(19) Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

(11) **EP 2 115 111 B1**

(12) **EUROPÄISCHE PATENTSCHRIFT**

(45) Veröffentlichungstag und Bekanntmachung des Hinweises auf die Patenterteilung:
30.04.2014 Patentblatt 2014/18

(21) Anmeldenummer: **07847764.3**

(22) Anmeldetag: **04.12.2007**

(51) Int Cl.:
C11D 3/20 *(2006.01)* ***C11D 3/32*** *(2006.01)*
C11D 3/386 *(2006.01)*

(86) Internationale Anmeldenummer:
PCT/EP2007/063260

(87) Internationale Veröffentlichungsnummer:
WO 2008/107030 (12.09.2008 Gazette 2008/37)

(54) **CARBOXYLGRUPPEN TRAGENDE BENZOPHENON- ODER BENZOESÄUREANILID-DERIVATE ALS ENZYMSTABILISATOREN**

BENZOPHENONE OR BENZOIC ACID ANILIDE DERIVATIVES CONTAINING CARBOXYL GROUPS AS ENZYME STABILIZERS

DÉRIVÉS DE BENZOPHÉNONE OU D'ANILIDE D'ACIDE BENZOÏQUE PORTANT DES GROUPES CARBOXYLE SERVANT DE STABILISATEURS D'ENZYMES

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MT NL PL PT RO SE SI SK TR

(30) Priorität: **06.03.2007 DE 102007011236**

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
11.11.2009 Patentblatt 2009/46

(73) Patentinhaber: **Henkel AG & Co. KGaA**
40589 Düsseldorf (DE)

(72) Erfinder:
- **MICHELS, Andreas**
  40237 Düsseldorf (DE)
- **GHOSH, Robin**
  40215 Düsseldorf (DE)
- **BESSLER, Cornelius**
  40231 Düsseldorf (DE)
- **LOWIS, Daniela**
  42781 Haan (DE)

(56) Entgegenhaltungen:
EP-A- 0 378 261 **WO-A-98/22567**

- **WYSS ET AL.: "Non-Peptidic Small Molecule Inhibitors of the Single-Chain Hepatitis C Virus NS3 Protease/NS4A Cofactor Complex Discovered by Structure-Based NMR Screening" JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, 4. September 2004 (2004-09-04), Seiten 2486-2498, XP002469620**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents im Europäischen Patentblatt kann jedermann nach Maßgabe der Ausführungsordnung beim Europäischen Patentamt gegen dieses Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist. (Art. 99(1) Europäisches Patentübereinkommen).

EP 2 115 111 B1

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Waschmittel, enthaltend Carboxylgruppen tragende Benzophenon- oder Benzoesäureanilid-Derivate, die als Proteaseinhibitoren wirken und somit geeignete Enzymstabilisatoren sind.

[0002] Der Einsatz von Enzymen in Waschmitteln ist im Stand der Technik etabliert. Sie dienen dazu, das Leistungsspektrum der betreffenden Mittel entsprechend ihren speziellen Aktivitäten zu erweitern. Hierzu gehören insbesondere hydrolytische Enzyme wie Proteasen, Amylasen, Lipasen und Cellulasen. Die ersten drei genannten hydrolysieren Proteine, Stärke und Fette und tragen somit unmittelbar zur Schmutzentfemung bei. Cellulasen werden insbesondere wegen ihrer Gewebewirkung eingesetzt. Eine weitere Gruppe von Waschmittelenzymen sind oxidative Enzyme, insbesondere Oxidasen, die ggf. im Zusammenspiel mit anderen Komponenten vorzugsweise dazu dienen, Anschmutzungen zu bleichen oder die bleichenden Agentien in situ zu erzeugen. Neben diesen Enzymen, die einer fortwährenden Optimierung unterworfen werden, werden laufend weitere Enzyme für den Einsatz in Waschmitteln bereitgestellt, um insbesondere spezielle Anschmutzungen optimal angehen zu können, wie beispielsweise Pektinasen, β-Glucanasen, Mannanasen oder weitere Hemicellulasen zur Hydrolyse insbesondere spezieller pflanzlicher Polymere.

[0003] Die am längsten etablierten und in praktisch allen modernen, leistungsfähigen Waschmitteln enthaltenen Enzyme sind Proteasen und hierunter insbesondere Serin-Proteasen, zu denen auch die Subtilasen zählen. Sie bewirken den Abbau proteinhaltiger Anschmutzungen auf dem Reinigungsgut. Allerdings hydrolysieren sie auch sich selbst (Autoproteolyse) und alle anderen in den betreffenden Mitteln enthaltenen Proteine, d.h. insbesondere auch weitere Enzyme. Dies geschieht besonders während des Reinigungsvorgangs, d.h. in der wässrigen Waschflotte, wenn vergleichsweise günstige Reaktionsbedingungen vorliegen. Dies geschieht aber auch während der Lagerung der betreffenden Mittel, weshalb mit zunehmender Lagerdauer immer auch ein gewisser Verlust von Enzymaktivitäten, beispielsweise der Proteaseaktivität, einhergeht. In der Regel ist die Enzymaktivität in dem Waschmittel umgekehrt proportional zur Lagerdauer, mit fortschreitender Lagerdauer nimmt die Enzymaktivität immer weiter ab. Besonders problematisch ist dies in gelförmigen oder flüssigen und insbesondere in wasserhaltigen Rezepturen, weil in diesem mit dem enthaltenen Wasser sowohl das Reaktionsmedium als auch das Hydrolyse-Reagenz zur Verfügung stehen.

[0004] Ein Ziel bei der Entwicklung von Waschmitteln besteht somit darin, die enthaltenen Enzyme besonders während der Lagerung zu stabilisieren. Darunter wird der Schutz gegen verschiedene ungünstige Einflüsse verstanden, wie beispielsweise gegen Denaturierung oder Zerfall durch physikalische Einflüsse oder Oxidation. Ein Schwerpunkt dieser Entwicklungen besteht im Schutz der enthaltenen Proteine und/oder Enzyme gegen proteolytische Spaltung. Diese kann durch den Aufbau physikalischer Barrieren erfolgen, etwa durch Verkapselung der Enzyme in speziellen Enzymgranulaten oder durch Konfektionierung der Mittel in Zwei- oder Mehrkammersystemen. Ein anderer vielfach beschrittener Weg besteht darin, den Mitteln chemische Verbindungen zuzusetzen, die die Proteasen inhibieren und somit insgesamt als Stabilisatoren für die Proteasen und die anderen enthaltenen Proteine und Enzyme wirken. Es muss sich dabei um reversible Proteaseinhibitoren handeln, da die Proteaseaktivität nur vorübergehend, insbesondere während der Lagerung, nicht aber mehr während des Reinigungsprozesses unterbunden werden soll.

[0005] Als reversible Proteaseinhibitoren sind im Stand der Technik Polyole, insbesondere Glycerin und 1,2-Propylenglycol, Benzamidin-Hydrochlorid, Borax, Borsäuren, Boronsäuren oder deren Salze oder Ester etabliert. Darunter sind vor allem Derivate mit aromatischen Gruppen, etwa ortho-, meta- oder para-substituierte Phenylboronsäuren zu erwähnen, insbesondere 4-Formylphenyl-Boronsäure (4-FPBA) beziehungsweise die Salze oder Ester der genannten Verbindungen. Ein besonders guter Schutz ergibt sich, wenn Borsäurederivate zusammen mit Polyolen eingesetzt werden, da sie dann einen das Enzym stabilisierenden Komplex bilden können. Auch Peptidaldehyde, das heißt Oligopeptide mit reduziertem C-Terminus, insbesondere solche aus 2 bis 50 Monomeren, sind zu diesem Zweck beschrieben. Zu den peptidischen reversiblen Proteaseinhibitoren gehören unter anderem Ovomucoid und Leupeptin. Auch spezifische, reversible Peptid-Inhibitoren sowie Fusionsproteine aus Proteasen und spezifischen Peptid-Inhibitoren werden hierfür eingesetzt.

[0006] Polyole wie Glycerin und 1,2-Propylenglycol haben sich jedoch aufgrund ihrer hohen notwendingen Einsatzkonzentrationen als unvorteilhaft erwiesen, weil die übrigen Wirkstoffe der betreffenden Mittel damit nur noch in entsprechend geringeren Anteilen enthalten sein können.

[0007] Unter den bereits in vergleichsweise niedriger Konzentration wirksamen Serin-Protease-Inhibitoren nehmen Borsäurederivate eine herausragende Stellung ein. Beispielsweise offenbart die internationale Patentanmeldung WO 96/21716 A1 dass als Proteaseinhibitoren wirkende Borsäurederivate auch geeignet sind, Enzyme in Waschmitteln zu stabilisieren. Eine Auswahl besonders leistungsfähiger Stabilisatoren sind offenbart in der internationalen Patentanmeldung WO 96/41859 A1.

[0008] Unabhängig von ihrer stabilisierenden Wirkung weisen die Borsäurederivate jedoch einen entscheidenden Nachteil auf. Viele Borsäurederivate, wie beispielsweise Borat, bilden mit einigen anderen Waschmittelinhaltsstoffen unerwünschte Nebenprodukte, so dass diese in den betreffenden Mitteln nicht mehr für den erwünschten Reinigungsszweck zur Verfügung stehen oder sogar als Verunreinigung auf dem Waschgut zurückbleiben.

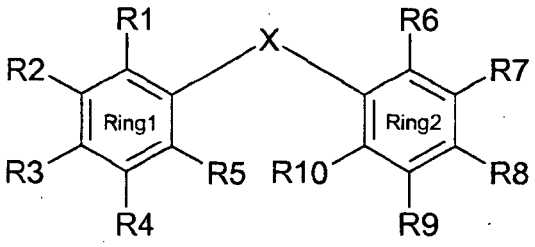
[0009] Es stellte sich somit die Aufgabe, borfreie chemische Verbindungen zu identifizieren, die als Proteaseinhibitoren

wirken und somit als Enzymstabilisatoren in Waschmitteln geeignet sind.

[0010] Hierbei war der Einsatz in insgesamt flüssigen, gelförmigen oder pastösen Waschmitteln von besonderem Interesse, und darunter insbesondere in solchen, die Wasser enthalten.

[0011] Diese Aufgabe wird durch folgende Mittel gelöst:

Waschmittel, enthaltend eine Protease und eine Verbindung der allgemeinen Strukturformel:



in der

(a) X für eine Carbonylgruppe (C=O) oder eine Säureamidgruppe (NHCO) steht,
(b) R1, R2, R3, R4 und R5 (in Ring 1) für Wasserstoff (H), eine Carboxyl- (COOH), eine Methyl- (CH_3), eine Ethyl- (C_2H_5), eine Hydroxyl- (OH), eine Hydroxymethyl- (CH_2OH), eine Aminogruppe (NH_2) und/oder ein Halogen stehen, wobei in diesem Ring mindestens eine Carboxylgruppe (COOH) vorliegt,
(c) R6, R7, R8, R9 und R10 (in Ring 2) für Wasserstoff (H), eine Carboxyl- (COOH), eine Methyl- (CH_3), eine Ethyl- (C_2H_5), eine Hydroxyl- (OH), eine Hydroxymethyl- (CH_2OH), eine Aminogruppe (NH_2) und/oder ein Halogen stehen, wobei in diesem Ring mindestens eine Carboxylgruppe (COOH) vorliegt, und
(d) optional zwei der Reste R1 bis R10 (A) und (B), die zueinander orthoständig sind, (A) eine in (b) und/oder (c) genannte obligatorische oder gegebenenfalls weitere Carboxylgruppe (COOH) und (B) eine Hydroxymethylgruppe sind, die als solche Gruppen oder optional als Gruppierung $-CH_2-O-CO-$ vorliegen und somit zusammen mit den sie tragenden C-Atomen des Rings ein fünfgliedriges Lacton darstellen.

[0012] Unter einem Waschmittel sind erfindungsgemäß alle Mittel zu verstehen, die sich zum Waschen von insbesondere Textilien eignen. Hierfür geeignete Inhaltsstoffe werden weiter unten detailliert ausgeführt.

[0013] Unter einer Protease sind erfindungsgemäß alle Enzyme zu verstehen, die in der Lage sind, Säureamidverknüpfungen von Proteinen zu hydrolysieren. Auch die Proteasen werden weiter unten detailliert ausgeführt.

