

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03826025.5

[51] Int. Cl.

C12N 9/28 (2006.01)

C12N 9/30 (2006.01)

C12N 15/74 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2006 年 3 月 8 日

[11] 公开号 CN 1745169A

[22] 申请日 2003.2.26 [21] 申请号 03826025.5

[86] 国际申请 PCT/US2003/005658 2003.2.26

[87] 国际公布 WO2004/078960 英 2004.9.16

[85] 进入国家阶段日期 2005.8.24

[71] 申请人 金克克国际有限公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 F·A·哈丁

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

代理人 赵蓉民 路小龙

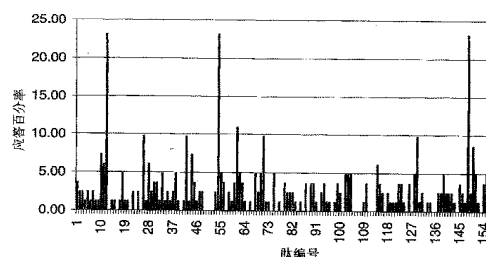
权利要求书 3 页 说明书 71 页 附图 1 页

[54] 发明名称

产生改变的免疫原应答的淀粉酶及其制备和使用方法

[57] 摘要

本发明提供了新颖的淀粉酶变体，这些变体与亲本蛋白质相比表现出降低的免疫原性应答。本发明进一步提供了编码新颖的淀粉酶变体的 DNA 分子、包含编码新颖的淀粉酶变体的 DNA 的宿主细胞，以及制备具有较低的变应原性的淀粉酶的方法。此外，本发明提供了多种包含这些淀粉酶变体的组合物，所述的淀粉酶变体与野生型淀粉酶相比具有较低的免疫原性。



1. 用于鉴定淀粉酶的至少一个 T 细胞表位的方法, 所述方法包括步骤:
 - (a) 从单个人血液来源获得树突状细胞的溶液和初生 CD4+和/或 CD8+ T 细胞的溶液;
 - 5 (b) 分化所述的树突状细胞以产生分化的树突状细胞的溶液;
 - (c) 将所述的分化的树突状细胞的溶液和所述的初生 CD4+和/或 CD8+ T 细胞的溶液与所述淀粉酶的肽片段混合; 和
 - (d) 测量在所述步骤 (c) 中的所述 T 细胞的增殖。
2. 如权利要求 1 所述的方法, 其中所述淀粉酶是微生物淀粉酶。
- 10 3. 如权利要求 2 所述的方法, 其中所述淀粉酶是从杆菌属的成员中获得的。
4. 如权利要求 3 所述的方法, 其中杆菌选自枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*)、地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*)、缓慢芽孢杆菌 (*B. lentus*)、短小芽孢杆菌 (*B. brevis*)、嗜热脂肪芽孢杆菌 (*B. stearothermophilus*)、嗜碱芽孢杆菌 (*B. alkalophilus*)、解淀粉芽孢杆菌 (*B. amyloliquefaciens*)、克劳氏芽孢杆菌 (*B. clausii*)、耐盐芽孢杆菌 (*B. halodurans*)、巨大芽孢杆菌 (*B. megaterium*)、凝结芽孢杆菌 (*B. coagulans*)、环状芽孢杆菌 (*B. circulans*)、典雅芽孢杆菌 (*B. lautus*) 和苏云金芽孢杆菌 (*B. thuringiensis*)。
- 15 芽孢杆菌 (*B. alkalophilus*)、解淀粉芽孢杆菌 (*B. amyloliquefaciens*)、克劳氏芽孢杆菌 (*B. clausii*)、耐盐芽孢杆菌 (*B. halodurans*)、巨大芽孢杆菌 (*B. megaterium*)、凝结芽孢杆菌 (*B. coagulans*)、环状芽孢杆菌 (*B. circulans*)、典雅芽孢杆菌 (*B. lautus*) 和苏云金芽孢杆菌 (*B. thuringiensis*)。
- 20 5. 如权利要求 1 所述的方法, 其中所述淀粉酶包含 SEQ ID NO:1 中的序列的至少一部分。
6. 降低淀粉酶的免疫原性的方法, 所述方法包括步骤:
 - (a) 鉴定所述淀粉酶中的至少一个 T 细胞表位, 通过
 - (i) 使粘附的单核细胞来源的树突状细胞与包含所述的 T 细胞表位的至少一种肽接触, 其中所述树突状细胞已经通过体外暴露给至少一种细胞因子被分化; 和
 - 25 (ii) 使所述的树突状细胞和所述的肽与初生 T 细胞接触, 其

中所述的初生 T 细胞已经从与所述的粘附的单核细胞来源的树突状细胞相同的来源获得,从而所述的 T 细胞对所述肽产生应答而发生增殖;和

(b) 修饰所述的淀粉酶以中和所述的 T 细胞表位,以产生变体淀粉酶,这样,所述的变体淀粉酶诱导低于或基本上等于所述初生 T 细胞的基线增殖。

7. 如权利要求 6 所述的方法,其中所述淀粉酶是微生物淀粉酶。

8. 如权利要求 7 所述的方法,其中所述淀粉酶是从杆菌属的成员中获得的。

9. 如权利要求 8 所述的方法,其中杆菌选自枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、缓慢芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、嗜碱芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、克劳氏芽孢杆菌、耐盐芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌、环状芽孢杆菌、典雅芽孢杆菌和苏云金芽孢杆菌。

10. 如权利要求 6 所述的方法,其中所述淀粉酶包含 SEQ ID NO:1 中的序列的至少一部分。

11. 如权利要求 6 所述的方法,其中所述淀粉酶的所述表位被修饰,通过:(a) 用来自所述淀粉酶的同源物的类似序列取代所述 T 细胞表位的氨基酸序列,其中所述的取代基本上模拟 T 细胞表位的主要三级结构特征。

12. 如权利要求 6 所述的方法,其中所述淀粉酶通过改变选自 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9 和 SEQ ID NO:10 的至少一个表位来修饰。

13. 如权利要求 12 所述的方法,其中所述表位通过用氨基酸序列替代与所述的至少一个表位相对应的残基来修饰。

14. 如权利要求 12 所述的方法,其中所述表位通过删除与所述的至少

一个表位相对应的残基的氨基酸序列来修饰。

15. 如权利要求 12 所述的方法，其中所述表位通过在所述的至少一个表位上增加氨基酸来修饰。

17. 变体淀粉酶，其包含在至少一个表位中的至少一个变化，所述的至少一个表位包含选自 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9 和 SEQ ID NO:10 的氨基酸序列。

18. 如权利要求 17 的变体淀粉酶，其中所述淀粉酶是在杆菌属的生物中表达的。

10 19. 如权利要求 17 的变体淀粉酶，其中所述变体淀粉酶产生的免疫原应答低于由野生型淀粉酶产生的所述免疫原应答。

20. 如权利要求 17 的变体淀粉酶，其中由所述变体产生的免疫原应答大于由野生型淀粉酶产生的所述免疫原应答。

21. 组合物，其包含编码权利要求 17 的所述变体淀粉酶的核酸。

15 22. 表达载体，其包含权利要求 21 的核酸。

23. 用权利要求 22 的表达载体转化的宿主细胞。

24. 洗涤组合物，其包含权利要求 17 的变体淀粉酶。

产生改变的免疫原应答的淀粉酶及其制备和使用方法

技术领域

- 5 本发明提供了新颖的淀粉酶变体，与亲本蛋白（parental proteins）相比，这些酶表现出降低的免疫原应答（immunogenic responses）。本发明进一步提供了编码新颖的淀粉酶变体的 DNA 分子、包含编码新颖的淀粉酶变体的 DNA 的宿主细胞，以及用于制备具有较低的变应原性/免疫原性的淀粉酶的方法。此外，本发明提供了包含这些淀粉酶变体的
- 10 的多种组合物，与野生型淀粉酶相比，所述淀粉酶变体是较低免疫原性的。

背景技术

- 蛋白质在工业、药物和商业用途中的应用越来越普遍和重要。然而，这已经导致许多个体对这些蛋白质产生敏感化，导致对这些蛋白
- 15 质的过敏反应频繁的出现。例如，一些蛋白质与某些个体中的超敏反应有关。结果，尽管蛋白质在工业（例如洗衣去污剂、化妆品、织物处理等等）中很有用，并且在该领域进行了广泛研究以提供改进的酶（例如在典型的洗衣条件下具有更有效的去污性的酶），但这些酶在工
- 20 业上的应用一直有问题。

- 已经开展了很多的工作来缓解这些问题。为了降低酶应用的免疫原性潜力而开发出来的策略包括改进的生产工艺，该工艺通过控制和最小化粉尘颗粒和/或携带有空气传播的蛋白质的浮质的工作间浓度，来减少潜在的接触；改进的成粒工艺，该工艺降低实际上由蛋白质产
- 25 品所产生的粉尘或浮质的数量；以及改进的回收工艺，该工艺降低在最终产品中具有潜在的变应原性/免疫原性的污染物的水平。然而，降低蛋白质本身的变应原性/免疫原性的努力是相对不成功的。另外，已经进行了掩饰酶中的表位（epitopes）的努力，所述表位在高度敏感个体中被免疫球蛋白 E（IgE）识别。（参见 PCT 公开号 WO 92/10755；
- 30 WO 94/10191；WO 96/17929；WO 99/49056；和 WO 01/07578），或通

过使聚合物或肽/蛋白质附着到有问题的酶上，来放大或改变抗原决定簇的性质。

尽管一些研究已经提供了降低某些蛋白质的变态反应原性/免疫原性的方法，以及在一些个体中引起变态反应的表位的鉴定，但是用于
5 鉴定这些表位的分析方法通常涉及在之前已经暴露于抗原的个体的血清中测量 IgE 和 IgG。然而，一旦 Ig 反应已经开始，致敏作用就已经发生了。因此，存在一种鉴定会产生增强的免疫应答的蛋白质的需求，以及存在一种生产能引起降低的免疫应答的蛋白质的需求。

10 发明概述

本发明提供了新颖的蛋白质变体，这些变体与亲本蛋白质相比表现出降低的免疫原性应答。本发明进一步提供了编码新颖变体的 DNA 分子、包含编码新颖变体的 DNA 的宿主细胞，以及制备具有较低的变应原性/免疫原性的蛋白质的方法。此外，本发明提供了多种包含这些
15 蛋白质的组合物，所述蛋白质与野生型蛋白质相比具有较低的免疫原性。

本发明提供了用于鉴定淀粉酶的至少一种 T 细胞表位的方法，该方法包括如下步骤：(a) 从单个人血液来源，获得树突状细胞的溶液和初生 (naive) CD4+ 和/或 CD8+ T-细胞的溶液，(b) 分化树突状细胞
20 以产生被分化的树突状细胞的溶液；(c) 将分化的树突状细胞以及初生 CD4+ 和/或 CD8+ T-细胞的溶液与淀粉酶的肽片段混合；和 (d) 测量在步骤 (c) 中的 T 细胞的增殖。在一些实施方案中，淀粉酶是微生物淀粉酶。在一些优选实施方案中，淀粉酶是从杆菌属 (*Bacillus*) 的一个成员获得的。在一些特别优选的实施方案中，杆菌选自枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*)、地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*)、缓慢芽孢杆菌 (*B. lentus*)、短小芽孢杆菌 (*B. brevis*)、嗜热脂肪芽孢杆菌 (*B. stearothermophilus*)、嗜碱芽孢杆菌 (*B. alkalophilus*)、解淀粉芽孢杆菌 (*B. amyloliquefaciens*)、克劳氏芽孢杆菌 (*B. clausii*)、耐盐芽孢杆菌 (*B. halodurans*)、巨大芽孢杆菌 (*B. megaterium*)、凝结芽孢杆菌 (*B. coagulans*)、环状芽孢杆菌 (*B. circulans*)、典雅芽孢杆菌 (*B. lautus*)
25 和苏云金芽孢杆菌 (*B. thuringiensis*)。在一些可以选择的实施方案中，

淀粉酶包含如 SEQ ID NO:1 中所示的序列的至少一部分。本发明也提供了用于降低淀粉酶的免疫原性的方法，所述方法包括步骤：(a) 鉴定淀粉酶中的至少一种 T 细胞表位，通过 (i) 使粘附单核细胞来源的树突状细胞与至少一种包含 T 细胞表位的肽接触，所述树突状细胞已经通过体外暴露给至少一种细胞因子被分化；和 (ii) 使树突状细胞和肽与初生 T 细胞接触，其中初生 T 细胞是从与粘附单核细胞来源的树突状细胞相同的来源获得的，从而 T 细胞响应于该肽而发生增殖效应；和 (b) 修饰淀粉酶以中和 (neutralize) T 细胞表位，以产生变体淀粉酶，这样，变体淀粉酶所诱导的是低于或基本上等于初生 T 细胞的基线增殖 (baseline proliferation)。在一些实施方案中，淀粉酶是微生物淀粉酶。在一些优选实施方案中，淀粉酶是从杆菌属的一个成员获得的。在一些特别优选的实施方案中，杆菌选自枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*)、地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*)、缓慢芽孢杆菌 (*B. lentus*)、短小芽孢杆菌 (*B. brevis*)、嗜热脂肪芽孢杆菌 (*B. stearothermophilus*)、嗜碱芽孢杆菌 (*B. alkalophilus*)、解淀粉芽孢杆菌 (*B. amyloliquefaciens*)、克劳氏芽孢杆菌 (*B. clausii*)、耐盐芽孢杆菌 (*B. halodurans*)、巨大芽孢杆菌 (*B. megaterium*)、凝结芽孢杆菌 (*B. coagulans*)、环状芽孢杆菌 (*B. circulans*)、典雅芽孢杆菌 (*B. lautus*) 和苏云金芽孢杆菌 (*B. thuringiensis*)。在一些可以选择的实施方案中，淀粉酶包含如 SEQ ID NO:1 中所示的序列的至少一部分。在一些实施方案中，淀粉酶的表位通过如下来修饰：(a) 用来自淀粉酶的同源物 (homolog) 的类似序列取代 T 细胞表位的氨基酸序列，其中该取代基本上模拟 T 细胞表位的主要三级结构特征。在一些优选实施方案中，淀粉酶通过改变选自 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10 中的至少一个表位而被修饰。在一些实施方案中，表位通过用氨基酸序列代替与至少一个表位相对应的残基来修饰，而在其它实施方案中，表位通过删除与至少一个表位相对应的残基的氨基酸序列来修饰，仍然在进一步的实施方案中，表位通过在至少一个表位上增加氨基酸来修饰。

本发明也提供了变体淀粉酶，其包含在至少一个表位上的至少一

个改变，所述的表位包括选自 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10 的氨基酸序列。在一些优选的实施方案中，淀粉酶是在杆菌属的生物中表达的。在一些特别优选的实施方案中，由变体淀粉酶产生的免疫原性反应低于由野生型淀粉酶产生的免疫原性反应。然而，在一些其它实施方案中，由变体产生的免疫原性反应大于由野生型淀粉酶产生的免疫原性反应。

本发明进一步提供了包含编码变体淀粉酶的核酸序列的组合物，以及包含核酸的表达载体，和用表达载体转化的宿主细胞。

10 本发明进一步提供了与工业和消费者相关的产品，包括但不限于这样的组合物，如包含本发明的变体淀粉酶的洗涤组合物。实际上，本发明提供了适合用于各种用途、环境和组合物的变体淀粉酶。

附图说明

15 图 1 提供了一份说明针对地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*) 淀粉酶肽的响应者百分比 (per cent responders) 的图表。

发明描述

20 本发明提供了新颖的蛋白质变体，这些蛋白质变体与亲本蛋白质相比表现出降低的免疫原性反应。本发明进一步提供了编码新颖变体的 DNA 分子、包含编码新颖变体的 DNA 的宿主细胞，以及用于制备具有较低的变应原性/免疫原性的蛋白质的方法。此外，本发明提供了多种包含这些蛋白质的组合物，所述蛋白质与野生型蛋白质相比具有较低的免疫原性。

25 在一个优选的实施方案中，与前体（即亲本）淀粉酶相比，本发明提供了刺激改变的免疫原性响应和变应潜能的变体淀粉酶。

定义

30 除非另外说明，此处所用的所有技术和科学术语与本发明所属的技术领域的普通技术人员通常的理解具有相同的含义。例如，Singleton 和 Sainsbury, *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology*, 2d Ed.,

John Wiley and Sons, NY (1994); 以及 Hale 和 Marham, *The Harper Collins Dictionary of Biology*, Harper Perennial, NY (1991)为本领域普通技术人员提供了本发明中所用的许多术语的通用解释。尽管与此处所描述的那些方法和材料类似和等价的任何方法和材料可以在本发明的实践中使用, 但优选的方法和材料在此处被描述。因此, 将说明书作为5 一个整体来参考, 下面将要定义的术语被更加充分地描述。而且, 正如此处所用, 术语“一个(a)”、“一(an)”和“这个”包括了复数涵义, 除非上下文中清楚地另有指明。

正如此处所用, “淀粉酶”指将淀粉或糖原分解(即水解)为糊精、麦芽糖和/或葡萄糖的任何酶。该术语包括本技术领域已知的各种类型10 淀粉酶中的任何类型, 包括 α 淀粉酶、 β 淀粉酶和葡糖淀粉酶。然而, 在特别优选的实施方案中, 本发明的淀粉酶包括 α -淀粉酶。该术语包括自然发生的以及重组的淀粉酶。

正如此处所用, “人淀粉酶”指来源于人的蛋白质, 其表现出淀粉酶型催化活性(例如人源性淀粉酶的 kexin 家族)。此外, 此处提供的15 蛋白质的衍生物、变体和同源物, 包括那些来源于非人来源如小鼠或兔的蛋白质的衍生物、变体或同源物, 它们保留了酶的主要活性, 其包括在本发明的范围之内。

正如此处所用, “淀粉”指任何含有淀粉的材料。尤其是, 该术语指各种基于植物的材料, 包括但不限于小麦、大麦、马铃薯、甘薯、20 菱、谷物(corn)、玉米(maize)、木薯、高粱、黑麦和麸皮。实际上, 这里并不意图将本发明限定于任何特定类型和/或来源的淀粉。总的来说, 该术语指含有植物的复杂多糖碳水化合物的任何材料, 包括直链淀粉和支链淀粉, 其具有分子式 $(C_6H_{10}O_5)_x$, 其中“x”可以是任何数字。25

正如此处所用, 术语“酶促转化”指, 通过用酶接触底物或中间物, 将碳底物修饰为中间物、或将中间物修饰为最终产物。在一些实施方案中, 接触是通过直接将底物或中间物暴露给适当的酶来完成。在其它实施方案中, 接触包括分别将底物或中间物暴露给表达和/或分泌30 酶的生物, 并且/或者, 分别地将期望的底物和/或中间物代谢为期望的中间物和/或最终产物。

正如此处所用,“单糖”指具有经验式 $(CH_2O)_n$ 的任何化合物,其中 n 是 3-7,优选地是 5-7。在一些实施方案中,该术语指由单个多羟基醛或酮单元构成的“简单糖”。该术语包括但不限于这样的化合物如葡萄糖、半乳糖和果糖。

- 5 正如此处所用,“二糖”指包含两个共价连接的单糖单元的任何化合物。该术语包括,但不限于这样的化合物如蔗糖、乳糖和麦芽糖。

正如此处所用,“寡糖”指具有以糖苷键连接的 2-10 个单糖单元的任何化合物。在一些优选实施方案中,该术语指通过共价键连接在一起的单糖单元的短链。

- 10 正如此处所用,“多糖”指具有连接成直链或支链形式的多个单糖单元的任何化合物。在一些优选实施方案中,该术语指具有成百上千个单糖单元的长链。一些多糖,如纤维素具有直链,而其它(例如糖原)具有支链。淀粉和纤维素是最丰富的多糖类物质,它们由不断重现的葡萄糖单元组成(尽管这些化合物在葡萄糖单元如何相互连接上有所不同)。

- 15 正如此处所用,“杆菌属”包括本技术领域的普通技术人员已知的所有成员,包括但不限于枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*)、地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*)、缓慢芽孢杆菌 (*B. lentus*)、短小芽孢杆菌 (*B. brevis*)、嗜热脂肪芽孢杆菌 (*B. stearothermophilus*)、嗜碱芽孢杆菌 (*B. alkalophilus*)、解淀粉芽孢杆菌 (*B. amyloliquefaciens*)、克劳氏芽孢杆菌 (*B. clausii*)、耐盐芽孢杆菌 (*B. halodurans*)、巨大芽孢杆菌 (*B. megaterium*)、凝结芽孢杆菌 (*B. coagulans*)、环状芽孢杆菌 (*B. circulans*)、典雅芽孢杆菌 (*B. lautus*) 和苏云金芽孢杆菌 (*B. thuringiensis*)。应该认识到,杆菌属继续经受着分类学的重新组合。因此,应意识到的是,该属包括已经被重新分类的种类,包括但不限于这样的生物如 *B. stearothermophilus*, 现在它被命名为 “*Geobacillus stearothermophilus*。” 在存在氧气的情况下产生有抵抗力的内生孢子被认为是杆菌属的限定性特征,尽管该特征也适用于被最新命名的脂环酸芽孢杆菌 (*Alicyclobacillus*)、双芽孢杆菌 (*Amphibacillus*)、硫胺素芽孢杆菌 (*Aneurinibacillus*)、*Anoxybacillus*、短小短芽孢杆菌 (*Brevibacillus*)、*Filobacillus*、*Gracilibacillus*、喜盐芽孢杆菌
- 20
- 25
- 30

