, 157, 183, 204, 234, 245, 246, 249 und 253 gemäß SEQ ID NO:1 entsprechen; und/oder
- (ii) ein- oder mehrfache Aminosäuresubstitution an den Positionen, die den Positionen 3, 12, 24, 30, 35, 49, 60, 63, 65, 72, 73, 87, 95, 98, 108, 109, 110, 112, 117, 121, 122,

- 131, 142, 151, 163, 165, 174, 175, 177, 182, 187, 194, 195, 212, 232, 238, 248 und 256 gemäß SEQ ID NO:1 entsprechen; und/oder
- (iii) ein- oder mehrfache Aminosäuresubstitution an den Positionen, die den Positionen 4, 5, 11, 14, 17, 21, 22, 31, 43, 50, 53, 57, 62, 68, 74, 78, 82, 83, 85, 88, 101, 102, 106, 107, 116, 124, 126, 138, 141, 149, 152, 153, 158, 190, 197, 202, 207, 209, 216, 219 und 250 gemäß SEQ ID NO:1 entsprechen; und/oder
- (iv) ein- oder mehrfache Aminosäuresubstitution an den Positionen, die den Positionen 2, 27, 41, 42, 44, 45, 51, 54, 56, 58, 66, 67, 75, 79, 81, 86, 91, 96, 104, 111, 120, 125, 127, 135, 144, 156, 159, 160, 162, 171, 172, 181, 184, 186, 188, 205, 210, 211, 217, 221, 222, 223, 230, 236, 237, 239, 247, 251, 252 und 254 gemäß SEQ ID NO:1 entsprechen; und/oder
- (v) eine oder mehrere Aminosäuresubstitutionen ausgewählt aus der Gruppe A001D, A001M, Y004N, N009D, N009L, N009M, N009Q, N009Y, A013F, A013Q, A013Y, S023A, S023E, S023Q, S025A, S025C, S025D, S025E, S025N, E026A, E026C, E026F, E026H, E026I, E026K, E026M, E026Q, E026R, E026S, E026T, E026V, E026W, E026Y, N028I, N028K, N028P, N028Q, N028T, N028Y, S030D, L032A, L032E, L032Q, S033Q, S035E, S035I, S035Q, S035V, Y043R, R046D, R046I, R046N, R046Q, R046T, S057C, Y060C, T061D, T061M, T061P, G062A, T063C, E064A, E064K, E064Q, E064R, A065G, A065K, A065Y, E072H, R073L, R073Y, T083V, D085E, I087L, T088D, T088E, T089A, T089C, T089D, T089E, T089G, T089L, T089P, T089V, L090E, L090Q, L090S, L090T, Q092D, Q092E, Q092G, Q092H, Q092N, Q092S, Q092Y, S095D, S095E, S095Q, N101E, N105A, N105D, N105E, N105G, N105M, N105Q, N105S, M107L, I108L, I108Y, N109T, R110H, S113C, S113D, S113E, S113H, S113P, T114D, T114E, S117Q, A125S, V126A, M131A, M131F, M131L, S141E, P151A, P151C, P151I, P151L, P151S, P151V, L152I, T153C, T153L, H156D, L157A, L157C, L157H, L157I, L157K, L157N, L157Q, L157S, L157T, L157W, L157Y, N158E, N160D, D174A, D174C, D174E, D174G, D174H, D174K, D174M, D174Q, D174R, D174S, D174T, D174V, L175C, L175D, L175E, L175G, L175N, L175Q, T177D, A182D, A182E, T183D, T183E, T183H, T183Q, T183S, H184Y, P187A, P187E, P187M, P187V, F188M, N190E, S194D, S194E, S197A, E202V, D204A, D204C, D204E, D204F, D204G, D204H, D204I, D204K, D204L, D204M, D204N, D204P, D204Q, D204R, D204S, D204T, D204V, D204W, T207D, T207G, F209C, F209E, A210T, N212I, N212L, N212M, N212T, N212V, G219A, N232C, N232M, T234H, R245V, D246A, D246C, D246H, D246P, D246T, L248I, F249G, F249K, F249N, F249P, G250P, E253A, E253C, E253F, E253G, E253H, E253I, E253K, E253L, E253N, E253Q, E253R, E253S, E253T, E253V, E253W, E253Y, R256I und R256L, wobei die angegebenen Positionen den Positionen gemäß SEQ ID NO:1 entsprechen; und/oder

- (vi) eine oder mehrere Aminosäuresubstitutionen ausgewählt aus der Gruppe A001E, A001F, A001G, A001H, A001K, A001L, A001N, A001R, A001S, A001T, A001V, A001W, A001Y, Y004F, E005A, E005L, N009A, N009E, N009H, N009S, N009T, N009V, T011N, D012A, D012H, A013C, A013D, A013E, A013K, A013L, A013M, A013S, A013T, L014F, L014I, L014M, A017G, A017K, A017M, A017Q, A017S, S019A, S019C, S019F, S019H, S019K, S019L, S019M, S019N, S019R, S019T, S019V, S019W, P021L, F022Y, S023C, S023D, S023F, S023G, S023H, S023I, S023K, S023L, S023M, S023P, S023T, S023Y, V024F, V024I, V024L, V024M, V024T, V024W, V024Y, S025G, S025K, S025L, S025M, S025Q, S025R, S025T, S025V, E026G, E026L, E026N, N028A, N028E, N028F, N028G, N028H, N028L, N028M, N028S, N028V, N028W, S030A, S030E, S030N, S030P, S030T, R031K, L032G, L032H, L032I, L032K, L032M, L032N, L032R, L032S, L032T, L032Y, S033A, S033D, S033H, S033K, S033M, S033N, S033V, S035D, S035H, S035L, S035N, S035R, S035Y, T041K, Y044F, R046A, R046E, R046K, R046L, R046S, R046V, E047D, N048A, N048C, N048D, N048E, N048G, N048H, N048I, N048K, N048L, N048M, N048P, N048Q, N048R, N048Y, N049A, N049D, N049G, N049M, N049Q, T050L, Y051F, A053G, S057A, S057V, Y060L, Y060V, T061A, T061G, T061S, T061Y, G062T, T063D, T063H, T063K, T063N, E064M, E064V, E064W, E064Y, A065N, A065Q, A065R, A065S, S066D, S066T, I067L, A068Q, E072A, E072L, E072M, E072Q, E072S, I074V, I082F, I082M, T083C, D085N, I087C, I087M, T088N, T088S, T089H, T089I, T089K, T089N, T089Q, T089S, L090A, L090F, L090M, L090W, L090Y, Q092A, Q092L, E098Q, N101A, N101D, N101Q, A102H, L104V, N105H, H106W, I108C, I108T, I108V, N109E, N109F, N109H, N109K, N109M, N109S, N109Y, R110A, R110C, R110E, R110F, R110G, R110L, R110M, R110N, R110Q, R110S, A111T, S113A, S113F, S113G, S113K, S113L, S113N, S113Q, S113T, S113V, S113Y, T114A, T114C, T114H, T114I, T114K, T114M, T114N, T114Q, T114R, T114S, T114V, R116S, S117D, S117E, S117G, SI 171, S121A, S122G, S122H, S122K, S122N, R138E, R138Q, S141Q, Q142E, Q142I, Q142L, Q142M, P144K, P151G, L152M, L157F, L157M, L157R, L157V, N158H, N160E, S162E, S163E, S163N, S163T, T165K, T165M, T165Q, T165R, T165Y, I171F, G172A, L175A, L175H, L175S, T177K, T177R, T177V, V181P, A182H, A182N, A182Q, A182S, T183A, T183I, T183K, T183R, T183Y, H184F, K186R, P187K, P187Q, P187T, S195D, S195E, S195H, S195N, S195T, E202G, E202I, E202L, E202Q, G205Q, T207N, F209W, N212A, N212Y, G219Q, Y221F, S222C, S222T, V230Q, N232D, N232G, N232K, N232L, T234A, T234D, T234E, T234I, T234Q, T234S, T237N, T237S, R245A, R245C, R245E, R245G, R245H, R245K, R245L, R245M, R245Q, R245S, R245T, D246G, D246I, D246K, D246Q, D246S, D246V, G247K, L248A, L248D, L248E, L248K, L248M, L248Q, L248S, F249C, F249H, F249L, F249M, F249Q, F249R, F249S, F249T, F249V, F249Y, E251G, V252I, E254C, R256C, R256D, R256E, R256H, R256M, R256Q,

R256T, R256V und R256W, wobei die angegebenen Positionen den Positionen gemäß SEQ ID NO:1 entsprechen; und/oder

- (vii) eine oder mehrere Aminosäuresubstitutionen ausgewählt aus der Gruppe A001C, A001P, A001Q, Y004W, E005W, N009C, N009F, N009G, N009I, D012V, A013H, A013I, S019G, S019I, S019Q, S019Y, S023R, S023V, V024K, S025F, S025I, L032D, L032V, S033E, S033F, S033I, S033L, S033R, S035A, S035M, Y043W, R046C, R046F, R046H, R046M, E047C, E047H, N048S, N048V, N048W, N049C, T050Q, V054I, T061H, T061I, T061V, T063S, E064G, E064I, E064L, E064N, A065C, A065L, A065M, I067V, A068H, A068K, A068T, E072K, E072N, R073F, T083I, I087Y, T089M, T089W, L090K, L090V, Q092K, Q092M, Q092T, S095C, E098D, E098T, N101W, A102C, N105Y, M107V, I108Q, R110K, R110T, S113W, T114P, S117A, S117C, S117M, S117N, S117P, S117T, S121G, S121K, S121N, S121P, S121R, S121T, S122A, S122C, S122D, S122E, S122R, S122T, M127S, R138T, Q142R, Q142V, A149C, P151T, L157E, L157P, N158V, S163D, S163M, T165L, T165V, D174N, L175K, T177H, T177Q, T177Y, V181T, T183C, T183F, T183M, T183N, P187L, P187S, S194M, S194Q, S194T, S195C, S195W, S197E, S197K, E202C, G205N, P211V, N212C, I217T, G219T, N232A, N232E, N232F, N232H, N232Y, T234K, T234L, T234N, T234R, T234V, Q238E, Q238P, Q238R, F239Y, D246E, D246M, D246R, D246W, L248C, L248P, L248V, F249W, G250K, G250R, E253M, E254K und R256K, wobei die angegebenen Positionen den Positionen gemäß SEQ ID NO:1 entsprechen; und/oder

- (viii) eine oder mehrere Aminosäuresubstitutionen ausgewählt aus der Gruppe N002A, N002L, P003A, P003E, P003G, P003H, P003I, P003K, P003L, P003M, P003Q, P003S, P003T, P003V, T011H, D012E, D012S, A013G, A013P, L014Y, S019E, F022E, F022M, V024C, V024Q, E026P, N028C, N028D, L032F, L032P, S033Y, T041R, I042V, Y043K, E047F, E047L, E047M, E047P, E047S, E047V, E047W, N049E, N049F, N049L, N049Y, T050E, T050V, Y060G, Y060M, G062Q, G062S, T063A, T063G, E064T, A065D, A065E, A065H, A065T, E072D, E072V, E072W, D085C, I087E, T088G, T089Y, L090R, Q092V, N101S, N105I, N105K, N105L, N105R, H106F, I108M, I108N, N109R, S112G, S112P, S112T, T114F, T114G, T114Y, R116I, R116K, R116T, R116V, S117H, D120L, S122L, S122Q, S122V, S122Y, L124A, L124M, L124P, M127V, G135A, R138A, S141A, Q142D, Q142K, Q142N, S163A, S163G, T165H, I171V, T177M, T177N, A182C, K186L, P187I, N190H, N190Y, S194C, S197Y, F209D, F209N, N212S, I217V, V223T, V230A, T234G, T234M, T234Y, Y236F, Q238C, Q238D, Q238G, Q238M, Q238S, R245N, R245P, D246Y, G247R, L248R, F249A, F249E und R256N, wobei die angegebenen Positionen den Positionen gemäß SEQ ID NO:1 entsprechen; und/oder