[0014] Bei der in der allgemeinen Strukturformel dargestellten Verbindung handelt es sich um eine aromatische Verbindung mit zwei Benzolringen, die gemäß Merkmal (a) über eine Keto- oder eine Säureamidgruppe verknüpft sind. Es handelt sich somit um ein Benzophenon- oder ein Benzoesäureanilid-Derivat.

[0015] Dieses Benzophenon-Derivat kann gemäß den Merkmalen (b) und (c) in beiden Ringen als Reste R1, R2, R3, R4 und R5 (in Ring 1) bzw. R6, R7, R8, R9 und R10 (in Ring 2) Wasserstoff (H), eine Carboxyl- (COOH), eine Methyl- (CH_3), eine Ethyl- (C_2H_5), eine Hydroxyl- (OH), eine Hydroxymethyl- (CH_2OH), eine Aminogruppe (NH_2) und/oder ein Halogen tragen. Voraussetzung ist, daß in jedem der beiden Ringe mindestens eine Carboxylgruppe (COOH) vorliegt.

[0016] Das gleiche gilt für ein derartiges Benzoesäureanilid-Derivat. Hierbei können die Ringe 1 und 2 unterschieden werden, wobei Ring 1 derjenige ist, der sich auf die Benzoesäure bzw. deren Substitutionsprodukt zurückführen läßt, und Ring 2 derjenige, der sich auf das Anilin bzw. dessen Substitutionsprodukt zurückführen läßt. Auch dieses Benzoesäureanilid-Derivat kann als R1, R2, R3, R4 und R5 (in Ring 1) bzw. R6, R7, R8, R9 und R10 (in Ring 2) Wasserstoff (H), eine Carboxyl-(COOH), eine Methyl- (CH_3), eine Ethyl- (C_2H_5), eine Hydroxyl- (OH), eine Hydroxymethyl-(CH_2OH), eine Aminogruppe (NH_2) und/oder ein Halogen tragen. Voraussetzung ist wiederum, daß in jedem der beiden Ringe mindestens eine Carboxylgruppe (COOH) vorliegt.

[0017] Erfindungsrelevant ist gemäß Merkmal (d) auch ein derartiges Benzophenon- oder Benzoesäureanilid-Derivat, welches in einem der beiden Ringe 1 oder 2 als mögliche Substituenten zwei der Reste R1 bis R10 (A) und (B) aufweist, die zueinander orthoständig sind, (A) eine in (b) und/oder (c) genannte obligatorische oder gegebenenfalls weitere Carboxylgruppe (COOH) und (B) eine Hydroxymethylgruppe sind, die als solche Gruppen oder optional als Gruppierung $-CH_2-O-CO-$ vorliegen und somit zusammen mit den sie tragenden C-Atomen des Rings ein fünfgliedriges Lacton darstellen.

[0018] Es ist also möglich, dass zwei der gemäß (b) und (c) möglichen Substituenten (A) und (B) eine Carboxylgruppe (COOH) bzw. eine Hydroxymethylgruppe sind, in einem Ring unmittelbar benachbart, d.h. zueinander orthoständig sind und in Form der Hydroxylgruppe und der Carboxymethylgruppe nebeneinander vorliegen. In diesem Fall kann es dazu

kommen, dass diese beiden Gruppen miteinander ein Lacton ausbilden und In Lactonform an die zu inhibierende Protease binden. Es ist auch möglich, dass die Bindung ohne vorherige Ausbildung der Lactonform stattfindet. Es ist zur Verwirklichung der vorliegenden Erfindung auch möglich, bereits bei der Synthese die Lactonform vorzugeben und das bereits gebildete Lacton als Stabilisator dem betreffenden Mittel zuzugeben. Die am besten geeignete Form ist anhand der zu inhibierenden Protease und des ins Auge gefassten Stabilisators experimentell zu ermitteln, was dem Fachmann keine grundlegenden Schwierigkeiten bereitet.

[0019] Bei der Zählung der Carboxylgruppen gemäß den Merkmalen (b) und (c) und den bevorzugten Ausführungsformen, die auf die Anzahl der pro Molekül enthaltenen Carboxylgruppen bezug nehmen, wird diese Lacton-Carboxylgruppe als Carboxylgruppe gemäß Merkmal (b) bzw. (c) mitgezählt, kann aber auch zusätzlich neben einer weiteren, Carboxylgruppe vorliegen.

[0020] Die vorliegende Erfindung umfaßt die genannten Verbindungen in allen protonierten und/oder deprotonierten Formen. Insbesondere die Carboxylgruppe(n) (COOH) und ggf. die Aminogruppe(n) (NH_2) liegen je nach pH-Wert des umgebenden Mediums als Carboxylat- (COO^-) bzw. als Ammoniumgruppen (NH_3^+) vor. Gegebenenfalls sind entgegengesetzt geladene Kationen (H^+, Na^+, K^+ oder ähnliche) bzw. Anionen (Cl^-, Br^-, Formiat, Acetat etc.) anwesend. In all diesen Formen kann die vorliegende Erfindung verwirklicht werden. Entscheidend ist jeweils die Wechselwirkung zwischen der erfindungsrelevanten Verbindung und der erfindungsgemäß zu inhibierenden/- stabilisierenden Protease.

[0021] Ohne an diese Theorie gebunden sein wollen, wird erfindungsgemäß davon ausgegangen, daß die erfindungsrelevanten Verbindungen mit der erfindungsgemäß zu inhibierenden/stabilisierenden Protease einen Komplex ausbilden. Dieser sieht wahrscheinlich so aus, daß sich die erfindungsrelevante Verbindung in die Substratbindungstasche der Protease einlagert und dort nicht-kovalent gebunden wird. Auf diese Weise wird das aktive Zentrum der Protease durch eine nicht durch dieses Enzym hydrolysierbare Verbindung blockiert und steht nicht für eine Hydrolyse anderer zugegener Proteine zur Verfügung. Hierbei handelt es sich um eine reversible Bindung, d.h. um ein Gleichgewicht zwischen Assoziation und Dissoziation. Der Gleichgewichtskoeffizient dieser Reaktion wird als Inhibitionskonstante oder K_i bezeichnet.

[0022] Der erste Vorteil der erfindungsrelevanten Verbindungen gegenüber dem Stand der Technik besteht neben ihrem gegenüber den Polyolen geringeren Volumenbedarf darin, daß sie günstige Inhibitionskonstanten bezüglich der in Waschmitteln einsetzbaren Proteasen aufweisen. Dies gilt beispielsweise für Serin-Proteasen, aber auch für Metalloproteasen. Die Inhibitoren binden somit reversibel, d.h. sie gehen nicht zu feste und nicht zu lose vorübergehende Wechselwirkungen mit dem Enzym ein. Vorteilhafterweise liegt damit während der Lagerung der Großteil der erfindungsrelevanten Protease in Form eines Protease-Inhibitor-Komplexes vor. Die Protease und ggf. weitere enthaltene Proteine, insbesondere weitere Enzyme werden auf diese Weise gegenüber einer Proteolyse durch dieses Enzym geschützt (gegen Proteolyse stabilisiert). Andererseits wird im Augenblick der Verdünnung des erfindungsgemäßen Mittels mit Wasser zur Herstellung einer wäßrigen Wasch- bzw. Reinigungsflotte während des Reinigungsvorgangs das Bindungsgleichgewicht in Richtung Dissoziation verschoben, so daß sich der Komplex auflöst und der Großteil der erfindungsreievanten Protease proteolytisch aktiv wird. Es handelt sich bei den erfindungsrelevanten Verbindungen also gemäß der formulierten Aufgabe um funktionierende Protease-Inhibitoren und somit Enzym-Stabilisatoren für Waschmittel.

[0023] Der zweite Vorteil der erfindungsrelevanten Verbindungen gegenüber dem Stand der Technik besteht darin, daß sie als Elemente lediglich C, H, N und O und gegebenenfalls Halogenide und/oder Schwefel aufweisen und insbesondere frei von Bor sind. Sie bilden somit nicht die unerwünschten, auf Bor zurückzuführenden Nebenprodukte mit anderen Waschmittelinhaltsstoffen.

[0024] Ferner verfügen sie insbesondere aufgrund der in jedem aromatischen Ring enthaltenen Carboxylgruppen über eine gute Wasserlöslichkeit, so daß sie in entsprechende Mittel einfach eingearbeitet werden können und ein Ausfällen während der Lagerung vermieden wird.

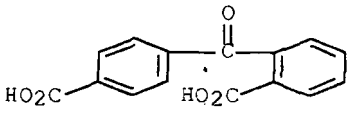
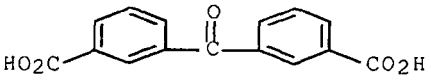
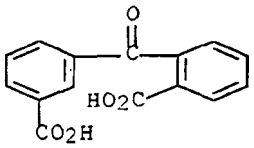
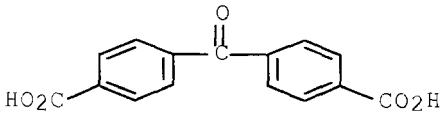
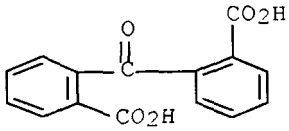
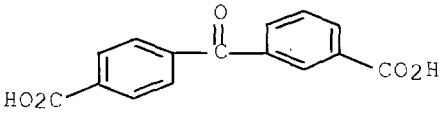
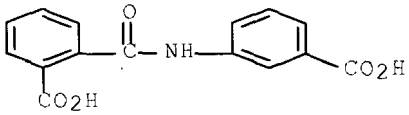
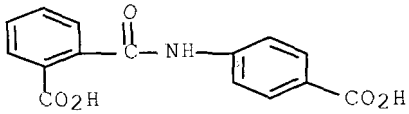
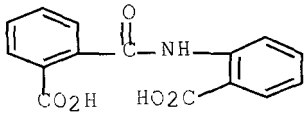
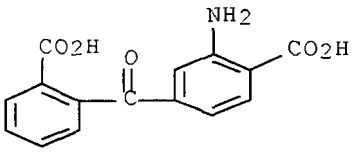
[0025] Grundsätzlich wirken die genannten Verbindungen vermutlich deshalb als reversible Inhibitoren, weil sie dem Substrat der Proteasen, insbesondere hinsichtlich der zu hydrolysierenden Säureamidbindung, strukturell gleichen. Umgekehrt lassen sich also grundsätzlich alle Proteasen durch die efindungsrelevanten Verbindungen inhibieren, so diese erfindungsgemäß als Protease-Inhibitoren geeignet sind. Dies gilt insbesondere für Serin-Proteasen, wie anhand der Beispiele zur vorliegenden Anmeldung mit der positiven Wirkung der dort experimentell beschriebenen Verbindungen anhand von Serin-Proteasen, konkret Subtilasen, noch spezieller Subtilisinen gezeigt worden ist, und zwar anhand einer Variante des Subtilisins aus Bacillus lentus DSM 5483.

[0026] Weitere Gegenstände der vorliegenden Erfindung betreffen:

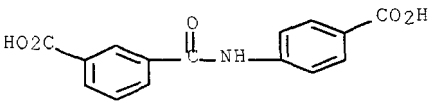
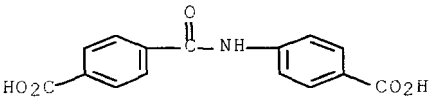
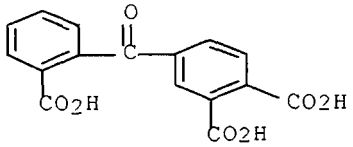
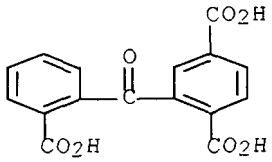
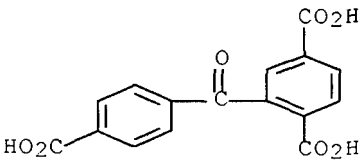
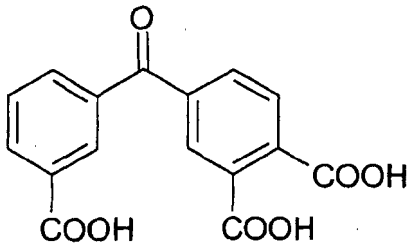
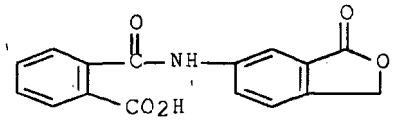
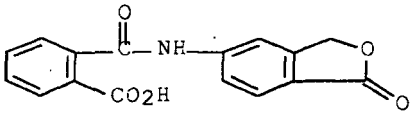
- die Verwendung einer oben beschriebenen Verbindung als reversibler Inhibitor und/oder Stabilisator einer Protease, im Rahmen einer Waschmittelrezeptur;
- Waschverfahren, in dem eine Protease zur Wirkung kommt, die mit einer oben beschriebenen Verbindung inhibiert und/oder stabilisiert ist;
- die Verwendung eines erfindungsgemäßen Waschmittels zum Waschen und/oder Reinigen von Textilien sowie

- die Verwendung einer Protease und einer oben beschriebenen Verbindung zur Herstellung eines Waschmittels.

