



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103649292 A

(43) 申请公布日 2014. 03. 19

(21) 申请号 201280033107. 5

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2012. 06. 29

C11D 3/386 (2006. 01)

(30) 优先权数据

C07K 5/06 (2006. 01)

11172357. 3 2011. 07. 01 EP

C07K 5/08 (2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 01. 02

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2012/062760 2012. 06. 29

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/004636 EN 2013. 01. 10

(71) 申请人 诺维信公司

地址 丹麦鲍斯韦

(72) 发明人 L. M. 米凯尔森 F. 庞齐尼

R. 比萨西亚 R. 卡尼沃蒂

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 罗天乐

权利要求书2页 说明书18页

序列表4页

(54) 发明名称

稳定化的枯草杆菌蛋白酶组合物

(57) 摘要

可以使用肽醛向亚硫酸氢盐加合物的转化来增加在肽醛的纯化中的水溶解度。有利的是,这种亚硫酸氢盐加合物本身作为枯草杆菌蛋白酶抑制剂和稳定剂是有效的并且它还可以稳定一种第二酶(如果存在)。该亚硫酸氢盐加合物作为枯草杆菌蛋白酶抑制剂是有效的,并且在储存过程中,它在液体洗涤剂中保持其抑制和稳定化作用。因此,使用该亚硫酸氢盐加合物可以避免将其转化回至肽醛的成本和时间,并且可以省去肽醛的随后干燥,并且这可以避免处理处于粉末形式或作为高度稀释的水溶液的肽醛的不便。

1. 一种组合物, 该组合物包括一种枯草杆菌蛋白酶和一种具有式 $X-B^1-NH-CHR-CHOH-SO_3M$ 的肽醛亚硫酸氢盐加合物, 其中:

- a) M 是 H (氢) 或一种碱金属;
- b) R 是一种基团这样使得 $NH-CHR-CO$ 是 L- 氨基酸残基或 D- 氨基酸残基;
- c) B^1 是一个氨基酸残基; 并且
- d) X 由一个或多个氨基酸残基组成, 可任选地包括一个 N 端保护基团。

2. 如前一权利要求所述的组合物, 其中 R 是一种基团这样使得 $NH-CHR-CO$ 是 Tyr、间酪氨酸、3, 4- 二羟苯丙氨酸、Phe、Val、Met、Nva、Leu、Ile 或 Nle 的 L- 氨基酸残基或 D- 氨基酸残基。

3. 如任一前项权利要求所述的组合物, 其中 B^1 是 Ala、Cys、Gly、Pro、Ser、Thr、Val、Nva、或 Nle 的残基。

4. 如以上任何一项权利要求所述的组合物, 其中 X 是 B^2 、 B^3-B^2 、 $Z-B^2$ 、或 $Z-B^3-B^2$, 其中 B^2 和 B^3 各自表示一个氨基酸残基, 并且 Z 是一种 N 端保护基团。

5. 如前一权利要求所述的组合物, 其中 B^2 是 Val、Gly、Ala、Arg、Leu、Phe 或 Thr 的残基。

6. 如权利要求 4 所述的组合物, 其中 B^3 是 Phe、Tyr、Trp、苯基甘氨酸、Leu、Val、Nva、Nle 或 Ile 的残基。

7. 如以上任何一项权利要求所述的组合物, 其中 Z 是苄氧基羰基 (Cbz)、对甲氧苄基羰基 (MOZ)、苄基 (Bn)、苯甲酰基 (Bz)、对甲氧苄基 (PMB)、对甲氧苯基 (PMP)、甲酰基、乙酰基 (Ac)、甲氧基、或甲氧羰基。

8. 如以上任何一项权利要求所述的组合物, 该组合物处于液体或粒状形式。

9. 如以上任何一项权利要求所述的组合物, 该组合物是一种进一步包括一种表面活性剂的洗涤剂。

10. 如以上任何一项权利要求所述的组合物, 该组合物进一步包括一种第二酶, 具体是脂肪酶、角质酶、淀粉酶、碳水化合物酶、纤维素酶、果胶酶、果胶酸裂解酶、甘露聚糖酶、阿拉伯糖酶、半乳聚糖酶、木聚糖酶、氧化酶、漆酶或过氧化酶。

11. 一种制备如以上任何一项权利要求所述的组合物的方法, 该方法包括将一种枯草杆菌蛋白酶、一种包括具有式 $X-B^1-NH-CHR-CHOH-SO_3M$ 的肽醛亚硫酸氢盐加合物的水溶液, 其中 M、R、 B^1 以及 X 如在权利要求 1 中所定义, 以及任选地一种表面活性剂进行混合。

12. 一种用于在权利要求 1-10 中任一项所述的组合物中使用的化合物, 该化合物是具有式 $X-B^1-NH-CHR-CHOH-SO_3M$ 的肽醛亚硫酸氢盐加合物, 其中 M 和 X 如在权利要求 1 中所定义, B^1 是一种与脯氨酸 (Pro) 不同的氨基酸残基, 并且 R 是一种基团这样使得 $NH-CHR-CO$ 是 Tyr、间酪氨酸、3, 4- 二羟苯丙氨酸、Phe、Val、Met、Nva 或 Nle 的 L- 氨基酸残基或 D- 氨基酸残基。

13. 如权利要求 12 所述的化合物, 该化合物是 $Cbz-RA-NHCH(CH_2C_6H_4OH)C(OH)(SO_3M)-H$ 、 $Ac-GA-NHCH(CH_2C_6H_4OH)C(OH)(SO_3M)-H$ 、 $Cbz-GA-NHCH(CH_2C_6H_4OH)C(OH)(SO_3M)-H$ 、 $Cbz-GG-NHCH(CH_2C_6H_4OH)C(OH)(SO_3M)-H$ 、 $Cbz-RV-NHCH(CH_2C_6H_4OH)C(OH)(SO_3M)-H$ 、 $Cbz-LV-NHCH(CH_2C_6H_4OH)C(OH)(SO_3M)-H$ 、 $Ac-LGA-NHCH(CH_2C_6H_4OH)C(OH)(SO_3M)-H$ 、 $Ac-FGA-NHCH(CH_2C_6H_4OH)C(OH)(SO_3M)-H$ 、 $Ac-YGA-NHCH(CH_2C_6H_4OH)C(OH)(SO_3M)-H$ 、

Ac-FGV-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H、或 Ac-WLV-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H, 其中 Ac 是乙酰基并且 Cbz 是苄氧羰基。

14. 一种用于在权利要求 1-10 中任一项所述的组合物中使用的化合物, 该化合物是具有式 X-B¹-NH-CHR-CHOH-SO₃M 的肽醛亚硫酸氢盐加合物, 其中 M、R 和 X 如在权利要求 1 中所定义, 并且其中 B¹ 是丙氨酸(Ala)、半胱氨酸(Cys)、甘氨酸(Gly)、丝氨酸(Ser)、苏氨酸(Thr)、缬氨酸(Val)、正缬氨酸(Nva) 以及正亮氨酸(Nle) 的氨基酸残基。

15. 如权利要求 14 所述的化合物, 该化合物是 Cbz-GA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H、Cbz-VA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H、Cbz-GA-NHCH(CH₂Ph)C(OH)(SO₃M)-H、Cbz-GA-NHCH(CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H、Cbz-GG-NHCH(CH₂Ph)C(OH)(SO₃M)-H、Ac-FGA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H、Ac-FGA-NHCH(CH₂Ph)C(OH)(SO₃M)-H、Ac-FGA-NHCH(CH₂CH₂SCH₃)C(OH)(SO₃M)-H、MeO-CO-VA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H、MeNCO-VA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H、MeO-CO-FGA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H、MeO-CO-FGA-NHCH(CH₂Ph)C(OH)(SO₃M)-H、MeSO₂-FGA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H、MeSO₂-VA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H、PhCH₂O(OH)(O)P-VA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H、EtSO₂-FGA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H、PhCH₂SO₂-VA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H、PhCH₂O(OH)(O)P-LA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H、PhCH₂O(OH)(O)P-FA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H、以及 MeO(OH)(O)P-LGA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H, 其中 Ac 是乙酰基并且 Cbz 是苄氧羰基。

16. 一种用于在权利要求 1-10 中任一项所述的组合物中使用的化合物, 该化合物是具有式 X-B¹-NH-CHR-CHOH-SO₃M 的肽醛亚硫酸氢盐加合物; 其中 R 和 M 如在权利要求 1 中所定义; B¹ 表示一种与脯氨酸(Pro) 不同的氨基酸残基; X 是 B²、B³-B²、Z-B²、Z-B³-B², 其中 B³ 和 B² 各自表示一个氨基酸残基, 并且 Z 是一种 N 端保护基团; 并且其中 B² 是 Gly、Thr 或 Val。

