

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 471 447**

51 Int. Cl.:

C11D 3/20 (2006.01)

C11D 3/32 (2006.01)

C11D 3/386 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.12.2007 E 07847764 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.04.2014 EP 2115111**

54 Título: **Derivados de benzofenona o anilida de ácido benzoico que llevan grupos carboxilo como estabilizantes de enzimas**

30 Prioridad:

06.03.2007 DE 102007011236

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

26.06.2014

73 Titular/es:

**HENKEL AG & CO. KGAA (100.0%)
HENKELSTRASSE 67
40589 DÜSSELDORF, DE**

72 Inventor/es:

**MICHELS, ANDREAS;
GHOSH, ROBIN;
BESSLER, CORNELIUS y
LOWIS, DANIELA**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 471 447 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Derivados de benzofenona o anilida de ácido benzoico que llevan grupos carboxilo como estabilizantes de enzimas

5 La presente invención se refiere a agentes de lavado que contienen derivados de benzofenona o anilida de ácido benzoico que llevan grupos carboxilo, que actúan como inhibidores de proteasa y, por tanto, son estabilizantes de enzimas adecuados.

10 El empleo de enzimas en agentes de lavado está establecido en el estado de la técnica. Sirven para ampliar el espectro de rendimiento de los respectivos agentes correspondientemente a sus actividades especiales. A esto pertenecen, en particular, enzimas hidrolíticas tales como proteasas, amilasas, lipasas y celulasas. Las primeras tres mencionadas hidrolizan proteínas, almidón y grasas y, por tanto, contribuyen directamente a la eliminación de suciedad. Las celulasas se emplean en particular debido a su efecto en tejidos. Otro grupo de enzimas de agentes de lavado son enzimas oxidantes, en particular oxidasas que, dado el caso interaccionando con otros componentes, sirven preferentemente para blanquear ensuciamientos o generar *in situ* los agentes blanqueadores. Además de estas enzimas, que se someten a una optimización constante, se facilitan permanentemente otras enzimas para el empleo en agentes de lavado para poder abordar de forma óptima en particular ensuciamientos especiales, tales como, por ejemplo, pectinasas, β -glucanasas, mananasas u otras hemicelulasas para la hidrólisis, en particular, de polímeros vegetales especiales.

20 Las enzimas establecidas desde hace más tiempo y contenidas prácticamente en todos los agentes de lavado modernos potentes son las proteasas y, entre las mismas, en particular las serina proteasas, a las que pertenecen también las subtilasas. Provocan la degradación de ensuciamientos que contienen proteínas sobre el producto de limpieza. No obstante, también se hidrolizan a sí mismas (autoproteólisis) y a todas las demás proteínas contenidas en los respectivos agentes, es decir, en particular también otras enzimas. Esto ocurre en particular durante el proceso de limpieza, es decir, en el baño de lavado acuoso cuando existen condiciones de reacción comparativamente adecuadas. Pero esto también ocurre durante el almacenamiento de los respectivos agentes, por lo que una duración creciente de almacenamiento conlleva siempre también una cierta pérdida de actividades enzimáticas, por ejemplo de la actividad proteasa. Por norma general, la actividad enzimática en el agente de lavado es inversamente proporcional a la duración de almacenamiento, con una duración creciente de almacenamiento cada vez disminuye más la actividad enzimática. Esto es particularmente problemático en formulaciones en forma de gel o líquidas y en particular que contienen agua, debido a que en las mismas con el agua contenida están disponibles tanto el medio de reacción como el reactivo de hidrólisis.

35 Por tanto, un objetivo durante el desarrollo de agentes de lavado consiste en estabilizar las enzimas contenidas en particular durante el almacenamiento. Por ello se entiende la protección frente a distintas influencias desfavorables tales como, por ejemplo, frente a desnaturalización o descomposición por influencias físicas u oxidación. Un punto clave de estos desarrollos radica en la protección de las proteínas y/o enzimas contenidas frente a escisión proteolítica. Esta se puede realizar por la generación de barreras físicas, por ejemplo, mediante encapsulación de las enzimas en granulados de enzimas especiales o mediante confección de los agentes en sistemas de dos o más cámaras. Otra vía seguida muchas veces consiste en añadir compuestos químicos a los agentes, que inhiben las proteasas y, por tanto, en su totalidad actúan como estabilizantes para las proteasas y las demás proteínas y enzimas contenidas. A este respecto se tiene que tratar de inhibidores de proteasa reversibles, ya que la actividad proteasa se ha de reprimir solo temporalmente, en particular durante el almacenamiento, pero ya no durante el proceso de limpieza.

50 Como inhibidores de proteasa reversibles en el estado de la técnica están establecidos los polioles, en particular glicerol y 1,2-propilenglicol, clorhidrato de benzamidina, bórax, ácidos bóricos, ácidos borónicos o sus sales o ésteres. Entre los mismos se han de mencionar sobre todo derivados con grupos aromáticos, por ejemplo, ácidos fenilborónicos sustituidos en posición orto, meta o para, en particular ácido 4-formilfenil-borónico (4-FPBA) o las sales o ésteres de los compuestos mencionados. Se obtiene una protección particularmente buena cuando los derivados de ácido borónico se emplean junto con polioles, ya que entonces pueden formar un complejo que estabiliza la enzima. Con este fin se han descrito también aldehídos peptídicos, es decir, oligopéptidos con extremo C reducido, en particular aquellos de 2 a 50 monómeros. A los inhibidores de proteasa reversibles peptídicos pertenecen, entre otras cosas, ovomucoide y leupeptina. Para esto se emplean también inhibidores de péptidos reversibles específicos así como proteínas de fusión de proteasas e inhibidores de péptidos específicos.

60 Sin embargo, los polioles tales como glicerol y 1,2-propilenglicol han resultado desventajosos a causa de sus altas concentraciones de uso necesarias, debido a que los restantes principios activos de los respectivos agentes, por tanto, pueden estar contenidos ya solo en partes correspondientemente menores.

Entre los inhibidores de serina proteasa eficaces ya en una concentración comparativamente reducida, los derivados de ácido borónico ocupan una posición destacada. Por ejemplo, la solicitud de patente internacional WO 96/21716 A1 desvela que los derivados de ácido borónico que actúan como inhibidores de proteasa también son adecuados para estabilizar enzimas en agentes de lavado. En la solicitud de patente internacional WO 96/41859 A1 se desvela una selección de estabilizantes particularmente potentes.

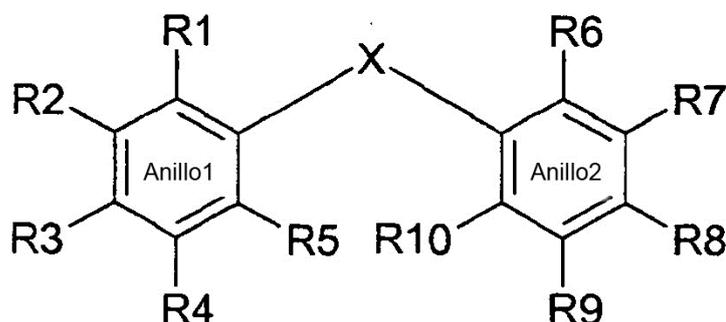
Independientemente de su efecto estabilizante, sin embargo, los derivados de ácido borónico presentan una desventaja decisiva. Muchos derivados de ácido borónico, tales como, por ejemplo, borato, forman con algunos otros ingredientes del agente de lavado productos secundarios indeseados, de tal manera que los mismos en los respectivos agentes ya no están disponibles para el fin deseado de limpieza o incluso permanecen en el artículo lavado como impureza.