[0027] Besonders bevorzugt wird in allen erfindungsgemäßen Aspekten die stabilisierende Verbindung aus einem der folgenden Stabilisatoren ausgewählt:

	Strukturformel	Name
a)		2-(4-Carboxybenzoyl)-Benzoesäure
b)		3,3'-Carbonylbis-Benzoesäure
c)		2-(3-Carboxybenzoyl)-Benzoesäure
d)		4,4'-Carbonylbis-Benzoesäure
e)		2,2'-Carbonylbis-Benzoesäure
f)		3-(4-Carboxybenzoyl)-Benzoesäure
g)		2-[[(3-Carboxyphenyl)amino]carbonyl]-Benzoesäure
h)		2-[[(4-Carboxyphenyl)amino]carbonyl]-Benzoesäure
i)		2-[(2-Carboxybenzoyl)amino]-Benzoesäure
j)		2-Amino-2',4-carbonylbis-Benzoesäure

(fortgesetzt)

	Strukturformel	Name
k)		3-[[(4-Carboxyphenyl)amino]carbonyl]-Benzoesäure
l)		4-[(4-Carboxybenzoyl)amino]-Benzoesäure
m)		4-(2-Carboxybenzoyl)-1,2-Benzoldicarboxylsäure
n)		2-(2-Carboxybenzoyl)-1,4-Benzold icarboxylsäu re
o)		2-(4-Carboxybenzoyl)-1,4-Benzoldicarboxylsäure
p)		4-(3-Carboxybenzoyl)-1,2-Benzoldicarboxylsäure
r)		2-[[(1,3-Dihydro-3-oxo-5-isobenzofuranyl)amino]carbonyl]-Benzoesäure
s)		2-[[(1,3-Dihydro-1-oxo-5-isobenzofuranyl)amino]carbonyl]-Benzoesäure

[0028] Erfindungsgemäß sind solche Waschmittel bevorzugt, in denen die stabilisierende Verbindung bezüglich der enthaltenen Protease eine Inhibitionskonstante (Ki) von 0,01 bis 10 mM, vorzugsweise 0,1 bis 5, besonders bevorzugt 0,5 bis 2 aufweist.

[0029] Die Inhibitionskonstante K_i kann auf folgende Weise ermittelt werden:

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

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

[0030] Darin bedeuten [E], [I] und [EI] die jeweiligen molaren Gleichgewichtskonzentrationen von Enzym (E), Inhibitor (I) und dem Enzym-Inhibitor-Komplex (EI). Dieser Definition entsprechend ist eine Substanz mit einem kleinen Ki unter den jeweiligen Testbedingungen ein guter Inhibitor.

[0031] Die Bestimmung des K_i erfolgt auf der Grundlage des Aktivitätstests der Protease in Anwesenheit des entsprechenden Inhibitors. Über die im Stand der Technik etablierte und dem Fachmann bekannte Michaelis-Menten-Kinetik (Leonor Michaelis, Maud Menten (1913). Die Kinetik der Invertinwirkung, Biochem. Z. 49:333-369) werden die enzymatischen Parameter K_m, und k_{cat} in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen des Inhibitors bestimmt. Für eine Michaelis-Menten-Kinetik gilt vereinfacht:

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} E + P$$

[0032] Hierin bedeuten:

E: Enzym
S: Substrat
ES: Enzym-Substrat-Komplex
P: Produkt
k_1,k_{-1},k_2: Geschwindigkeitskonstanten

[0033] Hierin ist k_2 ein Maß der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit bei Substratsättigung (Vmax), auch Wechselzahl, molekulare Aktivität, "turnover number" oder kcat genannt (kcat = Vmax/ [Eo], wobei [Eo] die Ausgangskonzentration des Enzyms ist). Die Michaeliskonstante (d.h. die Substratkonzentration, die bei der Halbsättigung vorliegt, bei der die Umsatzgeschwindigkeit also v = Vmax/2 beträgt), ergibt sich zu
$K_m = k_{-1} / k_1$ (Michaelis-Menten-Fall, gegeben wenn $k_2 << k_1$) oder bzw. allgemeiner zu
$K_m = k_{-1} + k_2 / k_1$ (Briggs-Haldane-Situation, gegeben für den Fall, dass k_2 gegenüber k_1 nicht vernachlässigt werden kann).

[0034] Die Sättigungsfunktion eines "Michaelis-Menten Enzyms" ergibt sich unter Verwendung der Parameter Km und Vmax wie folgt:

$$v = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

[0035] Hierin bedeutet: v: Bildungsgeschwindigkeit von P (v = "Geschwindigkeit") [mol l-1 s-1]

vmax: maximale Geschwindigkeit [mol l-1 s-1]
Km: Michaelis-Menten-Konstante [mol l-1]
[S]: Substratkonzentration [mol l-1]

[0036] Durch die Bestimmung der Anfangskatalyse-Rate ($V_{Anf.}$) - für Proteasen der Anfangshydrolyse-Rate - bei verschiedenen Substratkonzentrationen [S] und Einpassung der experimentellen Daten in nachstehende Gleichung 1 wird die Inhibitionskonstante K_i erhalten.

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

[0037] Hierin steht [I] wiederum für die Inhibitor-Konzentration.

[0038] Alternativ kann K_I unter Verwendung der Cheng-Prusoff-Gleichung (Gleichung 2, Cheng Y., Prusoff W.H. (1973) Biochem.Pharmacol. 22, 3099-3108) über den IC_{50}-Wert bestimmt werden. Die Bestimmung des IC_{50}-Werts erfolgt über die Bestimmung der katalytischen Aktivität an einem Substrat in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen des

Inhibitors und der Anpassung der experimentellen Daten an eine sigmoidale Dosis-Wirkungs-Gleichung mit variabler Steigung (Pseudo-Hill-Steigungen). Es handelt sich dabei um die Inhibitor-Konzentration, die nötig ist, um eine 50%ige Inhibition zu erreichen.

[0039] K_i ergibt sich damit aus folgender Gleichung 2:

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

[0040] Darin bedeuten [S] die Substratkonzentration im Test und K_d die Dissoziationskonstante für das Substrat, die bei der IC_{50}-Konzentration des Inhibitors als identisch mit K_m für das Substrat gesetzt werden kann.

[0041] Die auf diese Weise bestimmbaren K_I-Werte kennzeichnen die Verbindung in Bezug auf das eingesetzte Enzym. In Beispiel 1 wurde die Restaktivität einer Protease, nämlich die Bacillus lentus-Alkalische Protease F49 (gemäß WO 95/23221 A1) in Gegenwart eines Inhibitors bestimmt. Da es sich dabei um eine typische Subtilisin-Protease handelt, sind die mit diesem Enzym erhaltenen Werte auch für andere Serin-Proteasen, insbesondere andere Subtilisin-Proteasen typisch. Der exakte Wert für eine interessierende Protease muß im Zweifel anhand der jeweils konkreten Protease ermittelt werden.

[0042] In erfindungsgemäßen Waschmitteln, die in einer bevorzugten Ausführung in überwiegend fester Form vorliegen und in einer zweiten Ausführung in überwiegend flüssiger, pastöser oder Gelform vorliegen, ist die Protease insbesondere in einem Gehalt von 2 μg bis 20 mg pro g des Mittels, vorzugsweise von 5 μg bis 17,5 mg pro g des Mittels, besonders bevorzugt von 20 μg bis 15 mg pro g des Mittels, ganz besonders bevorzugt von 50 μg bis 10 μg des Mittels enthalten.

[0043] Der Stabilisator ist in erfindungsgemäßen Mitteln insbesondere in einem Gehalt bis zu 50 mg pro g des Mittels, vorzugsweise bis zu 10 mg besonders bevorzugt bis zu 7 mg ganz besonders bevorzugt bis zu 5 mg pro g des Mittels enthalten. Weiterhin ist bevorzugt, dass der Stabilisator in einem Gehalt von 0,01 bis 100 x K_i (bezogen auf die enthaltene Protease), vorzugsweise 0,1 bis 10 x K_I besonders bevorzugt 1 bis 5 x K_i enthalten ist.

[0044] Vorzugsweise liegt das molare Verhältnis von Stabilisator zur Protease im Bereich von 1:1 bis 1.000:1, insbesondere von 1:1 bis 500:1, besonders bevorzugt von 1:1 bis 100:1, ganz besonders bevorzugt von 1:1 bis 20:1.

[0045] Neben dem Stabilisator gemäß der oben angegebenen allgemeinen Formel kann ein erfindungsgemäßes Mittel mindestens einen weiteren Stabilisator enthalten. In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung ist das Waschmittel somit dadurch gekennzeichnet, dass es mindestens einen weiteren Stabilisator enthält. In einem solchen Mittel sind daher mindestens zwei Verbindungen vorhanden, die eine Stabilisierung eines enthaltenen Enzyms, vorzugsweise einer Protease, bewirken. Bevorzugt wirken diese Verbindungen synergistisch, d.h. die durch beide Verbindungen erreichte Stabilisierungswirkung übersteigt die Summe der beiden einzelnen Stabilisierungswirkungen. In einer bevozugten Ausführungsform handelt es sich bei dem/den Stabilisator(en) um ein oder mehrere Polyole, insbesondere um Glycerin oder 1,2-Ethylenglycol, um ein Antioxidans, um Lactat oder ein oder mehrere Lactatderivate oder Kombinationen hiervon. Ebenfalls bevorzugt handelt es sich um eine oder mehrere derjenigen enzymstabilisierenden bzw. -inhibierenden Verbindungen, die in den internationalen Patentanmeldungen WO 07/113241 A1 oder WO 02/008398 offenbart sind.

[0046] Bei der erfindungsgemäß stabilisierten beziehungsweise reversibel inhibierten Protease handelt es sich vorzugsweise um eine Serin-Protease, insbesondere um eine Subtilase, besonders bevorzugt um ein Subtilisin.

[0047] Beispiele für solche Proteasen sind die Subtilisine BPN' und Carlsberg, die Protease PB92, die Subtilisine 147 und 309, die Alkalische Protease aus Bacillus lentus, Subtilisin DY und die den Subtilasen, nicht mehr jedoch den Subtilisinen im engeren Sinne zuzuordnenden Enzyme Thermitase, Proteinase K und die Proteasen TW3 und TW7. Subtilisin Carlsberg ist in weiterentwickelter Form unter dem Handelsnamen Alcalase® von der Firma Novozymes A/S, Bagsværd, Dänemark, erhältlich. Die Subtilisine 147 und 309 werden unter den Handelsnamen Esperase®, beziehungsweise Savinase® von der Firma Novozymes vertrieben. Von der Protease aus Bacillus lentus DSM 5483 leiten sich die unter der Bezeichnung BLAP® geführten Protease-Varianten ab.

[0048] Weitere Proteasen sind beispielsweise die unter den Handelsnamen Durazym®, Relase®, Everlase®, Nafizym, Natalase®, Kannase® und Ovozymes® von der Firma Novozymes, die unter den Handelsnamen, Purafect®, Purafect® OxP und Properase® von der Firma Genencor, das unter dem Handelsnamen Protosol® von der Firma Advanced Biochemicals Ltd., Thane, Indien, das unter dem Handelsnamen Wuxi® von der Firma Wuxi Snyder Bioproducts Ltd., China, die unter den Handelsnamen Proleather® und Protease P® von der Firma Amano Pharmaceuticals Ltd., Nagoya, Japan, und das unter der Bezeichnung Proteinase K-16 von der Firma Kao Corp., Tokyo, Japan, erhältlichen Enzyme.