- (ix) eine oder mehrere Aminosäuresubstitutionen ausgewählt aus der Gruppe N009W, D012I, D012L, A013R, A017N, P021D, P021T, P021Y, F022H, F022K, S023N,

V024N, S025H, S025Y, E027N, S030C, S030K, R031Q, R031V, S033C, S035C, S035W, I042Q, P045A, P045T, R046P, R046Y, E047Q, A053L, A053V, I056M, S057T, P058G, Y060A, Y060F, Y060S, Y060W, T061C, T061K, T061L, T061N, T061Q, T061R, T061W, G062D, T063E, T063P, E064H, E064S, E072F, E072G, E072R, R073I, R073T, R073V, R073W, I074A, I074C, I074G, I074T, A075S, G078A, G078S, F079G, V081G, I082G, I082K, I082Q, T083M, T083N, D085G, T086G, T086N, I087Q, I087S, I087T, I087W, T088C, L090C, L090D, L090G, L090H, L090N, D091E, D091Y, Q092C, Q092P, S095A, S095L, S095V, S095Y, R096Y, A102Y, N105C, N105F, N105V, N105W, M107S, I108K, I108P, N109Q, R110Y, S112F, S112I, S112L, S112W, S112Y, S113M, V126T, M131G, M131I, M131S, M131V, R138D, R138M, Q142A, A149I, T153N, L157D, L157G, N158C, N158D, N158I, N158W, K159T, S163C, T177C, T177E, T177S, A182G, A182Y, T183L, P187C, N190S, S195F, S195Q, S195Y, D204Y, A210S, K216N, K216Q, K216Y, G219L, N232R, N232W, R245I, L248F, F249D, G250S, G250T, E251Q, E253D und E253P, wobei die angegebenen Positionen den Positionen gemäß SEQ ID NO:1 entsprechen; und/oder

- (x) Fragmentierung, Deletions-, Insertions- oder Substitutionsmutagenese und eine Aminosäuresequenz umfasst, die über eine Länge von mindestens 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 255, 256, 257, 258, 259 oder 260 zusammenhängenden Aminosäuren mit dem Ausgangsmolekül übereinstimmt, wobei die Esterase die Aminosäuren R18 und S136 an den Positionen, die den Positionen 18 und 136 gemäß SEQ ID NO:1 entsprechen, umfasst.

In verschiedenen Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Esterasen können auch die Positionen 18, 163, 178 und/oder 213 variiert werden, solange die Esterase entweder

- (i) die Aminosäuren R18 und S136 an den Positionen, die den Positionen 18 und 136 gemäß SEQ ID NO:1 entsprechen, aufweist;
- (ii) die Aminosäuren R18, S136 und V178 an den Positionen, die den Positionen 18, 136 und 178 gemäß SEQ ID NO:1 entsprechen, aufweist;
- (iii) die Aminosäuren R18, S136 und S213 an den Positionen, die den Positionen 18, 136 und 213 gemäß SEQ ID NO:1 entsprechen, aufweist; oder
- (iv) die Aminosäuren V178 und S213 an den Positionen, die den Positionen 178 und 213 gemäß SEQ ID NO:1 entsprechen, aufweist.

Bevorzugte Substitutionen in diesen Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Esterasen sind:

- (i) ein oder mehrere Aminosäuresubstitutionen ausgewählt aus R018E, R018H, S136A, S136V, I178L, I213C, I213E, I213F, I213H, I213K, I213Q, I213R, I213S und I213Y; und/oder
- (ii) ein oder mehrere Aminosäuresubstitutionen ausgewählt aus R018A, R018G, R018I, R018N, R018Q, R018S, R018V, R018W, I213L und I213M; und/oder

- (iii) ein oder mehrere Aminosäuresubstitutionen ausgewählt aus R018F, R018M, R018P, R018T, I178V und I213A; und/oder
- (iv) ein oder mehrere Aminosäuresubstitutionen ausgewählt aus R018L und S136T; und/oder
- (v) ein oder mehrere Aminosäuresubstitutionen ausgewählt aus R018Y, S136C, I178F und I178Y.

Die beschriebenen ein- oder mehrfachen Aminosäuresubstitutionen können konservative Aminosäuresubstitutionen sein. Der Begriff "konservative Aminosäuresubstitution" bedeutet den Austausch (Substitution) eines Aminosäurerestes gegen einen anderen Aminosäurerest, wobei dieser Austausch nicht zu einer Änderung der Polarität oder Ladung an der Position der ausgetauschten Aminosäure führt, z. B. der Austausch eines unpolaren Aminosäurerestes gegen einen anderen unpolaren Aminosäurerest. Konservative Aminosäuresubstitutionen im Rahmen der Erfindung umfassen beispielsweise: G=A=S, I=V=L=M, D=E, N=Q, K=R, Y=F, S=T, G=A=I=V=L=M=Y=F=W=P=S=T.

In Ausführungsformen in denen die Esterase erhältlich ist durch Fragmentierung, Deletions-, Insertions- oder Substitutionsmutagenese, ist es beispielsweise möglich, an den Termini oder in den Loops des Enzyms einzelne Aminosäuren zu deletieren, ohne dass dadurch die hydrolytische Aktivität verloren oder vermindert wird. Ferner kann durch derartige Fragmentierung, Deletions-, Insertions- oder Substitutionsmutagenese beispielsweise auch die Allergenizität betreffender Enzyme gesenkt und somit insgesamt ihre Einsetzbarkeit verbessert werden. Vorteilhafterweise behalten die Enzyme auch nach der Mutagenese ihre hydrolytische Aktivität, d.h. ihre hydrolytische Aktivität entspricht mindestens derjenigen des Ausgangsenzyms, d.h. in einer bevorzugten Ausführungsform beträgt die hydrolytische Aktivität mindestens 80, vorzugsweise mindestens 90 % der Aktivität des Ausgangsenzyms. Auch weitere Substitutionen können vorteilhafte Wirkungen zeigen. Sowohl einzelne wie auch mehrere zusammenhängende Aminosäuren können gegen andere Aminosäuren ausgetauscht werden.

Sofern in den hierin beschriebenen Ausführungsformen auf Aminosäure-Positionen Bezug genommen wird, bezieht sich diese Angabe auf die Positionen in einem Molekül, die den entsprechenden Positionen der Esterase gemäß SEQ ID NO. 1 in einem Alignment zugeordnet sind. Weiterhin richtet sich die Zuordnung der Positionen nach dem reifen (maturen) Protein. Diese Zuordnung ist insbesondere auch anzuwenden, wenn die Aminosäuresequenz einer hierin beschriebenen Esterase eine höhere Zahl von Aminosäureresten umfasst als die Esterase gemäß SEQ ID NO. 1. Ausgehend von den genannten Positionen in der Aminosäuresequenz der Esterase sind die Veränderungspositionen in einer hierin beschriebenen Esterase diejenigen, die eben diesen Positionen in einem Alignment zugeordnet sind.

Vorteilhafte Positionen für Sequenzveränderungen, insbesondere Substitutionen, der Esterase gemäß SEQ ID NO:1, die übertragen auf homologe Positionen der hierin beschriebenen Esterasen bevorzugt von Bedeutung sind und der Esterase vorteilhafte funktionelle Eigenschaften verleihen, sind insbesondere die oben angegebenen Positionen, zuzuordnen in einem Alignment mit SEQ ID NO. 1 und damit in der Zählung gemäß SEQ ID NO. 1.

Besonders bevorzugt sind jeweils Substitutionen an den unter (i) angegebenen Positionen bzw. die unter (v) angegebenen konkreten Substitutionen. Als nächstes folgen die Substitutionen an den unter (ii) angegebenen Positionen bzw. die unter (vi) angegebenen konkreten Substitutionen. Danach folgen Substitutionen an den unter (iii) angegebenen Positionen bzw. die unter (vii) angegebenen konkreten Substitutionen. Schließlich folgen Substitutionen an den unter (iv) angegebenen Positionen bzw. die unter (viii) und (ix) angegebenen konkreten Substitutionen. Es können natürlich auch Substitutionen an einer Kombination von Positionen erfolgen, die unter (i)-(iv) angegeben sind. Ebenfalls können Substitutionen aus den unter (v)-(ix) angegebenen Listen beliebig kombiniert werden.

Vorteilhaft sind insbesondere beispielsweise Substitutionen, die denen entsprechen, die in der Internationalen Patentveröffentlichung WO2013/033318 A1 beschrieben sind, sofern die entsprechend homologen Positionen in einer hierin beschriebenen Esterase nicht schon natürlicherweise von einer dieser bevorzugten Aminosäuren eingenommen werden. Die Gesamtheit der Offenbarung dieser Patentschrift ist hierin durch Bezugnahme eingeschlossen, einschließlich aller Zeichnungen und Sequenzen.

Im Rahmen der Erfindung besonders bevorzugt sind die Esterasen, die an den Positionen, die den Positionen 178 und/oder 213 in SEQ ID NO:1 entsprechen, die Aminosäuresubstitutionen I178V und/oder I213S aufweisen. Es wurde gefunden, dass diese beiden Positionen an der Bindung des Substrats PET beteiligt sind, so dass entsprechende Substitutionen die Leistung der Esterase im Hinblick auf Substratbindung und Hydrolyse verbessern können. Besonders bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung betreffen daher die oben beschriebenen Esterasen, die eine Aminosäuresequenz umfassen, die mindestens 70 % vorzugsweise mindestens 80 %, noch bevorzugter mindestens 85 %, am bevorzugtesten mindestens 90 % Sequenzidentität mit der in SEQ ID NO. 1 angegebenen Aminosäuresequenz über deren Gesamtlänge aufweist und die die Aminosäuren V178 und S213 an den Positionen, die den Positionen 178 und 213 gemäß SEQ ID NO:1 entsprechen, aufweisen. In verschiedenen Ausführungsformen enthalten diese Esterasen zusätzlich eine oder mehrere der oben beschriebenen Substitutionen.

Alle Ausführungsformen und Sachverhalte, die oben im Zusammenhang mit den Esterasen, den erfindungsgemäßen Verfahren oder Verwendungen beschrieben wurden, sind auch auf die jeweiligen anderen Aspekte der Erfindung anwendbar.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine zuvor beschriebene Esterase, die zusätzlich stabilisiert ist, insbesondere durch eine oder mehrere Mutationen, beispielsweise Substitutionen, oder durch Kopplung an ein Polymer bzw. deren Verwendung oder Verfahren zu deren Verwendung. Denn eine Erhöhung der Stabilität bei der Lagerung und/oder während des Einsatzes, beispielsweise beim Waschprozess, führt dazu, dass die enzymatische Aktivität länger anhält und damit die Leistung verbessert wird. Grundsätzlich kommen alle im Stand der Technik beschriebenen und/oder zweckmäßigen Stabilisierungsmöglichkeiten in Betracht. Bevorzugt sind solche Stabilisierungen, die über Mutationen des Enzyms selbst erreicht werden, da solche Stabilisierungen im Anschluss an die Gewinnung des Enzyms keine weiteren Arbeitsschritte erfordern. Beispiele für hierfür geeignete Sequenzveränderungen sind vorstehend genannt. Weitere geeignete Sequenzveränderungen sind aus dem Stand der Technik bekannt. So können Esterasen beispielsweise auch dadurch stabilisiert werden, dass einer oder mehrere Tyrosin-Reste gegen andere Aminosäuren ausgetauscht werden.