17. 一种用于在权利要求 1-10 中任一项所述的组合物中使用的化合物, 该化合物是具有式 X-B¹-NH-CHR-CHOH-SO₃M 的肽醛亚硫酸氢盐加合物; 其中 R 和 M 如在权利要求 1 中所定义; B¹ 表示一种与脯氨酸(Pro) 不同的氨基酸残基; X 是 B³-B²、Z-B³-B², 其中 B³ 和 B² 各自表示一个氨基酸残基, 并且 Z 是一种 N 端保护基团; 并且其中 B³ 是 Phe、Tyr、Trp、苯基甘氨酸、Leu、Val、Nva、Nle 或 Ile。

稳定化的枯草杆菌蛋白酶组合物

[0001] 对序列表的引用

[0002] 本申请包含计算机可读形式的序列表。

技术领域

[0003] 本发明涉及一种包括枯草杆菌蛋白酶的组合物,该枯草杆菌蛋白酶由一种肽醛衍生物稳定。它还涉及制备该组合物的方法,并且涉及用于在该组合物中使用的化合物。

[0004] 发明背景

[0005] W098/13458、W094/04651、W098/13460、W095/25791、以及 W02009/118375 披露了具有由肽醛稳定化的枯草杆菌蛋白酶型的蛋白酶的液体洗涤剂。W02011/036153 披露向一种微粒状包含枯草杆菌蛋白酶的洗涤剂中添加肽醛可以改进脱垢性。

[0006] 熟知的是,醛可以与 NaHSO_3 形成可溶性加合物(重亚硫酸盐或亚硫酸氢盐加合物)并且肽醛趋向于是略微水溶性的。

[0007] W098/47523 和 US6,500,802 披露了肽基-2-氨基-1-羟基链烷磺酸及其作为蛋白酶抑制剂的用途。US5,436,229 披露了 L-精氨酸醛衍生物的重亚硫酸盐加合物及其作为凝血酶抑制剂的用途。

[0008] US4,703,036、US4,478,745 以及 US5,578,574 披露了制备处于干燥形式的肽醛的方法。

发明内容

[0009] 在稳定化的枯草杆菌蛋白酶组合物的大规模生产中,为了安全性和工艺两者的考虑,强烈优选的是处理液体原料。肽醛趋向于是略微水溶性的,这使得难于或不可能制备浓缩的水溶液并且当制备用于在液体配制品中使用或用于造粒以制备粒状组合物的稳定化枯草杆菌蛋白酶溶液时,必须使用干燥产品亦或高度稀释的水溶液。

[0010] 可以使用肽醛向亚硫酸氢盐加合物的转化来增加在肽醛的纯化中的水溶解度。有利的是,我们已经发现这一亚硫酸氢盐加合物本身作为枯草杆菌蛋白酶抑制剂和稳定剂是有效的并且发现它还可以稳定一种第二酶(非枯草杆菌蛋白酶)(如果存在)。我们已经发现亚硫酸氢盐加合物作为枯草杆菌蛋白酶抑制剂是有效的,并且我们已经发现在储存过程中,它在液体洗涤剂中保持其抑制和稳定化作用。因此,使用该亚硫酸氢盐加合物可以避开将其转化回至肽醛的成本和时间,并且可以省去肽醛的随后干燥,并且这可以避免处理处于粉末形式或作为高度稀释的水溶液的肽醛的不便。而且,添加肽醛重亚硫酸盐加合物还可以改进包含枯草杆菌蛋白酶的洗涤剂的脱垢性(洗涤性能)。

[0011] 因此,本发明提供了包括一种枯草杆菌蛋白酶和具有式 $\text{X-B}^1\text{-NH-CHR-CHOH-SO}_3\text{M}$ 的肽醛亚硫酸氢盐加合物的组合物。在该式中的基团具有以下意义:

[0012] a) M 是 H (氢) 或一种碱金属,优选是 Na 或 K;

[0013] b) R 是一种基团这样使得 NH-CHR-CO 是 L-氨基酸残基或 D-氨基酸残基(在下面表示为 B^0);

[0014] c) B^1 是一个氨基酸残基 ; 并且

[0015] d) X 由一个或多个 (优选是一个或两个) 氨基酸残基组成, 可任选地包括一种 N 端保护基团。

[0016] 本发明进一步提供了制备该组合物的方法, 该方法包括将一种枯草杆菌蛋白酶、一种包括具有式 $X-B^1-NH-CHR-CHOH-SO_3M$ (其中 M、R、 B^1 以及 X 如上所定义) 的肽醛亚硫酸氢盐加合物的水溶液、以及任选地一种表面活性剂进行混合。

[0017] 因此, 本发明提供了一种用于在该组合物中使用的化合物, 该化合物是具有式 $X-B^1-NH-CHR-CHOH-SO_3M$ 的肽醛亚硫酸氢盐加合物。R 可以是对 - 羟基 - 苄基, 并且 M、 B^1 以及 X 如上所定义。

[0018] 本发明的详细描述

[0019] 稳定化的枯草杆菌蛋白酶组合物

[0020] 本发明的组合物包括一种枯草杆菌蛋白酶和一种肽醛亚硫酸氢盐加合物, 并且它能任选地包括一种第二酶。该组合物可以处于液体或粒状形式。它可以是进一步包括一种表面活性剂的洗涤剂组合物。

[0021] 在一种组合物 (例如一种液体或粒状洗涤剂) 中, 以纯酶蛋白计算的每种酶 (枯草杆菌蛋白酶以及任选的第二酶) 的量将典型地是 0.04-80 微 M (或微摩尔 / kg)、特别是 0.2-30 微 M、尤其是 0.4-20 微 M (通常是 1-2000mg/1 或 1-2000mg/kg, 特别是 5-750mg/1, 尤其是 10-500mg/1)。在一种组合物 (例如一种酶浓缩物) 中, 以纯酶蛋白计算的每种酶的量将典型地是 0.01-20mM、特别是 0.04-10mM、尤其是 0.1-5mM (通常是 0.3-500g/1, 特别是 1-300g/1, 尤其是 3-150g/1)。

[0022] 根据本发明, 酶稳定剂或抑制剂与枯草杆菌蛋白酶的摩尔比是至少 1:1 或 1.5:1, 并且它小于 1000:1, 更优选小于 500:1, 甚至更优选是从 100:1 至 2:1 或从 20:1 至 2:1, 或最优选的是, 摩尔比是从 10:1 至 3:1。

[0023] 肽醛

[0024] 在该方法中使用的重亚硫酸盐加合物可以衍生自具有式 $X-B^1-B^0-H$ 的肽醛, 其中这些基团如上所定义, B^0 是具有 L- 构型或 D- 构型的单个的氨基酸残基, 具有式 $NH-CHR-CO$ 。

[0025] $NH-CHR-CO(B^0)$ 是一种 L- 氨基酸残基或 D- 氨基酸残基, 其中 R 可以是脂肪族的或芳香族的侧链 (例如, 芳烷基, 例如苄基), 其中 R 可以是可任选地取代的。更具体地说, B^0 残基可以是庞大的、中性的、极性的、疏水的和 / 或芳香族的、可任选地取代的。实例是 D- 型或 L- 型的 Tyr (对 - 酪氨酸), 间 - 酪氨酸, 3, 4- 二羟基苯丙氨酸, Phe, Val, Met, 正缬氨酸 (Nva), Leu, Ile 或正亮氨酸 (Nle); 特别是 Tyr, 间 - 酪氨酸, 3, 4- 二羟基苯丙氨酸, Phe, Val, Met, Nva 或 Nle。

[0026] 在上式 $X-B^1-B^0-H$ 中, B^1 残基可以具体地是小的、脂肪族的、疏水的和 / 或中性的。实例是丙氨酸 (Ala), 半胱氨酸 (Cys), 甘氨酸 (Gly), 脯氨酸 (Pro), 丝氨酸 (Ser), 苏氨酸 (Thr), 缬氨酸 (Val), 正缬氨酸 (Nva) 以及正亮氨酸 (Nle); 特别是 Ala, Cys, Gly, Ser, Thr, Val, Nva 以及 Nle。

[0027] X 可以具体地是一个或两个具有一种任选的 N 端保护基团的氨基酸残基 (即该化合物是具有或不具有保护基团的三肽醛或四肽醛)。因此, X 可以是 B^2 、 B^3-B^2 、 $Z-B^2$ 、 $Z-B^3-B^2$, 其中 B^3 和 B^2 各自表示一个氨基酸残基, 并且 Z 是一种 N 端保护基团。