[0049] Überraschenderweise wurde festgestellt, dass solche Proteasen besonders gut durch die erläuterten Verbindungen stabilisiert bzw. reversibel inhibiert werden. Zudem werden auch bestimmte Varianten von Proteasen, d.h. auch Varianten der genannten Proteasen, durch diese Verbindungen besonders vorteilhaft stabilisiert. Solche Protease-Varianten sind Teil der nachfolgend beschriebenen Erfindungsgegenstände.

[0050] Eine erfindungsgemäß stabilisierte beziehungsweise reversibel inhibierte Protease kann ein Wildtypenzym oder eine Protease-Variante sein. Unter Wildtypenzym ist zu verstehen, dass das Enzym in einem natürlich vorkom-

menden Organismus bzw. in einem natürlichen Habitat vorhanden ist aus diesem isoliert werden kann. Enzyme sind jedoch veränderbar und werden zum Teil gezielt verändert, insbesondere um ihre Eigenschaften den vorgesehenen Einsatzzwecken anzupassen oder um ihre katalytische Aktivität zu beeinflussen. Diese Veränderungen erfolgen durch oftmals durch Änderung der Aminosäuresequenz des Enzyms. Solche Veränderungen können dabei gezielt und somit ortsgerichtet oder zufällig, beispielsweise durch Zufallsmutageneseverfahren, erfolgen. Unter einer Enzym-Variante werden Enzyme verstanden, die aus einem Ausgangsenzym, beispielsweise einem Wildtyp-Enzym, durch Veränderung der Aminosäuresequenz erzeugt wurden. Die Veränderung der Aminosäuresequenz erfolgt vorzugsweise durch Mutationen, wobei Aminosäure-Substitutionen, Deletionen, Insertionen oder Kombinationen hiervon vorgenommen sein können. Das Einbringen solcher Mutationen in Proteine ist Stand der Technik und dem Fachmann auf dem Gebiet der Enzymtechnologie hinlänglich bekannt. Grundsätzlich können alle Enzyme derartig verändert sein. Erfindungsgemäß bevorzugt sind Protease-Varianten. Diese wurden aus einer Ausgangsprotease, beispielsweise einer Wildtyp-Protease, durch Veränderung der Aminosäuresequenz erzeugt, wobei bevorzugt Aminosäure-Substitutionen, Deletionen, Insertionen oder Kombinationen hiervon vorgenommen wurden. Die Ausgangsprotease muss jedoch nicht zwingend eine natürlich vorkommende Wildtyp-Protease sein, auch eine aus dem Stand der Technik bekannte Protease, an der bereits Veränderungen vorgenommen wurden, kann weiterentwickelt werden und daher erneut als Ausgangsprotease zur Erzeugung weiter Protease-Varianten dienen. Somit können beispielsweise alle der vorstehend beschriebenen Proteasen unverändert in erfindungsgemäßen Mitteln eingesetzt sein und durch die beschriebenen Verbindungen stabilisert sein. Sie können aber auch das Ausgangsenzym für eine Variante darstellen, welche dann in einem erfindungsgemäßen Mittel enthalten und durch die beschriebenen Verbindungen stabilisiert ist.

[0051] Unter allen beschriebenen Proteasen bzw. Varianten weiter bevorzugt ist das Wildtypenzym bzw. das Ausgangsenzym der Variante:

- Die Alkalische Protease aus Bacillus amyloliquefaciens (BPN'),
- Die Alkalische Protease aus Bacillus licheniformis (Subtilisin Carlsberg),
- Die Alkalische Protease PB92,
- Subtilisin 147 und/oder Subtilisin 309 (Savinase)
- Die Alkalische Protease aus Bacillus lentus, vorzugsweise aus Bacillus lentus DSM 5483,
- Die Alkalische Protease aus Bacillus alcalophilus (DSM 11233),
- die Alkalische Protease aus Bacillus gibsonii (DSM 14391) oder eine hierzu mindestens zu 70% identische Alkalische Protease,
- die Alkalische Protease aus Bacillus sp. (DSM 14390) oder eine hierzu mindestens zu 98,5% identische Alkalische Protease,
- die Alkalische Protease aus Bacillus sp. (DSM 14392) oder eine hierzu mindestens zu 98,1% identische Alkalische Protease,
- die Alkalische Protease aus Bacillus gibsonii (DSM 14393) oder eine hierzu mindestens zu 70% identische Alkalische Protease.

[0052] In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung ist das Waschmittel daher dadurch gekennzeichnet, dass die Protease aus einer Ausgangsprotease durch mindestens eine Veränderung einer Aminosäure erhalten wurde, wobei die Veränderung eine Substitution, Insertion oder Deletion einer Aminosäure ist, und sie zu der Ausgangsprotease auf Aminosäureebene zu mindestens 90%, vorzugsweise mindestens 92,5%, besonders bevorzugt mindestens 95% und ganz besonders bevorzugt mindestens 97,5% identisch ist.

[0053] Verfahren zur Durchführung und Erstellung von Sequenzvergleichen, sogenannte Alignments, sind dem Fachmann auf dem Gebiet der Enzymtechnologie bekannt. Durch solche Sequenzvergleiche werden für zu vergleichende Sequenzen beispielsweise die Identitäts- oder Homologiewerte ermittelt. Solch ein Vergleich geschieht dadurch, dass ähnliche Abfolgen in den Nukleotid- oder Aminosäuresequenzen der betrachteten Proteine einander zugeordnet werden. Dies nennt man Homologisierung. Eine tabellarische Zuordnung der betreffenden Positionen wird als Alignment bezeichnet. Bei der Analyse von Nukleotidsequenzen sind wiederum beide komplementären Stränge und jeweils allen drei möglichen Leserastern zu berücksichtigen; ebenso die Degeneriertheit des genetischen Codes und die organismenspezifische Verwendung der Codons (Codon-Usage). Inzwischen werden Alignments über Computerprogramme erstellt, wie beispielsweise durch die Algorithmen FASTA oder BLAST; dieses Vorgehen wird beispielsweise von D. J. Lipman und W. R. Pearson (1985) in Science, Band 227, S. 1435-1441 beschrieben.

[0054] Eine Zusammenstellung aller in den verglichenen Sequenzen übereinstimmenden Positionen wird als Konsensus-Sequenz bezeichnet.

[0055] Solch ein Vergleich erlaubt auch eine Aussage über die Ähnlichkeit oder Homologie der verglichenen Sequenzen zueinander. Diese wird in Prozent Identität, das heißt dem Anteil der identischen Nukleotide oder Aminosäurereste an denselben bzw. in einem Alignment einander entsprechenden Positionen wiedergegeben. Ein weiter gefasster Homologiebegriff bezieht die konservierten Aminosäure-Austausche in diesen Wert mit ein. Es ist dann von Prozent Ähn-

lichkeit die Rede. Solche Aussagen können über ganze Proteine oder Gene oder nur über einzelne Bereiche getroffen werden.

[0056] Homologe Bereiche von verschiedenen Proteinen sind durch Übereinstimmungen in der Aminosäuresequenz definiert. Diese können auch durch identische Funktion gekennzeichnet sein. Sie geht bis zu völligen Identitäten in kleinsten Bereichen, sogenannten Boxen, die nur wenige Aminosäuren umfassen und meist für die Gesamtaktivität essentielle Funktionen ausüben. Unter den Funktionen der homologen Bereiche sind kleinste Teilfunktionen der vom gesamten Protein ausgeübten Funktion zu verstehen, wie beispielsweise die Ausbildung einzelner Wasserstoffbrückenbindungen zur Komplexierung eines Substrats oder Übergangskomplexes.

[0057] Insbesondere dienen solche Sequenzvergleiche bzw. Alignments auch zur Ermittlung von einander entsprechenden Positionen in unterschiedlichen Molekülen. So kann beispielsweise in einem Alignment von unterschiedlichen Enzymen festgestellt werden, welche Positionen in der jeweiligen Aminosäure- oder Nukleinsäuresequenz einander entsprechen, auch wenn die jeweiligen Sequenzen beispielsweise unterschiedliche Gesamtlängen oder unterschiedliche Domänen bzw. Teilsequenzen aufweisen oder wenn innerhalb einer Sequenz zusätzliche Aminosäuren bzw. Nukleotide vorhanden sind. Einer bestimmten Position in einer ersten Sequenz kann daher eine entsprechende Position in einer zweiten Sequenz konkret zugeordnet werden, wobei es durchaus möglich ist, dass sich die einander entsprechenden Positionen an unterschiedlichen Stellen im Molekül befinden. Ferner können an den entsprechenden Positionen unterschiedliche Aminosäurereste vorhanden sein. Daher wird für solche Sequenzvergleiche bzw. zur Bestimmung einer Position konkret angegeben, um welche Position es sich handelt und von welchem Enzym ausgegangen wird, d.h. welche Zählweise der Positionsbestimmung zu Grunde zu legen ist.

[0058] Für die nachfolgenden Erfindungsgegenstände wird zur Positionsbestimmung die Aminosäuresequenz des reifen (mature) Proteins der Alkalischen Protease aus Bacillus lentus DSM 5483 verwendet, die in der internationalen Offenlegungsschrift WO 91/02792 A1 offenbart ist und eine Länge von 269 Aminosäureresten aufweist (in der vorliegenden Anmeldung bezeichnet als Alkalischen Protease aus Bacillus lentus).

[0059] In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung ist das Waschmittel dadurch gekennzeichnet, dass die Protease aus einer Ausgangsprotease durch mindestens eine Veränderung einer Aminosäure erhalten wurde, wobei die Veränderung eine Substitution oder Insertion einer Aminosäure in demjenigen Bereich der Aminosäuresequenz ist, der den Positionen 95 bis 103 der Alkalischen Protease aus Bacillus lentus in einem Alignment zugeordnet ist.

[0060] Besonders bevorzugt handelt es sich bei einer solchen Protease-Variante um eine Variante mit einer Insertion einer einzelnen Aminosäure nach einer oder mehrerer der Positionen 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102 und/oder 103 und ganz besonders bevorzugt zwischen den Positionen 97 und 98 und/oder den Positionen 99 und 100.

[0061] In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung ist das Waschmittel dadurch gekennzeichnet, dass die Protease aus einer Ausgangsprotease durch mindestens eine Veränderung einer Aminosäure erhalten wurde, die den Positionen 3, 4, 36, 42, 43, 47, 56, 61, 69, 87, 96, 99, 101, 102, 104, 114, 118, 120, 130, 139, 141, 142, 154, 157, 188, 193, 199, 205, 211, 224, 229, 236, 237, 242, 243, 250, 253, 255 und 268 der Alkalischen Protease aus Bacillus lentus in einem Alignment zugeordnet sind, wobei die Veränderung eine Substitution, Insertion oder Deletion einer Aminosäure ist.

[0062] Besonders bevorzugt erfolgt eine Aminosäureänderung gegenüber dem Ausgangsmotekül in einer oder mehreren der folgenden Positionen: 3, 4, 43, 61, 188, 193, 199, 211, 224, 250 und 253 (Zählung gemäß der Alkalischen Protease aus Bacillus lentus), besonders bevorzugt mit einem oder mehreren der Aminosäureaustausche X3T, X4I, X43V, X61A, X188P, X193M, X199I, X211L, X211D, X211E, X211G, X211N oder X211Q, X224V, X250G und/oder X253N. Insbesondere handelt es sich bei der Protease um eine Variante mit einer Punktmutation in Position 211, vorzugsweise mit einer Substitution einer einzelnen Aminosäure in dieser Position, besonders bevorzugt mit der Aminosäuresubstitution X211 L. Die vorstehenden Positionsangaben beziehen sich wiederum auf diejenigen Aminosäurereste, die den genannten Positionen der Alkalischen Protease aus Bacillus lentus in einem Alignment zugeordnet sind.

[0063] Erfindungsgemäße Mittel können neben der Protease ein oder mehrere weitere Enzyme enthalten, insbesondere aus folgender Gruppe: eine oder mehrere weitere Proteasen, Amylasen, Hemicellulasen, Cellulasen, Lipasen und Oxidoreduktasen. Bei der Amylase handelt es sich vorzugsweise um eine α-Amylase. Bei der Hemicellulase handelt es sich vorzugsweise um eine β-Glucanase, eine Pektinase, eine Pullulanase und/oder eine Mannanase. Bei der Cellulase handelt es sich vorzugsweise um ein Cellulase-Gemisch oder eine Einkomponentencellulase, vorzugsweise bzw. überwiegend um eine Endoglucanase und/oder eine Cellobiohydrolase. Bei der Oxidoreduktase handelt es sich vorzugsweise um eine Oxidase, insbesondere eine Cholin-Oxidase, oder um eine Perhydrolase.