Weitere Möglichkeiten der Stabilisierung sind beispielsweise:

- Veränderung der Bindung von Metallionen;
- Schutz gegen den Einfluss von denaturierenden Agentien wie Tensiden durch Mutationen, die eine Veränderung der Aminosäuresequenz auf oder an der Oberfläche des Proteins bewirken;
- Austausch von Aminosäuren, die nahe dem N-Terminus liegen, gegen solche, die vermutlich über nicht-kovalente Wechselwirkungen mit dem Rest des Moleküls in Kontakt treten und somit einen Beitrag zur Aufrechterhaltung der globulären Struktur leisten.

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

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

Unter Derivaten werden im Sinne der vorliegenden Anmeldung demnach solche Proteine verstanden, deren reine Aminosäurekette chemisch modifiziert worden ist. Solche Derivatisierungen können beispielsweise in vivo durch die Wirtszelle erfolgen, die das Protein exprimiert. Diesbezüglich sind Kopplungen niedrigmolekularer Verbindungen wie von Lipiden oder Oligosacchariden besonders hervorzuheben. Derivatisierungen können aber auch in vitro durchgeführt werden, etwa durch die chemische Umwandlung einer Seitenkette einer Aminosäure oder durch kovalente Bindung einer anderen Verbindung an das Protein. Beispielsweise ist die Kopplung von Aminen an Carboxylgruppen eines Enzyms zur Veränderung des isoelektrischen Punkts möglich. Eine solche andere Verbindung kann auch ein weiteres Protein sein, das beispielsweise über bifunktionelle che-

mische Verbindungen an ein erfindungsgemäßes Protein gebunden wird. Ebenso ist unter Derivatisierung die kovalente Bindung an einen makromolekularen Träger zu verstehen, oder auch ein nichtkovalenter Einschluss in geeignete makromolekulare Käfigstrukturen. Derivatisierungen können beispielsweise die Substratspezifität oder die Bindungsstärke an das Substrat beeinflussen oder eine vorübergehende Blockierung der enzymatischen Aktivität herbeiführen, wenn es sich bei der angekoppelten Substanz um einen Inhibitor handelt. Dies kann beispielsweise für den Zeitraum der Lagerung sinnvoll sein. Derartige Modifikationen können ferner die Stabilität oder die enzymatische Aktivität beeinflussen. Sie können ferner auch dazu dienen, die Allergenizität und/oder Immunogenizität des Proteins herabzusetzen und damit beispielsweise dessen Hautverträglichkeit zu erhöhen. Beispielsweise können Kopplungen mit makromolekularen Verbindungen, beispielsweise Polyethylenglykol, das Protein hinsichtlich der Stabilität und/oder Hautverträglichkeit verbessern.

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

Betreffend alle vorstehend beschriebenen Esterasen beziehungsweise Esterasevarianten und/oder Derivate sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung diejenigen besonders bevorzugt, deren Stabilität und/oder Aktivität mindestens derjenigen der Esterase gemäß einer der SEQ ID NOs. 1-3 entspricht, wobei die Aktivität sich auf die PET-Hydrolyse-Aktivität bezieht, die wie in den Beispielen beschrieben bestimmt werden kann.

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

Hierbei kann es sich DNA- oder RNA-Moleküle handeln. Sie können als Einzelstrang, als ein zu diesem Einzelstrang komplementärer Einzelstrang oder als Doppelstrang vorliegen. Insbesondere bei DNA-Molekülen sind die Sequenzen beider komplementärer Stränge in jeweils allen drei möglichen Leserastern zu berücksichtigen. Ferner ist zu berücksichtigen, dass verschiedene Codons, also Basentriplets, für die gleichen Aminosäuren codieren können, so dass eine bestimmte Amino-

säuresequenz von mehreren unterschiedlichen Nukleinsäuren codiert werden kann. Auf Grund dieser Degeneriertheit des genetischen Codes sind sämtliche Nukleinsäuresequenzen in diesen Erfindungsgegenstand mit eingeschlossen, die eine der vorstehend beschriebenen Esterasen codieren können. Der Fachmann ist in der Lage, diese Nukleinsäuresequenzen zweifelsfrei zu bestimmen, da trotz der Degeneriertheit des genetischen Codes einzelnen Codons definierte Aminosäuren zuzuordnen sind. Daher kann der Fachmann ausgehend von einer Aminosäuresequenz für diese Aminosäuresequenz codierende Nukleinsäuren problemlos ermitteln. Weiterhin können bei erfindungsgemäßen Nukleinsäuren ein oder mehrere Codons durch synonyme Codons ersetzt sein. Dieser Aspekt bezieht sich insbesondere auf die heterologe Expression der erfindungsgemäßen Enzyme. So besitzt jeder Organismus, beispielsweise eine Wirtszelle eines Produktionsstammes, eine bestimmte Codon-Verwendung. Unter Codon-Verwendung wird die Übersetzung des genetischen Codes in Aminosäuren durch den jeweiligen Organismus verstanden. Es kann zu Engpässen in der Proteinbiosynthese kommen, wenn die auf der Nukleinsäure liegenden Codons in dem Organismus einer vergleichsweise geringen Zahl von beladenen tRNA-Molekülen gegenüberstehen. Obwohl für die gleiche Aminosäure codierend führt das dazu, dass in dem Organismus ein Codon weniger effizient translatiert wird als ein synonymes Codon, das für dieselbe Aminosäure codiert. Auf Grund des Vorliegens einer höheren Anzahl von tRNA-Molekülen für das synonyme Codon kann dieses in dem Organismus effizienter translatiert werden.

Einem Fachmann ist es über heutzutage allgemein bekannte Methoden, wie beispielsweise die chemische Synthese oder die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in Verbindung mit molekularbiologischen und/oder proteinchemischen Standardmethoden möglich, anhand bekannter DNA- und/oder Aminosäuresequenzen die entsprechenden Nukleinsäuren bis hin zu vollständigen Genen herzustellen. Derartige Methoden sind beispielsweise aus Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, 3. Edition Cold Spring Laboratory Press. bekannt.

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

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

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

molekülen, Formylierungen, Aminierungen, usw. Solche posttranslationale Modifikationen können die Esterase funktionell beeinflussen.

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

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

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

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

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

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

Die Wirtszelle kann aber auch eine eukaryontische Zelle sein, die dadurch gekennzeichnet ist, dass sie einen Zellkern besitzt. Einen weiteren Gegenstand der Erfindung stellt daher eine Wirtszelle dar, die dadurch gekennzeichnet ist, dass sie einen Zellkern besitzt. Im Gegensatz zu prokaryontischen Zellen sind eukaryontische Zellen in der Lage, das gebildete Protein posttranslational zu modifizieren. Beispiele dafür sind Pilze wie Actinomyceten oder Hefen wie *Saccharomyces* oder *Kluyveromyces*. Dies kann beispielsweise dann besonders vorteilhaft sein, wenn die Proteine im Zusammenhang mit ihrer Synthese spezifische Modifikationen erfahren sollen, die derartige Systeme ermöglichen. Zu den Modifikationen, die eukaryontische Systeme besonders im Zusammenhang mit der Proteinsynthese durchführen, gehören beispielsweise die Bindung niedermolekularer Verbindungen wie Membrananker oder Oligosaccharide. Derartige Oligosaccharid-Modifikationen können beispielsweise zur Senkung der Allergenizität eines exprimierten Proteins wünschenswert sein. Auch eine Coexpression mit den natürlicherweise von derartigen Zellen gebildeten Enzymen, wie beispielsweise Cellulasen oder Lipasen, kann vorteilhaft sein. Ferner können sich beispielsweise thermophile pilzliche Expressionssysteme besonders zur Expression temperaturbeständiger Proteine oder Varianten eignen.

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

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

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

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

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

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

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

Die Mittel, die eine Esterase wie vorstehend beschrieben enthalten, sind vorzugsweise Mittel zur Behandlung und/oder Reinigung und/oder Pflege von Textilien oder Wäsche, insbesondere ein Waschmittel, ein Waschlösungsmittel oder ein Textilpflegemittel.

Zu diesem Erfindungsgegenstand zählen alle denkbaren Waschmittelarten, sowohl Konzentrate als auch unverdünnt anzuwendende Mittel, zum Einsatz im kommerziellen Maßstab, in der Waschmaschine oder bei der Handwäsche. Dazu gehören beispielsweise Waschmittel für Textilien, Teppiche, oder Naturfasern, für die die Bezeichnung Waschmittel verwendet wird. Zu den Waschmitteln im Rahmen der Erfindung zählen ferner Waschhilfsmittel, die bei der manuellen oder maschinellen Textilwäsche zum eigentlichen Waschmittel hinzudosiert werden, um eine weitere Wirkung zu erzielen. Ferner zählen zu Waschmitteln im Rahmen der Erfindung auch Textilvor- und Nachbehandlungsmittel, also solche Mittel, mit denen das Wäschestück vor der eigentlichen Wäsche in Kontakt gebracht wird, beispielsweise zum Anlösen hartnäckiger Verschmutzungen, und auch solche Mittel, die in einem der eigentlichen Textilwäsche nachgeschalteten Schritt dem Waschgut weitere wünschenswerte Eigenschaften wie angenehmen Griff, Knitterfreiheit oder geringe statische Aufladung verleihen. Zu letztgenannten Mittel werden u.a. die Weichspüler gerechnet.

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

Vorteilhafte Inhaltsstoffe der hierin beschriebenen und verwendeten Mittel sind offenbart in der internationalen Patentanmeldung WO2009/121725, dort beginnend auf Seite 5, vorletzter Absatz, und endend auf Seite 13 nach dem zweiten Absatz. Auf diese Offenbarung wird ausdrücklich Bezug genommen und der dortige Offenbarungsgehalt in die vorliegende Patentanmeldung einbezogen.

Ein hierin beschriebenes oder verwendetes Mittel enthält die Esterase vorteilhafterweise in einer Menge von 2µg bis 20mg, vorzugsweise von 5µg bis 17,5mg, besonders bevorzugt von 20µg bis 15mg und ganz besonders bevorzugt von 50µg bis 10mg pro g des Mittels. In verschiedenen Ausführungsformen kann die Esterase in dem Mittel in einer Menge von 1×10^{-8} bis 5 Gew.-%, 1×10^{-7} bis 3 Gew.-%, von 0,00001 bis 1 Gew.-%, von 0,00005 bis 0,5 Gew.-%, von 0,0001 bis 0,1 Gew.-% und von 0,0001 bis 0,05 Gew.-% bezogen auf aktives Protein enthalten sein.

Ferner kann die in dem Mittel enthaltene Esterase, und/oder weitere Inhaltsstoffe des Mittels, mit einer bei Raumtemperatur oder bei Abwesenheit von Wasser für das Enzym undurchlässigen Substanz umhüllt sein, welche unter Anwendungsbedingungen des Mittels durchlässig für das Enzym

wird. Eine solche Ausführungsform der Erfindung ist somit dadurch gekennzeichnet, dass die Esterase mit einer bei Raumtemperatur oder bei Abwesenheit von Wasser für die Esterase undurchlässigen Substanz umhüllt ist. Weiterhin kann auch das Mittel selbst in einem Behältnis, vorzugsweise einem luftdurchlässigen Behältnis, verpackt sein, aus dem es kurz vor Gebrauch oder während des Waschvorgangs freigesetzt wird.

