

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2023-518714
(P2023-518714A)

(43)公表日 令和5年5月8日(2023.5.8)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	9/10 (2006.01)	C 1 2 N	9/10	Z N A	4 B 0 5 0
C 1 2 N	15/73 (2006.01)	C 1 2 N	15/73	Z	4 B 0 6 5
C 1 2 N	7/01 (2006.01)	C 1 2 N	7/01		4 C 0 8 3
A 6 1 K	8/66 (2006.01)	A 6 1 K	8/66		4 H 0 1 1
A 0 1 P	1/00 (2006.01)	A 0 1 P	1/00		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全41頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2022-554747(P2022-554747)			(71)出願人	521387785
(86)(22)出願日	令和3年3月10日(2021.3.10)				キュリー カンパニー インコーポレイテッド
(85)翻訳文提出日	令和4年11月7日(2022.11.7)				アメリカ合衆国 2 7 7 0 9 ノースカロライナ州, ダーラム, デイビス ドライブ 6
(86)国際出願番号	PCT/US2021/021766			(74)代理人	100092783
(87)国際公開番号	WO2021/183680				弁理士 小林 浩
(87)国際公開日	令和3年9月16日(2021.9.16)			(74)代理人	100120134
(31)優先権主張番号	62/988,918				弁理士 大森 規雄
(32)優先日	令和2年3月13日(2020.3.13)			(72)発明者	シンデル, ウィル
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)				アメリカ合衆国 2 7 7 0 9 ノースカロライナ州, ダーラム, デイビス ドライブ 6, キュリー カンパニー インコーポレイテッド
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,最終頁に続く				最終頁に続く

(54)【発明の名称】 トランスグルタミナーゼ変種

(57)【要約】

トランスグルタミナーゼ変種が開示される。防腐剤、殺生物剤としての使用を含めた、変種に対する使用の適用、およびタンパク質の改変のための使用の適用が開示される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

任意選択で N 末端メチオニン残基をさらに含む、表 3 に描写される配列から選択されるアミノ酸配列を含むまたはそれからなる、トランスグルタミナーゼ酵素。

【請求項 2】

プロ配列をさらに含む、請求項 1 に記載のトランスグルタミナーゼ酵素。

【請求項 3】

任意選択で N 末端メチオニン残基をさらに含む、A 1 0 C または Q、D 1 4 H、L、M、N、W、または Y、R 1 5 A、E、または T、D 1 8 E または T、G 4 7 H、R 4 8 M、K 4 9 E または T、Q 7 4 C、N 1 3 4 S または T、A 1 3 6 C または S、L 1 3 7 K、V、E、または M、E 1 6 4 F、P 1 6 9 E、F 1 7 0 I、L、または V、S 1 9 9 A または G、および S 2 9 9 A、E、K、または V から選択される、ストレプトマイセス・モバラエンシス (*Streptomyces mobaraensis*) の成熟トランスグルタミナーゼ酵素の変種である、トランスグルタミナーゼ酵素。

10

【請求項 4】

プロ配列をさらに含む、請求項 3 に記載のトランスグルタミナーゼ酵素。

【請求項 5】

任意選択で N 末端メチオニン残基をさらに含む、表 3 に描写されるアミノ酸配列のいずれかの円順列変異体を含む、トランスグルタミナーゼ酵素。

【請求項 6】

プロ配列をさらに含む、請求項 5 に記載のトランスグルタミナーゼ酵素。

20

【請求項 7】

組成物を含まない同一の製品と比較して、1 種または複数の微生物の成長を阻止するまたは減少させるのに有効な量で、請求項 1 から 6 のいずれかに記載のトランスグルタミナーゼ変種を製品に組み入れるステップを含む、製品の貯蔵寿命を増加させるための方法。

【請求項 8】

酵素を含まない同一の製品と比較して、製品の貯蔵寿命を増加させる有効量で請求項 1 から 6 のいずれかに記載のトランスグルタミナーゼ酵素を含む、製品。

【請求項 9】

パーソナルケア製品、家庭用製品、産業用製品、食料品、医薬製品、美容製品、ヘルスケア製品、海産物、塗料製品、コーティング製品、エネルギー製品、プラスチック製品、パッケージング製品、または農産物である、請求項 8 に記載の製品。

30

【請求項 10】

棒状せっけん、液体せっけん、手の除菌剤、術前の皮膚消毒剤、洗浄用ワイプ、消毒用ワイプ、ボディウォッシュ、ざ瘡治療製品、抗真菌性おむつかぶれクリーム、抗真菌性皮膚クリーム、シャンプー、コンディショナー、化粧品、防臭剤、抗微生物性クリーム、ボディローション、ハンドクリーム、局所クリーム、アフターシェーブローション、皮膚化粧水、洗口剤、歯磨き粉、および日焼け止めローションから選択される、請求項 9 に記載の製品。

【請求項 11】

創傷治癒軟膏、クリーム、およびローション、創傷被覆剤、熱傷クリーム、包帯、テープ、ならびにステリストリップから選択される創傷ケア製品である、請求項 9 に記載の製品。

40

【請求項 12】

(i) 請求項 1 から 6 のいずれかに記載のトランスグルタミナーゼ酵素；および (ii) 日焼け止め分子、顔料、または色素分子を含む、前記トランスグルタミナーゼ酵素に対する基質、を含む、酵素組成物。

【請求項 13】

前記日焼け止め分子、顔料、または色素分子は、遊離アミノ基を含む分子にコンジュゲートされている、請求項 12 に記載の酵素組成物。

50

【請求項 14】

遊離アミノ基を含む前記分子は、リジン、カダベリン、プトレシン、ヒドラジン、アジピン酸ジヒドラジド、セバシン酸ジヒドラジド、およびヘキサメチレンジアミンから選択される、請求項 13 に記載の酵素組成物。

【請求項 15】

前記日焼け止め分子、顔料、または色素分子は、遊離グルタミン側鎖を有するアミノ酸、ペプチド、またはタンパク質にコンジュゲートされている、請求項 12 に記載の酵素組成物。

【請求項 16】

請求項 12 に記載の酵素組成物を含む、美容組成物。

10

【請求項 17】

関心対象の材料またはタンパク質と、請求項 1 から 6 のいずれかに記載のトランスグルタミナーゼ酵素、および顔料または色素分子とを接触させるステップであって、前記トランスグルタミナーゼ酵素は、前記関心対象の材料またはタンパク質に前記顔料または色素分子を共有結合させるのに有効な量で存在する、ステップを含む、関心対象の材料またはタンパク質に着色するための方法。

【請求項 18】

前記関心対象のタンパク質は、皮膚に存在するタンパク質である、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記皮膚に存在するタンパク質は、コラーゲン、ケラチン、および／またはエラスチンを含む、請求項 17 に記載の方法。

20

【請求項 20】

製品と接触した場合に、関心対象のタンパク質、またはタンパク質、ペプチド、もしくはアミノ酸含有材料に色分子を付加する有効量で請求項 1 から 6 のいずれかに記載のトランスグルタミナーゼ酵素を含む、製品。

【請求項 21】

パーソナルケア製品、美容製品、革製品、食料品、または農産物である、請求項 20 に記載の製品。

【請求項 22】

関心対象のタンパク質または材料と請求項 21 に記載の製品とを接触させるステップを含む、関心対象のタンパク質または材料の色を改変する方法。

30

【請求項 23】

1 種または複数の抗微生物酵素、ペプチド、またはタンパク質との組み合わせで、請求項 1 から 6 のいずれかに記載のトランスグルタミナーゼ酵素を含む組成物であって、防腐、殺生物、抗微生物、または殺ウイルス活性を含む、組成物。

【請求項 24】

前記抗微生物酵素、ペプチド、またはタンパク質は、リゾチーム、キチナーゼ、リパーゼ、リジン、リゾスタフィン、グルカナーゼ、DNase、RNase、ラクトフェリン、グルコースオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ、ラクトペルオキシダーゼ、ラクトナーゼ、アシラーゼ、ディスパーシンB、 α -アミラーゼ、セルラーゼ、ナイシン、バクテリオシン、シデロフォア、ポリミキシン、およびディフェンシンから選択される、請求項 23 に記載の組成物。

40

【請求項 25】

請求項 1 から 6 のいずれかに記載のトランスグルタミナーゼ酵素をコードする核酸配列を含む、バクテリオファージ。

【請求項 26】

抗微生物活性を含む、請求項 25 に記載の組成物。

【請求項 27】

薬学的に許容される賦形剤をさらに含む、請求項 26 に記載の組成物。

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2020年3月13日に出願された米国仮出願第62／988,918号の利益を主張するものであり、それは本明細書における参照によりその全体として組み入れられる。

【0002】

本発明は、ストレプトマイセス・モバラエンシス (*Streptomyces mobaraensis*) トランスグルタミナーゼの新規の変種に関する。変種は、野生型ストレプトマイセス・モバラエンシス (*Streptomyces mobaraensis*) トランスグルタミナーゼと比較して増加した特異的活性および／または架橋活性の速度を有して、タンパク質、ペプチド、または小分子をコンジュゲートするために使用され得る。変種は、広域微生物防除のための作用物質としての使用のために、活性のある殺生物酵素およびその製剤としても使用され得る。

10

【背景技術】

【0003】

トランスグルタミナーゼ (EC 2.3.2.13) は、ペプチド結合したグルタミン残基の γ -カルボキシアミド基がアシルドナーである、アシル転移反応を触媒し得る酵素である。多様な化合物における第1級アミノ基は、ペプチド結合したグルタミンの置換 γ -アミドの後続の形成を有して、アシルアクセプターとして機能し得る。ペプチド鎖におけるリジン残基の ϵ -アミノ基がアシルアクセプターとして働く場合、トランスグルタミナーゼは、分子内または分子間 γ -グルタミル- ϵ -リシル架橋を形成する。

20

【0004】

トランスグルタミナーゼは、バイオテクノロジーにおいておよび食品加工産業において多くの適用を見い出しており、それは「肉のり」という呼称を得ている。ペプチド架橋活性は、食品加工、バイオテクノロジー、医薬、医療用デバイス、パーソナル用品および家庭用品、ならびに革および布処理に及ぶ、多様な産業目的に有用であると示している。

【発明の概要】

【0005】

トランスグルタミナーゼ (Tgase) 酵素が本明細書において提供される。酵素は、ストレプトマイセス・モバラエンシス (*Streptomyces mobaraensis*) Tgase (配列番号1) の変種である。変種の一部は、野生型ストレプトマイセス・モバラエンシス (*Streptomyces mobaraensis*) 酵素よりも約1.4倍、約1.6倍、もしくは1.8倍である、またはそれを上回るアミド基転移活性の向上 (少なくとも約40%、約60%、もしくは約80%、または約40%、約60%、もしくは約80%を上回る酵素活性の向上) を示す。

30

【0006】

より低コストの製品開発を可能にするために、アミド基転移反応においてグルタミンドナー基質とアミン基質とを架橋するためのより低分量の酵素を可能にする、トランスグルタミナーゼの高い特異的活性を有することが望ましい。付加的に、より短い反応時間をもたらすより高い初速度を呈するトランスグルタミナーゼの変異変種を同定することが有益である。1つのそのような例は防腐の事例にあり、タンパク質、例えば細胞表面タンパク質の迅速な架橋は、より早いまたはより有効な微生物殺傷速度等であるがそれらに限定されない、優れた微生物防除につながる。

40

【0007】

1つの態様において、トランスグルタミナーゼ変種酵素が提供される。一部の実施形態において、変種は、任意選択でN末端メチオニン残基をさらに含む、表3において提供される配列から選択されるアミノ酸配列を含むまたはそれからなる。一部の実施形態において、トランスグルタミナーゼは、任意選択でN末端メチオニン残基をさらに含む、A10

50

C または Q、D 1 4 H、L、M、N、W、または Y、R 1 5 A、E、または T、D 1 8 E または T、G 4 7 H、R 4 8 M、K 4 9 E または T、Q 7 4 C、N 1 3 4 S または T、A 1 3 6 C または S、L 1 3 7 K、V、E、または M、E 1 6 4 F、P 1 6 9 E、F 1 7 0 I、L、または V、S 1 9 9 A または G、および S 2 9 9 A、E、K、または V から選択される、ストレプトマイセス・モバラエンシス (*Streptomyces mobaraensis*) の成熟トランスグルタミナーゼ酵素の変種である。一部の実施形態において、トランスグルタミナーゼは、任意選択で N 末端メチオニン残基をさらに含む、表 3 に描写されるアミノ酸配列のいずれかの円順列変異体 (circular permutant) である。一部の実施形態において、トランスグルタミナーゼ酵素はプロ配列をさらに含む。

【0008】

別の態様において、製品の貯蔵寿命を増加させるための方法が提供される。方法は、組成物を含まない同一の製品と比較して、1 種または複数の微生物の成長を阻止するまたは減少させるのに有効な量で、本明細書に記載されるトランスグルタミナーゼ変種を製品に組み入れるステップを含む。

【0009】

別の態様において、酵素を含まない同一の製品と比較して、製品の貯蔵寿命を増加させる有効量で本明細書に記載されるトランスグルタミナーゼ変種を含む製品が提供される。例えば、製品は、パーソナルケア製品、家庭用製品、産業用製品、食料品、医薬製品、美容製品、ヘルスケア製品、海産物、塗料製品、コーティング製品、エネルギー製品、プラスチック製品、パッケージング製品、または農産物であり得る。一部の実施形態において、製品は、棒状せっけん、液体せっけん、手の除菌剤、術前の皮膚消毒剤、洗浄用ワイプ、消毒用ワイプ、ボディーウォッシュ、ざ瘡治療製品、抗真菌性おむつかぶれクリーム、抗真菌性皮膚クリーム、シャンプー、コンディショナー、化粧品、防臭剤、抗微生物性クリーム、ボディーローション、ハンドクリーム、局所クリーム、アフターシェーブローション、皮膚化粧水、洗口剤、歯磨き粉、または日焼け止めローションである。他の実施形態において、製品は、創傷治療軟膏、クリーム、およびローション、創傷被覆剤、熱傷クリーム、包帯、テープ、またはステリストリップから選択される創傷ケア製品である。

【0010】

別の態様において、(i) 本明細書に記載されるトランスグルタミナーゼ変種酵素；および (ii) 日焼け止め分子、顔料、または色素分子等、トランスグルタミナーゼ酵素に対する基質、を含む酵素組成物が提供される。一部の実施形態において、日焼け止め分子、顔料、または色素分子は、遊離アミノ基を含む分子にコンジュゲートされている。例えば、遊離アミノ基を含む分子は、リジン、カダベリン、プトレシン、ヒドラジン、アジピン酸ジヒドラジド、セバシン酸ジヒドラジド、またはヘキサメチレンジアミンであり得る。一部の実施形態において、日焼け止め分子、顔料、または色素分子は、遊離グルタミン側鎖を有するアミノ酸、ペプチド、またはタンパク質にコンジュゲートされている。酵素組成物を含む美容組成物も提供される。

【0011】

別の態様において、関心対象の材料またはタンパク質に着色するための方法が提供される。方法は、関心対象の材料またはタンパク質と、本明細書に記載されるトランスグルタミナーゼ変種酵素、および顔料または色素分子とを接触させるステップであって、トランスグルタミナーゼ変種酵素は、関心対象の材料またはタンパク質に顔料または色素分子を共有結合させるのに有効な量で存在する、ステップを含む。1 つの実施形態において、関心対象のタンパク質は、皮膚に存在するタンパク質である。例えば、皮膚に存在するタンパク質は、コラーゲン、ケラチン、および／またはエラスチンであり得る。