[0064] Erfindungsgemäße Mittel enthalten vorzugsweise mindestens einen Komplexbildner und/oder Buildersubstanzen, wobei es sich bei dem Builder insbesondere um einen Zeolith-Builder handelt, und/oder ein nichtionisches Tensid, wobei es sich bei dem nichtionischen Tensid vorzugsweise um einen Hydroxymischether handelt, und/oder optischen Aufheller, wobei es sich bei dem optischen Aufheller um Diphenylverbindungen, insbesondere um Distyryl-Biphenylderivate, und/oder um Stilbentriazin-Derivate handelt.

Beispiele

Beispiel 1

Untersuchung der Protease-Restaktivität in Gegenwart eines Inhibitors

[0065] Zum Nachweis, dass die unten aufgeführten Verbindungen eine die Protease-Aktivität inhibierende Wirkung ausüben, wurde die proteolytische Restaktivität der Bacillus lentus-Alkalische Protease F49 (gemäß WO 95/23221 A1) in Anwesenheit dieser Verbindungen ermittelt.

[0066] In parallelen Reaktionsansätzen wurden in 100 mM Tris-Puffer, pH 6,8, 0,1% (w/v) BrijTM35 das Substrat Succinyl Alanin-Alanin-Prolin-Phenylalanin-para-Nitroanilid (AAPFpNA; Bachem L-1400) und 5 x 10^{-9} bzw. 1 x 10^{-8} M der Protease vorgelegt. Hinzu kamen die in Tabelle 1 aufgeführten zu testenden Verbindungen in einer Endkonzentration von 10 mM. Sie waren jeweils in wasserfreiem DMSO gelöst, wobei Effekte von DMSO auf die enzymatische Aktivität über die entsprechende Referenz mit derselben Menge DMSO, aber ohne die betreffende Verbindung korrigiert wurden. Die Inkubation erfolgte für 5 min bei pH 8,6 und 25°C. Dabei entspricht 1 U 1μmol gespaltenem Substrat pro Minute.

[0067] Auf diese Weise wurden folgende Verbindungen untersucht:

V1: 2-[[(3-carboxyphenyl)amino]carbonyl]-Benzoesäure
V2: 2-[(2-carboxybenzoyl)amino]-Benzoesäure
V3: 2-[[(4-carboxyphenyl)amino]carbonyl]-Benzoesäure
V4: 2-(4-carboxybenzoyl)-Benzoesäure
V5: 4-(2-carboxybenzoyl)-1,2-Benzoldicarboxylsäure

[0068] Sie führten alle zu einer Restaktivität der Protease von 50% oder weniger. Hierunter ist V1 der stärkste und damit am besten geeigente Protease-Inhibitor bzw. Stabilisator, gefolgt von V2, V3, V4 (praktisch genauso gut wie V3) und V5.

[0069] Aufgrund dieser Ergebnisse sind diese Verbindungen auch dazu geeignet, die enzymatischen Aktivitäten in Protease enthaltenden Wasch- und Reinigungsmitteln während der Lagerung zu stabilisieren.

Beispiel 2

[0070] Untersuchung der Lagerstabilität proteasehaltiger Wasch- und Reinigungsmittel in Gegenwart von Protease-Inhibitoren

[0071] Als Basisrezeptur wurde ein Flüssigwaschmittel mit folgender Zusammensetzung angesetzt (alle Angaben in Gewichts-Prozent): 0,3-0,5% Xanthan Gum, 0,2-0,4% Anti-Schaummittel, 6-7% Glycerin, 0,3-0,5% Ethanol, 4-7% FA-EOS, 24-28% Nichtionische Tenside, 1 % Borsäure, 1-2% Natriumcitrat (Dihydrat), 2-4% Soda, 14-16% Kokosnuss-Fettsäuren, 0,5% HEDP, 0-0,4% PVP, 0-0,05% optischer Aufheller, 0-0,001% Farbstoff, Rest: demineralisiertes Wasser.

[0072] Diese Rezeptur wurde mit den zu testenden, inhibierenden Verbindungen und 1.275.000 HPE/l B. lentus-Alkalische Protease F 49 versetzt. Die in HPE angegebene Protease-Aktivität (Henkel-Protease-Einheiten) wurde nach van Raay, Saran und Verbeek, gemäß der Veröffenlichung "Zur Bestimmung der proteolytischen Aktivität in Enzymkonzentraten und enzymhaltigen Wasch-, Spül- und Reinigungsmitteln" in Tenside (1970), Band 7, S. 125- 132, bestimmt.

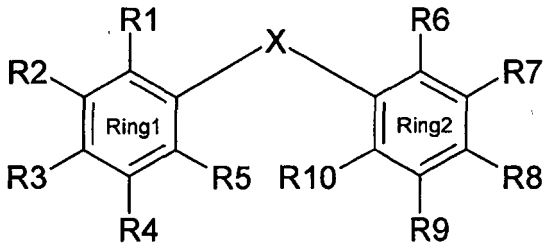
[0073] Die Lagerung erfolgte über verschieden lange Zeiträume in luftdicht verschlossenen Gefäßen bei 30°C.

[0074] Zur Auswertung wurden die Anfangswerte für die proteolytische Aktivität des betreffenden Mittels mit den nach der Lagerung bestimmten Werten verglichen. Je höher die nach der Lagerung verbleibende Aktivität war, desto besser war die enthaltene Protease während der Lagerung inaktiviert und desto besser eignet sich die betreffende Verbindung als erfindungsgemäßer Stabilisator.

[0075] Alle untersuchten Verbindungen zeigten eine eindeutig stabilisierende Wirkung.

Patentansprüche

1. Waschmittel, enthaltend eine Protease und eine Verbindung der allgemeinen Strukturformel:



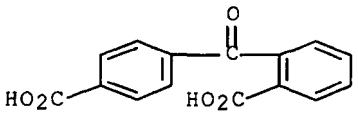
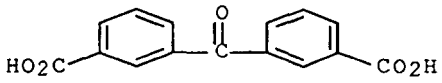
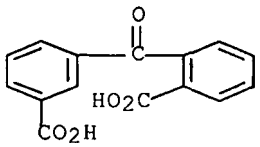
in der

(a) X für eine Carbonylgruppe (C=O) oder eine Säureamidgruppe (NHCO) steht,
(b) R1, R2, R3, R4 und R5 (in Ring 1) für Wasserstoff (H), eine Carboxyl- (COOH), eine Methyl- (CH_3), eine Ethyl- (C_2H_5), eine Hydroxyl- (OH), eine Hydroxymethyl- (CH_2OH), eine Aminogruppe (NH_2) und/oder ein Halogen stehen, wobei in diesem Ring mindestens eine Carboxylgruppe (COOH) vorliegt,
(c) R6, R7, R8, R9 und R10 (in Ring 2) für Wasserstoff (H), eine Carboxyl- (COOH), eine Methyl- (CH_3), eine Ethyl- (C_2H_5), eine Hydroxyl- (OH), eine Hydroxymethyl- (CH_2OH), eine Aminogruppe (NH_2) und/oder ein Halogen stehen, wobei in diesem Ring mindestens eine Carboxylgruppe (COOH) vorliegt, und
(d) optional zwei der Reste R1 bis R10 (A) und (B), die zueinander orthoständig sind, (A) eine in (b) und/oder (c) genannte obligatorische oder gegebenenfalls weitere Carboxylgruppe (COOH) und (B) eine Hydroxymethylgruppe sind, die als solche Gruppen oder optional als Gruppierung $-CH_2-O-CO-$ vorliegen und somit zusammen mit den sie tragenden C-Atomen des Rings ein fünfgliedriges Lacton darstellen.

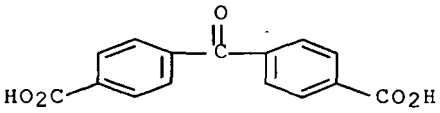
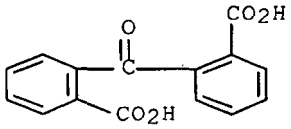
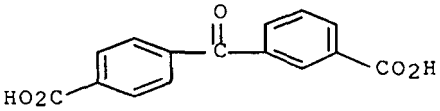
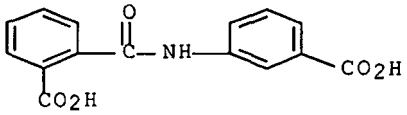
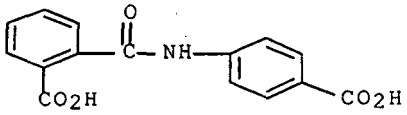
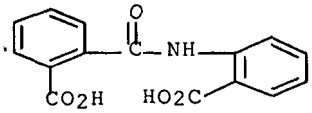
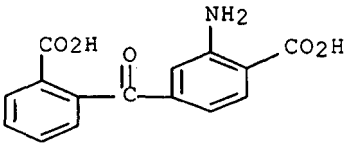
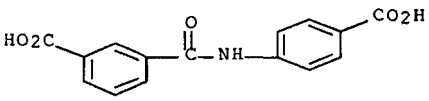
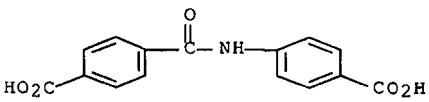
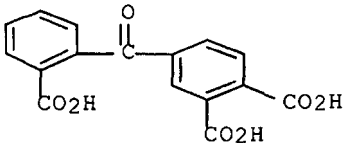
2. Waschmittel nach Anspruch 1, wobei die stabilisierende Verbindung in jedem der beiden aromatischen Ringe 1 bis 3, vorzugsweise 1 oder 2, ganz besonders bevorzugt in beiden Ringen zusammen 2 oder 3 Carboxylgruppen trägt, wobei eine gemäß (d) in ein Lacton eingebundene Carboxylgruppe mitgerechnet wird.

3. Waschmittel nach Anspruch 1 oder 2, wobei die stabilisierende Verbindung bezüglich der enthaltenen Protease eine Inhibitionskonstante (K_i) von 0,01 bis 10 mM, vorzugsweise 0,1 bis 5, besonders bevorzugt 0,5 bis 2 aufweist.

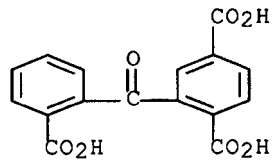
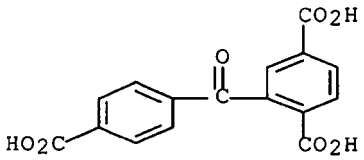
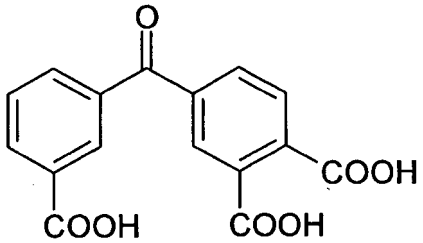
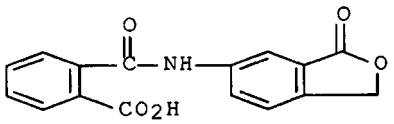
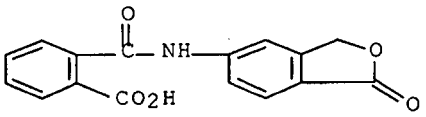
4. Waschmittel nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die stabilisierende Verbindung aus einem der folgenden Stabilisatoren ausgewählt ist:

	Strukturformel	Name
a)		2-(4-Carboxybenzoyl)-Benzoesäure
b)		3,3'-Carbonylbis-Benzoesäure
c)		2-(3-Carboxybenzoyl)-Benzoesäure

(fortgesetzt)

	Strukturformel	Name
d)		4,4'-Carbonylbis-Benzoesäure
e)		2,2'-Carbonylbis-Benzoesäure
f)		3-(4-Carboxybenzoyl)-Benzoesäure
g)		2-[[(3-Carboxyphenyl)amino]carbonyl]-Benzoesäure
h)		2-[[(4-Carboxyphenyl)amino]carbonyl]-Benzoesäure
i)		2-[(2-Carboxybenzoyl)amino]-Benzoesäure
j)		2-Amino-2',4-carbonylbis-Benzoesäure
k)		3-[[(4-Carboxyphenyl)amino]carbonyl]-Benzoesäure
l)		4-[(4-Carboxybenzoyl)amino]-Benzoesäure
m)		4-(2-Carboxybenzoyl)-1,2-Benzoldicarboxylsäure

(fortgesetzt)

	Strukturformel	Name
n)		2-(2-Carboxybenzoyl)-1,4-Benzoldicarboxylsäure
o)		2-(4-Carboxybenzoyl)-1,4-Benzoldicarboxylsäure
p)		4-(3-Carboxybenzoyl)-1,2-Benzoldicarboxylsäure
r)		2-[[(1,3-Dihydro-3-oxo-5-isobenzofuranyl)amino]carbonyl]-Benzoesäure
s)		2-[[(1,3-Dihydro-1-oxo-5-isobenzofuranyl)amino]carbonyl]-Benzoesäure

5. Waschmittel nach einem der Ansprüche 1 bis 4 in überwiegend fester Form.

6. Waschmittel nach einem der Ansprüche 1 bis 4 in überwiegend flüssiger, pastöser oder Gelform.

7. Waschmittel nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die Protease in einem Gehalt von 2 μg bis 20 mg pro g des Mittels, vorzugsweise von 5 μg bis 17,5 mg pro g des Mittels, besonders bevorzugt von 20 μg bis 15 mg pro g des Mittels, ganz besonders bevorzugt von 50 μg bis 10 μg des Mittels enthalten ist.

