

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-511813
(P2025-511813A)

(43)公表日 令和7年4月16日(2025.4.16)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/56 (2006.01)	C 1 2 N	15/56	4 B 0 6 5	
C 1 2 N	9/24 (2006.01)	C 1 2 N	9/24	Z N A	4 H 0 0 3
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z	
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21		
C 1 1 D	3/386(2006.01)	C 1 1 D	3/386		
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全81頁)					
(21)出願番号	特願2024-559323(P2024-559323)	(71)出願人	500586299	ノボザイムス アクティーゼルスカブ デンマーク国, デーコー 2 8 8 0 バ グスバエルト, クロシェイバイ 3 6	
(86)(22)出願日	令和5年3月30日(2023.3.30)				
(85)翻訳文提出日	令和6年10月4日(2024.10.4)				
(86)国際出願番号	PCT/EP2023/058333				
(87)国際公開番号	WO2023/194204	(74)代理人	100099759	弁理士 青木 篤	
(87)国際公開日	令和5年10月12日(2023.10.12)				
(31)優先権主張番号	22167309.8	(74)代理人	100123582		
(32)優先日	令和4年4月8日(2022.4.8)				
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)	(74)代理人	100117019	弁理士 渡辺 陽一	
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV	(74)代理人	100141977		
		(74)代理人	100138210		
				弁理士 池田 達則	
		(74)代理人	100182730		
	最終頁に続く			最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 ヘキソサミニダーゼバリエント及び組成物

(57)【要約】

本発明は、安定性の向上、例えば洗剤安定性の向上を提供することが見出された、親ヘキソサミニダーゼと比較して改変を示す新規のヘキソサミニダーゼバリエントに関する。また、本発明は、ヘキソサミニダーゼバリエントを含む洗剤組成物、並びにヘキソサミニダーゼバリエントを用いる方法及び生成する方法、並びにバリエントをコードする単離ヘキソサミニダーゼ配列、発現ベクター、及び宿主細胞に関する。本発明のバリエントは、クリーニングプロセス及び洗剤組成物での使用に適している。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 のヘキサミニダーゼポリペプチドのバリエーションであって、配列番号 1 と比較して、

配列番号 1 の位置 1 6 3、2 2 7、2 5 2 及び 3 0 9 に対応する 1 つ以上の位置、好ましくは 2、3 又は 4 つの位置での置換；並びに

配列番号 1 の位置 1 0 6、1 1 1、1 2 0、1 2 4、1 2 7、1 5 0、1 7 0、1 7 1、1 7 8、1 9 9、2 0 8、2 5 4、2 5 5 及び 2 7 8 に対応する 1 つ以上の位置での置換を含み；

10

ヘキサミニダーゼ活性を有し、配列番号 1、配列番号 2 又は配列番号 3 のポリペプチドに対して少なくとも 60%、例えば少なくとも 65%、少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90% 又は少なくとも 95% の配列同一性（但し、100% 未満の配列同一性）を有するバリエーション。

【請求項 2】

配列番号 1 と比較して、S 1 6 3 P、N 2 2 7 T、N 2 5 2 P 及び K 3 0 9 E からなる群から選択される 2、3 又は 4 つの置換を含み；

D 1 1 1 R、T 1 2 0 V、V 1 0 6 M、V 1 0 6 N、Y 1 2 4 I、Y 1 2 4 K、Y 1 2 4 L、R 1 2 7 P、E 1 5 0 N、L 1 7 0 G、D 1 7 1 F、D 1 7 1 H、Q 1 7 8 K、S 1 9 9 W、S 2 0 8 W、F 2 5 4 I、T 2 5 5 D 及び I 2 7 8 V からなる群から選択される少なくとも 1 つの置換をさらに含む、請求項 1 に記載のヘキサミニダーゼバリエーション

20

【請求項 3】

配列番号 1 と比較して、H 1 5 Y、S 1 8 6 R、S 2 2 5 G、E 2 3 2 D、G 2 3 5 W、N 2 6 0 Q、H 2 7 2 V、S 2 7 9 D、Y 2 8 1 P、K 3 0 8 Q 及び K 3 1 2 Q からなる群から選択される少なくとも 1 つの置換、例えば前記置換の 2、3、4、5、6、7、8、9、10 個又は全てをさらに含む；

任意選択により、配列番号 1 と比較して、Q 3 I、A 4 9 W 及び N 5 9 E からなる群から選択される 1 つ以上の置換、好ましくは前記置換の 2 つ若しくは 3 つ全て；又は Q 3 F、V 1 4 0 I、Q 2 1 5 K 及び N 2 6 7 T からなる群から選択される 1 つ以上の置換、好ましくは前記置換の 2 つ、3 つ若しくは 4 つ全てをさらに含む、請求項 1 又は 2 に記載のヘキサミニダーゼバリエーション。

30

【請求項 4】

配列番号 1 と比較して、D 1 1 1 R、T 1 2 0 V、V 1 0 6 M / N、E 1 5 0 N、D 1 7 1 F 及び I 2 7 8 V からなる群から選択される少なくとも 1 つの置換、例えば前記置換の少なくとも 2 つを含み；好ましくは D 1 1 1 R、T 1 2 0 V 及び E 1 5 0 N からなる群から選択される少なくとも 1 つの置換を含み；配列番号 2 又は配列番号 3 に対して、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90% 又は少なくとも 95% の配列同一性（但し、100% 未満の配列同一性）を有する、請求項 1～3 のいずれか一項に記載のヘキサミニダーゼバリエーション。

【請求項 5】

40

配列番号 2 と比較して、以下の置換又は置換セット：

- D 1 1 1 R
- D 1 1 1 R + T 1 2 0 V
- D 1 1 1 R + T 1 2 0 V + E 1 5 0 N
- D 1 1 1 R + T 1 2 0 V + E 1 5 0 N + D 1 7 1 F + I 2 7 8 V
- D 1 1 1 R + T 1 2 0 V + T 2 5 5 D
- D 1 1 1 R + T 1 2 0 V + Y 1 2 4 I
- D 1 1 1 R + T 1 2 0 V + Y 1 2 4 K + Q 1 7 8 K
- D 1 1 1 R + T 1 2 0 V + Y 1 2 4 L + Q 1 7 8 K
- D 1 1 1 R + Y 1 2 4 K + D 1 7 1 F D 1 7 1 F + S 2 0 8 W + N 2 6 7 T

50

- D 1 7 1 F + T 2 5 5 D
- D 1 7 1 H
- I 2 7 8 V
- K 3 0 8 E
- N 2 6 7 T
- R 1 2 7 P
- T 1 2 0 V + D 1 7 1 F
- T 1 2 0 V + D 1 7 1 F + N 2 6 7 T
- T 1 2 0 V + S 2 0 8 W + N 2 6 7 T
- T 1 2 0 V + T 2 5 5 D
- T 1 2 0 V + T 2 5 5 D + N 2 6 7 T
- T 1 2 0 V + Y 1 2 4 K + Q 1 7 8 K
- V 1 0 6 M + D 1 1 1 R + T 1 2 0 V + D 1 7 1 F
- V 1 0 6 M + Q 1 7 8 K + T 2 5 5 D
- V 1 0 6 M + T 1 2 0 V + D 1 7 1 F + Q 1 7 8 K
- V 1 0 6 M + T 1 2 0 V + Y 1 2 4 I + D 1 7 1 F
- V 1 0 6 M + T 1 2 0 V + Y 1 2 4 I + Q 1 7 8 K
- V 1 0 6 M + T 1 2 0 V + Y 1 2 4 K + D 1 7 1 F
- V 1 0 6 M + T 1 2 0 V + Y 1 2 4 L + Q 1 7 8 K
- V 1 0 6 N + D 1 1 1 R + T 1 2 0 V + E 1 5 0 N
- V 1 0 6 N + S 2 0 8 W + N 2 6 7 T
- V 1 0 6 N + T 1 2 0 V + D 1 7 1 F
- V 1 0 6 N + T 1 2 0 V + D 1 7 1 F + S 2 0 8 W
- V 1 0 6 N + T 1 2 0 V + E 1 5 0 N + D 1 7 1 F + I 2 7 8 V
- V 1 0 6 N + T 1 2 0 V + N 2 6 7 T

10

20

の少なくとも1つを含む、請求項1～4のいずれか一項に記載のヘキサミニダーゼバリアント。

【請求項6】

配列番号3と比較して、以下の置換又は置換セット：

- L 1 7 0 G
- E 1 5 0 N + F 2 5 4 I
- F 2 5 4 I
- V 1 0 6 N
- D 1 1 1 R + T 1 2 0 V
- D 1 1 1 R + T 1 2 0 V + E 1 5 0 N
- D 1 1 1 R + T 1 2 0 V + E 1 5 0 N + D 1 7 1 F + I 2 7 8 V
- D 1 1 1 R + T 1 2 0 V + T 2 5 5 D
- D 1 1 1 R + T 1 2 0 V + Y 1 2 4 I
- D 1 1 1 R + T 1 2 0 V + Y 1 2 4 K + Q 1 7 8 K
- D 1 1 1 R + T 1 2 0 V + Y 1 2 4 L + Q 1 7 8 K
- D 1 1 1 R + Y 1 2 4 K + D 1 7 1 F
- D 1 7 1 F + S 2 0 8 W + N 2 6 7 T
- D 1 7 1 F + T 2 5 5 D
- D 1 7 1 H
- I 2 7 8 V
- K 3 0 8 E
- N 2 6 7 T
- R 1 2 7 P
- T 1 2 0 V + D 1 7 1 F
- T 1 2 0 V + D 1 7 1 F + N 2 6 7 T

30

40

50

・ T 1 2 0 V + S 2 0 8 W + N 2 6 7 T
 ・ T 1 2 0 V + T 2 5 5 D
 ・ T 1 2 0 V + T 2 5 5 D + N 2 6 7 T
 ・ T 1 2 0 V + Y 1 2 4 K + Q 1 7 8 K
 ・ V 1 0 6 M + D 1 1 1 R + T 1 2 0 V + D 1 7 1 F
 ・ V 1 0 6 M + Q 1 7 8 K + T 2 5 5 D
 ・ V 1 0 6 M + T 1 2 0 V + D 1 7 1 F + Q 1 7 8 K
 ・ V 1 0 6 M + T 1 2 0 V + Y 1 2 4 I + D 1 7 1 F
 ・ V 1 0 6 M + T 1 2 0 V + Y 1 2 4 I + Q 1 7 8 K
 ・ V 1 0 6 M + T 1 2 0 V + Y 1 2 4 K + D 1 7 1 F
 ・ V 1 0 6 M + T 1 2 0 V + Y 1 2 4 L + Q 1 7 8 K
 ・ V 1 0 6 N + D 1 1 1 R + T 1 2 0 V + E 1 5 0 N
 ・ V 1 0 6 N + S 2 0 8 W + N 2 6 7 T
 ・ V 1 0 6 N + T 1 2 0 V + D 1 7 1 F
 ・ V 1 0 6 N + T 1 2 0 V + D 1 7 1 F + S 2 0 8 W
 ・ V 1 0 6 N + T 1 2 0 V + E 1 5 0 N + D 1 7 1 F + I 2 7 8 V
 ・ V 1 0 6 N + T 1 2 0 V + N 2 6 7 T

10

の少なくとも1つを含む、請求項1～4のいずれか一項に記載のヘキソサミニダーゼバリアント。

20

【請求項7】

配列番号1と比較して、以下の置換又は置換セット：

・ Q 3 I + H 1 5 Y + A 4 9 W + N 5 9 E + D 1 1 1 R + T 1 2 0 V + S 1 6 3 P + S 1
 8 6 R + S 2 2 5 G + N 2 2 7 T + E 2 3 2 D + G 2 3 5 W + N 2 5 2 P + N 2 6 0 Q +
 H 2 7 2 V + S 2 7 9 D + Y 2 8 1 P + K 3 0 8 Q + K 3 0 9 E + K 3 1 2 Q
 ・ Q 3 I + H 1 5 Y + A 4 9 W + N 5 9 E + D 1 1 1 R + T 1 2 0 V + E 1 5 0 N + S 1
 6 3 P + S 1 8 6 R + S 2 2 5 G + N 2 2 7 T + E 2 3 2 D + G 2 3 5 W + N 2 5 2 P +
 N 2 6 0 Q + H 2 7 2 V + S 2 7 9 D + Y 2 8 1 P + K 3 0 8 Q + K 3 0 9 E + K 3 1 2
 Q
 ・ Q 3 I + H 1 5 Y + A 4 9 W + N 5 9 E + D 1 1 1 R + T 1 2 0 V + E 1 5 0 N + S 1
 6 3 P + D 1 7 1 F + S 1 8 6 R + S 2 2 5 G + N 2 2 7 T + E 2 3 2 D + G 2 3 5 W +
 N 2 5 2 P + N 2 6 0 Q + H 2 7 2 V + I 2 7 8 V + S 2 7 9 D + Y 2 8 1 P + K 3 0 8
 Q + K 3 0 9 E + K 3 1 2 Q
 ・ Q 3 I + H 1 5 Y + A 4 9 W + N 5 9 E + D 1 1 1 R + T 1 2 0 V + S 1 6 3 P + S 1
 8 6 R + S 2 2 5 G + N 2 2 7 T + E 2 3 2 D + G 2 3 5 W + N 2 5 2 P + T 2 5 5 D +
 N 2 6 0 Q + H 2 7 2 V + S 2 7 9 D + Y 2 8 1 P + K 3 0 8 Q + K 3 0 9 E + K 3 1 2
 Q
 ・ Q 3 I + H 1 5 Y + A 4 9 W + N 5 9 E + D 1 1 1 R + T 1 2 0 V + Y 1 2 4 I + S 1
 6 3 P + S 1 8 6 R + S 2 2 5 G + N 2 2 7 T + E 2 3 2 D + G 2 3 5 W + N 2 5 2 P +
 N 2 6 0 Q + H 2 7 2 V + S 2 7 9 D + Y 2 8 1 P + K 3 0 8 Q + K 3 0 9 E + K 3 1 2
 Q
 ・ Q 3 I + H 1 5 Y + A 4 9 W + N 5 9 E + D 1 1 1 R + T 1 2 0 V + Y 1 2 4 K + S 1
 6 3 P + Q 1 7 8 K + S 1 8 6 R + S 2 2 5 G + N 2 2 7 T + E 2 3 2 D + G 2 3 5 W +
 N 2 5 2 P + N 2 6 0 Q + H 2 7 2 V + S 2 7 9 D + Y 2 8 1 P + K 3 0 8 Q + K 3 0 9
 E + K 3 1 2 Q
 ・ Q 3 I + H 1 5 Y + A 4 9 W + N 5 9 E + D 1 1 1 R + T 1 2 0 V + Y 1 2 4 L + S 1
 6 3 P + Q 1 7 8 K + S 1 8 6 R + S 2 2 5 G + N 2 2 7 T + E 2 3 2 D + G 2 3 5 W +
 N 2 5 2 P + N 2 6 0 Q + H 2 7 2 V + S 2 7 9 D + Y 2 8 1 P + K 3 0 8 Q + K 3 0 9
 E + K 3 1 2 Q
 ・ Q 3 I + H 1 5 Y + A 4 9 W + N 5 9 E + D 1 1 1 R + Y 1 2 4 K + S 1 6 3 P + D 1
 7 1 F + S 1 8 6 R + S 2 2 5 G + N 2 2 7 T + E 2 3 2 D + G 2 3 5 W + N 2 5 2 P +

30

40

50

50

• Q 3 I + H 1 5 Y + A 4 9 W + N 5 9 E + V 1 0 6 M + S 1 6 3 P + Q 1 7 8 K + S 1 8 6 R + S 2 2 5 G + N 2 2 7 T + E 2 3 2 D + G 2 3 5 W + N 2 5 2 P + T 2 5 5 D + N 2 6 0 Q + H 2 7 2 V + S 2 7 9 D + Y 2 8 1 P + K 3 0 8 Q + K 3 0 9 E + K 3 1 2 Q

• Q 3 I + H 1 5 Y + A 4 9 W + N 5 9 E + V 1 0 6 M + T 1 2 0 V + S 1 6 3 P + D 1 7 1 F + Q 1 7 8 K + S 1 8 6 R + S 2 2 5 G + N 2 2 7 T + E 2 3 2 D + G 2 3 5 W + N 2 5 2 P + N 2 6 0 Q + H 2 7 2 V + S 2 7 9 D + Y 2 8 1 P + K 3 0 8 Q + K 3 0 9 E + K 3 1 2 Q

• Q 3 I + H 1 5 Y + A 4 9 W + N 5 9 E + V 1 0 6 M + T 1 2 0 V + Y 1 2 4 I + S 1 6 3 P + D 1 7 1 F + S 1 8 6 R + S 2 2 5 G + N 2 2 7 T + E 2 3 2 D + G 2 3 5 W + N 2 5 2 P + N 2 6 0 Q + H 2 7 2 V + S 2 7 9 D + Y 2 8 1 P + K 3 0 8 Q + K 3 0 9 E + K 3 1 2 Q

• Q 3 I + H 1 5 Y + A 4 9 W + N 5 9 E + V 1 0 6 M + T 1 2 0 V + Y 1 2 4 I + S 1 6 3 P + Q 1 7 8 K + S 1 8 6 R + S 2 2 5 G + N 2 2 7 T + E 2 3 2 D + G 2 3 5 W + N 2 5 2 P + N 2 6 0 Q + H 2 7 2 V + S 2 7 9 D + Y 2 8 1 P + K 3 0 8 Q + K 3 0 9 E + K 3 1 2 Q

• Q 3 I + H 1 5 Y + A 4 9 W + N 5 9 E + V 1 0 6 M + T 1 2 0 V + Y 1 2 4 K + S 1 6 3 P + D 1 7 1 F + S 1 8 6 R + S 2 2 5 G + N 2 2 7 T + E 2 3 2 D + G 2 3 5 W + N 2 5 2 P + N 2 6 0 Q + H 2 7 2 V + S 2 7 9 D + Y 2 8 1 P + K 3 0 8 Q + K 3 0 9 E + K 3 1 2 Q

• Q 3 I + H 1 5 Y + A 4 9 W + N 5 9 E + V 1 0 6 M + T 1 2 0 V + Y 1 2 4 L + S 1 6 3 P + Q 1 7 8 K + S 1 8 6 R + S 2 2 5 G + N 2 2 7 T + E 2 3 2 D + G 2 3 5 W + N 2 5 2 P + N 2 6 0 Q + H 2 7 2 V + S 2 7 9 D + Y 2 8 1 P + K 3 0 8 Q + K 3 0 9 E + K 3 1 2 Q

• Q 3 I + H 1 5 Y + A 4 9 W + N 5 9 E + V 1 0 6 N + D 1 1 1 R + T 1 2 0 V + E 1 5 0 N + S 1 6 3 P + S 1 8 6 R + S 2 2 5 G + N 2 2 7 T + E 2 3 2 D + G 2 3 5 W + N 2 5 2 P + N 2 6 0 Q + H 2 7 2 V + S 2 7 9 D + Y 2 8 1 P + K 3 0 8 Q + K 3 0 9 E + K 3 1 2 Q

• Q 3 I + H 1 5 Y + A 4 9 W + N 5 9 E + V 1 0 6 N + S 1 6 3 P + S 1 8 6 R + S 2 0 8 W + S 2 2 5 G + N 2 2 7 T + E 2 3 2 D + G 2 3 5 W + N 2 5 2 P + N 2 6 0 Q + N 2 6 7 T + H 2 7 2 V + S 2 7 9 D + Y 2 8 1 P + K 3 0 8 Q + K 3 0 9 E + K 3 1 2 Q

• Q 3 I + H 1 5 Y + A 4 9 W + N 5 9 E + V 1 0 6 N + T 1 2 0 V + S 1 6 3 P + D 1 7 1 F + S 1 8 6 R + S 2 2 5 G + N 2 2 7 T + E 2 3 2 D + G 2 3 5 W + N 2 5 2 P + N 2 6 0 Q + H 2 7 2 V + S 2 7 9 D + Y 2 8 1 P + K 3 0 8 Q + K 3 0 9 E + K 3 1 2 Q

• Q 3 I + H 1 5 Y + A 4 9 W + N 5 9 E + V 1 0 6 N + T 1 2 0 V + S 1 6 3 P + D 1 7 1 F + S 1 8 6 R + S 2 0 8 W + S 2 2 5 G + N 2 2 7 T + E 2 3 2 D + G 2 3 5 W + N 2 5 2 P + N 2 6 0 Q + H 2 7 2 V + S 2 7 9 D + Y 2 8 1 P + K 3 0 8 Q + K 3 0 9 E + K 3 1 2 Q

• Q 3 I + H 1 5 Y + A 4 9 W + N 5 9 E + V 1 0 6 N + T 1 2 0 V + E 1 5 0 N + S 1 6 3 P + D 1 7 1 F + S 1 8 6 R + S 2 2 5 G + N 2 2 7 T + E 2 3 2 D + G 2 3 5 W + N 2 5 2 P + N 2 6 0 Q + H 2 7 2 V + I 2 7 8 V + S 2 7 9 D + Y 2 8 1 P + K 3 0 8 Q + K 3 0 9 E + K 3 1 2 Q

• Q 3 I + H 1 5 Y + A 4 9 W + N 5 9 E + V 1 0 6 N + T 1 2 0 V + S 1 6 3 P + S 1 8 6 R + S 2 2 5 G + N 2 2 7 T + E 2 3 2 D + G 2 3 5 W + N 2 5 2 P + N 2 6 0 Q + N 2 6 7 T + H 2 7 2 V + S 2 7 9 D + Y 2 8 1 P + K 3 0 8 Q + K 3 0 9 E + K 3 1 2 Q

• Q 3 F + H 1 5 Y + V 1 4 0 I + S 1 6 3 P + L 1 7 0 G + S 1 8 6 R + Q 2 1 5 K + S 2 2 5 G + N 2 2 7 T + E 2 3 2 D + G 2 3 5 W + N 2 5 2 P + N 2 6 0 Q + N 2 6 7

10

20

30

40

50

T+H272V+S279D+Y281P+K308Q+K309E+K312Q
 • Q3F+H15Y+V140I+E150N+S163P+S186R+Q215K+S225G+N227T+E232D+G235W+N252P+F254I+N260Q+N267T+H272V+S279D+Y281P+K308Q+K309E+K312Q
 • Q3F+H15Y+V140I+S163P+S186R+Q215K+S225G+N227T+E232D+G235W+N252P+F254I+N260Q+N267T+H272V+S279D+Y281P+K308Q+K309E+K312Q
 • Q3F+H15Y+V106N+V140I+S163P+S186R+Q215K+S225G+N227T+E232D+G235W+N252P+N260Q+N267T+H272V+S279D+Y281P+K308Q+K309E+K312Q
 • Q3F+H15Y+D111R+V140I+S163P+S186R+Q215K+S225G+N227T+E232D+G235W+N252P+N260Q+N267T+H272V+S279D+Y281P+K308Q+K309E+K312Q
 • Q3F+H15Y+D111R+V140I+E150N+S163P+S186R+Q215K+S225G+N227T+E232D+G235W+N252P+N260Q+N267T+H272V+S279D+Y281P+K308Q+K309E+K312Q
 • Q3F+H15Y+D111R+V140I+E150N+S163P+L170G+S186R+Q215K+S225G+N227T+E232D+G235W+N252P+N260Q+N267T+H272V+S279D+Y281P+K308Q+K309E+K312Q
 • Q3F+H15Y+D111R+V140I+E150N+S163P+L170G+S186R+Q215K+S225G+N227T+E232D+G235W+N252P+N260Q+N267T+H272V+I278V+S279D+Y281P+K308Q+K309E+K312Q
 • Q3F+H15Y+D111R+V140I+E150N+S163P+S186R+S199W+Q215K+S225G+N227T+E232D+G235W+N252P+N260Q+N267T+H272V+I278V+S279D+Y281P+K308Q+K309E+K312Q
 • Q3F+H15Y+D111R+V140I+S163P+S186R+Q215K+S225G+N227T+E232D+G235W+N252P+N260Q+N267T+H272V+I278V+S279D+Y281P+K308Q+K309E+K312Q
 • Q3F+H15Y+D111R+V140I+S163P+L170G+S186R+Q215K+S225G+N227T+E232D+G235W+N252P+N260Q+N267T+H272V+I278V+S279D+Y281P+K308Q+K309E+K312Q
 • Q3F+H15Y+D111R+V140I+S163P+L170G+S186R+S199W+Q215K+S225G+N227T+E232D+G235W+N252P+N260Q+N267T+H272V+S279D+Y281P+K308Q+K309E+K312Q
 • Q3F+H15Y+V140I+E150N+S163P+S186R+Q215K+S225G+N227T+E232D+G235W+N252P+N260Q+N267T+H272V+S279D+Y281P+K308Q+K309E+K312Q
 • Q3F+H15Y+V140I+E150N+S163P+S186R+Q215K+