【0012】

別の態様において、製品と接触した場合に、関心対象のタンパク質、またはタンパク質、ペプチド、もしくはアミノ酸含有材料に色分子を付加する有効量で本明細書に記載されるトランスグルタミナーゼ変種酵素を含む製品が提供される。一部の実施形態において、製品は、パーソナルケア製品、美容製品、革製品、食料品、または農産物であり得る。関

10

20

30

40

50

心対象のタンパク質または材料と製品とを接触させるステップを含む、関心対象のタンパク質または材料の色を改変するための方法も提供される。

【0013】

別の態様において、1種または複数の抗微生物酵素、ペプチド、またはタンパク質との組み合わせで、本明細書に記載されるトランスグルタミナーゼ変種酵素を含む組成物であって、組成物は、防腐、殺生物、抗微生物、または殺ウイルス活性を所有する、組成物が提供される。一部の実施形態において、抗微生物酵素、ペプチド、またはタンパク質は、リゾチーム、キチナーゼ、リパーゼ、リジン、リゾスタフィン、グルカナーゼ、DNase、RNase、ラクトフェリン、グルコースオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ、ラクトペルオキシダーゼ、ラクトナーゼ、アシラーゼ、ディスパーシン (dispersin) B、α-アミラーゼ、セルラーゼ、ナイシン、バクテリオシン、シデロフォア、ポリミキシン、またはディフェンシンである。

10

【0014】

別の態様において、本明細書に記載されるトランスグルタミナーゼ変種酵素をコードする核酸配列を含むバクテリオファージが提供される。1つの実施形態において、組成物は抗微生物活性を提供する。組成物は、薬学的に許容される賦形剤をさらに含み得る。

【発明を実施するための形態】

【0015】

本明細書に開示されるTgase架橋酵素は、ヘルスケア製品、パーソナルケアまたは美容製剤、パッケージング（例えば、食品、化粧品、および医薬品）、布および革製品、塗料およびコーティング、ならびに水処理および精製を含めた海洋適用における適用を有して、新規の微生物防除のための殺生物剤として採用され得る。一部の実施形態において、本明細書に開示されるTgase酵素は、関心対象のタンパク質、例としてケラチンおよびコラーゲンを、色素またはタンパク質で永続的に修飾するために採用され得る。一部の実施形態において、Tgase酵素は防腐剤として使用され得る。

20

【0016】

ストレプトマイセス・モバラエンシス (*Streptomyces mobaraensis*) Tgaseの変異体形態であるTgase酵素が本明細書に開示される。具体的には、本明細書に記載される酵素は、野生型Tgaseまたはその円順列変異体のポリペプチド配列における少なくとも1つのアミノ酸を変異させ、グルタミンアミノ酸残基とアミン（またはヒドロキシルアミン）アクセプターとの間のトランスグルタミナーゼアミド基転移活性を観察することによって獲得されるタンパク質である。

30

【0017】

変異置換を有するタンパク質の組み換え発現のための方法は、以前に記載されている、例えばMolecular Cloning, A Laboratory Manual 4th ed., Cold Spring Harbor Press (1989)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997)等。単一点変異体酵素は、部位指向性変異導入または当技術分野において公知の任意の他の方法を使用して作出され得る。そのような方法は、Kunkel方法、KLD方法、またはギャップ二重鎖 (Gapped duplex) 方法等、キットおよび市販の試薬を使用するものを含み得るがそれらに限定されるわけではなく、キットの例として、例えばQuickChange (商標) Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)、GeneArt (商標) Site-Directed Mutagenesis System (Invitrogen)、Q5 (登録商標) Site-Directed Mutagenesis System (New England Biolabs)、TaKaRa Site-Directed Mutagenesis System (Prime STAR (登録商標) Mutagenesis Basal kit)、またはMuta-Direct (商標) Site Directed Mutagenesis Kit (iNtRON)等。

40

【0018】

I. 定義

50

「1つの(A)」、「1つの(an)」、および「その(the)」は、文脈上別様にはっきりと記述されない限り、複数形の指示対象(reference)を含む。

【0019】

「約」という用語は、本明細書において、値のプラスまたはマイナス10パーセント(10%)を意味するために使用される。例えば、「約100」は、90~110の任意の数を指す。

【0020】

本明細書でおよび特許請求の範囲で本明細書において使用するとき、「または」は、上で定義される「および／または」と同じ意味を有すると理解されるべきである。例えば、10
列挙における品目を分離する場合、「または」または「および／または」は、内包的である、すなわち、いくつかの要素または要素の列挙のうちの少なくとも1種の、しかし1種を上回る種類も含む内包、および任意選択で付加的な列挙されていない品目の内包として解釈されるものとする。「のうちの1種のみ」もしくは「のうちの正確に1種」、または特許請求の範囲において「からなる」と使用される場合等、そうでないことがはっきりと示された用語だけは、いくつかの要素または要素の列挙のうちの正確に1種の要素の内包を指すであろう。一般的に、本明細書において使用される「または」という用語は、「いずれか」、「のうちの1種」、「のうちの1種のみ」、または「のうちの正確に1種」等、20
排他性の用語が先行する場合、排他的選択肢(すなわち、「一方または他方であるが、両方ではない」)を示すと単に解釈されるものとする。「から本質的になる」は、特許請求の範囲において使用される場合、特許法の分野において使用されるその普通の意味を有するものとする。

【0021】

本明細書でおよび特許請求の範囲で本明細書において使用される「および／または」という語句は、そのようにつながった要素の「いずれかまたは両方」、すなわち、ある場合には接続的に存在し、他の場合には離接的に存在する要素、を意味すると理解されるべきである。そうでないことがはっきりと示されない限り、具体的に特定されるそうした要素30
に関係するまたは無関係であるかどうかにかかわらず、「および／または」節によって具体的に特定される要素以外に、他の要素が任意選択で存在し得る。ゆえに、非限定的な例として、「Aおよび／またはB」への言及は、「含む」等の無制限の言語と併せて使用される場合、1つの実施形態では、BなしのA(B以外の要素を任意選択で含む)；別の実施形態では、AなしのB(A以外の要素を任意選択で含む)；さらに別の実施形態では、AおよびBの両方(他の要素を任意選択で含む)；等を指し得る。

【0022】

「アミノ酸」という用語は、アルファ炭素と呼ばれる炭素に結合しているアミン基およびカルボキシル基の両方を含有する分子を指す。適切なアミノ酸は、限定されることなく、天然に存在するアミノ酸のD-およびL-異性体、ならびに有機合成または他の代謝経路によって調製される天然に存在しないアミノ酸を含む。一部の実施形態において、単一の「アミノ酸」は、伸長した脂肪族または芳香族骨格足場ごとに利用可能な、複数の側鎖部分を有し得る。文脈上別様に具体的に示されない限り、本明細書において使用されるアミノ酸という用語は、アミノ酸類似体を含むことを意図される。40

【0023】

本明細書において使用するとき、「抗微生物」とは、EPAに従った、細菌およびウイルスを殺傷するまたはその成長を阻害することを意図される物質を指す。

【0024】

本明細書において使用される「塩基対」または「bp」という用語は、二本鎖DNA分子におけるアデニン(A)とチミン(T)との、またはシトシン(C)とグアニン(G)との連携(すなわち、水素結合した対合)を指す。一部の実施形態において、塩基対は、例えばDNA/RNA二重鎖における、ウラシル(U)と対合したAを含み得る。

【0025】

本明細書において使用するとき、「殺生物」とは、米国環境保護庁(EPA)によって50

規定される、微小生物を殺傷する物質を指す。

【0026】

「円順列変異体」とは、参照配列と比較して、そのアミノ酸配列におけるアミノ酸の順序の変化を有するタンパク質を指す。結果は、参照タンパク質と比較して、異なる接続性、しかし全体的に同様の3次元(3D)形状を有するタンパク質構造である。

【0027】

「に由来する」という用語は、「を起源とする」、「から獲得された」、「から獲得可能な」、「から単離された」、「から精製された」、および「から創出された」という用語を包含し、一方の指定された材料が、別の指定された材料にその起源を見い出す、または別の指定された材料に関して記載され得る特質を有することを一般的に示す。

10

【0028】

本明細書における「二重鎖」という用語は、2つのポリヌクレオチド配列間に存在する相補性の領域を指す。「二重鎖領域」という用語は、2つのオリゴヌクレオチド間または単一のオリゴヌクレオチドの2つの部分間に存在する配列相補性の領域を指す。

【0029】

本明細書において使用される「有効量」とは、微生物成長を阻止するまたは阻害するのに十分である、本明細書に開示される防腐組成物の量(例えば、最小阻害濃度(MIC))を指す。本特許の防腐組成物は、グラム陽性細菌、グラム陰性細菌、酵母、および／またはカビに対して活性がある。

【0030】

本明細書において使用するとき、「発現」という用語は、ポリペプチドが遺伝子の核酸配列に基づいて産生される過程を指す。過程は、転写および翻訳の両方を含む。

20

【0031】

「遺伝子」とは、ポリペプチドを産生することに関与するDNAセグメントを指し、コード領域に先行するおよび後続する領域、ならびに個々のコードセグメント(エクソン)間の介在配列(イントロン)を含む。

【0032】

「家庭用製品」とは、個々の消費者によって使用されるであろう、パーソナルケア製品以外の製品である。

【0033】

「ハイブリダイゼーション」および「アニーリング」とは、1種または複数のポリヌクレオチドが反応して、ヌクレオチド残基の塩基間での水素結合を介して安定化される複合体を形成する反応を指す。水素結合は、ワトソン・クリック型塩基対合、フーグスティーン型結合によって、または任意の他の配列特異的様式で生じ得る。複合体は、二重鎖構造を形成する2本の核酸鎖、複数鎖の複合体を形成する3本以上の鎖、自己ハイブリダイズする単一の鎖、またはこれらの任意の組み合わせを含み得る。ハイブリダイゼーション反応は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)の始動、ライゲーション反応、シーケンシング反応、または切断反応、例えばリボザイムによるポリヌクレオチドの酵素的切断等、より広範な過程における1ステップを構成し得る。第2の配列のヌクレオチド残基の塩基との水素結合を介して安定化され得る第1の核酸配列は、第2の配列に「ハイブリダイズ可能」と言われる。そのような場合、第2の配列も、第1の配列にハイブリダイズ可能であると言われ得る。「ハイブリダイズした」という用語は、ヌクレオチド残基の塩基間での水素結合を介して安定化される複合体におけるポリヌクレオチドを指す。

30

【0034】

「産業用製品」とは、産業において使用される製品を指す。

【0035】

本明細書において使用される「単離された」、「精製された」、「分離された」、および「回収された」という用語は、それが含有されるサンプルの例えば少なくとも90重量%、または少なくとも95重量%、または少なくとも98重量%の濃度でそれが天然に結び付いている少なくとも1種の構成要素から取り除かれている材料(例えば、タンパク質

50

、核酸、または細胞)を指す。例えば、これらの用語は、その天然状態、例えば無傷の生物学的システム等において見い出されるように、通常ではそれに付随する構成要素を実質的にまたは本質的に含んでいない材料を指し得る。単離された核酸分子は、該核酸分子を普通では発現する細胞に含有される核酸分子を含むが、該核酸分子は、染色体外に、またはその天然の染色体位置とは異なる染色体位置に存在する。

【0036】

「成熟」ポリペプチド、タンパク質、または酵素とは、そのプロ配列の切断後のまたはプロ配列のない、チモーゲンまたはプロタンパク質の活性化形態を指す。一部の実施形態において、成熟酵素は、翻訳後プロセッシング(活性化)ステップを排除するために、プロ配列とは別個のポリペプチドとして産生され得る。

10

【0037】

「微小生物」および「微生物」という用語は、細菌、原生動物、真菌、藻類、アメーバ、ウイルス、およびカビ生命体を含み得る。

【0038】

本明細書における「変異」という用語は、置換、挿入、および欠失(切り取りを含む)を含むがそれらに限定されず、それによって「変異体」を産生する、親配列に導入された変化を指す。変異の結果は、親配列によってコードされるタンパク質に見い出されない新しい特徴、特性、機能、表現型、または形質の創出を含むが、それらに限定されるわけではない。

【0039】

本明細書における「ヌクレオチド」という用語は、糖部分(ペントース)、リン酸、および窒素複素環塩基からなるDNAまたはRNAの単量体単位を指す。塩基は、グリコシド炭素(ペントースの1'炭素)を介して糖部分に連結され、塩基と糖とのその組み合わせはヌクレオシドである。ヌクレオシドがペントースの3'または5'位に結合したリン酸基を含有する場合、それはヌクレオチドと称される。作動的に連結されたポリマーヌクレオチドの配列は、本明細書において典型的に「塩基配列」、「ヌクレオチド配列」、「ポリヌクレオチド配列」、「オリゴヌクレオチド配列」、または核酸もしくはポリヌクレオチド「鎖」と称され、本明細書において、それぞれポリマー配列の「5'」および「3'」末端における末端5'リン酸基および末端3'ヒドロキシル基を指す、5'末端から3'末端への従来の方向に左から右の配向がある式によって表される。

20

30

【0040】

「任意選択の」または「任意選択で」とは、後に記載される事象、状況、または材料が生じても生じなくてもよい、または存在しても存在しなくてもよいこと、ならびに該記載は、事象、状況、または材料が生じるまたは存在する場合、およびそれが生じないまたは存在しない場合を含むことを意味する。

【0041】

本明細書において使用するとき、「病原体」とは、ヒト、動物、および／または植物において疾患を引き起こし得る微小生物(例えば、細菌、ウイルス、または寄生生物)を指す。

【0042】

「ペプチド」とは、鎖状に連結された2つ以上のアミノ酸からなり、各酸のカルボキシル基が、 $R-O-C-NH-R'$ 型の結合によって次のもののアミノ基につながっている、例えば約2～約50個のアミノ酸の化合物を指す。

40

【0043】

本明細書における「ポリメラーゼ」という用語は、ヌクレオチドの重合(すなわち、ポリメラーゼ活性)を触媒する酵素を指す。ポリメラーゼという用語は、DNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼ、および逆転写酵素を包含する。「DNAポリメラーゼ」は、デオキシリボヌクレオチドの重合を触媒する。「RNAポリメラーゼ」は、リボヌクレオチドの重合を触媒する。「逆転写酵素」は、RNA鋳型に相補的であるデオキシリボヌクレオチドの重合を触媒する。