8. Waschmittel nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei der Stabilisator in einem Gehalt bis zu 50 mg pro g des Mittels, vorzugsweise bis zu 10 mg besonders bevorzugt bis zu 7 mg ganz besonders bevorzugt bis zu 5 mg pro g des Mittels enthalten ist.

9. Waschmittel nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei das molare Verhältnis von Stabilisator zur Protease im Bereich von 1:1 bis 1.000:1, insbesondere von 1:1 bis 500:1, besonders bevorzugt von 1:1 bis 100:1, ganz besonders bevorzugt von 1:1 bis 20:1 liegt.

10. Waschmittel nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei der Stabilisator in einem Gehalt von 0,01 bis 100 x K_i (bezogen auf die enthaltene Protease), vorzugsweise 0,1 bis 10 x K_i besonders bevorzugt 1 bis 5 x K_i enthalten ist.

11. Waschmittel nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei es sich bei der Protease um eine Serin-Protease, vorzugsweise um eine Subtilase, besonders bevorzugt um ein Subtilisin handelt.

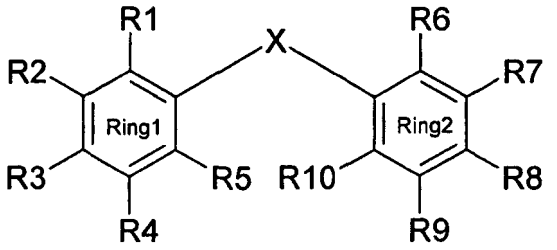
12. Waschmittel nach einem der Ansprüche 1 bis 11, **dadurch gekennzeichnet, dass**

(a) die Protease aus einer Ausgangsprotease durch mindestens eine Veränderung einer Aminosäure erhalten wurde, wobei die Veränderung eine Substitution, Insertion oder Deletion einer Aminosäure ist, und sie zu der Ausgangsprotease auf Aminosäureebene zu mindestens 90%, vorzugsweise mindestens 92,5%, besonders bevorzugt mindestens 95% und ganz besonders bevorzugt mindestens 97,5% identisch ist, und/oder

(b) die Protease aus einer Ausgangsprotease durch mindestens eine Veränderung einer Aminosäure erhalten wurde, wobei die Veränderung eine Substitution oder Insertion einer Aminosäure in demjenigen Bereich der Aminosäuresequenz ist, der den Positionen 95 bis 103 der Alkalischen Protease aus Bacillus lentus in einem Alignment zugeordnet ist, und/oder

(c) die Protease aus einer Ausgangsprotease durch mindestens eine Veränderung einer Aminosäure erhalten wurde, die den Positionen 3, 4, 36, 42, 43, 47, 56, 61, 69, 87, 96, 99, 101, 102, 104, 114, 118, 120, 130, 139, 141, 142, 154, 157, 188, 193, 199, 205, 211, 224, 229, 236, 237, 242, 243, 250, 253, 255 und 268 der Alkalischen Protease aus Bacillus lentus in einem Alignment zugeordnet sind, wobei die Veränderung eine Substitution, Insertion oder Deletion einer Aminosäure ist.

13. Verwendung einer Verbindung der allgemeinen Strukturformel:



in der

(a) X für eine Carbonylgruppe (C=O) oder eine Säureamidgruppe (NHCO) steht,

(b) R1, R2, R3, R4 und R5 (in Ring 1) für Wasserstoff (H), eine Carboxyl- (COOH), eine Methyl- (CH_3), eine Ethyl- (C_2H_5), eine Hydroxyl- (OH), eine Hydroxymethyl- (CH_2OH), eine Aminogruppe (NH_2) und/oder ein Halogen stehen, wobei in diesem Ring mindestens eine Carboxylgruppe (COOH) vorliegt,

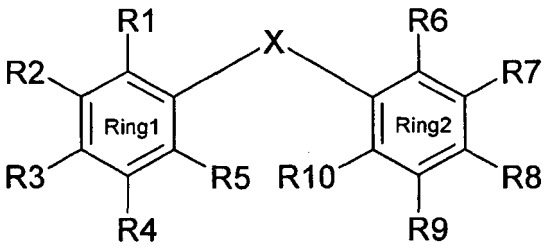
(c) R6, R7, R8, R9 und R10 (in Ring 2) für Wasserstoff (H), eine Carboxyl- (COOH), eine Methyl- (CH_3), eine Ethyl- (C_2H_5), eine Hydroxyl- (OH), eine Hydroxymethyl- (CH_2OH), eine Aminogruppe (NH_2) und/oder ein Halogen stehen, wobei in diesem Ring mindestens eine Carboxylgruppe (COOH) vorliegt, und

(d) optional zwei der Reste R1 bis R10 (A) und (B), die zueinander orthoständig sind, (A) eine in (b) und/oder (c) genannte obligatorische oder gegebenenfalls weitere Carboxylgruppe (COOH) und (B) eine Hydroxymethylgruppe sind, die als solche Gruppen oder optional als Gruppierung $-CH_2-O-CO-$ vorliegen und somit zusammen mit den sie tragenden C-Atomen des Rings ein fünfgliedriges Lacton darstellen,

als reversibler Inhibitor einer Protease im Rahmen einer Waschmittelrezeptur.

14. Verwendung eines Waschmittels nach einem der Ansprüche 1 bis 12 zum Waschen und/oder Reinigen von Textilien.

15. Verwendung einer Protease und einer Verbindung der allgemeinen Strukturformel:



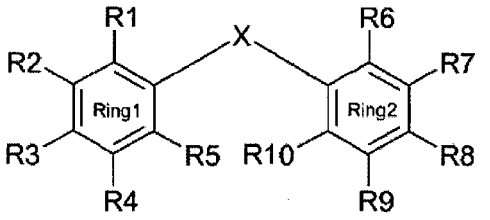
in der

(a) X für eine Carbonylgruppe (C=O) oder eine Säureamidgruppe (NHCO) steht,
(b) R1, R2, R3, R4 und R5 (in Ring 1) für Wasserstoff (H), eine Carboxyl- (COOH), eine Methyl- (CH_3), eine Ethyl- (C_2H_5), eine Hydroxyl- (OH), eine Hydroxymethyl- (CH_2OH), eine Aminogruppe (NH_2) und/oder ein Halogen stehen, wobei in diesem Ring mindestens eine Carboxylgruppe (COOH) vorliegt,
(c) R6, R7, R8, R9 und R10 (in Ring 2) für Wasserstoff (H), eine Carboxyl- (COOH), eine Methyl- (CH_3), eine Ethyl- (C_2H_5), eine Hydroxyl- (OH), eine Hydroxymethyl- (CH_2OH), eine Aminogruppe (NH_2) und/oder ein Halogen stehen, wobei in diesem Ring mindestens eine Carboxylgruppe (COOH) vorliegt, und
(d) optional zwei der Reste R1 bis R10 (A) und (B), die zueinander orthoständig sind, (A) eine in (b) und/oder (c) genannte obligatorische oder gegebenenfalls weitere Carboxylgruppe (COOH) und (B) eine Hydroxymethylgruppe sind, die als solche Gruppen oder optional als Gruppierung $-CH_2-O-CO-$ vorliegen und somit zusammen mit den sie tragenden C-Atomen des Rings ein fünfgliedriges Lacton darstellen.

zur Herstellung eines Waschmittels.

Claims

1. A washing agent, containing a protease and a compound of the general structural formula



,

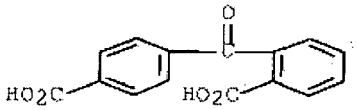
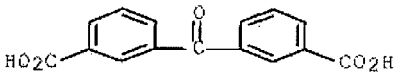
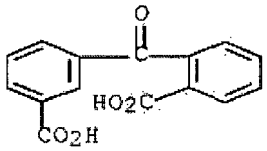
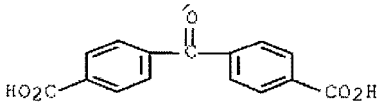
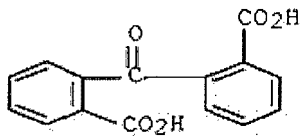
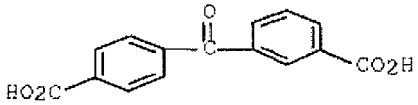
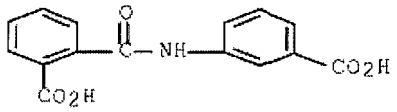
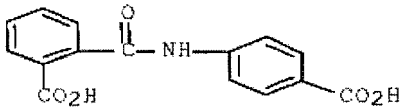
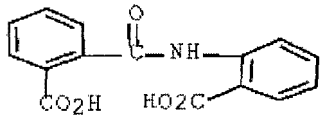
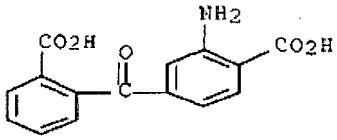
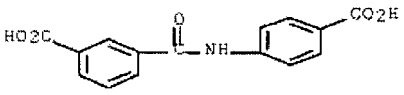
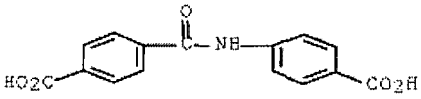
in which

(a) X stands for a carbonyl group (C=O) or an acid amide group (NHCO),
(b) R1, R2, R3, R4 and R5 (in ring 1) stand for hydrogen (H), a carboxyl group (COOH), a methyl group (CH_3), an ethyl group (C_2H_5), a hydroxyl group (OH), a hydroxymethyl group (CH_2OH), an amino group (NH_2) and/or a halogen, wherein at least one carboxyl group (COOH) is present in this ring,
(c) R6, R7, R8, R9 and R10 (in ring 2) stand for hydrogen (H), a carboxyl group (COOH), a methyl group (CH_3), an ethyl group (C_2H_5), a hydroxyl group (OH), a hydroxymethyl group (CH_2OH), an amino group (NH_2) and/or a halogen, wherein at least one carboxyl group (COOH) is present in this ring and
(d) optionally two of the radicals R1 to R10 (A) and (B), which are in ortho position to one another, (A) is an obligatory carboxyl group (COOH) mentioned in (b) and/or (c) or optionally an additional carboxyl group (COOH), and (B) is a hydroxymethyl group, which are present as such groups or optionally as the group $-CH_2-O-CO-$ and thus together with the carbon atoms of the ring containing them denote a five-membered lactone.

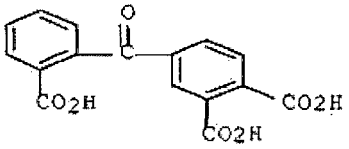
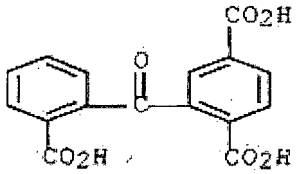
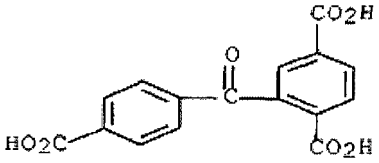
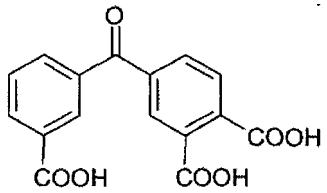
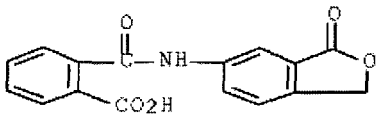
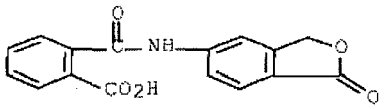
2. The washing agent according to claim 1, wherein the stabilizing compound has, in each of the two aromatic rings, 1 to 3 carboxyl groups, preferably 1 or 2 carboxyl groups, most preferably 2 or 3 carboxyl groups in both rings together, wherein a carboxyl group bound in a lactone according to (d) is also counted.