Por tanto, se había planteado el objetivo de identificar compuestos químicos sin boro que actuasen como inhibidores de proteasa y que fuesen, por tanto, adecuados como estabilizantes de enzimas en agentes de lavado.

En este caso era de particular interés el empleo en agentes de lavado en conjunto líquidos, en forma de gel o pastosos y, entre estos, en particular en aquellos que contienen agua.

Este objetivo se resuelve mediante los siguientes agentes:

Agentes de lavado que contienen una proteasa y un compuesto con la fórmula estructural general:



en la que

- (a) X representa un grupo carbonilo (C=O) o un grupo amida de ácido (NHCO),
 (b) R1, R2, R3, R4 y R5 (en el anillo 1) representan hidrógeno (H), un grupo carboxilo (COOH), un metilo (CH₃), un etilo (C₂H₅), un hidroxilo (OH), un hidroximetilo (CH₂OH), un amino (NH₂) y/o un halógeno, existiendo en este anillo al menos un grupo carboxilo (COOH),
 (c) R6, R7, R8, R9 y R10 (en el anillo 2) representan hidrógeno (H), un grupo carboxilo (COOH), un metilo (CH₃), un etilo (C₂H₅), un hidroxilo (OH), un hidroximetilo (CH₂OH), un amino (NH₂) y/o un halógeno, existiendo en este anillo al menos un grupo carboxilo (COOH) y
 (d) opcionalmente dos de los restos R1 a R10 (A) y (B), que están en posición orto entre sí, (A) es un grupo carboxilo (COOH) mencionado en (b) y/o (c) obligatorio o dado el caso adicional y (B) un grupo hidroximetilo, que están presentes como tales grupos u opcionalmente como agrupación -CH₂-O-CO- y, por tanto, representan junto con los átomos de C que los llevan del anillo una lactona de cinco miembros.

Por un agente de lavado se ha de entender, de acuerdo con la invención, todos los agentes que son adecuados para el lavado en particular de materiales textiles. Los ingredientes adecuados para esto se indican detalladamente más adelante.

Por una proteasa se ha de entender, de acuerdo con la invención, todas las enzimas que están en disposición de hidrolizar enlaces de amida de ácido de proteínas. También las proteasas se indican de forma detallada más adelante.

En el caso del compuesto representado en la fórmula estructural general se trata de un compuesto aromático con dos anillos de benceno que, de acuerdo con la característica (a), están enlazados a través de un grupo ceto o amida de ácido. Por tanto, se trata de un derivado de benzofenona o de anilida de ácido benzoico.

Este derivado de benzofenona de acuerdo con las características (b) y (c) en ambos anillos como restos R1, R2, R3, R4 y R5 (en el anillo 1) o R6, R7, R8, R9 y R10 (en el anillo 2) puede llevar hidrógeno (H), un grupo carboxilo (COOH), un metilo (CH₃), un etilo (C₂H₅), un hidroxilo (OH), un hidroximetilo (CH₂OH), un amino (NH₂) y/o un halógeno. La condición es que en cada uno de los dos anillos esté presente al menos un grupo carboxilo (COOH).

Lo mismo se aplica para un derivado de este tipo de anilida de ácido benzoico. En este caso, los anillos 1 y 2 se pueden diferenciar, siendo el anillo 1 aquel que se puede deber al ácido benzoico o su producto de sustitución y el anillo 2 aquel que se puede deber a la anilina o su producto de sustitución. También este derivado de anilida de ácido benzoico puede llevar como R1, R2, R3, R4 y R5 (en el anillo 1) o R6, R7, R8, R9 y R10 (en el anillo 2) hidrógeno (H), un grupo carboxilo (COOH), un metilo (CH₃), un etilo (C₂H₅), un hidroxilo (OH), un hidroximetilo

(CH₂OH), uno amino (NH₂) y/o un halógeno. A su vez, la condición es que en cada uno de los dos anillos esté presente al menos un grupo carboxilo (COOH).

Es relevante para la invención de acuerdo con la característica (d) también un derivado de benzofenona o de anilida de ácido benzoico de este tipo que, en uno de los dos anillos 1 o 2, como posibles sustituyentes presenta dos de los restos R1 a R10 (A) y (B) que tienen posición orto entre sí, (A) es un grupo carboxilo (COOH) mencionado en (b) y/o (c) obligatorio o dado el caso adicional y (B) un grupo hidroximetilo, que están presentes como tales grupos u opcionalmente como agrupación -CH₂-O-CO- y, por tanto, representan junto con los átomos de C que los llevan del anillo una lactona de cinco miembros.

Por tanto, es posible que dos de los sustituyentes (A) y (B) posibles de acuerdo con (b) y (c) sean un grupo carboxilo (COOH) o un grupo hidroximetilo, estén directamente adyacentes en un anillo, es decir, tengan posición orto entre sí y estén presentes uno al lado de otro en forma del grupo hidroxilo y del grupo carboximetilo. En este caso puede ocurrir que estos dos grupos configuren una lactona entre sí y en forma de lactona se unan a la proteasa a inhibir. También es posible que la unión tenga lugar sin la configuración previa de la forma de lactona. Para llevar a la práctica la presente invención también es posible predefinir ya durante la síntesis la forma de lactona y añadir la lactona ya formada como estabilizante al respectivo agente. La forma más adecuada se ha de establecer experimentalmente mediante la proteína a inhibir y el estabilizante considerado, lo que no plantea ninguna dificultad fundamental al experto.

Durante la enumeración de los grupos carboxilo de acuerdo con las características (b) y (c) y las formas de realización preferentes que hacen referencia a la cantidad de los grupos carboxilo contenidos por molécula, este grupo lactona-carboxilo también se cuenta como grupo carboxilo de acuerdo con la característica (b) o (c), pero también puede estar presente adicionalmente además de otro grupo carboxilo.

La presente invención comprende los compuestos mencionados en todas las formas protonadas y/o desprotonadas. En particular el grupo o los grupos carboxilo (COOH) y dado el caso el grupo o los grupos amino (NH₂) están presentes, dependiendo del valor de pH del medio circundante, como grupos carboxilato (COO⁻) o amonio (NH₃⁺). Dado el caso están presentes cationes (H⁺, Na⁺, K⁺ o similares) o aniones (Cl⁻, Br⁻, formiato, acetato, etc.) de carga opuesta. En todas estas formas se puede llevar a la práctica la presente invención. Es determinante, respectivamente, la interacción entre el compuesto relevante para la invención y la proteasa a inhibir/estabilizar de acuerdo con la invención.