50

【0044】

「ポリヌクレオチド」、「核酸」、および「オリゴヌクレオチド」という用語は、互換可能に使用される。それらは、デオキシリボヌクレオチドもしくはリボヌクレオチドのいずれかを問わず、任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態、またはその類似体を指す。ポリヌクレオチドは、任意の3次元構造を有し得、公知または未知の任意の機能を果たし得、一本鎖または複数鎖（例えば、一本鎖、二本鎖、三重らせん等）であり得、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、および／あるいは改変されたヌクレオチドもしくは塩基またはそれらの類似体を含めた、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドの類似体または改変された形態を含有し得る。遺伝子コードは縮重しているため、特定の amino 酸をコードするために1種を上回るコドンが使用され得、本発明は、特定の amino 酸配列をコードするポリヌクレオチドを包含する。ポリヌクレオチドが使用の条件下で所望の機能性を保持する限りにおいて、ヌクレアーゼ耐性を増加させる改変（例えば、デオキシ、2'-O-Me、ホスホロチオエート等）を含めた、任意のタイプの改変されたヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体を使用され得る。標識、例えば放射性もしくは非放射性標識またはアンカー、例えばビオチンも、検出または捕捉の目的のために組み入れられ得る。ポリヌクレオチドという用語は、ペプチド核酸（PNA）も含む。ポリヌクレオチドは、天然に存在し得るまたは天然に存在し得ない。ポリヌクレオチドは、RNA、DNA、もしくはその両方、ならびに／またはその改変された形態および／もしくは類似体を含み得る。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド構成要素によって中断され得る。1つまたは複数のホスホジエステル連結は、代替的な連結基によって置き換えられ得る。これらの代替的な連結基は、リン酸が、P(O)S（「チオエート」）、P(S)S（「ジチオエート」）、(O)NR₂（「アミデート」）、P(O)R、P(O)OR'、CO、またはCH₂（「ホルマセタル（formacetal）」）によって置き換えられ、式中、各RまたはR'は、独立して、H、またはエーテル（-O-）連結を任意選択で含有する置換もしくは非置換アルキル（1～20個のC）、アリール、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、またはアラリジル（araldyl）である、実施形態を含むが、それらに限定されるわけではない。以下のものは、ポリヌクレオチドの非限定的な例である：遺伝子または遺伝子フラグメントのコードまたは非コード領域、遺伝子間DNA、連鎖解析により規定される遺伝子座（loci）（遺伝子座（locus））、エクソン、イントロン、メッセンジャーRNA（mRNA）、トランスファーRNA、リボソームRNA、低分子干渉RNA（siRNA）、低分子ヘアピンRNA（shRNA）、マイクロRNA（miRNA）、核小体低分子RNA、リボザイム、cDNA、組み換えポリヌクレオチド、分岐ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離されたDNA、任意の配列の単離されたRNA、核酸プローブ、アダプター、およびプライマー。ポリヌクレオチドは、メチル化ヌクレオチドおよびヌクレオチド類似体等、改変されたヌクレオチドを含み得る。存在する場合、ヌクレオチド構造の改変は、ポリマーの会合の前または後に与えられ得る。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド構成要素によって中断され得る。ポリヌクレオチドは、標識化構成要素、タグ、反応性部分、または結合パートナーとのコンジュゲーション等によって、重合の後にさらに改変され得る。ポリヌクレオチド配列は、提供される場合、別様に明記されない限り、5'から3'方向に列挙される。

【0045】

本明細書において使用するとき、「ポリペプチド」とは、amino 酸から構成され、当業者によってタンパク質として認識される組成物を指す。amino 酸残基に対する従来の1文字または3文字コードが本明細書において使用される。「ポリペプチド」および「タンパク質」という用語は、任意の長さのamino 酸のポリマーを指すために、本明細書において互換可能に使用される。ポリマーは線状または分岐であり得、それは改変されたamino 酸を含み得、それは非amino 酸によって中断され得る。該用語は、天然にまたは介入；例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化、または標識化構成要素とのコンジュゲーション等の任意の他の操縦もしくは改変、によって改変されているamino 酸ポリマーも包含する。また、例えば、amino 酸の1種または複数の類似体

(例えば、非天然アミノ酸等を含む)、ならびに当技術分野において公知の他の改変を含有するポリペプチドが該定義に含まれる。

【0046】

本明細書において使用するとき、「防腐剤」とは、製品の1つまたは複数の実用性の劣化を含めた、製品を損なうまたは劣化させる、微小生物の成長または望ましくない化学反応(酸化等)の発生を(一定期間)阻止するための、記載される製品に添加される作用物質である。

【0047】

「プロモーター」とは、RNAポリメラーゼによる遺伝子の転写を始動することに関与する調節配列を指す。プロモーターは、誘導性プロモーターまたは構成的プロモーターであり得る。「誘導性プロモーター」とは、環境的なまたは発生学的な調節条件下で活性があるプロモーターである。

【0048】

「プロ配列」とは、酵素等の活性タンパク質を産生するためにタンパク質から典型的に切断される、発現されるタンパク質内、例えばトランスグルタミナーゼ等のチモーゲンまたはプロタンパク質内のポリペプチド配列を指す。一部の実施形態において、プロ配列は、タンパク質の正しいフォールディングに必須であり得る。一部の実施形態において、プロ配列の切断は、活性酵素への不活性酵素の移行をもたらす。

【0049】

「組み換え」という用語は、変更されたポリペプチドを産生するためにコード配列を変異させ、コード配列を別の遺伝子のものに融合し、異なるプロモーターの制御下に遺伝子を置き、異種生物において遺伝子を発現させ、減少したまたは上昇したレベルで遺伝子を発現させ、その天然発現プロファイルとは異なる様式で条件付きでまたは構成的に遺伝子を発現させる等によって、その配列または発現特徴を変更するように改変されている遺伝材料(すなわち、核酸、それらがコードするポリペプチド、ならびにそのようなポリヌクレオチドを含むベクターおよび細胞)を指す。一般的に、組み換え核酸、ポリペプチド、およびそれに基づく細胞は、それらが、天然に見い出される関連する核酸、ポリペプチド、および細胞と同一ではないように操縦されている。組み換え細胞は、「操作された」とも称され得る。

【0050】

「貯蔵寿命」とは、品目(例えば、本明細書に記載される製品)が、依然として使用可能な、消費に適した、または販売可能な状態である時間の長さを指す。

【0051】

少なくとも2種の核酸の文脈における「実質的に同様の」および「実質的に同一の」という語句は、典型的に、ポリヌクレオチドが、参照(例えば、野生型)ポリヌクレオチドまたはポリペプチドと比較して、少なくとも約35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはさらに99.5%の配列同一性を有する配列を含むことを意味する。配列同一性は、標準的パラメーターを使用したBLAST、ALIGN、およびCLUSTAL等の公知のプログラムを使用して判定され得る。(例えば、Altshul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410; Henikoff et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. 89:10915; Karin et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. 90:5873; および Higgins et al. (1988) Gene 73:237を参照されたい)。BLAST解析を実施するためのソフトウェアは、アメリカ国立生物工学情報センターを通じて公的に利用可能である。また、データベースは、FASTAを使用して検索され得る(Pearson et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:2444-2448)。一部の実施形態において、実質的に同一の核酸分子は、ストリンジェントな条件下(例えば、中間~高いストリンジェンシーの域内)で互いにハイブリダイズする。本明細書における核酸「合成」とは、ポリヌクレオチドの新しい鎖を作製する、または鋳型依存的様式で既存のポリヌクレオチド(すなわち、D

10

20

30

40

50

NA または RNA) を引き延ばすための任意のインビトロ方法を指す。本発明に従った合成は、ポリメラーゼの使用を有して、ポリヌクレオチド鋳型配列のコピーの数を増加させる増幅を含み得る。ポリヌクレオチド合成 (例えば、増幅) は、ポリヌクレオチドへのヌクレオチドの組み入れ (例えば、プライマーからの伸長) をもたらし、それによってポリヌクレオチド鋳型に相補的な新しいポリヌクレオチド分子を形成する。形成されたポリヌクレオチド分子およびその鋳型は、付加的なポリヌクレオチド分子を合成するための鋳型として使用され得る。本明細書において使用される「DNA 合成」は、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を含むがそれに限定されず、例えばプローブおよびオリゴヌクレオチドプライマーに対するまたはポリヌクレオチドシーケンシングのための、標識ヌクレオチドの使用を含み得る。「転写制御下にある」とは、ポリヌクレオチド配列の転写が、転写の始動に寄与するまたは転写を促進するエレメントにそれが作動可能に連結されていることに依存することを示す、当技術分野においてよく理解された用語である。

10

【0052】

関連する (および誘導体) タンパク質は、「変種」タンパク質を包含する。変種タンパク質は、別の (すなわち、親) タンパク質とはおよび／または互いとは、少数のアミノ酸残基異なる。変種は、それが由来する親タンパク質と比較して、1 つまたは複数のアミノ酸変異 (例えば、アミノ酸欠失、挿入、または置換) を含み得る。代替的にまたは付加的に、変種は、例えば BLAST、ALIGN、および CLUSTAL 等の配列アライメントツールを使用して判定される、参照タンパク質または核酸との指定される程度の配列同一性を有し得る (下記を参照されたい)。例えば、変種タンパク質または核酸は、参照配列と少なくとも約 35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはさらに 99.5% のアミノ酸配列同一性を有し得る。

20

【0053】

「チモーゲン」または「プロ酵素」とは、プロ配列のタンパク質分解的切断を介するものの等の触媒作用によって活性酵素に変換され得る、酵素の不活性前駆体を指す。

【0054】

本明細書において別様に定義されない限り、本開示に関連して使用される科学のおよび技術的用語は、当業者によって共通に理解される意味を有するものとする。さらに、文脈によって別様に要されない限り、単数形の用語は複数を含むものとし、複数形の用語は単数を含むものとする。本開示の方法および技法は、概して、当技術分野において周知の従来の方法に従って実施される。概して、本明細書に記載される生化学、酵素学、分子および細胞生物学、微生物学、遺伝学、ならびにタンパク質および核酸化学およびハイブリダイゼーションに関連して使用される命名法、ならびにそれらの技法は、当技術分野において周知でかつよく使用されるものである。本開示の方法および技法は、別様に示されない限り、概して、当技術分野において周知で、かつ本明細書を通じて引用されかつ論じられる様々な一般的参考文献およびより具体的な参考文献に記載される従来の方法に従って実施される。

30

【0055】

II. T g a s e 変種

ストレプトマイセス・モバラエンシス (*Streptomyces mobaraensis*) 由来の野生型酵素 (配列番号 1) に対して、酵素活性の少なくとも 1.4 倍 (40%) の向上を有する T g a s e 変種が本明細書に開示される。

【0056】

配列番号 1: 野生型成熟 T G a s e

【0057】

40

50

【化 1】

DSDDRVTPPAEPLDRMPDPYRPSYGRAETVVNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQMTEEQREWLSYGCVGV
 TWVNSGQYPTNRLAFASFDEDRFKNELKNGRPRSGETRAEFEGRVAKESFDEEKGFQRAREVASVMN
 RALENAHDESAYLDNLKKELANGNDALRNEDARSPFYALRNTPSFKERNGGNHDP SRMKAVIYSKH
 FWSGQDRSSSADKRKYGDPDAFRPAPGTGLVDM SRDRNIPRSPTSPGEGFVNFDYGWFGAQTEADAD
 KTVWTHGNHYHAPNGSLGAMHVYESKFRNWSEGYSDFDRGAYVITFIPKSWNTAPDKVKQGW

【0058】

配列番号 1 に記載される野生型配列と比べた、そのような変種の例のアミノ酸配列は表 3 に開示される。例えば、野生型酵素に対して、活性の少なくとも約 1.4 倍（40%）の向上を有する T g a s e 変種は、表 3 に示される点変異のいずれかを有し得る。

10

【0059】

本明細書における T g a s e 変種はプロ配列をさらに含み得る。一部の実施形態において、変種は、変種ポリペプチド配列の一部（例えば、表 3 に記載されるアミノ酸配列の伸長としての付加的なアミノ酸配列）として、または別個のポリペプチドとして、プロ配列とともに発現される。一部の実施形態において、成熟変種ポリペプチドは、ポリペプチド T g a s e プロ配列の存在下で発現される。1つの実施形態において、プロ配列をコードする DNA 配列、および成熟 T g a s e 変種をコードする DNA 配列は、同じ DNA 鋳型から個別のポリペプチド配列として発現される。別の実施形態において、成熟ポリペプチドをコードする DNA 配列は、第 1 の DNA 鋳型から発現され、プロ配列をコードする DNA 配列は、別個の第 2 の DNA 鋳型から発現される。別の実施形態において、プロ配列は化学合成され、成熟ポリペプチドの発現の前、間、または後に発現システムに添加される。1つの例において、T g a s e 変種は、本明細書における参照によりその全体として組み入れられる P C T 出願第 U S 2 0 / 4 9 2 2 6 号明細書に開示される無細胞発現システムにおいて発現され得る。

20

【0060】

一部の実施形態において、T g a s e 変種は、同種プロ配列、すなわち T g a s e 酵素に対する天然のプロ配列、すなわち同じ生物由来の野生型 T g a s e 酵素に対するプロ配列とともに発現される、例えば組み換えで発現される。他の実施形態において、T g a s e 変種は、異種プロ配列、すなわち同じ酵素であるが異なる生物由来のものに対するプロ配列、または同じもしくは異なる生物由来の異なる酵素に対するプロ配列とともに発現される、例えば組み換えで発現される。

30

【0061】

成熟野生型ストレプトマイセス・モバラエンシス (*Streptomyces mobaraensis*) T g a s e 酵素は、該酵素をコードする遺伝子配列によってコードされる N 末端メチオニン残基を欠如する。一部の実施形態において、T g a s e 変種は、N 末端メチオニン残基なしで、成熟ストレプトマイセス・モバラエンシス (*Streptomyces mobaraensis*) T g a s e の変種として発現される。他の実施形態において、T g a s e は、付加的な N 末端メチオニン残基を有する成熟 T g a s e として発現され、それは、T g a s e が発現される発現ベクターによって提供され得る。

40

【0062】

一部の実施形態において、T g a s e 変種は、T g a s e 酵素の円順列変異体、例えば野生型 T g a s e 酵素（配列番号 1）のまたは本明細書に記載される T g a s e 変種（例えば、表 3 に記載される変種）の円順列変異体であり得る。一部の実施形態において、T g a s e 変種は、任意選択で N 末端メチオニン残基をさらに含む、表 1 に記載される T g a s e 変種の円順列変異体であり得る。円順列変異体は、親酵素、すなわち野生型酵素、または例えば表 3 に描写される開示される変種に対して、新規の基質特異性、産物プロファイル、および反応速度論を提供し得る。円順列変異体は、親酵素の同じ基本的フォールディングを保持するが、任意選択で連結配列によって接続された元の N および C 末端とともに、異なる箇所に N 末端を有する。T g a s e 野生型または変種円順列変異体において

50

、野生型または変種酵素の N 末端残基は、天然の N 末端以外の、該タンパク質における部位に配置される。

【0063】

III. 抗微生物組成物

その円順列変異体を含めた、任意選択で N 末端メチオニン残基を有し、かつ任意選択で本明細書に記載されるプロ配列を有する、表 3 に開示される変種のいずれか等、本明細書に記載される 1 種または複数の T g a s e 変種酵素を含む組成物、例えば殺生物、防腐、抗微生物、抗細菌、および抗ウイルス（殺ウイルス）組成物が開示される。そのような組成物は、例えば微生物防除のために、保存される対象となる製品内にまたは製品とともに（例えば、その中にまたはそれと関連して）含まれ得る。T g a s e 変種酵素は、タンパク質上のアミノ酸残基の反応を触媒し得、それによって、例えばタンパク質架橋を生じさせる、またはタンパク質に関心対象の分子を結合させる。一部の実施形態において、組成物は、保存される対象となる製品における微生物（例えば、細菌）成長を阻害するのに、例えば微生物成長の 80%~100%、または少なくとも約 80%、85%、90%、95%、98%、もしくは 99% のうちのいずれかの阻害に有効な量で、例えば本明細書に開示される 1 種または複数の T g a s e 変種を含むまたはそれからなる、1 種または複数の T g a s e 変種酵素を含む。

10

【0064】

防腐剤は、微生物夾雑物の成長を阻害しかつその量を低下させることによって、製品の微生物学的安全性を維持するために、製品製剤に添加される抗微生物成分である。米国薬局方は、化粧品およびパーソナルケア製品における防腐剤に対する許容される微生物生存に関するプロトコルを公開している。これらの試験は、USP 51（抗微生物有効性試験）および USP 61（微生物限度試験）を含む（<https://www.fda.gov/files/about%20fda/published/Pharmaceutical-Microbiology-Manual.pdf>）。