3. The washing agent according to claim 1 or 2, wherein the stabilizing compound has an inhibition constant (K_i) of 0.01 to 10 mM preferably 0.1 to 5, especially preferably 0.5 to 2, with respect to the protease contained therein.

4. The washing agent according to any one of Claims 1 to 3, wherein the stabilizing compound is selected from one of the following stabilizers:

	Structural formula	Name
a)		2-(4-Carboxybenzoyl)benzoic acid
b)		3,3'-Carbonylbisbenzoic acid
c)		2-(3-Carboxybenzoyl)benzoic acid
d)		4,4'-Carbonylbisbenzoic acid
e)		2,2'-Carbonylbisbenzoic acid
f)		3-(4-Carboxybenzoyl)benzoic acid
g)		2-[[(3-Carboxyphenyl)amino]carbonyl]-benzoic acid
h)		2-[[(4-Carboxyphenyl)amino]carbonyl]-benzoic acid
i)		2-[(2-Carboxybenzoyl)amino]benzoic acid
j)		2-Amino-2',4-carbonylbisbenzoic acid
k)		3-[[(4-Carboxyphenyl)amino]carbonyl]-benzoic acid
l)		4-[(4-Carboxybenzoyl)amino]benzoic acid

(continued)

	Structural formula	Name
m)		4-(2-Carboxylbenzoyl)-1,2-benzenedicarboxylic acid
n)		2-(2-Carboxybenzoyl)-1,4-benzene-dicarboxylic acid
o)		2-(4-Carboxybenzoyl)-1,4-benzene-dicarboxylic acid
p)		4-(3-carboxybenzoyl)-1,2-benzenedicarboxylic acid
r)		2-[[(1,3-Dihydro-3-oxo-5-isobenzofuranyl)amino]carbonyl]benzoic acid
s)		2-[[(1,3-Dihydro-1-oxo-5-isobenzofuranyl)amino]carbonyl]benzoic acid

5. The washing agent according to any one of Claims 1 to 4 in predominantly solid form.

6. The washing agent according to any one of Claims 1 to 4 in predominantly liquid, paste or gel form.

7. The washing agent according to any one of Claims 1 to 6, wherein the protease is present in an amount of 2 μg to 20 mg per g of the agent, preferably from 5 μg to 17.5 mg per g of the agent, more preferably from 20 μg to 15 mg per g of the agent, most preferably from 50 μg to 10 μg of the agent.

8. The washing agent according to any one of Claims 1 to 7, wherein the stabilizer is present in an amount of up to 50 mg per g of the agent, preferably up to 10 mg, more preferably up to 7 mg, most preferably up to 5 mg per g of the agent.

9. The washing agent according to any one of Claims 1 to 8, wherein the molar ratio of stabilizer to protease is in the range of 1:1 to 1000:1, in particular from 1:1 to 500:1, more preferably from 1:1 to 100:1, most preferably from 1:1 to 20:1.

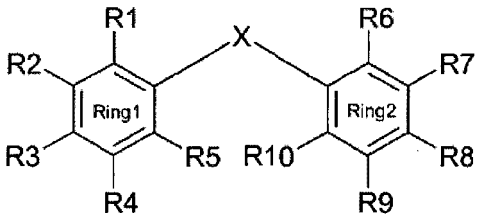
10. The washing agent according to any one of Claims 1 to 9, wherein the stabilizer is present in an amount of 0.01 to 100 $\times$ K_i (based on the protease contained therein), preferably 0.1 to 10 $\times$ K_i, more preferably 1 to 5 $\times$ K_i.

11. The washing agent according to any one of Claims 1 to 10, wherein the protease is a serine protease, preferably a subtilase, more preferably a subtilisin.

12. The washing agent according to any one of Claims 1 to 11, **characterized in that**

(a) the protease is obtained from a starting protease by at least one change in an amino acid, such that the change is a substitution, insertion or deletion of an amino acid and it is at least 90% identical to the starting protease on an amino acid level, preferably at least 92.5% identical, especially preferably at least 95% identical and most especially preferably at least 97.5% identical, and/or
(b) the protease is obtained from a starting protease by at least one change in an amino acid, such that the change is a substitution or insertion of an amino acid in the area of the amino acid sequence assigned to positions 95 to 103 of the alkaline protease from *Bacillus lentus* in an alignment, and/or
(c) the protease is obtained from a starting protease by at least one change in an amino acid assigned to positions 3, 4, 36, 42, 43, 47, 56, 61, 69, 87, 96, 99, 101, 102, 104, 114, 118, 120, 130, 139, 141, 142, 154, 157, 188, 193, 199, 205, 211, 224, 229, 236, 237, 242, 243, 250, 253, 255 and 268 of the alkaline protease from *Bacillus lentus* in an alignment, such that the change is a substitution, insertion or deletion of an amino acid.

13. Use of a compound of the general structural formula



,

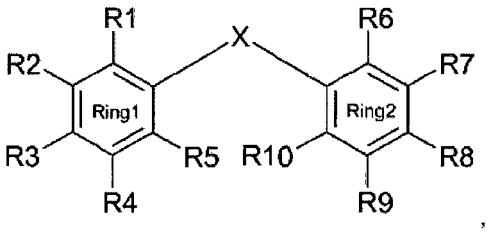
in which

(a) X stands for a carbonyl group (C=O) or an acid amide group (NHCO),
(b) R1, R2, R3, R4 and R5 (in ring 1) stand for hydrogen (H), a carboxyl group (COOH), a methyl group (CH_3), an ethyl group (C_2H_5), a hydroxyl group (OH), a hydroxymethyl group (CH_2OH), an amino group (NH_2) and/or a halogen, wherein at least one carboxyl group (COOH) is present in this ring,
(c) R6, R7, R8, R9 and R10 (in ring 2) stand for hydrogen (H), a carboxyl group (COOH), a methyl group (CH_3), an ethyl group (C_2H_5), a hydroxyl group (OH), a hydroxymethyl group (CH_2OH), an amino group (NH_2) and/or a halogen, wherein at least one carboxyl group (COOH) is present in this ring, and
(d) optionally two of the radicals R1 to R10 are (A) and (B), which are in ortho position to one another, (A) is an obligatory carboxyl group (COOH) mentioned in (b) and/or (c) or optionally an additional carboxyl group, and (B) is a hydroxymethyl group, which are present as such groups or optionally as the group $-CH_2-O-CO-$ and thus together with the carbon atoms of the ring containing them denote a five-membered lactone,

as a reversible inhibitor of a protease within the context of a washing agent recipe.

14. The use of a washing agent according to any one of Claims 1 to 12 for washing and/or cleaning textiles.

15. The use of a protease and a compound of the general structural formula



,

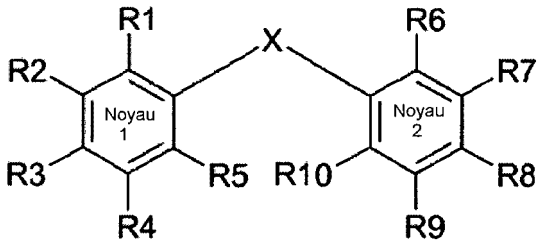
in which

(a) X stands for a carbonyl group (C=O) or an acid amide group (NHCO),
(b) R1, R2, R3, R4 and R5 (in ring 1) stand for hydrogen (H), a carboxyl group (COOH), a methyl group (CH_3),

an ethyl group (C_2H_5), a hydroxyl group (OH), a hydroxymethyl group (CH_2OH), an amino group (NH_2) and/or a halogen, wherein at least one carboxyl group (COOH) is present in this ring,
(c) R6, R7, R8, R9 and R10 (in ring 2) stand for hydrogen (H), a carboxyl group (COOH), a methyl group (CH_3), an ethyl group (C_2H_5), a hydroxyl group (OH), a hydroxymethyl group (CH_2OH), an amino group (NH_2) and/or a halogen, wherein at least one carboxyl group (COOH) is present in this ring, and
(d) optionally two of the radicals R1 to R10 are (A) and (B), which are in ortho position to one another, (A) is an obligatory carboxyl group (COOH) mentioned in (b) and/or (c) or optionally an additional carboxyl group (COOH), and (B) is a hydroxymethyl group, which are present as such groups or optionally as the group $-CH_2-O-CO-$ and thus together with the carbon atoms of the ring containing them denote a five-membered lactone, for producing a washing agent.

Revendications

1. Agent de lavage contenant une protéase et un composé répondant à la formule développée générale :



,

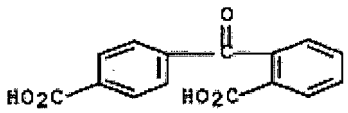
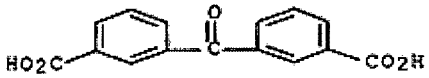
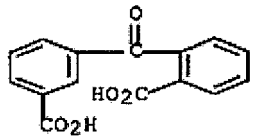
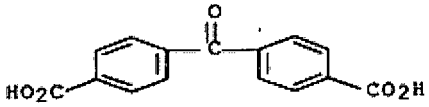
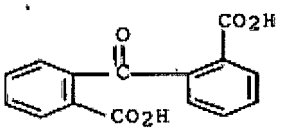
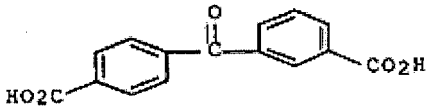
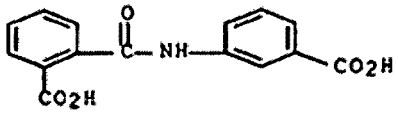
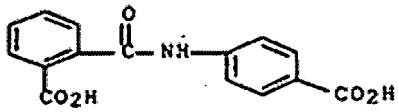
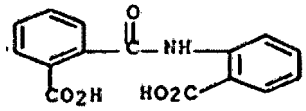
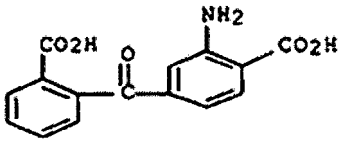
dans laquelle

(a) X représente un groupe carbonyle (C=O) ou un groupe d'amide d'acide (NHCO) ;
(b) R1, R2, R3, R4 et R5 (dans le noyau 1) représentent un atome d'hydrogène (H), un groupe carboxyle (COOH), un groupe méthyle (CH_3), un groupe éthyle (C_2H_5), un groupe hydroxyle (OH), un groupe hydroxyméthyle (CH_2OH), un groupe amino (NH_2) et/ou un atome d'halogène, au moins un groupe carboxyle (COOH) étant présent dans ce noyau ;
(c) R6, R7, R8, R9 et R10 (dans le noyau 2) représentent un atome d'hydrogène (H), un groupe carboxyle (COOH), un groupe méthyle (CH_3), un groupe éthyle (C_2H_5), un groupe hydroxyle (OH), un groupe hydroxyméthyle (CH_2OH), un groupe amino (NH_2) et/ou un atome d'halogène, au moins un groupe carboxyle (COOH) étant présent dans ce noyau ; et
(d) de manière facultative, deux des résidus R1 à R10 (A) et (B), qui sont disposés en position ortho l'un par rapport à l'autre, (A) représentent un groupe carboxyle (COOH) obligatoire mentionné sous (b) et/ou (c) ou éventuellement un autre groupe carboxyle (COOH), et (B) un groupe hydroxyméthyle, qui sont présents sous la forme desdits groupes ou de manière facultative sous la forme d'un groupement $-CH_2-O-CO-$ et représentent ainsi ensemble avec les atomes de carbone du noyau qui les porte, une lactone à cinq membres.