(*Halobacillus*)、类芽孢杆菌 (*Paenibacillus*)、*Salibacillus*、*Thermobacillus*、*Ureibacillus* 和 *Virgibacillus*。

正如此处所用，“野生型”和“天然”蛋白质是那些在自然界发现的蛋白质。“野生型序列”和“野生型基因”这些术语此处可以交替使用，它们指在宿主细胞中天然发生的序列。在一些实施方案中，野生型序列指作为蛋白质工程项目的起始点的感兴趣序列。编码天然发生的蛋白质（即前体蛋白质）的基因可以根据本领域普通技术人员已知的一般方法获得。这些方法通常包括合成具有感兴趣蛋白质的推定的序列编码区域的标记探针，制备表达该蛋白质的生物的基因文库，并通过与所述探针杂交来筛选所述文库，以便获得感兴趣的基因。然后对阳性杂交克隆作图并测序。

“重组淀粉酶”指其中编码淀粉酶的 DNA 序列被修饰以产生变体（或突变体）DNA 序列的淀粉酶，其中所述变体（或突变体）DNA 序列在天然发生的氨基酸序列上编码一个或多个氨基酸的取代、缺失或插入。产生这样的修饰和可以与此处公开的方法联合使用的合适的方法包括那些在美国专利 4,760,025 (US RE 34,606)、美国专利 5,204,015 和美国专利 5,185,258 中公开的方法，所有这些专利被引入此处作为参考。

正如此处所用，术语“样品”以其最广泛的意义使用。然而，在优选的实施方案中，该术语用于指代包含肽（即，肽集（*pepset*）中的肽，其包含感兴趣的蛋白质中的序列）的样品（例如等分试样），所述肽正在被分析、鉴定、修饰和/或其它肽进行比较。因此，在多数情况下，该术语被用来表示包含感兴趣的蛋白质或肽的材料。

正如此处所用，“刺激指数”（*Stimulation Index, SI*）是指，与对照相比，肽的 T 细胞增殖反应的测量结果。SI 通过用含有树突状细胞和 CD4⁺T 细胞但不含有肽的对照培养物的平均 CPM（每分钟计数），除以测试含有肽的 CD4⁺T 细胞和树突状细胞培养物时所获得的平均 CPM 来计算。对各供体（*donor*）和各个肽，计算该值。尽管介于大约 1.5 到 4.5 之间的 SI 值可以被用于表示阳性响应，但表示阳性响应的优选 SI 值在 2.5 到 3.5 之间，其中端值包括在内；优选地在 2.7 到 3.2 之间，2.7 和 3.2 包括在内；更优选地在 2.9 到 3.1 之间，2.9 和 3.1 包括在内。

此处描述的最优选的实施方案中使用的 SI 值为 2.95。

正如此处所用，此处所用的术语“数据集 (dataset)”指对于每一蛋白质而言，一组肽和一组供体的汇编数据。

正如此处所用，术语“肽集 (pepset)”指从每一测试蛋白质（即感兴趣的蛋白质）获得的肽的集合。肽集（或“肽集合 (peptide sets)”）中的这些肽用来自每一供体的细胞进行测试。

正如此处所用，术语“纯化”和“分离”指从样品去除污染物。例如，淀粉酶是通过去除溶液或制剂中不是淀粉酶的杂质蛋白质和其它化合物来纯化的。在一些实施方案中，重组淀粉酶在细菌宿主细胞中表达，这些重组淀粉酶通过去除其它的宿主细胞组分来纯化；从而增加了样品中重组淀粉酶多肽的百分比。

正如此处所用，“背景水平”和“背景应答”是指，对于任何被测试的蛋白质，数据集中任意给定的肽的应答者的平均百分率。该值通过平均该集合中所有肽的应答者百分率来测定，数据集汇编自所有被测试的供体。作为一个例子，3%的背景应答将表明，当对 100 个供体进行测试时，对于数据集中的任何肽，平均起来将有 3 个阳性响应（SI 大于 2.95）。

正如此处所用，“抗原呈递细胞”（“APC”）指在其表面呈递抗原的免疫系统细胞，这样，抗原可以被 T 细胞表面上的受体识别。抗原呈递细胞包括，但不限于树突状细胞、并指状细胞、活化 B 细胞和巨噬细胞。

术语“淋巴”，当关于细胞系或细胞使用时，是指细胞系或细胞来源于淋巴谱系，包括 B 和 T 淋巴细胞谱系的细胞。

正如此处所用，“T 淋巴细胞”和“T 细胞”包括 T 淋巴细胞谱系中的任何细胞，从 T 细胞前体（包括 Thy1 阳性细胞，其尚未重配 T 细胞受体基因）到成熟 T 细胞（即，CD4 或 CD8 的单一阳性，表面 TCR 阳性细胞）。

正如此处所用，术语“B 淋巴细胞”和“B 细胞”包括 B 细胞谱系中的任何细胞，从 B 细胞前体，如前-B 细胞（已经开始重排 Ig 重链基因的 B220⁺细胞）到成熟 B 细胞和浆细胞。

正如此处所用，“CD4⁺T 细胞”和“CD4 T 细胞”指辅助 T 细胞，

而“CD8⁺T 细胞”和“CD8 T 细胞”指细胞毒性 T 细胞。

正如此处所用，“B 细胞增殖”是指在抗原呈递细胞与 B 细胞温育期间，在有或者没有抗原的情况下，所产生的 B 细胞数目。

正如此处所用，此处所用的“基线 B 细胞增殖”是指，在不存在肽或蛋白质抗原的情况下，在暴露于抗原呈递细胞时响应的个体中通常所观察到的 B 细胞增殖的程度。为了此处的目的，以每一个体每一个样品为基础，基线 B 细胞增值水平确定为在不存在抗原的情况下的 B 细胞增殖。

正如此处所用，“B 细胞表位”是指肽或蛋白质的一个特征，在对包含抗原（即，免疫原）的肽的免疫源应答中，B 细胞受体识别该特征。

正如此处所用，“改变的 B 细胞表位”是指与前体肽或感兴趣的肽不同的表位氨基酸序列，这样，感兴趣的变体肽在人或别的动物中产生不同的（即，改变的）免疫源应答。应该预期到，改变的免疫源应答包括改变的免疫原性和/或变应原性（即，增加或者降低的总体免疫源应答）。在一些实施方案中，改变的 B 细胞表位包含选自被鉴定的表位中的那些残基的氨基酸的取代或删除。在可以选择的实施方案中，改变的 B 细胞表位包括在该表位中一个或多个残基的加入。

正如此处所用，“T 细胞表位”是指肽或蛋白质的一个特征，在对包含抗原的肽的免疫应答的起始中，T 细胞受体识别该特征。T 细胞对 T 细胞表位的识别，通常被认为是通过这样的机理来实现，其中 T 细胞识别抗原的肽片段，所述的抗原肽片段被结合于在抗原呈递细胞上表达的 I 类或 II 类主要组织相容性复合物（MHC）分子上（例如参见 Moeller（编著），Immunol. Rev., 98: 187[1987]）。在本发明的一些实施方案中，被鉴定的表位或表位片段，正如此处描述的，在具有 MHC 分子的抗原呈递细胞的检测中是有用的，具有 MHC 分子的抗原呈递细胞能结合并且展示表位或片段。在一些实施方案中，表位/表位片段进一步包括可检测的标记（即，标志物），这有助于鉴定结合和/或显示感兴趣的表位/表位片段的细胞。

正如此处所用，“T 细胞增殖”是指，在存在或者不存在抗原的情况下，在 T 细胞与抗原呈递细胞的温育过程中所产生的 T 细胞数量。

正如此处所用,“基线 T 细胞增殖”指,在不存在肽或蛋白质抗原的情况下,在暴露给抗原呈递细胞的响应中、在个体中通常所观察到的 T 细胞增殖程度。为了此处的目的,基线 T 细胞增殖水平,以每一个体每一个样品为基础,确定为在不存在抗原的情况下对抗原呈递细胞响应时的 T 细胞增殖。

正如此处所用,“改变的免疫原应答”指增加的或降低的免疫原应答。蛋白质和肽表现出“增加的免疫原性应答”,是指在当它们所引起的 T 细胞和/或 B 细胞应答大于由亲本(例如前体)蛋白质或肽(例如感兴趣的蛋白质)所引起的 T 细胞和/或 B 细胞应答之时。该较高的应答的净结果是直接针对变体蛋白质或肽的抗体应答增加。蛋白质和肽表现出“降低的免疫原性应答”,是指在当它们所引起的 T 细胞和/或 B 细胞应答低于亲本(例如前体)蛋白质或肽所引起的 T 细胞和/或 B 细胞应答之时。在优选的实施方案中,该较低应答的净结果是直接针对变体蛋白质或肽的抗体应答降低。在一些优选实施方案中,亲本蛋白质是野生型蛋白质或肽。

正如此处所用,“免疫原性的体内降低”是指,在活的生物体内(例如要求使用活的动物),至少部分地发生的免疫原应答降低,按测定方法所确定的。例证性的“体内”测定法包括在小鼠模型中测定改变的免疫原应答。

正如此处所用,“免疫原性的体外降低”是指,在活的生物体之外的人工环境中(即不要求使用活的动物)中发生的免疫原应答降低,按测定方法所确定的。例证性的体外测定法包括,测试人外周血单核细胞对感兴趣的肽的增殖应答。

正如此处所用,术语“显著的表位”是指这样的表位(即, T 细胞和/或 B 细胞表位),其中在被测试的供体库中的响应比率(response rate)等于或大于背景响应比率的大约三倍。

正如此处所用,“弱显著的表位”是指这样的表位(即, T 细胞和/或 B 细胞表位),其中在被测试的供体库中的响应比率大于背景响应比率,但小于背景响应比率的大约三倍。

正如此处所用,“感兴趣的蛋白质”指被分析、鉴定和/或修饰的蛋白质。天然发生的,以及重组的蛋白质在本发明中是有用的。

正如此处所用,“蛋白质”指由氨基酸组成的和由本领域的普通技术人员确认为蛋白质的任何物质。术语“蛋白质”、“肽”和多肽在此处可以被交替使用。肽是蛋白质的一部分,本领域的技术人员应该理解该术语在上下文的使用。术语“蛋白质”包括蛋白质的成熟形式,以及相关蛋白质的原(pro-)形式和前原(pre-pro)形式。前原形式的蛋白质包含蛋白质的成熟形式,其具有可有效连接到(operably linked to)蛋白质的氨基末端上的原序列(prosequence),和可有效连接到原序列的氨基末端上的“前(pre-)”或“信号”序列。

本发明的变体包括成熟形式的蛋白质变体,以及这样的蛋白质变体的原形式和前原形式。由于前原形式有助于蛋白质变体的表达、分泌和成熟,所以前原形式是优选的结构。

正如此处所用,“原序列(prosequence)”指结合到成熟形式的蛋白质的N末端部分上的氨基酸序列,当N末端被去除时,会导致“成熟”形式的蛋白质的出现。在自然界发现的许多酶是翻译出的酶原产物,在缺少翻译后加工的情况下,它们便以这种形式表达。

正如此处所用,“信号序列”和“前序列(presequence)”是指,结合到蛋白质的N末端部分或蛋白原的N末端部分上的任何氨基酸序列,所述序列可以参与蛋白质的成熟形式或原形式的分泌。信号序列的这一定义是功能性的,目的在于包括由蛋白质基因的N末端部分编码的所有那些氨基酸序列,它们参与蛋白质在天然条件下分泌的实现。本发明使用这样的序列以实现此处描述的蛋白质变体的分泌。

正如此处所用,蛋白质变体的“前原”形式由具有有效连接到该蛋白质的氨基末端上的原序列的成熟形式蛋白质,和有效连接到原序列的氨基末端上的“前”或“信号”序列组成。

正如此处所用,功能上类似的蛋白质被认为是“相关蛋白质”。在一些实施方案中,这些蛋白质来源于不同的属和/或种,包括了生物类别之间的差异(例如细菌蛋白质和真菌蛋白质)。在一些实施方案中,这些蛋白质来源于不同的属和/或种(例如枯草芽孢杆菌淀粉酶和地衣芽孢杆菌淀粉酶),包括了生物类别之间的差异(例如细菌淀粉酶和真菌淀粉酶)。在其它实施方案中,相关蛋白质由同一物种提供。实际上,这里并不意图将本发明限制为来自特定来源的相关蛋白质。

正如此处所用，术语“衍生物”指来源于前体蛋白质的蛋白质，其中在 C 末端或者在 N 末端上加入或者在 C 和 N 末端上均加入一个或多个氨基酸，在氨基酸序列中一个或多个不同位置上取代一个或多个氨基酸，和/或在蛋白质的两个末端中的任意一个末端或两个末端上、
5 或者在氨基酸序列的一个或多个位点上删除一个或多个氨基酸，和/或在氨基酸序列的一个或多个位点上插入一个或多个氨基酸。蛋白质衍生物的制备优选地通过修饰编码天然蛋白质的 DNA 序列，将 DNA 序列转化进入合适的宿主，表达被修饰的 DNA 序列以形成衍生的蛋白质，从而予以实现。

10 相关（和衍生物）蛋白质包括“变体蛋白质”。在优选的实施方案中，变体蛋白质不同于亲本蛋白质，彼此在少量氨基酸残基上不同。不同的氨基酸残基的数量可以是一个或更多个，优选地为 1、2、3、4、5、10、15、20、30、40、50 或更多个氨基酸残基。在一个优选实施方案中，变体之间不同的氨基酸的数量在 1 到 10 之间。在特别优选的实施方案中，相关蛋白质和特定的变体蛋白质含有至少 50%、60%、65%、
15 70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98% 或 99% 的氨基酸序列同一性。此外，相关蛋白质或变体蛋白质，正如此处所用，可以指在显著区域（prominent regions）的数量上不同于另一个相关蛋白质或亲本蛋白质的蛋白质。例如，在一些实施方案中，变体蛋白质具有不同
20 于亲本蛋白质的 1、2、3、4、5 或 10 个相应的显著区域。

在一个实施方案中，变体的显著对应区域仅仅产生背景水平的免疫原应答。鉴定为用于取代、插入或缺失的一些残基是保守残基，而其它则不是保守残基。在残基不是保守残基的情况下，一个或多个氨基酸的替代限于产生具有与自然界发现的氨基酸序列不对应的氨基酸
25 序列的变体的替代。在保守残基的情况下，这样的替代不应该导致天然发生的序列。

在一些实施方案中，修饰，优选地是针对编码前体酶的氨基酸序列的“前体 DNA 序列”进行，但可以通过前体蛋白质的操纵而进行。在残基不是保守残基的情况下，一个或多个氨基酸的替代限于产生具有与自然界发现的氨基酸序列不对应的氨基酸序列的变体的取代。在
30 保守残基的情况下，这样的取代不应该导致天然发生的序列。本发明

提供的衍生物进一步包括改变淀粉酶的特性的化学修饰。

在一些实施方案中，变体淀粉酶的特性用本领域的普通技术人员已知的方法来确定。例证性的特性包括，但不限于热稳定性、碱稳定性和特定淀粉酶的稳定性，各种底物，缓冲液和/或产物配方。与酶稳定性测定法相结合，可以鉴定通过随机诱变获得的变体淀粉酶，其表现出增加的或者降低的碱或热稳定性，而同时维持了酶活性。

碱稳定性可以通过已知的方法或者通过此处描述的方法来测定。碱稳定性显著改变的证据是，与前体蛋白质相比，突变体的酶活性的半衰期有至少大约 5%或更高的增加或降低（在许多实施方案中，优选的是增加）。

热稳定性可以通过已知的方法或者通过此处描述的方法来测定。热稳定性显著改变的证据是，与前体蛋白质相比，当突变体暴露于相对高的温度和中性 pH 时，其催化活性的半衰期有至少大约 5%或更高的增加或降低（在许多实施方案中，优选的是增加）。

在一些优选实施方案中，淀粉酶基因被连接进适当的表达质粒中。然后，用克隆的淀粉酶基因来转化或转染宿主细胞，以便表达淀粉酶基因。在质粒含有质粒复制所必需的熟知元件或者该质粒可以被设计为整合到宿主染色体中的情况下，该质粒可以在宿主中复制。提供必需的元件，以进行有效的基因表达（例如，有效连接到感兴趣的基因上的启动子）。在一些实施方案中，被提供的这些必需元件是基因自身的同源启动子，如果它可以被识别的话（即，被宿主转录）；转录终止子（对于真核宿主细胞，为多腺苷酸化区域），该转录终止子是外源的，或者由淀粉酶基因的内源终止子区域提供。在一些实施方案中，选择性基因如抗生素抗性基因也包括在内，所述抗生素抗性基因能维持在含有抗微生物物质的培养基中进行培养的质粒感染宿主细胞的连续培养。

尽管可以使用其它方法，但下述的盒式诱变方法可用来帮助本发明的淀粉酶变体的构建。首先，获得天然发生的淀粉酶编码基因，并对其完全或部分地进行测序。然后，扫描该序列，扫描到这样一个点，即在该点处期望在被编码的淀粉酶中产生一个或多个氨基酸的突变（缺失、插入或取代）。对该点侧翼的序列进行评价，寻找限制酶切位

点的存在，以便用寡核苷酸库代替该基因的一个短片段，当其被表达时将编码各种突变体。这样的限制酶切位点优选地是蛋白质基因内的独特位点，以便有助于基因片段的取代。然而，可以使用在淀粉酶基因中非过度丰富的任何便利的限制酶切位点，只要限制酶切消化所产生的基因片段可以以适当顺序被重装配。如果在距离所选择的点的一个便利距离内（10 个到 15 个核苷酸）的位置上不存在限制酶切位点，这样的位点通过以这样的方式取代基因中的核苷酸来产生，即，在最后的构建物中，阅读框和该处被编码的氨基酸均不被改变。为了改变其序列以符合期望序列而对基因进行的突变，是通过与通常已知的方法相符的 M13 引物延伸来实现的。定位合适的侧翼区域以及为了获得两个便利的限制酶切位点序列而评价所需要的改变的任务，是通过遗传密码的冗余性、基因的限制酶切图谱和大量不同的限制酶，予以常规地进行。需要注意的是，如果便利的侧翼限制酶切位点是可以利用的，上述方法应该仅仅在该侧翼区域内不含有该位点的情况下使用。

一旦天然发生的 DNA 或合成的 DNA 被克隆，用相关的限制酶消化位于将要被突变的位置的两侧的限制酶切位点，并将一系列末端互补的寡核苷酸序列盒连接进基因中。该方法可以简化诱变，这是由于所有寡核苷酸可以被合成，它们具有相同的限制酶切位点，并且不需要合成的接头来产生限制酶切位点。

正如此处所用，“与.....相对应的”是指蛋白质或肽中位于列出的位置处的残基，或者是与蛋白质或肽中列出的残基类似的、同源的或等价的残基。

正如此处所用，“对应的区域”通常是指沿着相关蛋白质或亲本蛋白质的类似位置。

术语“编码.....的核酸分子”、“编码.....的 DNA 序列”和“编码.....的 DNA”是指沿着脱氧核糖核酸链的脱氧核苷酸的次序或序列。这些脱氧核苷酸的次序决定了沿着多肽（蛋白质）链的氨基酸的次序。因而 DNA 序列编码氨基酸序列。

正如此处所用，术语“类似序列（analogous sequence）”是指，能提供与感兴趣的蛋白质（即，典型地，是感兴趣的原始蛋白质）相类似的功能、三级结构和/或保守残基的蛋白质内的序列。在特别优选的

实施方案中，同源序列包括在表位处的或表位附近的序列。例如，在含有 α 螺旋或 β 片层结构的表位区域中，在类似序列中的替换氨基酸优选地保留了相同的特定结构。该术语也指核苷酸序列，以及氨基酸序列。在一些实施方案中，类似序列被开发，以便替换氨基酸在表位处或表位附近，显示出与感兴趣的蛋白质中的氨基酸相似的功能、三级结构和/或保守残基。因此，在含有例如 α 螺旋或 β 片层结构的表位区域中，替换氨基酸优选地维持了特异的结构。

正如此处所用，“同源蛋白质”是指，与感兴趣的蛋白质（例如来自另一来源的淀粉酶）具有相似作用、结构、抗原性和/或免疫原应答的蛋白质（例如淀粉酶）。这里不要求同源物必须是进化相关的。因此，意图在于，该术语包括从不同物种获得的相同功能的蛋白质。在一些优选实施方案中，期望鉴定出与感兴趣的蛋白质具有类似的三级和/或一级结构的同源物，这是由于用来自同源物的类似片段替代感兴趣的蛋白质中的表位将降低该变化的破坏性。因此，在许多情况下，密切同源的蛋白质提供了表位取代的最期望来源。可以选择地，对于一个给定的蛋白质，寻找人类类似物是有利的。例如，在一些实施方案中，用来自另一种淀粉酶或其它物种的淀粉酶的序列取代一种淀粉酶中的特定表位，导致产生了具有降低的免疫原性的淀粉酶。在一些优选实施方案中，本发明的淀粉酶类似物具有与野生型淀粉酶基本上类似的三级和/或一级结构。重要的淀粉酶表位，可以用来自同源酶的类似片段取代。这种类型的取代将降低亲本淀粉酶的变化破坏性。在许多情况下，密切同源的蛋白质提供了表位取代的最期望来源。

正如此处所用，“同源基因”是指来自不同但通常是相关的物种的至少一对基因，它们彼此对应，并且彼此具有同一性或非常相似。该术语包括通过物种形成过程（即，新物种的进化）分离开的基因（例如直向同源基因），以及通过遗传复制业已分离的基因（例如旁向同源基因）。这些基因编码“同源蛋白质”。