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

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

Diese Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung umfassen alle festen, pulverförmigen, flüssigen, gelförmigen oder pastösen Darreichungsformen hierin beschriebener und verwendeter Mittel, die gegebenenfalls auch aus mehreren Phasen bestehen können sowie in komprimierter oder nicht komprimierter Form vorliegen können. Das Mittel kann als rieselfähiges Pulver vorliegen, insbesondere mit einem Schüttgewicht von 300 g/l bis 1200 g/l, insbesondere 500 g/l bis 900 g/l oder 600 g/l bis 850 g/l. Zu den festen Darreichungsformen des Mittels zählen ferner Extrudate, Granulate, Tabletten oder Pouches. Alternativ kann das Mittel auch flüssig, gelförmig oder pastös sein, beispielsweise in Form eines nicht-wässrigen Flüssigwaschmittels oder einer nicht-wässrigen Paste oder in Form eines wässrigen Flüssigwaschmittels oder einer wasserhaltigen Paste. Weiterhin kann das Mittel als Einkomponentensystem vorliegen. Solche Mittel bestehen aus einer Phase. Alternativ kann ein Mittel auch aus mehreren Phasen bestehen. Ein solches Mittel ist demnach in mehrere Komponenten aufgeteilt.

Die hierin beschriebenen und verwendeten Mittel, insbesondere Waschmittel, können ausschließlich eine Esterase enthalten. Alternativ können sie auch weitere hydrolytische Enzyme oder andere Enzyme in einer für die Wirksamkeit des Mittels zweckmäßigen Konzentration enthalten. Eine weitere Ausführungsform stellen somit Mittel dar, die ferner eines oder mehrere weitere Enzyme umfassen. Als weitere Enzyme bevorzugt einsetzbar sind alle Enzyme, die in dem erfindungsgemäßen Mittel eine katalytische Aktivität entfalten können, insbesondere eine Protease, Amylase, Cellulase, Hemicellulase, Mannanase, Tannase, Xylanase, Xanthanase, Xyloglucanase, β -Glucosidase, Pektinase, Carrageenase, Perhydrolase, Oxidase, Oxidoreduktase oder eine Lipase, sowie deren Gemische. Weitere Enzyme sind in dem Mittel vorteilhafterweise jeweils in einer Menge von 1×10^{-8} bis 5 Gewichts-Prozent bezogen auf aktives Protein enthalten. Zunehmend bevorzugt ist jedes weitere Enzym in einer Menge von 1×10^{-7} -3 Gew.-%, von 0,00001-1 Gew.-%, von 0,00005-0,5 Gew.-%, von 0,0001 bis 0,1 Gew.-% und besonders bevorzugt von 0,0001 bis 0,05 Gew.-% in hierin beschriebenen und verwendeten Mitteln enthalten, bezogen auf aktives Protein.

Besonders bevorzugt zeigen die Enzyme synergistische Effekte, beispielsweise bei der Reinigungsleistungen gegenüber bestimmten Anschmutzungen oder Flecken, d.h. die in der Mittelzusammensetzung enthaltenen Enzyme unterstützen sich in ihrer Leistung gegenseitig. Ganz besonders bevorzugt liegt ein solcher Synergismus vor zwischen der erfindungsgemäß enthaltenen Esterase und einem weiteren Enzym eines erfindungsgemäßen Mittels, darunter insbesondere zwischen der genannten Esterase und und/oder einer Mannanase und/oder einer Cellulase und/oder einer Pektinase. Bevorzugt ist die Kombination einer hierin beschriebenen Esterase mit einer Cellulase in den hierin beschriebenen und verwendeten Mitteln, Verwendungen und Verfahren, da so auf PET/Cellulose-Mischgeweben und/oder gemischten Wäscheposten beide Arten von Faserpflege einwirken können.

Synergistische Effekte können nicht nur zwischen verschiedenen Enzymen, sondern auch zwischen einem oder mehreren Enzymen und weiteren Inhaltsstoffen des erfindungsgemäßen Mittels auftreten.

Ein weiterer Erfindungsgegenstand ist ein Verfahren zur Behandlung oder Pflege von Textilien, das dadurch gekennzeichnet ist, dass in mindestens einem Verfahrensschritt ein hierin beschriebenes Mittel angewendet wird, oder dass in mindestens einem Verfahrensschritt eine hierin beschriebene Esterase katalytisch aktiv wird, insbesondere derart, dass die Esterase in einer Menge von 40µg bis 4g, vorzugsweise von 50µg bis 3g, besonders bevorzugt von 100µg bis 2g und ganz besonders bevorzugt von 200µg bis 1g eingesetzt wird.

Hierunter fallen sowohl manuelle als auch maschinelle Verfahren, wobei maschinelle Verfahren bevorzugt sind. Verfahren zur Behandlung, Pflege und/oder Reinigung von Textilien zeichnen sich im allgemeinen dadurch aus, dass in mehreren Verfahrensschritten verschiedene pflege- oder reinigungsaktive Substanzen auf das Textil aufgebracht und nach der Einwirkzeit abgewaschen werden, oder dass das Textil in sonstiger Weise mit einem solchen Mittel oder einer Lösung oder Verdünnung dieses Mittels behandelt wird. Alle denkbaren Wasch- oder Textilbehandlungs- oder Textilpflegeverfahren können in wenigstens einem der Verfahrensschritte um die Anwendung eines hierin beschriebenen Mittels oder einer hierin beschriebenen Esterase bereichert werden und stellen dann Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung dar. Alle Sachverhalte, Gegenstände und Ausführungsformen, die für hierin beschriebene und verwendete Esterasen und sie enthaltende Mittel beschrieben sind, sind auch auf diesen Erfindungsgegenstand anwendbar. Daher wird an dieser Stelle ausdrücklich auf die Offenbarung an entsprechender Stelle verwiesen mit dem Hinweis, dass diese Offenbarung auch für die vorstehenden erfindungsgemäßen Verfahren und Verwendungen gilt.

Da erfindungsgemäße Esterasen natürlicherweise bereits eine hydrolytische Aktivität besitzen und diese auch in Medien entfalten, die sonst keine Reinigungskraft besitzen wie beispielsweise in blo-

ßem Puffer, kann ein einzelner und/oder der einzige Schritt eines solchen Verfahrens darin bestehen, dass gewünschtenfalls als einzige aktive Komponente eine erfindungsgemäße Esterase mit einem Textil oder Wäschestück in Kontakt gebracht wird, bevorzugt in einer Pufferlösung oder in Wasser. Dies stellt eine weitere Ausführungsform dieses Erfindungsgegenstandes dar.

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

Darüber hinaus betrifft die Erfindung auch den weiteren Aspekt, die hierin beschriebenen Esterasen zum Polyesterabbau in Abwässern oder anderen mit Polyester, insbesondere PET in Nanopartikelform, belasteten Umgebungen, wie Gewässern, Böden, Deponien, etc. einzusetzen.

Generell sind alle oben im Kontext mit Esterasen und den diesen enthaltenden Mitteln beschriebenen Sachverhalte, Gegenstände und Ausführungsformen auch in den Verfahren und Verwendungen der Erfindung anwendbar. Das bedeutet beispielsweise, dass die Esterasen, die hierin beschrieben werden, bei der Verwendung zur Hydrolyse von Polyestern, insbesondere PET, oder in Verfahren zum Verbessern des Tragekomforts und/oder Vermindern von Pilling von Polyesterhaltigen Textilien, insbesondere PET-haltigen Textilien, oder in Verfahren zum Hydrophilieren von PET-Fasern und/oder Abbau von PET-Polymer aus Textilfasern in allen oben beschriebenen Formulierungen und/oder auf alle oben beschriebenen Arten verwendet werden können. Daher wird an dieser Stelle ausdrücklich auf die Offenbarung an entsprechender Stelle verwiesen mit dem Hinweis, dass diese Offenbarung auch für die erfindungsgemäße Verwendung bzw. die erfindungsgemäßen Verfahren gilt.

Beispiele

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

Beispiel 1: Herstellung der Esterasen

Ausgehend von einer Esterase, die eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO. 1 aufwies, wurde eine erfindungsgemäße Esterase-Variante durch ortsgerichtete („site-directed“) Mutagenese in der für die Esterase codierenden Nukleinsäure mittels „QuickChange® II Site-directed-Mutagenese-Kit“ (Stratagene) hergestellt. Hierbei wurden die Codons für die angegebenen Aminosäurepositionen (178, 213) derart verändert, so dass bei der Translation bezogen auf die Aminosäuresequenz eine Substitution der Aminosäuren wie angegeben erfolgte. Die Expression der Esterase-Variante erfolgte in fachüblicher Art- und Weise durch Transformation von E.coli BL21(DE3) mit einem entsprechenden Expressionsvektor und nachfolgender Kultur der die Esterase-Variante exprimierenden Transformanten. Die Esterasen wurden mittels Chromatographie aus den entsprechenden Kulturen aufgereinigt.

Referenz-Esterase: Esterase mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO. 1.

Esterase-Variante I178V: Esterase mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO. 1 mit der Aminosäuresubstitution I178V in der Zählung gemäß SEQ ID NO. 1 (SEQ ID NO. 2).

Esterase-Variante I213S: Esterase mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO. 1 mit der Aminosäuresubstitution I213S in der Zählung gemäß SEQ ID NO. 1 (SEQ ID NO. 3).

Beispiel 2: Charakterisierung der hergestellten Esterase(-Varianten)

Die Aktivität der Esterasen wurden mit zwei Methoden bestimmt. Mittels einer turbidimetrischen Methode wurde die enzymatische Hydrolyse von Polycaprolacton (PCL) Nanopartikeln gemessen. Die PCL-Nanopartikel wurden hierzu mittels einer Präzipitationsmethode hergestellt. 100 mg PCL wurden in 10 mL Aceton bei 50°C gelöst und anschließend unter starkem Rühren tröpfchenweise in 100 mL ultrareines H₂O pipettiert. Die PCL-Suspension wurde durch einen Papierfilter filtriert und das organische Lösungsmittel unter dem Abzug entfernt. Für die Bestimmung des enzymatischen Abbaus von PCL Nanopartikeln wurden 100 µL einer PCL-Suspension (1 mg/mL) in jedem Well einer Mikrotiterplatte vorgelegt und mit Tris-Puffer (0.5 M, pH 8,5) oder Enzymlösungen im selben Tris-Puffer bis zu einem Gesamtvolumen von 200 µL aufgefüllt. Die PCL Hydrolyse wurde im Plattenleser bei 600 nm und 50°C über einen Zeitraum von 15 min bestimmt. Die linearen initialen Raten der Trübungsabnahme der Suspension wurden bestimmt. Die Ergebnisse sind in Figur 1

graphisch dargestellt (Abbauration von PCL-Nanopartikeln als funktion der eingesetzten Enzymmengen).

Mit einer weiteren Methode wurde die enzymatische Abbauration von PET-Folien gravimetrisch bestimmt. Hierzu wurden eine PET-Folie (ca. 55 mg, 5 mm X 30 mm) und ca. 900 µg chromatographisch aufgereinigtes Enzym gelöst in 0.5 M Tris-HCl (pH 8,5) unter starkem Schütteln bei 60°C inkubiert. Die Gewichtverluste der PET-Folien wurden nach 48 h-Inkubation bestimmt.