S 2 2 5 G + N 2 2 7 T + E 2 3 2 D + G 2 3 5 W + N 2 5 2 P + N 2 6 0 Q + N 2 6 7
T + H 2 7 2 V + I 2 7 8 V + S 2 7 9 D + Y 2 8 1 P + K 3 0 8 Q + K 3 0 9 E + K 3
1 2 Q

・ Q 3 F + H 1 5 Y + V 1 4 0 I + E 1 5 0 N + S 1 6 3 P + L 1 7 0 G + S 1 8 6 R +
Q 2 1 5 K + S 2 2 5 G + N 2 2 7 T + E 2 3 2 D + G 2 3 5 W + N 2 5 2 P + N 2 6 0
Q + N 2 6 7 T + H 2 7 2 V + S 2 7 9 D + Y 2 8 1 P + K 3 0 8 Q + K 3 0 9 E + K 3
1 2 Q

・ Q 3 F + H 1 5 Y + V 1 4 0 I + E 1 5 0 N + S 1 6 3 P + L 1 7 0 G + S 1 8 6 R +
Q 2 1 5 K + S 2 2 5 G + N 2 2 7 T + E 2 3 2 D + G 2 3 5 W + N 2 5 2 P + N 2 6 0
Q + N 2 6 7 T + H 2 7 2 V + I 2 7 8 V + S 2 7 9 D + Y 2 8 1 P + K 3 0 8 Q + K 3
0 9 E + K 3 1 2 Q

・ Q 3 F + H 1 5 Y + V 1 4 0 I + E 1 5 0 N + S 1 6 3 P + S 1 8 6 R + S 1 9 9 W +
Q 2 1 5 K + S 2 2 5 G + N 2 2 7 T + E 2 3 2 D + G 2 3 5 W + N 2 5 2 P + N 2 6 0
Q + N 2 6 7 T + H 2 7 2 V + S 2 7 9 D + Y 2 8 1 P + K 3 0 8 Q + K 3 0 9 E + K 3
1 2 Q

・ Q 3 F + H 1 5 Y + V 1 4 0 I + S 1 6 3 P + S 1 8 6 R + Q 2 1 5 K + S 2 2 5 G +
N 2 2 7 T + E 2 3 2 D + G 2 3 5 W + N 2 5 2 P + N 2 6 0 Q + N 2 6 7 T + H 2 7 2
V + I 2 7 8 V + S 2 7 9 D + Y 2 8 1 P + K 3 0 8 Q + K 3 0 9 E + K 3 1 2 Q

・ Q 3 F + H 1 5 Y + V 1 4 0 I + S 1 6 3 P + L 1 7 0 G + S 1 8 6 R + Q 2 1 5 K +
S 2 2 5 G + N 2 2 7 T + E 2 3 2 D + G 2 3 5 W + N 2 5 2 P + N 2 6 0 Q + N 2 6 7
T + H 2 7 2 V + S 2 7 9 D + Y 2 8 1 P + K 3 0 8 Q + K 3 0 9 E + K 3 1 2 Q

・ Q 3 F + H 1 5 Y + V 1 4 0 I + S 1 6 3 P + L 1 7 0 G + S 1 8 6 R + Q 2 1 5 K +
S 2 2 5 G + N 2 2 7 T + E 2 3 2 D + G 2 3 5 W + N 2 5 2 P + N 2 6 0 Q + N 2 6 7
T + H 2 7 2 V + I 2 7 8 V + S 2 7 9 D + Y 2 8 1 P + K 3 0 8 Q + K 3 0 9 E + K 3
1 2 Q

・ Q 3 F + H 1 5 Y + V 1 4 0 I + S 1 6 3 P + L 1 7 0 G + S 1 8 6 R + S 1 9 9 W +
Q 2 1 5 K + S 2 2 5 G + N 2 2 7 T + E 2 3 2 D + G 2 3 5 W + N 2 5 2 P + N 2 6 0
Q + N 2 6 7 T + H 2 7 2 V + S 2 7 9 D + Y 2 8 1 P + K 3 0 8 Q + K 3 0 9 E + K 3
1 2 Q

・ Q 3 F + H 1 5 Y + V 1 4 0 I + S 1 6 3 P + L 1 7 0 G + S 1 8 6 R + S 1 9 9 W +
Q 2 1 5 K + S 2 2 5 G + N 2 2 7 T + E 2 3 2 D + G 2 3 5 W + N 2 5 2 P + N 2 6 0
Q + N 2 6 7 T + H 2 7 2 V + I 2 7 8 V + S 2 7 9 D + Y 2 8 1 P + K 3 0 8 Q + K 3
0 9 E + K 3 1 2 Q

・ Q 3 F + H 1 5 Y + V 1 4 0 I + S 1 6 3 P + S 1 8 6 R + S 1 9 9 W + Q 2 1 5 K +
S 2 2 5 G + N 2 2 7 T + E 2 3 2 D + G 2 3 5 W + N 2 5 2 P + N 2 6 0 Q + N 2 6 7
T + H 2 7 2 V + I 2 7 8 V + S 2 7 9 D + Y 2 8 1 P + K 3 0 8 Q + K 3 0 9 E + K 3
1 2 Q

の1つを含む、請求項1～6のいずれか一項に記載のヘキサミニダーゼバリエント。

【請求項8】

配列番号2又は配列番号3に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも
90%又は少なくとも95%の配列同一性（但し100%未満の配列同一性）を有する、
請求項1～7のいずれか一項に記載のヘキサミニダーゼバリエント。

【請求項9】

配列番号1、配列番号2若しくは配列番号3のポリペプチド、又は前記置換のないバリ
アントと同じアミノ酸配列を有する親ポリペプチドと比較して、安定性が向上している、
請求項1～8のいずれか一項に記載のヘキサミニダーゼバリエント。

【請求項10】

請求項1～9のいずれか一項に記載のヘキサミニダーゼバリエント及び少なくとも1
つの洗剤補助成分を含む洗剤組成物。

【請求項11】

10

20

30

40

50

洗濯又は硬質表面クリーニング、例えば食器洗浄などのクリーニングプロセスにおける、請求項 1～9 のいずれか一項に記載のヘキソサミニダーゼバリエント又は請求項 10 に記載の洗剤組成物の使用。

【請求項 12】

品目をクリーニングする方法であって、請求項 1～9 のいずれか一項に記載のヘキソサミニダーゼバリエントを含む洗浄液、又は請求項 10 に記載の洗剤組成物に前記品目を曝すことを含む、方法。

【請求項 13】

生地 of 洗濯方法であって、

a) 前記生地を、請求項 1～9 のいずれか一項に記載のヘキソサミニダーゼバリエントを含む洗浄液、又は請求項 10 に記載の洗剤組成物に曝すことと；

b) 少なくとも 1 つの洗浄サイクルを完了すること；及び、任意選択により

c) 前記品目を濯ぐこと

を含む方法。

【請求項 14】

請求項 1～9 のいずれか一項に記載のヘキソサミニダーゼバリエントをコードするポリヌクレオチド、前記ポリヌクレオチドを含む核酸コンストラクト若しくは発現ベクター、又は前記ポリヌクレオチドで形質転換した組換え宿主細胞。

【請求項 15】

ヘキソサミニダーゼバリエントを生成する方法であって、

a) 前記バリエントの発現に適した条件の下で請求項 14 に記載の組換え宿主細胞を培養すること；及び

b) 前記バリエントを回収すること

を含む方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

配列表の参照

本出願は、コンピュータに読み込み可能な形態の配列表を含み、配列表は参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

本発明は、新規なヘキソサミニダーゼ（ジスベルシン）バリエント、バリエントを含む洗剤組成物などの組成物、バリエントをコードするポリヌクレオチド、バリエントの生成方法、バリエントの使用法、並びにクリーニングのためのバリエント及び洗剤組成物の使用に関する。

【背景技術】

【0003】

プロテアーゼ及びアミラーゼなどの様々な酵素がそれぞれ、タンパク質及びデンプンに関連する汚れを除去するための洗剤組成物において長く使用されてきた。しかしながら、例えば洗濯物におけるほとんどの汚れは、既知の酵素を使用しても完全に除去することが困難であり得る様々な有機物の複雑な混合物である。例えば、ヒトの皮膚、例えば死んだ皮膚細胞、汗及び皮脂からのバイオ汚れなどの複雑な有機汚れは、タンパク質、デンプン、油、及び例えば多糖類などの様々な有機物質を含む。その結果、洗濯物などの汚れを効果的に除去するには、様々な酵素活性を必要とする。

【0004】

ヘキソサミニダーゼ活性を有する酵素（ジスベルシン）及びヘキソサミニダーゼ酵素バリエントを含む洗剤組成物は、例えば、国際公開第 2017/186943 号パンフレット及び国際公開第 2020/207944 号パンフレットに既に開示されている。しかしながら、ジスベルシンを含有する洗剤組成物はまだ市販されておらず、さらに、様々な洗剤組成物及び洗浄条件が、全ての既知のジスベルシンの全てが対処することができるわけ

10

20

30

40

50

ではない課題を提示し得る。

【0005】

一般に、ジスベルシンなどの酵素が、洗濯などのクリーニングプロセスで有用であるためには、所与の洗剤組成物中で、且つ所与の洗浄条件下で、安定且つ有効である必要がある。例えば、北アメリカ及び世界のある特定の他の地域における洗濯条件は、ヨーロッパなどにおける洗濯条件とは一般に異なる。ヨーロッパでは、洗濯機が典型的にはフロントローディング式であり、比較的少量の水を比較的長い洗浄サイクル及びしばしば高い温度と組み合わせて使用するが、北アメリカ及びその他の地域では、洗濯機は一般にトップローディング式であり、大量の水、比較的短い洗浄サイクル及びしばしば低い温度を使用する。洗浄水中の洗剤濃度が低～中程度であることを含む、北アメリカ及びその他の地域などにおけるこれらの条件は、酵素洗剤が、短い洗浄サイクル及びしばしば比較的低い温度で、希釈率の高い洗浄水中で効果的な汚れの除去を提供することを困難にし得る。洗剤組成物はまた、洗浄条件、並びに水硬度などの他の局所因子に対処するために、例えば北アメリカではヨーロッパと比較して、異なる製剤化がされている場合がある。

10

【0006】

本発明は、例えば典型的な北アメリカの洗浄条件下、及び例えば北アメリカで一般に使用されている洗剤組成物での使用に特に適していることが判明したヘキソサミニダーゼ酵素バリエントを提供する。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

20

【0007】

本発明は、配列番号1のヘキソサミニダーゼポリペプチドのバリエントであって、配列番号1と比較して、

配列番号1の位置163、227、252及び309に対応する1つ以上の位置、好ましくは2、3又は4つの位置での置換；並びに

配列番号1の位置106、111、120、124、127、150、170、171、178、199、208、254、255及び278に対応する1つ以上の位置での置換を含み；

ヘキソサミニダーゼ活性を有し、配列番号1、配列番号2又は配列番号3のポリペプチドに対して少なくとも60%、例えば少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%又は少なくとも95%の配列同一性（但し、100%未満の配列同一性）を有するバリエントに関する。

30

【0008】

また、本発明は、本明細書中で開示されるヘキソサミニダーゼバリエントを含む組成物、例えば洗剤組成物、並びにバリエントをコードする単離ポリヌクレオチド、ポリヌクレオチドを含む核酸コンストラクト、ベクター及び宿主細胞、並びにバリエントを生成する方法に関する。本発明はさらに、クリーニングのため、例えば洗濯のために、ヘキソサミニダーゼバリエント及び組成物を用いる方法に関する。

【図面の簡単な説明】

40

【0009】

【図1】配列番号1、2、3及び4のポリペプチドのアラインメントである。

【発明を実施するための形態】

【0010】

配列表の概要

テリバチルス・サッカロフィルス (*Terribacillus saccharophilus*) から得られる配列番号1成熟型ヘキソサミニダーゼポリペプチド

配列番号2ヘキソサミニダーゼ、配列番号1のバリエント

配列番号3ヘキソサミニダーゼ、配列番号1のバリエント

配列番号4ヘキソサミニダーゼ、配列番号1のバリエント

50

【0011】

定義

この詳細な説明に従って、下記の定義が適用される。単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」、及び「その(the)」は、別途文脈が明確に示さない限り、複数の言及を含むことに留意されたい。

【0012】

別途定義されない限り、又は文脈によって明確に指示されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるもの同一の意味を有する。

【0013】

ヘキソサミニダーゼ：用語「ヘキソサミニダーゼ」は、「ジスペルシン」及び略語「Dsp」を含み、これは、例えばバイオフィームにおいて見出されるN-アセチルグルコサミンポリマーの β -1, 6-グリコシド結合の加水分解を触媒する、ヘキソサミニダーゼ活性を有するポリペプチドであるEC3.2.1.を意味する。用語ヘキソサミニダーゼは、N-アセチルグルコサミニダーゼ活性及び β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を有するポリペプチドを含む。用語「ヘキソサミニダーゼ活性を有するポリペプチド」は、用語「ヘキソサミニダーゼ」と互換的に用いられ得、同様に、用語「 β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性を有するポリペプチド」は、用語「 β -N-アセチルグルコサミニダーゼ」と互換的に用いられ得る。本発明の目的のために、ヘキソサミニダーゼ活性は、アッセイ1又は2に記載される手順に従い決定される。好ましい実施形態では、ヘキソサミニダーゼ活性を有するポリペプチドは、ジスペルシンである。好ましい実施形態では、ヘキソサミニダーゼ活性を有するポリペプチドは、ポリ- β -1, 6-N-アセチルグルコサミンを標的とする β -N-アセチルグルコサミニダーゼである。

【0014】

発現：用語「発現」は、バリエーションの生成に関与するあらゆる工程（例えば、限定されないが、転写、転写後修飾、翻訳、翻訳後修飾、及び分泌）を含む。

【0015】

発現ベクター：「発現ベクター」は、バリエーションをコードするDNA配列を含む直鎖状又は環状のDNAコンストラクトを指し、このコード配列は、適切な宿主においてDNAの発現を生じさせることができる適切な制御配列に作動可能に連結されている。そのような制御配列には、転写を誘導するプロモータ、転写を制御する任意選択のオペレータ配列、mRNA上の適切なリボソーム結合部位をコードする配列、エンハンサ、並びに転写及び翻訳の終結を制御する配列が含まれ得る。

【0016】

伸長：用語「伸長」は、バリエーションのアミノ末端及び／又はカルボキシル末端への1つ以上のアミノ酸の付加を意味し、「伸長された」バリエーションは、ヘキソサミニダーゼ活性を有する。

【0017】

断片：用語「断片」は、1つ以上のアミノ酸がバリエーションのアミノ末端及び／又はカルボキシル末端から欠落しているバリエーションを意味し、この断片は、ヘキソサミニダーゼ活性を有する。

【0018】

宿主株又は宿主細胞：「宿主株」又は「宿主細胞」は、バリエーションをコードするポリヌクレオチドを含む、発現ベクター、ファージ、ウイルス、又は他のDNAコンストラクトが導入された生物である。例示的な宿主株は、目的ポリペプチドを発現することができる微生物細胞（例えば、細菌、糸状菌、及び酵母）である。

【0019】

特性の向上：用語「特性の向上」は、親と比較して向上したバリエーションと関連する特徴を意味する。そのような特性の向上としては、以下に限定されないが、触媒効率、触媒速度、化学的安定性、酸化安定性、pH活性、pH安定性、特異的活性、保存条件下での安

10

20

30

40

50

定性、基質結合、基質切断、基質特異性、基質安定性、表面特性、熱活性、及び熱安定性の向上が挙げられる。本発明の文脈において、特性の向上は、好ましくは安定性の向上、例えば洗剤組成物における熱安定性の向上又は保存安定性の向上である。本発明のヘキソサミニダーゼバリエーションの特性の向上、例えば安定性の向上は、本明細書の実施例に記載されるように決定され得る。

【0020】

単離された：用語「単離された」は、バリエーション、核酸、細胞、又は他の特定の物質若しくは成分であって、他のタンパク質、核酸、細胞などが挙げられるがこれらに限定されない少なくとも1種の他の物質又は成分から分離されているバリエーション、核酸、細胞、又は他の特定の物質若しくは成分を意味する。したがって、単離されたポリペプチド、核酸、細胞、又は他の物質は、天然には存在しない形態である。単離されたポリペプチドとしては、宿主細胞中で発現された分泌バリエーションを含有する培養ブロスが挙げられるが、これに限定されない。

10

【0021】

成熟ポリペプチド：用語「成熟ポリペプチド」は、N末端プロセッシング及び／又はC末端プロセッシング（例えば、シグナルペプチドの除去）後の成熟形態のポリペプチドを意味する。

【0022】

成熟ポリペプチドコード配列：「成熟ポリペプチドコード配列」という用語は、ヘキソサミニダーゼ活性を有する成熟ポリペプチドをコード化するポリヌクレオチドを意味する。

20

【0023】

変異体：用語「変異体」は、バリエーションをコードするポリヌクレオチドを意味する。

【0024】

天然：用語「天然」は、宿主細胞内に天然に存在する核酸又はポリペプチドを意味する。

【0025】

核酸：用語「核酸」は、バリエーションをコードすることができるDNA、RNA、ヘテロ二本鎖、及び合成分子を包含する。核酸は、一本鎖であっても二本鎖であってもよく、化学修飾されていてもよい。用語「核酸」及び「ポリヌクレオチド」は、互換的に用いられる。遺伝コードは縮重であるので、2つ以上のコドンが特定のアミノ酸をコードするのに用いられ得、本組成物及び方法は、特定のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を包含する。特に明記しない限り、核酸配列は、5'から3'の方向で示される。

30

【0026】

核酸コンストラクト：用語「核酸コンストラクト」は、天然に存在する遺伝子から単離されているか、又は通常であれば自然界に存在しない方法で核酸のセグメントを含有するように修飾されているか、又は合成であり、核酸配列に作動可能に連結されている1つ以上の制御配列を含む、一本鎖又は二本鎖のいずれかの核酸分子を意味する。

【0027】

作動可能に連結されている：用語「作動可能に連結されている」は、指定された成分が、意図される方法で機能するのを可能にする関係（並置が挙げられるが、これに限定されない）にあることを意味する。例えば、調節配列は、コード配列の発現が調節配列の制御下にあるように、コード配列に作動可能に連結されている。

40

【0028】

親又は親ヘキソサミニダーゼ：用語「親」、「親ヘキソサミニダーゼ」又は「親酵素」は、本発明の酵素バリエーションを生成するために改変されるヘキソサミニダーゼを意味する。したがって、親は、本明細書中で開示されるバリエーションの同一のアミノ酸配列を有するが、本明細書中に開示されている特定の改変、典型的には置換を有していないヘキソサミニダーゼポリペプチドである。

【0029】

50

特定の実施形態において、ヘキササミニダーゼ親は、配列番号 1、配列番号 2 又は配列番号 3 に対して、少なくとも 60%、少なくとも 61%、少なくとも 62%、少なくとも 63%、少なくとも 64%、少なくとも 65%、少なくとも 66%、少なくとも 67%、少なくとも 68%、少なくとも 69%、少なくとも 70%、少なくとも 72%、少なくとも 73%、少なくとも 74%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 81%、少なくとも 82%、少なくとも 83%、少なくとも 84%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、少なくとも 99.5%、又は 100% の同一性を有するヘキササミニダーゼである。

10

【0030】

一実施形態において、親ヘキササミニダーゼは、配列番号 1、配列番号 2 又は配列番号 3 の配列を有するヘキササミニダーゼである。好ましい実施形態において、親ヘキササミニダーゼは、配列番号 1 のポリペプチドである。

【0031】

組換え：用語「組換え」は、その従来の意味で、天然に見出されるものと異なるコンステレーションを形成するための核酸配列の操作、例えば切断及び再結合を指すのに用いられる。用語、組換えは、天然の状態から修飾されている細胞、核酸、バリエーション又はベクターを指す。したがって、例えば、組換え細胞は、細胞の天然（非組換え）形態内に見出されない遺伝子を発現するか、又は天然に見出されるものと異なるレベル若しくは異なる条件下で天然の遺伝子を発現する。用語「組換え」は、「遺伝子改変された」及び「トランスジェニック」と同義である。

20

【0032】

配列同一性：2つのアミノ酸配列間又は2つのヌクレオチド配列間の関連性は、「配列同一性」というパラメータによって説明される。

2つのアミノ酸配列間の配列同一性は、EMBOSSパッケージ（EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277）バージョン6.6.0のNeedleプログラムにおいて実装されている、ニードルマン-ブッシュアルゴリズム（Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453）を用いて、「最長同一性」の出力として決定される。使用されるパラメータは、ギャップオープンペナルティが10、ギャップエクステンションペナルティが0.5、及びEBLOSUM62（BLOSUM62のEMBOSSバージョン）置換マトリックスである。Needleプログラムが最長の同一性を報告するように、nobriefオプションをコマンドラインで指定しなければならない。「最長同一性」と標識されるNeedleの出力は、下記のように算出される：

30

$$(\text{同一残基} \times 100) / (\text{アラインメントの長さ} - \text{アラインメント中のギャップの総数})$$

。

【0033】

2つのポリヌクレオチド配列間の配列同一性は、EMBOSSパッケージ（EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000、上記参照）バージョン6.6.0のNeedleプログラムに実装されている、ニードルマン-ブッシュアルゴリズム（Needleman and Wunsch, 1970、上記参照）を用いて、「最長同一性」の出力として決定される。使用されるパラメータは、ギャップオープンペナルティが10、ギャップエクステンションペナルティが0.5、及びEDNAFULL（NCBI NUC4.4のEMBOSSバージョン）置換マトリックスである。最長同一性をNeedleプログラムが報告するように、nobriefオプションをコマンドラインで指定しなければならない。「最長同一性」と標識されるNeedleの出力は、

40

50

下記のように算出される：

(同一デオキシリボヌクレオチド×100) / (アラインメントの長さ－アラインメント中のギャップの総数)。

【0034】

バリエーション：用語「バリエーション」は、ヘキササミニダーゼ活性を有するポリペプチドであって、1箇所以上の位置に置換、挿入（伸長を含む）、及び／又は欠失（例えば、トランケーション）を含むポリペプチドを意味する。置換は、ある位置を占めるアミノ酸の異なるアミノ酸による置き換えを意味しており；欠失は、ある位置を占めるアミノ酸の除去を意味しており；挿入は、ある位置を占めるアミノ酸に隣接しており且つその直後に続く1～5個のアミノ酸（例えば、1～3個のアミノ酸、特に、1個のアミノ酸）の付加を意味する。