正如此处所用，“直向同源物”和“直向同源基因”是指存在于不同物种中的基因，这些基因是通过物种形成过程，从一个共同的祖先基因（即，一个同源基因）进化而来的。通常地，直向同源物在进化过程中保留了相同的功能。直向同源物的鉴定，在最新测序的基因组

中基因功能的可靠预测中是有用的。

正如此处所用，“旁向同源物”和“旁向同源基因”是指在基因组内通过复制而相关的基因。直向同源物通过进化过程保留了相同的功能，而旁向同源物进化出了新的功能，即使一些功能与原始功能通常是相关的。旁向同源基因的实例包括，但不限于，编码胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、弹性蛋白酶和凝血酶的基因，这些酶都是丝氨酸蛋白酶，它们在相同的种类中一起发生。

正如此处所用，“野生型”和“天然”蛋白质是那些在自然界发现的蛋白质。术语“野生型序列”和“野生型基因”此处可以交替使用，用来指在宿主细胞中自然或天然发生的序列。在一些实施方案中，野生型序列是指，作为蛋白质工程项目的起始点的感兴趣序列。编码天然发生的（即，前体）蛋白质的基因，可以通过本领域的普通技术人员已知的一般方法来获得。这些方法通常包括合成具有感兴趣的蛋白质的编码区域推定序列的标记探针，制备来自表达该蛋白质的生物的基因组文库，并通过与探针杂交来筛选文库中感兴趣的基因。然后，对阳性杂交克隆作图并测序。

正如此处所用，术语“重组的 DNA 分子”是指含有通过分子生物学技术的手段结合在一起的 DNA 片段的 DNA 分子。

术语“重组寡核苷酸”指使用分子生物学操作产生的寡核苷酸，包括但不限于，通过多核苷酸序列的限制酶消化所产生的两个或更多个寡核苷酸序列的连接产物，寡核苷酸的合成产物（例如引物或寡核苷酸的合成），和类似物。

序列之间的同源性程度可以使用本技术领域已知的任何合适的方法来确定（例如参见 Smith 和 Waterman, *Adv. Appl. Math.*, 2: 482 [1981]; Needleman 和 Wunsch, *J. Mol. Biol.*, 48: 443 [1970]; Pearson 和 Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2444 [1988]; 程序例如 Wisconsin Genetics Software Package 中的 GAP、BESTFIT、FASTA 和 TFASTA（Genetics Computer Group, Madison, WI）；和 Devereux 等人, *Nucl. Acid Res.*, 12: 387-395 [1984]）。

例如，PILEUP 是一个可用于确定序列同源性水平的有用程序。PILEUP，使用累进、两两联配的方式，由一群相关的序列中产生多序

列联配。它也可以绘出用于产生该联配的显示了类聚 (clustering relationship) 关系的树。PILEUP 使用了 Feng 和 Doolittle 累进联配方法的简化方法 (Feng 和 Doolittle, J. Mol. Evol., 35: 351-360 [1987])。该方法类似于由 Higgins 和 Sharp 描述的方法 (Higgins 和 Sharp, CABIOS 5: 151-153 [1989])。有用的 PILEUP 参数包括 3.00 的缺省间隙权重, 0.10 的缺省间隙长度权重, 和加权的末端间隙。有用的算法的另一个实例是 BLAST 算法, 由 Altschul 等人描述 (Altschul 等人, J. Mol. Biol., 215: 403-410, [1990]; 和 Karlin 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5787 [1993])。一个特别有用的 BLAST 程序是 WU-BLAST-2 程序 (参见 Altschul 等人, Meth. Enzymol., 266: 460-480 [1996])。参数“W”、“T”和“X”决定了联配的灵敏度和速度。BLAST 程序所用的缺省参数包括字符长度 (W) 为 11, BLOSUM62 计分矩阵 (参见 Henikoff 和 Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915 [1989]) 联配 (B) 为 50, 期望值 (E) 为 10, M'5, N'-4, 以及两个链的比较。

正如此处所用, “核酸序列同一性百分比 (%)”被定义为, 在该序列与候选序列中相同的核苷酸残基的百分比。

正如此处所用, 术语“杂交”指通过碱基配对, 核酸链与互补链发生结合的过程, 正如本领域所已知的。

正如此处所用, “杂交条件”指杂交反应进行的条件。这些条件通过杂交被测量时条件的“严紧性 (stringency)”程度来分类。例如, 严紧性程度可以依赖于核酸结合复合体或探针的解链温度 (T_m)。例如, “最大严紧性”通常在大约 $T_m-5^{\circ}\text{C}$ 发生 (比探针的 T_m 低 5°C); “高度严紧性”发生在低于 T_m 的大约 $5-10^{\circ}\text{C}$; “中度严紧性”发生在低于探针 T_m 的大约 $10-20^{\circ}\text{C}$; 和“低度严紧性”发生在低于 T_m 的大约 $20-25^{\circ}\text{C}$ 。可以选择地, 或另外地, 杂交条件可以是基于杂交的盐或离子强度条件和/或一次或多次的严紧性洗涤。例如, $6\times\text{SSC}$ =非常低的严紧性; $3\times\text{SSC}$ =低度到中度严紧性; $1\times\text{SSC}$ =中度严紧性; 和 $0.5\times\text{SSC}$ =高度严紧性。从功能上来说, 最大严紧性条件可以用于鉴定与杂交探针具有严格的同一性或接近严格的同一性的核酸序列; 而高度严紧性条件被用于鉴定与探针具有大约 80%或更高的序列同一性的核酸序列。

对于要求高度选择性的应用，通常期望应用相对严紧的条件来形成杂交体（例如使用相对低的盐和/或高温条件）。

在至少两个核酸或多肽的情形中，短语“基本上相似的”和“基本上同一的”通常指，多核苷酸或多肽包含与参考（即，野生型）序列相比具有至少 60%同一性、优选地至少 75%序列同一性、更优选地至少 80%、更优选地至少 90%、仍然更优选地 95%、最优选地 97%，有时高达 98%和 99%的序列同一性的序列。序列同一性使用已知的程序如 BLAST、ALIGN 和 CLUSTAL 来确定，这些程序使用标准参数。

（参见例如 Altschul 等人, J. Mol. Biol. 215: 403-410 [1990]; Henikoff 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915 [1989]; Karin 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873 [1993]; 和 Higgins 等人, Gene 73: 237-244 [1988]）。进行 BLAST 分析的软件可以通过 National Center for Biotechnology Information 公开获得。也可以使用 FASTA 来搜索数据库（Pearson 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444-2448 [1988]）。两个多肽是基本上同一的一个指征是，第一个多肽与第二个多肽是具有免疫交叉反应的。典型地，由于保守的氨基酸取代而有所不同的多肽是免疫交叉反应的。因此，例如，在两个肽的不同之处仅仅在于保守的取代时，该第一个多肽与该第二个多肽是基本上同一的。两个核酸序列基本上同一的另一个指征是，这两个分子在严紧条件（例如，中度到高度严紧）下彼此杂交。

正如此处所用，“等价残基（equivalent residues）”谈及享有特定的氨基酸残基的蛋白质。例如，等价残基可以通过在蛋白质（例如 IFN- β ）的三级结构水平上确定同源性来鉴定，所述蛋白质的三级结构已经通过 X 射线晶体学确定。等价残基被定义为如此的残基，即对于那些等价残基而言，具有推定的等价残基的蛋白质和感兴趣的蛋白质的特定氨基酸残基的两个或多个主链原子的原子坐标（N 对 N、CA 对 CA、C 对 C、和 O 对 O），在对齐之后，是在 0.13nm 以内，优选地在 0.1nm 以内。在为了获得被分析的蛋白质的非氢蛋白原子的原子坐标的最大重叠而对最佳模型进行定向和定位之后，即可实现对齐。优选的模型是结晶学模型，其以可获得的最高分辨率给出了实验衍射数据的最低 R 因子，如使用结晶学和蛋白质表征/分析技术领域的普通技术人员已知

的方法所测定的。

本发明包括具有改变的免疫原性的淀粉酶，这些淀粉酶与来源于所提及的特定微生物菌株的淀粉酶等价。“等价”在这一文境中是指由多核苷酸编码的淀粉酶，所述多核苷酸能与编码 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列的多核苷酸，在中度到高度严紧性条件下杂交，并且仍保留了针对人 T 细胞的改变的免疫原性应答。因此，在一些实施方案中，等价淀粉酶包括，相对于表位序列和具有这些表位的变体淀粉酶的至少 55%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 97%或至少 99%的同一性。

正如此处所用，术语“杂合淀粉酶”和“融合淀粉酶”是指，从至少两个不同的蛋白质或“亲本”蛋白质进行遗传工程而得到的蛋白质。在优选的实施方案中，这些亲本蛋白质是彼此的同源物。例如，在一些实施方案中，优选的杂合淀粉酶或融合淀粉酶含有一个蛋白质的 N 末端和该蛋白质的同源物的 C 末端。在一些优选实施方案中，这两个末端被组合在一起，对应于全长的活性蛋白质。在可以选择的优选实施方案中，同源物具有非常大的相似性，但不具有完全相同的 T 细胞表位。因此，在一个实施方案中，本发明提供了在 C 末端具有一个或多个 T 细胞表位的感兴趣的淀粉酶，但是在其中，该 C 末端被同源物的 C 末端所取代，所述同源物在其 C 末端具有更低效力的 T 细胞表位、或具有较少的 T 细胞表位或者没有 T 细胞表位。因此，熟练技术人员应该理解到，借助于在同源物中鉴定 T 细胞表位的能力，可以形成产生不同的免疫原性应答的多个变体。而且，应该理解到，内部的部分，以及多于一个的同源物可被用来产生本发明的变体。

正如此处所用，术语“调控元件”指控制核酸序列表达的某一方面的遗传元件。例如，启动子是有助于有效连接的编码区域的转录起始的调控元件。其它调控元件包括剪接信号、多腺苷酸化信号和终止信号。

正如此处所用，“表达载体”指含有 DNA 序列的 DNA 构建物，所述 DNA 序列可有效连接到能影响该 DNA 在合适的宿主中表达的合适的控制序列上。这样的控制序列包括影响转录的启动子、控制这样的转录的任选的操纵子序列、编码合适的 mRNA 核糖体结合位点的序列，

和控制转录和翻译的终止的序列。载体可以是质粒、噬菌体颗粒、或简单地是有效的基因组插入物。一旦转化到合适的宿主中，载体就可以复制，并且独立于宿主基因组而发挥功能，或者在某些情况下可以整合到基因组中。在本发明的说明书中，“质粒”和“载体”有时被交替使用，质粒目前是最普遍使用的载体形式。然而，本发明的目的是包括这类的其它形式的表达载体，这些表达载体起着等效的功能，它们在本技术领域是已知的，或者正在成为已知的。

正如此处所用，“宿主细胞”通常是原核或真核宿主，它们优选地通过本技术领域已知的方法来操纵（例如参见美国专利 4,760,025 (RE34,606)），以便使它们能分泌具有酶活性的内切酶。表达蛋白质的优选宿主细胞是杆菌菌株 BG2036，该菌株缺乏具有酶促活性的中性蛋白质和碱性蛋白酶（枯草杆菌蛋白酶）。菌株 BG2036 的构建在美国专利 5,264,366 中有详细描述，此处引入作为参考。表达蛋白质的其它宿主细胞包括枯草芽孢杆菌 I168（也描述在美国专利 4,760,025 (RE34,606)）和美国专利 5,264,366 中，此处将这些专利的公开内容作为参考），以及任何合适的杆菌菌株，包括那些属于地衣芽孢杆菌、缓慢芽孢杆菌和其它杆菌种的那些菌株，等等。在一些优选的实施方案中，宿主细胞已经被修饰，以便内源淀粉酶不能由宿主细胞产生。

用使用本技术领域已知的重组 DNA 技术构建的载体转化或转染宿主细胞。转化的宿主细胞能复制编码蛋白质变体的载体，或者表达期望的蛋白质变体。在编码蛋白质变体的前形式或前原形式的载体情况中，这样的变体，当被表达时，通常被宿主细胞分泌到宿主细胞培养基中。

在将核酸序列插入到细胞中的情形中，术语“被导入”是指转化、转导或转染。转化的手段包括原生质体转化、氯化钙沉淀、电穿孔、裸 DNA 以及本技术领域已知的类似手段。（参见 Chang 和 Cohen (1979) *Mol. Gen. Genet.* 168: 111-115; Smith 等人, (1986) *Appl. and Env. Microbiol.* 51: 634; 和 Ferrari 等人的综述文章, (1989) *Genetics*, pages 57-72 in *Bacillus* ed. C. Harwood, Plenum Publishing Corporation）。

术语“启动子/增强子”表示含有能提供启动子和增强子功能的序列的 DNA 片段（例如，反转录酶病毒的长末端重复单元既含有启动子，

也含有增强子功能)。增强子/启动子可以是“内源的”或“外源的”或“异源的”。内源增强子/启动子是在基因组中与给定的基因天然连接的增强子/启动子。外源(异源)增强子/启动子是通过遗传操纵方法(即分子生物学技术)与一个基因毗邻放置的增强子/启动子。

- 5 表达载体上“剪接信号”的存在,通常导致重组转录物更高水平的表达。剪接信号介导从初始 RNA 转录物中去除内含子,它由剪接供体位点和受体位点组成(Sambrook 等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第二版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York [1989], 16.7-16.8 页)。通常使用的剪接供体位点和受体位点是来自 SV40 的 16S RNA 的剪接点。

术语“稳定的转染”或“被稳定地转染”是指,将外来 DNA 引入和整合到被转染细胞的基因组中。术语“稳定的转染子”指已经将外来(foreign)或外源性(exogenous)DNA 稳定地整合到被转染细胞的基因组 DNA 中的细胞。

- 15 正如此处所用,术语“选择性的标记物”或“选择性的基因产物”谈及编码酶促活性的基因的应用,一旦细胞中的选择性标记物被表达,该酶促活性将抗性赋予接触抗生素或药物的细胞。

- 正如此处所用,术语“扩增”和“基因扩增”是指特定的 DNA 序列被不成比例地复制的过程,这样,被扩增的基因以比在基因组中初始存在的拷贝数量高的拷贝数量存在。在一些实施方案中,通过在存在药物(例如可抑制酶的抑制剂)的情况下的生长来选择细胞,导致编码在存在药物的情况下生长所需要的基因产物的内源基因的扩增,或者编码该基因产物的外源(即,输入的)序列的扩增,或者两者的扩增。特定基因的基因扩增是在发育过程中自然地发生,如在两栖动物的卵母细胞中核糖体基因的扩增。基因扩增可以通过用药物处理培养
- 20 的细胞来诱导。药物诱导的扩增的实例是哺乳动物细胞中内源 *dhfr* 基因的氨甲蝶呤诱导的扩增(Schmike 等人, *Science* 202: 1051[1978])。通过在存在药物(例如可抑制酶的抑制剂)的情况下的生长来选择细胞,导致编码在存在药物的情况下生长所需的基因产物的内源基因的
- 25 扩增,或编码该基因产物的外源(即,输入的)序列的扩增,或者导致两者的扩增。
- 30

“扩增”是涉及模板特异性的核酸复制的特殊情况。这与非特异性的模板复制（即依赖于模板，但不依赖于特异性模板的复制）形成对照。模板的特异性在此处与复制的保真度（即，正确多核苷酸的合成）和核苷酸（核糖-或脱氧核糖-）特异性有所区别。模板的特异性通常是就“靶物质”特异性而言。靶序列是“靶”，在某种意义上，它们是被寻求以从其它核酸中分选出来。主要针对这种分选而设计出来的扩增技术已经出现。

正如此处所用，术语“共扩增”是指，可扩增的标记物与其它基因序列（即，包括一个或多个非选择性的基因，如那些包含在表达载体中的基因）一起引入到单一细胞中，并应用适当的选择压力，这样，该细胞既扩增可扩增的标记物，也扩增其它的非选择性的基因序列。可扩增的标记物可以物理地连接到其它的基因序列上；或者可选择地，是可以被引入到相同的细胞中的两个分离的 DNA 元件，其中一个 DNA 元件含有可扩增的标记物，另一个 DNA 元件含有非选择性的标记物。

正如此处所用，术语“可扩增的标记物”、“可扩增的基因”和“扩增载体”是指标记物、基因、或编码基因的载体，该载体允许该基因在适当的生长条件下进行扩增。

正如此处所用，术语“可扩增的核酸”是指可以通过任何扩增方法进行扩增的核酸。应该预期到，“可扩增的核酸”通常包括“样品模板”。

正如此处所用，术语“样品模板”指来源于被用来分析“靶物质”（在下面被定义）的存在的样品的核酸。相反，“背景模板”被用来指代除了样品模板以外的核酸，其可能存在于或可能不存在于样品中。背景模板通常是最容易被疏忽的。它可能是物质遗留（carryover）的结果，或者可能是由于存在需要从样品中纯化去掉的核酸污染物。例如，来自生物的但不是那些将被检测的核酸，可能在测试样品中作为背景而存在。

“模板特异性”在许多扩增技术中是通过酶的选择来实现的。扩增酶是指，在它们被使用的条件下，在核酸的异源混合物中仅仅处理核酸的特异性序列的酶。例如，在 Q β 复制酶的情况下，MDV-1 RNA 是该复制酶的特异性模板（例如参见 Kacian 等人, Proc. Natl. Acad. Sci.

USA 69: 3038 [1972])。其它核酸不被该扩增酶复制。类似地,在 T7 RNA 聚合酶的情况下,该扩增酶对其本身的启动子具有严格的特异性(参见 Chamberlin 等人, Nature 228: 227 [1970])。在 T4 DNA 连接酶的情况下,当寡核苷酸或多核苷酸底物与模板之间在连接处存在错配时,该酶不会将这两个寡核苷酸或多核苷酸连接(参见 Wu and Wallace, Genomics 4: 560 [1989])。最后, *Taq* 和 *Pfu* 聚合物,由于它们在高温下发挥作用的能力,被发现对于由于引物结合而因此被限定的序列显示出高度特异性;高温导致有助于引物与靶序列杂交、而不与非靶序列杂交的热力学条件。

10 正如此处所用,术语“引物”是指寡核苷酸,不管是在纯化的限制消化中自然产生的寡核苷酸,还是合成产生的寡核苷酸,当置于与核酸链互补的引物延伸产物的合成被诱导的条件下(即,在存在核苷酸和诱导剂如 DNA 聚合酶的情况下,以及在合适的温度和 pH 下)时,它能作为合成的起始点发挥作用。为了在扩增上具有最大效率,引物
15 优选地是单链的,但可选择地,可以是双链的。如果是双链的,首先对该引物进行处理,以便在被用于制备延伸产物之前分离其链。优选地,引物是寡脱氧核糖核苷酸。引物必需足够长,以便在存在诱导剂的情况下启动延伸产物的合成。引物的精确长度将依赖于许多因素,包括温度、引物的来源和所使用的方法。

20 正如此处所用,术语“探针”指寡核苷酸(即,核苷酸序列),不管是在纯化的限制消化中天然产生的寡核苷酸,还是合成产生的、重组产生的或通过 PCR 扩增产生的寡核苷酸,所述寡核苷酸能与别的感兴趣的寡核苷酸杂交。探针可以是单链或双链的。探针在特定基因序列的检测、鉴定和分离中是有用的。应该预期到,本发明中使用的任何探针都可以用任何“报告分子”标记,以便在任一检测系统中可检测
25 到,包括但不限于酶(例如 ELISA,以及基于酶的组织化学测定法)、荧光、放射活性和发光系统。这里并不打算将本发明限定于任何特定的检测系统或标记物。

正如此处所用,术语“靶”,当在聚合酶链式反应中使用,是指
30 用于聚合酶链式反应的引物所结合的核酸区域。因此,“靶”是打算从其它核酸序列中分选出来的物质。“片段”被定义为靶序列内的核酸区

域。

正如此处所用，术语“聚合酶链式反应”（“PCR”）指美国专利4,683,195、4,683,202和4,965,188的方法，此处引入作为参考，这些专利包括，不通过克隆或纯化，增加靶序列的片段在基因组DNA混合物中的浓度的方法。用于扩增靶序列的该过程，包括将大大过量的两种寡核苷酸引物引入到含有期望的靶序列的DNA混合物中，随后，在存在DNA聚合酶的情况下，进行精确顺序的热循环。这两个引物与双链靶序列中它们各自的链是互补的。为了实现扩增，对混合物进行变性，然后引物被退火到它们在靶分子内的互补序列上。在退火之后，用聚合酶延伸引物，以便形成一对新的互补链。变性、引物退火和聚合酶延伸的步骤可以多次重复（即变性、退火和延伸构成一个“循环”；可以有多个“循环”），以获得高浓度的期望靶序列的扩增片段。期望的靶序列的扩增片段的长度由引物相对于彼此的相对位置决定，因此，该长度是一个可控制的参数。由于该过程的重复特征，该方法被称作“聚合酶链式反应”（下文为“PCR”）。由于靶序列的期望的扩增片段成为混合物中的优势序列（就浓度而言），所以它们被称作“PCR扩增产物”。

正如此处所用，术语“扩增试剂”是扩增需要的那些试剂（脱氧核糖核苷三磷酸、缓冲液等等），引物、核酸模板和扩增酶除外。典型地，扩增试剂以及其它反应组分被放置和装在反应容器中（试管、微孔等等）。