	SEQ ID	SEQ ID	SEQ ID
	NO:1	NO:2	NO:3
Abbauration (mg/24h)	2,3±0,2	3,2±0,3	2,8±0,2

Patentansprüche

1. Verwendung einer Esterase oder eines Mittels, das eine Esterase enthält, insbesondere eines Mittels zur Wäsche- und/oder Textilbehandlung, zur Hydrolyse von Polyestern, insbesondere Polyethylenterephthalat (PET), dadurch gekennzeichnet, dass die Esterase eine Aminosäuresequenz umfasst, die mindestens 70 %, vorzugsweise mindestens 80 %, noch bevorzugter mindestens 85 %, am bevorzugtesten mindestens 90 % Sequenzidentität mit der in SEQ ID NO. 1 angegebenen Aminosäuresequenz über deren Gesamtlänge aufweist.
2. Verfahren zum Verbessern des Tragekomforts und/oder Vermindern von Pilling von Polyesterhaltigen Textilien, insbesondere PET-haltigen Textilien, durch in Kontakt bringen der Polyesterhaltigen Textilien mit einer Esterase oder einem Mittel, das eine Esterase enthält, insbesondere einem Mittel zur Wäsche- und/oder Textilbehandlung, dadurch gekennzeichnet, dass die Esterase eine Aminosäuresequenz umfasst, die mindestens 70 %, vorzugsweise mindestens 80 %, noch bevorzugter mindestens 85 %, am bevorzugtesten mindestens 90 % Sequenzidentität mit der in SEQ ID NO. 1 angegebenen Aminosäuresequenz über deren Gesamtlänge aufweist.
3. Verfahren zum Hydrophilieren von PET-Fasern und/oder Abbau von PET-Polymer aus Textilfasern durch in Kontakt bringen des PET mit einer Esterase oder einem Mittel, das eine Esterase enthält, insbesondere einem Mittel zur Wäsche- und/oder Textilbehandlung, dadurch gekennzeichnet, dass die Esterase eine Aminosäuresequenz umfasst, die mindestens 70 %, vorzugsweise mindestens 80 %, noch bevorzugter mindestens 85 %, am bevorzugtesten mindestens 90 % Sequenzidentität mit der in SEQ ID NO. 1 angegebenen Aminosäuresequenz über deren Gesamtlänge aufweist.
4. Ausführungsform nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Esterase (a) aus der in SEQ ID NO. 1 angegebenen Aminosäuresequenz besteht oder (b) aus der Esterase mit der in in SEQ ID NO. 1 angegebenen Aminosäuresequenz als Ausgangsmolekül erhältlich ist durch
 - (i) ein- oder mehrfache Aminosäuresubstitution an den Positionen, die den Positionen 1, 9, 13, 18, 19, 23, 25, 26, 28, 32, 33, 46, 47, 48, 61, 64, 89, 90, 92, 105, 113, 114, 157, 183, 204, 234, 245, 246, 249, und 253 gemäß SEQ ID NO:1 entsprechen; und/oder
 - (ii) ein- oder mehrfache Aminosäuresubstitution an den Positionen, die den Positionen 3, 12, 24, 30, 35, 49, 60, 63, 65, 72, 73, 87, 95, 98, 108, 109, 110, 112, 117, 121, 122, 131, 142, 151, 163, 165, 174, 175, 177, 182, 187, 194, 195, 212, 213, 232, 238, 248 und 256 gemäß SEQ ID NO:1 entsprechen; und/oder
 - (iii) ein- oder mehrfache Aminosäuresubstitution an den Positionen, die den Positionen 4, 5, 11, 14, 17, 21, 22, 31, 43, 50, 53, 57, 62, 68, 74, 78, 82, 83, 85, 88, 101, 102, 106, 107, 116,

124, 126, 136, 138, 141, 149, 152, 153, 158, 178, 190, 197, 202, 207, 209, 216, 219 und 250 gemäß SEQ ID NO:1 entsprechen; und/oder

(iv) ein- oder mehrfache Aminosäuresubstitution an den Positionen, die den Positionen 2, 27, 41, 42, 44, 45, 51, 54, 56, 58, 66, 67, 75, 79, 81, 86, 91, 96, 104, 111, 120, 125, 127, 135, 144, 156, 159, 160, 162, 171, 172, 181, 184, 186, 188, 205, 210, 211, 217, 221, 222, 223, 230, 236, 237, 239, 247, 251, 252 und 254 gemäß SEQ ID NO:1 entsprechen; und/oder

(v) eine oder mehrere Aminosäuresubstitutionen ausgewählt aus der Gruppe A001D, A001M, Y004N, N009D, N009L, N009M, N009Q, N009Y, A013F, A013Q, A013Y, R018E, R018H, S023A, S023E, S023Q, S025A, S025C, S025D, S025E, S025N, E026A, E026C, E026F, E026H, E026I, E026K, E026M, E026Q, E026R, E026S, E026T, E026V, E026W, E026Y, N028I, N028K, N028P, N028Q, N028T, N028Y, S030D, L032A, L032E, L032Q, S033Q, S035E, S035I, S035Q, S035V, Y043R, R046D, R046I, R046N, R046Q, R046T, S057C, Y060C, T061D, T061M, T061P, G062A, T063C, E064A, E064K, E064Q, E064R, A065G, A065K, A065Y, E072H, R073L, R073Y, T083V, D085E, I087L, T088D, T088E, T089A, T089C, T089D, T089E, T089G, T089L, T089P, T089V, L090E, L090Q, L090S, L090T, Q092D, Q092E, Q092G, Q092H, Q092N, Q092S, Q092Y, S095D, S095E, S095Q, N101E, N105A, N105D, N105E, N105G, N105M, N105Q, N105S, M107L, I108L, I108Y, N109T, R110H, S113C, S113D, S113E, S113H, S113P, T114D, T114E, S117Q, A125S, V126A, M131A, M131F, M131L, S136A, S136V, S141E, P151A, P151C, P151I, P151L, P151S, P151V, L152I, T153C, T153L, H156D, L157A, L157C, L157H, L157I, L157K, L157N, L157Q, L157S, L157T, L157W, L157Y, N158E, N160D, D174A, D174C, D174E, D174G, D174H, D174K, D174M, D174Q, D174R, D174S, D174T, D174V, L175C, L175D, L175E, L175G, L175N, L175Q, T177D, I178L, A182D, A182E, T183D, T183E, T183H, T183Q, T183S, H184Y, P187A, P187E, P187M, P187V, F188M, N190E, S194D, S194E, S197A, E202V, D204A, D204C, D204E, D204F, D204G, D204H, D204I, D204K, D204L, D204M, D204N, D204P, D204Q, D204R, D204S, D204T, D204V, D204W, T207D, T207G, F209C, F209E, A210T, N212I, N212L, N212M, N212T, N212V, I213C, I213E, I213F, I213H, I213K, I213Q, I213R, I213S, I213Y, G219A, N232C, N232M, T234H, R245V, D246A, D246C, D246H, D246P, D246T, L248I, F249G, F249K, F249N, F249P, G250P, E253A, E253C, E253F, E253G, E253H, E253I, E253K, E253L, E253N, E253Q, E253R, E253S, E253T, E253V, E253W, E253Y, R256I und R256L, wobei die angegebenen Positionen den Positionen gemäß SEQ ID NO:1 entsprechen; und/oder

(vi) eine oder mehrere Aminosäuresubstitutionen ausgewählt aus der Gruppe A001E, A001F, A001G, A001H, A001K, A001L, A001N, A001R, A001S, A001T, A001V, A001W, A001Y, Y004F, E005A, E005L, N009A, N009E, N009H, N009S, N009T, N009V, T011N, D012A, D012H, A013C, A013D, A013E, A013K, A013L, A013M, A013S, A013T, L014F, L014I, L014M, A017G, A017K, A017M, A017Q, A017S, R018A, R018G, R018I, R018N, R018Q, R018S, R018V, R018W, S019A, S019C, S019F, S019H, S019K, S019L, S019M, S019N, S019R, S019T, S019V, S019W, P021L, F022Y, S023C, S023D, S023F, S023G, S023H,

S023I, S023K, S023L, S023M, S023P, S023T, S023Y, V024F, V024I, V024L, V024M, V024T, V024W, V024Y, S025G, S025K, S025L, S025M, S025Q, S025R, S025T, S025V, E026G, E026L, E026N, N028A, N028E, N028F, N028G, N028H, N028L, N028M, N028S, N028V, N028W, S030A, S030E, S030N, S030P, S030T, R031K, L032G, L032H, L032I, L032K, L032M, L032N, L032R, L032S, L032T, L032Y, S033A, S033D, S033H, S033K, S033M, S033N, S033V, S035D, S035H, S035L, S035N, S035R, S035Y, T041K, Y044F, R046A, R046E, R046K, R046L, R046S, R046V, E047D, N048A, N048C, N048D, N048E, N048G, N048H, N048I, N048K, N048L, N048M, N048P, N048Q, N048R, N048Y, N049A, N049D, N049G, N049M, N049Q, T050L, Y051F, A053G, S057A, S057V, Y060L, Y060V, T061A, T061G, T061S, T061Y, G062T, T063D, T063H, T063K, T063N, E064M, E064V, E064W, E064Y, A065N, A065Q, A065R, A065S, S066D, S066T, I067L, A068Q, E072A, E072L, E072M, E072Q, E072S, I074V, I082F, I082M, T083C, D085N, I087C, I087M, T088N, T088S, T089H, T089I, T089K, T089N, T089Q, T089S, L090A, L090F, L090M, L090W, L090Y, Q092A, Q092L, E098Q, N101A, N101D, N101Q, A102H, L104V, N105H, H106W, I108C, I108T, I108V, N109E, N109F, N109H, N109K, N109M, N109S, N109Y, R110A, R110C, R110E, R110F, R110G, R110L, R110M, R110N, R110Q, R110S, A111T, S113A, S113F, S113G, S113K, S113L, S113N, S113Q, S113T, S113V, S113Y, T114A, T114C, T114H, T114I, T114K, T114M, T114N, T114Q, T114R, T114S, T114V, R116S, S117D, S117E, S117G, SI 171, S121A, S122G, S122H, S122K, S122N, R138E, R138Q, S141Q, Q142E, Q142I, Q142L, Q142M, P144K, P151G, L152M, L157F, L157M, L157R, L157V, N158H, N160E, S162E, S163E, S163N, S163T, T165K, T165M, T165Q, T165R, T165Y, I171F, G172A, L175A, L175H, L175S, T177K, T177R, T177V, V181P, A182H, A182N, A182Q, A182S, T183A, T183I, T183K, T183R, T183Y, H184F, K186R, P187K, P187Q, P187T, S195D, S195E, S195H, S195N, S195T, E202G, E202I, E202L, E202Q, G205Q, T207N, F209W, N212A, N212Y, I213L, I213M, G219Q, Y221F, S222C, S222T, V230Q, N232D, N232G, N232K, N232L, T234A, T234D, T234E, T234I, T234Q, T234S, T237N, T237S, R245A, R245C, R245E, R245G, R245H, R245K, R245L, R245M, R245Q, R245S, R245T, D246G, D246I, D246K, D246Q, D246S, D246V, G247K, L248A, L248D, L248E, L248K, L248M, L248Q, L248S, F249C, F249H, F249L, F249M, F249Q, F249R, F249S, F249T, F249V, F249Y, E251G, V252I, E254C, R256C, R256D, R256E, R256H, R256M, R256Q, R256T, R256V und R256W, wobei die angegebenen Positionen den Positionen gemäß SEQ ID NO:1 entsprechen; und/oder

(vii) eine oder mehrere Aminosäuresubstitutionen ausgewählt aus der Gruppe A001C, A001P, A001Q, Y004W, E005W, N009C, N009F, N009G, N009I, D012V, A013H, A013I, R018F, R018M, R018P, R018T, S019G, S019I, S019Q, S019Y, S023R, S023V, V024K, S025F, S025I, L032D, L032V, S033E, S033F, S033I, S033L, S033R, S035A, S035M, Y043W, R046C, R046F, R046H, R046M, E047C, E047H, N048S, N048V, N048W, N049C, T050Q, V054I, T061H, T061I, T061V, T063S, E064G, E064I, E064L, E064N, A065C, A065L, A065M, I067V, A068H, A068K, A068T, E072K, E072N, R073F, T083I, I087Y, T089M, T089W, L090K, L090V, Q092K, Q092M, Q092T, S095C, E098D, E098T, N101W, A102C, N105Y, M107V,