20

【0065】

本明細書に開示される防腐システムの有効性は、グラム陽性細菌、グラム陰性細菌、酵母、および／またはカビを含むがそれらに限定されない多様な微生物（例えば、大腸菌（*E. coli*）DH10β、大腸菌（*E. coli*）ATCC 8739、*B. サブティリス*（*B. subtilis*）BGSC 1A976、*C. アルビカンス*（*C. albicans*）ATCC 10231、および／または *A. ブラジリエンシス*（*A. brasiliensis*）ATCC 16404）に対する MIC（最小阻害濃度）に基づいて判定される。最小阻害濃度（MIC）は、微生物の成長を阻害するであろう、抗微生物薬の最低濃度として定義される。微生物成長は、例えば分光光度法（600nm における光学密度）によってまたは細胞生存率アッセイ（BacTiter Glo、Promega）を用いて判定され得る。

30

【0066】

一部の実施形態において、組成物は、架橋酵素、ヌクレアーゼ、ヒドロラーゼ、プロテアーゼ、および／または溶解酵素等、1 種または複数の付加的な殺生物酵素を含む。一部の実施形態において、組成物は、キトサン、ポリリジン、および／または第 4 級アンモニウム化合物等であるがそれらに限定されない、1 種または複数の殺生物化学物質をさらに含む。殺生物酵素、組成物、および製剤、ならびにその使用の方法の例示的な、しかし非限定的な例は、本明細書における参照によりその全体として組み入れられる PCT/US 20/21211 明細書に開示される。

40

【0067】

理論によって拘束されることを望むことなく、殺生物酵素の使用は、抗微生物作用の付加的なメカニズムを提供することによって、殺生物化学物質の抗微生物特性を増強する。例えば、キトサンは細胞膜を破裂させ、細胞内容物の漏出につながる。架橋 T g a s e 酵素は、細胞の表面および細胞内の両方での細胞機能に不可欠なタンパク質を架橋し得る。両材料のこの組み合わせは、必要とされる材料の分量を一緒になって低下させ、経時的により大きな活性（より少ないキトサンおよびより少ない酵素）を可能にする付加的な安定性を酵素に提供し、殺生物キトサンの使用に伴い得る望ましくない効果を低下させる。

50

【 0 0 6 8 】

A．殺生物タンパク質およびペプチド

一部の実施形態において、組成物は、1種または複数の抗微生物ペプチドを含む。抗微生物ペプチドの例は、ナイシンおよびペディオシンを含むがそれらに限定されるわけではない。

【 0 0 6 9 】

一部の実施形態において、組成物は、1種または複数の抗微生物タンパク質を含む。抗微生物タンパク質の例は、カゼインを含むがそれに限定されるわけではない。

【 0 0 7 0 】

本明細書に開示される T g a s e 変種酵素との組み合わせで含まれ得る、公知の殺生物酵素および抗微生物ペプチドの非限定的な例は表 1 に示される。一部の実施形態において、本明細書に記載される T g a s e 変種酵素は、表 1 に記載される抗微生物酵素、ペプチド、またはタンパク質のうちの 1 種または複数との組み合わせで、殺生物、防腐、抗細菌、または抗ウイルス（殺ウイルス）組成物において利用され得る。

【 0 0 7 1 】

10

20

30

40

50

【表 1 - 1】

表 1. 公知の抗微生物特性を有する酵素、ペプチド、およびタンパク質

メカニズム	酵素	説明	引用
溶解	リゾチーム	先天性免疫系の一部として、動物によって産生される。細菌細胞壁におけるペプチドグリカンサブユニットを加水分解する。	Ibrahim et al. (2001) <i>FEBS Letters</i> 506(1):27-32; Malaczewska et al. (2019) <i>BMC Vet. Res.</i> 15:318
	キチナーゼ	昆虫および真菌と闘うために、バチルス・チューリンゲンシス (<i>Bacillus thuringiensis</i>) を含めた土壌細菌によって分泌される	Martínez-Zavala et al (2020) <i>Front. Microbiol.</i> 10:3032
	リパーゼ	細胞外脂質およびポリマーを加水分解する。	Prabhawathi et al. (2014) <i>PLoS One</i> 9(5)
	リジン	細菌細胞壁のグリカン構成要素を加水分解するために、バクテリオファージによって利用される	Hoops et al. (2008) <i>Appl. Environ. Microbiol.</i> 75:5, 1388-1394
	リゾスタフィン	細胞壁ペプチドグリカンに見い出されるペンタグリシン架橋を切断するメタロエンドペプチダーゼ。	Kokai-Kun et al. (2003) <i>Antimicrob Agents Chemothor</i> 47(5):1589-1597
	グルカナーゼ	真菌細胞壁を分解するために、バチルス (<i>Bacillus</i>) 種を含めた土壌細菌によって分泌される。殺藻剤としておよびバイオフィーム制御に利用もされている。	Shafi et al. (2017) <i>Biotechnology & Biotechnological Equipment</i> 31:3 446-459
ヌクレアーゼ	DNase	細胞外核酸およびウイルスゲノム DNA を加水分解する。	Kaplan et al. (2012) <i>J. Antibiot. (Tokyo)</i> 65(2):73-77
	RNase	ウイルス RNA を加水分解する。	Wirth (1992) 国際公開第 1994000016 号パンフレット
	ラクトフェリン	必須の鉄イオンを隔離して、微生物成長を阻止する。また、ヌクレアーゼ活性を所有し、バイオフィームポリマーを加水分解する。	Niaz et al. (2019) <i>International Journal of Food Properties</i> 22:1 1626-1641
酸化還元酵素	グルコースオキシダーゼ	グルコースを酸化して D-グルコノ- δ -ラクトンおよび過酸化水素にする。	Wong et al. (2008) <i>Appl Microbiol Biotechnol.</i> 78(6):927-938
	ペルオキシダーゼ	不活性基質を酸化して、殺生物活性(active)を形成する。	Ihalin et al. (2006) <i>Arch. Biochem. Biophys.</i> 445, 261-268
	ラクトペルオキシダーゼ	不活性基質を酸化して、殺生物活性(active)を形成する。	White et al. (1983) <i>Antimicrob Agents Chemothor</i> 32(2): 267-272
クオラムクエンチング	ラクトナーゼ	クオラム感知ラクトンを加水分解し、バイオフィーム促進および発病促進経路の活性化を阻止する。	Schwab et al. (2019) <i>Front Microbiol.</i> 10:611
	アシラーゼ	クオラム感知ラクトンを加水分解し、バイオフィーム促進および発病促進経路の活性化を阻止する。	Vogel et al. (2020) <i>Front. Chem.</i> 8:54

【 0 0 7 2 】

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

ヒドロラーゼ	ディスパーシン B	バイオフィルムポリマーを加水分解する	Izano et al. (2007) <i>J Dent Res</i> 86(7):618-622
	α-アミラーゼ	細胞外多糖類を加水分解する。	Craigen et al. (2011) <i>Open Microbiol J.</i> 5: 21-31
	セルラーゼ	バイオフィルムおよび藻類細胞壁のセルロース構成要素を加水分解する。	Loiselle et al. (2003) <i>Biofouling</i> 19(2):77-85
抗微生物ペプチド	ナイシン	微生物細胞膜の透過性を増加させる。	Li et al. (2018) <i>Appl Environ Microbiol</i> 18(12)
	バクテリオシン	作用の様態は、細胞壁合成の阻害および細胞膜透過性を増加させることを含む。	Meade et al. (2020) <i>Antibiotics</i> 9(1):32
	シデロフォア	鉄イオンに結合しかつ隔離する	Raaska et al. (1999) <i>J Indust Microbiol Biotechnol</i> 22, 27-32
	ポリミキシン	微生物細胞膜の透過性を増加させる。	Poirel et al. (2017) <i>Clin Microbiol Rev</i> 30:577-596
	ディフェンシン	微生物細胞膜の透過性を増加させる。	Gans (2003) <i>Nat Rev Immunol</i> 3, 710-720

10

20

【0073】

B. 殺生物化学物質

一部の実施形態において、本明細書に記載される T g a s e 変種は、例えば殺生物、防腐、抗細菌、または抗ウイルス（殺ウイルス）組成物としての使用のために、キトサン、ポリリジン、または第 4 級アンモニウム化合物を含むがそれらに限定されない、1 種または複数の殺生物化学物質とともに製剤化され得る。殺生物化学物質の非限定的な例は表 2 に示される。

【0074】

30

40

50

【表 2 - 1】

表 2. 抗微生物適用のための殺生物化学物質の例

分類	化学物質
ポリマー	キトサン
	N,N,N-トリメチルキトサン
	ε-ポリ-リジン
	ポリビニルベンジル-ジメチルブチルアンモニウムクロリド
	ポリビニルベンジルトリメチルアンモニウムクロリド
	第 4 級アンモニウムポリエチレンイミン
	第 4 級ホスホニウム修飾エポキシ化天然ゴム
	アルギニン-トリプトファンに富むペプチド
	グアニル化ポリメタクリレート(polymethacrylate)
	アンモニウムエチルメタクリレート(methacrylate)ホモポリマー
	メタロ-テルピリジンカルボキシメチルセルロース
	ポリ(n-ビニルイミダゾール)修飾シリコーンゴム
第 4 級アンモニウム	コカミドプロピル(Cocoamidopropyl)ベタイン
	ミリスタミドプロピル-pg-ジモニウム Cl リン酸
	塩化ベンザルコニウム
	クオタニウム-6
	ココベタイン
洗剤	ラウリル硫酸ナトリウム
	ドデシルベンゼンスルホン酸
カオトロピック剤	ポリアミドプロピルビグアニド
	塩化グアニジニウム
有機酸	乳酸
	クエン酸
	サリチル酸
	ソルビン酸
	酢酸
	デヒドロ酢酸
	過酢酸
	安息香酸

10

20

30

40

【0075】

50

【表 2 - 2】

フェノールおよびアルコール	エタノール
	イソプロパノール
	ジクロロベンジルアルコール
	グリセロール
	カプリリルグリコール
	エチルヘキシルグリセリン
	ベンジルアルコール
	2-フェノキシエタノール
アルデヒドおよびアルデヒド 放出体	グルタルアルデヒド
	ホルムアルデヒド
	ヒドロキシメチルグリセリン
	酸ナトリウム
塩基	DMDM ヒダントイン
酸化剤	水酸化ナトリウム
パラベン	過酸化水素
	メチルパラベン
	エチルパラベン
その他	プロピルパラベン
	ナタマイシン
	ベンズイソチアゾリノン
	ブノボル
	カプリル酸ソルビタン
	アルギン酸エチルラウロイル
	メチルイソチアゾリノン
	塩化セチルピリジニウム
	クロルフェネシン
	亜鉛オマミド(Omamide)
	ナトリウムオマミド
	N-(3-アミノプロピル)-N-ドデシルプロパン-1,3-ジアミン
	メチルクロロイソチアゾリノン
	2,2-ジブromo-3-ニトリプロピオンアミド
	1-オクタデカンアミニウム, N,N-ジメチル-N-[3-(トリメトキシシリル)プロピル]-, クロリド
	サポニン
	安息香酸ナトリウム

10

20

30

40

【0076】

1. 第4級アンモニウム化合物

キトサンおよびそのより多くアセチル化された形態のキチンのような、バイオポリマーを含有する第4級アンモニウム化合物は、それらの抗微生物活性で周知である（Kong, et al. (2010) Int. J. of Food Microbiol. 144: 51-63）。細菌、酵母、および真菌等の種々の群の微小生物に対する、キチン、キトサン、およびそれらの誘導体の抗微生物活性は公知である。

【0077】

第4級アンモニウム化合物（非限定的な例は、塩化セチルピリジニウム、塩化ベンゼトニウム、塩化ベンザルコニウム、ポリアミノプロピルビグアニドを含む）は、他の美容成

50

分との特異的不適合性に起因して、パーソナルケア産業に対して限られた使用を有する。

【0078】

L o n z a製のG e o g a r dシリーズの防腐剤混和物は、それらの新しい創出物（G e o g a r d 233S、G e o g a r d 233S、G e o g a r d 233S、G e o g a r d 361）においてパラベンの使用を回避しているが、しかしながらこれらの抗微生物組成物はカチオン性塩化ベンゼトニウムに基づき、それは、局所パーソナルケア製剤の重要な部分を形成する多くのアニオン性成分によって不活性化される。

【0079】

2. アルデヒドおよびアルデヒド放出化合物

ホルムアルデヒドは、カテゴリ-3 CMR（発癌性、変異原性、生殖毒性）として分類される。しかしながら、ホルムアルデヒドをゆっくりと放出するいくつかの抗微生物薬が依然として使用されており、商業的に製造されていることに注目することは興味深い。有効でかつ十分に受け入れられている抗微生物薬の少なさに起因して、産業は、DMDMヒダントイン（CAS 6440-58-0）、イミダゾリジニル尿素、およびジアゾリジニル尿素（CAS 39236-46-9）のようなホルムアルデヒドドナーの使用を続けざるを得ない。これらの物質によって放出されるホルムアルデヒドは、その極めて反応性の高いアルデヒドカルボニル官能性を介していくつかの美容成分と反応し得る。例えば、唯一の利用可能でかつ世界的に承認されたUV-A吸収剤のアヴォベンゾンは、ホルムアルデヒド誘導体によって放出されるホルムアルデヒドと反応する。これは、日焼け止め製剤にとって著しい不利である。防腐剤混和物のC l a r i a n t製のN i a p a g u a r d P D UおよびC o g n i s製のE l e s t a b 305、I S P製のG e r m a b e n I I、G e r m a b e n H-Eは、パラベンとジアゾリジニル尿素との組み合わせを活用する。I S P製のG e r m a l l P l u sおよびL o n z a製のG l y d a n t P l u sは、ヨードプロピニルブチルカルバメート（IPBC）とともにジアゾリジニル尿素を利用する。M c I n t y r e製のP a r a g o nシリーズは、DMDMヒダントイン、ならびにパラベン、フェノキシエタノール、およびIPBCのような他の抗微生物薬を有する。S y m r i s e製のN e o - D r a g o c i d eおよびT h o r製のM i c r o c a r e I M Pは、パラベンとイミダゾリジニル尿素との間の相乗効果を活用する。

【0080】

3. パラベン

パラベンは、p-ヒドロキシ安息香酸のエステルである。パラベン化合物は、特にメチルパラベン（CAS 99-76-3）、エチルパラベン（CAS 120-47-8）、プロピルパラベン（CAS 94-13-3）、ブチルパラベン（CAS 94-26-8）、イソプロピルパラベン（CAS 4191-73-5）、およびベンジルパラベン（CAS 94-18-8）を含む。C l a r i a n t製の「P h e n o n i p」は、そのうちの5種がパラベンである6種の抗微生物薬の混和物である。同社は、「N i p a s t a t」および「N i p a s e p t」としてパラベンのみの混和物を提供し、C o g n i s製のE l e s t a b F L 15、E l e s t a b 48、E l e s t a b 50J、E l e s t a b 305、E l e s t a b 388、E l e s t a b 3344、E l e s t a b 4112、E l e s t a b 4121、E l e s t a b 4150 L i p oはすべて、それらの中に少なくとも1種のパラベンを有する抗微生物薬の混和物である。I n d u c h e m製のU n i p h e n P 23、I S P製のG e r m a b e nおよびL i q u a P a rシリーズの混和物は、数種のパラベンを含有する。G a l a x y S u r f a c t a n t sは、フェノキシエタノールとともにそれぞれ4種および5種のパラベン混和物に基づくG a l g u a r d N K 1およびG a l g u a r d N K 2混和物を提供する。それらの「P a r a g o n」シリーズからのM c I n t y r e / R h o d i aによる5種の混和物は、数種のパラベンを有する。R o h m a n d H a a s製のN e o l o n e M X Pは、メチルイソチアゾリノンとともにパラベンを有する。S y m r i s e製のN e o - D r a g o c i d eシリーズの混和物はパラベンを有する。S

chulke and Mayr製のEuxyl K 300は、5種のパラベンを有する。Thor製のMicrocare PM4およびMicrocare PM5は、それぞれ4種および5種のパラベンを有する。パラベンはフェノール誘導体であり；すべてのフェノール性抗微生物薬は、10というpKaを有して、極めて酸性の水素を有する極めて反応性の高い有機官能基であるフェノール性「ヒドロキシル」基を有する。