借助PCR，在基因组DNA中将单个拷贝的特定靶序列扩增到可检测的水平是可能的，所述检测可以通过数个不同的方法进行（例如与标记探针的杂交；生物素化引物的整入，随后进行抗生物素蛋白-酶偶联物检测；将³²P标记的脱氧核苷三磷酸如dCTP或dATP整入到扩增的片段中）。除了基因组DNA，任何的寡核苷酸或多核苷酸序列也可以用适当组合的引物分子扩增。特别地，由PCR方法本身产生的扩增片段，它们本身可以是随后的PCR扩增的有效模板。

正如此处所用，术语“PCR产物”、“PCR片段”和“扩增产物”指变性、退火和延伸的PCR步骤的两个或更多个循环完成后得到的化合物混合物。这些术语包括这样的情况，即已经有一个或多个靶序列

的一个或多个片段的扩增。

正如此处所用，术语“限制性内切酶”和“限制酶”指细菌酶，每一种这样的酶在特异性核苷酸序列处或在其附近切割双链 DNA。

正如此处所用，“个人护理产品”指在头发、皮肤、头皮、牙齿的清洗中所用的产品，包括但不限于洗发剂、沐浴液、淋浴凝胶、局部补水剂、牙膏和/或其它局部清洁剂。在一些特别优选的实施方案中，这些产品被人使用，而在其它实施方案中，这些产品由非人的动物使用（例如在兽医应用中）。

正如此处所用，“清洗组合物”是可以用于从基质上除去不需要的化合物的组合物，所述基质如织物、碟子、隐形眼镜、其它固体基质、头发（洗发香波）、皮肤（肥皂和面霜）、牙齿（漱口水、牙膏）等等。

正如此处所用，术语“清洗组合物材料”指根据期望的特定类型的清洗组合物和产品形式（例如液体；颗粒；喷雾组合物）而选择的任何液体、固体或气体材料，这些材料也与在该组合物中使用的淀粉酶和其它酶相容。清洗组合物材料的特异性选择，可通过对将要清洗的表面、产品或织物，以及针对使用（例如洗涤去污剂的使用）过程中的清洗条件的期望组合物形式加以考虑，来容易地完成。

正如此处所用，术语“硬表面清洗组合物”指用于清洗硬表面如地板、墙壁、浴室瓷砖以及类似物的去污剂组合物。这样的组合物可以以任何形式提供，包括但不限于固体、液体、乳剂等等。

正如此处所用，“洗碟用组合物”指用于清洗碟子的组合物的所有类型，包括但不限于颗粒和液体形式。

正如此处所用，“织物清洗组合物”指用于清洗织物的所有形式的去污剂组合物，包括但不限于颗粒、液体和条状形式。正如此处所用，“织物”指任何纺织材料。

正如此处所用，术语“可相容的”指清洗组合物材料不会将淀粉酶的蛋白水解活性降低到这样的程度，即淀粉酶在正常使用情况下没有期望的有效性。此处对特定的清洗组合物材料进行了详细的例证性说明。

正如此处所用，“有效量的淀粉酶”指获得在特定应用（例如个人护理产品、清洗组合物等等）中所要求的酶活性所需要的淀粉酶的量。

这样的有效量可由本领域的普通技术人员容易地确定，该有效量基于许多因素，如所使用的特定的酶变体、清洗用途、清洗组合物的特定组成、液体或者干（例如颗粒、条状）的组合物是否被要求，等等。

正如此处所用，“非织物清洗组合物”包括硬表面清洗组合物、洗
5 碟用组合物、口腔清洗组合物、牙清洗组合物和个人清洗组合物。

正如此处所用，“口腔清洗组合物”指洁牙液、牙膏、牙胶、牙粉、漱口水、口腔喷雾剂、口腔凝胶、口香糖、糖锭、香粉、药片（tablet）、生物凝胶（biogels）、预防膏剂、牙齿处理液以及类似物。

正如此处所用，“药物上可接受的”的意思是，该术语描述的药剂、
10 药物和/或惰性的成分，适合与人和其它动物的组织联系使用，而没有与合理的利害比相当的、不适当的毒性、不相容性、不稳定性、刺激、过敏反应以及类似效果。

本发明的许多蛋白质变体可以用于配制各种去污剂组合物。大量已知的化合物可以作为合适的表面活性剂而应用于包含本发明的蛋白质变体的组合物中。这些包括非离子、阴离子、阳离子或两性离子去污剂（例如参见美国专利 4,404,128 和美国专利 4,261,868）。合适的去污剂制剂描述在美国专利 5,204,015 的实施例 7 中（先前引入作为参考）。本技术领域的普通技术人员熟悉用作清洗组合物的不同制剂。除了典型的清洗组合物，容易理解到，本发明的蛋白质变体在应用天然
20 或野生型蛋白质的任何用途中都有用。因此，这些变体可以被用于，例如条状或液体皂用途、盘碟护理制剂、表面清洗用途、隐形眼镜清洗溶液或产品、肽水解、废物处理、纺织品用途、作为蛋白质生产中的融合-裂解酶，等等。实际上，本发明中的变体并不限于任何特定的应用。例如，除了降低的变应原性，本发明的变体可以在去污剂组合物中具有增强的性能（与前体相比）。正如此处所用，在去污剂中的“增强的性能”被定义为对某些酶敏感污点（例如草或血液）的清洗增强，这可在标准的洗涤循环后通过常用的评价方法来确定。特别地，本发明的淀粉酶为从衣服和其它材料去除基于淀粉的污点和脏物如巧克力、肉汤、婴幼儿食品等等提供了增强的性能。此外，淀粉酶为从碟
25 子上去除大米、面食、麦片等等提供了增强的性能。

蛋白质，尤其是本发明的淀粉酶，可以被配制到已知的粉状和液

体去污剂中，其具有介于 6.5 到 12.0 之间的 pH，所述淀粉酶具有大约 0.01%到大约 5%（优选地 0.1%到 0.5%）的重量。在一些实施方案中，这些去污剂清洗组合物进一步包括其它酶，如蛋白酶、其它的淀粉酶、纤维素酶、脂肪酶或内切糖苷酶，以及增洁剂和稳定剂。

5 将蛋白质加入到传统清洗组合物不会产生任何特殊的使用限制。换句话说，适合用于去污剂的任何温度和 pH 也适合于本发明的组合物，只要 pH 在上述范围内，并且温度低于所描述的蛋白质的变性温度。此外，本发明的蛋白质也可以在不含去污剂的清洗组合物中应用，单独地使用或者与增洁剂和稳定剂联合使用。

10 在一个实施方案中，本发明提供了用于处理纺织品的包含本发明的变体蛋白质的组合物。该组合物可用于处理，例如丝绸或羊毛（例如参见 RE 216,034; EP 134,267; US 4,533,359; 和 EP 344,259）。在需要时，可以根据本领域熟知的方法筛选这些变体的蛋白水解活性。特别地，本发明提供了适合于织物护理和处理用途的淀粉酶，所述的织物护理和处理包括但不限于脱浆。

15 在一些实施方案中，本发明的淀粉酶在工业中 useful，如食品和饲料生产、烘焙、酿造、纸浆和造纸工业、淀粉的液化和/或降解、淀粉的改造、谷物加工和碾磨、麦芽糖生产、谷类淀粉液化、麦芽汁生产、全麦酿造。

20 正如上面所指出的，当与它们的前体 DNA 编码的天然淀粉酶相比时，本发明的淀粉酶表现出修饰的免疫原应答（例如，抗原性和/或免疫原性）。在一些优选实施方案中，蛋白质（例如淀粉酶）表现出降低的变应原性/免疫原性。本领域的普通技术人员可以容易地认识到，本发明的淀粉酶的应用，在很大程度上，是由所述蛋白质的免疫特性确定的。例如，表现出降低的免疫原应答的淀粉酶可以在清洗组合物中
25 使用。此处描述的有效量的一种或多种淀粉酶变体在用于清洗各种需要去除淀粉酶污点的表面的组合物中是有用的。这样的清洗组合物包括用于清洗硬表面的去污剂组合物、用于清洗织物的去污剂组合物、洗碟用组合物、口腔清洗组合物，和牙清洗组合物。

30 进一步，在被设计成一旦与湿气接触便释放出它们的活性成分的配方中，本发明的淀粉酶是有用的。因此，在一些实施方案中，基于

淀粉的组合物一旦与淀粉酶在潮湿条件下接触就被快速分解。此外，本发明的淀粉酶可用作消化助剂（例如用于淀粉代谢）。

5 在一些实施方案中，本发明的组合物含有乳化剂和/或表面活性剂，通常地，这有助于在连续的液相内分散和悬浮分散相。如果产物是打算用于皮肤清洁，那么表面活性剂也是有用的。此后为了方便起见，乳化剂被包括在术语“表面活性剂”内。因此，“表面活性剂”是指表面活性试剂，不管它是用作乳化剂还是用作其它的表面活性剂目的如皮肤清洁。已知的或传统的表面活性剂可以用于本发明的组合物，只要所选择的试剂与组合物的主要成分在化学和物理上相容，并且提供了期望的特性。合适的表面活性剂包括非聚硅氧烷衍生的材料，及其混合物。在申请 WO 00/24372 中讨论的所有表面活性剂被认为适合在本发明中使用。

15 在一些实施方案中，本发明的组合物含有大约 0.05%到大约 15%的表面活性剂或表面活性剂的混合物。所选择的准确的表面活性剂或表面活性剂混合物将依赖于组合物的 pH 和存在的其它组分。

此处有用的非离子型表面活性剂包括，那些可被广泛地定义为长链醇（例如 C₈₋₃₀ 醇）与糖或淀粉聚合物的缩聚产物的试剂（即，苷）。其它有用的非离子型表面活性剂包括脂肪酸与氧化烯的缩聚产物（即，脂肪酸的氧化烯酯）。这些材料具有通式 RCO(X)_nOH，其中 R 是 C₁₀₋₃₀ 的烷基基团，X 是 -OCH₂CH₂-（即，来源于乙二醇或氧化乙烯）或 -OCH₂CHCH₃-（即，来源于丙二醇或氧化丙烯），n 是从大约 6 到大约 200 的整数。其它的非离子表面活性剂是 2 摩尔脂肪酸与氧化烯的缩聚产物（即，脂肪酸的氧化烯二酯）。这些材料具有通式 RCO(X)_nOOCR，其中 R 是 C₁₀₋₃₀ 的烷基基团，X 是 -OCH₂CH₂-（即，来源于乙二醇或氧化乙烯）或 -OCH₂CHCH₃-（即，来源于丙二醇或氧化丙烯），n 是从大约 6 到大约 100 的整数。此处所用的乳化剂最优选地是基于脱水山梨糖醇脂肪酸酯和蔗糖脂肪酸酯的混合物的脂肪酸酯掺合物，尤其是脱水山梨糖醇硬脂酸酯和蔗糖可可酯（sucrose cocoate）的掺合物。这可以从 ICI 通过商业途径获得，商标名为 Arlatone 2121。更进一步的合适的实例包括十六硬脂酸酯（cetearyl alcohols）、十六烷基糖苷（cetearyl glucosides）的混合物，例如那些可从 Seppic 获得的，商标名为 Montanov

68, 和可从 Henkel 获得的, 商标名为 Emulgade PL 68/50。

在一些实施方案中, 此处有用的亲水表面活性剂可选择地或额外地包括本技术领域已知的各种阳离子、阴离子、两性离子和兼性表面活性剂中的任何表面活性剂 (例如参见美国专利 5,011,681, 美国专利 5 4,421,769, 和美国专利 3,755,560)。各种阴离子表面活性剂也在本发明的组合物中 有用 (例如参见美国专利 3,929,678)。例证性的阴离子表面活性剂包括 alkoyl isethionates (例如 C₁₂-C₃₀)、硫酸烷基酯和硫酸烷基醚酯及其盐、磷酸烷基酯和磷酸烷基醚酯及其盐、牛磺酸烷基甲基酯 (例如 C₁₂-C₃₀), 和脂肪酸的皂盐 (例如碱金属盐, 如钠盐或钾盐)。

10 兼性 (amphoteric) 和两性离子 (zwitterionic) 表面活性剂也在本发明的组合物中 有用。可以在本发明的组合物中使用的兼性和两性离子表面活性剂的实例是那些被广泛地描述为脂肪族仲胺和叔胺的衍生物的表面活性剂, 所述的脂肪族仲胺和叔胺中的脂肪族基团可以是直链或支链的, 其中脂肪族取代物中的一个含有大约 8 到大约 22 个碳原子 (优选地为 C₈-C₁₈), 一个含有阴离子水溶性基团 (例如羧基、磺酸盐、硫酸盐、磷酸盐或膦酸盐)。实例包括烷基亚氨乙酸盐、亚氨基二链烷酸盐和氨基链烷酸盐、咪唑鎓盐和铵衍生物。其它适合的兼性和两性离子表面活性剂包括那些选自甜菜碱、磺基甜菜碱、羟基磺基甜菜碱、支链的和非支链的烷酰基肌氨酸盐及其混合物的表面活性剂。

20 在一些实施方案中, 本发明的乳剂进一步包括含有乳化剂或表面活性剂的聚硅氧烷 (silicone)。各种聚硅氧烷乳化剂在本发明中 有用。这些聚硅氧烷乳化剂通常是有机修饰的有机聚硅氧烷, 本领域的普通技术人员也称为有机硅表面活性剂。有用的聚硅氧烷乳化剂包括二甲聚硅氧烷共聚多元醇 (dimethicone copolyol)。这些材料是聚二甲基硅氧烷, 它们已经被修饰以包含聚醚侧链, 如聚环氧乙烷链、聚环氧丙烷链、这些链的混合, 以及含有衍生自环氧乙烷和环氧丙烷的部分 (moieties) 的聚醚链。其它实例包括烷基修饰的二甲聚硅氧烷共聚多元醇 (即含有 C₂-C₃₀ 侧链的化合物)。其它有用的二甲聚硅氧烷共聚多元醇包括具有各种阳离子、阴离子、兼性和两性离子侧链部分 (pendant 25 moieties) 的材料。

30 在一些实施方案中, 本发明的组合物包含至少一种聚合增稠剂。

此处有用的聚合增稠剂的平均分子量优选地大于 20,000, 更优选地大于 50,000, 尤其是大于 100,000。在一些实施方案中, 本发明的组合物包含的聚合增稠剂或其混合物占组合物的重量百分比为大约 0.01%至大约 10%, 优选地大约 0.1%至大约 8%, 更优选地大约 0.5%至大约 5%。

5 此处有用的优选的聚合物增稠剂包括非离子型增稠剂和阴离子增稠剂, 或其混合物。合适的非离子增稠剂包括聚丙烯酰胺聚合物、交联的聚(N-乙烯吡咯烷酮)、多糖、天然或合成胶、聚乙烯吡咯烷酮和聚乙烯醇。合适的阴离子增稠剂包括丙烯酸/丙烯酸乙酯共聚物、羧基乙烯基聚合物、和烷基乙烯基醚和顺丁烯二酐的交联共聚物。此处所用的特别优选的增稠剂是非离子聚丙烯酰胺聚合物, 如聚丙烯酰胺和异链烷烃以及聚氧乙烯月桂烷-7 (laureth-7), 可从 Seppic Corporation 获得, 商标名为 Sepigel 305, 丙烯酸/丙烯酸乙酯共聚物和羧基乙烯基聚合物, 由 B.F. Goodrich 公司出售, 商标名为 CARBOPOL™ 树脂, 或其混合物。在一些实施方案中, 合适的 CARBOPOL™ 树脂是疏水改性的。
10 的。其它合适的树脂描述在 WO98/22085 中。也应该预期到这些树脂的混合物将在本发明中 useful。

在一些实施方案中, 本发明的组合物包含, 至少一种聚硅氧烷油相。聚硅氧烷油相通常占组合物的大约 0.1%到大约 20%, 优选地大约 0.5%到大约 10%, 更优选地大约 0.5%到大约 5%。该聚硅氧烷油相,
20 或每一聚硅氧烷油相优选地包含一种或多种聚硅氧烷组分。

在一些实施方案中, 聚硅氧烷组分是流体, 包括直链、支链和环状硅氧烷。此处有用的合适的聚硅氧烷流体包括聚烷基硅氧烷流体、聚芳基硅氧烷流体、环状和线性聚烷基硅氧烷、聚烷氧基化硅氧烷、氨基和季铵改性的硅氧烷、聚烷基芳基硅氧烷或聚醚硅氧烷共聚物及其混合物。
25 聚硅氧烷流体可以是挥发性的或非挥发性的。聚硅氧烷流体通常的平均分子量低于大约 200,000。合适的聚硅氧烷流体的分子量为大约 100,000 或更低, 优选地大约 50,000 或更低, 更优选地大约 10,000 或更低。优选地, 聚硅氧烷流体选自平均分子量在大约 100 到大约 50,000, 优选地在大约 200 到大约 40,000 之间的聚硅氧烷流体。
30 典型地, 聚硅氧烷流体在 25℃的粘度范围在大约 0.65 到大约 600,000 mm².s⁻¹ 之间, 优选地在大约 0.65 到大约 10,000 mm².s⁻¹ 之间。该粘度

可以利用如 Dow Corning Corporate Test Method CTM0004 中所示的玻璃毛细管粘度计来测量。在本发明中有用的合适的聚二甲基硅氧烷包括那些, 例如可以从 General Electric Company 得到的 SF 和 Viscasil (RTM) 系列, 和来自 Dow Corning 的 Dow Corning 200 系列的聚二甲基硅氧烷。同样有用的是基本上不挥发的聚烷基芳基硅氧烷 (例如聚甲基苯基硅氧烷), 在 25°C 具有大约 0.65 到 $30,000 \text{ mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ 的粘度。这些硅氧烷可以获得, 例如 General Electric Company 的 SF 1075 甲基苯基流体或 Dow Corning 的 556 Cosmetic Grade Fluid。适合在此处使用的环状聚二甲基硅氧烷是那些具有环状结构的聚二甲基硅氧烷, 含有大约 3 到大约 7 个 $(\text{CH}_3)_2\text{SiO}$ 部分。

聚硅氧烷树胶也在本发明中有用。术语“聚硅氧烷树胶 (silicone gum)”在此处指平均分子量超过大约 200,000, 优选地从大约 200,000 到大约 4,000,000 之间的高分子量聚硅氧烷。本发明包括非挥发性的聚烷基硅氧烷树胶以及聚芳基硅氧烷树胶。在优选的实施方案中, 聚硅氧烷油相包含聚硅氧烷树胶或包含含有该聚硅氧烷树胶的聚硅氧烷混合物。典型地, 聚硅氧烷树胶在 25°C 具有超过大约 $1,000,000 \text{ mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ 的粘度。聚硅氧烷树胶包括本技术领域已知的二甲聚硅氧烷 (例如参见美国专利 4,152,416), 以及 General Electric Silicone Rubber Product Data Sheets SE 30, SE 33, SE 54 和 SE 76 中描述的聚硅氧烷树胶。聚硅氧烷树胶的具体实例包括聚二甲基硅氧烷、(聚二甲基硅氧烷)-(甲基乙烯基硅氧烷)共聚物、聚(二甲基硅氧烷)(二苯基)(甲基乙烯基硅氧烷)共聚物及其混合物。此处有用的优选的聚硅氧烷树胶是平均分子量从大约 200,000 到大约 4,000,000 之间的聚硅氧烷树胶, 可选自二甲聚硅氧烷醇 (dimethiconol)、二甲聚硅氧烷共聚多元醇、二甲聚硅氧烷及其混合物。

此处的聚硅氧烷相优选地包括整合到组合物中作为聚硅氧烷树胶流体掺合物的一部分的聚硅氧烷树胶。当聚硅氧烷树胶作为聚硅氧烷树胶流体掺合物的一部分被加入时, 该聚硅氧烷树胶优选地构成聚硅氧烷树胶流体掺合物的大约 5% 到大约 40%, 尤其是大约 10% 到 20%, 以重量百分比计算。此处合适的聚硅氧烷树胶流体掺合物是主要包括如下物质的混合物:

- (i) 平均分子量从大约 200,000 到大约 4,000,000 之间的聚硅氧烷，其选自二甲聚硅氧烷醇、氟聚硅氧烷（fluorosilicone）和二甲聚硅氧烷及其混合物；和
- (ii) 载体，该载体是聚硅氧烷流体，其粘度为大约 $0.65 \text{ mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ 到大约 $100 \text{ mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ，

其中 i) 到 ii) 的比率为大约 10:90 到大约 20:80，其中该基于聚硅氧烷树胶的组分的最终粘度为大约 $100 \text{ mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ 到大约 $100,000 \text{ mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ，优选地为 $500 \text{ mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ 到大约 $10,000 \text{ mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ 。

进一步，适合在此处的聚硅氧烷油相中使用的聚硅氧烷组分是交联的聚合有机硅氧烷聚合物，其可任选地分散在流体载体中。通常而言，交联的聚有机硅氧烷聚合物，连同其载体（如果存在），占组合物的 0.1% 到大约 20%，优选地大约 0.5% 到大约 10%，更优选地大约 0.5% 到大约 5%。这样的聚合物包括通过交联剂交联在一起的聚有机硅氧烷聚合物。合适的交联剂包括那些在 WO 98/22085 中描述的那些交联剂。