I108Q, R110K, R110T, S113W, T114P, S117A, S117C, S117M, S117N, S117P, S117T, S121G, S121K, S121N, S121P, S121R, S121T, S122A, S122C, S122D, S122E, S122R, S122T, M127S, R138T, Q142R, Q142V, A149C, P151T, L157E, L157P, N158V, S163D, S163M, T165L, T165V, D174N, L175K, T177H, T177Q, T177Y, I178V, V181T, T183C, T183F, T183M, T183N, P187L, P187S, S194M, S194Q, S194T, S195C, S195W, S197E, S197K, E202C, G205N, P211V, N212C, I213A, I217T, G219T, N232A, N232E, N232F, N232H, N232Y, T234K, T234L, T234N, T234R, T234V, Q238E, Q238P, Q238R, F239Y, D246E, D246M, D246R, D246W, L248C, L248P, L248V, F249W, G250K, G250R, E253M, E254K und R256K, wobei die angegebenen Positionen den Positionen gemäß SEQ ID NO:1 entsprechen; und/oder

(viii) eine oder mehrere Aminosäuresubstitutionen ausgewählt aus der Gruppe N002A, N002L, P003A, P003E, P003G, P003H, P003I, P003K, P003L, P003M, P003Q, P003S, P003T, P003V, T011H, D012E, D012S, A013G, A013P, L014Y, R018L, S019E, F022E, F022M, V024C, V024Q, E026P, N028C, N028D, L032F, L032P, S033Y, T041R, I042V, Y043K, E047F, E047L, E047M, E047P, E047S, E047V, E047W, N049E, N049F, N049L, N049Y, T050E, T050V, Y060G, Y060M, G062Q, G062S, T063A, T063G, E064T, A065D, A065E, A065H, A065T, E072D, E072V, E072W, D085C, I087E, T088G, T089Y, L090R, Q092V, N101S, N105I, N105K, N105L, N105R, H106F, I108M, I108N, N109R, S112G, S112P, S112T, T114F, T114G, T114Y, R116I, R116K, R116T, R116V, S117H, D120L, S122L, S122Q, S122V, S122Y, L124A, L124M, L124P, M127V, G135A, S136T, R138A, S141A, Q142D, Q142K, Q142N, S163A, S163G, T165H, I171V, T177M, T177N, A182C, K186L, P187I, N190H, N190Y, S194C, S197Y, F209D, F209N, N212S, I217V, V223T, V230A, T234G, T234M, T234Y, Y236F, Q238C, Q238D, Q238G, Q238M, Q238S, R245N, R245P, D246Y, G247R, L248R, F249A, F249E und R256N, wobei die angegebenen Positionen den Positionen gemäß SEQ ID NO:1 entsprechen; und/oder

(ix) eine oder mehrere Aminosäuresubstitutionen ausgewählt aus der Gruppe N009W, D012I, D012L, A013R, A017N, R018Y, P021D, P021T, P021Y, F022H, F022K, S023N, V024N, S025H, S025Y, E027N, S030C, S030K, R031Q, R031V, S033C, S035C, S035W, I042Q, P045A, P045T, R046P, R046Y, E047Q, A053L, A053V, I056M, S057T, P058G, Y060A, Y060F, Y060S, Y060W, T061C, T061K, T061L, T061N, T061Q, T061R, T061W, G062D, T063E, T063P, E064H, E064S, E072F, E072G, E072R, R073I, R073T, R073V, R073W, I074A, I074C, I074G, I074T, A075S, G078A, G078S, F079G, V081G, I082G, I082K, I082Q, T083M, T083N, D085G, T086G, T086N, I087Q, I087S, I087T, I087W, T088C, L090C, L090D, L090G, L090H, L090N, D091E, D091Y, Q092C, Q092P, S095A, S095L, S095V, S095Y, R096Y, A102Y, N105C, N105F, N105V, N105W, M107S, I108K, I108P, N109Q, R110Y, S112F, S112I, S112L, S112W, S112Y, S113M, V126T, M131G, M131I, M131S, M131V, S136C, R138D, R138M, Q142A, A149I, T153N, L157D, L157G, N158C, N158D, N158I, N158W, K159T, S163C, T177C, T177E, T177S, I178F, I178Y, A182G, A182Y, T183L, P187C, N190S, S195F, S195Q, S195Y, D204Y, A210S, K216N, K216Q, K216Y, G219L, N232R,

N232W, R245I, L248F, F249D, G250S, G250T, E251Q, E253D und E253P, wobei die angegebenen Positionen den Positionen gemäß SEQ ID NO:1 entsprechen; und/oder

(x) Fragmentierung, Deletions-, Insertions- oder Substitutionsmutagenese und eine Aminosäuresequenz umfasst, die über eine Länge von mindestens 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 255, 256, 257, 258, 259 oder 260 zusammenhängenden Aminosäuren mit dem Ausgangsmolekül übereinstimmt.

5. Esterase, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine Aminosäuresequenz umfasst, die mindestens 70 % vorzugsweise mindestens 80 %, noch bevorzugter mindestens 85 %, am bevorzugtesten mindestens 90 % Sequenzidentität mit der in SEQ ID NO. 1 angegebenen Aminosäuresequenz über deren Gesamtlänge aufweist und die
 - (i) die Aminosäuren R18 und S136 an den Positionen, die den Positionen 18 und 136 gemäß SEQ ID NO:1 entsprechen, aufweist;
 - (ii) die Aminosäuren R18, S136 und V178 an den Positionen, die den Positionen 18, 136 und 178 gemäß SEQ ID NO:1 entsprechen, aufweist;
 - (iii) die Aminosäuren R18, S136 und S213 an den Positionen, die den Positionen 18, 136 und 213 gemäß SEQ ID NO:1 entsprechen, aufweist;
 - (iv) die Aminosäuren V178 und S213 an den Positionen, die den Positionen 178 und 213 gemäß SEQ ID NO:1 entsprechen, aufweist; oder
 - (v) die Aminosäuren R18, S136, V178 und S213 an den Positionen, die den Positionen 18, 136, 178 und 213 gemäß SEQ ID NO:1 entsprechen, aufweist.
6. Esterase nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass sie (a) eine Aminosäuresequenz umfasst, die ausgewählt ist aus denen, die in SEQ ID NOs:1-5 angegeben sind oder daraus besteht; oder (b) aus einer Esterase, die die Aminosäuresequenz nach SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 oder SEQ ID NO:5 umfasst, als Ausgangsmolekül erhältlich ist durch
 - (xi) ein- oder mehrfache Aminosäuresubstitution an den Positionen, die den Positionen 1, 9, 13, 19, 23, 25, 26, 28, 32, 33, 46, 47, 48, 61, 64, 89, 90, 92, 105, 113, 114, 157, 183, 204, 234, 245, 246, 249 und 253 gemäß SEQ ID NO:1 entsprechen; und/oder
 - (xii) ein- oder mehrfache Aminosäuresubstitution an den Positionen, die den Positionen 3, 12, 24, 30, 35, 49, 60, 63, 65, 72, 73, 87, 95, 98, 108, 109, 110, 112, 117, 121, 122, 131, 142, 151, 163, 165, 174, 175, 177, 182, 187, 194, 195, 212, 232, 238, 248 und 256 gemäß SEQ ID NO:1 entsprechen; und/oder
 - (xiii) ein- oder mehrfache Aminosäuresubstitution an den Positionen, die den Positionen 4, 5, 11, 14, 17, 21, 22, 31, 43, 50, 53, 57, 62, 68, 74, 78, 82, 83, 85, 88, 101, 102, 106, 107, 116, 124, 126, 138, 141, 149, 152, 153, 158, 190, 197, 202, 207, 209, 216, 219 und 250 gemäß SEQ ID NO:1 entsprechen; und/oder

- (xiv) ein- oder mehrfache Aminosäuresubstitution an den Positionen, die den Positionen 2, 27, 41, 42, 44, 45, 51, 54, 56, 58, 66, 67, 75, 79, 81, 86, 91, 96, 104, 111, 120, 125, 127, 135, 144, 156, 159, 160, 162, 171, 172, 181, 184, 186, 188, 205, 210, 211, 217, 221, 222, 223, 230, 236, 237, 239, 247, 251, 252 und 254 gemäß SEQ ID NO:1 entsprechen; und/oder
- (xv) eine oder mehrere Aminosäuresubstitutionen ausgewählt aus der Gruppe A001D, A001M, Y004N, N009D, N009L, N009M, N009Q, N009Y, A013F, A013Q, A013Y, S023A, S023E, S023Q, S025A, S025C, S025D, S025E, S025N, E026A, E026C, E026F, E026H, E026I, E026K, E026M, E026Q, E026R, E026S, E026T, E026V, E026W, E026Y, N028I, N028K, N028P, N028Q, N028T, N028Y, S030D, L032A, L032E, L032Q, S033Q, S035E, S035I, S035Q, S035V, Y043R, R046D, R046I, R046N, R046Q, R046T, S057C, Y060C, T061D, T061M, T061P, G062A, T063C, E064A, E064K, E064Q, E064R, A065G, A065K, A065Y, E072H, R073L, R073Y, T083V, D085E, I087L, T088D, T088E, T089A, T089C, T089D, T089E, T089G, T089L, T089P, T089V, L090E, L090Q, L090S, L090T, Q092D, Q092E, Q092G, Q092H, Q092N, Q092S, Q092Y, S095D, S095E, S095Q, N101E, N105A, N105D, N105E, N105G, N105M, N105Q, N105S, M107L, I108L, I108Y, N109T, R110H, S113C, S113D, S113E, S113H, S113P, T114D, T114E, S117Q, A125S, V126A, M131A, M131F, M131L, S141E, P151A, P151C, P151I, P151L, P151S, P151V, L152I, T153C, T153L, H156D, L157A, L157C, L157H, L157I, L157K, L157N, L157Q, L157S, L157T, L157W, L157Y, N158E, N160D, D174A, D174C, D174E, D174G, D174H, D174K, D174M, D174Q, D174R, D174S, D174T, D174V, L175C, L175D, L175E, L175G, L175N, L175Q, T177D, A182D, A182E, T183D, T183E, T183H, T183Q, T183S, H184Y, P187A, P187E, P187M, P187V, F188M, N190E, S194D, S194E, S197A, E202V, D204A, D204C, D204E, D204F, D204G, D204H, D204I, D204K, D204L, D204M, D204N, D204P, D204Q, D204R, D204S, D204T, D204V, D204W, T207D, T207G, F209C, F209E, A210T, N212I, N212L, N212M, N212T, N212V, G219A, N232C, N232M, T234H, R245V, D246A, D246C, D246H, D246P, D246T, L248I, F249G, F249K, F249N, F249P, G250P, E253A, E253C, E253F, E253G, E253H, E253I, E253K, E253L, E253N, E253Q, E253R, E253S, E253T, E253V, E253W, E253Y, R256I und R256L, wobei die angegebenen Positionen den Positionen gemäß SEQ ID NO:1 entsprechen; und/oder
- (xvi) eine oder mehrere Aminosäuresubstitutionen ausgewählt aus der Gruppe A001E, A001F, A001G, A001H, A001K, A001L, A001N, A001R, A001S, A001T, A001V, A001W, A001Y, Y004F, E005A, E005L, N009A, N009E, N009H, N009S, N009T, N009V, T011N, D012A, D012H, A013C, A013D, A013E, A013K, A013L, A013M, A013S, A013T, L014F, L014I, L014M, A017G, A017K, A017M, A017Q, A017S, S019A, S019C, S019F, S019H, S019K, S019L, S019M, S019N, S019R, S019T, S019V, S019W, P021L, F022Y, S023C, S023D, S023F, S023G, S023H, S023I,