【0081】

4. ハロゲン化合物

Nalco製のMerguardシリーズ（4種の混和物）は、ハロゲン化分子であるメチルジブロモ（dirbromo）グルタロニトリルおよび2-ブロモ-2-ニトロ-1, 3-ジオールに依存する。Schulke and Mayr製のEuxylシリーズの数の混和物は、クロロチアゾリノン、メチルジブロモグルタロニトリル、2-ブロモ-2-ニトロ-1, 3-ジオール、およびジアゾリジニル尿素に基づく。Thor製のMicrocareシリーズは、パラベン、2-ブロモ-2-ニトロ-1, 3-ジオール、ヨードプロピニルブチルカルバメート（IPBC）、イミダゾリジニル尿素、およびジアゾリジニル尿素を採用する。

【0082】

ハロゲン化抗微生物薬の他の例は、クロルフェネシンおよびクロルヘキシジンである。フェノール化合物のように、ハロゲン化有機分子が著しいレベルの有毒効果を呈することは常識である。例えば、IPBCは、そのヨウ素内容物に起因して、甲状腺ホルモン攪乱のリスクを有する。それは日本では許可されておらず、EUでは、つけて放っておく製品において最高0.02%までしか許可されていない。同様に、EUは、洗い流す製品においてのみ最高0.1%までしかメチルジブロモグルタロニトリルの使用法を認めていない。ブロナポールである2-ブロモ-2-ニトロブタン-1, 3-ジオールは、窒素含有美容成分の一部と相互作用する間に発癌性ニトロソアミンの生成に関わる。メチルクロロイソチアゾリノンの抗微生物効力は、それが、15ppm濃度で洗い流す製品においてしか許可されていないほど強力である。クロロメチルイソチアゾリノンは極めて広域の抗微生物活性を有するが、そのような強力な抗微生物薬の毒性は極度に高く、それゆえ化粧品考案者は、長時間ヒト皮膚にとどまる化粧品において、この種類の強力な抗微生物薬を使用することを好まない。低濃度（ppmレベル）の任意の強い殺細菌剤が、ヒト細胞を含めた生きた生物の任意の他の細胞に等しく致死的である可能性があるとは予想することは合理的である。製品が粘膜と接触し続ける場合、これは、日本においてクロロメチルイソチアゾリノンが防腐に対して許可されない正確な理由である。

【0083】

ハロゲン化合物は、2, 4-ジクロロベンジル-アルコール、クロロキシレノール（4-クロロ-3, 5-ジメチル-フェノールとしても知られる）、ブロナポール（2-ブロモ-2-ニトロブタン-1, 3-ジオールとしても知られる）、ヨードプロピニルブチルカルバメートを含む。

【0084】

C. ベクター送達

本明細書に記載される組成物は、本明細書に記載される1種または複数の殺生物酵素をコードする遺伝材料の送達のためのベクター（例えば、バクテリオファージ）を含み得る。

【0085】

本明細書において使用するとき、「バクテリオファージ」および「ファージ」は、単離株のメンバーが、ゲノムにおいて少なくとも約90%、95%、99%、99.9%のうちのいずれか、またはそれを上回る配列同一性を共有する等、実質的に同じ遺伝的構成を有するバクテリオファージ単離株を指すために互換可能に使用される。「バクテリオファージ」または「ファージ」は、親バクテリオファージならびにその子孫または誘導体（遺伝子操作されたバージョン等）を指す。バクテリオファージは、天然に存在するファージ単離株、または宿主細菌の内側にいるファージの生活環を実行するための、ファージの少

なくともすべての必須遺伝子もしくは全ゲノムをコードするベクターもしくは核酸を含めた、操作されたファージであり得る。

【0086】

IV. 製品

本明細書に開示される製品は、製品において抗微生物剤、例えば防腐剤として作用する、有効量の、例えば約0.0001%w/v～約5%w/vの本明細書に記載されるTgase変種酵素、または本明細書に記載されるその組成物を含む、パーソナルケア製品、家庭用製品、産業用製品、食料品、医薬製品、美容製品、ヘルスケア製品、海産物、塗料製品、コーティング製品、接着剤製品、エネルギー製品、プラスチック製品、パッケージング製品、または農産物を含む。

10

【0087】

一部の実施形態において、1種または複数のTgase変種は、棒状せっけん、液体せっけん（例えば、ハンドソープ）、手の除菌剤（洗い流すおよびつけて放っておくアルコールベースおよび水性ベースの手の消毒剤を含む）、術前の皮膚消毒剤、洗浄用ワイプ、消毒用ワイプ、ボディーウォッシュ、ざ瘡治療製品、抗真菌性おむつかぶれクリーム、抗真菌性皮膚クリーム、シャンプー、コンディショナー、化粧品（リキッドまたはパウダーファンデーション、リキッドまたはソリッドアイライナー、マスカラ、クリームアイシャドウ、色付きのパウダー、乾燥させてまたは湿らせて使用される「パンケーキ」タイプのパウダー、メイク除去製品等を含むがそれらに限定されない）、防臭剤、抗微生物性クリーム、ボディーローション、ハンドクリーム、局所クリーム、アフターシェーブローション、皮膚化粧水、洗口剤、歯磨き粉、日焼け止めローション、ならびに洗浄用ワイプ、ベビーシャンプー、ベビーせっけん、およびおむつクリーム等であるがそれらに限定されないベビー製品等であるがそれらに限定されないパーソナルケア製品に含まれる。一部の実施形態において、1種または複数のTgase変種は、創傷治癒軟膏、クリーム、およびローション、創傷被覆剤、熱傷クリーム、包帯、テープ、ならびにステリストリップ等であるがそれらに限定されない創傷ケア品目、ならびに医療用ガウン、キャップ、フェイスマスク、および靴カバー、サージカルドロップ（surgical drop）等の医療用品に含まれる。一部の実施形態において、1種または複数のTgase変種は、洗口液、歯磨き粉、もしくは歯科用フロスコーティング等の口腔ケア製品、獣医用製品もしくはペットケア製品、防腐組成物、または消毒溶液、スプレー、もしくはワイプ等の表面消毒剤に含まれる。

20

30

【0088】

一部の実施形態において、1種または複数のTgase変種は、例えば防腐物質として、家庭用または産業用製品に組み入れられる。例えば、Tgase変種は、濃縮液体洗浄剤またはスプレー洗浄剤、洗浄用ワイプ、食器洗い液、食器洗い洗剤、スプレーモップ液、家具艶出し剤、屋内用塗料、屋外用塗料、ほこり取りスプレー、洗濯用洗剤、織物柔軟剤、ラグマット／織物洗浄剤、窓およびガラス洗浄剤、便器洗浄剤、液体／クリーム洗浄剤等の家庭用洗浄剤に含まれ得る。一部の実施形態において、1種または複数のTgase変種は、例えば消費、パッケージング、および食品コーティングの前に果物および野菜を洗浄するために設計された、食品洗い製品に含まれ得る。

40

【0089】

本明細書に記載されるTgase変種が組み入れられ得る他の製品は、食料品、医薬製品、美容製品、ヘルスケア製品、海産物、塗料製品、コーティング製品、エネルギー製品（例えば、水圧破碎液）、プラスチック製品、パッケージング製品、および農産物を含むが、それらに限定されるわけではない。一部の実施形態において、Tgase変種は、HVACシステム、冷却池、水精製システムに組み入れられ得る、またはパルプおよび紙加工等であるがそれらに限定されない産業適用において使用され得る。

【0090】

本明細書に開示される製品は、皮膚の1種もしくは複数のタンパク質、例えばコラーゲン、ケラチン、および／もしくはエラスチンに、または加工食料品に対する食用ケーシン

50

グ、例えばソーセージケーシング等の食料品のタンパク質に共有結合させる等、表面に着色するのに有効な量で、本明細書に記載される T g a s e 変種またはその組成物、および 1 種または複数の色産生分子を含む、化粧品およびパーソナルケア製品を含む。一部の実施形態において、T g a s e 変種酵素の有効量は、最高で約 1 % w / v である。

【0091】

一部の実施形態において、本明細書に記載される T g a s e 変種を含む製品または組成物は、アシルトランスフェラーゼ、アルファアミラーゼ、ベータアミラーゼ、アルファガラクトシダーゼ、アラビノシダーゼ、アリアルエステラーゼ、ベータガラクトシダーゼ、カラギーナーゼ (carrageenase)、カタラーゼ、セロビオヒドロラーゼ、セルラーゼ、コンドロイチナーゼ、クチナーゼ、エンドベクター 1, 4-グルカナーゼ、エンドベクターマンナーゼ、エステラーゼ、エクソマンナーゼ、ガラクタナーゼ (galactanase)、グルコアミラーゼ、ヘミセルラーゼ、ヒアルロニダーゼ、ケラチナーゼ、ラッカーゼ、ラクターゼ、リグニナーゼ、リパーゼ、リポキシゲナーゼ、マンナーゼ、オキシダーゼ、ペクチン酸リアーゼ、ペクチンアセチルエステラーゼ、ペクチナーゼ、ペントサナーゼ (pentosanase)、ペルオキシダーゼ、フェノールオキシダーゼ、ホスファターゼ、ホスホリパーゼ、フィターゼ、ポリガラクトツロナーゼ、ベータグルカナーゼ、タンナーゼ、キシランアセチルエステラーゼ、キシラナーゼ、キシログルカナーゼ (xyloglucanase)、キシロシダーゼ、メタロプロテアーゼ、セリンプロテアーゼ、またはその組み合わせから選択される 1 種または複数の付加的な酵素をさらに含む。

【0092】

一部の実施形態において、その円順列変異体を含めた、任意選択で N 末端メチオニン残基を有し、かつ任意選択で本明細書に記載されるプロ配列を有する、表 3 に開示される変種のいずれか等、T g a s e 変種酵素、または本明細書に記載されるその組成物は、少なくとも約 0.0001 % w / v、0.0005 % w / v、0.001 % w / v、0.005 % w / v、0.01 % w / v、0.05 % w / v、0.1 % w / v、0.5 % w / v、1 % w / v、1.5 % w / v、2 % w / v、2.5 % w / v、3 % w / v、3.5 % w / v、4 % w / v、4.5 % w / v、または 5 % w / v のうちのいずれかの濃度で、本明細書に開示される製品のいずれかに抗微生物剤として含まれる。一部の実施形態において、T g a s e 変種酵素またはその組成物は、約 0.0001 % w / v ~ 約 0.0005 % w / v、約 0.001 % w / v ~ 約 0.005 % w / v、約 0.005 % w / v ~ 約 0.01 % w / v、約 0.01 % w / v ~ 約 0.05 % w / v、約 0.05 % w / v ~ 約 0.1 % w / v、約 0.1 % w / v ~ 約 0.5 % w / v、約 0.5 % w / v ~ 約 1 % w / v、約 1 % w / v ~ 約 1.5 % w / v、約 1.5 % w / v ~ 約 2 % w / v、約 2 % w / v ~ 約 2.5 % w / v、約 2.5 % w / v ~ 約 3 % w / v、約 3 % w / v ~ 約 3.5 % w / v、約 3.5 % w / v ~ 約 4 % w / v、約 4 % w / v ~ 約 4.5 % w / v、約 4.5 % w / v ~ 約 5 % w / v、約 0.0001 % w / v ~ 約 0.001 % w / v、約 0.001 % w / v ~ 約 0.01 % w / v、約 0.01 % w / v ~ 約 0.1 % w / v、約 0.1 % w / v ~ 約 1 % w / v、約 1 % w / v ~ 約 2.5 % w / v、約 2.5 % w / v ~ 約 5 % w / v、または約 1 % w / v ~ 約 5 % w / v のうちのいずれかの濃度で含まれる。

【0093】

一部の実施形態において、本明細書に記載される T g a s e 変種酵素またはその組成物が抗微生物剤として含まれる製品は、パラベン、ホルムアルデヒドおよびホルムアルデヒド放出体、イソチアゾリノン、フェノキシエタノール、ならびに／または有機酸（安息香酸ナトリウム等）等であるがそれらに限定されない、石油化学由来の防腐物質を含まない。一部の実施形態において、単独での、または殺生物化学物質、例えばキトサンとの組み合わせでの、本明細書に記載される T g a s e 変種酵素は、製品における唯一の抗微生物剤、例えば抗細菌剤または防腐剤である。一部の実施形態において、本明細書に記載される T g a s e 変種酵素は、1 種または複数の石油化学由来の防腐物質等であるがそれらに限定されない 1 種または複数の付加的な抗微生物剤との組み合わせで、抗微生物剤として含まれる。一部の実施形態において、本明細書に記載される T g a s e 変種酵素は、1 種

または複数の石油化学由来の防腐物質等であるがそれらに限定されない１種または複数の付加的な抗微生物剤との組み合わせで、抗微生物剤として含まれる。

【００９４】

一部の実施形態において、防腐剤混和物は、製品と適合性であり、酸化剤または還元剤に対して、および様々な製品の正常域のpH（４．５～８．０）に対して安定である。

【００９５】

本明細書に記載されるT g a s e変種が組み入れられ得る製品の非限定的な例は、参照によりそれらの全体として本明細書に組み入れられる、P C T出願第P C T / U S 2 0 / 2 1 2 1 1号明細書に、ならびに米国仮出願第63 / 0 1 0 , 9 8 7号明細書、第63 / 0 7 4 , 2 8 8号明細書、および第63 / 0 7 5 , 7 6 3号明細書に記載される。

10

【００９６】

A. パーソナルケア製品

本明細書に記載されるT g a s e変種酵素またはその組成物、例えば防腐組成物は、任意のパーソナルケア製品に組み入れられ得る。開示されるT g a s e変種酵素組成物が組み入れられ得るパーソナルケア製品は、棒状せっけん、液体せっけん（例えば、ハンドソープ）、手の除菌剤（洗い流すおよびつけて放っておくアルコールベースおよび水性ベースの手の消毒剤を含む）、術前の皮膚消毒剤、洗浄用ワイプ、消毒用ワイプ、ボディーウォッシュ、ざ瘡治療製品、抗真菌性おむつかぶれクリーム、抗真菌性皮膚クリーム、シャンプー、コンディショナー、化粧品（リキッドまたはパウダーファンデーション、リキッドまたはソリッドアイライナー、マスカラ、クリームアイシャドウ、色付きのパウダー、乾燥させてまたは湿らせて使用される「パンケーキ」タイプのパウダー、メイク除去製品等を含むがそれらに限定されない）、防臭剤、抗微生物性クリーム、ボディーローション、ハンドクリーム、局所クリーム、アフターシェーブローション、皮膚化粧水、洗口剤、歯磨き粉、日焼け止めローション、ならびに洗浄用ワイプ、ベビーシャンプー、ベビーせっけん、およびおむつクリーム等であるがそれらに限定されないベビー製品を含むが、それらに限定されるわけではない。本主題は、創傷治療軟膏、クリーム、およびローション、創傷被覆剤、熱傷クリーム、包帯、テープ、ならびにステリストリップ等であるがそれらに限定されない創傷ケア品目、ならびに医療用ガウン、キャップ、フェイスマスク、および靴カバー、サージカルドロップ等の医療用品にも適用され得る。付加的なパーソナルケア製品は、洗口液、歯磨き粉、歯科用フロスコティング等の口腔製品、獣医用製品およびペットケア製品、防腐組成物、ならびに溶液、スプレー、またはワイプを含めた表面消毒剤を含むが、それらに限定されるわけではない。