在此处使用的合适的聚有机硅氧烷聚合物的实例包括甲基乙基二甲聚硅氧烷、甲基乙基二苯基二甲聚硅氧烷和甲基乙基苯甲基二苯基二甲聚硅氧烷。

适合在此处的聚硅氧烷油相中使用的另一类的聚硅氧烷组分包括聚二有机硅氧烷-聚氧化烯共聚物，其含有至少一个聚二有机硅氧烷片段和至少一个聚氧化烯片段。合适的聚二有机硅氧烷片段及其共聚物包括那些在 WO 98/22085 中所描述的。合适的聚合二有机硅氧烷-聚烯共聚物可通过商业途径从 Wacker-Chemie GmbH, Munich 获得，商标名为 Belsil(RTM)，从 Th. Goldschmidt Ltd., England 获得，Abil(RTM)，例如 Belsil(RTM) 6031 和 Abil(RTM) B88183。此处有用的特别优选的共聚物流体掺合物包括 Dow Corning DC3225C，其具有 CTFA 名称二甲聚硅氧烷/二甲聚硅氧烷共聚多元醇。

在一些实施方案中，本发明的组合物包括抗微生物和/或抗真菌活性。此处有用的抗微生物和抗真菌活性的非限定性实例包括，但不限于， β -内酰胺药物、喹诺酮药物、环丙沙星（ciprofloxacin）、诺氟沙星（norfloxacin）、四环素、红霉素、丁胺卡那霉素（amikacin）、2,4,4'-三氯-2'-羟基二苯基醚、3,4,4'-三氯 banilide、苯氧基乙醇、苯氧基丙醇、

苯氧基异丙醇、强力霉素、卷曲霉素、双氯苯双胍己烷(chlorhexidine)、氯四环素、土霉素、克林霉素、乙胺丁醇、己咪定乙基磺酸盐(hexamidine isethionate)、甲硝哒唑、戊烷脒(pentamidine)、艮他霉素、卡那霉素、林可霉素(lineomycin)、甲烯土霉素(methacycline)、六甲烯胺(methenamine)、美诺四环素(minocycline)、新霉素、奈替米星(netilmicin)、巴龙霉素、链霉素、妥布霉素(tobramycin)、咪康唑(miconazole)、盐酸四环素、红霉素、锌红霉素、依托红霉素(erythromycin estolate)、硬脂酸红霉素、硫酸丁胺卡那霉素、盐酸强力霉素、硫酸卷曲霉素、葡萄糖酸双氯苯双胍己烷、盐酸双氯苯双胍己烷、盐酸氯四环素、盐酸土霉素、盐酸克林霉素、盐酸乙胺丁醇、盐酸甲硝哒唑、盐酸戊烷脒、硫酸艮他霉素、硫酸卡那霉素、盐酸林可霉素、盐酸甲烯土霉素、马尿酸六甲烯胺、扁桃酸六甲烯胺、盐酸美诺四环素、硫酸新霉素、硫酸奈替米星、硫酸巴龙霉素、硫酸链霉素、硫酸妥布霉素、盐酸咪康唑、盐酸金刚烷胺(amanfadine)、硫酸金刚烷胺、羟甲辛吡酮(octopirox)、对氯间二甲苯酚(parachlorometaxylenol)、制霉菌素(nystatin)、托萘酯(tolnaftate)、氯代三苯甲咪唑(clotrimazole)、十六烷基氯化吡啶鎓(CPC)、吡啶酮乙醇胺(piroctone olamine)、硫化硒、酮康唑(ketoconazole)、三氯碳酰苯胺(triclocarbon)、三氯沙(triclosan)、双吡啶硫酮锌、伊曲康唑(itraconazole)、积雪草酸(asiatic acid)、日桧醇(hinokitiol)、mipirocin、盐酸clinacycin、过氧化苯酰、苄基过氧化物、美诺环素(minocyclin)、苯氧基异丙醇, 及其混合物, 以及在欧洲专利 0 680 745 中所描述的那些。

在一些其它的实施方案中, 多种任选的成分如中和剂(neutralizing agents)、香水和着色剂, 在本发明的组合物中 useful。此外, 优选地, 任何这样的成分都不会负面地影响产品的美学特性。

此处, 适合用于中和含有酸性基团的亲水胶凝试剂的中和剂包括氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、单乙醇胺、三乙醇胺、氨基甲基丙醇、三羟甲基氨基甲烷(Tris)缓冲液和三乙醇胺。

此处的其它任选材料包括颜料, 当所述颜料是水不溶性时, 它有助于油相成分的总水平, 并且被包括在油相成分的总水平中。适合在本发明的组合物中使用的颜料可以是有机和/或无机的。同样包括在术

语“颜料”中的是具有浅的颜色或光泽的材料，如无光泽的表面修饰剂，也如光散射剂。优选地，本发明的组合物包含折射率为大约 1.3 到大约 1.7 的颗粒材料，颗粒材料被分散在组合物中，其中间的（median）粒度为大约 2 到大约 30 μm 。优选地，此处有用的颗粒具有相对窄的分布，其意思是超过 50%的颗粒落在各自中位值（median value）的任一侧的 3 μm 范围以内。还优选的是，超过 50%，优选地超过 60%，甚至更优选地超过 70%的颗粒落在各自中位值的所规定的尺寸范围内。合适的颗粒材料包括有机或无机硅，优选地包括有机基聚硅氧烷聚合物。优选的颗粒是不流动的实体材料。“实体”指颗粒不是中空的。中空颗粒的中央位置处的空间对折射率有负面影响，从而对颗粒在皮肤或者组合物上的视觉效果有不利影响。合适的有机颗粒材料包括那些用聚甲基倍半硅氧烷制成的材料，参考上面，还可由聚酰胺、聚乙烯、聚丙烯腈、聚丙烯酸、聚甲基丙烯酸、聚苯乙烯、聚四氟乙烯（PTFE）和聚(偏二氯乙烯)。也可以使用来源于前述材料的单体的共聚物。无机材料包括硅石和氮化硼。可通过商业途径获得的此处有用的颗粒材料的代表性实例是 Tospearl®145，该材料的粒度中位值为大约 4.5 μm ，和来自 Kobo 的 EA-209®，该材料是乙烯/丙烯酸共聚物，其粒度中位值为大约 10 μm ，从 Elf Atochem, France 获得的 Nylon-12，商标名为 Orgasol 2002，或其混合物。

合适的颜料的进一步的实例包括二氧化钛、来自 Kobo 的预分散二氧化钛（例如 Kobo GWL75CAP）、氧化铁、酞基谷氨酸铁氧化物（acyglutamate iron oxide）、群青蓝（ultramarine blue）、D&C 染料、洋红（carmin）及其混合物。取决于组合物的类型，颜料混合物通常是有用的。此处有用的优选颜料是从增加水分、皮肤感觉、皮肤外观和乳液的角度出发的。合适地，此处的组合物的 pH 在大约 6.1 到大约 10.0 的范围内，其中最终组合物的 pH 可根据需要通过加入酸性、碱性或缓冲盐来调节。

本发明的组合物通过本领域普通技术人员熟知的标准技术制备。一般而言，水相和/或油相单独制备，类似的相部分的材料可以以任何次序被加入。如果最终产物是乳剂，那么两个相通过有力的搅拌组合在一起。配方中具有高挥发性或在高温下易于水解的任何成分，可以

在接近该过程的结束之时，在轻轻地搅拌下加入；如果适用的话，采用后乳化法（post emulsification）。

正如上面所指出的，具有降低的变应原性/免疫原性的淀粉酶也在织物的处理中 useful。“织物处理”包括织物和可以被机织、粘结或编织成织物或服装的单独的纱线或纤维被处理以产生期望特性的过程。这样的期望特性的实例是“石洗（stone-washing）”、防起球、脱毛、脱浆、软化，以及本领域普通技术人员熟知的其它织物处理。

在本发明的一个实施方案中，此处鉴定的表位被用于引起免疫应答（例如，在期望产生针对包括这样的表位中的一个或者两个的淀粉酶的抗体的情况下）。这样的抗体在筛选其它的淀粉酶时是有用的，所述淀粉酶包括一个或两个这样的区域、或与这些区域高度同源的区域。此外，本发明的淀粉酶在各种分析方法中可用作试剂，如使用分离的天然表位的免疫分析法、呈现出特定的表位区域的重组蛋白质或合成肽，它们可以用于评价人对包括这些区域或高度同源的区域的蛋白质的敏感性。

在另一个实施方案中，此处的表位片段在具有能结合和呈递这样的片段的 MHC 分子的抗原呈递细胞的检测中是有用的。例如，所述的表位片段可以包括一个可检测的标记物（例如放射性标记）。已标记的片段然后与感兴趣的细胞温育，然后检测结合（或呈递）已标记的片段的细胞。

在其它实施方案中，具有降低的变应原性/免疫原性的相关淀粉酶和/或变体淀粉酶在其它应用中 useful，包括制药应用、药物传送应用和它的健康护理应用。此外，具有降低的变应原性/免疫原性的相关蛋白质和/或变体蛋白质在其它应用中 useful，包括制药应用、药物传送应用和它的健康护理应用。实际上，应该预期到，本发明的淀粉酶将在大量的组合物和应用中具有广泛的用途。

发明详述

本发明提供了新颖的蛋白质变体，这些蛋白质变体与亲本蛋白质相比，表现出降低的免疫原性应答。本发明进一步提供了编码新颖的变体的 DNA 分子、包含编码新颖变体的 DNA 的宿主细胞，以及制备

具有更低的变应原性/免疫原性的蛋白质的方法。此外，本发明提供了多种包含这些蛋白质的组合物，所述蛋白质与野生型蛋白质相比具有更低的免疫原性。

正如此处描述的，在此处描述的被分析的淀粉酶中有至少四个 T 细胞表位。实际上，下面的表位被确定为是兴趣所在：

DSAYLAEHGITAVWIPPAYKG (SEQ ID NO:2)、

KYGTKGELQSAIKSL (SEQ ID NO:3)、

DRNRVISGEHLIKAW (SEQ ID NO:4)、

FDGTDWDESRKLNRI (SEQ ID NO:5)、

10 AWDWEVSNENGNYYDY (SEQ ID NO:6)、

EIKRWGTWYANELQL (SEQ ID NO:7)、

EPILKARKQYAYGAQ (SEQ ID NO:8)、

RQNAGETWHDITGNR (SEQ ID NO:9)，和

EFHVNGGSVSIYVQR (SEQ ID NO:10)。

15 在一些实施方案中，本发明进一步包括鉴定增加或降低淀粉酶的免疫原性的残基。在一些实施方案中，在野生型或亲本淀粉酶序列中的至少一个 T 细胞表位中进行了至少一个氨基酸取代。在一些优选的实施方案中，在亲本淀粉酶序列中有多个氨基酸被改变，以产生具有降低的变应原性/免疫原性的淀粉酶变体。在可选择的优选实施方案中，
20 在亲本淀粉酶序列中进行了氨基酸删除、插入和/或取代，以便产生具有降低的变应原性/免疫原性的变体淀粉酶。在一些实施方案中，淀粉酶是地衣芽孢杆菌淀粉酶，而在其它可选择的实施方案中，淀粉酶是从任一其它生物获得的淀粉酶。在一些实施方案中，该淀粉酶是野生型的，而在其它实施方案中，它是在感兴趣的表位中具有氨基酸取代的
25 突变 (mutated) 变体、缀合 (conjugated) 变体或杂合 (hybrid) 变体，所述表位会在个体或个体的抽样 (sampling of individuals) 中导致过敏。

除了具有降低的变应原性/免疫原性的淀粉酶，本发明还包括具有增加的变应原性/免疫原性的变体淀粉酶，以及与亲本淀粉酶具有相同
30 程度的变应原性/免疫原性，但具有其它改变的特性的变体淀粉酶。在可选择的优选实施方案中，在亲本淀粉酶序列中进行氨基酸删除、插

入和/或取代，以便产生具有增加的变应原性/免疫原性的变体淀粉酶。在其它实施方案中，变体淀粉酶包括在它们的氨基酸序列的非 T 细胞表位区域中的改变。因此，本发明包括对 T 细胞具有相同的反应性，但具有其它改变的特性的淀粉酶。在优选实施方案中，这些改变的特性为该变体淀粉酶提供了有利的性质。在一些实施方案中，淀粉酶是地衣芽孢杆菌淀粉酶，而在其它可选择的实施方案中，淀粉酶是从任何其它生物获得的淀粉酶。在一些实施方案中，该淀粉酶是野生型的，而在其它实施方案中，它是在感兴趣的表位中具有氨基酸取代的突变变体、缀合变体或杂合变体，所述表位会在个体或个体的抽样中导致过敏。

在本发明的一个优选实施方案中，具有改变的免疫原应答（例如增加或降低的免疫原应答）的肽衍生自感兴趣的淀粉酶。在一些实施方案中，表位通过鉴定表位和非表位的分析方法来鉴定，如下：分化的树突状细胞与人初生 CD4+和/或 CD8+ T 细胞，以及与感兴趣的肽结合。更特别地，在一些实施方案中，提供了感兴趣的具有降低的免疫原应答的肽，其中 T 细胞表位被识别，包括如下步骤：（a）从单个血液来源获得树突状细胞的溶液和初生 CD4+和/或 CD8+ T 细胞的溶液；（b）分化树突状细胞；（c）将分化的树突状细胞和初生 CD4+和/或 CD8+ T-细胞的溶液与感兴趣的肽混合；和（d）测量 T 细胞在步骤（c）中的增殖。

在本发明的一个实施方案中，制备与感兴趣的淀粉酶的全部或部分相对应的一系列肽寡聚物。在一些优选实施方案中，产生肽文库，其覆盖了蛋白质的相关部分或全部。正如在下面的实施例中所描述的，一组肽被用于鉴定感兴趣的表位，这组肽中的每一个均是 15-mer 的肽，它们以三个氨基酸为单位发生步移式的表化（offset）。通过用在此处提供的分析方法，分别地分析每一个肽，本发明的方法有助于准确地鉴定由 T 细胞识别的表位。在上面的实施例中，一个特定的肽比其相邻的肽具有更大的反应性，这有助于将表位锚定区域（anchor region）鉴定到三个氨基酸的范围内。在一些实施方案中，在这些表位的位置被确定后，每个表位内的一个或多个氨基酸被修饰，直到该肽产生与原始蛋白质的 T 细胞应答不同的 T 细胞应答。而且，本发明提供了鉴定

具有期望的低 T 细胞表位效力 (epitope potency) 的蛋白质的手段, 所述蛋白质可以以它们的天然发生的形式 (即, 野生型蛋白质) 使用。

本发明延伸到所有的蛋白质, 人们期望调制这些蛋白质的免疫原应答。本领域普通技术人员可以容易地认识到, 本发明的蛋白质和肽并不一定是天然的蛋白质和肽。实际上, 在本发明的一个实施方案中, 具有改变的免疫应答的重排 (shuffled) 基因被考虑 (例如参见 Stemmer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 10747 [1994]; Pattenet 等人, Curr. Op. Biotechnol. 8: 724 [1997]; Kuchner 和 Arnold, Trends Biotechnol., 15: 523 [1997]; Moore 等人, J. Mol. Biol., 272:336 [1997]; Zhao 等人, Nature Biotechnol., 16: 258 [1998]; Giver 等人 Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95: 12809 [1998]; Harayama, Trends Biotechnol., 16:76 [1998]; Lin 等人, Biotechnol., Prog., 15:467 [1999];和 Sun, Comput. Biol., 6:77 [1999], 它们描述了基因重排和这样的基因的表达)。在一些实施方案中, 淀粉酶被改变, 以便动物针对该淀粉酶产生的免疫应答被改变。

15 优选地, 根据本发明的淀粉酶是分离的或纯化的。“纯化或分离”是指, 淀粉酶由其天然状态改变而来, 这是通过将该淀粉酶与一些或所有的天然发生的组分分离来完成的, 所述淀粉酶与这些天然发生的组分在自然界是相联系的。该纯化可通过本领域已知的任何合适的方法实现, 包括但不限于本技术领域认可的分离技术, 如离子交换层析、亲和层析、疏水分离、透析、淀粉酶处理、硫酸铵沉淀或其它的蛋白盐沉淀、离心、大小排阻层析、过滤、微过滤、凝胶电泳或梯度分离, 以去除全细胞、细胞碎片、杂质、外来蛋白质和/或在最终组合物中不期望的酶。在一些实施方案中, 一些组分被加入含有淀粉酶的组合物中以提供额外的益处, 这些组分例如活化剂、抗抑制剂、期望的离子、控制 pH 的化合物和/或其它的酶 (例如纤维素酶)。

除了上述蛋白质和肽, 本发明包括野生型淀粉酶, 以及表现出改变的免疫原应答 (例如, 增加或降低的免疫原应答) 的变体淀粉酶。在一些实施方案中, 当变体淀粉酶引起的 T 细胞应答大于亲本 (即, 前体) 淀粉酶引起的 T 细胞应答时, 该变体淀粉酶表现出增加的免疫原应答。该更高的应答的净结果是针对该变体淀粉酶的抗体的增加。在可选择的实施方案中, 当变体淀粉酶引起的 T 细胞应答低于亲本 (即,

前体)淀粉酶引起的 T 细胞应答时,该变体淀粉酶表现出降低的免疫原应答。该更低的应答的净结果是针对该变体淀粉酶的抗体的减少。

在确定变体蛋白质的降低的免疫原应答中有用的示范性测定方法包括,但不限于体内测定法(HLA-DR3/DQ2 鼠 T 细胞应答),和体外测定法(人外周血单核细胞(PBMC)对淀粉酶 1(即 BPN'-Y217L 淀粉酶)及其变体。在确定降低的免疫原应答中有用的体内测定法包括,但不限于使用转基因动物,例如鼠(Taurog 等人, Immunol. Rev., 169:209-223 [1999])、兔或猪。用于在体内测试感兴趣的修饰蛋白质和变体、确定降低的免疫原应答的优选的转基因鼠模型是本技术领域已知的 HLA-DR3/DQ2 鼠模型。细胞表面结合分析显示,感兴趣的淀粉酶表位与 HLA-DQ2 结合。

除了改变(例如增加或降低)动物例如人对天然发生的氨基酸序列的免疫原应答,本发明还提供了降低突变蛋白质的免疫原应答的方法(例如,已经被改变以改变该蛋白质的功能活性的淀粉酶)。在一些实施方案中,突变被制造以便提供一些有利特性,包括但不限于增加的活性、增加的热稳定性、增加的碱稳定性和/或氧化稳定性。在一些实施方案中,突变导致新的 T 细胞表位整合到突变的淀粉酶中。正如此处更进一步详细讨论的,本发明提供了淀粉酶 T 细胞表位和具有氨基酸变化的变体淀粉酶,所述的氨基酸变化将改变该突变蛋白质的免疫原应答。

尽管本发明包括上述蛋白质和许多其它蛋白质,但为了简化起见,下面将描述本发明的特别优选的实施方案,这些实施方案涉及淀粉酶的修饰。

此处使用的氨基酸位置编号是指那些指定给 SEQ ID NO:1 的成熟地衣芽孢杆菌淀粉酶序列的位置编号。然而,本发明不限于该特定淀粉酶的突变,而是延伸到在与地衣芽孢杆菌淀粉酶中特别鉴定的残基“等价的”位置上含有氨基酸残基的前体淀粉酶。例如,在前体淀粉酶是地衣芽孢杆菌 α -淀粉酶的情况下,可以在地衣芽孢杆菌中与上面所示的那些相对应的等价氨基酸残基处进行取代、缺失和/或插入。

如果前体淀粉酶的残基(氨基酸)与地衣芽孢杆菌淀粉酶中特定的残基或该残基的部分是同源的(即,在一级或三级结构的位置上是

对应的)或者类似的,那么前体淀粉酶的所述残基(氨基酸)与地衣芽孢杆菌淀粉酶的所述残基是等价的。正如此处所用,“对应的”通常是指沿着肽的类似位置。

为了建立一级结构的同源性,将前体淀粉酶的氨基酸序列与地衣芽孢杆菌淀粉酶一级序列直接比较,特别地,与在序列已知的淀粉酶中已知是不变的一组残基比较。与保守残基联配,其中允许必要的插入和删除,以便维持联配(即,通过任意的缺失和插入避免排除保守残基),之后,定义与地衣芽孢杆菌的一级序列中的特定氨基酸等价的残基。保守残基的联配优选地应该保留100%的这样的残基。然而,超过75%或低至50%的保守残基的联配也是足以定义等价残基的。因此,这些保守残基可以被用于定义其它的淀粉酶中与地衣芽孢杆菌淀粉酶对应的等价氨基酸残基,所述其它的淀粉酶与优选的地衣芽孢杆菌淀粉酶高度同源。

在一些实施方案中,本发明提供了与前体淀粉酶相比具有改变的免疫原应答潜力的变体淀粉酶。尽管本发明用于降低免疫原应答,但此处描述的突变可以与本领域已知的突变组合使用,以产生与前体相比改变的热稳定性和/或改变的底物特异性、修饰的活性、改进的比活性或改变的碱稳定性。

在其他实施方案中,两个同源蛋白质被融合,以去除至少一个T细胞表位。正如下面所描述的,蛋白质中含有T细胞表位的区域用同源蛋白质中不具有该T细胞表位的相同区域取代。例如,融合蛋白用来自地衣芽孢杆菌的淀粉酶和其地衣芽孢杆菌同源物的淀粉酶产生,以便所得到的蛋白质不具有在亲本地衣芽孢杆菌淀粉酶中存在的T细胞表位。任何的氨基酸长度都可用于融合到亲本蛋白质中,从仅仅一个表位到该蛋白质的大部分,只要维持期望的活性。然而,并不一定要维持活性的原始水平。由于蛋白质的降低的变应原性/免疫原性,在一些实施方案中,为了获得相同的活性水平,使用了比亲本蛋白质更多的杂合蛋白质。