10

【0035】

野生型：アミノ酸配列又は核酸配列に関する用語「野生型」は、アミノ酸配列又は核酸配列が、天然の配列又は天然に存在する配列であることを意味する。本明細書で用いられる場合、用語「天然に存在する」は、天然に見出されるもの（例えば、タンパク質、アミノ酸、又は核酸配列）を指す。逆に、用語「天然に存在しない」は、天然に見出されないもの（例えば、研究室で生成された組換え核酸及びタンパク質配列、又は野生型配列の改変）を指す。

【0036】

バイオフィーム：バイオフィームは、生地若しくは食器などの表面上、又は他の硬質表面上で、細胞が互いに接着しているあらゆる微生物群である。これらの接着細胞は、細胞外ポリマー物質（EPS）の自己生成マトリックス内に埋め込まれていることが多い。バイオフィームEPSは、概して、細胞外DNA、タンパク質、及び多糖で構成されたポリマー集塊である。バイオフィームは、生きている表面上でも生きていない表面上でも形成され得る。バイオフィーム内で増殖する微生物細胞は、同じ生物の浮遊細胞と生理学的に異なる（浮遊細胞は対照的に液体媒体中に浮遊又は泳動し得る単細胞である）。バイオフィーム内に生存する細菌は、通常、フィルムの高密度で且つ保護された環境によって種々の方法で協働且つ相互作用することが可能になるため、同じ種の浮遊細菌とは大きく異なる特性を有する。この環境の利点の1つは、高密度の細胞外マトリックス及び細胞の外層が集団の内部を保護するために、洗剤及び抗生物質に対する耐性が高いことである。洗濯物において、バイオフィーム産生細菌は、例えば、以下の種に見出すことができる：アシネトバクター属（*Acinetobacter*）種、アエロミクロビウム属（*Aeromicrobium*）種、ブレブンディモナス属（*Brevundimonas*）、マイクロバクテリウム属（*Microbacterium*）種、ミクロコッカス・ルテウス（*Micrococcus luteus*）、シュードモナス属（*Pseudomonas*）種、スタフィロコッカス・エピデルミディス（*Staphylococcus epidermidis*）、及びステノトロホモナス属（*Stenotrophomonas*）種。

20

30

【0037】

安定性：用語「安定性」には、保存安定性、及び使用中、例えば洗浄プロセス中の安定性が含まれ、時間の関数として、本発明によるヘキササミニダーゼバリエーションの安定性、例えば、乾燥形態で又は溶液中（例えば、洗剤用液中）でヘキササミニダーゼバリエーションが維持された場合にどの程度活性が保持されるかを反映する。安定性は、多くの要因、例えばpH、温度、及び洗剤組成の性質（例えば、ビルダー、界面活性剤などの量及びタイプによって影響される。ヘキササミニダーゼ安定性は、実施例に記載されるように測定され得、且つ、例えば、親ヘキササミニダーゼ又は参照ヘキササミニダーゼ、例えば配列番号1、配列番号2又は配列番号3のポリペプチドと比較して、融解温度（ T_m ）又は半減期向上因子（HIF）として表され得る。用語「安定性の向上」又は「安定性の増大」は、本明細書においては、バリエーション中に置換のない親ヘキササミニダーゼの安定性と比較して、且つ／又は配列番号1、配列番号2及び配列番号3の安定性と比較して、溶液中の

40

50

安定性の増大を示すバリエーションヘキソサミニダーゼと定義される。配列番号 2 及び配列番号 3 を有するヘキソサミニダーゼは、配列番号 1 のヘキソサミニダーゼよりも安定性（ T_m 及び HIF ）が高く、したがって、配列番号 2 又は 3 と比較して安定性の高いヘキソサミニダーゼバリエーションも、配列番号 1 よりも高い安定性を有する。用語「安定性の向上」及び「安定性の増大」は、洗剤安定性を含む。

【0038】

洗浄性能：本発明の文脈における「洗浄性能」という用語は、洗濯におけるクリーニング効果、好ましくはディープクリーニング効果を指し、ここで「ディープクリーニング」は、ヘキソサミニダーゼ親又は配列番号 1 を有するヘキソサミニダーゼと比較した、本発明のヘキソサミニダーゼバリエーションのバイオフィルム又はその成分の破壊又は除去を指す。

10

【0039】

洗浄性能は、しみがついた布切れの回復値として表され得る。洗浄及び濯ぎの後に、布切れを平らに広げ、室温で一晩空気乾燥させる。洗浄した布切れを全て、洗浄の翌日に評価する。非常に小さいアパーチャを有する Macbeth Color Eye 7000 反射分光光度計を用いて、布切れの光反射率を評価する。測定は入射光に UV を含まずに行い、460 nm での反射率を抽出する。

【0040】

洗濯：用語「洗濯」は、家庭用洗濯及び業務用洗濯の双方に関し、例えば本発明のクリーニング組成物又は洗剤組成物を含有する溶液により生地を処理するプロセスを意味する。洗濯プロセスは、例えば、家庭用若しくは業務用洗浄機を用いて実行され得、又は手で実行され得る。

20

【0041】

洗剤組成物：用語「洗剤組成物」（又は「クリーニング組成物」）は、特に明記しない限り、洗剤組成物又はクリーニング組成物のあらゆる形態を含む。これらとして、粒状又は粉末状の汎用又は重質洗剤、とりわけクリーニング洗剤；液体、ゲル又はペースト状の汎用洗剤、とりわけいわゆる重質液体（HDL）タイプ；1 つ以上の部屋を有するポッド、カプセル、タブなどの単一単位用量（SUD）組成物；繊細な布地用液体洗剤；手洗いうし器洗浄剤又は軽質食器洗浄剤、とりわけ高起泡タイプのもの；家庭用及び業務用の種々の錠剤、顆粒、液体、及びリンスエイドタイプを含む食洗機用洗浄剤；抗菌手洗いタイプ、クリーニングバー、セッケンバー、マウスウォッシュ、義歯クリーナー、自動車又はカーペットシャンプー、浴室クリーナーを含む液体クリーニング及び消毒剤；ヘアシャンプー及びヘアリンス；シャワージェル、フォームバス；金属クリーナー；並びに漂白添加剤及び「ステインスティック」又は前処理タイプなどのクリーニング助剤が挙げられる。用語「洗剤組成物」及び「洗剤製剤」は、汚れた対象物のクリーニングのための洗浄媒体での使用が意図される混合物に関して用いられる。いくつかの実施形態では、この用語は、布地及び／又は衣服の洗濯に関して用いられる（例えば、「洗濯洗剤」）。代替的な実施形態では、この用語は、食器、カトラリーなどのクリーニングに用いられるものなどの他の洗剤（例えば「食器洗浄洗剤」）を指す。本発明が、いずれか特定の洗剤製剤又は組成物に限定されることは意図されない。用語「洗剤組成物」は、界面活性剤を含有する組成物に限定されることは意図されない。本発明によるバリエーションに加えて、この用語は、例えば、界面活性剤、ビルダー、キレート又はキレート化剤、漂白剤系又は漂白剤成分、ポリマー、柔軟仕上げ剤、気泡促進剤、泡抑制剤、染料、芳香剤、黄変抑制剤、光学的増白剤、殺菌剤、殺真菌剤、汚染物懸濁剤、耐食剤、酵素抑制剤又は安定化剤、酵素活性化剤、トランスフェラーゼ、加水分解酵素、酸化還元酵素、青味剤及び蛍光染料、酸化防止剤、並びに溶解剤を含有し得る洗剤を包含することが意図されている。

30

40

【0042】

布地：用語「布地」は、あらゆる生地材料を包含する。したがって、この用語は、衣服、並びに布地、ヤーン、繊維、不織材料、天然材料、合成材料、及び他のあらゆる生地材料を包含することが意図される。

50

【0043】

生地：用語「生地」は、織布、並びに糸、織物、ニット、及び不織布への変換又はそうしたものとしての使用に適したステープルファイバ及びフィラメントを指す。この用語は、天然の、そして合成の（例えば、製造された）繊維製のヤーンを包含する。用語「生地材料」は、繊維、ヤーン中間物、ヤーン、布地、及び布地から製造される製品（例えば、衣服及び他の物品）に係る一般的な用語である。

【0044】

非布地洗剤組成物：用語「非布地洗剤組成物」は、生地以外の表面洗剤組成物、例えば、以下に限定されないが、手動食器洗浄組成物を含む食器洗浄洗剤組成物などの硬質表面クリーニング用組成物、口腔洗剤組成物、義歯洗剤組成物、及びパーソナルクレンジング組成物を含む。非布地洗剤組成物の別の群は、医療クリーニング、すなわち、バイオフィルムを除去若しくは防止するための医療デバイスのクリーニング、又はバイオフィルム形成を防止するための留置医療デバイス若しくはインプラントなどの医療デバイスのコーティングのための組成物である。医療デバイスは、例えば、カテーテル、機械弁、心臓ペースメーカー、動静脈シャント、強膜バックル、人工関節、鼓膜換気チューブ、気管切開チューブ、ボイスプロテゼ、人工陰茎、人工尿道括約筋、合成恥骨膈スリング、縫合糸、骨アンカー、骨ねじ、眼内レンズ、コンタクトレンズ、子宮内避妊器具、大動脈大腿動脈移植片、血管移植片、ニードル、ルアーロックコネクタ、ニードルレスコネクタ又は手術器具であり得る。

【0045】

酵素の有効量：用語「酵素の有効量」は、特定の用途、例えば、定義される洗剤組成物に要求される酵素活性を達成するのに必要な酵素の量を指す。そのような有効量は、当業者によって容易に確定され、用いられる特定の酵素、クリーニング用途、洗剤組成物の特定の組成、及び液体又は乾燥（例えば、粒状、バー）組成物のどちらが要求されるかなどの多くの要因に基づく。ヘキソサミニダーゼバリエーションの用語「有効量」は、例えば規定の洗剤組成物中の、所望のレベルの酵素活性を達成する、先に記載のヘキソサミニダーゼバリエーションの量を指す。

【0046】

関連洗浄条件：用語「関連洗浄条件」は、本明細書においては、洗剤マーケットセグメントの家庭で実際に用いられる条件、特に洗浄温度、時間、洗浄機、洗剤濃度、洗剤の種類、及び水の硬度を示すために用いられる。

【0047】

洗浄液：用語「洗浄液」（又は「洗浄水」）は、本発明のヘキソサミニダーゼバリエーションを含む水溶液を指す。洗浄液は、水、及びヘキソサミニダーゼバリエーションを含む洗剤組成物を含有する（例えば、洗浄機又は食器洗浄機において見出される）溶液である。洗剤組成物は、水と混合されて洗浄液を形成する前に、本明細書の他で記載される適切なあらゆる形態、例えば液体又は粉末であり得る。

【0048】

水硬度：本明細書で用いられる用語「水の硬度」又は「硬度」又は「dH」又は「°dH」は、ドイツ硬度を指す。1度が、水1リットルあたり10ミリグラムの酸化カルシウムと定義される。

【0049】

補助材料：用語「補助材料」又は「補助成分」は、所望される特定の種類の洗剤組成物、及び製品の形態（例えば、液体、粒状、粉末、バー、ペースト、スプレー、錠剤、ゲル、又はフォーム組成物）のために選択されるあらゆる液体、固体、又は気体材料を意味し、これらの材料はまた、好ましくは、組成物に用いられるヘキソサミニダーゼバリエーション酵素と相溶性がある。補助材料に関するより詳細な情報を、さらに以下に提供する。

【0050】

低洗剤濃度：用語「低洗剤濃度」系は、約800ppm未満の洗剤成分が洗浄水中に存在する洗剤を含む。アジア、例えば日本の洗剤は、典型的には低洗剤濃度系であると考え

10

20

30

40

50

られる。

【0051】

中洗剤濃度：用語「中洗剤濃度」系は、約800ppm～約2000ppmの洗剤成分が洗浄水中に存在する洗剤を含む。北米の洗剤は、一般に中洗剤濃度系であると考えられる。

【0052】

高洗剤濃度：用語「高洗剤濃度」系は、約2000ppmを超える洗剤成分が洗浄水中に存在する洗剤を含む。欧州の洗剤は、一般に高洗剤濃度系であると考えられる。

【0053】

バリエーションの命名のための規則

本発明の目的のために、配列番号1に開示されるポリペプチドを用いて、別のヘキサミニダーゼ中の対応するアミノ酸位置が決定される。別のヘキサミニダーゼのアミノ酸配列が、配列番号1に開示されるポリペプチドとアラインされ、このアラインメントに基づいて、配列番号1に開示されるポリペプチド内のアミノ酸残基に対応するアミノ酸位置番号が、好ましくはバージョン5.0.0以降の、EMBOSSパッケージ（EMBOSS; The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16; 276-277）のNeedleプログラムにおいて実装されている、ニードルマン-ブッシュアルゴリズム（Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48; 443-453）を用いて決定される。使用されるパラメータは、ギャップオープンペナルティが10、ギャップエクステンションペナルティが0.5、及びEBLOSUM62（BLOSUM62のEMBOSSバージョン）置換マトリックスである。

【0054】

本発明のバリエーションの説明では、参照を容易にするために、以下で説明する命名法が適応されている。承認されたIUPACの一文字又は三文字のアミノ酸略号が採用される。

【0055】

置換。アミノ酸置換では、以下の命名法が用いられる：元のアミノ酸、位置、置換アミノ酸。したがって、226位でのスレオニンのアラニンによる置換は、「T226A」（又は、三文字コードを用いて「Thr226Ala」）と命名される。複数の変異は、加算記号（「+」）によって区切られ得、例えば、「G205R+S411F」は、205位及び411位でのそれぞれアルギニン（R）によるグリシン（G）及びフェニルアラニン（F）によるセリン（S）の置換を表す。これ以外にも、複数の変異が、スペース、コンマ、又はプラス記号によって示され得る（例えば、「G205R S411F」、「G205R, S411F」、又は「G205R+S411F」）。

【0056】

欠失。アミノ酸欠失では、以下の命名法が用いられる：元のアミノ酸、位置、*。したがって、195位のグリシンの欠失は、「G195*」と指定される。複数の欠失が、加算記号（「+」）によって区切られる（例えば、「G195*+S411*」）。

【0057】

挿入。アミノ酸置換では、以下の命名法が用いられる：元のアミノ酸、位置、元のアミノ酸、挿入アミノ酸。したがって、195位でのグリシンの後のリシンの挿入は、「G195GK」と指定される。複数のアミノ酸の挿入は、[元のアミノ酸、位置、元のアミノ酸、挿入アミノ酸#1、挿入アミノ酸#2など]と指定される。例えば、195位のグリシンの後へのリシン及びアラニンの挿入は、「G195GKA」のように示される。

【0058】

このような場合、挿入されたアミノ酸残基は、この挿入されたアミノ酸残基に先行するアミノ酸残基の位置番号へ小文字を追加することによって付番される。したがって、上記の例では、配列は以下のとおりである：

【0059】

【表1】

親:	バリエント:
195	195 195a 195b
G	G - K - A

【0060】

複数の改変。複数の改変を含むバリエントは、上で説明したように、加算記号（「+」）によって区切られており、例えば、「R170Y+G195E」は、170及び195位のアルギニン及びグリシンの、それぞれチロシン及びグルタミン酸による置換を表す。これ以外にも、複数の改変は、上記のようにスペース又はコンマによって区切られ得る。

10

【0061】

様々な改変。様々な改変をある位置で導入することができる場合、様々な改変は、コンマ又はスラッシュによって区切られ得、例えば、「R170Y, E」又は「R170Y/E」は、チロシン又はグルタミン酸による170位でのアルギニンの置換を表す。したがって、「Y167G, A+R170G, A」又は「Y167G/A+R170G/A」は、以下のバリエントを指定する：「Y167G+R170G」、「Y167G+R170A」、「Y167A+R170G」、及び「Y167A+R170A」。

20

【0062】

本発明は、配列番号1のヘキサミニダーゼポリペプチドのバリエントであって、配列番号1と比較して、

配列番号1の位置163、227、252及び309に対応する1つ以上の位置、好ましくは2、3又は4つの位置での置換；並びに

配列番号1の位置106、111、120、124、127、150、170、171、178、199、208、254、255及び278に対応する1つ以上の位置での置換を含み；

ヘキサミニダーゼ活性を有し、配列番号1、配列番号2又は配列番号3のポリペプチドに対して少なくとも60%、例えば少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%又は少なくとも95%の配列同一性（但し、100%未満の配列同一性）を有するバリエントに関する。

30

【0063】

バリエント

一実施形態において、本発明のバリエントは、配列番号1と比較して、

以下の位置における示されたアミノ酸残基の1つ以上、例えば2、3又は4つ：163位のP、227位のT、252位のP及び309位のE；並びに

以下の位置における示されたアミノ酸残基の1つ以上：106位のM又はN、111位のR、120位のV、124位のI、K又はL、127位のP、150位のN、170位のG、171位のF又はH、178位のK、199位のW、208位のW、254位のI、255位のD及び278位のV

40

を含み；

位置番号は、配列番号1に基づく。

【0064】

したがって、ヘキサミニダーゼバリエントは、配列番号1と比較して、S163P、N227T、N252P及びK309Eからなる群から選択される2、3又は4つの置換；

並びに、V106M、V106N、D111R、T120V、Y124I、Y124K、Y124L、R127P、E150N、L170G、D171F、D171H、Q17

50

8 K、S 1 9 9 W、S 2 0 8 W、F 2 5 4 I、T 2 5 5 D 及び I 2 7 8 V からなる群から選択される少なくとも1つの置換を含み得る。

【0065】

好ましい実施形態では、ヘキソサミニダーゼバリエントは、配列番号1と比較して、H 1 5 Y、S 1 8 6 R、S 2 2 5 G、E 2 3 2 D、G 2 3 5 W、N 2 6 0 Q、H 2 7 2 V、S 2 7 9 D、Y 2 8 1 P、K 3 0 8 Q 及び K 3 1 2 Q からなる群から選択される少なくとも1つの置換、例えば前記置換の2、3、4、5、6、7、8、9、10個又は全てをさらに含み得る。このような実施形態では、バリエントは、配列番号1と比較して、Q 3 I、A 4 9 W 及び N 5 9 E からなる群から選択される1つ以上の置換、好ましくは前記置換の2つ若しくは3つ全て；又は Q 3 F、V 1 4 0 I、Q 2 1 5 K 及び N 2 6 7 T からなる群から選択される1つ以上の置換、好ましくは前記置換の2つ、3つ若しくは4つ全てをさらに含み得る。

10

【0066】

一実施形態では、ヘキソサミニダーゼバリエントは、配列番号1と比較して、置換 S 1 6 3 P、N 2 2 7 T、N 2 5 2 P 及び K 3 0 9 E；並びに H 1 5 Y、S 1 8 6 R、S 2 2 5 G、E 2 3 2 D、G 2 3 5 W、N 2 6 0 Q、H 2 7 2 V、S 2 7 9 D、Y 2 8 1 P、K 3 0 8 Q 及び K 3 1 2 Q からなる群から選択される少なくとも1つの置換、例えば前記置換の2、3、4、5、6、7、8、9、10個又は全てを含む。

【0067】

好ましい実施形態では、本発明のヘキソサミニダーゼバリエントは、配列番号1と比較して、V 1 0 6 M / N、D 1 1 1 R、T 1 2 0 V、Y 1 2 4 I / K / L、R 1 2 7 P、E 1 5 0 N、L 1 7 0 G、D 1 7 1 F / H、Q 1 7 8 K、S 1 9 9 W、S 2 0 8 W、T 2 5 5 D、N 2 6 7 T、I 2 7 8 V 及び K 3 0 8 E からなる群から選択される少なくとも1つの置換を含む。好ましくは、バリエントは、前記置換の少なくとも2つ、例えば前記置換の少なくとも3つを含む。このようなバリエントの1つは、V 1 0 6 M / N、D 1 1 1 R、T 1 2 0 V、Y 1 2 4 I / K / L、R 1 2 7 P、E 1 5 0 N、L 1 7 0 G、D 1 7 1 F / H、Q 1 7 8 K、S 1 9 9 W、S 2 0 8 W、T 2 5 5 D、N 2 6 7 T、I 2 7 8 V 及び K 3 0 8 E からなる群から選択される少なくとも1つの置換、例えば前記置換の少なくとも2つ又は少なくとも3つを含む配列番号2のバリエントである。別のこのようなバリエントは、V 1 0 6 M / N、D 1 1 1 R、T 1 2 0 V、Y 1 2 4 I / K / L、R 1 2 7 P、E 1 5 0 N、L 1 7 0 G、D 1 7 1 F / H、Q 1 7 8 K、S 1 9 9 W、S 2 0 8 W、T 2 5 5 D、N 2 6 7 T、I 2 7 8 V 及び K 3 0 8 E からなる群から選択される少なくとも1つの置換、例えば前記置換の少なくとも2つ又は少なくとも3つを含む配列番号3のバリエントである。

20

30

【0068】

より好ましい実施形態では、本発明のヘキソサミニダーゼバリエントは、配列番号1と比較して、V 1 0 6 M / N、D 1 1 1 R、T 1 2 0 V、E 1 5 0 N、L 1 7 0 G、D 1 7 1 F、Q 1 7 8 K、S 1 9 9 W、S 2 0 8 W、T 2 5 5 D 及び I 2 7 8 V からなる群から選択される少なくとも1つの置換を含む。好ましくは、バリエントは、前記置換の少なくとも2つ、例えば前記置換の少なくとも3つを含む。このようなバリエントの1つは、V 1 0 6 M / N、D 1 1 1 R、T 1 2 0 V、E 1 5 0 N、L 1 7 0 G、D 1 7 1 F、Q 1 7 8 K、S 1 9 9 W、S 2 0 8 W、T 2 5 5 D 及び I 2 7 8 V からなる群から選択される少なくとも1つの置換、例えば前記置換の少なくとも2つ又は少なくとも3つを含む配列番号2のバリエントである。別のこのようなバリエントは、V 1 0 6 M / N、D 1 1 1 R、T 1 2 0 V、E 1 5 0 N、L 1 7 0 G、D 1 7 1 F、Q 1 7 8 K、S 1 9 9 W、S 2 0 8 W、T 2 5 5 D 及び I 2 7 8 V からなる群から選択される少なくとも1つの置換、例えば前記置換の少なくとも2つ又は少なくとも3つを含む配列番号3のバリエントである。

40

【0069】

より好ましくは、本発明のヘキソサミニダーゼバリエントは、配列番号1と比較して、

50

V 1 0 6 M / N、D 1 1 1 R、T 1 2 0 V、E 1 5 0 N、D 1 7 1 F 及び I 2 7 8 V からなる群から選択される少なくとも1つの置換、例えば前記置換の少なくとも2つ、例えば前記置換の少なくとも3つを含む。

【0070】

特に好ましい実施形態では、本発明のヘキソサミニダーゼバリエントは、配列番号1と比較して、D 1 1 1 R、T 1 2 0 V 及び E 1 5 0 N からなる群から選択される少なくとも1つの置換を含む。したがって、バリエントは、置換 D 1 1 1 R + T 1 2 0 V、D 1 1 1 R + E 1 5 0 N 若しくは T 1 2 0 V + E 1 5 0 N、又は3つ全ての置換 D 1 1 1 R + T 1 2 0 V + E 1 5 0 N を含み得る。これらの実施形態において、バリエントは、V 1 0 6 M、V 1 0 6 N、Y 1 2 4 I、Y 1 2 4 K、Y 1 2 4 L、R 1 2 7 P、L 1 7 0 G、D 1 7 1 F、D 1 7 1 H、Q 1 7 8 K、S 1 9 9 W、S 2 0 8 W、F 2 5 4 I、T 2 5 5 D 及び I 2 7 8 V からなる群から選択される少なくとも1つの置換をさらに含み得、好ましい置換は、V 1 0 6 M / N、L 1 7 0 G、D 1 7 1 F、Q 1 7 8 K、S 1 9 9 W、S 2 0 8 W、T 2 5 5 D 及び I 2 7 8 V からなる群から選択されるものを含む。