Sin quedar ligado a esta teoría, de acuerdo con la invención se parte de que los compuestos relevantes para la invención configuran un complejo con la proteasa a inhibir/estabilizar de acuerdo con la invención. Este, probablemente, tiene tal aspecto que el compuesto relevante para la invención se introduce en el bolsillo de unión a sustrato de la proteasa y allí se une de forma no covalente. De este modo, el centro activo de la proteasa se bloquea por un compuesto no hidrolizable por esta enzima y no está disponible para una hidrólisis de otras proteínas presentes. En este caso se trata de una unión reversible, es decir, de un equilibrio entre asociación y disociación. El coeficiente de equilibrio de esta reacción se denomina constante de inhibición o K_i.

La primera ventaja de los compuestos relevantes para la invención frente al estado de la técnica radica, además de en su menor necesidad de volumen frente a los polioles, en que presentan constantes de inhibición adecuadas en relación con las proteasas que se pueden emplear en agentes de lavado. Esto se cumple, por ejemplo, para serina proteasas, pero también para metaloproteasas. De este modo, los inhibidores se unen de forma reversible, es decir, establecen interacciones temporales no demasiado fuertes y no demasiado débiles con la enzima. Por tanto, ventajosamente durante el almacenamiento la gran parte de la proteasa relevante para la invención está presente en forma de un complejo de proteasa-inhibidor. La proteasa y dado el caso otras proteínas contenidas, en particular otras enzimas, de este modo se protegen por esta enzima frente a una proteólisis (se estabilizan frente a proteólisis). Por otro lado, en el momento de la dilución del agente de acuerdo con la invención con agua para la preparación de un baño de lavado o limpieza acuoso durante el proceso de limpieza, el equilibrio de la unión se desplaza en dirección a disociación, de tal manera que se deshace el complejo y gran parte de la proteasa relevante para la invención se hace proteolíticamente activa. Por tanto, en el caso de los compuestos relevantes para la invención de acuerdo con el objetivo formulado se trata de inhibidores de proteasa que funcionan y, por tanto, estabilizantes de enzima para agentes de lavado.

La segunda ventaja de los compuestos relevantes para la invención frente al estado de la técnica consiste en que como elementos presentan únicamente C, H, N y O y, dado el caso, halógenos y/o azufre y en particular están exentos de boro. Por tanto, no forman los productos secundarios indeseados que se deben a boro con otros ingredientes del agente de lavado.

Además disponen, en particular a causa de los grupos carboxilo contenidos en cada anillo aromático, de una buena solubilidad en agua, de tal manera que se pueden incluir de forma sencilla en los correspondientes agentes y se evita una precipitación durante el almacenamiento.

Básicamente, los compuestos mencionados actúan como inhibidores reversibles probablemente debido a que son estructuralmente iguales al sustrato de las proteasas, en particular en relación con el enlace de amida de ácido a hidrolizar. A la inversa, por tanto, básicamente se pueden inhibir todas las proteasas por los compuestos relevantes para la invención, de tal manera que los mismos de acuerdo con la invención son adecuados como inhibidores de proteasa. Esto se cumple en particular para serina proteasas, como se ha mostrado mediante los ejemplos de la presente solicitud con el efecto positivo de los compuestos descritos experimentalmente allí mediante serina proteasas, en concreto subtilasas, más especialmente subtilisinas y, de hecho, mediante una variante de la subtilisina de *Bacillus lentus* DSM 5483.

10 Otros objetos de la presente invención se refieren a:

- el uso de un compuesto que se ha descrito anteriormente como inhibidor reversible y/o estabilizante de una proteasa en el marco de una formulación de agente de lavado;
- procedimientos de lavado en los que actúa una proteasa que se ha inhibido y/o estabilizado con un compuesto que se ha descrito anteriormente;
- el uso de un agente de lavado de acuerdo con la invención para el lavado y/o la limpieza de materiales textiles así como
- el uso de una proteasa y un compuesto que se ha descrito anteriormente para la preparación de un agente de lavado.

20 De forma particularmente preferente, en todos los aspectos de acuerdo con la invención el compuesto estabilizante se selecciona de uno de los siguientes estabilizantes:

	Fórmula estructural	Nombre
a)		ácido 2-(4-carboxibenzoil)-benzoico
b)		ácido 3,3'-carbonylbis-benzoico
c)		ácido 2-(3-carboxibenzoil)-benzoico
d)		ácido 4,4'-carbonylbis-benzoico
e)		ácido 2,2'-carbonylbis-benzoico
f)		ácido 3-(4-carboxibenzoil)-benzoico
g)		ácido 2-[[3-carboxifenil]amino]carbonyl-benzoico
h)		ácido 2-[[4-carboxifenil]amino]carbonyl-benzoico

	Fórmula estructural	Nombre
i)		ácido 2-[(2-carboxibenzoil)amino]-benzoico
j)		ácido 2-amino-2',4-carbonilbis-benzoico
k)		ácido 3-[[4-carboxifenil]amino]carbonil]-benzoico
l)		ácido 4-[[4-carboxibenzoil]amino]-benzoico
m)		ácido 4-(2-carboxibenzoil)-1,2-benzenodicarboxílico
n)		ácido 2-(2-carboxibenzoil)-1,4-benzenodicarboxílico
o)		ácido 2-(4-carboxibenzoil)-1,4-benzenodicarboxílico
p)		ácido 4-(3-carboxibenzoil)-1,2-benzenodicarboxílico
r)		ácido 2-[[1,3-dihidro-3-oxo-5-isobenzofuranil]amino]carbonil]-benzoico
s)		ácido 2-[[1,3-dihidro-1-oxo-5-isobenzofuranil]amino]carbonil]-benzoico

De acuerdo con la invención se prefieren los agentes de lavado en los que el compuesto estabilizante presenta, en relación con la proteasa contenida, una constante de inhibición (K_i) de 0,01 a 10 mM, preferentemente de 0,1 a 5, de forma particularmente preferente de 0,5 a 2.

5

La constante de inhibición K_i se puede establecer del siguiente modo:

Para la caracterización de un inhibidor reversible de la actividad enzimática, la constante de inhibición K_i es una variable característica y decisiva. K_i describe el equilibrio entre enzima, inhibidor y complejo de enzima-inhibidor para un enlace reversible. A este respecto, el complejo de enzima-inhibidor catalíticamente no es activo e inhibe

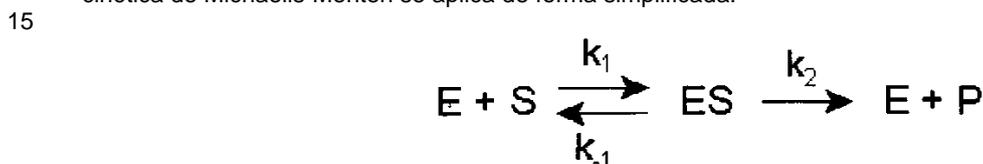
10

la reacción mediante reducción de la concentración de enzima libre que está todavía disponible para la unión de sustrato. La K_i por consiguiente está definida como:

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

5 En la misma, [E], [I] y [EI] se refieren a las respectivas concentraciones de equilibrio molares de enzima (E), inhibidor (I) y el complejo de enzima-inhibidor (EI). De forma correspondiente a esta definición, una sustancia con una pequeña K_i en las respectivas condiciones de ensayo es un buen inhibidor.