在一些实施方案中,通过检查各种商业可获得的底物与淀粉酶的相互作用,测定变体淀粉酶活性并与感兴趣的淀粉酶比较,所述底物包括但不限于酪蛋白、角蛋白、弹性蛋白、胶原蛋白。正如所期望的,

淀粉酶活性可通过本领域已知的任何合适的方法确定。在其它实施方案中，变体淀粉酶的其他特性使用本领域已知的合适方法确定。示例性的特性包括但不限于，热稳定性、碱稳定性、该特定的淀粉酶在各种底物或缓冲溶液或产品制剂中的稳定性。与此处公开的酶稳定性分析5 方法联合，鉴定通过随机诱变获得的突变体，这些突变体显示出增加或者降低的碱性或热稳定性，同时维持了酶活性。

实验

下述实施例用于举例说明某些优选的实施方案和本发明的一些方面，10 不应该被解释为限定本发明的范围。

在随后的实验公开内容中，下面的缩写词被应用：M（摩尔每升）；mM（毫摩尔每升）； μ M（微摩尔每升）；nM（纳摩尔每升）；mol（摩尔）；mmol（毫摩尔）； μ mol（微摩尔）；nmol（纳摩尔）；gm（克）；mg（毫克）； μ g（微克）；pg（皮克）；L（升）；ml（毫升）； μ l（微升）；15 cm（厘米）；mm（毫米）； μ m（微米）；nm（纳米）； $^{\circ}$ C（摄氏度）；cDNA（拷贝或互补DNA）；DNA（脱氧核糖核酸）；ssDNA（单链DNA）；dsDNA（双链DNA）；dNTP（脱氧核糖核苷三磷酸）；RNA（核糖核酸）；PBS（磷酸缓冲盐溶液）；g（重力）；OD（光密度）；Dulbecco氏磷酸盐缓冲液（DPBS）；HEPES（N-[2-羟乙基]哌嗪-N-[2-乙磺酸]）；20 HBS（HEPES 缓冲盐水）；SDS（十二烷基硫酸钠）；Tris-HCl（盐酸三[羟甲基]氨基甲烷）；Klenow（DNA 聚合酶 I 大（Klenow）片段）；rpm（每分钟转速）；EGTA（乙二醇-双(β -氨基乙醚)N,N,N',N'-四乙酸）；EDTA（乙二胺四乙酸）；bla（ β -内酰胺酶或氨苄青霉素抗性基因）；Endogen（Endogen, Woburn, MA）；CytoVax（CytoVax, Edmonton, 25 Canada）；Wyeth-Ayerst（Wyeth-Ayerst, Philadelphia, PA）；NEN（NEN Life Science Products, Boston, MA）；Wallace Oy（Wallace Oy, Turku, Finland）；Pharma AS（Pharma AS, Oslo, Norway）；Dynal（Dynal, Oslo, Norway）；Bio-Synthesis（Bio-Synthesis, Lewisville, TX）；ATCC（American Type Culture Collection, Rockville, MD）；Gibco/BRL 30（Gibco/BRL, Grand Island, NY）；Sigma（Sigma Chemical Co., St. Louis, MO）；Pharmacia（Pharmacia Biotech, Pisacataway, NJ）；和 Stratagene

(Stratagene, La Jolla, CA)。

实施例 1

制备在使用人 T 细胞鉴定 α 淀粉酶中的肽 T 细胞表位的 I-MUNE® 分析系统中所用的细胞

从对 IFN- β 处于未知的暴露状态的 82 个人中收集新鲜的人外周血细胞。测试这些细胞以确定 IFN- β 中的抗原表位，正如实施例 3 中所描述的。

如下地制备外周单核血细胞（在室温下储存，不超过 24 小时）备用：在来自 1 单位全血的大约 30 毫升的淡黄色制备物溶液中加入 Dulbecco 氏磷酸盐缓冲液（DPBS），使其达到 50ml，再分作两管。将 12.5ml 室温的淋巴制备密度分离介质（Lymphoprep density separation media）（Nycomed; Pharma AS; 密度 1.077g/ml）置于这些样品的下面。以 600 $\times$ g 将试管离心 30 分钟。两相界面被收集、汇合、并在 DPBS 中洗涤。所得溶液的细胞密度用血细胞计数器来测量，如本领域所已知的。存活力通过台盼蓝排斥法来测量，正如本领域所已知的。

利用所得溶液，由外周血单核细胞样品制备分化的树突状细胞培养物，外周血单核细胞样品在溶液中的密度为 10^8 个细胞/75ml 培养瓶，制备过程如下面所述：

- 20 (1) 1: 100 稀释度的 β -巯基乙醇（Gibco）加入到 50ml 的无血清 AIM V 培养基（Gibco）。将培养瓶在 37°C 在 5% CO₂ 中水平放置 2 小时，以便使单核细胞粘附到瓶壁上。
- (2) 如下进行单核细胞到树突状细胞的分化：去除未粘附细胞，将所得到的粘附细胞（单核细胞）与 30ml 的 AIM V，800 单位/ml 的 GM-CSF（Endogen）和 500 单位/ml 的 IL-4（Endogen）混合；
25 将所得到的混合物在 37°C 在 5% CO₂ 中培养 5 天。在温育 5 天后，细胞因子 TNF α （Endogen）被加至 0.2 单位/ml，细胞因子 IL-1 α （Endogen）被加至终浓度为 50 单位/ml，将混合物在 37°C 在 5% CO₂ 中再培养 2 天。
- 30 (3) 在第七天，加入 100mM 的含 EDTA 的 PBS 中的丝裂霉素 C，至浓度为 50 微克/ml，以终止目前分化的树突状细胞培养物的生长。

将溶液在 37°C 在 5% CO₂ 中培养 60 分钟。通过轻敲培养瓶，从塑性表面移去树突状细胞。然后以 600×g 将树突状细胞离心 5 分钟，在 DPBS 中洗涤，并且如上面所描述的进行计数。

5 (4) 将所制备的树突状细胞放置到 96 孔圆底平板中，以 2×10^4 细胞/孔的浓度加到每孔中，每孔中有 100 微升总体积的 AIM V 培养基。

从用于制备树突状细胞的外周血细胞样品的冷冻等份中制备 CD4+T 细胞，使用由 Dynal CD4+ T 细胞富集试剂盒(Dynal CD4+ T-cell enrichment kit) (Dynal) 提供的试剂。将所得到的 CD4+细胞溶液离心，
10 在 AIMV 培养基中重悬浮，使用本技术领域已知的方法确定细胞密度。然后将 CD4+T 细胞悬浮液重悬浮至 AIM V 培养基中，计数为 2×10^6 /ml，这有助于 96 孔平板的有效操作。

实施例 2

15 α 淀粉酶中 T 细胞表位的鉴定

基于具有如下序列的地衣芽孢杆菌 α 淀粉酶 (Genbank P6278) 的序列，制备在实施例 3 中所描述的 I-MUNE®分析法中使用的肽：
mkqqkrlyar lltlfalfif llphsaaaaa nlngtlmqyf ewympndgqh wkrlqndsay
laehgitavw ippaykgtsq advgygaydl ydlgefhhqkg tvrtkygtdg elqsaikslh
20 srdinvygdv vinhkkgada tedvtavevd padrnrvsig ehrikawthf hfpgrgstys
dfkwhwyhfd gtdwdesrkl nriykfqqga wdwevsneng nydylmyadi dydhpdvaae
ikrwgtwyaw elqldgfrld avkhikfsfl rdwvnhvrek tgkemftvae ywqndlgale
nylnktnfnh svfdvplhyq fhaastqggg ydmrklinst vvskhplkav tfvdnhdtpq
gqslestvqt wfkplayafi ltresgypqv fygdmygtdg dsqreipalk hkiepilkar
25 kqyaygaqhd yfdhhdvlgw tregdssvan sglaalitdg pggakrmyvg rqnagetwhd
itgnrseppv insegwgefhh vnggsvisyv qr (SEQ ID NO:1)。

基于该 α 淀粉酶的全长氨基酸序列 (SEQ ID NO:1)，通过模拟表位法 (Mimotopes) 合成制备出一个由 157 个 15-聚体 (15mers) 组成的集合，它们以三个氨基酸为单位进行步移式变化 (off-set)，从而包
30 括了 α 淀粉酶的全部序列。

肽抗原被制备为 DMSO 中的 2 mg/ml 储液。首先，将 0.5 微升的储液放置在 96 孔平板的每一个孔中，其中在 96 孔平板上已经事先放

置了分化的树突状细胞。然后，将如上制备的 100 微升的稀释的 CD4+ T 细胞溶液加入到每一个孔中。有用的对照包括稀释的 DMSO 空白，和破伤风类毒素阳性对照。

在 20 微升总体积中，每一孔中的终浓度如下：

- 5
- 2×10⁴ CD4+

2×10⁵ 树突状细胞 (R:S 为 10:1)

5μM 肽。

实施例 3

10

使用人 T 细胞鉴定 α 淀粉酶中的肽 T 细胞表位的 I-MUNE®分析法

一旦制备了分析试剂（即，细胞、肽等等），并将其分配到 96 孔平板中，就可以进行 I-MUNE®分析法。对照包括树突状细胞加单独的 CD4+ T 细胞（含有 DMSO 载体），和破伤风类毒素（Wyeth-Ayerst），大约为 5Lf/mL。

- 15
- 在 37℃在 5%CO₂ 中将培养物温育 5 天。以 0.5 microCi/孔加入氚标记胸苷（NEN）。收获培养物，次日评价掺入情况，其中使用 Wallac TriBeta 闪烁检测系统（Wallace Oy）。

所有测试进行至少两次重复。被报告的所有测试显示出针对抗原破伤风类毒素的强阳性对照应答。在每一实验中对应答进行平均，然后根据基线应答进行标准化。如果该应答是基线应答的至少 2.95 倍，那么记录为阳性事件（即增殖性应答）。

- 20
- 计算针对制备出的来自 α 淀粉酶的肽的免疫原应答（即 T 细胞增殖），并显示在图 1 中。对于所测试的供体，针对该肽集合的应答的总背景比率是 2.80±3.70%。使用这些方法，鉴定出具有潜在价值的多个肽，包括在下面的表 1 中所示的肽。
- 25
- 表 1 在 α 淀粉酶中的感兴趣的肽
- | 肽编号 | 序列 | SEQ IN NO: |
|-------|-----------------------|------------|
| 10-12 | DSAYLAEHGITAVWIPPAYKG | 2 |
| 26 | KYGTKGELQSAIKSL | 3 |
| 42 | DRNRVISGEHLIKAW | 4 |
- 48

54	FDGTDWDESRKLNRI	5
61	AWDWEVSNENGNYDY	6
71	EIKRWGTWYANELQL	7
129	EPILKARKQYAYGAQ	8
148	RQNAGETWHDITGNR	9
157	EFHVNGGSVSIYVQR	10

应该预期到，对这些肽中或这些肽周围的氨基酸进行的修饰将提供适合用作低变应原性/免疫原性淀粉酶的变体 α -淀粉酶。

5

实施例 4

与表位肽编号的 HLA 联系

使用可通过商业途径获得的基于 PCR 的 HLA 分型试剂盒 (Bio-Synthesis)，评价在上面描述的两轮分析试验中测试的所有供体的 HLA-DR 表达和 DQ 表达。在一些实施方案中，使用自由度为 1 的卡方分析，测试对一个肽编号的应答者和无应答者的个体 HLA-DR 和 -DQ 抗原的表型频率。不管探讨中的 HLA 抗原是否均存在于应答供体和非应答供体的样品中，以及相应的表位是否被认为是一个 HLA 相关表位，对与该肽编号相对应的表位进行反应的可能性的增加或降低，均予以计算。

在表达表位相关的 HLA 等位基因的应答者和非应答者中，针对各个肽的增殖应答的程度，也可以被分析。“对肽的个体应答者(individual responder to the peptide)”是通过大于 2.95 的刺激指数来定义的。应该预期到，在表达与表位相关的 HLA 等位基因的供体中，增殖应答将高于在不表达相关的等位基因的肽应答者中的增殖应答。

从上面可以清楚地看到，本发明提供了用于鉴定在野生型淀粉酶中的 T 细胞表位的方法和组合物。一旦鉴定了抗原性表位，按照所期望的方式对表位进行修饰，被修饰的表位的肽序列被整合进野生型淀粉酶中，这样该被修饰的序列不能再发起 $CD4^+$ T 细胞应答，或者，与野生型亲本相比，其中 $CD4^+$ T 细胞应答被显著地降低。特别地，本发明提供了适合用于降低淀粉酶的免疫原性的手段，包括方法和组合物。

实施例 5

淀粉酶变体在沐浴液和其它个人护理产品中的稳定性

使用下面方法，测量多种淀粉酶变体的稳定性。

5 测量溶液稳定性的方法

在这些实验中，在至少两个研究中，测试了淀粉酶和突变体变体，其中第一个研究涉及在 45℃测试 30 分钟，第二个研究涉及在 50℃测试 30 分钟。对于这些测试，通过将去离子水与可通过商业途径获得的沐浴液（例如 Procter&Gamble 出售的沐浴液，商标名为 ZEST®）混合，
10 制备出 50/50（w/w）沐浴溶液。缓冲掺合物的 pH 为大约 6.8。

稀释将被测试的酶，这样，当使用 SAAPFpNA 测定终点（assay endpoint）法对 10μl 的酶/沐浴溶液进行测定时，酶在 50 w/w %沐浴液：去离子水溶液中的最终酶浓度使 OD₄₀₅ 从 0.5 变化为 1.0。一旦确定了稀释量，将 200μl 的稀释混合物放置到 96 孔微量滴定平板孔中。密封
15 该平板，对于第一个研究，将该平板放置在 40℃的水浴中；对于第二个研究，放置在 50℃的水浴中。在期望的时间长度（例如 30 或 45 分钟）后，从水浴中取出平板，用终点法测定 10μl 样品。保留的活性百分比按 100 乘最终活性除以初始活性来计算。

在一些实施方案中，包含由 I-MUNE®分析系统确定的特定残基的
20 变体显示出增加量的保留酶活性，因此比对照具有更广的热稳定性。例如，在 50℃，一些变体化合物具有更大的保留活性百分比，而没有稳定化残基变体的对照突变体酶和/或野生型酶具有较低的保留活性百分比。在一些实施方案中，所有的酶在 50℃在存在沐浴液的情况下，均具有增强的稳定性，但具有不同的稳定性变体的对照突变体酶-[表位
25 变体]具有更好的稳定性。

实际上，具有降低的免疫原性的本发明的变体淀粉酶在多个应用中被发现是有用的。除了去污剂和其它清洁制剂，具有降低的免疫原性的变体淀粉酶也在个人护理产品中是有用的。下面的表提供了适合在测试中使用的多种产品的组成。在这些表中，术语“次要元素”包
30 括 pH 调节剂、防腐剂、粘度调节剂和香料。在这些表中，数量代表大概的重量百分比（由生产商提供），除非特别说明，这些数量的目的不

在于表示意义非常重大的数字。

保湿沐浴产品

pH=7

原材料	数量
去离子水	QS
甘油	4.0
PEG-6 辛酸/癩酸甘油酯	4.0
棕榈仁脂肪酸	3.0
月桂醇醚-3 硫酸钠 (Sodium Laureth-3 Sulphate)	45.0
椰油单乙醇酰胺 (Cocamide MEA)	3.0
月桂基咪唑啉 (Sodium Lauroamphoacetate)	25.0
大豆油	10.0
聚季铵盐 (Polyquaternium-10) (JR30M)	0.70
淀粉酶	~1000ppm
蛋白酶	~1000ppm

沐浴产品

pH 6.5

pH7

pH8.5

原材料	数量	数量	数量
去离子水	QS	QS	QS
月桂醇醚硫酸钠	12	15	8
椰油酰胺丙基甜菜碱	8	10	15
APG 葡糖苷 (Plantacare 2000 ¹)	0	2	1
聚季铵盐-10 (JR30M)	0.25	0	0
聚季铵盐-7 (Mackam 55)	0	0	0.7
蛋白酶	~250ppm	~500ppm	~1000ppm
淀粉酶	~250ppm	~500ppm	~1000ppm

1-Cognis

润肤乳液

pH7

pH7

pH7.5

pH7

原材料	数量	数量	数量	数量
去离子水	QS	QS	QS	QS

甘油	8	8	10	12
异十六烷	3	3	3	6
烟酰胺	0	3	5	6
异丙基异硬脂酸酯	3	3	3	3
聚丙烯酰胺, 异链烷烃, Laureth-7 (Sepigel 305 ²)	3	3	3	3
矿脂	4	4	4	2
尼龙 12	2	2	2.5	2.5
二甲聚硅氧烷 (DC1403 ⁴)	2	2	2.5	2.5
蔗糖聚棉籽油	1.5	1.5	1.5	1.5
硬脂醇 97%	1	1	1	1
D 泛酰醇	1	1	1	1
DL- α 生育酚醋酸酯	1	1	1	1
十六醇 95%	0.5	0.5	0.5	1
BEHYNYL ALCOHOL	1	1	1	0.5
EMULGADE PL 68/50	0.4	0.4	0.5	0.5
硬脂酸	0.15	0.15	0.15	0.15
Peg-100-硬脂酸酯 (MYRJ59 ¹)	0.15	0.15	0.15	0.15
淀粉酶	~ 50ppm	~ 50ppm	~ 250ppm	~ 1000ppm
蛋白酶	~ 50ppm	~ 50ppm	~ 250ppm	~ 1000ppm

1- Uniqema

2- Seppic

4- Dow Corning

高效保湿面霜/乳液

pH7

pH7

原材料	数量	数量
去离子水	QS	QS
甘油	12	5
PEG 400 ⁶	0	10
烟酰胺	5	7

异十六烷	5	5
二甲聚硅氧烷 (DC1403 ³)	3	2
聚丙烯酰胺, 异链烷烃, Laureth-7 (Sepigel 305 ¹)	3	3
异丙基异硬脂酸酯	2	2
聚甲基倍半硅氧烷 (Polymethylsilsesquioxane)	2	2
十六醇 95%	1	1
蔗糖聚棉籽油	1	1
D 泛酰醇	1	1
维生素 E (生育酚醋酸酯)	1	1
硬脂醇 95%	0.5	0.5
鲸蜡糖苷 (Cetearyl Glucoside)	0.5	0.5
二氧化钛	0.3	0.3
硬脂酸	0.15	0.15
PEG-100-硬脂酸酯 (Myrj 59 ⁴)	0.15	0.15
淀粉酶	~500ppm	~500ppm
蛋白酶	~500ppm	~500ppm

1- Seppic

3- Dow Corning

4- Uniqema

5- Scher Chemicals

5 6- Dow Chemicals

保湿面霜	pH7	pH7	pH7.5
原材料	数量	数量	数量
去离子水	QS	QS	QS
甘油	3	5	10
矿脂	3	3	0
十六醇 95%	1.5	1.5	1
二甲聚硅氧烷共聚多元醇	2	2	2

(DC 3225C ⁴)			
异丙基棕榈酸酯	1	1	0.5
卡波姆 (Carbomer) 954 ²	0.7	0.7	0.7
二甲聚硅氧烷 (DC 200/350cs ⁴)	1	1	1
硬脂醇 97%	0.5	0.5	1
硬脂酸	0.1	0.1	0.1
Peg-100-硬脂酸酯 (MYRJ59 ¹)	0.1	0.1	0.1
二氧化钛	0.3	0.3	0.3
淀粉酶	~50ppm	~250ppm	~1000ppm
蛋白酶	~50ppm	~250ppm	~1000ppm

- 1- Uniqema
- 2- BF Goodrich
- 4- Dow Chemicals

5

实施例 6

洗涤组合物

除了上面描述的组合物，本发明提供了开发具有特定特性的洗涤组合物的方法。实际上，本发明提供了包含修饰的淀粉酶的多种洗涤组合物。在特别优选的实施方案中，上面描述的有效量的一种或多种淀粉酶被包含在用于清洗各种需要去除蛋白质类污点的表面的组合物中。这样的洗涤组合物包括用于清洗硬表面的去污剂组合物；用于清洗织物的去污剂组合物；洗碟用组合物；口腔清洗组合物；和牙清洗组合物。这些组合物可以以适合于特定目的用途的任何形式提供。优选地，本发明的洗涤组合物包含大约 0.0001%到大约 10%的一种或多种淀粉酶，更优选地从大约 0.001%到大约 1%，更优选地从大约 0.001%到大约 0.1%。下面进一步详细地讨论了在其中淀粉酶被使用的各种洗涤组合物的几个实例。除非特别说明，此处所用的所有份额、百分比和比率都以重量计算。

20

A. 用于硬表面、碟子和织物的洗涤组合物

本发明的淀粉酶（例如变体淀粉酶），在期望去除多泡沫和/或高度

不溶性基质的任何去污剂组合物中是有用的。因此，本发明的淀粉酶可以与各种传统的成分一起使用，以便提供配制的硬表面清洁剂、洗碟用组合物、织物洗涤组合物和类似物。这些组合物适合以对特定的应用来说可接受的任何形式使用（例如液体、颗粒、条状等等）。此外，
5 这些组合物也适合在可通过商业途径获得的“浓缩”洗涤剂中使用，所述的“浓缩”洗涤剂含有重量百分比高达 30%-60%的表面活性剂。