[0028] B² 残基可以具体地是小的、脂肪族的和 / 或中性的, 例如, Ala、Gly、Thr、Arg、Leu、Phe 或 Val ; 特别是 Gly、Thr 或 Val。

[0029] B³ 残基可以具体地是庞大的、疏水的、中性的和 / 或芳香族的、可任选地取代的, 例如 Phe、Tyr、Trp、苯基甘氨酸、Leu、Val、Nva、Nle 或 Ile。

[0030] N 端保护基团 Z (如果存在) 可以选自甲酰基, 乙酰基 (Ac), 苯甲酰基, 三氟乙酰基, 氟甲氧基羰基, 甲氧基琥珀酰基, 芳香族尿烷保护基团和脂肪族尿烷保护基团, 苄氧基羰基 (Cbz), 叔丁氧基羰基, 金刚烷氧基羰基, 对甲氧苄基羰基 (MOZ), 苄基 (Bn), 对甲氧苄基 (PMB) 或对甲氧基苄基 (PMP), 甲氧羰基 (Moc); 甲氧基乙酰基 (Mac); 氨基甲酸甲酯或甲氨基羰基 / 甲基脲基团。在具有保护基团 (即 X=Z-B³-B²) 的四肽醛的情况下, Z 优选是小的脂肪族基团, 例如甲酰基、乙酰基、氟甲氧基羰基、叔丁氧基羰基、甲氧羰基 (Moc); 甲氧基乙酰基 (Mac); 氨基甲酸甲酯或甲氨基羰基 / 甲基脲基团。在具有保护基团 (即 X=Z-B²) 的三肽醛的情况下, Z 优选是庞大的芳香族基团, 例如苯甲酰基、苄氧基羰基、对甲氧苄基羰基 (MOZ)、苄基 (Bn)、对甲氧苄基 (PMB) 或对甲氧基苄基 (PMP)。

[0031] 适合的肽醛描述于 W094/04651、W095/25791、W098/13458、W098/13459、W098/13460、W098/13461、W098/13461、W098/13462、W02007/141736、W02007/145963、W02009/118375、W02010/055052 以及 W02011/036153 中。更具体地说, 肽醛可以是 Z-RAY-H、Ac-GAY-H、Z-GAY-H、Z-GAL-H、Z-VAL-H、Z-GAF-H、Z-GAV-H、Z-GGY-H、Z-GGF-H、Z-RVY-H、Z-LVY-H、Ac-LGAY-H、Ac-FGAY-H、Ac-YGAY-H、Ac-FGAL-H、Ac-FGAF-H、Ac-FGVY-H、Ac-FGAM-H、Ac-WLVY-H、MeO-CO-VAL-H、MeNCO-VAL-H、MeO-CO-FGAL-H、MeO-CO-FGAF-H、MeSO₂-FGAL-H、MeSO₂-VAL-H、PhCH₂O(OH)(O)P-VAL-H、EtSO₂-FGAL-H、PhCH₂SO₂-VAL-H、PhCH₂O(OH)(O)P-LAL-H、PhCH₂O(OH)(O)P-FAL-H、或 MeO(OH)(O)P-LGAL-H。在这里, Z 是苄氧基羰基, Me 是甲基, Et 是乙基, Ac 是乙酰基, H 是氢, 并且其他字母表示由标准的单个字母标示 (例如, F=Phe, Y=Tyr, L=Leu) 而指代的氨基酸残基。

[0032] 可替代地, 该肽醛可以具有 W02010/055052 中所描述的式:

[0033] $P-O-(A_i-X')_n-A_{n+1}-Q$

[0034] 其中 Q 是氢、CH₃、CX₃、CHX₂、或 CH₂X, 其中 X 是卤素原子;

[0035] 其中一个 X' 是“双 N-封端基团”CO、CO-CO、CS、CS-CS 或 CS-CO, 最优选是 urido(CO), 并且其他 X' 均为空,

[0036] 其中 n=1-10, 优选是 2-5, 最优选是 2,

[0037] 其中每个 A_i 和 A_{n+1} 是具有以下结构的氨基酸残基:

[0038] 对于至 X=-CO- 的右侧的残基而言, 是 -NH-CR-CO-, 或

[0039] 对于至 X=-CO- 的左侧的残基而言, 是 -CO-CR-NH-

[0040] 其中 R 是 H- 或可任选地取代的烷基或烷芳基基团, 该烷芳基基团能可任选地包括一个杂原子并且能可任选地被连接至 N 原子, 并且

[0041] 其中 P 是氢或任何 C 端保护基团。

[0042] 此类肽醛的实例包括 α-MAPI、β-MAPI、F-脲-RVY-H、F-脲-GGY-H、F-脲-GAF-H、F-脲-GAY-H、F-脲-GAL-H、F-脲-GA-Nva-H、F-脲-GA-Nle-H、Y-脲-RVY-H、Y-脲-GAY-H、F-CS-RVF-H、F-CS-RVY-H、F-CS-GAY-H、抗痛素、GE20372A、GE20372B、糜蛋白酶抑素 A、糜蛋白酶抑素 B、以及糜蛋白酶抑素 C。

[0043] 肽醛的另外的实例披露于特此通过引用而结合的 W02010/055052 和 W02009/118375、W094/04651、W098/13459、W098/13461、W098/13462、W02007/145963 (宝洁公司(P&G)) 中。

[0044] 肽醛亚硫酸氢盐加合物

[0045] 肽醛亚硫酸氢盐加合物可以衍生自上述肽醛。

[0046] 具体的实例是 Cbz-RA-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H、Ac-GA-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H、Cbz-GA-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H、Cbz-GA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H、Cbz-VA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H、Cbz-GA-NHCH(CH₂Ph)C(OH)(SO₃M)-H、Cbz-GA-NHCH(CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H、Cbz-GG-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H、Cbz-GG-NHCH(CH₂Ph)C(OH)(SO₃M)-H、Cbz-RV-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H、Cbz-LV-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H、Ac-LGA-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H、Ac-FGA-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H、Ac-YGA-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H、Ac-FGA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H、Ac-FGA-NHCH(CH₂Ph)C(OH)(SO₃M)-H、Ac-FGV-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H、Ac-FGA-NHCH(CH₂CH₂SCH₃)(SO₃M)-H、Ac-WLV-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H、MeO-CO-VA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H、MeNCO-VA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H、MeO-CO-FGA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H、MeO-CO-FGA-NHCH(CH₂Ph)C(OH)(SO₃M)-H、MeSO₂-FGA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H、MeSO₂-VA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H、PhCH₂O(OH)(O)P-VA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)-C(OH)(SO₃M)-H、EtSO₂-FGA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H、PhCH₂SO₂-VA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H、PhCH₂O(OH)(O)P-LA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)-C(OH)(SO₃M)-H、PhCH₂O(OH)(O)P-FA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H、MeO(OH)(O)P-LGA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H、以及 F-脲-RV-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H, 其中 M= 负电荷、H、Na、或 K 或另一种反离子。

[0047] 枯草杆菌蛋白酶

[0048] 枯草杆菌蛋白酶是丝氨酸蛋白酶的亚组。丝氨酸蛋白酶是催化肽键水解并且在活性位点处存在一个必需丝氨酸残基的酶(White (怀特), Handler (汉德勒) 和 Smith (史密斯), 1973, "Principles of Biochemistry (生物化学原理)", 第五版, McGraw-Hill Book Company (麦格劳-希尔图书公司), NY, 第 271-272 页)。枯草杆菌蛋白酶包括如由 Siezen (斯艾森) 等人, Protein Engng. (《蛋白质工程》) 4(1991) 719-737; 和 Siezen (斯艾森) 等人, Protein Science (《蛋白质科学》) 6(1997) 501-523 所定义的 I-S1 和 I-S2 亚组, 优选地由其组成。由于丝氨酸蛋白酶的活性位点的高度保守结构, 根据本发明的枯草杆菌蛋白酶可以是功能上相当于由(斯艾森) 等人(在前) 提出的指定亚组的亚麻酶。

[0049] 枯草杆菌蛋白酶可以是动物、植物或微生物来源的, 包括微生物的或基因上修饰的突变体(蛋白质工程变体)。枯草杆菌蛋白酶的实例是来源于芽孢杆菌的那些, 例如枯草杆菌蛋白酶 Novo、枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg、枯草杆菌蛋白酶 BPN'、枯草杆菌蛋白酶 309、枯草杆菌蛋白酶 147 和枯草杆菌蛋白酶 168 (描述于 W089/06279 中) 以及蛋白酶 PD138 (W093/18140)。实例描述于 W098/020115、W001/44452、W001/58275、W001/58276、W003/006602 以及 W004/099401 中。其他实例是描述于 W092/19729、W098/20115、W098/20116、W098/34946、W02011/036263 中的变体以及蛋白酶的混合物。