20

30

【００９７】

概して、本明細書に開示されるT g a s e変種酵素は、美容製品（例えば、口紅、ファンデーション、頬紅、またはアイメイク）等、皮膚の外観を修飾することにおける使用を意図される任意の適切なパーソナルケア製品に組み入れられ得る。開示される組成物が組み入れられ得る美容製品は、リキッドもしくはパウダーファンデーション、リキッドもしくはソリッドアイライナー、頬紅、アイシャドウ、色付きのパウダー、乾燥させてもしくは湿らせて使用される「パンケーキ」タイプのパウダー、リップカラー、またはメイクを整えるスプレー等を含むが、それらに限定されるわけではない。開示される組成物は、ブロンザーまたは人工タンニング製品にも組み入れられ得る。付加的に、開示される組成物は、例えば日焼け止め発色団（オキシベンゾン、アヴォベンゾン、オクチサレート（octisalate）、オクトクリレン、ホモサレート（homosalate）、もしくはオクチノクセート（octinoxate）、またはその誘導体等であるがそれらに限定されない）を皮膚タンパク質に結合させる、化学的日焼け止め等の日焼け止め製品に組み入れられ得る。

40

【００９８】

一部の実施形態において、開示される酵素および組成物によって微生物夾雑から保護されるパーソナルケア製品は、乳濁液、ゲル、セラム、溶液、化粧水、ローション、クリーム、スプレー、ゲル、パウダー、スティック、および洗浄剤等の任意のタイプであり得る。

50

【0099】

パーソナルケア製品製剤は、典型的に、本開示の防腐組成物が添加される基本製剤を含む。基本製剤は、最終使用の適用に応じて、数々のかつ異なる成分を含有し得る。パーソナルケア製品製剤は、例えば溶媒、界面活性剤、乳化剤、粘度因子、コンディショナー、軟化剤、皮膚ケア成分、保湿剤、増粘剤、潤滑剤、充填剤、抗酸化剤、他の防腐剤、活性成分、特に皮膚科学的活性成分、香料等、ならびにその混合物を含有し得る。本明細書で言及される活性成分は、例えば抗炎症剤、ならびに任意選択で、抗細菌薬、抗真菌薬、および同様の作用物質を含む。局所適用に適した活性成分は特に好ましい。

【0100】

一部の実施形態において、パーソナルケア製品は、石油化学由来の防腐物質等、いかなる付加的な防腐剤も含有しない。一部の実施形態において、パーソナルケア製品は、本明細書に記載される酵素または酵素／ポリマー組成物に加えて、石油化学由来の防腐剤等の1種または複数の付加的な防腐物質を含む。

10

【0101】

一部の実施形態において、パーソナルケア製品は、パーソナルケア製品に典型的に含まれる従来の抗細菌および／または抗真菌「活性剤」を含まない。ハンドソープにおいて使用される従来の抗細菌薬は、クロフルカルバン、フルオロサラン、ヘキサクロロフェン、ヘキシルレゾルシノール、ヨウ素錯体（アンモニウムエーテルサルフェート（sulfate）およびポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート（monolaurate））、ヨウ素錯体（アルキルアリアルオキシポリエチレングリコールのリン酸エステル）、ノニルフェノキシポリ（エチレンオキシ）エタノールヨウ素（ethanoliodine）、ポロキサマーヨウ素錯体、ポビドン、塩化ウンデコイルヨウ素錯体、塩化メチルベンゼトニウム、フェノール、フェノール16、第2級アミルトリクレゾール、オキシクロロセンナトリウム、トリブロムサラン、トリクロカルバン、トリクロサン、およびトリプル色素（Triple dye）を含む。消費者製品製剤において防腐剤として使用される従来の抗微生物薬は、パラベン、ホルムアルデヒドおよびホルムアルデヒド放出体、イソチアゾリノン、フェノキシエタノール、ならびに有機酸（安息香酸ナトリウム等）を含む。

20

【0102】

一部の実施形態において、単独での、またはキトサンを含むがそれに限定されない殺生物化学物質との組み合わせ（例えば、混和物）での、本明細書に記載されるT g a s e変種酵素は、製品における唯一の抗細菌剤、抗真菌剤、抗微生物剤、または防腐剤である。一部の実施形態において、単独での、またはキトサン等であるがそれらに限定されない殺生物化学物質との組み合わせ（例えば、混和物）でのT g a s e変種酵素は、1種または複数の石油化学由来の防腐物質等の1種または複数の付加的な防腐物質と組み合わせられる。一部の実施形態において、1種または複数のバイオベースの防腐剤（すなわち、本明細書に開示されるT g a s e変種酵素またはその組成物）は、1種または複数の合成防腐剤（例えば、石油化学由来の物質）と組み合わせられ、バイオベースおよび合成防腐剤の間で達成される防腐（例えば、抗微生物）効果は、相加的または相乗的である。一部の実施形態において、1種または複数のバイオベースの防腐剤（すなわち、本明細書に開示されるT g a s e変種酵素またはその組成物）は、1種または複数の付加的な防腐物質、例えばポリリジン、キトサン、ベンゾエート（benzoate）、ナイシン、リゾチーム、およびキトサン、またはその任意の組み合わせから選択される殺生物物質と組み合わせられ、バイオベースの防腐剤と付加的な防腐物質との間で達成される防腐（例えば、抗微生物）効果は、相加的または相乗的である。

30

40

【0103】

一部の実施形態において、パーソナルケア製品は軟化剤を含み得る。軟化剤は、限定されることなく、アーモンド油、ヒマシ油、セラトニア抽出物、セトステアロイルアルコール、セチルアルコール、セチルエステルワックス、コレステロール、綿実油、シクロメチコン、パルミトステアリン酸エチレングリコール、グリセリン、モノステアリン酸グリセリン、モノオレイン酸グリセリル、ミリスチン酸イソプロピル、パルミチン酸イソプロピ

50

ル、ラノリン、レシチン、軽油、中鎖トリグリセリド、鉱油およびラノリンアルコール、ワセリン、ワセリンおよびラノリンアルコール、ダイズ油、デンプン、ステアリンアルコール、ヒマワリ油、キシリトール、ならびにその組み合わせを含む。1つの実施形態において、軟化剤は、エチルヘキシルステアレート (ethylhexylstearate) およびエチルヘキシルパルミテート (palmitate) である。

【0104】

よく見られる乳化剤は、金属せっけん、ある特定の動物および植物油、ならびに様々な極性化合物である。適切な乳化剤は、アカシア、アニオン性乳化ワックス、ステアリン酸カルシウム、カルボマー、セトステアリンアルコール、セチルアルコール、コレステロール、ジエタノールアミン、パルミトステアリン酸エチレングリコール、モノステアリン酸グリセリン、モノオレイン酸グリセリル、ヒドロキシプロピル (hydroxypyl) セルロース、ヒプロメロース、ラノリン、含水 (hydrous)、ラノリンアルコール、レシチン、中鎖トリグリセリド、メチルセルロース、鉱油およびラノリンアルコール、リン酸二水素ナトリウム、モノエタノールアミン、非イオン性乳化ワックス、オレイン酸、ポロキサマー (poloxamer)、ポロキサマー (poloxamers)、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンヒマシ油誘導体、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ステアリン酸ポリオキシエチレン、アルギン酸プロピレングリコール、自己乳化性モノステアリン酸グリセリル、クエン酸ナトリウム二水和物 (dehydrate)、ラウリル硫酸ナトリウム、ソルビタンエステル、ステアリン酸、ヒマワリ油、トラガカント、トリエタノールアミン、キサンタンガム、ならびにその組み合わせを含む。1つの実施形態において、乳化剤はステアリン酸グリセロールである。

10

20

【0105】

適切な非イオン性界面活性剤は、乳化ワックス、モノオレイン酸グリセリル、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンヒマシ油誘導体、ポリソルベート、ソルビタンエステル、ベンジルアルコール、安息香酸ベンジル、シクロデキストリン、モノステアリン酸グリセリン、ポロキサマー、ポビドン、およびその組み合わせを含む。1つの実施形態において、非イオン性界面活性剤はステアリンアルコールである。

【0106】

適切な抗酸化剤は、例えば亜硫酸塩 (例えば、亜硫酸ナトリウム)、トコフェロールまたはその誘導体、アスコルビン酸またはその誘導体、クエン酸、没食子酸プロピル、キトサングリコール酸、システイン、N-アセチルシステイン+硫酸亜鉛、チオ硫酸塩 (例えば、チオ硫酸ナトリウム)、ポリフェノール、グルタチオン、ジチオトレイトール (DTT)、スーパーオキシドジスルフィド、カタラーゼ等を含む。

30

【0107】

エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) 等のキレート剤も含まれ得る。

【0108】

適切な増粘剤は、例えばアクリレート (acrylate) /ステアレス-20メタクリレート (methacrylate) 共重合体、カルボマー、カルボキシメチルデンプン、ミツロウ、ジメチコン/ビニルジメチコンクロスポリマー、アルギン酸プロピレングリコール、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、シリカ、ジメチルシリル化シリカ、キサンタンガム、および水添ブチレン/エチレン/スチレン共重合体を含む。

40

【0109】

適切な保湿剤は、例えばブチレングリコール、セチルアルコール、ジメチコン、酒石酸ジミリスチル、グルコース、グリセレス-26、グリセリン、ステアリン酸グリセリル、加水分解乳タンパク質、乳酸、ラクトースおよび他の糖、ラウレス-8、レシチン、オクトキシグリセリン、PEG-12、PEG-135、PEG-150、PEG-20、PEG-8、ペンチレングリコール、ヘキシレングリコール、フィタントリオール、ポリクオタニウム-39、PPG-20メチルグルコースエーテル、プロピレングリコール、ヒアルロン酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、PCAナトリウム、ソルビトール、スクシノグ

50

リカン、合成蜜ろう、クエン酸トリアルキル C 1 4 - 1 5、ならびにデンプンを含む。

【 0 1 1 0 】

1. 色分子

本明細書に記載される組成物は、表面への適用のための、ならびにコラーゲン、ケラチン、および／もしくはエラスチン等、皮膚の表面の 1 種もしくは複数のタンパク質に結合させる等の表面に結合させるための、またはソーセージケーシング等の食料品に対する食用ケーシングに結合させるための、色素または顔料分子等の 1 種または複数の色産生分子を含有し得る。色産生分子の非限定的な例は、"Summary of Color Additives for Use in the United States in Foods, Drugs, Cosmetics, and Medical Devices," US Food and Drug Administration、<https://www.fda.gov/industry/color-additive-inventories/summary-color-additives-use-united-states-foods-drugs-cosmetics-and-medical-devices>に記載される。

10

【 0 1 1 1 】

2. 日焼け止め分子およびリンカー

本明細書に記載される組成物は、製品製剤内のタンパク質もしくはペプチドへの、またはコラーゲン、ケラチン、エラスチン、加水分解コラーゲン、加水分解ケラチン、および／もしくは加水分解エラスチン等、皮膚の表面のタンパク質もしくはペプチドへの適用およびそれらに結合させるための、日焼け止め等の 1 種または複数の UV 遮断分子を含有し得る。

【 0 1 1 2 】

日焼け止めおよび／または日焼け止め類似体分子の非限定的な例は、パラアミノ安息香酸、トロラミンサリチル酸、シノキサート (cinoxate)、ジオキシベンゾン、エンズリゾール、ホモサレート (homosalate)、メラジマート (meradimate)、オクチノクセート (octinoxate)、オクチサレート (octisalate)、オクトクリレン、パディメート (padimate) O、スリソベンゾン、オキシベンゾン、アヴォベンゾン、およびベンゾフェノンヒドラゾンを含むが、それらに限定されるわけではない。

20

【 0 1 1 3 】

一部の実施形態において、日焼け止めは、タンパク質またはペプチドへの酵素的結合のための基質ハンドルを提供するリンカー分子で官能化される。この官能化の非限定的な例は、日焼け止め分子とリンカーとの間のシッフ塩基の形成を通じて遂行され得る。この官能化の非限定的な例は、日焼け止め分子とリンカーとの間のカルバメート (carbamate) 連結の形成を通じて遂行され得る。リンカーは、第 1 級アミン、ヒドラジン、ヒドラジド、またはアルコキシアミン部分の形態における酵素認識のために利用可能なアミンを含有し得る。リンカーは、酵素認識のためのグルタミン残基も含有し得る。リンカーは、日焼け止め-リンカー分子のインサイチュー形成のための、様々な長さの脂肪酸炭素鎖によって連結された 2 つの化学官能性末端基からなり得る。リンカーの非限定的な例は、リジン、カダベリン、プトレシン、ヒドラジン、アジピン酸ジヒドラジド、セバシン酸ジヒドラジド、およびヘキサメチレンジアミンを含む。

30

【 0 1 1 4 】

一部の実施形態において、日焼け止め-リンカー付加物は、関心対象のタンパク質またはペプチドに結合され、その後、日焼け止めは加水分解によって放出され得る。1 つの実施形態において、日焼け止め分子は加水分解性である、または別様にリンカーから放出可能である。一部の実施形態において、日焼け止め-リンカー付加物は、UV 遮断保護を提供するために、タンパク質またはペプチド、例えば皮膚に存在するタンパク質またはペプチドに結合したままである。

40

【 0 1 1 5 】

3. タンパク質およびペプチド

本明細書に記載される組成物は、日焼け止め、皮膚ケア、および／もしくは美容製品、または使用の適用のための、関心対象の 1 種または複数のタンパク質またはペプチドを含有し得る。皮膚ケア製品および化粧品に対する関心対象のタンパク質およびペプチドの非

50

限定的な例は、コラーゲン、加水分解コラーゲン、ケラチン、加水分解ケラチン、エラスチン、加水分解エラスチン、シルク、加水分解シルク、シルクフィブロインペプチド、アセチルヘキサペプチド-3、アセチルヘキサペプチド-8、アセチルテトラペプチド-5、アセチルテトラペプチド-9、アセチルアルギニルトリプトフィルジフェニルグリシン、銅トリペプチド-1、C T-2、ジペプチド-2、ヘプタペプチド-7、酢酸ヘキサノイルジペプチド-3 ノルロイシン、ヘキサペプチド-9、ヘキサペプチド-11、トリペプチド-1 マンガン、ミリストイルヘキサペプチド-16、ミリストイルヘキサペプチド-16、ミリストイルペンタペプチド-17、ノナペプチド-1、パルミトイルジペプチド-5 ジアミノブチロイルヒドロキシトレオニン、パルミトイルジペプチド-5 ジアミノヒドロキシ酪酸、パルミトイルヘキサペプチド-12、パルミトイルヘキサペプチド-14、パルミトイルヘキサペプチド-6、パルミトイルペンタペプチド-4、パルミトイルテトラペプチド-7、パルミトイルトリペプチド-1、パルミトイルトリペプチド-3、パルミトイルトリペプチド-38、ペンタペプチド-3、ペンタペプチド-18、s h-オリゴペプチド-1、s h-オリゴペプチド-2、s h-ポリペプチド-1、s h-ポリペプチド-11、s h-ポリペプチド-9、ダイズペプチド、テトラペプチド P K E K、テトラペプチド-21、トリペプチド-1、トリペプチド-10 シトルリン、およびヘモグロビン、米、大豆、小麦タンパク質、トウモロコシ、フィブロンекチン、レチクリン、血清タンパク質、小麦グルテンの改変された加水分解物である。

10

【0116】

本明細書に記載される組成物は、関心対象の1種または複数のモデルペプチドを含有し得る。関心対象のモデルペプチドの1つの非限定的な例は、C b z - G l n - G l yを含む。