在一些实施方案中，洗涤组合物含有各种阴离子、非离子、两性离子等等的表面活性剂。这样的表面活性剂通常以组合物的大约 0.1% 到大约 60%的水平存在，优选地从大约 1%到大约 35%。合适的表面活性剂包括，但不限于传统的 C_{11} - C_{18} 烷基苯磺酸盐和伯烷基硫酸盐和无规的烷基硫酸盐、分子式为 $CH_3(CH_2)_x(CHOSO_3^{sup.-M.sup.+})CH_3$ 和 $CH_3(CH_2)_y(CHOSO_3^{sup.-M.sup.+})CH_2CH_3$ 的 C_{10} - C_{18} 仲(2,3)烷基硫酸盐，其中 x 和 $(y+1)$ 是至少大约 7 的整数，优选地至少大约 9， M 是水溶性阳离子，尤其是钠、 C_{10} - C_{18} 烷基烷氧基硫酸盐（尤其是 EO 1-7 乙氧基硫酸盐）、 C_{10} - C_{18} 烷基烷氧基羧酸盐（尤其是 EO 1-7 乙氧基羧酸盐）、 C_{10} - C_{18} 烷基聚葡萄糖苷，和它们相应的硫酸化聚葡萄糖苷、 C_{12} - C_{18} α -磺化脂肪酸酯、 C_{12} - C_{18} 烷基和烷基酚烷氧基化物（尤其是乙氧基化物和混合的乙氧基/丙氧基）、 C_{12} - C_{18} 甜菜碱和磺基甜菜碱（“sultaines”）、 C_{10} - C_{18} 胺氧化物、 C_8 - C_{24} 肌氨酸盐（尤其是油酰肌氨酸盐），以及类似物。
15 烷基烷氧基硫酸盐（AES）和烷基烷氧基羧酸盐（AEC）在此处是优选的。进一步，这样的表面活性剂与前面所述的胺氧化物和/或甜菜碱或磺基甜菜碱组合使用也是优选的，这取决于设计者的期望。其它传统的有用的表面活性剂在本技术领域是已知的，包括但不限于，特别有用的表面活性剂，如 C_{10} - C_{18} N 甲基葡萄糖胺（例如参见美国专利
20 5,194,639）。

在一些实施方案中，本发明的组合物包括非离子表面活性剂类别中的成员，其是具有疏水部分的环氧乙烷缩合物，可以提供平均亲水亲脂平衡值（HLB）的范围在 5-17 之间，优选地 6 到 14，更优选地 7 到 12 的表面活性剂。疏水（亲脂）部分本质上可以是脂肪族或芳族，
30 与任何特定的疏水基团发生缩合的聚环氧乙烷基团的长度可以容易地调节，以得到在亲水和疏水元素之间具有期望的平衡程度的水溶性化

合物。特别优选的是 C₉-C₁₅ 伯醇乙氧基化物(或混合的乙氧基/丙氧基), 每摩尔醇含有 3-8 摩尔环氧乙烷, 尤其是 C₁₄-C₁₅ 伯醇, 每摩尔醇含有 6-8 摩尔环氧乙烷; C₁₂-C₁₅ 伯醇, 每摩尔醇含有 35 摩尔环氧乙烷; 及其混合物。

- 5 在去污剂洗涤组合物中, 有用的多种其它成分可以用于此处的组合物中, 包括其它的活性成分、载体、水溶助剂、加工助剂、染料或颜料、用于液体制剂的溶剂, 等等。为了额外地增加泡沫, 可以将增泡剂如 C₁₀-C₁₆ 烷基氧化胺加入到组合物中, 通常以大约 1% 到大约 10% 的水平加入。C₁₀-C₁₄ 单乙醇和二乙醇酰胺, 是这样的增泡剂的一种典型类别的例证。使用带有多泡沫性表面活性剂辅剂如上面提到的氧化胺、甜菜碱和磺基甜菜碱的这样的增泡剂也是有利的。如果希望的话, 可以加入可溶性镁盐如 MgCl₂、MgSO₄ 以及类似物, 通常以大约 0.1% 到大约 2% 的水平加入, 以提供更多的泡沫。
- 10

- 此处的液体洗涤组合物通常含有水和其它溶剂作为载体。低分子量伯醇或仲醇(例如甲醇、乙醇、丙醇和异丙醇)是合适的。一元醇是优选的致溶表面活性剂, 但多元醇如那些含有大约 2 到大约 6 个碳原子和大约 2 到大约 6 个羟基基团(例如 1,3-丙二醇、乙二醇、丙三醇和 1,2-丙二醇)的多元醇在本发明的洗涤剂中也是有用的。在一些实施方案中, 组合物含有大约 90%, 或大约 10% 到大约 50% 的这样的载体。
- 15

- 20 此处的洗涤剂组合物优选被这样配制, 即, 在含水的洗涤操作中被使用的期间, 洗涤水的 pH 在大约 6.8 到大约 11.0 之间。因此, 最终产品通常按该范围来配制。将 pH 控制在推荐的使用水平的技术包括应用缓冲液、碱、酸等等, 这些技术对本领域的普通技术人员是已知的。

- 当配制本发明的硬表面洗涤组合物和织物洗涤组合物时, 配制者可以期望应用多种增洁剂, 其被应用的水平从重量百分比为大约 5% 到大约 50%。典型的增洁剂包括 1-10 微米沸石、聚羧酸酯如柠檬酸酯和含氧二琥珀酸酯(oxydisuccinates)、分层(layered)硅酸酯、磷酸酯以及类似物。其它的传统增洁剂对本领域的技术人员是已知的, 它们适于被纳入本发明的组合物中。
- 25

- 30 类似地, 配制者可以期望在这样的组合物中使用各种其它的酶, 如纤维素酶、脂肪酶、淀粉酶、过氧化物酶和蛋白酶, 以重量计, 通

常是在大约 0.001%到大约 1%的水平使用。各种具有清洁效力和织物护理作用的酶在洗衣洗涤剂领域是熟知的，它们适于被包含在本发明的组合物中。

各种漂白化合物，如过碳酸盐、过硼酸盐以及类似物，也可以在本发明的组合物中使用。这些漂白化合物通常以重量百分比从大约 1%到大约 15%的水平存在。如果希望的话，这样的组合物也可以含有漂白活化剂，如四乙酰基乙二胺、壬酰基羟苯磺酸盐以及类似物，它们在本技术领域也是已知的。这些化合物的使用水平通常在重量百分比为大约 1%到大约 10%的范围内。

各种污垢释放剂，尤其是阴离子低聚酯类型的污垢释放剂；各种螯合剂，尤其是氨基膦酸酯和乙二胺二琥珀酸酯；各种粘土去除剂，尤其是乙氧基化四亚乙基五胺；各种分散剂，尤其是聚丙烯酸酯和聚天冬氨酸酯；各种增白剂，尤其是阴离子增白剂；各种染料转移抑制剂，如聚乙烯吡咯烷酮；各种抑泡剂，尤其是有机硅和仲醇；各种织物软化剂，尤其是绿土黏土和黏土絮凝聚合物（例如聚(氧乙烯)）；以及类似物都在本发明的组合物中 useful，最典型地，以重量百分比计，它们在从大约 1%到大约 35%的范围内使用。

酶稳定剂也在本发明的洗涤组合物中 useful。这样的酶稳定剂包括，但不限于丙二醇（优选地从大约 1%到大约 10%），甲酸钠（优选地从 0.1%到大约 1%）和甲酸钙（优选地从 0.1%到大约 1%）。

1. 硬表面洗涤组合物

在优选的实施方案中，本发明的硬表面洗涤组合物包括有效量的一种或多种淀粉酶（例如变体淀粉酶），优选地重量百分比为大约 0.0001%到大约 10%，更优选地从大约 0.001%到大约 5%，更优选地从大约 0.001%到大约 1%，以组合物中的活性淀粉酶的重量计算。除了包含一种或多种淀粉酶，这样的硬表面洗涤组合物通常包含至少一种淀粉酶、至少一种蛋白酶、一种表面活性剂和一种水溶性螯合增洁剂。然而，在某些特定的产品如喷雾式窗清洁剂中，有时不使用表面活性剂，这是由于它们可能在玻璃表面上产生薄膜/条纹残留物。

表面活性剂组分，当存在时，可少至占此处所述组合物的 0.1%，

但通常地，这些组合物将含有大约 0.25%到大约 10%，更优选地大约 1%到大约 5%的表面活性剂。

通常地，这些组合物将含有大约 0.5%到大约 50%的去污增洁剂，优选地从大约 1%到大约 10%。优选地，pH 应该在大约 8 到 12 的范围内。如果需要调节 pH，可以使用传统的 pH 调节剂如氢氧化钠、碳酸钠或盐酸。

在一些实施方案中，至少一种溶剂被包括在这些组合物中。有用的溶剂包括但不限于，二醇醚如二乙二醇单己基醚、二乙二醇单丁基醚、乙二醇一丁醚、乙二醇一己醚、丙二醇一丁醚、二丙二醇一丁醚，和二醇如 2,2,4-三甲基-1,3-戊二醇和 2-乙基-1,3-己二醇。当使用时，这样的溶剂通常以大约 0.5%到大约 15%的水平存在，优选地从大约 3%到大约 11%。

此外，当组合物以“完全的强度（full strength）”应用到表面后，表面没有被清洗时，为了促进组合物从表面上更快的挥发，在本发明的组合物中可以使用高挥发性溶剂如异丙醇或乙醇。当使用时，挥发性溶剂在组合物中通常以从大约 2%到大约 12%的水平存在。

下面的非限定性实例对本发明的硬表面洗涤组合物实施方案进行了例证性说明。在下面的实例中，实例中的标记“淀粉酶#”是指在本发明的组合物中有用的变体，组合物中具有降低的免疫原应答的淀粉酶变体的百分比为 0.10、0.20、0.10、0.05、0.03 和 0.02。

液体硬表面洗涤组合物						
组分	实例序号					
	1	2	3	4	5	6
EDTA**			2.90	2.90		
柠檬酸钠					2.90	2.90
NaC ₁₂ 烷基苯	1.95		1.95		1.95	
NaC ₁₂ 烷基硫酸盐		2.20		2.20		2.20
NaC ₁₂ (乙氧基)***		2.20		2.20		2.20
C ₁₂ 二甲基胺		0.50		0.50		0.50
异丙基苯磺酸钠	1.30		1.30		1.30	
己基卡必醇***	6.30	6.30	6.30	6.30	6.30	6.30

水****	平衡到 100%
-------	----------

** Na₄ 乙二胺二乙酸

*** 二乙二醇一己基醚

**** 所有配方调节到 pH 7。

在上述实例的一些实施方案中，在本发明中有用的其它淀粉酶（例如变体淀粉酶）作为替代而具有基本上相似的效果。此外，在上述实例的一些实施方案中，在本发明中有用的具有降低的免疫原性的淀粉酶（例如变体淀粉酶）的任意组合，作为替代并具有基本上相似的效果。

下表提供了适于清洗硬表面和除霉的组合物样本。这些产品组合物通常的 pH 为大约 7。

清洗硬表面和去除家居霉物的喷雾组合物						
组分	实例序号					
	7	8	9	10	11	12
淀粉酶#	0.20	0.05	0.10	0.30	0.20	0.30
淀粉酶#+14					0.30	0.10
蛋白酶#	0.20	0.05	0.10	0.30	0.20	0.30
蛋白酶#+14					0.30	0.10
辛基硫酸钠	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
十二烷基硫酸钠	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
NaOH	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80
硅酸盐 (Na)	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
香料	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35
水	平衡到 100%					

在这些实施例中，在本发明中有用的淀粉酶（例如变体淀粉酶）的任何组合作为替代并具有基本上类似的结果。

2. 洗碟用组合物

在本发明的其它实施方案中，提供了包含一种或多种淀粉酶（例如变体淀粉酶）的洗碟用组合物。下面例证性地说明了本发明优选的洗碟用组合物实施方案。淀粉酶以 0.5、0.4、0.1、0.05、0.03 和 0.02

的百分比包含在内，产品的 pH 被调节到 7。

洗碟用组合物						
组分	实例序号					
	13	14	15	16	17	18
C ₁₂ -C ₁₄ N-甲基-	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90
C ₁₂ 乙氧基(1)硫酸盐	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0
2-甲基十一烷酸	4.50	4.50		4.50	4.50	
C ₁₂ 乙氧基(2)羧酸盐	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50
C ₁₂ 醇乙氧基化物(4)	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
C ₁₂ 胺氧化物	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
异丙基苯磺酸钠	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
乙醇	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
Mg Supp ⁺⁺ (MgCl ₂)	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Ca Supp ⁺⁺ (CaCl ₂)	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40
水	平衡到 100%					

在上面刚刚描述的实例的一些实施方案中，在本发明中有用的淀粉酶（例如变体淀粉酶）在上述制剂中作为替代并具有基本上类似的效果。进一步，在刚刚描述的实施例的一些实施方案中，其它的在本发明中有用的淀粉酶（例如变体淀粉酶）的任意组合，在上述制剂中作为替代，并具有基本上类似的效果。

颗粒状自动洗碟用组合物			
组分	实例		
	A	B	C
柠檬酸	15.0		
柠檬酸盐	4.0	29.0	15.0
丙烯酸酯/甲基丙烯酸酯共聚物	6.0		6.0
丙烯酸顺丁烯二酸共聚物		3.7	
干燥加入的碳酸盐	9.0		20.0
碱金属硅酸盐	8.5	17.0	9.0
石蜡		0.5	

苯并三唑		0.3	
Termamyl 60T	1.5	1.5	1.0
淀粉酶#4	1.6	1.6	1.6
蛋白酶#4 (4.6%金属颗粒)	1.6	1.6	1.6
过碳酸盐 (AvO)	1.5		
一水合过硼酸盐		0.3	1.5
四水合过硼酸盐		0.9	
四乙酰基乙二胺	3.8	4.4	
二亚乙基三胺五甲基磷酸 (镁盐)	0.13	0.13	0.13
烷基乙氧基硫酸盐-3x 乙氧基化	3.0		
烷基乙氧基丙氧基非离子表面活性剂			
抑泡剂	2.0		
Olin SLF18 非离子表面活性剂			
硫酸盐			

在上面刚刚描述的配方中，在本发明中有用的具有降低的免疫原性的淀粉酶（例如，一种变体淀粉酶）可替代，具有基本上相似的效果。同样在上面刚刚描述的配方中，在本发明中有用的淀粉酶的任何组合（例如，多种变体淀粉酶）可替代，具有基本上相似的效果。

5

3. 织物洗涤组合物

本发明进一步提供了包含一种或多种淀粉酶（例如变体淀粉酶）的织物洗涤组合物。

10

a. 颗粒织物洗涤

15

本发明的颗粒状织物洗涤组合物含有有效量的一种或多种淀粉酶（例如变体淀粉酶），优选地为重量百分比从大约 0.001% 到大约 10%，更优选地从大约 0.005% 到大约 5%，更优选地从大约 0.01% 到大约 1%，以组合物中的活性淀粉酶重量计算。除了一种或多种淀粉酶，颗粒织物洗涤组合物通常包括至少一种表面活性剂、一种或多种增洁剂，在一些情况下，还包括漂白剂。下面的实例对本发明的颗粒状织物洗涤组合物实施方案进行了例证性说明。

粒状织物洗涤组合物				
组分	实例序号			
	20	21	22	23
淀粉酶	0.10	0.20	0.03	0.05
淀粉酶			0.02	0.05
蛋白酶（4%金属颗粒（4% Prill））	0.10	0.20	0.03	0.05
蛋白酶（4%金属颗粒）			0.02	0.05
C ₁₃ 线性烷基苯磺酸盐	22.0	22.0	22.0	22.0
磷酸盐（三聚磷酸钠）	23.0	23.0	23.0	23.0
碳酸钠	23.0	23.0	23.0	23.0
硅酸钠	12.0	14.0	14.0	14.0
沸石	8.20	8.20	8.20	8.20
螯合掩蔽剂（二亚乙基三胺五乙酸）	0.40	0.40	0.40	0.40
硫酸钠	5.50	5.50	5.50	5.50
水	平衡到 100%			

在上面刚刚描述的配方中，在本发明中有用的具有降低的免疫原性的淀粉酶（例如变体淀粉酶）可作为替代并具有基本上相似的效果。同样在上面刚刚描述的配方中，在本发明中有用的淀粉酶（例如变体淀粉酶）的任何组合可作为替代并具有基本上相似的效果。

粒状织物清洗组合物				
组分	实例序号			
	24	25	26	27
淀粉酶#	0.10	0.20	0.03	0.05
淀粉酶#+1			0.02	0.05
蛋白酶#（4%金属颗粒）	0.10	0.20	0.03	0.05
蛋白酶#+1（4%金属颗粒）			0.02	0.05
C ₁₂ 烷基苯磺酸盐	12.0	12.0	12.0	12.0
沸石 A（1-10μm）	26.0	26.0	26.0	26.0
2-丁基辛酸	4.0	4.0	4.0	4.0
C ₁₂ -C ₁₄ 仲(2,3)	5.0	5.0	5.0	5.0

柠檬酸钠	5.0	5.0	5.0	5.0
光学增白剂	0.10	0.10	0.10	0.10
硫酸钠	17.0	17.0	17.0	17.0
填料, 水, 次要元素	平衡到 100%			

在上面刚刚描述的配方中, 在本发明中有用的具有降低的免疫原性的淀粉酶(例如变体淀粉酶)可作为替代并具有基本上相似的结果。同样在上面刚刚描述的配方中, 在本发明中有用的淀粉酶(例如变体淀粉酶)的任何组合可作为替代并具有基本上相似的结果。

粒状织物洗涤组合物		
组分	实例序号	
	28	29
线性烷基苯磺酸盐	11.4	10.7
牛油烷基硫酸盐	1.8	2.4
C ₁₄₋₁₅ 烷基硫酸盐	3.0	3.10
C ₁₄₋₁₅ 醇 7 次乙氧基化物	4.0	4.0
牛油醇 11 次乙氧基化物	1.8	1.8
分散剂	0.07	0.1
有机硅聚合物液体	0.80	0.80
柠檬酸三钠	14.0	15.0
柠檬酸	3.0	2.5
沸石	32.5	32.1
顺丁烯二酸丙烯酸共聚物	5.0	5.9
二亚乙基五亚甲基三胺	1.0	0.20
蛋白酶# (4%金属颗粒)	0.30	0.30
脂肪酶	0.36	0.40
淀粉酶	0.30	0.30
硅酸钠	2.0	2.5
硫酸钠	3.5	5.2
聚乙烯吡咯烷酮	0.3	0.5
过硼酸盐	0.5	1

苯酚磺酸盐	0.1	0.2
过氧化物酶	0.1	0.1
次要元素	加到 100	

粒状织物洗涤组合物

组分	实例序号	
	30	31
线性 C ₁₂ 烷基苯磺酸钠	6.5	8.0
硫酸钠	15.0	18.0
沸石	26.0	22.0
次氨基三乙酸钠	5.0	5.0
聚乙烯吡咯烷酮	0.5	0.7
四乙酰基乙二胺	3.0	3.0
硼酸	4.0	
过硼酸盐	0.5	1
苯酚磺酸盐	0.1	0.2
蛋白酶# (4%金属颗粒)	0.4	0.4
淀粉酶#4	0.4	0.4
填料 (例如硅酸盐、碳酸盐、香料)	加到 100	

- 在其它实施方案中, 提供了致密的粒状织物洗涤组合物, 如下面
- 5 提供的组合物。成分以重量百分比计算。组合物 1: 烷基硫酸盐 (8.0)、烷基乙氧基硫酸盐 (2.0)、C25 和 C45 醇 3 和 7 次乙氧基化物的混合物 (6.0)、聚羟基脂肪酸酰胺 (2.5)、沸石 (17.0)、分层硅酸盐/柠檬酸盐 (16.0)、碳酸盐 (7.0)、顺丁烯二酸丙烯酸共聚物 (5.0)、污垢释放聚合物 (0.4)、羧甲基纤维素 (0.4)、聚(4-乙烯基嘧啶)-N-氧化物 (0.1)、
- 10 乙烯基咪唑和乙烯基吡咯烷酮的共聚物 (0.1)、PEG-2000 (0.2)、淀粉酶# (0.5)、蛋白酶 (4%金属颗粒) (0.5)、脂肪酶 (0.2)、纤维素酶 (0.2)、四乙酰基乙二胺 (6.0)、过碳酸盐 (22.0)、乙二胺二琥珀酸 (0.3)、抑泡剂 (3.5)、4,4'-双(2-吗啉基-4-苯胺基-s-三嗪-6-基氨基)芪-2,2'-二磺酸二钠 (0.25)、4,4'-双(2-sulfostyryl)二苯基二钠 (0.05)、以及水、香料

和次要元素的组合（加到 100）。

在可以选择的粒状织物洗涤组合物中，提供了下述成分。成分以重量百分比提供。组合物 2：线性烷基苯磺酸盐（7.6）、C₁₆-C₁₈ 烷基硫酸盐（1.3）、C₁₄₋₁₅ 醇 7 次乙氧基化（4.0）、椰油-烷基-二甲基羟乙基氯化铵（1.4）、分散剂（0.07）、聚硅氧烷流体（0.8）、柠檬酸三钠（5.0）、沸石 4A（15.0）、顺丁烯二酸丙烯酸共聚物（4.0）、二亚乙基三胺五亚甲基磷酸（0.4）、过硼酸盐（15.0）、四乙酰基乙二胺（5.0）、绿土黏土（10.0）、聚(氧乙烯)（MW 300,000）（0.3）、淀粉酶#、淀粉酶#（0.4）、蛋白酶（4%金属颗粒）（0.4）、脂肪酶（0.2）、淀粉酶（0.3）、纤维素酶（0.2）、硅酸钠（3.0）、碳酸钠（10.0）、羧甲基纤维素（0.2）、增白剂（0.2）、和水、香料和次要元素的混合物（加到 100）。