[0050] 可商购的枯草杆菌蛋白酶的实例包括 Kannase™、Everlase™、Relase™、Esperase™、Alcalase™、Durazym™、Savinase™、Ovozyme™、Liquanase™、Coronase™、Polarzyme™、Pyrase™、Pancreatic Trypsin NOVO (PTN)、Bio-Feed™Pro 以及 Clear-Lens™Pro ;Blaze (所有可以从丹麦的巴格斯维尔德(Bagsvaerd) 诺维信公司 (Novozymes A/S) 获得)。其他可商购的枯草杆菌蛋白酶包括 Ronozyme™Pro、Maxatase™、Maxacal™、Maxapem™、Opticlean™、Properase™、Purafast™、Purafect™、PurafectOx™、Purafact Prime™、Excellase™、FN2™、FN3™ 以及 FN4™ (可以从 Genencor International Inc. (杰能科国际公司)、Gist-Brocades (Gist-Brocades 公司)、BASF、或 DSM 获得)。其他实例是引发酶(Primase)™ 和 Duralase™, 可以从 Henkel (汉高公司) 获得的 Blap R、Blap S 以及 Blap X。

[0051] 第二酶

[0052] 除了枯草杆菌蛋白酶之外, 该洗涤剂组合物能可任选地包括一种第二酶, 例如脂肪酶、角质酶、淀粉酶、碳水化合物酶、纤维素酶、果胶酶、果胶酸裂解酶、甘露聚糖酶、阿拉伯糖酶、半乳聚糖酶、木聚糖酶、氧化酶、漆酶、和 / 或过氧化酶。该组合物可以包含一种、两种或更多种非枯草杆菌蛋白酶的酶。

[0053] 脂肪酶和角质酶

[0054] 适合的脂肪酶和角质酶包括细菌或真菌来源的那些。包括经化学修饰的或蛋白质工程改造的突变体。实例包括来自嗜热真菌属的脂肪酶, 例如, 来自如描述于 EP258068 和 EP305216 中的柔毛嗜热霉(以前被命名为柔毛腐质霉); 来自腐质霉属的角质酶, 例如, 如描述于 W096/13580 中的特异腐质霉; 假单胞菌属脂肪酶, 例如, 来自产碱假单胞菌或类产碱假单胞菌(EP218272)、洋葱假单胞菌 P (EP331376)、施氏假单胞菌(GB1, 372, 034)、荧光假单胞菌、假单胞菌属菌株 SD705 (W095/06720 和 W096/27002)、P. wisconsinensis (W096/12012); 芽胞杆菌属脂肪酶, 例如, 来自枯草芽孢杆菌(Dartois (达尔托伊斯) 等人, 1993, Biochemica et Biophysica Acta (《生物化学与生物物理学报》), 1131:253-360)、嗜热脂肪芽孢杆菌(JP64/744992) 或短小芽孢杆菌(W091/16422)。

[0055] 其他的实例是例如 W092/05249、W094/01541、EP407225、EP260105、W095/35381、W096/00292、W095/30744、W094/25578、W095/14783、W095/22615、W097/04079、W097/07202、W000/060063、W02007/087508 以及 W02009/109500 中所描述的那些脂肪酶变体。

[0056] 优选的可商购的脂肪酶酶类包括 Lipolase™, Lipolase Ultra™, 以及 Lipex™; Lecitase™, Lipolex™; Lipoclean™, Lipoprime™(诺维信公司(Novozymes A/S))。其他可商购的脂肪酶包括 Lumafast(Genencor Int Inc(杰能科国际公司)); Lipomax(Gist-Brocades 公司 /Genencor Int Inc (杰能科国际公司)) 以及来自 Solvay (苏威公司) 的芽胞杆菌属脂肪酶。

[0057] 淀粉酶

[0058] 适合的淀粉酶(α 和 / 或 β) 包括细菌或真菌来源的那些。包括经化学修饰的或蛋白质工程改造的突变体。淀粉酶包括例如从芽孢杆菌, 例如地衣芽孢杆菌的特定菌株获得的 α -淀粉酶, 更加详细地描述于 GB1, 296, 839 中。

[0059] 有用的淀粉酶的实例是描述于 W094/02597, W094/18314, W096/23837、以及 W097/43424 中的变体, 尤其是在以下一个或多个位置具有替换的变体: 15、23、105、106、

124、128、133、154、156、181、188、190、197、202、208、209、243、264、304、305、391、408、以及 444。

[0060] 可商购的淀粉酶是 Stainzyme ;Stainzyme Plus ;Duramyl™,Termamyl™,Termamyl Ultra ;Natalase, Fungamyl™ 和 BAN™ (诺维信公司(Novozymes A/S)), Rapidase™ 和 Purastar™ (来自杰能科国际公司(Genencor International Inc.))。

[0061] 裂解酶

[0062] 果胶酸裂解酶可以是来源于芽孢杆菌、特别是地衣芽孢杆菌或 *B. agaradhaerens* 的野生型酶,或由任何这些而得的变体,例如,如描述于 US6, 124, 127、W01999/027083、W01999/027084、W02002/006442、W02002/092741、W02003/095638 中。可商购的果胶酸裂解酶是 Xpect ;Pectawash 以及 Pectaway (诺维信公司(Novozymes A/S))。

[0063] 甘露聚糖酶

[0064] 甘露聚糖酶可以是第 5 族或第 26 族的碱性甘露聚糖酶。它可以是来自芽孢杆菌属或腐质霉属的野生型酶,特别是 *B. agaradhaerens*、地衣芽孢杆菌、耐盐芽孢杆菌(*B. halodurans*)、克劳氏芽孢杆菌、或特异腐质霉。适合的甘露聚糖酶描述于 W01999/064619 中。可商购的甘露聚糖酶是 Mannaway (诺维信公司(Novozymes A/S))。

[0065] 纤维素酶

[0066] 适合的纤维素酶包括细菌或真菌来源的那些。包括经化学修饰的或蛋白质工程改造的突变体。适合的纤维素酶包括来自芽孢杆菌属、假单胞菌属、腐质霉属、镰孢霉属、梭孢壳属、支顶孢属的纤维素酶,例如披露于 US4, 435, 307、US5, 648, 263、US5, 691, 178、US5, 776, 757 以及 W089/09259 中的由特异腐质霉、嗜热毁丝菌(*Myceliophthora thermophila*)和尖孢镰刀菌产生的真菌纤维素酶。

[0067] 尤其适合的纤维素酶是具有颜色保护益处的碱性或中性纤维素酶。此类纤维素酶的实例是描述于 EP0495257、EP0531372、W096/11262、W096/29397、W098/08940 中的纤维素酶。其他实例是例如描述于 W094/07998、EP0531315、US5, 457, 046、US5, 686, 593、US5, 763, 254、W095/24471、W098/12307 以及 W099/01544 中的那些纤维素酶变体。

[0068] 可商购的纤维素酶是 Celluzyme, Celluclean ;Endloase ;Carezyme ;Renozyme ;whitezyme (诺维信公司(Novozymes A/S))。

[0069] 肽醛和亚硫酸氢盐 / 重亚硫酸盐加合物的制备

[0070] 肽醛可以通过与重亚硫酸钠的反应而转化为水可溶的亚硫酸氢盐加合物,如描述于教科书中,例如 March, J. (马克, J.)Advanced Organic Chemistry (《高等有机化学》), 第四版, Wiley-Interscience, US1992, p895。

[0071] 向亚硫酸氢盐加合物的转化是可逆的(Ex J. Am. Chem. Soc. (《美国化学学会杂志》) 1978, 100, 1228)。因此,该加合物在液体洗涤剂、在液体枯草杆菌蛋白酶配制品、或在洗涤水中可以部份或全部回复以释放肽醛。

[0072] 正在讨论的肽醛可以通过省略最后的干燥步骤通过已知的方法来制备,例如,如描述于 US4, 703, 036、US4, 478, 745 或 US5, 578, 574 中,或它可以通过综述于 J. Pept. Sci. (《肽科学杂志》) 2007 ;13 ;1-15 或举例说明于 Synthesis (《合成》) 1983, 676 中的任何方法来制备。肽醛可以是粗品或纯化的,被分离为一种固体或由有机溶剂保存在溶液中。

[0073] 可以通过已知方法,例如,如描述于 W098/47523 ;US6, 500, 802 ;US5, 436, 229 ;