10

【0071】

一実施形態では、ヘキソサミニダーゼバリエントは、配列番号1と比較して、置換 D 1 1 1 R を、T 1 2 0 V 及び E 1 5 0 N から選択される少なくとも1つの置換と、任意選択による V 1 0 6 M、V 1 0 6 N、Y 1 2 4 I、Y 1 2 4 K、Y 1 2 4 L、R 1 2 7 P、L 1 7 0 G、D 1 7 1 F、D 1 7 1 H、Q 1 7 8 K、S 1 9 9 W、S 2 0 8 W、F 2 5 4 I、T 2 5 5 D 及び I 2 7 8 V からなる群から選択される少なくとも1つの追加の置換とともに含む。

20

【0072】

一実施形態では、ヘキソサミニダーゼバリエントは、配列番号1と比較して、置換 T 1 2 0 V を、D 1 1 1 R V 及び E 1 5 0 N から選択される少なくとも1つの置換と、任意選択による V 1 0 6 M、V 1 0 6 N、Y 1 2 4 I、Y 1 2 4 K、Y 1 2 4 L、R 1 2 7 P、L 1 7 0 G、D 1 7 1 F、D 1 7 1 H、Q 1 7 8 K、S 1 9 9 W、S 2 0 8 W、F 2 5 4 I、T 2 5 5 D 及び I 2 7 8 V からなる群から選択される少なくとも1つの追加の置換とともに含む。

【0073】

一実施形態では、ヘキソサミニダーゼバリエントは、配列番号1と比較して、置換 E 1 5 0 N を、D 1 1 1 R 及び T 1 2 0 V から選択される少なくとも1つの置換と、任意選択による V 1 0 6 M、V 1 0 6 N、Y 1 2 4 I、Y 1 2 4 K、Y 1 2 4 L、R 1 2 7 P、L 1 7 0 G、D 1 7 1 F、D 1 7 1 H、Q 1 7 8 K、S 1 9 9 W、S 2 0 8 W、F 2 5 4 I、T 2 5 5 D 及び I 2 7 8 V からなる群から選択される少なくとも1つの追加の置換とともに含む。

30

【0074】

いくつかの実施形態では、ヘキソサミニダーゼバリエントは、配列番号1と比較して、V 1 0 6 M、V 1 0 6 N、Y 1 2 4 I、Y 1 2 4 K、Y 1 2 4 L、R 1 2 7 P、L 1 7 0 G、D 1 7 1 F、D 1 7 1 H、Q 1 7 8 K、S 1 9 9 W、S 2 0 8 W、F 2 5 4 I、T 2 5 5 D 及び I 2 7 8 V からなる群から選択される；例えば V 1 0 6 M / N、L 1 7 0 G、D 1 7 1 F、Q 1 7 8 K、S 1 9 9 W、S 2 0 8 W、T 2 5 5 D 及び I 2 7 8 V からなる群から選択される少なくとも1つの置換を含む。

40

【0075】

いくつかの実施形態では、ヘキソサミニダーゼバリエントは、配列番号1と比較して、a) S 1 6 3 P、N 2 2 7 T、N 2 5 2 P 及び K 3 0 9 E からなる群から選択される2つ、3つ、又は好ましくは4つの置換；b) H 1 5 Y、S 1 8 6 R、S 2 2 5 G、E 2 3 2 D、G 2 3 5 W、N 2 6 0 Q、H 2 7 2 V、S 2 7 9 D、Y 2 8 1 P、K 3 0 8 Q 及び K 3 1 2 Q からなる群から選択される少なくとも1つの置換、好ましくは2、3、4、5、6、7、8、9 又は10個の置換、より好ましくは前記置換の全て；並びに c) V 1 0 6 M、V 1 0 6 N、D 1 1 1 R、T 1 2 0 V、Y 1 2 4 I、Y 1 2 4 K、Y 1 2 4 L、R 1

50

27P、E150N、L170G、D171F、D171H、Q178K、S199W、S208W、F254I、T255D及びI278Vからなる群から選択される少なくとも1つの置換を含む。

【0076】

一実施形態では、ヘキソサミニダーゼバリエーションは、配列番号1と比較して、a) S163P、N227T、N252P及びK309Eからなる群から選択される2つ、3つ、又は好ましくは4つの置換；b) H15Y、S186R、S225G、E232D、G235W、N260Q、H272V、S279D、Y281P、K308Q及びK312Qからなる群から選択される少なくとも1つの置換、好ましくは少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9又は10個の置換、より好ましくは前記置換の全て；並びにc) 置換V106Mを含む。このようなバリエーションは、例えば、D111R、T120V、E150N、D171F及びI278Vからなる群から選択される1つ以上の追加の置換をさらに含み得る。

10

【0077】

一実施形態では、ヘキソサミニダーゼバリエーションは、配列番号1と比較して、a) S163P、N227T、N252P及びK309Eからなる群から選択される2つ、3つ、又は好ましくは4つの置換；b) H15Y、S186R、S225G、E232D、G235W、N260Q、H272V、S279D、Y281P、K308Q及びK312Qからなる群から選択される少なくとも1つの置換、好ましくは少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9又は10個の置換、より好ましくは前記置換の全て；並びにc) 置換V106Nを含む。このようなバリエーションは、例えば、D111R、T120V、E150N、D171F及びI278Vからなる群から選択される1つ以上の追加の置換をさらに含み得る。

20

【0078】

一実施形態では、ヘキソサミニダーゼバリエーションは、配列番号1と比較して、a) S163P、N227T、N252P及びK309Eからなる群から選択される2つ、3つ、又は好ましくは4つの置換；b) H15Y、S186R、S225G、E232D、G235W、N260Q、H272V、S279D、Y281P、K308Q及びK312Qからなる群から選択される少なくとも1つの置換、好ましくは少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9又は10個の置換、より好ましくは前記置換の全て；並びにc) 置換D111Rを含む。このようなバリエーションは、例えば、V106M/N、T120V、E150N、D171F及びI278Vからなる群から選択される1つ以上の追加の置換をさらに含み得る。

30

【0079】

一実施形態では、ヘキソサミニダーゼバリエーションは、配列番号1と比較して、a) S163P、N227T、N252P及びK309Eからなる群から選択される2つ、3つ、又は好ましくは4つの置換；b) H15Y、S186R、S225G、E232D、G235W、N260Q、H272V、S279D、Y281P、K308Q及びK312Qからなる群から選択される少なくとも1つの置換、好ましくは少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9又は10個の置換、より好ましくは前記置換の全て；並びにc) 置換T120Vを含む。このようなバリエーションは、例えば、V106M/N、D111R、E150N、D171F及びI278Vからなる群から選択される1つ以上の追加の置換をさらに含み得る。

40

【0080】

一実施形態では、ヘキソサミニダーゼバリエーションは、配列番号1と比較して、a) S163P、N227T、N252P及びK309Eからなる群から選択される2つ、3つ、又は好ましくは4つの置換；b) H15Y、S186R、S225G、E232D、G235W、N260Q、H272V、S279D、Y281P、K308Q及びK312Qからなる群から選択される少なくとも1つの置換、好ましくは少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9又は10個の置換、より好ましくは前記置換の全て；並びにc) 置換Y

50

1 2 4 Iを含む。このようなバリエーションは、例えば、V 1 0 6 M / N、D 1 1 1 R、T 1 2 0 V、E 1 5 0 N、D 1 7 1 F 及び I 2 7 8 V からなる群から選択される 1 つ以上の追加の置換をさらに含み得る。

【0081】

一実施形態では、ヘキサミニダーゼバリエーションは、配列番号 1 と比較して、a) S 1 6 3 P、N 2 2 7 T、N 2 5 2 P 及び K 3 0 9 E からなる群から選択される 2 つ、3 つ、又は好ましくは 4 つの置換；b) H 1 5 Y、S 1 8 6 R、S 2 2 5 G、E 2 3 2 D、G 2 3 5 W、N 2 6 0 Q、H 2 7 2 V、S 2 7 9 D、Y 2 8 1 P、K 3 0 8 Q 及び K 3 1 2 Q からなる群から選択される少なくとも 1 つの置換、好ましくは少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9 又は 10 個の置換、より好ましくは前記置換の全て；並びに c) 置換 Y 1 2 4 K を含む。このようなバリエーションは、例えば、V 1 0 6 M / N、D 1 1 1 R、T 1 2 0 V、E 1 5 0 N、D 1 7 1 F 及び I 2 7 8 V からなる群から選択される 1 つ以上の追加の置換をさらに含み得る。

10

【0082】

一実施形態では、ヘキサミニダーゼバリエーションは、配列番号 1 と比較して、a) S 1 6 3 P、N 2 2 7 T、N 2 5 2 P 及び K 3 0 9 E からなる群から選択される 2 つ、3 つ、又は好ましくは 4 つの置換；b) H 1 5 Y、S 1 8 6 R、S 2 2 5 G、E 2 3 2 D、G 2 3 5 W、N 2 6 0 Q、H 2 7 2 V、S 2 7 9 D、Y 2 8 1 P、K 3 0 8 Q 及び K 3 1 2 Q からなる群から選択される少なくとも 1 つの置換、好ましくは少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9 又は 10 個の置換、より好ましくは前記置換の全て；並びに c) 置換 Y 1 2 4 L を含む。このようなバリエーションは、例えば、V 1 0 6 M / N、D 1 1 1 R、T 1 2 0 V、E 1 5 0 N、D 1 7 1 F 及び I 2 7 8 V からなる群から選択される 1 つ以上の追加の置換をさらに含み得る。

20

【0083】

一実施形態では、ヘキサミニダーゼバリエーションは、配列番号 1 と比較して、a) S 1 6 3 P、N 2 2 7 T、N 2 5 2 P 及び K 3 0 9 E からなる群から選択される 2 つ、3 つ、又は好ましくは 4 つの置換；b) H 1 5 Y、S 1 8 6 R、S 2 2 5 G、E 2 3 2 D、G 2 3 5 W、N 2 6 0 Q、H 2 7 2 V、S 2 7 9 D、Y 2 8 1 P、K 3 0 8 Q 及び K 3 1 2 Q からなる群から選択される少なくとも 1 つの置換、好ましくは少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9 又は 10 個の置換、より好ましくは前記置換の全て；並びに c) 置換 R 1 2 7 P を含む。このようなバリエーションは、例えば、V 1 0 6 M / N、D 1 1 1 R、T 1 2 0 V、E 1 5 0 N、D 1 7 1 F 及び I 2 7 8 V からなる群から選択される 1 つ以上の追加の置換をさらに含み得る。

30

【0084】

一実施形態では、ヘキサミニダーゼバリエーションは、配列番号 1 と比較して、a) S 1 6 3 P、N 2 2 7 T、N 2 5 2 P 及び K 3 0 9 E からなる群から選択される 2 つ、3 つ、又は好ましくは 4 つの置換；b) H 1 5 Y、S 1 8 6 R、S 2 2 5 G、E 2 3 2 D、G 2 3 5 W、N 2 6 0 Q、H 2 7 2 V、S 2 7 9 D、Y 2 8 1 P、K 3 0 8 Q 及び K 3 1 2 Q からなる群から選択される少なくとも 1 つの置換、好ましくは少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9 又は 10 個の置換、より好ましくは前記置換の全て；並びに c) 置換 E 1 5 0 N を含む。このようなバリエーションは、例えば、V 1 0 6 M / N、D 1 1 1 R、T 1 2 0 V、E 1 5 0 N、D 1 7 1 F 及び I 2 7 8 V からなる群から選択される 1 つ以上の追加の置換をさらに含み得る。このようなバリエーションは、例えば、V 1 0 6 M / N、D 1 1 1 R、T 1 2 0 V、D 1 7 1 F 及び I 2 7 8 V からなる群から選択される 1 つ以上の追加の置換をさらに含み得る。

40

【0085】

一実施形態では、ヘキサミニダーゼバリエーションは、配列番号 1 と比較して、a) S 1 6 3 P、N 2 2 7 T、N 2 5 2 P 及び K 3 0 9 E からなる群から選択される 2 つ、3 つ、又は好ましくは 4 つの置換；b) H 1 5 Y、S 1 8 6 R、S 2 2 5 G、E 2 3 2 D、G 2 3 5 W、N 2 6 0 Q、H 2 7 2 V、S 2 7 9 D、Y 2 8 1 P、K 3 0 8 Q 及び K 3 1 2 Q

50

からなる群から選択される少なくとも1つの置換、好ましくは少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9又は10個の置換、より好ましくは前記置換の全て；並びにc)置換L170Gを含む。このようなバリエーションは、例えば、V106M/N、D111R、T120V、E150N、D171F及びI278Vからなる群から選択される1つ以上の追加の置換をさらに含み得る。このようなバリエーションは、例えば、V106M/N、D111R、T120V、E150N、D171F及びI278Vからなる群から選択される1つ以上の追加の置換をさらに含み得る。

【0086】

一実施形態では、ヘキサミニダーゼバリエーションは、配列番号1と比較して、a) S163P、N227T、N252P及びK309Eからなる群から選択される2つ、3つ、又は好ましくは4つの置換；b) H15Y、S186R、S225G、E232D、G235W、N260Q、H272V、S279D、Y281P、K308Q及びK312Qからなる群から選択される少なくとも1つの置換、好ましくは少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9又は10個の置換、より好ましくは前記置換の全て；並びにc)置換D171Fを含む。このようなバリエーションは、例えば、V106M/N、D111R、T120V、E150N及びI278Vからなる群から選択される1つ以上の追加の置換をさらに含み得る。

10

【0087】

一実施形態では、ヘキサミニダーゼバリエーションは、配列番号1と比較して、a) S163P、N227T、N252P及びK309Eからなる群から選択される2つ、3つ、又は好ましくは4つの置換；b) H15Y、S186R、S225G、E232D、G235W、N260Q、H272V、S279D、Y281P、K308Q及びK312Qからなる群から選択される少なくとも1つの置換、好ましくは少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9又は10個の置換、より好ましくは前記置換の全て；並びにc)置換D171Hを含む。このようなバリエーションは、例えば、V106M/N、D111R、T120V、E150N及びI278Vからなる群から選択される1つ以上の追加の置換をさらに含み得る。

20

【0088】

一実施形態では、ヘキサミニダーゼバリエーションは、配列番号1と比較して、a) S163P、N227T、N252P及びK309Eからなる群から選択される2つ、3つ、又は好ましくは4つの置換；b) H15Y、S186R、S225G、E232D、G235W、N260Q、H272V、S279D、Y281P、K308Q及びK312Qからなる群から選択される少なくとも1つの置換、好ましくは少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9又は10個の置換、より好ましくは前記置換の全て；並びにc)置換Q178Kを含む。このようなバリエーションは、例えば、V106M/N、D111R、T120V、E150N、D171F及びI278Vからなる群から選択される1つ以上の追加の置換をさらに含み得る。

30

【0089】

一実施形態では、ヘキサミニダーゼバリエーションは、配列番号1と比較して、a) S163P、N227T、N252P及びK309Eからなる群から選択される2つ、3つ、又は好ましくは4つの置換；b) H15Y、S186R、S225G、E232D、G235W、N260Q、H272V、S279D、Y281P、K308Q及びK312Qからなる群から選択される少なくとも1つの置換、好ましくは少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9又は10個の置換、より好ましくは前記置換の全て；並びにc)置換S199Wを含む。このようなバリエーションは、例えば、V106M/N、D111R、T120V、E150N、D171F及びI278Vからなる群から選択される1つ以上の追加の置換をさらに含み得る。

40

【0090】

一実施形態では、ヘキサミニダーゼバリエーションは、配列番号1と比較して、a) S163P、N227T、N252P及びK309Eからなる群から選択される2つ、3つ、

50

又は好ましくは4つの置換；b) H15Y、S186R、S225G、E232D、G235W、N260Q、H272V、S279D、Y281P、K308Q及びK312Qからなる群から選択される少なくとも1つの置換、好ましくは少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9又は10個の置換、より好ましくは前記置換の全て；並びにc)置換S208Wを含む。このようなバリエーションは、例えば、V106M／N、D111R、T120V、E150N、D171F及びI278Vからなる群から選択される1つ以上の追加の置換をさらに含み得る。

【0091】

一実施形態では、ヘキササミニダーゼバリエーションは、配列番号1と比較して、a) S163P、N227T、N252P及びK309Eからなる群から選択される2つ、3つ、又は好ましくは4つの置換；b) H15Y、S186R、S225G、E232D、G235W、N260Q、H272V、S279D、Y281P、K308Q及びK312Qからなる群から選択される少なくとも1つの置換、好ましくは少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9又は10個の置換、より好ましくは前記置換の全て；並びにc)置換F254Iを含む。このようなバリエーションは、例えば、V106M／N、D111R、T120V、E150N、D171F及びI278Vからなる群から選択される1つ以上の追加の置換をさらに含み得る。

【0092】

一実施形態では、ヘキササミニダーゼバリエーションは、配列番号1と比較して、a) S163P、N227T、N252P及びK309Eからなる群から選択される2つ、3つ、又は好ましくは4つの置換；b) H15Y、S186R、S225G、E232D、G235W、N260Q、H272V、S279D、Y281P、K308Q及びK312Qからなる群から選択される少なくとも1つの置換、好ましくは少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9又は10個の置換、より好ましくは前記置換の全て；並びにc)置換T255Dを含む。このようなバリエーションは、例えば、V106M／N、D111R、T120V、E150N、D171F及びI278Vからなる群から選択される1つ以上の追加の置換をさらに含み得る。

【0093】

一実施形態では、ヘキササミニダーゼバリエーションは、配列番号1と比較して、a) S163P、N227T、N252P及びK309Eからなる群から選択される2つ、3つ、又は好ましくは4つの置換；b) H15Y、S186R、S225G、E232D、G235W、N260Q、H272V、S279D、Y281P、K308Q及びK312Qからなる群から選択される少なくとも1つの置換、好ましくは少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9又は10個の置換、より好ましくは前記置換の全て；並びにc)置換I278Vを含む。このようなバリエーションは、例えば、V106M／N、D111R、T120V、E150N及びD171Fからなる群から選択される1つ以上の追加の置換をさらに含み得る。

【0094】

本発明の特定のヘキササミニダーゼバリエーションの例としては、配列番号1、配列番号2又は配列番号3と比較して、好ましくは配列番号2と比較して、以下の置換又は置換セットの少なくとも1つを含むバリエーションが挙げられる：

- D111R
- D111R+T120V
- D111R+T120V+E150N
- D111R+T120V+E150N+D171F+I278V
- D111R+T120V+T255D
- D111R+T120V+Y124I
- D111R+T120V+Y124K+Q178K
- D111R+T120V+Y124L+Q178K
- D111R+Y124K+D171F

10

20

30

40

50

- D 1 7 1 F + S 2 0 8 W + N 2 6 7 T
- D 1 7 1 F + T 2 5 5 D
- D 1 7 1 H
- I 2 7 8 V
- K 3 0 8 E
- N 2 6 7 T
- R 1 2 7 P
- T 1 2 0 V + D 1 7 1 F
- T 1 2 0 V + D 1 7 1 F + N 2 6 7 T
- T 1 2 0 V + S 2 0 8 W + N 2 6 7 T
- T 1 2 0 V + T 2 5 5 D
- T 1 2 0 V + T 2 5 5 D + N 2 6 7 T
- T 1 2 0 V + Y 1 2 4 K + Q 1 7 8 K
- V 1 0 6 M + D 1 1 1 R + T 1 2 0 V + D 1 7 1 F
- V 1 0 6 M + Q 1 7 8 K + T 2 5 5 D
- V 1 0 6 M + T 1 2 0 V + D 1 7 1 F + Q 1 7 8 K
- V 1 0 6 M + T 1 2 0 V + Y 1 2 4 I + D 1 7 1 F
- V 1 0 6 M + T 1 2 0 V + Y 1 2 4 I + Q 1 7 8 K
- V 1 0 6 M + T 1 2 0 V + Y 1 2 4 K + D 1 7 1 F
- V 1 0 6 M + T 1 2 0 V + Y 1 2 4 L + Q 1 7 8 K
- V 1 0 6 N + D 1 1 1 R + T 1 2 0 V + E 1 5 0 N
- V 1 0 6 N + S 2 0 8 W + N 2 6 7 T
- V 1 0 6 N + T 1 2 0 V + D 1 7 1 F
- V 1 0 6 N + T 1 2 0 V + D 1 7 1 F + S 2 0 8 W
- V 1 0 6 N + T 1 2 0 V + E 1 5 0 N + D 1 7 1 F + I 2 7 8 V
- V 1 0 6 N + T 1 2 0 V + N 2 6 7 T

【 0 0 9 5 】

上記に列挙した特定のヘキササミニダーゼバリエントは、配列番号 2 又は配列番号 3 と比較して、好ましくは配列番号 2 と比較して、少なくとも 8 0 %、好ましくは少なくとも 8 5 %、より好ましくは少なくとも 9 0 %、例えば少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 % 又は少なくとも 9 9 % の配列同一性を有し得る。

【 0 0 9 6 】

本発明の特定のヘキササミニダーゼバリエントの他の例としては、配列番号 1、配列番号 2 又は配列番号 3 と比較して、好ましくは配列番号 3 と比較して、以下の置換又は置換セットの少なくとも 1 つを含むバリエントが挙げられる：

- L 1 7 0 G
- E 1 5 0 N + F 2 5 4 I
- F 2 5 4 I
- V 1 0 6 N
- D 1 1 1 R + T 1 2 0 V
- D 1 1 1 R + T 1 2 0 V + E 1 5 0 N
- D 1 1 1 R + T 1 2 0 V + E 1 5 0 N + D 1 7 1 F + I 2 7 8 V
- D 1 1 1 R + T 1 2 0 V + T 2 5 5 D
- D 1 1 1 R + T 1 2 0 V + Y 1 2 4 I
- D 1 1 1 R + T 1 2 0 V + Y 1 2 4 K + Q 1 7 8 K
- D 1 1 1 R + T 1 2 0 V + Y 1 2 4 L + Q 1 7 8 K
- D 1 1 1 R + Y 1 2 4 K + D 1 7 1 F
- D 1 7 1 F + S 2 0 8 W + N 2 6 7 T
- D 1 7 1 F + T 2 5 5 D

- D 1 7 1 H
- I 2 7 8 V
- K 3 0 8 E
- N 2 6 7 T
- R 1 2 7 P
- T 1 2 0 V + D 1 7 1 F
- T 1 2 0 V + D 1 7 1 F + N 2 6 7 T
- T 1 2 0 V + S 2 0 8 W + N 2 6 7 T
- T 1 2 0 V + T 2 5 5 D
- T 1 2 0 V + T 2 5 5 D + N 2 6 7 T
- T 1 2 0 V + Y 1 2 4 K + Q 1 7 8 K
- V 1 0 6 M + D 1 1 1 R + T 1 2 0 V + D 1 7 1 F
- V 1 0 6 M + Q 1 7 8 K + T 2 5 5 D
- V 1 0 6 M + T 1 2 0 V + D 1 7 1 F + Q 1 7 8 K
- V 1 0 6 M + T 1 2 0 V + Y 1 2 4 I + D 1 7 1 F
- V 1 0 6 M + T 1 2 0 V + Y 1 2 4 I + Q 1 7 8 K
- V 1 0 6 M + T 1 2 0 V + Y 1 2 4 K + D 1 7 1 F
- V 1 0 6 M + T 1 2 0 V + Y 1 2 4 L + Q 1 7 8 K
- V 1 0 6 N + D 1 1 1 R + T 1 2 0 V + E 1 5 0 N
- V 1 0 6 N + S 2 0 8 W + N 2 6 7 T
- V 1 0 6 N + T 1 2 0 V + D 1 7 1 F
- V 1 0 6 N + T 1 2 0 V + D 1 7 1 F + S 2 0 8 W
- V 1 0 6 N + T 1 2 0 V + E 1 5 0 N + D 1 7 1 F + I 2 7 8 V
- V 1 0 6 N + T 1 2 0 V + N 2 6 7 T