S023K, S023L, S023M, S023P, S023T, S023Y, V024F, V024I, V024L, V024M, V024T, V024W, V024Y, S025G, S025K, S025L, S025M, S025Q, S025R, S025T, S025V, E026G, E026L, E026N, N028A, N028E, N028F, N028G, N028H, N028L, N028M, N028S, N028V, N028W, S030A, S030E, S030N, S030P, S030T, R031K, L032G, L032H, L032I, L032K, L032M, L032N, L032R, L032S, L032T, L032Y, S033A, S033D, S033H, S033K, S033M, S033N, S033V, S035D, S035H, S035L, S035N, S035R, S035Y, T041K, Y044F, R046A, R046E, R046K, R046L, R046S, R046V, E047D, N048A, N048C, N048D, N048E, N048G, N048H, N048I, N048K, N048L, N048M, N048P, N048Q, N048R, N048Y, N049A, N049D, N049G, N049M, N049Q, T050L, Y051F, A053G, S057A, S057V, Y060L, Y060V, T061A, T061G, T061S, T061Y, G062T, T063D, T063H, T063K, T063N, E064M, E064V, E064W, E064Y, A065N, A065Q, A065R, A065S, S066D, S066T, I067L, A068Q, E072A, E072L, E072M, E072Q, E072S, I074V, I082F, I082M, T083C, D085N, I087C, I087M, T088N, T088S, T089H, T089I, T089K, T089N, T089Q, T089S, L090A, L090F, L090M, L090W, L090Y, Q092A, Q092L, E098Q, N101A, N101D, N101Q, A102H, L104V, N105H, H106W, I108C, I108T, I108V, N109E, N109F, N109H, N109K, N109M, N109S, N109Y, R110A, R110C, R110E, R110F, R110G, R110L, R110M, R110N, R110Q, R110S, A111T, S113A, S113F, S113G, S113K, S113L, S113N, S113Q, S113T, S113V, S113Y, T114A, T114C, T114H, T114I, T114K, T114M, T114N, T114Q, T114R, T114S, T114V, R116S, S117D, S117E, S117G, SI 171, S121A, S122G, S122H, S122K, S122N, R138E, R138Q, S141Q, Q142E, Q142I, Q142L, Q142M, P144K, P151G, L152M, L157F, L157M, L157R, L157V, N158H, N160E, S162E, S163E, S163N, S163T, T165K, T165M, T165Q, T165R, T165Y, I171F, G172A, L175A, L175H, L175S, T177K, T177R, T177V, V181P, A182H, A182N, A182Q, A182S, T183A, T183I, T183K, T183R, T183Y, H184F, K186R, P187K, P187Q, P187T, S195D, S195E, S195H, S195N, S195T, E202G, E202I, E202L, E202Q, G205Q, T207N, F209W, N212A, N212Y, G219Q, Y221F, S222C, S222T, V230Q, N232D, N232G, N232K, N232L, T234A, T234D, T234E, T234I, T234Q, T234S, T237N, T237S, R245A, R245C, R245E, R245G, R245H, R245K, R245L, R245M, R245Q, R245S, R245T, D246G, D246I, D246K, D246Q, D246S, D246V, G247K, L248A, L248D, L248E, L248K, L248M, L248Q, L248S, F249C, F249H, F249L, F249M, F249Q, F249R, F249S, F249T, F249V, F249Y, E251G, V252I, E254C, R256C, R256D, R256E, R256H, R256M, R256Q, R256T, R256V und R256W, wobei die angegebenen Positionen den Positionen gemäß SEQ ID NO:1 entsprechen; und/oder

- (xvii) eine oder mehrere Aminosäuresubstitutionen ausgewählt aus der Gruppe A001C, A001P, A001Q, Y004W, E005W, N009C, N009F, N009G, N009I, D012V, A013H, A013I, S019G, S019I, S019Q, S019Y, S023R, S023V, V024K, S025F, S025I, L032D, L032V, S033E, S033F, S033I, S033L, S033R, S035A, S035M, Y043W, R046C, R046F, R046H, R046M, E047C, E047H, N048S, N048V, N048W, N049C, T050Q,

V054I, T061H, T061I, T061V, T063S, E064G, E064I, E064L, E064N, A065C, A065L, A065M, I067V, A068H, A068K, A068T, E072K, E072N, R073F, T083I, I087Y, T089M, T089W, L090K, L090V, Q092K, Q092M, Q092T, S095C, E098D, E098T, N101W, A102C, N105Y, M107V, I108Q, R110K, R110T, S113W, T114P, S117A, S117C, S117M, S117N, S117P, S117T, S121G, S121K, S121N, S121P, S121R, S121T, S122A, S122C, S122D, S122E, S122R, S122T, M127S, R138T, Q142R, Q142V, A149C, P151T, L157E, L157P, N158V, S163D, S163M, T165L, T165V, D174N, L175K, T177H, T177Q, T177Y, V181T, T183C, T183F, T183M, T183N, P187L, P187S, S194M, S194Q, S194T, S195C, S195W, S197E, S197K, E202C, G205N, P211V, N212C, I217T, G219T, N232A, N232E, N232F, N232H, N232Y, T234K, T234L, T234N, T234R, T234V, Q238E, Q238P, Q238R, F239Y, D246E, D246M, D246R, D246W, L248C, L248P, L248V, F249W, G250K, G250R, E253M, E254K und R256K, wobei die angegebenen Positionen den Positionen gemäß SEQ ID NO:1 entsprechen; und/oder

(xviii) eine oder mehrere Aminosäuresubstitutionen ausgewählt aus der Gruppe N002A, N002L, P003A, P003E, P003G, P003H, P003I, P003K, P003L, P003M, P003Q, P003S, P003T, P003V, T011H, D012E, D012S, A013G, A013P, L014Y, S019E, F022E, F022M, V024C, V024Q, E026P, N028C, N028D, L032F, L032P, S033Y, T041R, I042V, Y043K, E047F, E047L, E047M, E047P, E047S, E047V, E047W, N049E, N049F, N049L, N049Y, T050E, T050V, Y060G, Y060M, G062Q, G062S, T063A, T063G, E064T, A065D, A065E, A065H, A065T, E072D, E072V, E072W, D085C, I087E, T088G, T089Y, L090R, Q092V, N101S, N105I, N105K, N105L, N105R, H106F, I108M, I108N, N109R, S112G, S112P, S112T, T114F, T114G, T114Y, R116I, R116K, R116T, R116V, S117H, D120L, S122L, S122Q, S122V, S122Y, L124A, L124M, L124P, M127V, G135A, R138A, S141A, Q142D, Q142K, Q142N, S163A, S163G, T165H, I171V, T177M, T177N, A182C, K186L, P187I, N190H, N190Y, S194C, S197Y, F209D, F209N, N212S, I217V, V223T, V230A, T234G, T234M, T234Y, Y236F, Q238C, Q238D, Q238G, Q238M, Q238S, R245N, R245P, D246Y, G247R, L248R, F249A, F249E und R256N, wobei die angegebenen Positionen den Positionen gemäß SEQ ID NO:1 entsprechen; und/oder

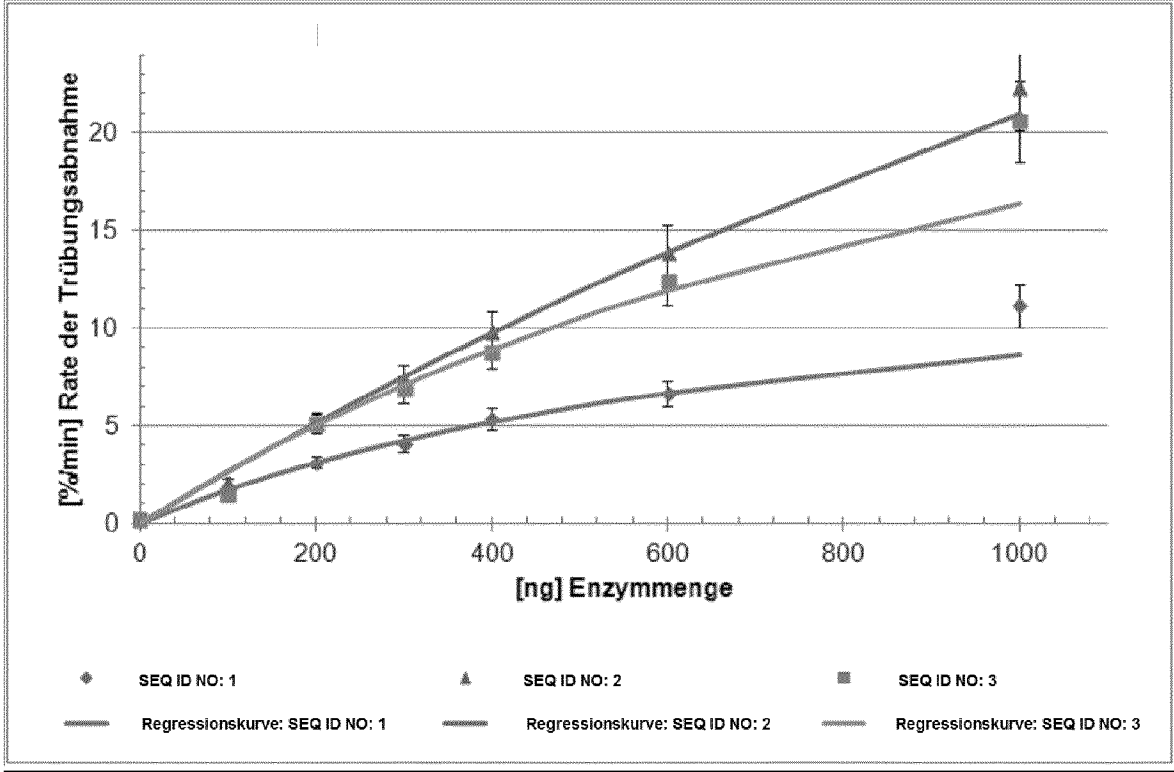
(xix) eine oder mehrere Aminosäuresubstitutionen ausgewählt aus der Gruppe N009W, D012I, D012L, A013R, A017N, P021D, P021T, P021Y, F022H, F022K, S023N, V024N, S025H, S025Y, E027N, S030C, S030K, R031Q, R031V, S033C, S035C, S035W, I042Q, P045A, P045T, R046P, R046Y, E047Q, A053L, A053V, I056M, S057T, P058G, Y060A, Y060F, Y060S, Y060W, T061C, T061K, T061L, T061N, T061Q, T061R, T061W, G062D, T063E, T063P, E064H, E064S, E072F, E072G, E072R, R073I, R073T, R073V, R073W, I074A, I074C, I074G, I074T, A075S, G078A, G078S, F079G, V081G, I082G, I082K, I082Q, T083M, T083N, D085G, T086G, T086N, I087Q, I087S, I087T, I087W, T088C, L090C, L090D, L090G, L090H, L090N, D091E,

D091Y, Q092C, Q092P, S095A, S095L, S095V, S095Y, R096Y, A102Y, N105C, N105F, N105V, N105W, M107S, I108K, I108P, N109Q, R110Y, S112F, S112I, S112L, S112W, S112Y, S113M, V126T, M131G, M131I, M131S, M131V, R138D, R138M, Q142A, A149I, T153N, L157D, L157G, N158C, N158D, N158I, N158W, K159T, S163C, T177C, T177E, T177S, A182G, A182Y, T183L, P187C, N190S, S195F, S195Q, S195Y, D204Y, A210S, K216N, K216Q, K216Y, G219L, N232R, N232W, R245I, L248F, F249D, G250S, G250T, E251Q, E253D und E253P, wobei die angegebenen Positionen den Positionen gemäß SEQ ID NO:1 entsprechen; und/oder

- (xx) Fragmentierung, Deletions-, Insertions- oder Substitutionsmutagenese und eine Aminosäuresequenz umfasst, die über eine Länge von mindestens 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 255, 256, 257, 258, 259 oder 260 zusammenhängenden Aminosäuren mit dem Ausgangsmolekül übereinstimmt, wobei die Esterase die Aminosäuren R18 und S136 an den Positionen, die den Positionen 18 und 136 gemäß SEQ ID NO:1 entsprechen, umfasst.