10 La determinación de la K_i se realiza basándose en el ensayo de actividad de la proteasa en presencia del correspondiente inhibidor. A través de la cinética, establecida en el estado de la técnica y conocida por el experto, de Michaelis-Menten (Leonor Michaelis, Maud Menten (1913). Die Kinetik der Invertinwirkung, Biochem. Z. 49: 333-369) se determinan los parámetros enzimáticos K_m y k_{cat} en presencia de distintas concentraciones del inhibidor. Para una cinética de Michaelis-Menten se aplica de forma simplificada:



En la misma significan:

20 E: enzima
S: sustrato
ES: complejo de enzima-sustrato
P: producto
 k_1, k_{-1}, k_2 : constantes de velocidad

25 Aquí, k_2 es una medida de la máxima velocidad de reacción con saturación de sustrato ($V_{m\acute{a}x}$), también denominada número de cambio, actividad molecular, "número de renovación" o k_{cat} ($k_{cat} = V_{m\acute{a}x}/[E_0]$, siendo $[E_0]$ la concentración de partida de la enzima). La constante de Michaelis (es decir, la concentración de sustrato que está presente con la semisaturación a la que, por tanto, la velocidad de reacción asciende a $v = V_{m\acute{a}x}/2$) se obtiene con $K_m = k_{-1} / k_1$ (caso de Michaelis-Menten, dado cuando $k_2 \ll k_1$) o respectivamente de forma más general con $K_m = k_{-1} + k_2 / k_1$ (situación de Briggs-Haldane dado para el caso en que k_2 no se pueda despreciar frente a k_1).

30 La función de saturación de una "enzima de Michaelis-Menten" se obtiene mediante el uso de los parámetros K_m y $V_{m\acute{a}x}$:

$$v = \frac{v_{m\acute{a}x} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

35 Aquí significa: v: velocidad de formación de P ($v =$ "velocidad") [mol l⁻¹ s⁻¹]

40 $v_{m\acute{a}x}$: máxima velocidad [mol l⁻¹ s⁻¹]
 K_m : constante de Michaelis-Menten [mol l⁻¹]
[S]: concentración de sustrato [mol l⁻¹]

45 Mediante la determinación de la velocidad de catálisis inicial (V_{ini}) –para proteasas de la velocidad de hidrólisis inicial– con distintas concentraciones de sustrato [S] y ajuste de los datos experimentales en la siguiente ecuación 1 se obtiene la constante de inhibición K_i .

$$\text{Ecuación 1: } v_{ini} = k_{cat} \times [S] \times E_0 / (K_m \times (1 + [I]/K_i) + S)$$

50 Aquí a su vez [i] se refiere a la concentración de inhibidor.

55 Como alternativa, K_i se puede determinar mediante el uso de la ecuación de Cheng-Prusoff (ecuación 2, Cheng Y., Prusoff W. H. (1973) Biochem. Pharmacol. 22, 3099-3108) a través del valor de CI_{50} . La determinación del valor del CI_{50} se realiza a través de la determinación de la actividad catalítica de un sustrato en presencia de distintas concentraciones del inhibidor y la adaptación de los datos experimentales a una ecuación de dosis-efecto sigmoidea con pendiente variable (pseudo-pendientes de Hill). A este respecto se trata de la concentración de inhibidor que es necesaria para conseguir una inhibición del 50 %.

K_i , por tanto, se obtiene a partir de la siguiente ecuación 2:

$$\text{Ecuación 2: } K_i = CI_{50}/(1 + [S]/K_d)$$

En la misma significan [S] la concentración de sustrato en el ensayo y K_d la constante de disociación para el sustrato que con la concentración de CI_{50} del inhibidor se puede poner como idéntica a K_m para el sustrato.

Los valores de K_i determinables de este modo caracterizan el compuesto en relación con la enzima empleada. En el Ejemplo 1 se determinó la actividad residual de una proteasa, en concreto la proteasa alcalina de *Bacillus lentus* F49 (de acuerdo con el documento WO 95/23221 A1) en presencia de un inhibidor. Ya que a este respecto se trata de una proteasa subtilisina típica, los valores obtenidos con esta enzima también son típicos para otras serina proteasas, en particular otras proteasas subtilisina. El valor exacto para una proteasa de interés en caso de duda se tiene que establecer mediante la proteasa respectivamente concreta.

En agentes de lavado de acuerdo con la invención que, en una realización preferente están presentes en forma principalmente sólida y en una segunda realización en forma sobre todo líquida, pastosa o de gel, la proteasa está contenida en particular con un contenido de 2 μg a 20 mg por g del agente, preferentemente de 5 μg a 17,5 mg por g del agente, de forma particularmente preferente de 20 μg a 15 mg por g del agente, de forma muy particularmente preferente de 50 μg a 10 μg del agente.

El estabilizante está contenido en los agentes de acuerdo con la invención en particular con un contenido de hasta 50 mg por g del agente, preferentemente hasta 10 mg, de forma particularmente preferente hasta 7 mg, de forma muy particularmente preferente hasta 5 mg por g del agente. Además se prefiere que el estabilizante esté contenido con un contenido de 0,01 a 100 x K_i (en la relación con la proteasa contenida), preferentemente de 0,1 a 10 x K_i , de forma particularmente preferente de 1 a 5 x K_i .

Preferentemente, la proporción molar de estabilizante a proteasa se encuentra en el intervalo de 1:1 a 1.000:1, en particular de 1:1 a 500:1, de forma particularmente preferente de 1:1 a 100:1, de forma muy particularmente preferente de 1:1 a 20:1.

Además del estabilizante de acuerdo con la fórmula general que se ha indicado anteriormente, un agente de acuerdo con la invención puede contener al menos otro estabilizante. En otra forma de realización de la invención, por tanto, el agente de lavado está caracterizado por que contiene al menos otro estabilizante. En un agente de este tipo, por tanto, están presentes al menos dos compuestos que causan una estabilización de una enzima contenida, preferentemente de una proteasa. Preferentemente, estos compuestos actúan de forma sinérgica, es decir, el efecto estabilizante conseguido a través de ambos compuestos supera la suma de ambos efectos estabilizantes individuales. En una forma de realización preferente, en el caso del/los estabilizantes se trata de uno o varios polioles, en particular de glicerol o 1,2-etilenglicol, de un antioxidante, de lactato o de uno o varios derivados de lactato o combinaciones de los mismos. Asimismo de forma preferente se trata de uno o varios de los compuestos estabilizantes o inhibidores de enzima que están desvelados en las solicitudes de patente internacionales WO 07/113241 A1 o WO 02/008398.

En el caso de la proteasa estabilizada o inhibida de forma reversible de acuerdo con la invención se trata preferentemente de una serina proteasa, en particular de una subtilasa, de forma particularmente preferente de una subtilisina.