10

20

30

40

50

【0097】

上記に列挙した特定のヘキソサミニダーゼバリエントは、配列番号2又は配列番号3と比較して、好ましくは配列番号3と比較して、少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、例えば少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%又は少なくとも99%の配列同一性を有し得る。

【0098】

本発明の好ましいヘキソサミニダーゼバリエントの例としては、配列番号1と比較して、以下の置換セットの1つを含むバリエントが挙げられる：

- Q 3 I + H 1 5 Y + A 4 9 W + N 5 9 E + D 1 1 1 R + T 1 2 0 V + S 1 6 3 P + S 1 8 6 R + S 2 2 5 G + N 2 2 7 T + E 2 3 2 D + G 2 3 5 W + N 2 5 2 P + N 2 6 0 Q + H 2 7 2 V + S 2 7 9 D + Y 2 8 1 P + K 3 0 8 Q + K 3 0 9 E + K 3 1 2 Q
- Q 3 I + H 1 5 Y + A 4 9 W + N 5 9 E + D 1 1 1 R + T 1 2 0 V + E 1 5 0 N + S 1 6 3 P + S 1 8 6 R + S 2 2 5 G + N 2 2 7 T + E 2 3 2 D + G 2 3 5 W + N 2 5 2 P + N 2 6 0 Q + H 2 7 2 V + S 2 7 9 D + Y 2 8 1 P + K 3 0 8 Q + K 3 0 9 E + K 3 1 2 Q
- Q 3 I + H 1 5 Y + A 4 9 W + N 5 9 E + D 1 1 1 R + T 1 2 0 V + E 1 5 0 N + S 1 6 3 P + D 1 7 1 F + S 1 8 6 R + S 2 2 5 G + N 2 2 7 T + E 2 3 2 D + G 2 3 5 W + N 2 5 2 P + N 2 6 0 Q + H 2 7 2 V + I 2 7 8 V + S 2 7 9 D + Y 2 8 1 P + K 3 0 8 Q + K 3 0 9 E + K 3 1 2 Q
- Q 3 I + H 1 5 Y + A 4 9 W + N 5 9 E + D 1 1 1 R + T 1 2 0 V + S 1 6 3 P + S 1 8 6 R + S 2 2 5 G + N 2 2 7 T + E 2 3 2 D + G 2 3 5 W + N 2 5 2 P + T 2 5 5 D + N 2 6 0 Q + H 2 7 2 V + S 2 7 9 D + Y 2 8 1 P + K 3 0 8 Q + K 3 0 9 E + K 3 1 2 Q
- Q 3 I + H 1 5 Y + A 4 9 W + N 5 9 E + D 1 1 1 R + T 1 2 0 V + Y 1 2 4 I + S 1 6 3 P + S 1 8 6 R + S 2 2 5 G + N 2 2 7 T + E 2 3 2 D + G 2 3 5 W + N 2 5 2 P +

50

• Q 3 I + H 1 5 Y + A 4 9 W + N 5 9 E + T 1 2 0 V + S 1 6 3 P + S 1 8 6 R + S 2
2 5 G + N 2 2 7 T + E 2 3 2 D + G 2 3 5 W + N 2 5 2 P + T 2 5 5 D + N 2 6 0 Q +
N 2 6 7 T + H 2 7 2 V + S 2 7 9 D + Y 2 8 1 P + K 3 0 8 Q + K 3 0 9 E + K 3 1 2
Q

• Q 3 I + H 1 5 Y + A 4 9 W + N 5 9 E + T 1 2 0 V + Y 1 2 4 K + S 1 6 3 P + Q 1
7 8 K + S 1 8 6 R + S 2 2 5 G + N 2 2 7 T + E 2 3 2 D + G 2 3 5 W + N 2 5 2 P +
N 2 6 0 Q + H 2 7 2 V + S 2 7 9 D + Y 2 8 1 P + K 3 0 8 Q + K 3 0 9 E + K 3 1 2
Q

• Q 3 I + H 1 5 Y + A 4 9 W + N 5 9 E + V 1 0 6 M + D 1 1 1 R + T 1 2 0 V + S 1
6 3 P + D 1 7 1 F + S 1 8 6 R + S 2 2 5 G + N 2 2 7 T + E 2 3 2 D + G 2 3 5 W +
N 2 5 2 P + N 2 6 0 Q + H 2 7 2 V + S 2 7 9 D + Y 2 8 1 P + K 3 0 8 Q + K 3 0 9
E + K 3 1 2 Q

• Q 3 I + H 1 5 Y + A 4 9 W + N 5 9 E + V 1 0 6 M + S 1 6 3 P + Q 1 7 8 K + S 1
8 6 R + S 2 2 5 G + N 2 2 7 T + E 2 3 2 D + G 2 3 5 W + N 2 5 2 P + T 2 5 5 D +
N 2 6 0 Q + H 2 7 2 V + S 2 7 9 D + Y 2 8 1 P + K 3 0 8 Q + K 3 0 9 E + K 3 1 2
Q

• Q 3 I + H 1 5 Y + A 4 9 W + N 5 9 E + V 1 0 6 M + T 1 2 0 V + S 1 6 3 P + D 1
7 1 F + Q 1 7 8 K + S 1 8 6 R + S 2 2 5 G + N 2 2 7 T + E 2 3 2 D + G 2 3 5 W +
N 2 5 2 P + N 2 6 0 Q + H 2 7 2 V + S 2 7 9 D + Y 2 8 1 P + K 3 0 8 Q + K 3 0 9
E + K 3 1 2 Q

• Q 3 I + H 1 5 Y + A 4 9 W + N 5 9 E + V 1 0 6 M + T 1 2 0 V + Y 1 2 4 I + S 1
6 3 P + D 1 7 1 F + S 1 8 6 R + S 2 2 5 G + N 2 2 7 T + E 2 3 2 D + G 2 3 5 W +
N 2 5 2 P + N 2 6 0 Q + H 2 7 2 V + S 2 7 9 D + Y 2 8 1 P + K 3 0 8 Q + K 3 0 9
E + K 3 1 2 Q

• Q 3 I + H 1 5 Y + A 4 9 W + N 5 9 E + V 1 0 6 M + T 1 2 0 V + Y 1 2 4 I + S 1
6 3 P + Q 1 7 8 K + S 1 8 6 R + S 2 2 5 G + N 2 2 7 T + E 2 3 2 D + G 2 3 5 W +
N 2 5 2 P + N 2 6 0 Q + H 2 7 2 V + S 2 7 9 D + Y 2 8 1 P + K 3 0 8 Q + K 3 0 9
E + K 3 1 2 Q

• Q 3 I + H 1 5 Y + A 4 9 W + N 5 9 E + V 1 0 6 M + T 1 2 0 V + Y 1 2 4 K + S 1
6 3 P + D 1 7 1 F + S 1 8 6 R + S 2 2 5 G + N 2 2 7 T + E 2 3 2 D + G 2 3 5 W +
N 2 5 2 P + N 2 6 0 Q + H 2 7 2 V + S 2 7 9 D + Y 2 8 1 P + K 3 0 8 Q + K 3 0 9
E + K 3 1 2 Q

• Q 3 I + H 1 5 Y + A 4 9 W + N 5 9 E + V 1 0 6 M + T 1 2 0 V + Y 1 2 4 L + S 1
6 3 P + Q 1 7 8 K + S 1 8 6 R + S 2 2 5 G + N 2 2 7 T + E 2 3 2 D + G 2 3 5 W +
N 2 5 2 P + N 2 6 0 Q + H 2 7 2 V + S 2 7 9 D + Y 2 8 1 P + K 3 0 8 Q + K 3 0 9
E + K 3 1 2 Q

• Q 3 I + H 1 5 Y + A 4 9 W + N 5 9 E + V 1 0 6 N + D 1 1 1 R + T 1 2 0 V + E 1
5 0 N + S 1 6 3 P + S 1 8 6 R + S 2 2 5 G + N 2 2 7 T + E 2 3 2 D + G 2 3 5 W +
N 2 5 2 P + N 2 6 0 Q + H 2 7 2 V + S 2 7 9 D + Y 2 8 1 P + K 3 0 8 Q + K 3 0 9
E + K 3 1 2 Q

• Q 3 I + H 1 5 Y + A 4 9 W + N 5 9 E + V 1 0 6 N + S 1 6 3 P + S 1 8 6 R + S 2
0 8 W + S 2 2 5 G + N 2 2 7 T + E 2 3 2 D + G 2 3 5 W + N 2 5 2 P + N 2 6 0 Q +
N 2 6 7 T + H 2 7 2 V + S 2 7 9 D + Y 2 8 1 P + K 3 0 8 Q + K 3 0 9 E + K 3 1 2
Q

• Q 3 I + H 1 5 Y + A 4 9 W + N 5 9 E + V 1 0 6 N + T 1 2 0 V + S 1 6 3 P + D 1
7 1 F + S 1 8 6 R + S 2 2 5 G + N 2 2 7 T + E 2 3 2 D + G 2 3 5 W + N 2 5 2 P +
N 2 6 0 Q + H 2 7 2 V + S 2 7 9 D + Y 2 8 1 P + K 3 0 8 Q + K 3 0 9 E + K 3 1 2
Q

• Q 3 I + H 1 5 Y + A 4 9 W + N 5 9 E + V 1 0 6 N + T 1 2 0 V + S 1 6 3 P + D 1
7 1 F + S 1 8 6 R + S 2 0 8 W + S 2 2 5 G + N 2 2 7 T + E 2 3 2 D + G 2 3 5 W +

10

20

30

40

50

50

本明細書中で開示されるヘキソサミニダーゼバリエントは、バリエント内に置換のない親ヘキソサミニダーゼに対して少なくとも60%の配列同一性を有する。バリエントは、例えば、親ヘキソサミニダーゼに対して少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%又は少なくとも80%の配列同一性を有し得る。ヘキソサミニダーゼバリエントは、例えば、親ヘキソサミニダーゼに対して少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%又は少なくとも95%、例えば少なくとも96%、少なくとも97%。少なくとも98%又は少なくとも99%、但し100%未満の配列同一性を有し得る。

【0100】

特に、本明細書で開示されるヘキソサミニダーゼバリエントのいずれも、配列番号1、配列番号2又は配列番号3に対して少なくとも60%の配列同一性を有する。ヘキソサミニダーゼバリエントは、例えば、配列番号1、2又は3のいずれかに対して、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%又は少なくとも80%の配列同一性を有し得る。ヘキソサミニダーゼバリエントは、例えば、配列番号1、2又は3のいずれかに対して、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%又は少なくとも95%、例えば少なくとも96%、少なくとも97%又は少なくとも98%、但し100%未満の配列同一性を有し得る。

【0101】

一態様では、本発明のヘキソサミニダーゼバリエントは、配列番号2に対して、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%又は少なくとも95%、例えば少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%又は少なくとも99%、但し100%未満の配列同一性を有する。

【0102】

別の態様では、本発明のヘキソサミニダーゼバリエントは、配列番号3に対して、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%又は少なくとも95%、例えば少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%又は少なくとも99%、但し100%未満の配列同一性を有する。

【0103】

一態様では、配列番号1、2又は3と比較した本発明のバリエントにおける改変の数は、1~20個、例えば1~10個、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10個の改変である。

【0104】

本明細書に記載のバリエントは、N末端及び／又はC末端において1つ以上のアミノ酸の伸長をさらに含み得る。或いは、バリエントは、N末端及び／又はC末端において1つ以上のアミノ酸のランケーションをさらに含み得る。

【0105】

したがって、本発明は、N末端及び／若しくはC末端における1つ以上のアミノ酸の伸長、又はN末端及び／若しくはC末端における1つ以上のランケーション短縮を含む本明細書に開示されるバリエントであって、ヘキソサミニダーゼ活性を有し、配列番号1のポリペプチドと比較して、又は配列番号2若しくは配列番号3のポリペプチドと比較して、洗剤安定性が向上しているバリエントを含む。

【0106】

本発明のバリエントは、任意選択により、マイナーな性質のもの、すなわち、タンパク質の折畳み及び／若しくは活性に大きく影響しない保存的アミノ酸置換若しくは挿入；典型的には1~30アミノ酸の、小さな欠失；アミノ末端メチオニン残基などの小さなアミノ若しくはカルボキシル末端伸長；最大20~25残基の小さなリンカーペプチド；又は正味荷電若しくは別の機能を変えることによって精製を促進する小さな伸長、例えばポリヒスチジン尾部、抗原性エピトープ若しくは結合ドメインであり得る他のアミノ鎖変化を含み得る。

【0107】

保存的置換の例は、塩基性アミノ酸（アルギニン、リシン、及びヒスチジン）、酸性アミノ酸（グルタミン酸及びアスパラギン酸）、極性アミノ酸（グルタミン及びアスパラギン）、疎水性アミノ酸（ロイシン、イソロイシン、及びバリン）、芳香族アミノ酸（フェニルアラニン、トリプトファン、及びチロシン）、及び低分子アミノ酸（グリシン、アラニン、セリン、トレオニン、及びメチオニン）からなる群内にある。概して比活性を変更しないアミノ酸置換が、当該技術分野において知られており、例えば H. Neurath and R. L. Hill, 1979, In, The Proteins, Academic Press, New York に記載されている。一般的な置換としては、Ala/Ser、Val/Ile、Asp/Glu、Thr/Ser、Ala/Gly、Ala/Thr、Ser/Asn、Ala/Val、Ser/Gly、Tyr/Phe、Ala/Pro、Lys/Arg、Asp/Asn、Leu/Ile、Leu/Val、Ala/Glu、及び Asp/Gly がある。

10

【0108】

或いは、アミノ酸変化は、ポリペプチドの物理化学的性質が変更されるような性質のものである。例えば、アミノ酸の変化により、ポリペプチドの熱安定性が向上する、基質特異性が変わる、最適な pH が変わるなどが生ずる可能性がある。

【0109】

ポリペプチド内の必須アミノ酸を、部位特異的変異誘発又はアラニン走査変異誘発（Cunningham and Wells, 1989, Science 244:1081-1085）などの当該技術分野において知られている手法に従って特定することができる。後者の技術では、分子中の全ての残基毎に単一のアラニン変異を導入し、得られた分子を、ヘキソサミニダーゼ活性について試験して、分子の活性に不可欠なアミノ酸残基を特定する。Hilton et al., 1996, J. Biol. Chem. 271:4699-4708 も参照されたい。また、酵素の活性部位又は他の生物学的相互作用を、推定される接触部位アミノ酸の変異と組み合わせた、核磁気共鳴、結晶構造解析、電子回折又は光親和性標識などの技術によって測定される構造の物理的分析によって判定することもできる。例えば、de Vos et al., 1992, Science 255:306-312; Smith et al., 1992, J. Mol. Biol. 224:899-904; Wlodaver et al., 1992, FEBS Lett. 309:59-64 を参照されたい。必須アミノ酸の同定は、関連ポリペプチドとのアラインメントから推測することもでき、且つ／又は関連ポリペプチドとの、又はポリペプチド若しくはタンパク質ファミリ内で、共通祖先に由来するポリペプチド／タンパク質（典型的には類似の三次元構造、機能及び有意な配列類似性を有する）との、配列相同性及び保存された触媒機構から推測することもできる。加えて、又は或いは、必須アミノ酸及び／又はポリペプチドの活性部位を同定するためのタンパク質構造モデリングに、タンパク質構造予測ツールが使用され得る。例えば、Jumper et al., 2021, "Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold", Nature 596:583-589 を参照されたい。

20

30

【0110】

バリエーションは、300～350個のアミノ酸、例えば310～340個、315～335個又は320～330個のアミノ酸から構成され得る。

40

【0111】

一実施形態において、バリエーションは、親酵素と比較して、安定性が向上し、特に保存安定性が向上する、すなわち洗剤組成物中の保存下での安定性が向上した。上記のように、安定性の向上は、例えば、本明細書の実施例に記載のように、半減期向上因子（HIF）によって表され得る。

【0112】

一実施形態において、ヘキソサミニダーゼバリエーションは、親ヘキソサミニダーゼと比較して、半減期向上因子（HIF）として表される安定性が向上しており、すなわち HIF

50

値は1を超える。好ましくは、バリエーションは、例えば本明細書中の実施例に記載されるように決定される、親と比較した半減期向上因子が、少なくとも1.2、少なくとも1.3、少なくとも1.4、少なくとも1.5、少なくとも1.6、少なくとも1.7、少なくとも1.8、少なくとも1.9又は少なくとも2.0である。好ましい実施形態において、バリエーションは、親と比較した半減期向上因子が少なくとも2.5、少なくとも3.0、少なくとも3.5、又は少なくとも4.0であり得る。

【0113】

本発明のヘキソサミニダーゼバリエーションは、当該技術分野において知られている標準的なタンパク質精製方法を用いて、好ましくは単離、より好ましくは精製されている。

【0114】

バリエーションの生成

本発明はまた、ヘキソサミニダーゼ活性を有するバリエーションを得るための方法であって、

(a) 配列番号1の位置163、227、252及び309に対応する1つ以上の位置、好ましくは2、3又は4つの位置での置換；並びに配列番号1の位置106、111、120、124、127、150、170、171、178、199、208、254、255及び278に対応する1つ以上の位置での置換を親ヘキソサミニダーゼに導入すること；

(b) バリエーションを回収することと

を含み、

バリエーションは、ヘキソサミニダーゼ活性を有し、且つ配列番号1、配列番号2又は配列番号3のポリペプチドに対して少なくとも60%、例えば少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%又は少なくとも95%の配列同一性（但し、100%未満の配列同一性）を有する、方法に関する。

【0115】

好ましくは、本方法は、配列番号1と比較して、(i) S163P、N227T、N252P及びK309Eからなる群から選択される2、3又は4つの置換；並びに(ii) V106M、V106N、D111R、T120V、Y124I、Y124K、Y124L、R127P、E150N、L170G、D171F、D171H、Q178K、S199W、S208W、F254I、T255D及びI278Vからなる群から選択される少なくとも1つの置換を、親ヘキソサミニダーゼに導入する工程を含む。(ii)において親ヘキソサミニダーゼに導入される好ましい置換は、V106M/N、D111R、T120V、E150N、D171F及びI278V、例えば前記置換の少なくとも2つを含む。特に好ましい置換は、D111R、T120V及びE150Nの1、2又は3つを含む。

【0116】

本方法は、好ましくは、配列番号1と比較して、H15Y、S186R、S225G、E232D、G235W、N260Q、H272V、S279D、Y281P、K308Q及びK312Qからなる群から選択される少なくとも1つの置換、例えば、前記置換の2、3、4、5、6、7、8、9、10個又は全てを親ヘキソサミニダーゼに導入することをさらに含む。本方法は、より好ましくは、配列番号1と比較して、Q3I、A49W及びN59Eからなる群から選択される1つ以上の置換、好ましくは前記置換の2つ若しくは3つ全て；又はQ3F、V140I、Q215K及びN267Tからなる群から選択される1つ以上の置換、好ましくは前記置換の2つ、3つ若しくは4つ全てを親ヘキソサミニダーゼに導入することを含む。

【0117】

他の実施形態において、方法は、(a) 親ヘキソサミニダーゼに、見出し「バリエーション」下で先に一覧した置換セットのいずれかを導入することであって、位置番号は、配列番号1の付番に基づき、バリエーションは、配列番号1、配列番号2、又は配列番号3のポリペ

10

20

30

40

50

ブチドに対して少なくとも60%、例えば少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%又は少なくとも95%、但し100%未満の配列同一性を有し、且つバリエーションはヘキササミニダーゼ活性を有する、導入することと；(b) バリエーションを回収することを含む。

【0118】

好ましくは、本明細書に開示の方法によって得られるバリエーションは、配列番号2又は配列番号3と比較して、少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、例えば少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%又は少なくとも98%の配列同一性を有する。

10

【0119】

バリエーションは、部位特異的変異誘発、合成遺伝子構築、半合成遺伝子構築、ランダム変異誘発、DNAシャッフリングなどの、当該技術分野において知られているあらゆる変異誘発手法を用いて調製することができる。

【0120】

ポリヌクレオチド

また、本発明は、本発明のバリエーションをコードするポリヌクレオチドに関する。

【0121】

ポリヌクレオチドは、ゲノムDNA、cDNA、合成DNA、合成RNA、mRNA、又はそれらの組合せであり得る。

20

【0122】

ある態様では、ポリヌクレオチドは、単離される。

【0123】

別の態様では、ポリヌクレオチドは、精製される。

【0124】

核酸コンストラクト

また、本発明は、本発明のバリエーションをコードするポリヌクレオチドであって、制御配列と適合する条件の下で、適切な宿主細胞においてコード配列の発現を誘導する1つ以上の制御配列に作動可能に連結されているポリヌクレオチドを含む核酸コンストラクトに関する。用いられ得る制御配列の例として、プロモータ、ターミネータ、mRNAスタビライザ、リーダー配列、ポリアデニル化配列、シグナルペプチド、プロペプチド、調節配列、及び転写因子があり、これらは全て当該技術分野においてよく知られている。

30

【0125】

ポリヌクレオチドは、バリエーションの発現をもたらす種々の方法で操作され得る。ベクター中に挿入する前に、発現ベクターに応じてポリヌクレオチドを操作するのが望ましいか、又は必要であり得る。組換えDNA法を利用してポリヌクレオチドを修飾するための技法は、当該技術分野においてよく知られている。

【0126】

発現ベクター

また、本発明は、本発明のバリエーションをコードするポリヌクレオチド、プロモータ、並びに転写及び翻訳終止シグナルを含む組換え発現ベクターに関する。種々のヌクレオチド及び制御配列は、一緒に連結されて、1つ以上の都合のよい制限部位を含むことで、そのような部位にて、バリエーションをコードするポリヌクレオチドを挿入又は置換することを可能にする組換え発現ベクターを生成することができる。これ以外にも、発現に適切なベクター中にポリヌクレオチド、又はポリヌクレオチドを含む核酸コンストラクトを挿入することによって、ポリヌクレオチドを発現させることができる。発現ベクターを作製する際に、コード配列は、発現に適切な制御配列と作動可能にコード配列が連結されるようにベクター内に配置される。

40

【0127】

組換え発現ベクターは、組換えDNAの手法に都合よく供することが可能であり、且つ

50

ポリヌクレオチドの発現をもたらすことが可能であるあらゆるベクター（例えば、プラスミド又はウイルス）であり得る。ベクターの選択は、典型的に、ベクターの、当該ベクターが導入されることとなる宿主細胞との適合性に依存することになる。ベクターは、直鎖状又は閉環状のプラスミドであり得る。組換え発現に適した発現ベクターが、例えば、当該ベクターを宿主細胞中に導入する方法として、当該技術分野においてよく知られている。