J. Am. Chem. Soc. (《美国化学学会杂志》)1978, 100, 1228 ;Org. Synth. (《有机合成》), Coll. Vol. 7:361 中,通过使相对应的肽醛与重亚硫酸钠(亚硫酸氢钠, NaHSO_3);重亚硫酸钾(KHSO_3)的水溶液进行反应来制备重亚硫酸盐加合物的水溶液。

[0074] 洗涤剂组合物

[0075] 该洗涤剂可以是粒状的或液体的洗涤剂。液体洗涤剂处于非固体(或气体)的物理形态;它可以是一种可浇注的液体、可浇注的凝胶或非可浇注的凝胶。它可以是各向同性的亦或或结构化的,优选是各向同性的。它包括用于自动洗衣机或用于手洗的配制品。该洗涤剂包含至少一种表面活性剂。该洗涤剂还可以包括一种增洁剂。

[0076] 微粒状洗涤剂组合物可以是颗粒或粉末,或被压成片、团块的粉末/颗粒。该组合物可以处于片、条或袋的形式,包括多隔室袋。该组合物可以处于粉末的形式,例如自由流动的粉末,像团聚体、喷雾干燥的粉末、胶囊、挤出物、针状体、条状体(noodle)、薄片、或其任何组合。

[0077] 可以由水可溶的袋中或片的不同层中的隔室来将洗涤剂成分物理地彼此分离(参见下面的单位剂量)。由此可以避免组分之间的负面的存储相互作用。在洗涤溶液中,每个隔室的不同溶解特性曲线还可以引起选择的组分的延迟溶解。

[0078] 袋可以具有适合保存该组合物的任何形式、形状和材料,例如在与水接触之前,不允许该组合物从袋中释放出来。袋由封装内体积的水溶性膜制成。可以将所述内体积分为袋的隔室。优选的膜是形成膜或片的聚合材料,优选是聚合物。优选的聚合物、共聚物或其衍生物是选择的聚丙烯酸酯以及水溶性丙烯酸酯共聚物、甲基纤维素、羧甲基纤维素、糊精钠、乙基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、麦芽糊精、聚甲基丙烯酸酯,最优选是聚乙烯醇共聚物、和羟丙基甲基纤维素(HPMC)。优选地,在膜中的聚合物(例如PVA)的水平是至少约60%。优选的平均分子量将典型地是约20,000至约150,000。膜还可以是包括用水解方法可降解的并且水溶性的聚合物掺混物的掺混组合物,例如聚乳酸和聚乙烯醇(在贸易参考M8630下已知,如由Chris Craft In. Prod. Of Gary, Ind., US所出售)加增塑剂,像丙三醇、乙烯丙三醇、丙二醇、山梨醇及其混合物。这些袋可以包括一种固体的衣物清洁组合物或部分组分和/或由水溶性膜分离的一种液体清洁组合物或部分组分。用于液体组分的隔室在构成上可以与包含固体的隔室不同(参见例如US2009/0011970)。

[0079] 洗涤剂组分的选择可以包括(用于纺织品保养)有待清洁的纺织品的类型、污物的类型和/或程度、进行清洁时的温度、以及洗涤剂产品的配制的考虑。尽管根据一种具体的功能对以下提及的组分由通用首部进行分类,但是这并不被解释为限制,因为如被熟练的业内人士所理解的,一种组分可以包括另外的功能。

[0080] 在一个实施例中,可以将本发明的稳定化的枯草杆菌蛋白酶组合物以对应于以下的量添加至一种洗涤剂组合物中:0.001-100mg的蛋白质,例如0.01-100mg的蛋白质,优选是0.005-50mg的蛋白质,更优选是0.01-25mg的蛋白质,甚至更优选是0.05-10mg的蛋白质,最优选是0.05-5mg的蛋白质,并且甚至最优选是0.01-1mg的蛋白质/升的洗涤液体。

[0081] 单位剂量

[0082] 单位剂量产品是不可重复使用的容器中的单一剂量的包装。它被越来越多地用于洗衣和餐具洗涤的洗涤剂中。洗涤剂单位剂量产品是用于单次洗涤的洗涤剂的量的包装(例如,在由水溶性膜制成的袋中)。

[0083] 在一个方面中,该洗涤剂组合物处于单位剂型。处于单位剂型的洗涤剂产品包括片、胶囊、小袋(sachet)、袋(pouch)、等。在一个方面中,在此使用的是用水溶性膜包裹的片以及水溶性袋。本发明的洗涤剂组合物的重量是从约 10 克至约 25 克,从约 12 克至约 24 克或甚至从 14 克至 22 克。这些重量对于适合自动餐具洗涤剂产品分配器来说是极其方便的。在具有水溶性材料包封该洗涤剂组合物的单位剂量产品的情况下,这种水溶性材料不被认为是该组合物的一部分。在一个方面中,该单位剂型是水溶性袋(即,水溶性膜包封一种洗涤剂组合物),在一个方面中,该单位剂型是具有形成多个隔室的多个膜的多隔室袋。这种构型有助于该组合物的柔性和优化。它允许不同成分的分​​离和控释。在一个方面中,一个隔室包含一种处于固态的洗涤剂组合物并且另一个隔室包含一种处于液态的洗涤剂组合物。

[0084] 在一个方面中,多隔室袋体现为两个不同的隔室可以包含两种不同的清洁剂。在一个方面中,这两个隔室的膜具有不同的溶解特性曲线,这允许相同或不同试剂在不同时间的释放。例如,可以在洗涤工艺的早期递送来自一个隔室(第一隔室)的试剂以帮助去污并且在比来自该第一隔室的试剂晚至少两分钟、或甚至至少五分钟时递送来自另一个隔室(第二隔室)的第二试剂。

[0085] 在一个方面中,披露了一种多隔室袋,该多隔室袋包括两个叠加在另一个隔室上的并排的隔室,其中至少两个不同的隔室包含两种不同的洗涤剂组合物。

[0086] 由形成多个隔室的多个水溶性包封材料形成一个多隔室包,这些隔室之一将包含该洗涤剂组合物的一些或所有成分,另一个隔室可以包含一种液体组合物,该液体组合物可以是水性的(即包括该液体组合物按重量计多于 10% 的水)并且该隔室可以由温水可溶性材料制成。在一个实施例中,一个隔室由冷水可溶性材料制成。它允许不同成分的分​​离和控释。在其他实施例中,所有的隔室都由温水可溶性材料制成。

[0087] 适合的包包括至少两个叠加(即放置在上面)在另一个隔室上的并排隔室,尤其适合的是袋。这种处置有助于包的紧密度、稳健性以及强度,另外,它使得所需的水溶性材料的量最小。它仅需要三块材料来形成三个隔室。包的稳健性还允许使用非常薄的膜而不损害包的物理完整性。包的使用也非常简单,因为这些隔室不需要被折叠以在具有固定几何结构的机械分配器中使用。包的至少两个隔室包含两种不同的洗涤剂组合物。在此“不同的组合物”意指在至少一种成分上存在不同的洗涤剂组合物。

[0088] 在一个方面中,至少一个隔室包含一种固体洗涤剂组合物并且另一个隔室包含一种水性液体洗涤剂组合物,这些组合物典型地处于从约 20:1 至约 1:20、从约 18:1 至约 2:1 或从约 15:1 至约 5:1 的固体与液体的重量比。这种包是非常通用的,因为它可以容纳具有广谱的固体:液体比例的值的组合物。袋具有高的固体:液体比例,因为许多的洗涤剂成分特别适合以固体形式使用,在一个方面中以粉末形式。在此所定义的固体:液体比例是指包中的所有固体组合物的重量与所有液体组合物的重量之间的关系。

[0089] 适合的固体:液体重量比是从约 2:1 至约 18:1,或从约 5:1 至约 15:1。在其中洗涤剂的大部分的成分处于液态的情况下,这些重量比是适合的。

[0090] 在一个方面中。这两个并排的隔室包含可以是相同或不同的液体洗涤剂组合物并且另一个隔室包含一种固体洗涤剂组合物,例如处于粉末形式,在一个方面中,处于致密的粉末形式。固体组合物有助于包的强度和稳健性。

[0091] 对于分配器的原因而言,尤其是在自动洗餐具机中,在此的单位剂型产品具有正方形或矩形底部以及从约 1cm 至约 5cm,或从约 1cm 至约 4cm 的高度。在一个方面中,固体组合物的重量是从约 5 克至约 20 克、或从约 10 克至约 15 克并且液体组合物的重量是从约 0.5 克至约 4 克、或从约 0.8 克至约 3 克。在一个方面中,在相同条件下,形成不同隔室的至少两种膜具有不同的溶解度。这使得它们部份或完全包封的组合物能够在不同时间释放。