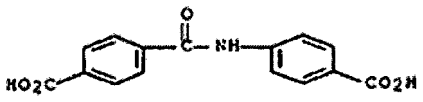
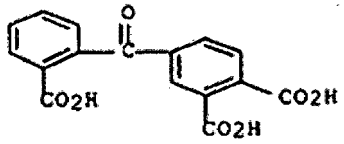
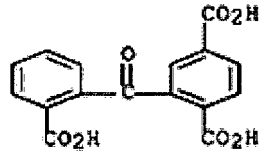
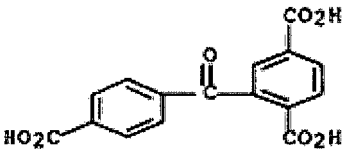
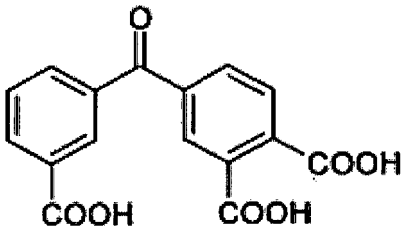
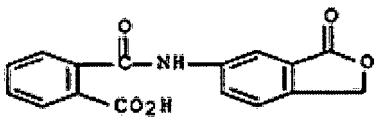
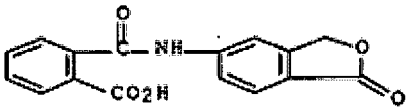
2. Agent de lavage selon la revendication 1, dans lequel le composé stabilisateur dans chacun des deux noyaux aromatiques porte de 1 à 3, de préférence 1 ou 2, de manière tout particulièrement préférée dans les deux noyaux ensemble 2 ou 3 groupes carboxyle, un groupe carboxyle intégré dans une lactone conformément à (d) étant compris dans le calcul.

3. Agent de lavage selon la revendication 1 ou 2, dans lequel le composé stabilisateur présente, par rapport à la protéase qu'il contient, une constante d'inhibition (K_i) de 0,01 à 10 mM, de préférence de 0,1 à 5, de manière particulièrement préférée de 0,5 à 2.

4. Agent de lavage selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, dans lequel le composé stabilisateur est choisi parmi un des stabilisateurs indiqués ci-après :

	Formule développée	Nom
a)		acide 2-(4-carboxybenzoyl)-benzoïque
b)		acide 3,3'-carbonylbis-benzoïque
c)		acide 2-(3-carboxybenzoyl)-benzoïque
d)		acide 4,4'-carbonylbis-benzoïque
e)		acide 2,2'-carbonylbis-benzoïque
f)		acide 3-(4-carboxybenzoyl)-benzoïque
g)		acide 2-[[(3-carboxyphényl)amino]carbonyl]-benzoïque
h)		acide 2-[[(4-carboxyphényl)amino]carbonyl]-benzoïque
i)		acide 2-[(2-carboxybenzoyl)amino]-benzoïque
j)		acide 2-amino-2',4-carbonylbis-benzoïque

(suite)

	Formule développée	Nom
k)		acide 3-[[(4-carboxyphényl)amino]carbonyl]-benzoïque
l)		acide 4-[(4-carboxybenzoyl)amino]carbonyl]-benzoïque
m)		acide 4-(2-carboxybenzoyl)-1,2-benzènedicarboxylique
n)		acide 2-(2-carboxybenzoyl)-1,4-benzènedicarboxylique
o)		acide 2-(4-carboxybenzoyl)-1,4-benzènedicarboxylique
p)		acide 4-(3-carboxybenzoyl)-1,2-benzènedicarboxylique
r)		acide 2-[[(1,3-dihydro-3-oxo-5-isobenzofuranyl)-amino]-carbonyl]-benzoïque
s)		acide 2-[[(1,3-dihydro-1-oxo-5-isobenzofuranyl)-amino]carbonyl]-benzoïque

5. Agent de lavage selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, principalement sous forme solide.

6. Agent de lavage selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, principalement sous forme liquide, pâteuse ou sous forme de gel.

7. Agent de lavage selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, dans lequel la protéase est contenue en une teneur de 2 μg à 20 mg par g de l'agent, de préférence de 5 μg à 17,5 mg par g de l'agent, de manière particulièrement préférée de 20 μg à 15 mg par g de l'agent, de manière tout particulièrement préférée de 50 μg à 10 μg de l'agent.

8. Agent de lavage selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, dans lequel le stabilisateur est contenu en une

teneur s'élevant jusqu'à 50 mg par g de l'agent, de préférence jusqu'à 10 mg, de manière particulièrement préférée jusqu'à 7 mg, de manière tout particulièrement préférée jusqu'à 5 mg par g de l'agent.

9. Agent de lavage selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, dans lequel le rapport molaire du stabilisateur à la protéase se situe dans la plage de 1:1 à 1000:1, en particulier de 1:1 à 500:1, de manière particulièrement préférée de 1:1 à 100:1, de manière tout particulièrement préférée de 1:1 à 20:1.

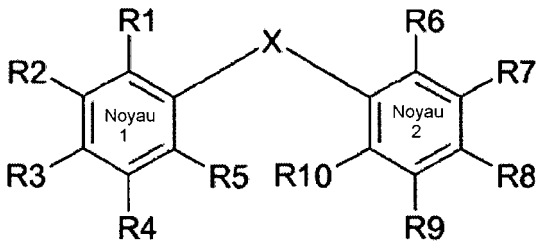
10. Agent de lavage selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, dans lequel le stabilisateur est contenu en une teneur de 0,01 à 100 x K_i (rapporté à la protéase contenue), de préférence de 0,1 à 10 x K_i, de manière particulièrement préférée de 1 à 5 x K_i.

11. Agent de lavage selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, dans lequel, en ce qui concerne la protéase, il s'agit d'une sérine-protéase de préférence d'une subtilase, de manière particulièrement préférée d'une subtilisine.

12. Agent de lavage selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, **caractérisé en ce que**

(a) on obtient la protéase à partir d'une protéase de départ via au moins une modification d'un acide aminé, la modification représentant une substitution, une insertion ou une délétion d'un acide aminé, et elle est identique à la protéase de départ, sur le plan des acides aminés, à concurrence d'au moins 90 %, de préférence d'au moins 92,5 %, de manière particulièrement préférée d'au moins 95 % et de manière tout particulièrement préférée d'au moins 97,5 % ; et/ou
(b) on obtient la protéase à partir d'une protéase de départ via au moins une modification d'un acide aminé, la modification représentant une substitution ou une insertion d' un acide aminé dans le domaine de la séquence d'acides aminés qui est attribué dans un alignement aux positions 95 à 103 de la protéase alcaline de Bacillus lentus, et/ou
(c) on obtient la protéase à partir d'une protéase de départ via au moins une modification d'un acide aminé, qui est attribué dans un alignement aux positions 3, 4, 36, 42, 43, 47, 56, 61, 69, 87, 96, 99, 101, 102, 104, 114, 118, 120, 130, 139, 141, 142, 154, 157, 188, 193, 199, 205, 211, 224, 229, 236, 237, 242, 243, 250, 253, 255 et 268 de la protéase alcaline de Bacillus lentus, la modification représentant une substitution, une insertion ou une délétion d'un acide aminé.

13. Utilisation d'un composé répondant à la formule développée générale



,

dans laquelle

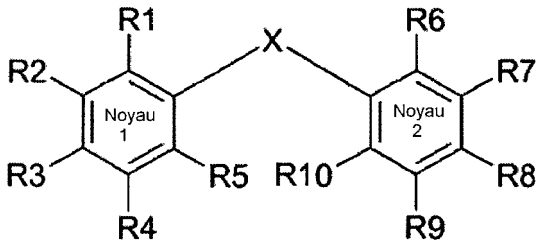
(a) X représente un groupe carbonyle (C=O) ou un groupe d'amide d'acide (NHCO) ;
(b) R1, R2, R3, R4 et R5 (dans le noyau 1) représentent un atome d'hydrogène (H), un groupe carboxyle (COOH), un groupe méthyle (CH_3), un groupe éthyle (C_2H_5), un groupe hydroxyle (OH), un groupe hydroxyméthyle (CH_2OH), un groupe amino (NH_2) et/ou un atome d'halogène, au moins un groupe carboxyle (COOH) étant présent dans ce noyau ;
(c) R6, R7, R8, R9 et R10 (dans le noyau 2) représentent un atome d'hydrogène (H), un groupe carboxyle (COOH), un groupe méthyle (CH_3), un groupe éthyle (C_2H_5), un groupe hydroxyle (OH), un groupe hydroxyméthyle (CH_2OH), un groupe amino (NH_2) et/ou un atome d'halogène, au moins un groupe carboxyle (COOH) étant présent dans ce noyau ; et
(d) de manière facultative, deux des résidus R1 à R10 (A) et (B), qui sont disposés en position ortho l'un par rapport à l'autre, (A) représentent un groupe carboxyle (COOH) obligatoire mentionné sous (b) et/ou (c) ou éventuellement un autre groupe carboxyle (COOH), et (B) un groupe hydroxyméthyle, qui sont présents sous la forme desdits groupes ou de manière facultative sous la forme d'un groupement -CH_2-O-CO- et représentent

ainsi ensemble avec les atomes de carbone du noyau qui les porte, une lactone à cinq membres,

à titre d'inhibiteur réversible d'une protéase dans le cadre d'une formulation d'agent de lavage.

14. Utilisation d'un agent de lavage selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, pour le lavage et/ou le nettoyage des textiles.

15. Utilisation d'une protéase et d'un composé répondant à la formule développée générale :



,

dans laquelle

(a) X représente un groupe carbonyle (C=O) ou un groupe d'amide d'acide (NHCO) ;
(b) R1, R2, R3, R4 et R5 (dans le noyau 1) représentent un atome d'hydrogène (H), un groupe carboxyle (COOH), un groupe méthyle (CH_3), un groupe éthyle (C_2H_5), un groupe hydroxyle (OH), un groupe hydroxyméthyle (CH_2OH), un groupe amino (NH_2) et/ou un atome d'halogène, au moins un groupe carboxyle (COOH) étant présent dans ce noyau ;
(c) R6, R7, R8, R9 et R10 (dans le noyau 2) représentent un atome d'hydrogène (H), un groupe carboxyle (COOH), un groupe méthyle (CH_3), un groupe éthyle (C_2H_5), un groupe hydroxyle (OH), un groupe hydroxyméthyle (CH_2OH), un groupe amino (NH_2) et/ou un atome d'halogène, au moins un groupe carboxyle (COOH) étant présent dans ce noyau ; et
(d) de manière facultative, deux des résidus R1 à R10 (A) et (B), qui sont disposés en position ortho l'un par rapport à l'autre, (A) représentent un groupe carboxyle (COOH) obligatoire mentionné sous (b) et/ou (c) ou éventuellement un autre groupe carboxyle (COOH), et (B) un groupe hydroxyméthyle, qui sont présents sous la forme desdits groupes ou de manière facultative sous la forme d'un groupement $-CH_2-O-CO-$ et représentent ainsi ensemble avec les atomes de carbone du noyau qui les porte, une lactone à cinq membres,

pour la production d'un agent de lavage.

IN DER BESCHREIBUNG AUFGEFÜHRTE DOKUMENTE

Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde ausschließlich zur Information des Lesers aufgenommen und ist nicht Bestandteil des europäischen Patentdokumentes. Sie wurde mit größter Sorgfalt zusammengestellt; das EPA übernimmt jedoch keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.

In der Beschreibung aufgeführte Patentdokumente

- WO 9621716 A1 **[0007]**
- WO 9641859 A1 **[0007]**
- WO 9523221 A1 **[0041] [0065]**
- WO 07113241 A1 **[0045]**
- WO 02008398 A **[0045]**
- WO 9102792 A1 **[0058]**

In der Beschreibung aufgeführte Nicht-Patentliteratur

- **LEONOR MICHAELIS ; MAUD MENTEN.** Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem. Z,* 1913, vol. 49, 333-369 **[0031]**
- **GLEICHUNG 2 ; CHENG Y. ; PRUSOFF W.H.** *Biochem.Pharmacol.,* 1973, vol. 22, 3099-3108 **[0038]**
- **D. J. LIPMAN ; W. R. PEARSON.** *Science,* 1985, vol. 227, 1435-1441 **[0053]**
- **VAN RAAY ; SARAN ; VERBEEK.** Zur Bestimmung der proteolytischen Aktivität in Enzymkonzentraten und enzymhaltigen Wasch-, Spül- und Reinigungsmitteln. *Tenside,* 1970, vol. 7, 125-132 **[0072]**