【0128】

宿主細胞

また、本発明は、本発明のバリエーションの生成を誘導する1つ以上の制御配列に作動可能に連結されている本発明のポリヌクレオチドを含む組換え宿主細胞に関する。

10

【0129】

ポリヌクレオチドを含むコンストラクト又はベクターが宿主細胞中に導入されることで、コンストラクト又はベクターは、前述されるように、染色体組込み体又は自己複製染色体外ベクターとして維持される。宿主細胞の選択は、バリエーションをコードする遺伝子及びその供給源に大きく依存することとなる。組換え宿主細胞は、本発明のポリヌクレオチドの単一のコピー、又は少なくとも2つのコピー、例えば、3つ、4つ、5つ、若しくはそれを超えるコピーを含み得る。

【0130】

宿主細胞は、本発明のポリペプチドの組換え生成に有用なあらゆる微生物細胞、例えば、原核細胞又は真菌細胞であり得る。

20

【0131】

原核生物の宿主細胞は、あらゆるグラム陽性細菌又はグラム陰性細菌であり得る。グラム陽性細菌として、バチルス属 (*Bacillus*)、クロストリジウム属 (*Clostridium*)、エンテロコッカス属 (*Enterococcus*)、ゲオバチルス属 (*Geobacillus*)、ラクトバチルス属 (*Lactobacillus*)、ラクトコッカス属 (*Lactococcus*)、オセアノバチルス属 (*Oceanobacillus*)、スタフィロコッカス属 (*Staphylococcus*)、ストレプトコッカス属 (*Streptococcus*)、及びストレプトマイセス属 (*Streptomyces*) が挙げられるが、これらに限定されない。グラム陰性細菌として、カンピロバクター属 (*Campylobacter*)、*E. コリ* (*E. coli*)、フラボバクテリウム属 (*Flavobacterium*)、フソバクテリウム属 (*Fusobacterium*)、ヘリコバクター属 (*Helicobacter*)、イリオバクター属 (*Ilyobacter*)、ナイセリア属 (*Neisseria*)、シュードモナス属 (*Pseudomonas*)、サルモネラ属 (*Salmonella*)、及びウレアプラズマ属 (*Ureaplasma*) が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0132】

細菌宿主細胞は、以下に限定されないが、バチルス・アルカロフィラス (*Bacillus alkalophilus*)、バチルス・アミロリクエファシエンス (*Bacillus amyloliquefaciens*)、バチルス・ブレビス (*Bacillus brevis*)、バチルス・サークルランス (*Bacillus circulans*)、バチルス・クラウジイ (*Bacillus clausii*)、バチルス・コアグラランス (*Bacillus coagulans*)、バチルス・ファーマス (*Bacillus firmus*)、バチルス・ロータス (*Bacillus lautus*)、バチルス・レントス (*Bacillus lentus*)、バチルス・リケニフォルミス (*Bacillus licheniformis*)、バチルス・メガテリウム (*Bacillus megaterium*)、バチルス・プミルス (*Bacillus pumilus*)、バチルス・ステアロサーモフィルス (*Bacillus stearothermophilus*)、バチルス・サブチリス (*Bacillus subtilis*)、及びバチルス・チューリングエンシス (*Bacillus thuringiensis*) の細胞が挙げられるあらゆるバチルス属 (*Bacillus*) 細胞であり得る。

40

50

【0133】

真菌宿主細胞は、酵母細胞又は糸状真菌細胞であり得る。

【0134】

糸状真菌宿主細胞は、例えば、アクレモニウム属 (*Acremonium*)、アスペルギルス属 (*Aspergillus*)、アウレオバシジウム属 (*Aureobasidium*)、ヤケイロタケ属 (*Bjerkandera*)、セリポリオプシス属 (*Ceriporiopsis*)、クリソスポリウム属 (*Chrysosporium*)、コプリナス属 (*Coprinus*)、カワラタケ属 (*Coriolus*)、クリプトコッカス属 (*Cryptococcus*)、フィリバシジウム属 (*Filibasidium*)、フザリウム属 (*Fusarium*)、フミコラ属 (*Humicola*)、マグナポルテ属 (*Magnaporthe*)、ムコール属 (*Mucor*)、ミセリオフトラ属 (*Myceliophthora*)、ネオカリマスティクス属 (*Neocallimastix*)、ニューロスポラ属 (*Neurospora*)、ペシロマイセス属 (*Paecilomyces*)、ペニシリウム属 (*Penicillium*)、ファネロカエテ属 (*Phanerochaete*)、フレビア属 (*Phlebia*)、ピロミセス属 (*Piromyces*)、ヒラタケ属 (*Pleurotus*)、シゾフィラム属 (*Schizophyllum*)、タラロマイセス属 (*Talaromyces*)、サーモアスカス属 (*Thermoascus*)、チエラビア属 (*Thielavia*)、トリポクラディウム属 (*Tolypocladium*)、ハウロクタケ属 (*Trametes*)、又はトリコデルマ属 (*Trichoderma*) の細胞であり得る。好ましい実施形態において、糸状真菌宿主細胞は、アスペルギルス属 (*Aspergillus*)、トリコデルマ属 (*Trichoderma*)、又はフザリウム属 (*Fusarium*) の細胞である。さらに好ましい実施形態において、糸状真菌宿主細胞は、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*)、アスペルギルス・オリゼー (*Aspergillus oryzae*)、トリコデルマ・リーセイ (*Trichoderma reesei*)、又はフザリウム・ベネタム (*Fusarium venenatum*) 細胞である。

【0135】

一態様において、宿主細胞は、単離、好ましくは精製されている。

【0136】

生成方法

また、本発明は、本発明のバリエントを生成する方法であって、(a) バリエントの生成に資する条件下で本発明の組換え宿主細胞を培養すること；及び任意選択により (b) バリエントを回収することを含む方法に関する。

【0137】

宿主細胞は、当該技術分野において知られている方法を用いて、バリエントの生成に適した栄養培地中で培養される。例えば、細胞は、適切な培地中での、且つバリエントの発現及び／又は単離が可能になる条件の下でのラボ用又は工業用発酵槽におけるフラスコ振盪培養又は小規模若しくは大規模発酵（連続、バッチ、フェドバッチ、又は固体状態の発酵が挙げられる）によって培養され得る。適切な培地は、商業的供給者から入手可能であるか、又は公開されている組成物に従って調製され得る（例えば、米国菌培養収集所 (*American Type Culture Collection*) のカタログ中）。バリエントが栄養培地中に分泌されるならば、バリエントは、培地から直接的に回収され得る。バリエントが分泌されなければ、細胞可溶化物から回収され得る。

【0138】

バリエントは、バリエントに特有である、当該技術分野において知られている、以下に限定されないが、特異抗体の使用、酵素生成物の形成、酵素基質の消失、又はバリエントの相対活性若しくは比活性を判定する酵素アッセイが挙げられる方法を用いて検出され得る。

【0139】

バリエントは、当該技術分野において知られている、収集、遠心分離、濾過、抽出、噴

霧乾燥、エバポレーション、又は沈殿が挙げられるがこれらに限定されない方法を用いて、培地から回収され得る。一態様において、全発酵ブロスが回収される。別の態様において、ポリペプチドを含む無細胞発酵ブロスが回収される。

【0140】

バリエーションは、実質的に純粋なバリエーション及び／又は断片を得るために、当該技術分野において知られている種々の手順によって精製され得る（例えば、Wingfield, 2015, Current Protocols in Protein Science; 80(1): 6.1.1-6.1.35; Labrou, 2014, Protein Downstream Processing, 1129: 3-10を参照）。

【0141】

代替の態様において、バリエーションは培地から回収されない。

【0142】

組成物

本発明はさらに、本発明による少なくとも1つのヘキソサミニダーゼバリエーション及び少なくとも1つのクリーニング補助成分を含むクリーニング組成物に関する。クリーニング組成物は、例えば、生地などの品目におけるディープクリーニング効果、すなわちバイオフィルム又はその成分の破壊又は除去効果を向上させるために、例えば、品目の粘着性を防止及び／若しくは低下させるために、品目についたしみを前処理するために、洗浄サイクル中の汚れの再沈着を防止及び／若しくは低下させるために、品目への汚れの付着を防止及び／若しくは低下させるために、品目の白さを維持若しくは向上させるために、且つ／又は品目の悪臭を防止及び／若しくは低下させるために使用され得る、本発明のヘキソサミニダーゼバリエーションは、粉末及び液体のクリーニング組成物などの洗剤組成物の様々なタイプにおいて、また、例えば単一単位用量組成物において、有用である。

【0143】

組成物は、界面活性剤、ビルダー、凝集助剤、キレート化剤、移染防止剤、酵素、酵素安定剤、酵素阻害剤、触媒材料、漂白活性化剤、過酸化水素、過酸化水素供給源、事前形成された過酸、ポリマー分散剤、泥汚れ除去／再沈着防止剤、増白剤、泡抑制剤、染料、香料、構造弾性化剤、布地柔軟剤、担体、ヒドロトロップ、ビルダー及びコビルダー、布地色調剤、消泡剤、分散剤、加工助剤、並びに／又は顔料からなる群から選択される1つ以上のクリーニング補助成分を含有し得る。

【0144】

クリーニング組成物は、典型的には、界面活性剤、及び通常、他のクリーニング補助成分、例えばビルダー又は泥／汚れ除去／再沈着防止剤を含有する。

【0145】

クリーニング補助成分は、ヘキソサミニダーゼ以外の1つ以上の酵素であり得る。1つ以上の酵素は、例えば、プロテアーゼ、アミラーゼ、リパーゼ、クチナーゼ、セルラーゼ、DNase、エンドグルカナーゼ、キシログルカナーゼ、ペクチナーゼ、ペクチンリアーゼ、キサントナーゼ、ペルオキシダーゼ、ハロペルオキシゲナーゼ、カタラーゼ及びマンナーゼからなる群から選択され得る。本発明の洗剤組成物に適した具体的な酵素を、以下に記載する。

【0146】

クリーニング組成物は、適切な任意の形態、例えば、バー、均質錠剤、2つ以上の層を有する錠剤、1つ以上の区画を有するパウチ、通常若しくは圧縮した粉末、顆粒、ペースト、ゲル、又は通常の、圧縮した若しくは濃縮した溶液に製剤化され得る。したがって、クリーニング組成物は、例えば、液体洗剤、又は、任意選択で「濃縮」若しくは「圧縮」された形態の粉末若しくは顆粒状の洗剤であり得る。また、単一単位用量の組成物の形態であり得る。

【0147】

クリーニング組成物中のヘキソサミニダーゼの量は、濃度の程度又は組成物のコンパクトさ及び洗浄液中の所望のヘキソサミニダーゼ濃度などの要因に応じて変わり得る。ヘキ

10

20

30

40

50

ソサミニダーゼは通常、クリーニング組成物中に、最大約10,000ppm、典型的には最大約5000ppm又は最大約2000ppmの量で含まれる。ヘキソサミニダーゼは、例えば、クリーニング組成物中に、1ppm~10,000ppm、例えば10ppm~5000ppm、20ppm~2000ppm、50ppm~1000ppm、80ppm~600ppm、又は100ppm~500ppmのレベルで含まれ得る。この文脈における単位「ppm」は、液体組成物（例えば、液体、ゲルなど）に加えられる酵素ではmg/l、固体組成物（例えば、粉末、粒状体、錠剤など）に加えられる酵素ではmg/kgを指すことが意図される。

【0148】

いくつかの態様では、洗剤組成物は、例えば高い温度及び／又はpH、例えば40℃以上及び／又はpH8以上での洗浄に適した、液体又は粉末の洗濯洗剤である。いくつかの態様では、洗剤組成物は、例えば、低い温度及び／又はpH、例えば20℃以下及び／又はpH6以下での洗浄に適した、液体又は粉末の洗濯洗剤である。また、洗剤は、任意選択により最小限の水により、又は水なしで、単位用量洗剤及び／又はコンパクト洗剤として製剤化され得る。また、洗剤は、食器洗浄洗剤であり得る。このような洗濯洗剤及び食器洗浄洗剤は、リン酸塩フリーであり得る。

【0149】

界面活性剤

界面活性剤は、ノニオン性、アニオン性、及び／又は両性界面活性剤の中から選択され得、好ましくはアニオン性又はノニオン性界面活性剤であるが、両性界面活性剤も用いられてもよい。一般に、漂白剤-安定界面活性剤が好ましい。好ましいアニオン性界面活性剤として、硫酸塩界面活性剤、特にアルキルエーテル硫酸塩、とりわけC9~C15アルコールエーテル硫酸塩、C12~C15第一級アルコールエトキシレート、C8~C16硫酸エステル、及びC10~C14硫酸エステル、例えば硫酸モノドデシルエステルがある。アニオン性界面活性剤の非限定的な例として、硫酸塩及びスルホン酸塩、特に、直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩(LAS)、LASの異性体、分枝状アルキルベンゼンスルホン酸塩(BABS)、フェニルアルカンスルホン酸塩、アルファ-オレフィンスルホン酸塩(AOS)、オレフィンスルホン酸塩、アルケンスルホン酸塩、アルカン-2,3-ジイルビス(硫酸塩)、ヒドロキシアルカンスルホン酸塩及びジスルホン酸塩、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)などのアルキル硫酸塩(AS)、脂肪アルコール硫酸塩(FAS)、第一級アルコール硫酸塩(PAS)、アルコールエーテル硫酸塩(AES又はAEOS又はFES、アルコールエトキシ硫酸塩又は脂肪アルコールエーテル硫酸塩としても知られている)、第二級アルカンスルホン酸塩(SAS)、パラフィンスルホン酸塩(PS)、エステルスルホン酸塩、スルホン化脂肪酸グリセロールエステル、メチルエステルスルホン酸塩(MES)が挙げられるアルファ-スルホ脂肪酸メチルエステル(アルファ-SFMe又はSES)、アルキル又はアルケニルコハク酸、ドデセニル/テトラデセニルコハク酸(DTSA)、アミノ酸の脂肪酸誘導体、スルホコハク酸のジエステル及びモノエステル、又は脂肪酸の塩(石鹼)、並びにそれらの組合せが挙げられる。

【0150】

アニオン性界面活性剤は、好ましくは、塩の形態で洗剤に加えられる。これらの塩における適切なカチオンは、ナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩、及びアンモニウム塩、例えば、(2-ヒドロキシエチル)アンモニウム塩、ビス(2-ヒドロキシエチル)アンモニウム塩、及びトリス(2-ヒドロキシエチル)アンモニウム塩などのアルカリ金属イオンである。非イオン性界面活性剤の非限定的な例として、アルコールエトキシレート(AE又はAEO)、アルコールプロポキシレート、プロポキシ化脂肪酸アルキルエステルなどのアルコキシ化脂肪酸アルキルエステル、アルキルフェノールエトキシレート(APE)、ノニルフェノールエトキシレート(NPE)、アルキルポリグリコシド(APG)、アルコキシ化アミン、脂肪酸モノエタノールアミド(FAM)、脂肪酸ジエタノールアミド(FADA)、エトキシ化脂肪酸モノエタノールアミド(EFAM)、プロポキシ化脂肪酸

モノエタノールアミド（PFAM）、ポリヒドロキシアルキル脂肪酸アミド、又はグルコサミンのN-アシルN-アルキル誘導体（グルカミド、GA又は脂肪酸グルカミド、FAGA）、並びに商品名SPAN及びTWEEN（登録商標）で入手可能な製品、並びにそれらの組合せが挙げられる。市販の非イオン性界面活性剤として、BASF社製Plurafac（商標）、Lutensol（商標）、及びPluronic（登録商標）、Cognis社製Dehypon（商標）シリーズ、並びにClariant社製Genapol（商標）シリーズが挙げられる。

【0151】

ビルダー

ビルダーは、好ましくは、リン酸塩、クエン酸ナトリウムビルダー、炭酸ナトリウム、ケイ酸ナトリウム、アルミノケイ酸ナトリウム（ゼオライト）の中から選択される。適切なビルダーとして、アルカリ金属又はアンモニウムリン酸塩、ポリリン酸塩、ホスホン酸塩、ポリリン酸塩、炭酸塩、重炭酸塩、ホウ酸塩、クエン酸塩、及びポリカルボン酸塩がある。クエン酸塩ビルダー、例えば、クエン酸及びその可溶性塩（特にナトリウム塩）は、ポリカルボン酸塩ビルダーである。クエン酸塩は、ゼオライト、BRITESILタイプのようなケイ酸塩、及び／又は積層ケイ酸塩ビルダーと組み合わせて用いることができる。ビルダーは、好ましくは、約0～65重量%、例えば約5重量%～約50重量%の量で添加される。洗濯洗剤中で、ビルダーのレベルは、典型的に、約40～65重量%、特に約50～65重量%、特に20～50重量%である。ビルダー及び／又はコビルダーは、特に、Ca及びMgとの水溶性錯体を形成するキレート化剤であり得る。クリーニング洗剤に用いられる、当該技術分野において知られているあらゆるビルダー及び／又はコビルダーが利用され得る。ビルダーの非限定的な例として、ゼオライト、ニリン酸塩（ピロリン酸塩）、三リン酸ナトリウム（STP又はSTPP）などの三リン酸塩、炭酸ナトリウムなどの炭酸塩、メタケイ酸ナトリウムなどの可溶性ケイ酸塩、積層ケイ酸塩（例えば、HoechstのSKS-6）、及び（カルボキシメチル）イヌリン（CMI）、及びそれらの組合せが挙げられる。ビルダーのさらなる非限定的な例として、クエン酸塩、キレータ、例えば、アミノカルボン酸塩、アミノポリカルボン酸塩、及びホスホン酸塩、並びにアルキル又はアルケニルコハク酸が挙げられる。追加の具体例として、2, 2', 2''-ニトリロ三酢酸（NTA）、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）、ジエチレントリアミン五酢酸（DTPA）、イミノジコハク酸（IDS）、エチレンジアミン-N, N'-ジコハク酸（EDDS）、メチルグリシン-N, N-二酢酸（MGDA）、グルタミン酸-N, N-二酢酸（GLDA）、1-ヒドロキシエタン-1, 1-ジホスホン酸、N-（2-ヒドロキシエチル）イミノ二酢酸（EDG）、アスパラギン酸-N-酢酸（ASMA）、アスパラギン酸-N, N-二酢酸（ASDA）、アスパラギン酸-N-モノプロピオン酸（ASMP）、イミノジコハク酸（IDA）、N-（スルホメチル）アスパラギン酸（SMAS）、N-（2-スルホエチル）-アスパラギン酸（SEAS）、N-（スルホメチルグルタミン酸（SMGL）、N-（2-スルホエチル）-グルタミン酸（SEGL）、N-メチルイミノ二酢酸（MIDA）、セリン-N, N-二酢酸（SEDA）、イソセリン-N, N-二酢酸（ISDA）、フェニルアラニン-N, N-二酢酸（PHDA）、アントラニル酸-N, N-二酢酸（ANDA）、スルファニル酸-N, N-二酢酸（SLDA）、タウリン-N, N-二酢酸（TUDA）、及びN'-（2-ヒドロキシエチル）エチレンジアミン-N, N, N'-三酢酸（HEDTA）、ジエタノールグリシン（DEG）、並びにそれらの組合せ及び塩が挙げられる。本明細書中での使用に適したホスホン酸塩として、1-ヒドロキシエタン-1, 1-ジホスホン酸（HEDP）、エチレンジアミンテトラキス（メチレンホスホン酸）（EDTMPA）、ジエチレントリアミンペンタキス（メチレンホスホン酸）（DTMPA又はDTMPMPA又はDTMPMP）、ニトリロトリス（メチレンホスホン酸）（ATMP又はNTMP）、2-ホスホノブタン-1, 2, 4-トリカルボン酸（PBTC）、ヘキサメチレンジアミンテトラキス（メチレンホスホン酸）（HDTMP）が挙げられる。また、組成物は、0～50重量%、例えば約5%～約30%の洗剤コビルダーを含有してもよい。洗剤組成物は、コビルダーを単独で

、又はビルダー、例えばゼオライトビルダーと組み合わせて含んでもよい。コビルダーの非限定的な例として、ポリアクリレートのホモポリマー又はそのコポリマー、例えば、ポリ（アクリル酸）（PAA）又はコポリ（アクリル酸／マレイン酸）（PAA／PMA）又はポリアスパラギン酸が挙げられる。さらなる例示的なビルダー及び／又はコビルダーは、例えば、国際公開第2009／102854号パンフレット、及び米国特許第5977053号明細書に記載されている。いくつかの態様では、ビルダーは、クエン酸及び／又はメチルグリシン-N，N-二酢酸（MGDA）及び／又はグルタミン酸-N，N-二酢酸（GLDA）及び／又はそれらの塩などの非リン系ビルダーである。また、好ましいビルダーが、クエン酸塩及び／又はメチルグリシン-N，N-二酢酸（MGDA）及び／又はグルタミン-N，N-二酢酸（GLDA）及び／又はそれらの塩を含む事例において、液体組成物はリン酸塩フリーであってもよい。

10

【0152】

漂白成分

クリーニング組成物は、0～30重量%、例えば、約1%～約20%などの漂白系を含有してもよい。クリーニング洗剤に用いられる、当該技術分野において知られている成分を含むあらゆる漂白系が利用され得る。適切な漂白系成分として、過酸化水素の供給源；過酸の供給源；及び漂白触媒又は漂白増強剤が挙げられる。

【0153】

過酸化水素の供給源：過酸化水素の適切な供給源は、無機過酸塩であり、過炭酸ナトリウム及び過ホウ酸ナトリウム（通常、一水和物又は四水和物）、並びに過酸化水素-尿素（1／1）などのアルカリ金属塩が挙げられる。

20

【0154】

過酸の供給源：過酸は、（a）事前に形成された過酸として直接組み込まれ得るか、又は（b）過酸化水素及び漂白活性化剤から洗浄液中にインサイチューで形成され得る（過加水分解）か、又は（c）過酸化水素及びペルヒドロラーゼ及び後者用の適切な基質、例えばエステルから洗浄液中にインサイチューで形成され得る。

【0155】

a）適切な事前に形成された過酸として、以下に限定されないが、ペルオキシカルボン酸、例えば、ペルオキシ安息香酸及びその環置換誘導体、ペルオキシ- α -ナフトエ酸、ペルオキシフタル酸、ペルオキシラウリン酸、ペルオキシステアリン酸、 ϵ -フタルイミドペルオキシカプロン酸〔フタルイミドペルオキシヘキサン酸（PAP）〕、及び α -カルボキシベンザミドペルオキシカプロン酸；脂肪族及び芳香族ジペルオキシジカルボン酸、例えば、ジペルオキシドデカン二酸、ジペルオキシアゼライン酸、ジペルオキシセバシン酸、ジペルオキシブラスル酸、2-デシルジペルオキシブタン二酸、並びにジペルオキシフタル酸、ジペルオキシイソフタル酸、及びジペルオキシテレフタル酸；ペルイミド酸；ペルオキシ-硫酸；ペルオキシ二硫酸；ペルオキシリン酸；ペルオキシケイ酸；並びに前記化合物の混合物が挙げられる。挙げられた過酸は、いくつかの場合には、適切な塩、例えば、アルカリ金属塩（例えば、Oxone（登録商標））又はアルカリ土類金属塩として最良に添加され得るものと理解される。

30

【0156】

b）適切な漂白活性化剤として、エステル、アミド、イミド、ニトリル、又は無水物のクラスに属するもの、並びに適宜それらの塩が挙げられる。適切な例として、テトラアセチルエチレンジアミン（TAED）、4-〔（3，5，5-トリメチルヘキサノイル）オキシ〕ベンゼン-1-スルホン酸ナトリウム（ISONOBS）、4-（ドデカノイルオキシ）ベンゼン-1-スルホン酸ナトリウム（LOBS）、4-（デカノイルオキシ）ベンゼン-1-スルホン酸ナトリウム、4-（デカノイルオキシ）安息香酸（DOBA）、4-（ノナノイルオキシ）ベンゼン-1-スルホン酸ナトリウム（NOBS）、及び／又は国際公開第98／17767号パンフレットに開示されているものがある。注目する漂白活性化剤の特定のファミリが、欧州特許第624154号明細書に開示されており、そのファミリの中でも、クエン酸アセチルトリエチル（ATC）が特に好ましい。ATC又