[0092] 可以通过修饰膜的厚度和 / 或膜材料的溶解度来实现多隔室袋的成分的控释。如描述于 WO2002/102955 中,可以通过例如膜交联来延迟膜材料的溶解度。设计用于漂洗释放的其他水溶性膜描述于 US4,765,916 和 US4,972,017 中。膜的蜡状涂层可以帮助漂洗释放(参见 US5,453,216)。pH 控释手段描述于 US5,453,216 中,特别是具有选择性乙酰化度的氨基乙酰化多糖。

[0093] 通过具有不同隔室的多隔室袋而获得延迟释放的其他手段传授于 US6,727,215 中,其中这些隔室由具有不同溶解度的膜制成。

[0094] 表面活性剂

[0095] 洗涤剂组合物可以包括一种或多种表面活性剂,它们可以是阴离子的和 / 或阳离子的和 / 或非离子的和 / 或半极性的和 / 或两性离子的,或其混合。在一个具体实施例中,洗涤剂组合物包括一种或多种非离子型表面活性剂以及一种或多种阴离子表面活性剂的混合物,但是还可以被单独使用。

[0096] 这种或这些表面活性剂典型地以按重量计从约 0.1% 至 60% 的水平存在,例如约 1% 至约 40%、或约 3% 至约 20%、或约 3% 至约 10%。基于所希望的清洁应用来选择这种或这些表面活性剂,并且这种或这些表面活性剂包括本领域中已知的任何一种或多种常规表面活性剂。可以利用本领域中已知的用于在洗涤剂中使用的任何表面活性剂。

[0097] 阴离子表面活性剂的非限制性实例包括硫酸盐和磺酸盐,特别是直链烷基苯磺酸盐(LAS),LAS 的异构体,支链烷基苯磺酸盐(BABS),苯基链烷磺酸盐, α -烯烴磺酸盐(AOS),烯烴磺酸盐,链烯烴磺酸盐,链烷-2,3-二基双(硫酸盐),羟基链烷磺酸盐以及二磺酸盐,烷基硫酸盐(AS)(例如十二烷基硫酸钠(SDS)),脂肪醇硫酸盐(FAS),伯醇硫酸盐(PAS),醇醚硫酸盐(AES 或 AEOS 或 FES,也被称为醇乙氧基硫酸盐或脂肪醇醚硫酸盐,包括月桂基醚硫酸钠(SLES)、皂或脂肪酸);仲链烷磺酸盐(SAS),石蜡烴磺酸盐(PS),酯磺酸盐,磺化的脂肪酸甘油酯, α -磺酸基脂肪酸甲酯(α -SFMe 或 SES)(包括甲酯磺酸盐(MES)),烷基琥珀酸或烯基琥珀酸,十二烯基 / 十四烯基琥珀酸(DTSA),氨基酸的脂肪酸衍生物,磺酸基琥珀酸或皂的二酯和单酯,及其组合。

[0098] 当被包括在其中时,洗涤剂将通常包含按重量计从约 1% 至约 40%,例如从约 5% 至约 30%(包括从约 5% 至约 15%)、或从约 20% 至约 25% 的阴离子表面活性剂。

[0099] 非离子型表面活性剂的非限制性实例包括醇乙氧基化物(AE 或 AEO)、醇丙氧基化物、丙氧基化的脂肪醇(PFA),烷氧基化的脂肪酸烷基酯(例如乙氧基化的和 / 或丙氧基化的脂肪酸烷基酯),烷基酚乙氧基化物(APE),壬基酚乙氧基化物(NPE),烷基多糖苷(APG),烷氧基化胺,脂肪酸单乙醇酰胺(FAM),脂肪酸二乙醇酰胺(FADA),乙氧基化的脂肪酸单乙醇酰胺(EFAM),丙氧基化的脂肪酸单乙醇酰胺(PFAM),多羟基烷基脂肪酸酰胺,或葡萄糖胺的 N-酰基 N-烷基衍生物(葡糖酰胺(GA),或脂肪酸葡糖酰胺(FAGA)),以及在 SPAN 和 TWEEN 商品名下可获得的产品,及其组合。

[0100] 当被包括在其中时,洗涤剂将通常包含按重量计从约 0.2% 至约 40% 的非离子型表面活性剂,例如从约 0.5% 至约 30%,特别是从约 1% 至约 20%、从约 3% 至约 10%,像从约 3% 至约 5%、或从约 8% 至约 12%。

[0101] 增洁剂

[0102] 洗涤剂组合物可以包含按重量计 0-65% 的洗涤剂增洁剂或共增洁剂、或其混合物。在洗涤餐具洗涤剂中,增洁剂的水平典型地是 40%-65%,特别是 50%-65%。增洁剂和 / 或共增洁剂可以具体是形成具有 Ca 和 Mg 的水溶性复合物的螯合剂。可以利用本领域中已知的用于在衣物洗涤剂中使用的任何增洁剂和 / 或共增洁剂。增洁剂的非限制性实例包括沸石,二磷酸盐(焦磷酸盐),三磷酸盐(例如三磷酸钠(STP 或 STPP)),次氨基三乙酸,乙二胺四乙酸(EDTA),二亚乙基三胺五乙酸,烷基琥珀酸或烯基琥珀酸,碳酸盐(例如碳酸钠),可溶性硅酸盐(例如硅酸钠),分层的硅酸盐(例如,来自 Hoechst (赫斯特公司)的 SKS-6),乙醇胺(例如 2-氨基乙-1-醇(MEA),亚氨基二乙醇(DEA)和 2,2',2"-次氨基三乙醇(TEA)),以及羧甲基菊粉(CMI),及其组合。

[0103] 该增洁剂可以是一种强劲的增洁剂,例如甲基甘氨酸二乙酸("MGDA")或 N,N-二羧甲基谷氨酸四钠盐(GLDA);它可以是一种中度增洁剂,例如三聚磷酸钠(STPP);或它可以是一种弱的增洁剂,例如柠檬酸钠。

[0104] 漂白系统

[0105] 洗涤剂组合物可以包含按重量计 0-50% 的漂白系统。可以利用本领域中已知的用于在衣物洗涤剂中使用的任何漂白系统。适合的漂白系统组分包括漂白催化剂,光漂白剂(photobleach),漂白活化剂,过氧化氢源(例如过碳酸钠和过硼酸钠),预成型的过酸及其混合物。适合的预成型过酸包括,但不限于:过氧羧酸及盐,过碳酸及盐,过白啉酸(perimidic acid)及盐,过氧单硫酸及盐(例如过硫酸氢钾(Oxone(R)),及其混合物。漂白的非限制性实例包括基于过氧化物的漂白系统,该系统可以包括例如一种与过酸形成漂白活化剂组合的无机盐,包括碱金属盐,例如过硼酸盐(通常是单水合物或四水合物)、过碳酸盐、过硫酸盐、过磷酸盐、过硅酸盐的钠盐。漂白活化剂在此意指一种与过氧化物漂白剂(像过氧化氢)反应以形成过酸的化合物。以此方式形成的过酸构成活化的漂白剂。有待在此使用的适合的漂白活化剂包括属于酯酰胺、酰亚胺或酸酐类别的那些。适合的实例是四乙酰基乙二胺(TAED),3,5,5-三甲基己酰氧基苯磺酸钠,二过氧十二烷酸,4-(十二酰氧基)苯磺酸盐(LOBS),4-(癸酰氧基)苯磺酸盐,4-(癸酰氧基)苯甲酸盐(DOBS),4-(3,5,5-三甲基己酰氧基)苯磺酸盐(ISONOBS),四乙酰基乙二胺(TAED)以及 4-(壬酰氧基)苯磺酸盐(NOBS),和 / 或 W098/17767 中披露的那些。感兴趣的漂白活化剂的具体家族披露于 EP624154 中并且在那个家族中特别优选的是乙酰柠檬酸三乙酯(ATC)。ATC 或短链甘油三酸酯(像 Triacin)具有以下优点,它是环境友好的,因为它最终降解为柠檬酸和醇。而且,乙酰柠檬酸三乙酯和三乙酸甘油酯在存储时在产品中具有良好的水解稳定性,并且它是一种有效的漂白活化剂。最后,ATC 为洗衣添加剂提供一种良好的增洁能力。可替代地,漂白系统可以包括例如酰胺、亚胺、或酰胺型的过氧酸。漂白系统还可以包括过酸,例如 6-(邻苯二甲酰氨基)过己酸(PAP)。漂白系统还可以包括一种漂白催化剂。