Son ejemplos de tales proteasas las subtilisinas BPN' y Carlsberg, la proteasa PB92, las subtilisinas 147 y 309, la proteasa alcalina de *Bacillus lentus*, la subtilisina DY y las enzimas a asignar a las subtilasas, pero ya no a las subtilisinas en el sentido más riguroso termitasa, proteinasa K y las proteasas TW3 y TW7. La subtilisina Carlsberg está disponible en forma perfeccionada con el nombre comercial Alcalase® de la empresa Novozymes A/S, Bagsværd, Dinamarca. Las subtilisinas 147 y 309 se comercializan con el nombre comercial Esperase® o Savinase® por la empresa Novozymes. De la proteasa de *Bacillus lentus* DSM 5483 se derivan las variantes de proteasa comercializadas con la denominación BLAP®.

Otras proteasas son, por ejemplo, las enzimas disponibles con los nombres comerciales Durazym®, Relase®, Everlase®, Nafizym, Natalase®, Kannase® y Ovozymes® de la empresa Novozymes, con el nombre comercial Purafect®, Purafect® OxP y Properase® de la empresa Genencor, con el nombre comercial Protosol® de la empresa Advanced Biochemicals Ltd., Thane, India, con el nombre comercial Wuxi® de la empresa Wuxi Snyder Bioproducts Ltd., China, con el nombre comercial Proleather® y Protease P® de la empresa Amano Pharmaceuticals Ltd., Nagoya, Japón y con la denominación proteinasa K-16 de la empresa Kao Corp., Tokio, Japón.

Sorprendentemente, se comprobó que tales proteasas se estabilizan o inhiben de forma reversible de forma particularmente buena por los compuestos explicados. Además también determinadas variantes de proteasas, es

decir, también variantes de las proteasas mencionadas, se estabilizan de forma particularmente ventajosa por estos compuestos. Tales variantes de proteasa son parte de los objetos de la invención descritos a continuación.

Una proteasa estabilizada o inhibida reversiblemente de acuerdo con la invención puede ser una enzima de tipo natural o una variante de proteasa. Por enzima de tipo natural se ha de entender que la enzima está presente en un organismo de origen natural o en un hábitat natural y se puede aislar del mismo. Sin embargo, las enzimas son modificables y en parte se modifican de forma dirigida, en particular para adaptar sus propiedades a los fines previstos de uso o para influir en su actividad catalítica. Estas modificaciones se realizan frecuentemente mediante cambio de la secuencia de aminoácidos de la enzima. A este respecto, tales cambios se pueden realizar de forma dirigida y, por tanto, con especificidad de lugar o aleatoriamente, por ejemplo mediante procedimientos de mutagénesis aleatoria. Por una variante de enzima se entiende enzimas que se han creado a partir de una enzima de partida, por ejemplo, una enzima de tipo natural, mediante modificación de la secuencia de aminoácidos. La modificación de la secuencia de aminoácidos se realiza, preferentemente, mediante mutaciones, pudiéndose haber efectuado sustituciones, deleciones, inserciones de aminoácidos o combinaciones de las mismas. La introducción de tales mutaciones en proteínas es estado de la técnica y es suficientemente conocida por el experto en el campo de la tecnología de enzimas. Básicamente pueden haberse modificado de este modo todas las enzimas. Se prefieren de acuerdo con la invención variantes de proteasa. Estas se han creado a partir de una proteasa de partida, por ejemplo, una proteasa de tipo natural, mediante modificación de la secuencia de aminoácidos, habiéndose efectuado preferentemente sustituciones, deleciones, inserciones de aminoácidos o combinaciones de las mismas. Sin embargo, la proteasa de partida no tiene que ser obligatoriamente una proteasa de tipo natural de origen natural, también una proteasa conocida por el estado de la técnica, en la que ya se han efectuado modificaciones, se puede perfeccionar y servir, por tanto, de nuevo como proteasa de partida para la generación de otras variantes de proteasa. De este modo, por ejemplo, todas las proteasas que se han descrito anteriormente se pueden emplear sin modificaciones en agentes de acuerdo con la invención y estar estabilizadas por los compuestos descritos. Sin embargo, pueden representar también la enzima de partida para una variante que, entonces, está contenida en un agente de acuerdo con la invención y está estabilizada mediante los compuestos descritos.

Entre todas las proteasas o variantes descritas se prefiere adicionalmente la enzima de tipo natural o la enzima de partida de la variante:

- la proteasa alcalina de *Bacillus amyloliquefaciens* (BPN'),
- la proteasa alcalina de *Bacillus licheniformis* (subtilisina Carlsberg),
- la proteasa alcalina PB92,
- subtilisina 147 y/o subtilisina 309 (Savinase)
- la proteasa alcalina de *Bacillus lentus*, preferentemente de *Bacillus lentus* DSM 5483,
- la proteasa alcalina de *Bacillus alcalophilus* (DSM 11233),
- la proteasa alcalina de *Bacillus gibsonii* (DSM 14391) o una proteasa alcalina con una identidad de al menos el 70 % con la misma,
- la proteasa alcalina de *Bacillus sp.* (DSM 14390) o una proteasa alcalina con una identidad de al menos el 98,5 % con la misma,
- la proteasa alcalina de *Bacillus sp.* (DSM 14392) o una proteasa alcalina con una identidad de al menos el 98,1 % con la misma,
- la proteasa alcalina de *Bacillus gibsonii* (DSM 14393) o una proteasa alcalina con una identidad de al menos el 70 % con la misma.

En otra forma de realización de la invención, por tanto, el agente de lavado está caracterizado por que la proteasa se ha obtenido a partir de una proteasa de partida mediante al menos una modificación de un aminoácido, siendo la modificación una sustitución, inserción o deleción de un aminoácido y tiene una identidad con la proteasa de partida en el plano de los aminoácidos de al menos el 90 %, preferentemente al menos el 92,5 %, de forma particularmente preferente al menos el 95 % y de forma muy particularmente preferente al menos el 97,5 %.

Los procedimientos para llevar a cabo y crear comparaciones de secuencias, los denominados alineamientos, son conocidos por el experto en el campo de la tecnología de enzimas. Mediante tales comparaciones de secuencias se establecen, para secuencias a comparar, por ejemplo, los valores de identidad u homología. Una comparación de este tipo ocurre asignándose sucesiones similares en las secuencias de nucleótidos o aminoácidos de las proteínas consideradas unas a otras. Esto se denomina homologación. Una asignación tabulada de las respectivas posiciones se denomina alineamiento. A su vez, en el análisis de secuencias de nucleótidos se han de tener en cuenta ambas cadenas complementarias y respectivamente las tres posibles fases de lectura; asimismo la degeneración del código genético y el uso específico de organismo de los codones (uso de codones). Entretanto se crean alineamientos a través de programas informáticos, tales como, por ejemplo, por los algoritmos FASTA o BLAST; esta forma de proceder se describe, por ejemplo, por D. J. Lipman y W. R. Pearson (1985) en Science, volumen 227, pág. 1435-1441.

Una compilación de todas las posiciones coincidentes en las secuencias comparadas se denomina secuencia consenso.

Una comparación de este tipo permite también una afirmación acerca de la similitud u homología de las secuencias comparadas entre sí. Esta se reproduce en porcentaje de identidad, es decir, la parte de los nucleótidos o restos de aminoácidos idénticos en las mismas o en un alineamiento de posiciones correspondientes entre sí. Un término de homología más amplio incluye las sustituciones de aminoácidos conservativas en este valor. Se habla entonces de porcentaje de similitud. Tales afirmaciones se pueden hacer acerca de proteínas o genes completos o solo acerca de zonas individuales.