40

50

は短鎖トリグリセリド様トリアセチンは、環境にやさしいという利点を有する。さらに、クエン酸アセチルトリエチル及びトリアセチンは、保存に際して生成物中での加水分解安定性が良好であり、効果的な漂白活性化剤である。最後に、ATCは、過加水分解反応中に放出されたクエン酸塩がビルダーとして機能し得るため、多機能性である。

【0157】

漂白触媒及び促進剤：また、漂白系として、漂白触媒又は促進剤が挙げられ得る。本発明の組成物に用いられ得る漂白触媒のいくつかの非限定的な例として、シュウ酸マンガン、酢酸マンガン、マンガン-コラーゲン、コバルト-アミン触媒、及びマンガントリアザシクロノナン (MnTACN) 触媒が挙げられ；特に好ましいのは、1, 4, 7-トリメチル-1, 4, 7-トリアザシクロノナン (Me₃-TACN) 又は1, 2, 4, 7-テトラメチル-1, 4, 7-トリアザシクロノナン (Me₄-TACN)、特にMe₃-TACNとのマンガンの錯体、例えば、二核マンガン錯体 [(Me₃-TACN)Mn(O)₃Mn(Me₃-TACN)] (PF₆)₂ 及び [2, 2', 2''-ニトリロトリス (エタン-1, 2-ジイラザニリリデン-κN-メタニリリデン) トリフェノラト-κ3O] マンガン (III) である。また、漂白触媒として、他の金属化合物、例えば、鉄又はコバルト錯体があり得る。他の適切な漂白触媒として、アシルヒドラゾン触媒、例えば米国特許出願公開第2014/0323381号明細書に開示されるものがある。

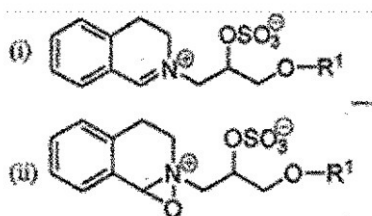
10

【0158】

過酸の供給源が含まれるいくつかの態様では、以下の式のもの：

【化1】

20



(iii) 及びその混合物 (式中、各 R₁ は、独立して、9~24 個の炭素を含有する分岐アルキル基又は11~24 個の炭素を含有する直鎖アルキル基であり、好ましくは、各 R₁ は、独立して、9~18 個の炭素を含有する分岐アルキル基又は11~18 個の炭素を含有する直鎖アルキル基であり、より好ましくは、各 R₁ は、独立して、2-プロピルヘプチル、2-ブチルオクチル、2-ペンチルノニル、2-ヘキシルデシル、ドデシル、テトラデシル、ヘキサデシル、オクタデシル、イソノニル、イソデシル、イソトリデシル、及びイソペンタデシルからなる群から選択される) のうちの1つを有する有機漂白触媒又は漂白促進剤が用いられ得る。

30

【0159】

他の例示的な漂白系は、例えば、国際公開第2007/087258号パンフレット、国際公開第2007/087244号パンフレット、国際公開第2007/087259号パンフレット、欧州特許第1867708号明細書 (ビタミンK)、及び国際公開第2007/087242号パンフレットに記載されている。適切な光漂白剤として、例えば、スルホン化亜鉛又はアルミニウムフタロシアニンがあり得る。

40

【0160】

洗剤組成物の選択として、生地ケアの場合、クリーニングされることとなる生地の種類、汚れの種類及び／又は程度、クリーニングが実施される温度、並びに洗剤製品の製剤化の考慮が挙げられ得る。以下で言及される成分は、機能性に従って概略的見出しによって分類されるが、これは、限定として解釈されるべきではない。というのも、当業者によって理解されるように、以下に示される例示的な非限定的成分が挙げられる成分が、追加的な機能性を含む場合もあるからである。

【0161】

ヒドロトロップ

50

洗剤組成物は、0～10重量%、例えば、0～5重量%、例えば、約0.5～約5%、又は約3%～約5%のヒドロトロップを含有し得る。洗剤における使用のための当該技術分野において知られているあらゆるヒドロトロップが利用され得る。ヒドロトロップの非限定的な例として、ベンゼンスルホン酸ナトリウム、p-トルエンスルホン酸ナトリウム（STS）、キシレンスルホン酸ナトリウム（XS）、クメンスルホン酸ナトリウム（SCS）、シメンスルホン酸ナトリウム、アミン酸化物、アルコール及びポリグリコールエーテル、ナトリウムヒドロキシナフトエート、ヒドロキシナフタレンスルホン酸ナトリウム、硫酸ナトリウムエチルヘキシル、並びにそれらの組合せが挙げられる。

【0162】

ポリマー

洗剤組成物は、0～10重量%、例えば、0.5～5%、2～5%、0.5～2%、又は0.2～1%のポリマーを含有し得る。洗剤に用いられる、当該技術分野において知られているあらゆるポリマーが利用され得る。ポリマーは、上記のコビルダーとして機能するものであってもよいし、再沈着防止、繊維保護、汚れ遊離、移染阻害、油脂クリーニング、及び／又は消泡性を付与するものであってもよい。いくつかのポリマーは、上記の性質のうち2つ以上及び／又は以下に挙げるモチーフのうち2つ以上を有し得る。例示的なポリマーとして、（カルボキシメチル）セルロース（CMC）、ポリ（ビニルアルコール）（PVA）、ポリ（ビニルピロリドン）（PVP）、ポリ（エチレングリコール）又はポリ（エチレンオキシド）（PEG）、エトキシ化ポリ（エチレンイミン）、カルボキシメチルイヌリン（CMI）、及びポリカルボキシレート、例えば、PAA、PAA／PMA、ポリアスパラギン酸、及びメタクリル酸ラウリル／アクリル酸コポリマー、疎水的に修飾されたCMC（HM-CMC）及びシリコーン、テレフタル酸とオリゴマーグリコールのコポリマー、ポリ（エチレンテレフタレート）とポリ（オキシエチレンテレフタレート）のコポリマー（PET-POET）、PVP、ポリ（ビニルイミダゾール）（PVI）、ポリ（ビニルピリジン-N-オキシド）（PVPO又はPVPNO）、並びにポリビニルピロリドン-ビニルイミダゾール（PVPVI）が挙げられる。さらなる例示的なポリマーとして、スルホン化ポリカルボキシレート、ポリエチレンオキシド及びポリプロピレンオキシド（PEO-PPO）、並びにジクオタニウムエトキシサルフェートが挙げられる。他の例示的なポリマーが、例えば、国際公開第2006／130575号パンフレットに開示されている。また、上述のポリマーの塩が意図される。

【0163】

布地色調剤

また、本発明の洗剤組成物は、染料又は顔料などの布地色調剤を含んでもよく、これは、洗剤組成物中に配合される場合、前記洗剤組成物を含む洗浄液と前記布地が接触するときに布地上に沈着することができるので、可視光の吸収／反射により前記布地の色合いを変更する。蛍光増白剤は、少なくともある程度の可視光を発する。対照的に、布地色調剤は、可視光スペクトルの少なくとも一部を吸収するので、表面の色合いを変更する。適切な布地色調剤として、染料及び染料-粘土コンジュゲートが挙げられ、顔料を含んでもよい。適切な染料として、小分子染料及びポリマー染料が挙げられる。適切な小分子染料として、例えば、（参照によって本明細書に組み込まれる）国際公開第2005／03274号パンフレット、国際公開第2005／03275号パンフレット、国際公開第2005／03276号パンフレット、及び欧州特許第1876226号明細書に記載されるような、色指数（C.I.）分類で、ダイレクトブルー、ダイレクトレッド、ダイレクトバイオレット、アシッドブルー、アシッドレッド、アシッドバイオレット、ベーシックブルー、ベーシックバイオレット、及びベーシックレッドに分類される染料、又はそれらの混合物からなる群から選択される小分子染料が挙げられる。洗剤組成物は、好ましくは、約0.00003重量%～約0.2重量%、約0.00008重量%～約0.05重量%、又は約0.0001重量%～約0.04重量%の布地色調剤を含む。組成物は、0.0001重量%～約0.2重量%の布地色調剤を含んでもよく、これはとりわけ、組成物が単位用量ポーチの形態である場合、好ましいと考えられる。また、適切な色調剤が、例えば、

国際公開第2007/087257号パンフレット及び国際公開第2007/087243号パンフレットに開示されている。

【0164】

酵素

洗剤組成物は、プロテアーゼ、リパーゼ、クチナーゼ、アミラーゼ、DNase、カルボヒドラーゼ、セルラーゼ、ペクチナーゼ、マンナーゼ、アラビナーゼ、ガラクタナーゼ、キシナーゼ、ヘキシサミニダーゼ、オキシダーゼ、例えばラッカーゼ、及び／又はペルオキシダーゼなどの1種以上の追加の酵素を含んでもよい。

【0165】

一般に、選択された酵素の特性は、選択された洗剤と適合性であるべきであり（すなわちpH最適条件、他の酵素成分及び非酵素成分との適合性など）、酵素は、有効量で含まれる必要がある。

【0166】

セルラーゼ

適切なセルラーゼとしては、細菌又は真菌起源のものが挙げられる。化学修飾又はタンパク質操作された変異体が含まれる。適切なセルラーゼとしては、バチルス属 (*Bacillus*)、シュドモナス属 (*Pseudomonas*)、フミコラ属 (*Humicola*)、フザリウム属 (*Fusarium*)、チエラビア属 (*Thielavia*)、アクレモニウム属 (*Acromonium*) 由来のセルラーゼ、例えば、米国特許第4,435,307号明細書、米国特許第5,648,263号明細書、米国特許第5,691,178号明細書、米国特許第5,776,757号明細書及び国際公開第89/09259号パンフレットに開示されているフミコラ・インソレンス (*Humicola insolens*)、ミセリオフトラ・サーモフィラ (*Myceliophthora thermophila*) 及びフザリウム・オキシスポラム (*Fusarium oxysporum*) から産生される真菌セルラーゼが挙げられる。

【0167】

とりわけ適切なセルラーゼは、色の保護に関して利点を有するアルカリ性又は中性セルラーゼである。そのようなセルラーゼの例として、欧州特許第0495257号明細書、欧州特許第0531372号明細書、国際公開第96/11262号パンフレット、国際公開第96/29397号パンフレット、国際公開第98/08940号パンフレットに記載されるセルラーゼがある。他の例として、国際公開第94/07998号パンフレット、欧州特許第0531315号明細書、米国特許第5,457,046号明細書、米国特許第5,686,593号明細書、米国特許第5,763,254号明細書、国際公開第95/24471号パンフレット、国際公開第98/12307号パンフレット、及び国際公開第99/001544号パンフレットに記載されるものなどのセルラーゼバリエーションがある。

【0168】

他のセルラーゼとして、国際公開第2002/099091号パンフレットの配列番号2の1位～773位のアミノ酸配列に対して少なくとも97%の同一性の配列を有するエンドペクター1,4-グルカナーゼ酵素、又はファミリー44キシログルカナーゼがあり、このキシログルカナーゼ酵素は、国際公開第2001/062903号パンフレットの配列番号2の40～559位に対して少なくとも60%の同一性の配列を有する。

【0169】

市販されているセルラーゼとして、Celluzyme (商標) 及び Carezyme (商標) (Novozymes A/S)、Carezyme Premium (商標) (Novozymes A/S)、Celluclean (商標) (Novozymes A/S)、Celluclean Classic (商標) (Novozymes A/S)、Cellusoft (商標) (Novozymes A/S)、Whitezyme (商標) (Novozymes A/S)、Clazinas (商標) 及び Puradax HA (商標) (Genencor International Inc.)、

並びに K A C - 5 0 0 (B) (商 標) (花 王 株 式 会 社) が 挙 げ ら れ る。

【 0 1 7 0 】

プロテアーゼ

適切なプロテアーゼは、いかなる起源のものであってもよいが、好ましくは、細菌起源又は真菌起源のものであり、場合によっては、タンパク質操作又は化学修飾された変異体の形態である。プロテアーゼは、セリンプロテアーゼ又はメタロプロテアーゼなどのアルカリプロテアーゼであってもよい。セリンプロテアーゼは、例えば、トリプシンなどの S 1 ファミリ、又はスブチリシンなどの S 8 ファミリのものであってもよい。メタロプロテアーゼは、例えば、サーモリシン、例えば M 4 ファミリ由来のもの、又は別のメタロプロテアーゼ、例えば、M 5、M 7、若しくは M 3 5 ファミリ由来のものであってもよい。

10

【 0 1 7 1 】

用語「スブチラーゼ」は、S i e z e n e t a l . , P r o t e i n E n g . 4 (1 9 9 1) 7 1 9 - 7 3 7 及び S i e z e n e t a l . , P r o t e i n S c i . 6 (1 9 9 7) 5 0 1 - 5 2 3 に従うセリンプロテアーゼのサブグループを指す。セリンプロテアーゼは、基質との共有結合付加物を形成するセリンを活性部位に有することによって特徴付けられるプロテアーゼのサブグループである。スブチラーゼは、6つの下位区分、スブチリシンファミリ、テルミターゼファミリ、プロテイナーゼ K ファミリ、ランチビオテックペプチダーゼファミリ、ケキシファミリ、及びピロリシンファミリに分割され得る。

【 0 1 7 2 】

洗剤使用に適したプロテアーゼは、アスペルギルス属 (A s p e r g i l l u s) などの真菌が挙げられる種々の生物から得られ得るが、洗剤プロテアーゼは、一般に、細菌から、特にバチルス属 (B a c i l l u s) から得られたものである。スブチラーゼが由来するバチルス属 (B a c i l l u s) 種の例として、バチルス・レントス (B a c i l l u s l e n t u s) 、バチルス・アルカロフィラス (B a c i l l u s a l k a l o p h i l u s) 、バチルス・サブチリス (B a c i l l u s s u b t i l i s) 、バチルス・アミロリクエファシエンス (B a c i l l u s a m y l o l i q u e f a c i e n s) 、バチルス・リケニフォルミス (B a c i l l u s l i c h e n i f o r m i s) バチルス・プミラス (B a c i l l u s p u m i l u s) 、及びバチルス・ギブソニ (B a c i l l u s g i b s o n i) が挙げられる。特定のスブチリシンとして、スブチリシンレントス、スブチリシンノボ、スブチリシンカールスバーク、スブチリシン B P N ' 、スブチリシン 3 0 9 、スブチリシン 1 4 7 、及びスブチリシン 1 6 8 、並びに例えばプロテアーゼ P D 1 3 8 (国際公開第 9 3 / 1 8 1 4 0 号パンフレットに記載) が挙げられる。他の有用なプロテアーゼとして、例えば、国際公開第 0 1 / 1 6 2 8 5 号パンフレット及び国際公開第 0 2 / 1 6 5 4 7 号パンフレットに記載されるものがある。

20

30

【 0 1 7 3 】

トリプシン様プロテアーゼの例として、国際公開第 9 4 / 2 5 5 8 3 号パンフレット及び国際公開第 2 0 0 5 / 0 4 0 3 7 2 号パンフレットに記載されるフザリウム属 (F u s a r i u m) プロテアーゼ、並びに国際公開第 2 0 0 5 / 0 5 2 1 6 1 号パンフレット及び国際公開第 2 0 0 5 / 0 5 2 1 4 6 号パンフレットに記載される、セルロモナス属 (C e l l u m o n a s) に由来するキモトリプシンプロテアーゼが挙げられる。

40

【 0 1 7 4 】

メタロプロテアーゼの例として、国際公開第 2 0 0 7 / 0 4 4 9 9 3 号パンフレットに記載される中性メタロプロテアーゼ、例えば、バチルス・アミロリクエファシエンス (B a c i l l u s a m y l o l i q u e f a c i e n s) に由来するもの、並びに、例えば、国際公開第 2 0 1 5 / 1 5 8 7 2 3 号パンフレット及び国際公開第 2 0 1 6 / 0 7 5 0 7 8 号パンフレットに記載されるメタロプロテアーゼが挙げられる。

【 0 1 7 5 】

有用なプロテアーゼの例として、国際公開第 8 9 / 0 6 2 7 9 号パンフレット、国際公開第 9 2 / 1 9 7 2 9 号パンフレット、国際公開第 9 6 / 3 4 9 4 6 号パンフレット、国

50

際公開第98/20115号パンフレット、国際公開第98/20116号パンフレット、国際公開第99/11768号パンフレット、国際公開第01/44452号パンフレット、国際公開第03/006602号パンフレット、国際公開第2004/003186号パンフレット、国際公開第2004/041979号パンフレット、国際公開第2007/006305号パンフレット、国際公開第2011/036263号パンフレット、国際公開第2014/207227号パンフレット、国際公開第2016/087617号パンフレット、及び国際公開第2016/174234号パンフレットに記載されるプロテアーゼバリエーションがある。好ましいプロテアーゼバリエーションは、例えば：S3T、V4I、S9R、S9E、A15T、S24G、S24R、K27R、N42R、S55P、G59E、G59D、N60D、N60E、V66A、N74D、S85R、A96S、S97G、S97D、S97A、S97SD、S99E、S99D、S99G、S99M、S99N、S99R、S99H、S101A、V102I、V102Y、V102N、S104A、G116V、G116R、H118D、H118N、A120S、S126L、P127Q、S128A、S154D、A156E、G157D、G157P、S158E、Y161A、R164S、Q176E、N179E、S182E、Q185N、A188P、G189E、V193M、N198D、V199I、Q200L、Y203W、S206G、L211Q、L211D、N212D、N212S、M216S、A226V、K229L、Q230H、Q239R、N246K、S253D、N255W、N255D、N255E、L256E、L256D、T268A、及びR269Hからなる群から選択される変異の1つ以上を含み得、位置番号は、国際公開第2016/001449号パンフレットの配列番号1に示されるバチルス・レントス (*Bacillus lentus*) プロテアーゼの位置に相当する。これらの変異の1つ以上を有するプロテアーゼバリエーションは、好ましくは、国際公開第2016/001449号パンフレットの配列番号1に示されるバチルス・レントス (*Bacillus lentus*) プロテアーゼ (Savinase (登録商標)、スプチリシン309としても知られている) のバリエーション、又は国際公開第2016/001449号パンフレットの配列番号2に示されるバチルス・アミロリクエファシエンス (*Bacillus amyloliquefaciens*) プロテアーゼ (BPN') のバリエーションである。そのようなプロテアーゼバリエーションは、好ましくは、国際公開第2016/001449号パンフレットの配列番号1に対して、又は配列番号2に対して少なくとも80%の配列同一性を有する。

10

20

30

【0176】

注目する別のプロテアーゼは、例えば、国際公開第91/02792号パンフレットに記載されるバチルス・レントス (*Bacillus lentus*) DSM5483由来のアルカリ性プロテアーゼ、並びにその、例えば、国際公開第92/21760号パンフレット、国際公開第95/23221号パンフレット、欧州特許第1921147号明細書、欧州特許第1921148号明細書、及び国際公開第2016/096711号パンフレットに記載されるバリエーションである。

【0177】

これ以外にも、プロテアーゼは、国際公開第2004/067737号パンフレットの配列番号1を有するTY145プロテアーゼのバリエーション、例えば、国際公開第2004/067737号パンフレットの配列番号1の27、109、111、171、173、174、175、180、182、184、198、199、及び297位に相当する1つ以上の位置にて置換を含むバリエーションであってもよく、前記プロテアーゼバリエーションは、国際公開第2004/067737号パンフレットの配列番号1に対して少なくとも75%且つ100%未満の配列同一性を有する。注目するTY145バリエーションは、例えば、国際公開第2015/014790号パンフレット、国際公開第2015/014803号パンフレット、国際公開第2015/014804号パンフレット、国際公開第2016/097350号パンフレット、国際公開第2016/097352号パンフレット、国際公開第2016/097357号パンフレット、及び国際公開第2016/097354号パンフレットに記載されている。

40

50

【0178】

適切な市販のプロテアーゼ酵素として、Alcalase（登録商標）、Duralase（商標）、Durazym（商標）、Relase（登録商標）、Relase（登録商標）Ultra、Savinase（登録商標）、Savinase（登録商標）Ultra、Primase（商標）、Polarzyme（登録商標）、Kannase（登録商標）、Liquanase（登録商標）、Liquanase（登録商標）Ultra、Ovozyme（登録商標）、Coronase（登録商標）、Coronase（登録商標）Ultra、Blaze（登録商標）、Blaze Eevity（登録商標）100T、Blaze Eevity（登録商標）125T、Blaze Eevity（登録商標）150T、Blaze Eevity（登録商標）200T、Neutrase（登録商標）、Everlase（登録商標）、Esperase（登録商標）、Progress（登録商標）Uno、Progress（登録商標）In、Progress（登録商標）Key及びProgress（登録商標）Excel（Novozymes A/S）という商品名で販売されているもの、Maxatase（商標）、Maxacal（商標）、Maxapem（登録商標）、Purafect（登録商標）Ox、Purafect（登録商標）OxP、Puramax（登録商標）、FN2（商標）、FN3（商標）、FN4^{ex}™、Excellase（登録商標）、Excellenz（商標）P1000、Excellenz（商標）P1250、Eraser（商標）、Preferenz（登録商標）P100、Preferenz（登録商標）P300、Purafect Prime、Preferenz P110（商標）、Effectenz P1000（商標）、Purafect（登録商標）、Effectenz P1050（商標）、Purafect（登録商標）Ox、Effectenz（商標）P2000、Purafast（商標）、Properase（登録商標）、Opticlean（商標）、及びOptimase（登録商標）（Danisco/DuPont）、BLAP（米国特許第5352604号明細書の図29に示される配列）及びそのバリエーション（Henkel AG）、並びにKao製のKAP（バチルス・アルカロフィラス（*Bacillus alkalophilus*）スブチリシン）という商品名で販売されているものが挙げられる。

10

20

【0179】

リパーゼ及びクチナーゼ

適切なリパーゼ及びクチナーゼとして、細菌起源又は真菌起源のものが挙げられる。化学修飾された変異酵素、又はタンパク質操作された変異酵素が含まれる。例として、欧州特許第258068号明細書及び欧州特許第305216号明細書に記載される、サーモマイセス属（*Thermomyces*）由来、例えばT. ラヌギノス（*T. lanuginosus*）（以前はフミコラ・ラヌギノーサ（*Humicola lanuginosa*）と命名されていた）由来のリパーゼ、フミコラ属（*Humicola*）、例えばH. インソレンス（*H. insolens*）由来のクチナーゼ（国際公開第96/13580号パンフレット）、シュードモナス属（*Pseudomonas*）（これらの一部は、現在、バークホルデリア属（*Burkholderia*）と改名されている）、例えば、P. アルカリゲネス（*P. alcaligenes*）又はP. シュードアルカリゲネス（*P. pseudoalcaligenes*）（欧州特許第218272号明細書）、P. セパシア（*P. cepacia*）（欧州特許第331376号明細書）、P. 属種株SD705（国際公開第95/06720号パンフレット及び国際公開第96/27002号パンフレット）、P. ウィスコンシンシス（*P. wisconsinensis*）（国際公開第96/12012号パンフレット）の株由来のリパーゼ、GDSLタイプのストレプトマイセス属（*Streptomyces*）リパーゼ（国際公開第10/065455号パンフレット）、イネいもち病菌（*Magnaporthe grisea*）（国際公開第10/107560号パンフレット）由来のクチナーゼ、シュードモナス・メンドシナ（*Pseudomonas mendocina*）由来のクチナーゼ（米国特許第5,389,536号明細書）、サーモビフィダ・フスカ（*Thermobifida f*