[0106] 洗涤剂组合物的其他本领域中所有熟知的成分包括助水溶物,织物调色剂,消泡剂,去污聚合物,抗再沉积剂,等。

[0107] 方法和组合物

[0108] 在一个第一方面中,本发明提供了一种组合物,该组合物包括一种枯草杆菌蛋白酶和具有式 $X-B^1-NH-CHR-CHOH-SO_3M$ 的肽醛亚硫酸氢盐加合物,其中:

[0109] a) M 是 H (氢) 或一种碱金属;

[0110] b) R 是一种基团这样使得 $NH-CHR-CO$ 是 L- 氨基酸残基或 D- 氨基酸残基;

[0111] c) B^1 是一个氨基酸残基; 并且

[0112] d) X 由一个或多个氨基酸残基组成,可任选地包括一种 N 端保护基团。

[0113] 在一个实施例中, R 是一种基团这样使得 $NH-CHR-CO$ 是 Tyr、间-酪氨酸、3, 4- 二羟苯丙氨酸、Phe、Val、Met、Nva、Leu、Ile 或 Nle 的 L- 氨基酸残基或 D- 氨基酸残基。

[0114] 在一个实施例中, B^1 是 Ala、Cys、Gly、Pro、Ser、Thr、Val、Nva、或 Nle 的残基。

[0115] 在一个实施例中, X 是 B^2 、 B^3-B^2 、 $Z-B^2$ 、或 $Z-B^3-B^2$, 其中 B^2 和 B^3 各自表示一个氨基酸残基, 并且 Z 是一种 N 端保护基团。优选地, B^2 是 Val、Gly、Ala、Arg、Leu、Phe 或 Thr 的残基。优选地, B^3 是 Phe、Tyr、Trp、苯基甘氨酸、Leu、Val、Nva、Nle 或 Ile 的残基。

[0116] 在一个实施例中, Z 是苄氧羰基 (Cbz)、对甲氧苄基羰基 (MOZ)、苄基 (Bn)、苯甲酰基 (Bz)、对甲氧苄基 (PMB)、对甲氧苄基 (PMP)、甲酰基、乙酰基 (Ac)、甲氧基、或甲氧羰基。

[0117] 在一个实施例中, 该组合物处于液体或粒状形式。优选地, 该组合物是一种进一步包括表面活性剂的洗涤剂。

[0118] 在一个实施例中, 该组合物进一步包括一种第二酶, 具体是脂肪酶、角质酶、淀粉酶、碳水化合物酶、纤维素酶、果胶酶、果胶酸裂解酶、甘露聚糖酶、阿拉伯糖酶、半乳聚糖酶、木聚糖酶、氧化酶、漆酶或过氧化酶。

[0119] 在另一个方面中, 本发明提供了一种制备本发明的组合物的方法, 如上所述, 该方法包括将一种枯草杆菌蛋白酶、一种包括具有如上所述的式 $X-B^1-NH-CHR-CHOH-SO_3M$ 的肽醛亚硫酸氢盐加合物的水溶液、以及任选地一种表面活性剂进行混合。

[0120] 在又一个方面中, 本发明提供了一种用于在本发明的组合物中使用的化合物, 该化合物是具有式 $X-B^1-NH-CHR-CHOH-SO_3M$ 的肽醛亚硫酸氢盐加合物, 其中 M 和 X 是如上所述定义的, B^1 是一种与脯氨酸 (Pro) 不同的氨基酸残基, 并且 R 是一种基团这样使得 $NH-CHR-CO$ 是 Tyr、间酪氨酸、3, 4- 二羟苯丙氨酸、Phe、Val、Met、Nva 或 Nle 的 L- 氨基酸残基或 D- 氨基酸残基。

[0121] 在一个实施例中, 该化合物是 Cbz-RA-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H、Ac-GA-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H、Cbz-GA-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H、Cbz-GG-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H、Cbz-RV-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H、Cbz-LV-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H、Ac-LGA-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H、Ac-FGA-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H、Ac-YGA-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H、Ac-FGV-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H、或 Ac-WLV-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H, 其中 Ac 是乙酰基并且 Cbz 是苄氧羰基。

[0122] 在又一个方面中, 本发明提供了一种用于在本发明的组合物中使用的化合物, 该化合物是具有式 $X-B^1-NH-CHR-CHOH-SO_3M$ 的肽醛亚硫酸氢盐加合物, 其中 M、R 和 X 是如上所述定义的, 并且其中 B^1 是丙氨酸 (Ala)、半胱氨酸 (Cys)、甘氨酸 (Gly)、丝氨酸 (Ser)、苏

氨酸(Thr)、缬氨酸(Val)、正缬氨酸(Nva)以及正亮氨酸(Nle)的氨基酸残基。

[0123] 在一个实施例中,该化合物是 Cbz-GA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂))C(OH)(SO₃M)-H、Cbz-VA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂))C(OH)(SO₃M)-H、Cbz-GA-NHCH(CH₂Ph)C(OH)(SO₃M)-H、Cbz-GA-NHCH(CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H、Cbz-GG-NHCH(CH₂Ph)C(OH)(SO₃M)-H、Ac-FGA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂))C(OH)(SO₃M)-H、Ac-FGA-NHCH(CH₂Ph)C(OH)(SO₃M)-H、Ac-FGA-NHCH(CH₂CH₂SCH₃)(SO₃M)-H、MeO-CO-VA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂))C(OH)(SO₃M)-H、MeNCO-VA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂))C(OH)(SO₃M)-H、MeO-CO-FGA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂))C(OH)(SO₃M)-H、MeO-CO-FGA-NHCH(CH₂Ph)C(OH)(SO₃M)-H、MeSO₂-FGA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂))C(OH)(SO₃M)-H、MeSO₂-VA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂))C(OH)(SO₃M)-H、PhCH₂O(OH)(O)P-VA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂))C(OH)(SO₃M)-H、EtSO₂-FGA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂))C(OH)(SO₃M)-H、PhCH₂SO₂-VA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂))C(OH)(SO₃M)-H、PhCH₂O(OH)(O)P-LA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂))C(OH)(SO₃M)-H、PhCH₂O(OH)(O)P-FA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂))C(OH)(SO₃M)-H、以及 MeO(OH)(O)P-LGA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂))-C(OH)(SO₃M)-H,其中 Ac 是乙酰基并且 Cbz 是苄氧羰基。

[0124] 在又另一个方面中,本发明提供了一种用于在本发明的组合物中使用的化合物,该化合物是具有式 X-B¹-NH-CHR-CHOH-SO₃M 的肽醛亚硫酸氢盐加合物;其中 R 和 M 是如上所述定义的;B¹ 表示一个与脯氨酸(Pro)不同的氨基酸残基;X 是 B²、B³-B²、Z-B²、Z-B³-B²,其中 B³ 和 B² 各自表示一个氨基酸残基,并且 Z 是一种 N 端保护基团;并且其中 B² 是 Gly、Thr 或 Val。

[0125] 在又另一个方面中,本发明提供了一种用于在本发明的组合物中使用的化合物,该化合物是具有式 X-B¹-NH-CHR-CHOH-SO₃M 的肽醛亚硫酸氢盐加合物;其中 R 和 M 是如上所述定义的;B¹ 表示一个与脯氨酸(Pro)不同的氨基酸残基;X 是 B³-B²、Z-B³-B²,其中 B³ 和 B² 各自表示一个氨基酸残基,并且 Z 是一种 N 端保护基团;并且其中 B³ 是 Phe、Tyr、Trp、苯基甘氨酸、Leu、Val、Nva、Nle 或 Ile。

[0126] 实例

[0127] 用作缓冲液和底物的化学制品至少是试剂等级的商品。

[0128] 实例 1

[0129] 肽醛的亚硫酸氢盐加合物的制备

[0130] 将如上所述具有式 X-B¹-B⁰-H 的肽醛转化为相对应的亚硫酸氢盐加合物。在室温下,向在 8ml 乙酸乙酯中的 1mmol X-B¹-B⁰-H 的搅拌悬浮液中滴加在 6ml 水中的 1.06mmol 亚硫酸氢钠(114mg)并且然后将该反应搅拌 2 小时。将水相分离并且将有机层用 2x2ml 水进行洗涤。将合并的水相冻干,给出呈白色粉末的 X-B¹-NH-CHR-CHOH-SO₃Na (预测产量 66%)。

[0131] 实例 2

[0132] 肽醛亚硫酸氢盐加合物的液体配制品的制备

[0133] 将 4mmol 的固体 X-B¹-NH-CHR-CHOH-SO₃Na 溶解于 6g 软化水中并且在 35°C 下搅拌 30min,并且随后冷却,给出 X-B¹-NH-CHR-CHOH-SO₃Na 的 25% 水溶液。可替代地,来自上面合成中的水相可以被容易地用于下面步骤中的酶稳定化并且这种溶液是大约 3% (w/w)。