Las zonas homólogas de distintas proteínas están definidas por coincidencias en la secuencia de aminoácidos. Estas pueden estar caracterizadas también por función idéntica. Van hasta identidades completas en las zonas más pequeñas, las denominadas cajas, que comprenden solo pocos aminoácidos y que la mayoría de las veces ejercen funciones esenciales para la actividad global. Por las funciones de las zonas homólogas se ha de entender las subfunciones más pequeñas de la función ejercida por toda la proteína, tales como, por ejemplo, la configuración de enlaces individuales de puente de hidrógeno para el complejo con un sustrato o complejo de transición.

En particular, tales comparaciones de secuencias o alineamientos sirven también para el establecimiento de posiciones correspondientes entre sí en diferentes moléculas. De este modo, por ejemplo, en un alineamiento de diferentes enzimas se puede comprobar qué posiciones en la respectiva secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico se corresponden entre sí, incluso cuando las respectivas secuencias, por ejemplo, presentan diferentes longitudes totales o diferentes dominios o subsecuencias o cuando dentro de una secuencia están presentes aminoácidos o nucleótidos adicionales. Por tanto, a una determinada posición en una primera secuencia se puede asignar una posición correspondiente en una segunda secuencia de forma concreta, siendo desde luego posible que las posiciones correspondientes entre sí se encuentren en puntos diferentes en la molécula. Además, en las correspondientes posiciones pueden estar presentes diferentes restos de aminoácidos. Por tanto, para tales comparaciones de secuencias o para la determinación de una posición de forma concreta se indica de qué posición se trata y de qué enzima se parte, es decir, en qué forma de recuento se tiene que basar la determinación de la posición.

Para los siguientes objetos de la invención, para la determinación de la posición se usa la secuencia de aminoácidos de la proteína madura (mature) de la proteasa alcalina de *Bacillus lentus* DSM 5483, que está desvelada en la solicitud publicada de patente internacional WO 91/02792 A1 y que presenta una longitud de 269 restos de aminoácidos (en la presente solicitud denominada proteasa alcalina de *Bacillus lentus*).

En otra forma de realización de la invención, el agente de lavado está caracterizado por que la proteasa se ha obtenido de una proteasa de partida mediante al menos una modificación de un aminoácido, siendo la modificación una sustitución o inserción de un aminoácido en la zona de la secuencia de aminoácidos que está asignada a las posiciones 95 a 103 de la proteasa alcalina de *Bacillus lentus* en un alineamiento.

De forma particularmente preferente, en el caso de una variante de proteasa de este tipo se trata de una variante con una inserción de un aminoácido individual detrás de una o varias de las posiciones 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102 y/o 103 y, de forma particularmente preferente, entre las posiciones 97 y 98 y/o las posiciones 99 y 100.

En otra forma de realización de la invención, el agente de lavado está caracterizado por que la proteasa se ha obtenido a partir de una proteasa de partida mediante al menos una modificación de un aminoácido, que está asignado a las posiciones 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 y 268 de la proteasa alcalina de *Bacillus lentus* en un alineamiento, siendo la modificación una sustitución, inserción o delección de un aminoácido.

De forma particularmente preferente se realiza un cambio de aminoácidos frente a la molécula de partida en una o varias de las siguientes posiciones: 3, 4, 43, 61, 188, 193, 199, 211, 224, 250 y 253 (enumeración de acuerdo con la proteasa alcalina de *Bacillus lentus*), de forma particularmente preferente con una o varias de las sustituciones de aminoácidos X3T, X4I, X43V, X61A, X188P, X193M, X199I, X211L, X211D, X211E, X211G, X211N o X211Q, X224V, X250G y/o X253N. En particular, en el caso de la proteasa se trata de una variante con una mutación puntual en la posición 211, preferentemente con una sustitución de un único aminoácido en esta posición, de forma particularmente preferente con la sustitución de aminoácido X211 L. Las anteriores indicaciones de la posición a su vez se refieren a los restos de aminoácidos que están asignados a las posiciones mencionadas de la proteasa alcalina de *Bacillus lentus* en un alineamiento.

Los agentes de acuerdo con la invención pueden contener, además de la proteasa, una o varias enzimas adicionales, en particular del siguiente grupo: una o varias de otras proteasas, amilasas, hemicelulasas, celulasas, lipasas y oxidorreductasas. En el caso de la amilasa se trata, preferentemente, de una α -amilasa. En el caso de la hemicelulasa se trata, preferentemente, de una β -glucanasa, una pectinasa, una pululanasa y/o una mananasa. En el caso de la celulasa se trata, preferentemente, de una mezcla de celulasas o de una celulasa de un componente, preferentemente o sobre todo de una endoglucanasa y/o una celobiohidrolasa. En el caso de la oxidorreductasa se trata, preferentemente, de una oxidasa, en particular de una colina oxidasa o de una perhidrolasa.

Los agentes de acuerdo con la invención contienen, preferentemente, al menos un complejante y/o sustancias soporte, tratándose en el caso del soporte en particular de un soporte de zeolita y/o un tensioactivo no iónico, tratándose en el caso del tensioactivo no iónico, preferentemente, de un hidroxíeter mixto y/o agentes de aclaramiento óptico, tratándose en el caso del agente de aclaramiento óptico de compuestos de difenilo, en particular de derivados de diestiril-bifenilo y/o de derivados de estilbentriazina.

Ejemplos

Ejemplo 1

Examen de la actividad residual de proteasa en presencia de un inhibidor

Para la comprobación de que los compuestos indicados más adelante ejercen un efecto inhibidor de la actividad proteasa se estableció la actividad residual proteolítica de la proteasa alcalina de *Bacillus lentus* F49 (de acuerdo con el documento WO 95/23221 A1) en presencia de estos compuestos.

En preparaciones de reacción paralelas se dispusieron en tampón Tris 100 mM, pH 6,8, 0,1 % (p/v) de BrijTM35 el sustrato succinil alanina-alanina-prolina-fenilalanina-para-nitroanilida (AAPFPNA; Bachem L-1400) y 5×10^{-9} o 1×10^{-8} M de la proteasa. A esto se añadieron los compuestos a ensayar indicados en la Tabla 1 en una concentración final de 10 mM. Estaban disueltos, respectivamente, en DMSO sin agua, corrigiéndose los efectos de DMSO sobre la actividad enzimática a través de la correspondiente referencia con la misma cantidad de DMSO, pero sin el respectivo compuesto. La incubación se realizó durante 5 min a pH 8,6 y 25 °C. A este respecto, 1 U se corresponde con 1 μ mol de sustrato escindido por minuto.

De este modo se examinaron los siguientes compuestos:

- V1: ácido 2-[[3-carboxifenil]amino]carbonil]-benzoico
- V2: ácido 2-[(2-carboxibenzoil)amino]-benzoico
- V3: ácido 2-[[4-carboxifenil]amino]carbonil]-benzoico
- V4: ácido 2-(4-carboxibenzoil)-benzoico
- V5: ácido 4-(2-carboxibenzoil)-1,2-bencenodicarboxílico

Todos condujeron a una actividad residual de la proteasa del 50 % o menos. Entre los mismos, V1 es el más fuerte y, por tanto, más adecuado inhibidor de proteasa o estabilizante, seguido por V2, V3, V4 (prácticamente igual de bueno que V3) y V5.