20

【0117】

B. 家庭用／産業用製品

単独で、または1種もしくは複数の石油化学由来の防腐物質等の1種もしくは複数の付加的な防腐物質との組み合わせで、開示されるT g a s e変種酵素または本明細書に開示されるその組成物を防腐物質として組み入れ得る家庭用／産業用製品の非限定的な実施形態は、濃縮液体洗浄剤およびスプレー洗浄剤、洗浄用ワイプ、食器洗い液、食器洗い洗剤、スプレーモップ液、家具艶出し剤、屋内用塗料、屋外用塗料、ほこり取りスプレー、洗濯用洗剤、織物柔軟剤、ラグマット／織物洗浄剤、窓およびガラス洗浄剤、便器洗浄剤、液体／クリーム洗浄剤等の家庭用洗浄剤（householder）を含むが、それらに限定されるわけではない。特定の実施形態において、本明細書に記載される組成物は、例えば消費の前に果物および野菜を洗浄するために設計された、食品洗い製品において使用され得る。一部の実施形態において、1種または複数のバイオベースの防腐剤（すなわち、本明細書に開示されるT g a s e変種酵素またはその組成物）は、1種または複数の合成防腐剤（例えば、石油化学由来の物質）と組み合わせられ、バイオベースおよび合成防腐剤の間で達成される防腐（例えば、抗微生物）効果は、相加的または相乗的である。

30

【0118】

C. 革

概して、本明細書に記載されるT g a s e変種酵素は、任意の天然コラーゲン含有製品に組み入れられ得る、または動物もしくは非動物由来のコラーゲン、ケラチン、シルク、および／もしくはエラスチンタンパク質等、革における1種もしくは複数のタンパク質に色を共有結合させるような、革を改変する革加工の間に使用され得る。

40

【0119】

D. 食料品

概して、本明細書に記載されるT g a s e変種酵素は、任意の食品タンパク質に組み入れられ得る、または食品タンパク質の色を改変する食品加工の間に使用され得る。開示されるT g a s e変種酵素が組み入れられ得る食料品は、コラーゲンまたはゼラチン（加水分解コラーゲン）を含有する動物由来の製品を含むが、それらに限定されるわけではない。これらは、ゼラチン製品、肉製品もしくはソーセージケーシング、ポークラインズ（p

50

ork rind) 等の肉類似体製品、または動物の皮膚の層および／もしくはコラーゲンを含む任意の肉製品もしくは海産物を含むが、それらに限定されるわけではない。加えて、酵素組成物は、非動物由来のコラーゲン含有製品または任意のコラーゲン含有製品に組み入れられ得る。

【0120】

E. 他の製品

開示される T g a s e 変種酵素または本明細書に開示されるその組成物が組み入れられ得る他の製品は、食料品、医薬製品、美容製品、ヘルスケア製品、海産物、塗料製品、コーティング製品、接着剤製品、エネルギー製品（例えば、水圧破砕液）、プラスチック製品、パッケージング製品、および農産物を含むが、それらに限定されるわけではない。一部の実施形態において、開示される酵素または本明細書に開示される酵素-ポリマー組成物は、HVACシステム、冷却池、水精製システムに組み入れられ得る、またはパルプおよび紙加工等であるがそれらに限定されない産業適用において使用され得る。

10

【0121】

一部の実施形態において、殺生物酵素、すなわち本明細書に開示される T g a s e 変種酵素は、1種または複数の石油化学由来の防腐物質等の1種または複数の付加的な防腐物質と組み合わせられる。一部の実施形態において、1種または複数のバイオベースの防腐剤（すなわち、本明細書に開示される T g a s e 変種酵素またはその組成物）は、1種または複数の合成防腐剤（例えば、石油化学由来の物質）と組み合わせられ、バイオベースおよび合成防腐剤の間で達成される防腐（例えば、抗微生物）効果は、相加的または相乗的である。

20

【0122】

V. 使用の方法

タンパク質またはペプチドの架橋が所望されるまたは有益である使用の様々な適用における、本明細書に開示される T g a s e 変種（その円順列変異体を含めた、任意選択でN末端メチオニン残基を有し、かつ任意選択で本明細書に記載されるプロ配列を有する、表3に開示される変種のいずれかを含む）の使用のための方法が提供される。

【0123】

本明細書に記載される T g a s e 変種は、防腐剤、抗微生物、医薬、美容、局所、産業、エネルギー、ヘルスケア、または海洋適用等であるがそれらに限定されない使用の適用において使用され得る。

30

【0124】

T g a s e 変種は、ヘルスケア製品、パーソナルケアまたは美容製剤、パッケージング（食品、化粧品、および医薬品）、布および革産生、塗料およびコーティング、ならびに水処理および精製を含めた海洋適用における適用を有して、抗微生物剤として採用される。T g a s e 変種は、関心対象のタンパク質、例としてケラチンおよびコラーゲンを、色素またはタンパク質で永続的に修飾するために採用され得る。

【0125】

本明細書に記載される T g a s e 変種が使用され得る方法の非限定的な例は、参照によりそれらの全体として本明細書に組み入れられる、PCT出願第PCT/US20/21211号明細書に、ならびに米国仮出願第63/010,987号明細書、第63/074,288号明細書、および第63/075,763号明細書に記載される。

40

【0126】

A. 防腐方法

本明細書に記載される T g a s e 変種（すなわち、その円順列変異体を含めた、任意選択でN末端メチオニン残基を有し、かつ任意選択で本明細書に記載されるプロ配列を有する、表3に開示される変種のいずれか）は、防腐剤を要する様々な適用、例えばパーソナルケア製品、家庭用製品、産業用製品、食料品、医薬製品、美容製品、ヘルスケア製品、海産物、塗料製品、コーティング製品、接着剤製品、エネルギー製品、プラスチック製品、パッケージング製品、および農産物における、パラベン、ホルムアルデヒド、およびグ

50

ルタルアルデヒド等であるがそれらに限定されない従来の防腐剤、ならびに銀（創傷ケア製品において使用される）を含めた従来の殺生物剤の代替品としてまたはそれに加えて使用され得る。T g a s e 変種は、潜在的に有害な細菌、真菌、および／または他の微生物の成長を阻害する抗微生物（例えば、防腐剤）成分として使用され得、したがって、そのような製品における細菌、真菌、および／または微生物成長を阻害する有効量で、保存される対象となる製品に添加される。使用のそのような適用の非限定的な例は、例えば、本明細書における参照によりその全体として組み入れられる P C T / U S 2 0 / 2 1 2 1 1 明細書に記載される。一部の実施形態において、U S P < 5 1 > 通過基準、すなわち、カテゴリ 2 の製品に関して：細菌：14 日目の時点で初回算出カウントから少なくとも 2 . 0 対数の低下、および 28 日目の時点で 14 日目のカウントからの増加なし；酵母およびカビに関して：14 および 28 日目の時点で初回算出カウントからの増加なし、が達成される。一部の実施形態において、酵素および酵素-バイオポリマー共製剤（coformulation）の抗微生物挙動は、グラム陽性およびグラム陰性細菌ならびに真菌に対する M I C（最小阻害濃度）によって特徴付けられ、それは、およそ 80 ~ 100 % の微生物成長の低下、または微生物成長の少なくとも約 80 %、85 %、90 %、95 %、98 %、もしくは 99 % のうちのいずれかの低下をもたらす。

10

【0127】

本明細書に記載される製品、例えばパーソナルケア製品、家庭用製品、産業用製品、食料品、医薬製品、美容製品、ヘルスケア製品、海産物、塗料製品、コーティング製品、接着剤製品、エネルギー製品、プラスチック製品、パッケージング製品、もしくは農産物と、または本明細書に開示される製品もしくはシステムのいずれかにおいて、例えば製剤において組み合わせられた場合、または防腐剤として製品もしくはシステムに組み入れられた場合、組成物は、幅広い pH 域にわたって有効な広域防腐活性を有し得る。

20

【0128】

一部の実施形態において、方法は、本明細書に記載される防腐組成物（例えば、本明細書に記載される T g a s e 変種またはその組成物）を、パーソナルケア製品、家庭用製品、産業用製品、食料品、医薬製品、美容製品、ヘルスケア製品、海産物、塗料製品、コーティング製品、接着剤製品、エネルギー製品、プラスチック製品、パッケージング製品、もしくは農産物等の製品もしくはシステムに、または本明細書に開示される製品もしくはシステムのいずれかにおいて、例えば製剤において添加するステップ、または製品もしくはシステムに組み入れるステップを含み、防腐組成物を含有しない同一の製品と比較して、微生物成長は減少しかつ／または製品の貯蔵寿命は増加する。一部の実施形態において、ホルムアルデヒドおよび／またはグルタルアルデヒド等であるがそれらに限定されない他の防腐剤は、製品組成物に含まれない。

30

【0129】

一部の実施形態において、パーソナルケア製品、家庭用製品、または産業用製品等の製品組成物の貯蔵寿命、完全性、または微生物不含（例えば、細菌および／または真菌不含）状態を増加させるための方法であって、方法は、製品（例えば、パーソナルケア製品、家庭用製品、または産業用製品）に本明細書に記載される防腐組成物の有効量を組み入れるステップを含む、方法が提供される。一部の実施形態において、有効量は、M I C（最小阻害濃度）と称される量であり得、それは、およそ 80 ~ 100 % の微生物成長の低下、または本明細書に記載される微生物成長の少なくとも約 80 %、85 %、90 %、95 %、98 %、もしくは 99 % のうちのいずれかの低下をもたらす。

40

【0130】

本明細書に記載される方法または組成物の一部の実施形態において、T g a s e 変種酵素は、約 0 . 0 1 % w / v ~ 約 5 % w / v、または少なくとも約 0 . 0 1 % w / v、0 . 0 5 % w / v、0 . 1 % w / v、0 . 5 % w / v、1 % w / v、1 . 5 % w / v、2 % w / v、2 . 5 % w / v、3 % w / v、3 . 5 % w / v、4 % w / v、4 . 5 % w / v、もしくは 5 % w / v のうちのいずれか、または約 0 . 0 1 % w / v ~ 約 0 . 0 5 % w / v、約 0 . 1 % w / v ~ 約 0 . 5 % w / v、約 1 % w / v ~ 約 1 . 5 % w / v、約 1 . 5 % w

50

／v ～約 2 % w／v、約 2 % w／v ～約 2 . 5 % w／v、約 2 . 5 % w／v ～約 3 % w／v、約 3 % w／v ～約 3 . 5 % w／v、約 3 . 5 % w／v ～約 4 % w／v、約 4 % w／v ～約 4 . 5 % w／v、約 4 . 5 % w／v ～約 5 % w／v、約 0 . 0 1 % w／v ～約 0 . 1 % w／v、約 0 . 1 % w／v ～約 1 % w／v、約 1 % ～約 5 % w／v、約 0 . 0 5 % w／v ～約 0 . 5 % w／v、約 0 . 5 % w／v ～約 5 % w／v、約 1 % w／v ～約 2 . 5 % w／v、もしくは約 2 . 5 % w／v ～約 5 % w／v のうちのいずれかの濃度で含まれ得る。

【0131】

開示される T g a s e 変種およびその組成物を利用した、防腐方法が適用され得るパーソナル (personal) ケア製品の非限定的な例は、棒状せっけん、液体せっけん (例えば、ハンドソープ)、手の除菌剤 (洗い流すおよびつけて放っておくアルコールベースおよび水性ベースの手の消毒剤を含む)、術前の皮膚消毒剤、洗浄用ワイプ、消毒用ワイプ、ボディーウォッシュ、ざ瘡治療製品、抗真菌性おむつかぶれクリーム、抗真菌性皮膚クリーム、シャンプー、コンディショナー、化粧品 (リキッドまたはパウダーファンデーション、リキッドまたはソリッドアイライナー、マスカラ、クリームアイシャドウ、色付きのパウダー、乾燥させてまたは湿らせて使用される「パンケーキ」タイプのパウダー、メイク除去製品等を含むがそれらに限定されない)、防臭剤、抗微生物性クリーム、ボディーローション、ハンドクリーム、局所クリーム、アフターシェーブローション、皮膚化粧水、洗口剤、歯磨き粉、日焼け止めローション、ならびに洗浄用ワイプ、ベビーシャンプー、ベビーせっけん、およびおむつクリーム等であるがそれらに限定されないベビー製品を含む。本主題は、創傷治癒軟膏、クリーム、およびローション、創傷被覆剤、熱傷クリーム、包帯、テープ、ならびにステリストリップ等であるがそれらに限定されない創傷ケア品目、ならびに医療用ガウン、キャップ、フェイスマスク、および靴カバー、サージカルドロップ等の医療用品にも適用され得る。付加的な製品は、洗口液、歯磨き粉、および歯科用フロスコーティング等の口腔製品、獣医用製品およびペットケア製品、防腐組成物、ならびに溶液、スプレー、またはワイプを含めた表面消毒剤を含むが、それらに限定されるわけではない。

【0132】

開示される T g a s e 変種およびその組成物を利用した、防腐方法が適用され得る家庭用／産業用製品の非限定的な例は、濃縮液体洗浄剤およびスプレー洗浄剤、洗浄用ワイプ、食器洗い液、食器洗い洗剤、スプレーモップ液、家具艶出し剤、屋内用塗料、屋外用塗料、ほこり取りスプレー、洗濯用洗剤、織物柔軟剤、ラグマット／織物洗浄剤、窓およびガラス洗浄剤、便器洗浄剤、液体／クリーム洗浄剤等の家庭用洗浄剤を含む。特定の実施形態において、本主題の防腐方法は、消費、パッケージング、および食品コーティングの前に果物および野菜を洗浄するために設計された、食品洗い製品において使用され得る。

【0133】

B. タンパク質改変方法

一部の実施形態において、T g a s e 変種は、UV 遮断日焼け止め、および／または顔料もしくは色素等の着色剤を含めた、機能的成分の長期にわたる適用に使用される対象となる製品に含まれ得る。例えば、T g a s e 変種は、毛髪繊維の表面の永続的な (共有結合性の) 色改変等であるがそれらに限定されない、哺乳類 (例えば、ヒト) 皮膚、毛髪、または爪への、活性のあるまたは機能的な成分の送達のための組成物において使用され得る。一部の実施形態において、T g a s e 変種は、UV 遮断 (日焼け止め) 製品または美容製品等、局所適用される対象となる製品および個体の皮膚に付着する製品に組み入れられ得る。一部の実施形態において、T g a s e 変種を使用して、革加工等において、動物の皮膚への色の永続的適用を提供し得る。一部の実施形態において、T g a s e 変種を使用して、食品加工において色の永続的適用を提供し得る。

【0134】

関心対象のタンパク質または材料を改変するまたはそれに色を付加するための方法が本明細書において提供される。方法は、関心対象のタンパク質、ペプチド、または材料と、

本明細書に記載される1種または複数のT g a s e変種、ならびに日焼け止めおよび／または色産生分子、例えば色素または顔料分子を含めた1種または複数の機能的成分とを接触させるステップを含む。T g a s e変種酵素は、関心対象のタンパク質、ペプチド、または材料に日焼け止めおよび／または色分子を共有結合させるのに十分（すなわち、有効）である量で存在する。

【0135】

一部の実施形態において、関心対象のタンパク質は、皮膚に存在する1種または複数のタンパク質であり、T g a s e酵素ならびに日焼け止めおよび／または色分子は、美容製品またはパーソナルケア製品の形態にあり得る。皮膚に存在するタンパク質は、コラーゲン、ケラチン、および／またはエラスチンであり得る。

10

【0136】

一部の実施形態において、関心対象の材料は、皮膚に由来する1種または複数のタンパク質またはペプチドであり、T g a s e変種酵素ならびに／または日焼け止めおよび／もしくは色分子は、美容製品またはパーソナルケア製品の形態にあり得る。製品製剤に存在するタンパク質は、コラーゲン、ケラチン、および／またはエラスチンであり得る。製品製剤に存在するペプチドは、加水分解コラーゲン、加水分解ケラチン、および／または加水分解エラスチンであり得る。