[0134] 实例 3

[0135] 包括枯草杆菌蛋白酶和肽醛亚硫酸氢盐加合物的稳定化的枯草杆菌蛋白酶配制品的制备

[0136] 通过使用 3.6% 的上面的 25% 水溶液,向可商购的 Savinase16L™(丹麦的巴格斯维尔德(Bagsvaerd) 诺维信公司(Novozymes A/S)) 中添加 0.9%X-B¹-NH-CHR-CHOH-SO₃Na。

[0137] 实例 4

[0138] 通过亚硫酸氢盐加合物稳定化枯草杆菌蛋白酶

[0139] 一般实验细节:将具有枯草杆菌蛋白酶(Savinase16L) 和脂肪酶(Lipex100L)、具有或不具有 X-B¹-NH-CHR-CHOH-SO₃Na (该肽醛亚硫酸氢盐加合物可以被单独地添加至包含该枯草杆菌蛋白酶的洗涤剂中) 的洗涤剂放置于 -18℃、35℃以及 40℃下的密闭玻璃中。使用标准分析方法,在不同时间之后测量蛋白酶和脂肪酶的残留活性(蛋白酶通过在 40℃、pH8.3 下 N,N-二甲基酪蛋白的水解来测量并且脂肪酶通过在 40℃、pH7.7 下 pNp-戊酸酯的水解来测量)。可以向已经包含适合量的肽醛亚硫酸氢盐加合物的洗涤剂中添加枯草杆菌蛋白酶来进行类似尝试。可以由所有提及的肽醛亚硫酸氢盐加合物获得类似结果。

[0140] 作为具有稳定化的枯草杆菌蛋白酶配制品的洗涤剂组合物的一个实例,在表 1 中描述了该组合物。

[0141] 表 1. 洗涤剂组合物。

[0142]

[0143]

组分	% (w/w)
烷基乙氧基硫酸钠 (C9-15, 2EO)	6.0
十二烷基苯磺酸钠	3.0
甲苯磺酸钠	3.0
油酸	2.0
伯醇乙氧基化物 (C12-15, 7EO)	3.0
伯醇乙氧基化物 (C12-15, 3EO)	2.5
乙醇	0.5
单丙二醇	2.0
柠檬酸三钠 2H ₂ O	4.0
三乙醇胺	0.4
用 NaOH 将 pH 调节至 8.5	
具有 X-B ¹ -NH-CHR-CHOH-SO ₃ Na 的稳定化的 Savinase 配制品; 或用于比较的 Savinase 16L	0.5
Lipex 100L TM (可以从诺维信公司 (Novozymes A/S) 获得)	0.5
水	至 100%

[0144] 在表 2 中示出了用 X=Cbz-Gly ; B¹=Ala ; R=-CH₂-p(C₆H₄)-OH 获得的结果 ; 在 40℃ 下、在表 1 所描述的洗涤剂中孵育一周之后测量的稳定性。

[0145] 表 2. 在 40℃ 下、在表 1 所描述的洗涤剂中孵育一周之后, 剩余的蛋白酶活性。

[0146]

向洗涤剂中添加的抑制剂的量	蛋白酶稳定性(剩余活性)
无	12%

7ppm	52%
14ppm	77%
18ppm	80%

[0147]

[0148] 这些结果证明通过添加肽醛的亚硫酸氢盐加合物对枯草杆菌蛋白酶的稳定化。

[0149] 实例 5

[0150] 枯草杆菌蛋白酶和脂肪酶的稳定化

[0151] 作为具有稳定化的枯草杆菌蛋白酶配制品的洗涤剂组合物的一个实例,在表 3 中描述了该组合物。

[0152] 表 3. 洗涤剂组合物。

[0153]

组分	% (w/w)
十二烷基苯磺酸钠	6.0
NaOH	1.4
大豆脂肪酸 (Edenor SJ)	3.0
可可脂肪酸 (Radiacid 0631)	2.5
伯醇乙氧基化物 (C13, 8EO)	5.0
乙醇	5.0
单丙二醇	5.0
柠檬酸三钠 2H ₂ O	0.5

[0154]

三乙醇胺	2.0
膦酸盐 - Dequest 2066 C2	3.0
如果必要的话, 用另外的 NaOH 将 pH 调节至 8.4	
枯草杆菌蛋白酶: Savinase, 用 X-B ¹ -NH-CHR-CHOH-SO ₃ Na 进行稳定; 或用 4-甲酰基苯基硼酸; 或不用用于比较的稳定剂	0.75
脂肪酶: Lipex 100L TM (可以从诺维信公司 (Novozymes A/S) 获得)	0.15
水	至 100%

[0155] 在表 4 中示出了在 35°C 下、在表 3 所描述的洗涤剂中孵育两周之后测量的结果。

[0156] 表 4. 在 35°C 下、在表 3 所描述的洗涤剂中孵育 2 周之后, 枯草杆菌蛋白酶(蛋白酶)和脂肪酶的剩余活性。

[0157]

抑制剂	洗涤剂中的抑制剂	枯草杆菌蛋白酶	脂肪酶
无	-	2%	1%
4-甲酰基苯基硼酸(现有技术)	128 ppm	8%	2%
X = Cbz-Gly; B ¹ = Ala; R = -CH ₂ -p(C ₆ H ₄)-OH	21 ppm	63%	18%

[0158] 这些结果证明肽醛的亚硫酸氢盐加合物的添加可以稳定枯草杆菌蛋白酶和蛋白酶(脂肪酶), 并且证明它比现有技术的稳定剂有效的多。

[0159] 实例 6

[0160] 枯草杆菌蛋白酶和脂肪酶的稳定化

[0161] 作为具有稳定化的枯草杆菌蛋白酶配制品的洗涤剂的又一个实例, 在表 5 中描述了该组合物。

[0162] 表 5. 洗涤剂组合物。

[0163]

组分	% (w/w)
商业上的非酶洗涤剂。2 x 剂量的液体 EU。 在英国购买，2009	98.2
枯草杆菌蛋白酶	1.4
脂肪酶：Lipoclean 2000L（可以从诺维信公司 （Novozymes A/S）获得）	0.4

[0164] 在表 6 中示出了在表 5 所描述的洗涤剂中在 37°C 下孵育 4 周之后、以及在 30°C 下孵育 8 周之后测量的结果。

[0165] 表 6. 在表 5 所描述的洗涤剂中在 37°C 下孵育 4 周之后、或在 30°C 下孵育 8 周之后，枯草杆菌蛋白酶(蛋白酶)和脂肪酶的剩余活性。

[0166]

抑制剂	枯草杆菌蛋白酶	向洗涤剂中添加的抑制剂的量	枯草杆菌蛋白酶	脂肪酶
			在 37°C 下，4 周	在 30°C 下，8 周
无	Coronase 48L	0	69%	28%
X = Cbz-Gly; B ¹ = Ala;	Coronase 48L	59 ppm	80%	61%

[0167]

$R = -CH_2-p(C_6H_4)-OH$				
无	液体蛋白酶 2.5L	0	43%	0%
X = Cbz-Gly; B ¹ = Ala; R = -CH ₂ -p(C ₆ H ₄)-OH	液体蛋白酶 2.5L	34 ppm	83%	27%

[0168] 这些结果证实肽醛的亚硫酸氢盐加合物的添加可以稳定枯草杆菌蛋白酶以及针对不同枯草杆菌蛋白酶的第三酶(脂肪酶)。

[0001]

序列表

<110> 诺维信公司 (Novozymes A/S)

<120> 稳定化的枯草杆菌蛋白酶组合物

<130> 11717-WO-PCT

<160> 9

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽醛

<400> 1

Leu Gly Ala Tyr
1

<210> 2

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽醛

<400> 2

Phe Gly Ala Tyr
1

<210> 3

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

[0002]

<220>

<223> 肽醛

<400> 3

Tyr Gly Ala Tyr

1

<210> 4

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽醛

<400> 4

Phe Gly Ala Leu

1

<210> 5

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽醛

<400> 5

Phe Gly Ala Phe

1

<210> 6

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

[0003]

<223> 肽醛

<400> 6

Phe Gly Val Tyr
1

<210> 7

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽醛

<400> 7

Phe Gly Ala Met
1

<210> 8

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽醛

<400> 8

Trp Leu Val Tyr
1

<210> 9

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽醛

[0004]

<400> 9

Leu Gly Ala Leu

1