A causa de estos resultados, estos compuestos también son adecuados para estabilizar las actividades enzimáticas en agentes de lavado y limpieza que contienen proteasa durante el almacenamiento.

Ejemplo 2

Examen de la estabilidad en almacenamiento de agentes de lavado y limpieza que contienen proteasa en presencia de inhibidores de proteasa

Como formulación de base se preparó un agente de lavado líquido con la siguiente composición (todas las indicaciones en porcentaje en peso): 0,3-0,5 % de goma xantana, 0,2-0,4 % de antiespumante, 6-7 % de glicerol, 0,3-0,5 % de etanol, 4-7 % de FAEOS, 24-28 % de tensioactivos no iónicos, 1 % de ácido bórico, 1-2 % de citrato sódico (dihidrato), 2-4 % de carbonato de sodio, 14-16 % de ácidos grasos de nuez de coco, 0,5 % de HEDP, 0-0,4 % de PVP, 0-0,05 % de agente de aclaramiento óptico, 0-0,001 % de colorante, resto: agua desmineralizada.

Esta formulación se mezcló con los compuestos inhibidores a ensayar y 1.275.000 UPH/I de proteasa alcalina de *B. lentus* F 49. La actividad de proteasa indicada en UPH (unidades de proteasa de Henkel) se determinó según van Raay, Saran y Verbeek de acuerdo con la publicación "Zur Bestimmung der proteolytischen Aktivität in Enzymkonzentraten und enzymhaltigen Wasch-, Spül- und Reinigungsmitteln" en Tenside (1970), volumen 7, pág. 125-132.

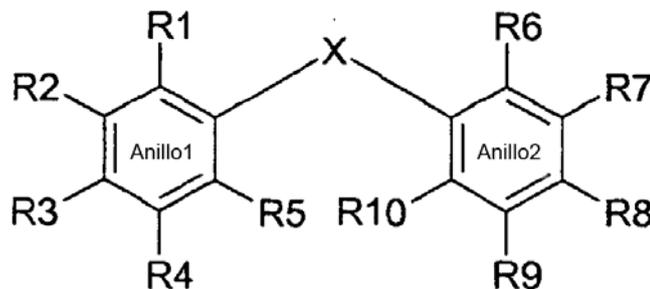
El almacenamiento se realizó a lo largo de periodos de tiempo de diferente longitud en recipientes cerrados de forma hermética al aire a 30 °C.

Para la evaluación, los valores iniciales para la actividad proteolítica del respectivo agente se compararon con los valores determinados después del almacenamiento. Cuanto mayor era la actividad remanente después del almacenamiento, mejor inactivada estaba la proteasa contenida durante el almacenamiento y más adecuado era el respectivo compuesto como estabilizante de acuerdo con la invención.

Todos los compuestos examinados mostraron un efecto inequívocamente estabilizante.

REIVINDICACIONES

1. Agente de lavado que contiene una proteasa y un compuesto de la fórmula estructural general:



5 en la que

- (a) X representa un grupo carbonilo (C=O) o un grupo amida de ácido (NHCO),
 (b) R1, R2, R3, R4 y R5 (en el anillo 1) representan hidrógeno (H), un grupo carboxilo (COOH), uno metilo (CH₃), uno etilo (C₂H₅), uno hidroxilo (OH), uno hidroximetilo (CH₂OH), uno amino (NH₂) y/o un halógeno, existiendo en este anillo al menos un grupo carboxilo (COOH),
 (c) R6, R7, R8, R9 y R10 (en el anillo 2) representan hidrógeno (H), un grupo carboxilo (COOH), uno metilo (CH₃), uno etilo (C₂H₅), uno hidroxilo (OH), uno hidroximetilo (CH₂OH), uno amino (NH₂) y/o un halógeno, existiendo en este anillo al menos un grupo carboxilo (COOH) y
 (d) opcionalmente dos de los restos R1 a R10 (A) y (B), que están en posición orto entre sí, (A) es un grupo carboxilo (COOH) mencionado en (b) y/o (c) obligatorio o dado el caso adicional y (B) un grupo hidroximetilo, que están presentes como tales grupos u opcionalmente como agrupación -CH₂-O-CO- y, por tanto, representan junto con los átomos de C que los llevan del anillo una lactona de cinco miembros.

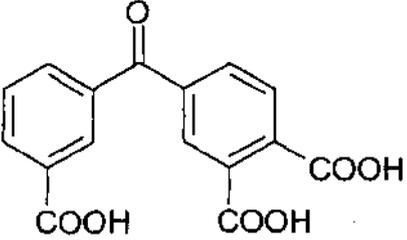
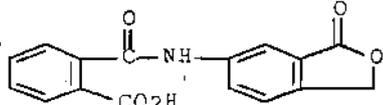
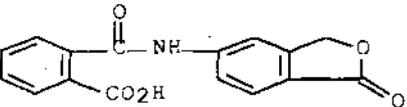
20 2. Agente de lavado de acuerdo con la reivindicación 1, llevando el compuesto estabilizante en cada uno de los dos anillos aromáticos de 1 a 3, preferentemente 1 o 2, de forma muy particularmente preferente en ambos anillos conjuntamente 2 o 3 grupos carboxilo, contándose un grupo carboxilo incluido de acuerdo con (d) en una lactona.

25 3. Agente de lavado de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, presentando el compuesto estabilizante en relación con la proteasa contenida una constante de inhibición (K_i) de 0,01 a 10 mM, preferentemente de 0,1 a 5, de forma particularmente preferente de 0,5 a 2.

30 4. Agente de lavado de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, estando seleccionado el compuesto estabilizante de uno de los siguientes estabilizantes:

	Fórmula estructural	Nombre
a)		ácido 2-(4-carboxibenzoil)-benzoico
b)		ácido 3,3'-carbonilbis-benzoico
c)		ácido 2-(3-carboxibenzoil)-benzoico
d)		ácido 4,4'-carbonilbis-benzoico

	Fórmula estructural	Nombre
e)		ácido 2,2'-carbonilbis-benzoico
f)		ácido 3-(4-carboxibenzoil)-benzoico
g)		ácido 2-[(3-carboxifenil)amino]carbonil-benzoico
h)		ácido 2-[(4-carboxifenil)amino]carbonil-benzoico
i)		ácido 2-[(2-carboxibenzoil)amino]-benzoico
j)		ácido 2-amino-2',4-carbonilbis-benzoico
k)		ácido 3-[(4-carboxifenil)amino]carbonil-benzoico
l)		ácido 4-[(4-carboxibenzoil)amino]-benzoico
m)		ácido 4-(2-carboxibenzoil)-1,2-benzenodicarboxílico
n)		ácido 2-(2-carboxibenzoil)-1,4-benzenodicarboxílico
o)		ácido 2-(4-carboxibenzoil)-1,4-benzenodicarboxílico

	Fórmula estructural	Nombre
p)		ácido 4-(3-carboxibenzoil)-1,2-benzenodicarboxílico
r)		ácido 2-[[[(1,3-dihidro-3-oxo-5-isobenzofuranil)amino]carbonil]-benzoico
s)		ácido 2-[[[(1,3-dihidro-1-oxo-5-isobenzofuranil)amino]carbonil]-benzoico

5. Agente de lavado de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4 en forma sobre todo sólida.

6. Agente de lavado de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4 en forma sobre todo líquida, pastosa o de gel.