【0137】

一部の実施形態において、関心対象のタンパク質または材料は、革、食料品、もしくは農産物、またはその中にある関心対象のタンパク質であり、T g a s e変種酵素および／または色分子は、革、食料品、もしくは農産物、またはその中にある関心対象のタンパク質を改変するまたはそれに色を付加するのに適切である組成物の形態にある。

20

【0138】

一部の実施形態において、哺乳類（例えば、ヒト）皮膚、毛髪、または爪のタンパク質またはペプチドに、活性のあるまたは機能的な成分（日焼け止め分子または着色剤等）を送達するための方法が提供される。例えば、方法は、哺乳類（例えば、ヒト）皮膚、毛髪、もしくは爪のタンパク質もしくはペプチドへの本明細書に記載される組成物の適用、または哺乳類（例えば、ヒト）個体の皮膚、毛髪、もしくは爪への組成物の局所適用を含み得る。

【0139】

一部の実施形態において、方法は、哺乳類（例えば、ヒト）皮膚、毛髪、または爪のタンパク質および／またはペプチドと、（a）少なくとも1種の活性のあるまたは機能的な成分（例えば、日焼け止め分子または着色剤等）の有効量；および（b）哺乳類（例えば、ヒト）皮膚、毛髪、または爪のタンパク質またはペプチドへの活性のあるまたは機能的な成分の架橋を触媒するのに有効な量でのT g a s e変種酵素、を含む組成物とを接触させるステップを含む。一部の実施形態において、方法は、哺乳類（例えば、ヒト）個体の皮膚、毛髪、または爪への組成物の局所適用を含み、ある特定の実施形態において、組成物は、（c）個体の皮膚、毛髪、または爪にT g a s e変種酵素および活性のあるまたは機能的な成分を送達するのに有効な量で、薬学的なまたは許容される担体を含み得る。

30

【0140】

例えば、活性のあるまたは機能的な成分は、活性のあるもしくは機能的な成分上に直接的に、またはそれに取り付けられた（例えば、共有結合した）リンカー上に間接的に、少なくとも1種のアルキルアミノ（ $-RNH_2$ ）、ヒドラジン、ヒドラジド、またはヒドロキシルアミン部分を含み得、方法は、活性のあるまたは機能的な成分のアミノ基と、皮膚、毛髪、または爪のタンパク質またはペプチドにおけるアミノ基（例えば、グルタミンおよび／またはリジンアミノ酸残基側鎖上のアミノ基）との間の架橋（例えば、共有結合の形成）のトランスグルタミナーゼ酵素による触媒を含む。

40

【実施例】

【0141】

以下の実施例は、本発明を限定することではなく例示することを意図される。

50

【0142】

[実施例1]

成熟トランスグルタミナーゼ（配列番号1）の部位飽和ライブラリーを合成して、単一点変異体酵素変種を創出した。製品製剤における迅速な殺傷速度および長寿を有する酵素変種を創出しようとして、活性の初速度の増強を特定することに加えて、エンドポイントアッセイにおいて活性を示す変種を同定した。

【0143】

DNA変種を標準的方法によって合成し、酵素を発現させた。結果として生じた単一点変異酵素変種を、一次スクリーニング、すなわちTgaseに対する標準的な比色分析ヒドロキサメート（hydroxamate）活性アッセイ（Folk and Cole (1965) J Biol Chem 240(7):2951-2960）を使用してアッセイし、二次スクリーニングを実施して、ダンシルカダベリンでのカゼインのトランスグルタミナーゼ触媒による標識化（例えば、Transglutaminase Fluorogenic Activity Assay Kit、T036、Zedira、Germany等、市販のキット）を使用して、活性変異体の活性初速度を判定した。

10

【0144】

簡潔には、標準的なヒドロキサメート（hydroxamate）アッセイは、アミンアクセプター基質としてN-カルボベンゾキシー-L-グルタミニルグリシン（Z-Gln-GlyまたはCBZ-Gln-Gly）、およびアミンドナーとしてヒドロキシルアミンを使用する。トランスグルタミナーゼの存在下で、ヒドロキシルアミンは組み入れられて、Z-グルタミルヒドロキサメート（glutamylhydroxamate）-グリシンを形成し、それは、37℃で1～3時間のインキュベーション後に525nmで検出可能な、鉄（III）を有する着色複合体を生じさせる。標準物質としてL-グルタミン酸γ-モノヒドロキサメート（monohydroxamate）（Millipore Sigma）を使用して、校正を実施した。Tgaseの1単位は、1分間あたり1μmolのγ-グルタミルヒドロキシルアミンのペプチド誘導体の形成を触媒する酵素の量として規定される。

20

【0145】

Transglutaminase Fluorogenic Activity Assay Kitは、ダンシル基の蛍光の強度および波長のシフトをもたらす、N,N-ジメチルカゼインへのモノダンシルカダベリンのトランスグルタミナーゼ触媒による共有結合性共役をモニターする。トランスグルタミナーゼ活性は、蛍光（励起波長332nm；発光波長500nm）の測定によってオンラインでモニターされ得る。相対的トランスグルタミナーゼ活性は、経時的な蛍光強度の増加によって示される。

30

【0146】

各変種を、野生型Tgaseと比べた活性の向上について評価しかつランク付けした。いずれかのアッセイにおいて少なくとも約1.4倍（40%）の活性の向上を有する変種を同定し、これらの変種の変異は表3に示される。表3に描写される変異のアミノ酸箇所は、配列番号1に描写される野生型ストレプトマイセス・モバラエンシス（Streptomyces mobaraensis）成熟Tgase配列と比べたものである。

【0147】

40

【表 3】

表 3

変種 活性向上

A10C	+	
A10Q	++	
D14H	+	
D14L	+	
D14M	+	
D14N	++	
D14W	+	10
D14Y	+	
R15A	+	
R15E	+	
R15T	+	
D18E	+	
D18T	+	
G47H	++	
R48M	+	
K49E	++	
K49T	++	
Q74C	+	
N134S	+	20
N134T	+	
A136C	+	
A136S	+	
L137K	+++	
L137V	+	
L147E	+	
L147M	+	
E164F	+	
P169E	+	
F170I	++	
F170L	+	
F170V	++	30
S199A	++	
S199G	+	
S299A	+	
S299E	+	
S299K	+	
S299V	++	

表 1. ストレプトマイセス・モバラエンシス(*Streptomyces mobaraensis*)Tgase 変種、および野生型 S.モバラエンシス(*S. mobaraensis*)Tgase と比べた活性の向上。アミノ酸箇所の番号付けは、配列番号 1 に描写される成熟 S.モバラエンシス(*S. mobaraensis*)Tgase アミノ酸配列を参照している。1.4 倍またはそれを上回る酵素活性の向上は、「+」によって表され; 1.6 倍またはそれを上回る向上は、「++」によって表され; 1.8 倍またはそれを上回る向上は、「+++」によって表される。

40

【0148】

前述の本発明は、理解の明瞭性の目的のために、例示および実施例によって多少詳しく記載されているものの、本発明の精神および範囲から逸脱することなく、ある特定の変化および改変が実践され得ることは当業者に明白であろう。それゆえ、本説明は、添付の特許請求の範囲において詳述される本発明の範囲を限定するものとして捉えられるべきではない。

【0149】

本明細書において引用されるすべての刊行物、特許、および特許出願は、すべての目的のために、かつあたかもそれぞれ個々の刊行物、特許、または特許出願が、参照によりそ

50

のように組み入れられることを具体的にかつ個々に示されているのと同じ程度に、参照によりそれらの全体として本明細書によって組み入れられる。

【配列表】

2023518714000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 21/21766

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - C12N 9/10, A61K 38/16, A61K 47/42 (2021.01)

CPC - C12N 9/1044, C12N 9/10, A61K 47/60, A61K 8/41

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

See Search History document

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

See Search History document

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

See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2009/0117640 A1 (NORSKOV-LAURITSEN et al.) 07 May 2009 (07.05.2009) abstract; para [0033]; SEQ ID NO: 1	1-6, 8-16, 20-21, 23-24
A	US 2004/0002144 A1 (KASHIWAGI et al.) 01 January 2004 (01.01.2004) abstract; claim 3; SEQ ID NO: 2	1-6, 8-16, 20-21, 23-24
A	YANG et al., Crystal Structure and Inhibition Studies of Transglutaminase from Streptomyces mobaraense. The Journal of Biological Chemistry. 04 March 2011, Vol. 286, No. 9, pp. 7301-7307. Entire document, especially abstract; p. 7304; Figure 2.	1-6, 8-16, 20-21, 23-24

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

"D" document cited by the applicant in the international application

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 July 2021

Date of mailing of the international search report

AUG 24 2021

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents

P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Lee Young

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 21/21766

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a. ☐ forming part of the international application as filed:

☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

☐ on paper or in the form of an image file.

b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 21/21766

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I+, claims 1-6, 8-16, 20-21, 23-24, directed to a variant transglutaminase enzyme, or a composition/product comprising a transglutaminase enzyme. The transglutaminase, composition or product will be searched to the extent that the transglutaminase encompasses a variant transglutaminase with mutation A10C relative to SEQ ID NO: 1 (note, this is the first transglutaminase listed in Table 3 at Specification para [0140]). It is believed that claims 1-6, 8-16, 20-21, 23-24 encompass this first named invention, and thus these claims will be searched without fee to the extent that the transglutaminase encompasses A10C relative to SEQ ID NO: 1. Additional transglutaminase(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected transglutaminase(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. An exemplary election would be a transglutaminase comprising A10Q relative to SEQ ID NO: 1, (claims 1-6, 8-16, 20-21, 23-24). --continued on first extra sheet--

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-6, 8-16, 20-21, 23-24, limited to A10C relative to SEQ ID NO: 1

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 21/21766

--continued from: Box No. III Observations where unity of invention is lacking--

Group II, claims 7, 17-19, 22, directed to a method for modifying a product, material, or protein by adding transglutaminase.

Group III, claims 25-27, directed to a bacteriophage.

The inventions listed as Group I+ do not relate to a single special technical feature under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special technical features

Group I+ has the special technical feature of a composition comprising or consisting of transglutaminase enzyme, that is not required by Group II or III.

Group II has the special technical feature of a method for increasing the shelf life or modifying the color of a product, material, or protein by adding transglutaminase, that is not required by Group I+ or III.

Group III has the special technical feature of a bacteriophage comprising a nucleic acid sequence that encodes the transglutaminase enzyme, that is not required by Group I+ or II.

The inventions of Group I+ each include the special technical feature of a unique amino acid sequence generated by a different mutation. Each amino acid sequence encodes a unique transglutaminase variant peptide, and is considered a distinct technical feature.

Common technical features

The inventions of Group I+, II and III share the common technical feature of an enzyme composition comprising the transglutaminase enzyme and a substrate for the transglutaminase enzyme, said composition having increased shelf-life or modified color due to the transglutaminase enzyme.

No technical features are shared between the transglutaminase variant amino acid sequences of Group I+ and accordingly, these groups lack unity a priori.

Additionally, even if the inventions listed as Group I+ were considered to share the technical features of including: a transglutaminase enzyme that is a variant of the mature transglutaminase enzyme of *Streptomyces mobaraensis*; a product comprising the transglutaminase enzyme in an effective amount to increase the shelf life of the product; an enzyme composition comprising the transglutaminase enzyme and a substrate for the transglutaminase enzyme, comprising a sunscreen molecule, a pigment, or a dye molecule; and a cosmetic composition comprising the enzyme composition, these shared technical features are previously disclosed by the prior art, as further discussed below.

The feature shared by Groups I+, II and III and the feature shared by the inventions listed as Group I+ are disclosed by US 2003/0224476 A1 to Chou (hereinafter "Chou"), and WO 2019/014118 A1 to IGC Bio, Inc. (hereinafter "IGC").

Chou discloses a transglutaminase enzymes (para [0048] - "An example of biological agents useful in methods of the present invention includes transglutaminases") that is a variant of the mature transglutaminase enzyme of *Streptomyces mobaraensis* (claims 1, 13; para [0187]-[0190] - "Table 2 is a comparison of the two amino acid sequences SEQ ID No. 6 (upper sequence) and SEQ ID No. 8 (lower sequence) by BLAST alignment. The alignment indicates about 270 identical amino acids (middle Sequence, about 81% sequence identity) between the amino acid Sequence of the mature TGase protein (about 331 amino acids) from *Streptomyces mobaraensis* ATCC 29032 and the amino acid Sequence of the mature TGase protein (about 334 amino acids) from *Streptomyces cinnamomeus* ATCC 11874"; SEQ ID NO: 8 exhibits a D18E variant.).

Chou discloses an enzyme composition (para [0048] - "An example of biological agents useful in methods of the present invention includes transglutaminases") comprising: i. the transglutaminase enzyme (para [0048] - "An example of biological agents useful in methods of the present invention includes transglutaminases"); and ii. a substrate for the transglutaminase enzyme, comprising a sunscreen molecule, a pigment, or a dye molecule (para [0044]-[0045] "microbial transglutaminases...typically have broader substrate specificity than their counterparts in higher organisms. Increasing the range of substrates that can be cross-linked by a biological agent increases the value and usefulness of the agent"; [0208] - "Cross-linking reactions were set up to assay for cross-linking activity of the purified, inactive recombinant SM TGase fusion protein on a substrate, B-casein" (Note: B-casein is used in sunscreen products); para [0177] - "The cross-linked products produced by the biological agents of the invention can also be used as novel protein-derived materials in a wide range of industries including cosmetics such as hair dyeing formulations for the production of keratinous fibre cross links, the production of thermally stable materials. Such as raw materials of micro capsules, carriers of immobilized enzymes and the like"), and a cosmetic composition comprising the enzyme composition (para [0177] "The cross-linked products produced by the biological agents of the invention can also be used as novel protein-derived materials in a wide range of industries including cosmetics such as hair dyeing formulations").

IGC discloses a product comprising a transglutaminase enzyme (para [0034] - "The present invention provides a transglutaminase variant of a wild-type transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis*"; para [00184] - "Transglutaminase is used in food processing as a meat glue to bond proteins together in foods, such as meat, fish, imitation crabmeat, processes meat or processed fish, e.g., boneless fish"), in an effective amount to increase the shelf life of the product, in comparison to an identical product that does not comprise the enzyme (para [00184]-[00185] - "Transglutaminase is used in food processing as a meat glue to bond proteins together in foods, such as meat, fish, imitation crabmeat, processes meat or processed fish, e.g., boneless fish...The transglutaminase variants provided herein are stable under conditions such as high temperature, e.g., over 50 C, pH extremes, e.g., high acidity at pH of 4 or lower, in the presence of salts, alkalis and/or surfactants, and other such severe conditions under which wildtype transglutaminase will denature, decompose and/or under which the transglutaminase enzymatic function is significantly reduced or eliminated").

--continued on next sheet--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 21/21766

--continued from previous sheet--

As the technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Therefore, Group I+, II and III inventions lack unity under PCT Rule 13 because they do not share the same or corresponding special technical feature.

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 0 1 P 3/00 (2006.01)**A 0 1 P 3/00****A 0 1 N 63/50 (2020.01)****A 0 1 N 63/50 1 0 0****C 1 2 N 15/54 (2006.01)****C 1 2 N 15/54**

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,K
E,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,N
G,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,
TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ミルチェック, エリカ

アメリカ合衆国 2 7 7 0 9 ノースカロライナ州, ダーラム, デイビス ドライブ 6, キュリー
カンパニー インコーポレイテッド

F ターム (参考)

4B050 CC04 DD02 EE10 LL01 LL10**4B065 AA50Y AA98X AB01 AC14 BA01 CA29 CA41 CA44 CA47 CA50****CA60****4C083 AD471 CC01****4H011 AA02 AA04 BB19 DH11**