7. Nukleinsäure codierend für eine Esterase nach Anspruch 5 oder 6.
8. Vektor enthaltend eine Nukleinsäure nach Anspruch 7, insbesondere ein Klonierungsvektor oder ein Expressionsvektor.
9. Nicht menschliche Wirtszelle, die eine Nukleinsäure nach Anspruch 7 oder einen Vektor nach Anspruch 8 beinhaltet, oder die eine Esterase nach Anspruch 5 oder 6 beinhaltet, insbesondere eine, die die Esterase in das die Wirtszelle umgebende Medium sezerniert.
10. Verfahren zur Herstellung einer Esterase umfassend
 - a) Kultivieren einer Wirtszelle gemäß Anspruch 9; und
 - b) Isolieren der Esterase aus dem Kulturmedium oder aus der Wirtszelle.
11. Mittel, insbesondere ein Mittel zur Wäsche- und/oder Textilbehandlung, vorzugsweise Waschmittel, dadurch gekennzeichnet, dass es mindestens eine Esterase nach Anspruch 5 oder 6 enthält, insbesondere in einer Menge von 2µg bis 20mg pro g des Mittels.
12. Verfahren zur Reinigung und/oder Pflege von Textilien, dadurch gekennzeichnet, dass in mindestens einem Verfahrensschritt ein Mittel nach Anspruch 11 angewendet wird.

Figur 1



Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: **4(fully); 6(partially)**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

see supplemental sheet PCT/ISA/210

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2015/053991

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N9/18 C11D3/386
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N C11D

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, Sequence Search, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2013/096653 A1 (DANISCO US INC [US]; ESTELL DAVID A [US]; GRAYCAR THOMAS P [US]; JENSE) 27 June 2013 (2013-06-27) claims 1-3,21-35, 37; example 1; sequence 4	1
X	WO 2013/033318 A1 (DANISCO US INC [US]; ESTELL DAVID A [US]; JENSEN LENE BOJSEN [US]; KRA) 7 March 2013 (2013-03-07) cited in the application claims 6, 27, 30, 32, 38, 42 ----- -/--	1



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 June 2015

Date of mailing of the international search report

01/07/2015

Name and mailing address of the ISA/

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

Authorized officer

van der Kooij, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2015/053991

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE UniProt [Online] 8 February 2011 (2011-02-08), "SubName: Full=Cutinase {ECO:0000313 EMBL:CBY05530.1}; EC=3.1.1.74 {ECO:0000313 EMBL:CBY05530.1}; Flags: Fragment;", XP055191195, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:E5BBQ3 Database accession no. E5BBQ3	1,5-11
Y	the whole document -----	2,3,12
Y	WO 01/34899 A1 (GENENCOR INT [US]; DYSON WADE [US]; KELLIS JAMES T JR [US]; POULOSE AY) 17 May 2001 (2001-05-17) claims ,4,8; example 3 -----	2,12
Y	CARLA SILVA ET AL: "Biotransformations in synthetic fibres", BIOCATALYSIS AND BIOTRANSFORMATION, vol. 26, no. 5, 1 January 2008 (2008-01-01), pages 350-356, XP055196137, ISSN: 1024-2422, DOI: 10.1080/10242420802357845 page 352, column 1, paragraph 2 - paragraph 5; figure 2 -----	3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2015/053991

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
WO 2013096653	A1	27-06-2013	CN	104024407 A		03-09-2014
			EP	2794866 A1		29-10-2014
			US	2015017700 A1		15-01-2015
			WO	2013096653 A1		27-06-2013

WO 2013033318	A1	07-03-2013	AR	087745 A1		16-04-2014
			CN	103781903 A		07-05-2014
			EP	2751263 A1		09-07-2014
			US	2014187468 A1		03-07-2014
			WO	2013033318 A1		07-03-2013

WO 0134899	A1	17-05-2001	AT	510957 T		15-06-2011
			AU	1076101 A		06-06-2001
			CA	2389913 A1		17-05-2001
			DK	1242671 T3		01-08-2011
			EP	1242671 A1		25-09-2002
			ES	2365207 T3		26-09-2011
			JP	4996027 B2		08-08-2012
			JP	2003514138 A		15-04-2003
			KR	20020059691 A		13-07-2002
			NO	20021550 A		27-05-2002
			PT	1242671 E		03-08-2011
			US	6933140 B1		23-08-2005
			US	2003082755 A1		01-05-2003
			WO	0134899 A1		17-05-2001

Continuation of Box II.2

Claims 4 (in full); 6 (in part)

Current claims 1-12 relate to an extremely large number of possible esterase variants, especially with respect to the possible single or multiple amino acid substitution at numerous positions in the amino acid sequence indicated in SEQ ID NO.1 as a starting molecule. However, support and disclosure (PCT Articles 6 and 5) can only be found for a very small part of the claimed esterase variants, see SEQ.ID.No:1-3 (see example 1), wherein the esterases according to SEQ.ID.No:4-5 as obvious variant are considered as combinations of the mutations described in SEQ.ID.No:2-3.

The initial phase of the search yielded a very large number of documents which are essential for the assessment of novelty. There are so many documents that it was not possible to determine which parts of claims 1-12 define the subject matter for which protection would be justified (PCT Article 6).

The scope of the search was thus restricted to the clearly defined subject matter of claims 1-3, 5, 6 (feature a)) and 7-12.

The applicant is advised that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established cannot normally be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subject matter that has not been searched. This also applies in cases where the claims were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or where the applicant submits new claims in the course of the procedure under PCT Chapter II. However, after entry into the regional phase before the EPO an additional search may be carried out in the course of the examination (cf. EPO Guidelines, C-VI, 7.2) if the deficiencies that led to the declaration under PCT Article 17(2) have been corrected.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2015/053991

Feld Nr. II Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein internationaler Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche diese Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. ☒ Ansprüche Nr. 4(vollständig); 6(teilweise)
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, dass eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
siehe BEIBLATT PCT/ISA/210
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefasst sind.

Feld Nr. III Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Diese Internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, dass diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung solcher Gebühren aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Dieser internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfasst:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Der Anmelder hat die zusätzlichen Recherchegebühren unter Widerspruch entrichtet und die gegebenenfalls erforderliche Widerspruchsgebühr gezahlt.
- ☐ Die zusätzlichen Recherchegebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt, jedoch wurde die entsprechende Widerspruchsgebühr nicht innerhalb der in der Aufforderung angegebenen Frist entrichtet.
- ☐ Die Zahlung der zusätzlichen Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2015/053991

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
INV. C12N9/18 C11D3/386
ADD.

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

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
C12N C11D

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

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

EPO-Internal, Sequence Search, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 2013/096653 A1 (DANISCO US INC [US]; ESTELL DAVID A [US]; GRAYCAR THOMAS P [US]; JENSE) 27. Juni 2013 (2013-06-27) Ansprüche 1-3,21-35, 37; Beispiel 1; Sequenz 4	1
X	WO 2013/033318 A1 (DANISCO US INC [US]; ESTELL DAVID A [US]; JENSEN LENE BOJSEN [US]; KRA) 7. März 2013 (2013-03-07) in der Anmeldung erwähnt Ansprüche 6, 27, 30, 32, 38, 42	1
	----- -/-	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen ☒ Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
 - "E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
 - "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
 - "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
 - "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
 - "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
 - "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
 - "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
 - "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
25. Juni 2015	01/07/2015
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter van der Kooij, M

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DATABASE UniProt [Online] 8. Februar 2011 (2011-02-08), "SubName: Full=Cutinase {ECO:0000313 EMBL:CBY05530.1}; EC=3.1.1.74 {ECO:0000313 EMBL:CBY05530.1}; Flags: Fragment;", XP055191195, gefunden im EBI accession no. UNIPROT:E5BBQ3 Database accession no. E5BBQ3	1,5-11
Y	das ganze Dokument -----	2,3,12
Y	WO 01/34899 A1 (GENENCOR INT [US]; DYSON WADE [US]; KELLIS JAMES T JR [US]; POULOSE AY) 17. Mai 2001 (2001-05-17) Ansprüche ,4,8; Beispiel 3 -----	2,12
Y	CARLA SILVA ET AL: "Biotransformations in synthetic fibres", BIOCATALYSIS AND BIOTRANSFORMATION, Bd. 26, Nr. 5, 1. Januar 2008 (2008-01-01) , Seiten 350-356, XP055196137, ISSN: 1024-2422, DOI: 10.1080/10242420802357845 Seite 352, Spalte 1, Absatz 2 - Absatz 5; Abbildung 2 -----	3

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2015/053991

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 2013096653	A1	27-06-2013	CN	104024407 A	03-09-2014
			EP	2794866 A1	29-10-2014
			US	2015017700 A1	15-01-2015
			WO	2013096653 A1	27-06-2013

WO 2013033318	A1	07-03-2013	AR	087745 A1	16-04-2014
			CN	103781903 A	07-05-2014
			EP	2751263 A1	09-07-2014
			US	2014187468 A1	03-07-2014
			WO	2013033318 A1	07-03-2013

WO 0134899	A1	17-05-2001	AT	510957 T	15-06-2011
			AU	1076101 A	06-06-2001
			CA	2389913 A1	17-05-2001
			DK	1242671 T3	01-08-2011
			EP	1242671 A1	25-09-2002
			ES	2365207 T3	26-09-2011
			JP	4996027 B2	08-08-2012
			JP	2003514138 A	15-04-2003
			KR	20020059691 A	13-07-2002
			NO	20021550 A	27-05-2002
			PT	1242671 E	03-08-2011
			US	6933140 B1	23-08-2005
			US	2003082755 A1	01-05-2003
			WO	0134899 A1	17-05-2001

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld II.2

Ansprüche Nr.: 4(vollständig); 6(teilweise)

Die vorliegenden Ansprüche 1-12 beziehen sich auf eine extrem große Zahl möglicher Esterasen-Variante, vor allem bezüglich die mögliche ein- oder mehrfache Aminosäuresubstitution an zahlreiche Positionen in der in SEQ.ID.No:1 angegebenen Aminosäuresequenz als Ausgangsmolekül. Stützung und Offenbarung im Sinne der Artikel 6 und 5 PCT lassen sich jedoch nur für einen sehr kleinen Teil der beanspruchten Esterasen-Variante finden, siehe SEQ.ID.No:1-3 (siehe Beispiel 1), wobei die Esterasen gemäß SEQ.ID.No:4-5 als naheliegende Variante als Kombinationen der in SEQ.ID.No:2-3 beschriebenen Mutationen betrachtet werden.

In der Anfangsphase der Recherche wurde auch eine sehr große Zahl von Dokumenten gefunden, die für die Neuheitsfrage von Bedeutung sind. Es wurden so viele Dokumente gefunden, dass es unmöglich ist zu bestimmen, welche Teile der Ansprüche 1-12 den Gegenstand definieren, für den ein Schutzanspruch gerechtfertigt wäre (Artikel 6 PCT).

Der Umfang der Recherche wurde deshalb auf die klar definierten Gegenstand der Ansprüche 1-3, 5, 6 (Merkmal a)) und 7-12 durchgeführt.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, dass Patentansprüche auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, dass die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, dass der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäss Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt. Nach Eintritt in die regionale Phase vor dem EPA kann jedoch im Zuge der Prüfung eine weitere Recherche durchgeführt werden (Vgl. EPA-Richtlinien C-IV, 7.2), sollten die Mängel behoben sein, die zu der Erklärung gemäss Art. 17 (2) PCT geführt haben.