7. Agente de lavado de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6, estando contenida la proteasa con un contenido de 2 μg a 20 mg por g del agente, preferentemente de 5 μg a 17,5 mg por g del agente, de forma particularmente preferente de 20 μg a 15 mg por g del agente, de forma muy particularmente preferente de 50 μg a 10 μg del agente.

8. Agente de lavado de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 7, estando contenido el estabilizante con un contenido de hasta 50 mg por g del agente, preferentemente hasta 10 mg, de forma particularmente preferente hasta 7 mg, de forma muy particularmente preferente hasta 5 mg por g del agente.

9. Agente de lavado de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 8, encontrándose la proporción molar de estabilizante a proteasa en el intervalo de 1:1 a 1.000:1, en particular de 1:1 a 500:1, de forma particularmente preferente de 1:1 a 100:1, de forma muy particularmente preferente de 1:1 a 20:1.

10. Agente de lavado de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 9, estando contenido el estabilizante con un contenido de 0,01 a 100 x K_i (en relación con la proteasa contenida), preferentemente de 0,1 a 10 x K_i , de forma particularmente preferente de 1 a 5 x K_i .

11. Agente de lavado de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 10, tratándose en el caso de la proteasa de una serina proteasa, preferentemente de una subtilasa, de forma particularmente preferente de una subtilisina.

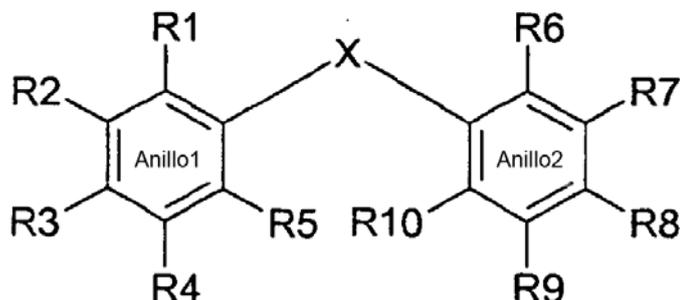
12. Agente de lavado de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado por que

(a) la proteasa se ha obtenido de una proteasa de partida mediante al menos una modificación de un aminoácido, siendo la modificación una sustitución, inserción o delección de un aminoácido y teniendo una identidad con la proteasa de partida en el plano de los aminoácidos de al menos el 90 %, preferentemente al menos el 92,5 %, de forma particularmente preferente al menos el 95 % y de forma muy particularmente preferente al menos el 97,5 % y/o

(b) la proteasa se ha obtenido de una proteasa de partida mediante al menos una modificación de un aminoácido, siendo la modificación una sustitución o una inserción de un aminoácido en la zona de la secuencia de aminoácidos que está asignada a las posiciones 95 a 103 de la proteasa alcalina de *Bacillus lentus* en un alineamiento y/o

(c) la proteasa se ha obtenido de una proteasa de partida mediante al menos una modificación de un aminoácido que está asignado a las posiciones 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 y 268 de la proteasa alcalina de *Bacillus lentus* en un alineamiento, siendo la modificación una sustitución, inserción o delección de un aminoácido.

13. Uso de un compuesto con la fórmula estructural general:



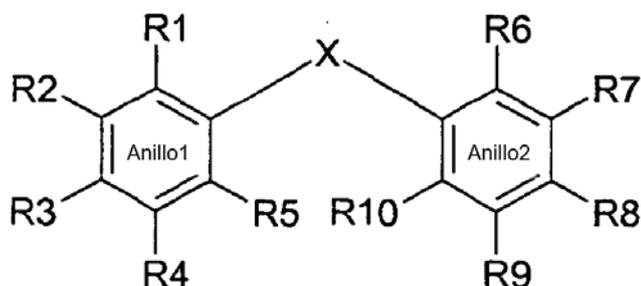
en la que

- 5
- (a) X representa un grupo carbonilo (C=O) o un grupo amida de ácido (NHCO),
 (b) R1, R2, R3, R4 y R5 (en el anillo 1) representan hidrógeno (H), un grupo carboxilo (COOH), uno metilo (CH₃), uno etilo (C₂H₅), uno hidroxilo (OH), uno hidroximetilo (CH₂OH), uno amino (NH₂) y/o un halógeno, existiendo en este anillo al menos un grupo carboxilo (COOH),
 10 (c) R6, R7, R8, R9 y R10 (en el anillo 2) representan hidrógeno (H), un grupo carboxilo (COOH), uno metilo (CH₃), uno etilo (C₂H₅), uno hidroxilo (OH), uno hidroximetilo (CH₂OH), uno amino (NH₂) y/o un halógeno, existiendo en este anillo al menos un grupo carboxilo (COOH) y
 (d) opcionalmente dos de los restos R1 a R10 (A) y (B), que están en posición orto entre sí, (A) es un grupo carboxilo (COOH) mencionado en (b) y/o (c) obligatorio o dado el caso adicional y (B) un grupo hidroximetilo, que
 15 están presentes como tales grupos u opcionalmente como agrupación -CH₂-O-CO- y, por tanto, representan junto con los átomos de C que los llevan del anillo una lactona de cinco miembros,

como inhibidor reversible de una proteasa en el marco de una formulación de agente de lavado.

20 14. Uso de un agente de lavado de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 12 para el lavado y/o la limpieza de materiales textiles.

15. Uso de una proteasa y un compuesto con la fórmula estructural general:



25 en la que

- (a) X representa un grupo carbonilo (C=O) o un grupo amida de ácido (NHCO),
 (b) R1, R2, R3, R4 y R5 (en el anillo 1) representan hidrógeno (H), un grupo carboxilo (COOH), uno metilo (CH₃), uno etilo (C₂H₅), uno hidroxilo (OH), uno hidroximetilo (CH₂OH), uno amino (NH₂) y/o un halógeno, existiendo en este anillo al menos un grupo carboxilo (COOH),
 30 (c) R6, R7, R8, R9 y R10 (en el anillo 2) representan hidrógeno (H), un grupo carboxilo (COOH), uno metilo (CH₃), uno etilo (C₂H₅), uno hidroxilo (OH), uno hidroximetilo (CH₂OH), uno amino (NH₂) y/o un halógeno, existiendo en este anillo al menos un grupo carboxilo (COOH) y
 (d) opcionalmente dos de los restos R1 a R10 (A) y (B), que están en posición orto entre sí, (A) es un grupo carboxilo (COOH) mencionado en (b) y/o (c) obligatorio o dado el caso adicional y (B) un grupo hidroximetilo, que
 35 están presentes como tales grupos u opcionalmente como agrupación -CH₂-O-CO- y, por tanto, representan junto con los átomos de C que los llevan del anillo una lactona de cinco miembros,

40 para la preparación de un agente de lavado.