在可以选择的粒状织物洗涤组合物中，提供了下述成分。成分以重量百分比提供。组合物 2：线性烷基苯（6.92）、牛油烷基硫酸盐（2.05）、C₁₄₋₁₅ 醇 7 次乙氧基化（4.4）、C₁₂₋₁₅ 烷基乙氧基硫酸盐-3 次乙氧基化（0.16）、沸石（20.2）、柠檬酸盐（5.5）、碳酸盐（15.4）、硅酸盐（3.0）、顺丁烯二酸丙烯酸共聚物（4.0）、羧甲基纤维素酶（0.31）、污垢释放聚合物（0.30）、淀粉酶#、蛋白酶#（4%金属颗粒）（0.2）、脂肪酶（0.36）、纤维素酶（0.13）、四水合过硼酸盐（11.64）、一水合过硼酸盐（8.7）、四乙酰基乙二胺（5.0）、二亚乙基三胺五亚甲基磷酸（0.38）、硫酸镁（0.40）、增白剂（0.19），香料、聚硅氧烷和抑泡剂的混合物（0.85）、和次要元素（加到 100）。

在上面刚刚描述的配方中，在本发明中有用的降低的免疫原性的淀粉酶（例如变体淀粉酶）可作替代，具有基本上相似的结果。同样在上面刚刚描述的配方中，在本发明中有用的淀粉酶（例如变体淀粉酶）的任何组合可作替代，具有基本上相似的结果。

b. 液体织物洗涤组合物

本发明的液体织物洗涤组合物包含有效量的一种或多种淀粉酶（例如变体淀粉酶），优选地重量百分比为大约 0.0001%到大约 10%，更优选地大约 0.001%到大约 1%，最优选地从大约 0.001%到大约 0.1%，以组合物中的活性淀粉酶重量计算。这样的液体织物洗涤组合物，通

常额外地包含一种阴离子表面活性剂、脂肪酸、水溶性去污增洁剂和水。下面的实例例证性地说明了本发明的液体织物洗涤组合物实施方案。

液体织物洗涤组合物					
组分	实例序号				
	35	36	37	38	39
淀粉酶#	0.05	0.03	0.30	0.03	0.10
淀粉酶#+1				0.01	0.20
蛋白酶#	0.05	0.03	0.30	0.03	0.10
蛋白酶#+1				0.01	0.20
C ₁₂ -C ₁₄ 烷基硫酸盐, Na	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
2-丁基辛酸	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
柠檬酸钠	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
C ₁₀ 醇乙氧基化物(3)	13.0	13.0	13.0	13.0	13.0
一乙醇胺	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
水/丙二醇/乙醇	平衡到 100% (100:1:1)				

- 在上面刚刚描述的配方中，在本发明中有用的具有降低的免疫原性淀粉酶（例如变体淀粉酶）可作替代，具有基本上相似的结果。同样在上面刚刚描述的配方中，在本发明中有用的淀粉酶（例如变体淀粉酶）的任何组合可作替代，具有基本上相似的结果。

液体织物洗涤组合物		
组分	实例序号	
	40	41
C ₁₂₋₁₄ 烷基琥珀酸	3.0	8.0
一水合柠檬酸	10.0	15.0
C ₁₂₋₁₅ 烷基硫酸钠	8.0	8.0
C ₁₂₋₁₅ 醇 2 次乙氧基化硫酸钠		3.0
C ₁₂₋₁₅ 醇 7 次乙氧基化		8.0
C ₁₂₋₁₅ 醇 5 次乙氧基化	8.0	
二亚乙基三胺五(亚甲基膦酸)	0.2	

油酸	1.8	
乙醇	4.0	4.0
丙二醇	2.0	2.0
淀粉酶#	0.2	0.2
聚乙烯吡咯烷酮	1.0	2.0
抑泡剂	0.15	0.15
NaOH	加至 pH 7.5	
过硼酸盐	0.5	1.0
苯酚磺酸盐	0.1	0.2
过氧化物酶	0.4	0.1
水和次要元素	加到 100	

在上面刚刚描述的配方中，在本发明中有用的具有降低的免疫原性的淀粉酶（例如变体淀粉酶）可作替代，具有基本上相似的效果。同样在上面刚刚描述的配方中，在本发明中有用的淀粉酶（例如变体淀粉酶）的任何组合可作替代，具有基本上相似的效果。

5

c. 条状织物洗涤组合物

适合用于手洗弄脏的织物的本发明的条状织物洗涤组合物含有有效量的一种或多种淀粉酶（例如变体淀粉酶），优选地，在组合物中的重量百分比为大约 0.001% 到大约 10%，更优选地从大约 0.01% 到大约 1%。下面的实例例证性地说明了本发明的条状织物洗涤组合物实施方案。

10

条状织物洗涤组合物				
组分	实例序号			
	42	43	44	45
蛋白酶#	0.3		0.1	0.02
蛋白酶#+1			0.4	0.03
淀粉酶#	0.3		0.1	0.02
淀粉酶#+1			0.4	0.03
C ₁₂ -C ₁₆ 烷基硫酸盐，钠	20.0	20.0	20.0	20.0

C ₁₂ -C ₁₄ -N-甲基葡糖胺	5.0	5.0	5.0	5.0
C ₁₁ -C ₁₃ 烷基苯磺酸盐, 钠	10.0	10.0	10.0	10.0
碳酸钠	25.0	25.0	25.0	25.0
焦磷酸钠	7.0	7.0	7.0	7.0
三聚磷酸钠	7.0	7.0	7.0	7.0
沸石 A (0.1-10 μ m)	5.0	5.0	5.0	5.0
羧甲基纤维素	0.2	0.2	0.2	0.2
聚丙烯酸酯 (MW 1400)	0.2	0.2	0.2	0.2
椰子-乙醇胺	5.0	5.0	5.0	5.0
增白剂, 香料	0.2	0.2	0.2	0.2
CaSO ₄	1.0	1.0	1.0	1.0
MgSO ₄	1.0	1.0	1.0	1.0
水	4.0	4.0	4.0	4.0
填料 (例如 CaCO ₃ , 滑石, 粘土, 硅酸盐等等)	平衡到 100%			

在上面刚刚描述的配方中, 在本发明中有用的具有降低的免疫原性的淀粉酶 (例如变体淀粉酶) 可作替代, 具有基本上相似的效果。同样在上面刚刚描述的配方中, 在本发明中有用的淀粉酶 (例如变体淀粉酶) 的任何组合可作替代并具有基本上相似的效果。

5

B. 其它的清洗组合物

除了上面讨论的硬表面洗涤、洗碟用和织物洗涤组合物, 一种或多种淀粉酶 (例如变体淀粉酶) 可用作多种其它的洗涤组合物的组分, 其中, 不溶性底物的水解是被期望的。这样的其它的洗涤组合物包括
10 但不限于口腔清洗组合物、牙清洗组合物和隐形眼镜清洗组合物, 以及其它的个人护理清洗组合物。

1. 口腔清洗组合物

在本发明的其它实施方案中, 在用于去除牙齿或假牙上的蛋白质
15 污物的组合物中, 包含了药物学上可接受量的一种或多种淀粉酶 (例如变体淀粉酶)。优选地, 本发明的口腔清洗组合物包含占组合物重量

的大约 0.0001%到大约 20%的一种或多种淀粉酶，更优选地为大约 0.001%到大约 10%，更优选地为大约 0.01%到大约 5%，和一种药物学上可接受的载体。典型地，在口腔清洗组合物的口腔清洗组分中，药物学上可接受的口腔清洗载体组分通常将占从组合物重量的大约 50% 5 到大约 99.99%，更优选地为大约 65%到大约 99.99%，更优选地为大约 65%到大约 99%。

可以包含在本发明的口腔清洗组合物中的药物学上可接受的载体组分和任选组分，对本领域的普通技术人员是已知的。在口腔清洗组合物中有用的各种组合物类型、载体组分和任选组分，公开在美国专利 10 5,096,700；美国专利 5,028,414；和美国专利 5,028,415 中，将这些专利的全部内容引用于此作为参考。下面的实例例证性地说明了本发明的口腔清洗组合物实施方案。

口腔清洗组合物				
组分	实例序号			
	46	47	48	49
淀粉酶#	2.0	3.5	1.5	2.0
蛋白酶	2.0	3.5	1.5	2.0
山梨糖醇（70%水溶液）	35.0	35.0	35.0	35.0
PEG-6*	1.0	1.0	1.0	1.0
硅石牙齿摩擦料**	20.0	20.0	20.0	20.0
氟化钠	0.243	0.243	0.243	0.243
氧化钛	0.5	0.5	0.5	0.5
糖精钠	0.286	0.286	0.286	0.286
烷基硫酸钠（27.9%）	4.0	4.0	4.0	4.0
香料	1.04	1.04	1.04	1.04
羧乙烯基聚合物***	0.30	0.30	0.30	0.30
角叉菜胶****	0.8	0.8	0.8	0.8
水	平衡到 100%			

* PEG-6 -- 聚乙二醇，MW 为 600

**沉淀硅石，鉴定为 Zeodent 119 (J.M. Huber)

15 ***卡巴普 (Carbopol) (B.F. Goodrich Chemical Co.)

******Iota Carrageenan (Hercules Chemical Co.)**

- 在上面刚刚描述的配方中，在本发明中有用的具有降低的免疫原性的淀粉酶（例如变体淀粉酶）可作替代并具有基本相似的效果。同样在上面刚刚描述的配方中，在本发明中有用的淀粉酶（例如变体淀粉酶）的任何组合可作替代，具有基本相似的效果。
- 5

漱口用组合物				
组分	实例序号			
	50	51	52	53
淀粉酶#	3.0	7.5	1.0	5.0
蛋白酶#	3.0	7.5	1.0	5.0
SDA 40 醇	8.0	8.0	8.0	8.0
香料	0.08	0.08	0.08	0.08
乳化剂	0.08	0.08	0.08	0.08
氟化钠	0.05	0.05	0.05	0.05
甘油	10.0	10.0	10.0	10.0
甜料	0.02	0.02	0.02	0.02
苯甲酸	0.05	0.05	0.05	0.05
NaOH	0.20	0.20	0.20	0.20
染料	0.04	0.04	0.04	0.04
水	平衡到 100%			

在上面刚刚描述的配方中，在本发明中有用的免疫原性降低的淀粉酶（例如变体淀粉酶）可作替代，具有基本上相似的效果。同样在上面刚刚描述的配方中，在本发明中有用的淀粉酶（例如变体淀粉酶）的任何组合可作替代，具有基本上相似的效果。

糖块组合物				
组分	实例序号			
	54	55	56	57
淀粉酶#	0.01	0.03	0.01	0.02
蛋白酶#	0.01	0.03	0.01	0.02
山梨糖醇	17.50	17.50	17.50	17.50
甘露醇	17.50	17.50	17.50	17.50

淀粉	13.60	13.60	13.60	13.60
甜料	1.20	1.20	1.20	1.20
香料	11.7	11.7	11.7	11.7
色素	0.10	0.10	0.10	0.10
玉米糖浆	平衡到 100%			

在上面刚刚描述的配方中，在本发明中有用的免疫原性降低的淀粉酶（例如一种变体淀粉酶）是替代的，具有基本上相似的效果。同样在上面刚刚描述的配方中，在本发明中有用的淀粉酶（例如多种变体淀粉酶）的任何组合可以是在其中替代的，具有基本上相似的效果。

5

2. 假牙清洗组合物

在本发明的其它实施方案中，本发明提供了多种假牙清洗组合物，用于清洗口腔外的假牙，其含有一种或多种淀粉酶（例如变体淀粉酶）。这样的假牙清洗组合物包含有效量的一种或多种淀粉酶（例如变体淀粉酶），优选地含组合物重量的大约 0.0001% 到大约 50% 的一种或多种淀粉酶，更优选地从大约 0.001% 到大约 35%，更优选地从大约 0.01% 到大约 20%，和假牙清洗载体。各种假牙清洗组合物形式，如泡腾片剂以及类似形式，在本技术领域是熟知的（例如参见美国专利 5,055,305，将其引入于此作为参考），这些形式通常适于整合入用于从假牙上去除淀粉基污物的一种或多种淀粉酶。

10
15

下面的实例例证性说明了本发明的假牙清洗组合物实施方案。

双层泡腾假牙清洗片剂组合物				
组分	实例序号			
	62	63	64	65
酸性层:				
淀粉酶#	1.0	1.5	0.01	0.05
酒石酸	24.0	24.0	24.0	24.0
碳酸钠	4.0	4.0	4.0	4.0
氨基磺酸	10.0	10.0	10.0	10.0
PEG 20,000	4.0	4.0	4.0	4.0
碳酸氢钠	24.5	24.5	24.5	24.5

过硫酸钾	15.0	15.0	15.0	15.0
酸式焦磷酸钠	7.0	7.0	7.0	7.0
热解硅石	2.0	2.0	2.0	2.0
四乙酰基乙二胺	7.0	7.0	7.0	7.0
蓖麻油基硫代琥珀酸盐	0.5	0.5	0.5	0.5
香料	1.0	1.0	1.0	1.0
碱性层:				
一水合过硼酸钠	32.0	32.0	32.0	32.0
碳酸氢钠	19.0	19.0	19.0	19.0
EDTA	3.0	3.0	3.0	3.0
三聚磷酸钠	12.0	12.0	12.0	12.0
PEG 20,000	2.0	2.0	2.0	2.0
过硫酸钾	26.0	26.0	26.0	26.0
碳酸钠	2.0	2.0	2.0	2.0
热解硅石	2.0	2.0	2.0	2.0
染料/香料	2.0	2.0	2.0	2.0

在上面刚刚描述的配方中，在本发明中有用的免疫原性降低的淀粉酶（例如一种变体淀粉酶）可在此替代，具有基本上相似的效果。同样在上面刚刚描述的配方中，在本发明中有用的淀粉酶（例如多种变体淀粉酶）的任何组合可以替代，具有基本上相似的效果。

5

3. 个人清洁组合物

在本发明的其它实施方案中，用于清洁皮肤的个人清洁组合物包括一种或多种淀粉酶（例如变体淀粉酶）。这样的组合物通常包括占组合物重量的大约 0.001% 到大约 5% 的淀粉酶（例如变体淀粉酶），优选地从大约 0.005% 到大约 2%，最优选地从大约 0.01% 到大约 0.8%。可以在其中含入此处描述的淀粉酶的优选的个人清洗组合物包括，但不限于在美国专利申请序列号 08/121,623 和 08/121,624 中所描述的那些组合物。尽管本发明可以预期到多种组合物，但含有肥皂（脂肪酸盐）组分的一种液体个人清洗组合物包含（重量百分比）：肥皂（K 或 Na）

(15.00), 30%月桂酸酯、30%肉豆蔻酸酯、25%棕榈酸酯、15%硬脂酸酯、脂肪酸(上述比率)(4.50)、月桂基肌氨酸钠(6.00)、月桂醇醚-3 硫酸钠(0.66)、椰油酰氨基丙基甜菜碱(1.33)、甘油(15.00)、丙二醇(9.00)、聚季胺盐 10(0.80)、乙二醇双硬脂酸酯(EDTA)(1.50)、
5 丙基对羟基苯甲酸酯(0.10)、甲基对羟基苯甲酸酯(0.20)、淀粉酶#(0.10)、蛋白酶#(0.10)、KOH 或 NaOH(如果需要用来调节 pH 的话)、硫酸钙(3)、乙酸(3)和水(平衡到 100)。

在另一个实施方案中,本发明提供了个人清洗条状物。尽管本发明可以预期到多种组合物,但含有肥皂成分的一种条状个人清洗组合物包含(重量百分比):椰油基羟乙磺酸钠(47.2)、十六烷基硫酸钠(9.14)、石蜡(9.05)、钠皂(原位)(3.67)、羟乙磺酸钠(5.51)、氯化钠(0.45)、二氧化钛(0.4)、EDTA 三钠(0.1)、羟乙二磷酸三钠(0.1)、香料(1.20)、Na₂SO₄(0.87)、淀粉酶#(0.10)、蛋白酶#(0.10)、以及水和次要元素的混合物(平衡到 100)。

15 在上面刚刚描述的配方中,在本发明中有用的免疫原性降低的淀粉酶(例如一种变体淀粉酶)可以在此替代,具有基本上相似的效果。同样在上面刚刚描述的配方中,在本发明中有用的淀粉酶(例如多种变体淀粉酶)的任何组合可以替代,具有基本上相似的效果。

20 实施例 7

洗涤性能测试

在本发明组合物中有用的变体的洗涤性能,可以通过本领域已知的任何合适的方法来评价。在该实施例中,描述了用于测量 EMPA 116 服装样品(Testfabrics, Inc., Middlesex, N.J. 07030)上污点(棉上的血液/牛奶/碳黑)的去除的一种合适方法。

25 6 份 EMPA 116 样品,被切成 3×4 1/2 英寸并且带有穿孔边缘,被放置到 Model 7243S Terg-O-Tometer (United States Testing Co., Inc., Hoboken, N.J.) 的各个罐中,其中含有 1000ml 水、15gpg 硬度(Ca⁺⁺:Mg⁺⁺ = 3:1, w:w)、7g 去污剂以及适当的酶。去污剂基础是来自 wfk-Testgewebe GmbH (Krefeld, Germany) 的 WFK1 去污剂,其具有下述成分(在最终制剂中的百分比):沸石 A (25%)、硫酸钠(25%)、

苏打灰(10%)、线性烷基苯磺酸酯(8.8%)、脂肪醇乙氧基化物(7-8EO)(4.5%)、钠皂(3%)和硅酸钠($\text{SiO}_2:\text{Na}_2\text{O} = 3.3:1$)(3%)。

在该基础洗涤剂中加入下列添加物(在最终制剂中的百分比): 一水合过硼酸钠(13%)、共聚物(Sokalan CP5)(4%)、TAED(Mykon ATC Green)(3%)、酶(0.5%)和漂白剂(Tinopal AMS-GX)(0.2%)。

一水合过硼酸钠可以从多种商业来源获得, 包括 Degussa Corporation, Ridgefield-Park。Sokalan CP5 是从 BASF Corporation, Parsippany, N.J.获得。Mykon ATC Green(TAED, 四乙酰基乙二胺)可以从 Warwick International, Limited, England 获得。Tinopal AMS GX 可以从 Ciba-Geigy Corporation, Greensboro, N.C.获得。

在一个合适的测试方法中, 将六份 EMPA 116 样品, 在含有酶的洗涤剂中, 在 60℃洗涤 30 分钟; 冲洗两次, 每次在 1000ml 水中冲洗 5 分钟。对于标准曲线, 酶以终浓度 0.05-1ppm 加入; 对于常规分析, 终浓度为 0.25ppm。干燥并且挤压样品, 使用 Minolta Chroma Meter, Model CR-200 (Minolta Corporation, Ramsey, NJ.) 的 $L^*a^*b^*$ 标度上的 L 值来测量来自样品的反射。在一些实施方案中, 被测试的酶的性能, 以标准的、良好表征的酶组合物之性能百分比, 予以报导。

实施例 8

液体去污剂制剂中的变体淀粉酶稳定性

该实施例提供了用于比较淀粉酶(例如变体淀粉酶)和地衣芽孢杆菌淀粉酶的稳定性的手段, 这是针对在液体去污剂配方中的失活作用进行的。由于其它的方法可以在本发明中使用, 所以这里的目的在于将本发明限定于该方法。

在该方法中, 用于该研究的去污剂制剂是可通过商业途径获得的洗衣用去污剂(例如 Tide® Ultra 液体洗衣去污剂(Proctor&Gamble))。在一些实施方案中, 需要对该去污剂制剂进行热处理以灭活原位淀粉酶。这通过在 96℃温育该去污剂 4.5 小时来实现。然后将需要测试的地衣芽孢杆菌淀粉酶和变体(例如变体淀粉酶)的浓缩制剂, 20 克酶/升的范围, 在室温下加入到热处理后的去污剂中, 去污剂制剂中的终浓度为 0.3 克酶/升。然后, 在 50℃的水浴中, 将加入了淀粉酶的热处

理后去污剂进行温育。在 0、24、46、76 和 112 小时的时间间隔从温育管中取出等份试样，将其加入到 1cm 小容器中测定酶活性，所述小容器含有溶解在 0.1M Tris-HCL 缓冲液，pH8.6，25℃中的 1.2mM 合成肽底物 suc-Ala-Ala-Pro-phe-p 硝基苯胺。通过监控作为时间函数的反应产物对硝基苯胺在 410nm 的吸光度，用分光光度计来测定初始线性反应速率。在优选实施方案中，观察到，相对于天然地衣芽孢杆菌酶，优选的变体具有明显更高的抗灭活的稳定性。在特定的测试条件下，确定了洗衣去污剂制剂中这两种酶针对灭活的估计半衰期。

10 上面的说明书中提及的所有出版物和专利在此处被引入作为参考。本发明的被描述的方法和系统的各种修改和变化在不背离本发明的范围和精神的情况下对本领域的普通技术人员是显而易见的。尽管本发明已经通过具体的优选实施方案进行了描述，但应该理解到将本发明限定于这样的特定实施方案是不适当的。实际上，所描述的用于
15 实施本发明的方式的各种修改都在本发明的范围内，这些修改对于分子生物系、免疫学、制剂学和/或相关领域的普通技术人员是显然的。