30

40

50

usca) 由来のリパーゼ (国際公開第 11/084412 号パンフレット)、ジェオバチルス・ステアロサーモフィラス (*Geobacillus stearothermophilus*) リパーゼ (国際公開第 11/084417 号パンフレット)、バチルス・サブチリス (*Bacillus subtilis*) 由来のリパーゼ (国際公開第 11/084599 号パンフレット)、並びにストレプトマイセス・グリセウス (*Streptomyces griseus*) (国際公開第 11/150157 号パンフレット) 及び S. プリスチナエスピラリス (*S. pristinaespiralis*) (国際公開第 12/137147 号パンフレット) 由来のリパーゼが挙げられる。

【0180】

他の例として、欧州特許第 407225 号明細書、国際公開第 92/05249 号パンフレット、国際公開第 94/01541 号パンフレット、国際公開第 94/25578 号パンフレット、国際公開第 95/14783 号パンフレット、国際公開第 95/30744 号パンフレット、国際公開第 95/35381 号パンフレット、国際公開第 95/22615 号パンフレット、国際公開第 96/00292 号パンフレット、国際公開第 97/04079 号パンフレット、国際公開第 97/07202 号パンフレット、国際公開第 00/34450 号パンフレット、国際公開第 00/60063 号パンフレット、国際公開第 01/92502 号パンフレット、国際公開第 07/87508 号パンフレット、及び国際公開第 09/109500 号パンフレットに記載されるものなどのリパーゼバリエーションがある。

【0181】

市販されている好ましいリパーゼ製品として、Lipolase (商標)、Lipex (商標); Lipolex (商標)、及び Lipoclean (商標) (Novozymes A/S)、Lumafast (当初は Genencor 製)、並びに Lipomax (当初は Gist-Brocades 製) が挙げられる。

【0182】

さらに他の例として、アシルトランスフェラーゼ又はペルヒドロラーゼと呼ばれこともあるリパーゼ、例えば、カンジダ・アンタークティカ (*Candida antarctica*) リパーゼ A との相同性を有するアシルトランスフェラーゼ (国際公開第 10/111143 号パンフレット)、マイコバクテリウム・スメグマチス (*Mycobacterium smegmatis*) 由来のアシルトランスフェラーゼ (国際公開第 05/56782 号パンフレット)、CE 7 ファミリー由来のペルヒドロラーゼ (国際公開第 09/67279 号パンフレット)、及び M. スメグマチス (*M. smegmatis*) ペルヒドロラーゼのバリエーション、特に Huntsman Textile Effects Pte Ltd 製の製品 Gentle Power Bleach に用いられている S54V バリエーション (国際公開第 10/100028 号パンフレット) がある。

【0183】

アミラーゼ

本発明のヘキソサミニダーゼと共に用いられ得る適切なアミラーゼは、アルファアミラーゼ又はグルコアミラーゼであり得、細菌起源のものでも真菌起源のものでもよい。化学修飾又はタンパク質操作された変異体が含まれる。アミラーゼとして、例えば、英国特許第 1,296,839 号明細書により詳細に記載される、バチルス属 (*Bacillus*)、例えばバチルス・リケニフォルミス (*Bacillus licheniformis*) の特殊な系統から得られるアルファアミラーゼが挙げられる。

【0184】

適切なアミラーゼとして、国際公開第 95/10603 号パンフレットにおける配列番号 2 を有するアミラーゼ又はその、配列番号 1 に対して 90% の配列同一性を有するバリエーションが挙げられる。好ましいバリエーションは、国際公開第 94/02597 号パンフレット、国際公開第 94/18314 号パンフレット、国際公開第 97/43424 号パンフレット、及び国際公開第 99/019467 号パンフレットの配列番号 4 に記載されており、例えば、以下の位置: 15、23、105、106、124、128、133、15

4、156、178、179、181、188、190、197、201、202、207、208、209、211、243、264、304、305、391、408、及び444の1つ以上において置換を有するバリエーションである。

【0185】

異なる適切なアミラーゼとして、国際公開第02/010355号パンフレットにおける配列番号6を有するアミラーゼ、又はその、配列番号6に対して90%の配列同一性を有するバリエーションが挙げられる。配列番号6の好ましいバリエーションは、181及び182位における欠失及び193位における置換を有するものである。

【0186】

適切な他のアミラーゼは、国際公開第2006/066594号パンフレットの配列番号6に示されるB. アミロリケファシエンス (B. amyloliquefaciens) から得られるアルファアミラーゼの残基1~33、及び国際公開第2006/066594号パンフレットの配列番号4に示されるB. リケニフォルミス (B. licheniformis) アルファアミラーゼの残基36~483を含むハイブリッドアルファアミラーゼ、又はその、90%配列同一性を有するバリエーションである。このハイブリッドアルファアミラーゼの好ましいバリエーションは、以下の位置：G48、T49、G107、H156、A181、N190、M197、I201、A209、及びQ264の1つ以上において置換、欠失、又は挿入を有するものである。国際公開第2006/066594号パンフレットの配列番号6に示されるB. アミロリケファシエンス (B. amyloliquefaciens) から得られるアルファアミラーゼの残基1~33、及び配列番号4の残基36~483を含むハイブリッドアルファアミラーゼの最も好ましいバリエーションは、置換：

M197T；

H156Y + A181T + N190F + A209V + Q264S；又は

G48A + T49I + G107A + H156Y + A181T + N190F + I201F + A209V + Q264S

を有するものである。

【0187】

適切なさらなるアミラーゼは、国際公開第99/019467号パンフレットにおける配列番号6を有するアミラーゼ、又はその、配列番号6に対して90%の配列同一性を有するバリエーションである。配列番号6の好ましいバリエーションは、以下の位置：R181、G182、H183、G184、N195、I206、E212、E216、及びK269の1つ以上において置換、欠失、又は挿入を有するものである。特に好ましいアミラーゼは、R181位及びG182位、又はH183位及びG184位に欠失を有するものである。

【0188】

用いることができる追加のアミラーゼは、国際公開第96/023873号パンフレットの配列番号1、配列番号3、配列番号2、若しくは配列番号7を有するもの、又はその、配列番号1、配列番号2、配列番号3若しくは配列番号7に対して90%の配列同一性を有するバリエーションである。配列番号1、配列番号2、配列番号3又は配列番号7の好ましいバリエーションは、付番に国際公開第96/023873号パンフレットの配列番号2を用いて、以下の位置：140、181、182、183、184、195、206、212、243、260、269、304及び476の1つ以上において置換、欠失、又は挿入を有するものである。より好ましいバリエーションは、181位、182位、183位及び184位から選択される2つの位置、例えば181位及び182位、182位及び183位、又は183位及び184位に欠失を有するものである。配列番号1、配列番号2又は配列番号7の最も好ましいアミラーゼバリエーションは、183位及び184位の欠失、並びに140位、195位、206位、243位、260位、304位及び476位の1つ以上に置換を有するものである。

【0189】

用いることができる他のアミラーゼとして、国際公開第08/153815号パンフレットの配列番号2、国際公開第01/66712号パンフレットにおける配列番号10を有するアミラーゼ、又はその、国際公開第08/153815号パンフレットの配列番号2に対して90%の配列同一性若しくは国際公開第01/66712号パンフレットにおける配列番号10に対して90%の配列同一性を有するバリエーションがある。国際公開第01/66712号パンフレットにおける配列番号10の好ましいバリエーションとして、以下の位置：176、177、178、179、190、201、207、211、及び264の1つ以上において置換、欠失、又は挿入を有するものがある。

【0190】

さらなる適切なアミラーゼとして、国際公開第09/061380号パンフレットの配列番号2を有するアミラーゼ、又はその、配列番号2に対して90%の配列同一性を有するバリエーションがある。配列番号2の好ましいバリエーションとして、C末端のトランケーション及び／又は以下の位置：Q87、Q98、S125、N128、T131、T165、K178、R180、S181、T182、G183、M201、F202、N225、S243、N272、N282、Y305、R309、D319、Q320、Q359、K444、及びG475の1つ以上において置換、欠失、又は挿入を有するものがある。配列番号2のより好ましいバリエーションとして、以下の位置：Q87E、R、Q98R、S125A、N128C、T131I、T165I、K178L、T182G、M201L、F202Y、N225E、R、N272E、R、S243Q、A、E、D、Y305R、R309A、Q320R、Q359E、K444E、及びG475Kの1つ以上における置換、並びに／或いはR180位及び／若しくはS181位又はT182位及び／若しくはG183位における欠失を有するものがある。配列番号2の最も好ましいアミラーゼバリエーションは、置換：

N128C+K178L+T182G+Y305R+G475K；

N128C+K178L+T182G+F202Y+Y305R+D319T+G475K；

S125A+N128C+K178L+T182G+Y305R+G475K；又は

S125A+N128C+T131I+T165I+K178L+T182G+Y305R+G475K

を有するものであり、バリエーションは、C末端がトランケートされており、任意選択により、243位の置換並びに／又は180位及び／若しくは181位の欠失をさらに含む。

【0191】

他の適切なアミラーゼは、国際公開第01/66712号パンフレットにおける配列番号12を有するアルファアミラーゼ、又は配列番号12に対して少なくとも90%の配列同一性を有するバリエーションである。好ましいアミラーゼバリエーションとして、国際公開第01/66712号パンフレットにおける配列番号12の以下の位置：R28、R118、N174；R181、G182、D183、G184、G186、W189、N195、M202、Y298、N299、K302、S303、N306、R310、N314；R320、H324、E345、Y396、R400、W439、R444、N445、K446、Q449、R458、N471、N484の1つ以上において置換、欠失、又は挿入を有するものがある。特定の好ましいアミラーゼとして、D183及びG184の欠失を有し、且つ置換R118K、N195F、R320K、及びR458Kを有するバリエーション、並びに群：M9、G149、G182、G186、M202、T257、Y295、N299、M323、E345、及びA339から選択される1つ以上の位置において置換を追加的に有するバリエーションが挙げられ、最も好ましいのは、これらの全ての位置において置換を追加的に有するバリエーションである。

【0192】

他の例として、国際公開第2011/098531号パンフレット、国際公開第2013/001078号パンフレット、及び国際公開第2013/001087号パンフレットに記載されるものなどのアミラーゼバリエーションがある。

【0193】

市販のアミラーゼとして、Duramyl（商標）、Termamyl（商標）、Fungamyl（商標）、Stainzyme（商標）、Stainzyme Plus（商標）、Natalase（商標）、Liquozyme X、及びBAN（商標）（Novozymes A/S製）、並びにRapidase（商標）、Purastar（商標）／Effectenz（商標）、Powerase、及びPreferenz S100（Genencor International Inc.／DuPont製）が挙げられる。

【0194】

DNase

用語「DNase」は、DNA骨格におけるホスホジエステル結合の加水切断、したがってDNAの分解を触媒するDNase（デオキシリボヌクレアーゼ）活性を有するポリペプチドを意味する。DNaseポリペプチドは、生地又は食器又は他の硬質表面などの表面に存在し得、細胞外DNA、タンパク質、及び多糖類から構成される細胞外ポリマー物質（EPS）のマトリックスからなる微生物バイオフィルムのディープクリーニングに有用であることがわかっている。

【0195】

DNaseポリペプチドは、典型的には、好ましくは真菌若しくは細菌起源の微生物酵素、又は微生物DNaseの遺伝子操作されたバリエーションである。

【0196】

適切な細菌DNaseは、例えば、バチルス属（*Bacillus*）及び関連する属の種から（Patel and Gupta, Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2020; 70: 406–438（バチルス（*Bacillus*）属に属すると以前に分類された種から、バチルス科（*Bacillaceae*）の6つの新しい属を提唱）を参照）、例えば、バチルス属（*Bacillus*）、サイトバチルス属（*Cytobacillus*）、メタバチルス属（*Metabacillus*）、アルカリハロバチルス属（*Alkalihalobacillus*）、ロセロモレア属（*Rosellomorea*）、又はメソバチルス属（*Mesobacillus*）から得られ得る。DNaseが得られる種の例としては、バチルス・リケニフォルミス（*Bacillus licheniformis*）、バチルス・サブチリス（*Bacillus subtilis*）、ストクリフィエラ・ホリコシイ（*Sutcliffeella horikoshii*）、サイトバチルス・ホルネキアエ（*Cytobacillus hornec kiae*）、メタバチルス・インディクス（*Metabacillus indicus*）、アルカリハロバチルス・アルギコラ（*Alkalihalobacillus algicola*）、ロセロモレア・ビエトナメンシス（*Rosellomorea vietnamensis*）、アルカリハロバチルス・ファジンポエンシス（*Alkalihalobacillus hwajinpoensis*）、メタバチルス・インディクス（*Metabacillus indicus*）、メソバチルス・カンピサリス（*Mesobacillus campisalis*）、バチルス・イドリエンシス（*Bacillus idriensis*）、ロセロモレア・マリスフラビ（*Rosellomorea marisflavi*）及びバチルス・ルシフェレンシス（*Bacillus luciferensis*）が挙げられる。好ましい細菌DNaseとしては、メタバチルス・インディクス（*Metabacillus indicus*）（以前、バチルス・シビ（*Bacillus cibi*）として知られる）から得られるもの及びそのバリエーションが挙げられる。

【0197】

DNアーゼはまた、真菌種から得ることもできる。好ましい真菌DNaseの例は、アスペルギルス属（*Aspergillus*）から、例えばアスペルギルス・オリゼー（*Aspergillus oryzae*）から、トリコデルマ属（*Trichoderma*）から、例えばトリコデルマ・ハルチアナム（*Trichoderma harzianu*

10

20

30

40

50

m) から、ビブレッサ属 (*Vibressa*) から、例えばビブレッセア・フラボビレンス (*Vibressea flavovirens*) から、モルケルラ属 (*Morchella*) から、例えばモルケルラ・コスタータ (*Morchella costata*) から、及びリゾクトニア属 (*Rhizoctonia*) から、例えばリゾクトニア・ソラーニ (*Rhizoctonia solani*) から得られるもの、並びにこれらのバリエーションである。好ましい真菌 DNase としては、アスペルギルス・オリゼー (*Aspergillus oryzae*) から得られるもの及びそのバリエーションが挙げられる。

【0198】

適切な DNase、DNase バリエーション、及び洗剤組成物におけるその使用は、例えば、国際公開第 2014/087011 号パンフレット、国際公開第 2015/155350 号パンフレット、国際公開第 2015/155351 号パンフレット、国際公開第 2017/060475 号パンフレット、国際公開第 2017/060493 号パンフレット、国際公開第 2017/060505 号パンフレット、国際公開第 2017/064269 号パンフレット、国際公開第 2018/011277 号パンフレット、国際公開第 2018/177203 号パンフレット、国際公開第 2018/177936 号パンフレット、国際公開第 2018/177938 号パンフレット、国際公開第 2019/081724 号パンフレット、国際公開第 2019/081721 号パンフレット、国際公開第 2021/130167 号パンフレット、国際公開第 2022/194668 号パンフレット及び国際公開第 2022/194673 号パンフレットに記載されている。

【0199】

ペルオキシダーゼ／オキシダーゼ

ペルオキシダーゼは、国際生化学分子生物学連合 (International Union of Biochemistry and Molecular Biology) (IUBMB) の命名委員会によって記載されている酵素分類 EC 1.11.1.7 によって含まれ得、又はそれから得られる、ペルオキシダーゼ活性を示すあらゆる断片であり得る。適切なペルオキシダーゼとして、植物起源、細菌起源、又は真菌起源のものが挙げられる。化学修飾又タンパク質操作された変異体が含まれる。有用なペルオキシダーゼの例としては、例えば C. シネレア (*C. cinerea*) といったヒトヨタケ属 (*Coprinosis*) 由来のペルオキシダーゼ (欧州特許第 179, 486 号明細書)、並びに国際公開第 93/24618 号パンフレット、国際公開第 95/10602 号パンフレット及び国際公開第 98/15257 号パンフレットに記載されているものなどのそのバリエーションが挙げられる。ペルオキシダーゼとしてはまた、クロロペルオキシダーゼ、プロモペルオキシダーゼなどのハロペルオキシダーゼ酵素、及びクロロペルオキシダーゼ活性又はプロモペルオキシダーゼ活性を示す化合物が挙げられ得る。ハロペルオキシダーゼは、ハロゲン化物イオンに対する特異性に従って分類される。クロロペルオキシダーゼ (E.C. 1.11.1.10) は、塩化物イオンからの次亜塩素酸塩の形成を触媒する。一態様において、ハロペルオキシダーゼは、クロロペルオキシダーゼである。好ましくは、ハロペルオキシダーゼは、バナジウムペルオキシダーゼ、すなわちバナジン酸塩含有ハロペルオキシダーゼである。好ましい方法では、バナジン酸塩含有ハロペルオキシダーゼは、塩化物イオンの供給源と組み合わせられる。ハロペルオキシダーゼは、多くの異なる真菌、特に暗色線菌科 (*dematiaceous hyphomycetes*) の真菌群、例えばカルダリオマイセス属 (*Caldariomyces*)、例えば C. フマゴ (*C. fumago*)、アルテルナリア属 (*Alternaria*)、クルブラリア属 (*Curvularia*)、例えば C. ベルクローサ (*C. verruculosa*) 及び C. イナエクアリス (*C. inaequalis*)、ドレクスレラ属 (*Drechslera*)、ウロクラジウム属 (*Ulocladium*) 及びボトリチス属 (*Botrytis*) から単離されている。ハロペルオキシダーゼは、シュードモナス属 (*Pseudomonas*)、例えば P. ピロシニア (*P. pyrrocinia*) 及びストレプトマイセス属 (*Streptomyces*)、例えば S. オーレオファシエンス (*S. aureofaciens*) などの細菌からも単離されている。好ましい態様において、ハロペルオ

キシダーゼは、クルブラリア属 (*Curvularia*) 種、特に、クルブラリア・ベルクローサ (*Curvularia verruculosa*) 又はクルブラリア・イナエクアリス (*Curvularia inaequalis*)、例えば、国際公開第 95/27046 号パンフレットに記載される *C. イナエクアリス* (*C. inaequalis*) CBS 102.42; 又は国際公開第 97/04102 号パンフレットに記載される *C. ベルクローサ* (*C. verruculosa*) CBS 147.63 若しくは *C. ベルクローサ* (*C. verruculosa*) CBS 444.70; 又は国際公開第 01/79459 号パンフレットに記載される *ドレクスレラ・ハルトレビイ* (*Drechslera hartlebii*)、国際公開第 01/79458 号パンフレットに記載される *デンドロフィエラ・サリナ* (*Dendryphiella salina*)、国際公開第 01/79461 号パンフレットに記載される *ファエオトリココニス・クロタラリエ* (*Phaeotrichoconis crotalarie*)、又は国際公開第 01/79460 号パンフレットに記載される *ゲニクロスפורウム*属 (*Geniculosporium*) 種から誘導可能である。

10

【0200】

オキシダーゼとしては、酵素分類 EC1.10.3.2 によって含まれるあらゆるラッカーゼ酵素、又はそれに由来する、ラッカーゼ活性を示すあらゆる断片、又は類似の活性を示す化合物、例えば、カテコールオキシダーゼ (EC1.10.3.1)、*o*-アミノフェノールオキシダーゼ (EC1.10.3.4)、若しくはビリルビンオキシダーゼ (EC1.3.3.5) が挙げられる。

20

【0201】

好ましいラッカーゼ酵素として、細菌起源の酵素がある。酵素は、植物、細菌又は真菌 (糸状真菌及び酵母を含む) から得ることができる。

【0202】

真菌由来の適切な例としては、バチルス属 (*Bacillus*)、ニューロスポラ属 (*Neurospora*)、例えば *N. クラッサ* (*N. crassa*)、ポドスポラ属 (*Podospora*)、ボトリチス属 (*Botrytis*)、コリビア属 (*Collybia*)、ツリガネタケ属 (*Fomes*)、レンチヌス属 (*Lentinus*)、ヒラタケ属 (*Pleurotus*)、カワラタケ属 (*Trametes*)、例えば、フルイカワラタケ (*T. villosa*) 及びカワラタケ (*T. versicolor*)、リゾクトニア属 (*Rhizoctonia*)、例えば *R. ソラニ* (*R. solani*)、ヒトヨタケ属 (*Coprinopsis*)、例えば、ウシグソヒトヨタケ (*C. cinerea*)、ササクレヒトヨタケ (*C. comatus*)、ヒメヒトヨタケ (*C. friesii*)、及びヒメヒガサヒトヨタケ (*C. plicatilis*)、ナヨタケ属 (*Psathyrella*)、例えば *イタチタケ* (*P. condelleana*)、*ヒカゲタケ*属 (*Panaeolus*)、例えば *ワライタケ* (*P. papilionaceus*)、ミセリオフトラ属 (*Myceliophthora*)、例えば *M. サーモフィラ* (*M. thermophila*)、*シタリジウム*属 (*Schytalidium*)、例えば *S. サーモフィルム* (*S. thermophilum*)、ポリボルス属 (*Polyporus*)、例えば *P. ピンシツス* (*P. pinsitus*)、*フレビア*属 (*Phlebia*)、例えば *P. ラジアータ* (*P. radiata*) (国際公開第 92/01046 号パンフレット)、又は *コリオルス*属 (*Coriolus*)、例えば *C. ヒルスツス* (*C. hirsutus*) (日本特許第 2238885 号公報) の株から誘導可能なラッカーゼが挙げられる。

30

40

【0203】

細菌由来の適切な例としては、バチルス属 (*Bacillus*) の株から誘導可能なラッカーゼが挙げられる。

【0204】

ヒトヨタケ属 (*Coprinopsis*) 又はミセリオフトラ属 (*Myceliophthora*) から得られるラッカーゼ; 国際公開第 97/08325 号パンフレットに開示の *ウシグソヒトヨタケ* (*Coprinopsis cinerea*) から得られるラッ

50

カーゼ；又は国際公開第 95 / 33836 号パンフレットに開示のミセリオフトラ・サーモフィラ (*Myceliophthora thermophila*) から得られるラッカーゼが好ましい。

【0205】

洗剤酵素は、1つ以上の酵素を含有する別々の添加剤を添加するか、又はこれらの酵素を含む組み合わせた添加剤を添加することによって、洗剤組成物中に含まれ得る。本発明の洗剤添加剤、すなわち、別々の添加剤又は組み合わせた添加剤が、例えば、顆粒、液体、スラリーなどとして配合され得る。好ましい洗剤添加剤製剤は、顆粒、非飛散性顆粒、液体、安定化された液体、及びスラリーである。

【0206】

非飛散性顆粒は、例えば、米国特許第 4, 106, 991 号明細書及び米国特許第 4, 661, 452 号明細書に開示の通りに生成することができ、任意選択により、当該技術分野において知られている方法によってコーティングされていてもよい。ワックス状コーティング材料の例として、平均分子量が 1000 ~ 20000 のポリ(エチレンオキシド)製品(ポリエチレングリコール、PEG)；16 ~ 50 エチレンオキシド単位を有するエトキシ化ノニルフェノール；アルコールが 12 ~ 20 個の炭素原子を含有し、且つ 15 ~ 80 エチレンオキシド単位が存在するエトキシ化脂肪族アルコール；脂肪族アルコール；脂肪酸；並びに脂肪酸のモノー及びジー及びトリグリセリドがある。流動層技術によって塗布するのに適した膜形成コーティング材料の例が、英国特許第 1483591 号明細書に示されている。液体酵素の調製物は、例えば、確立された方法に従って、ポリオール、例えばプロピレングリコール、糖若しくは糖アルコール、乳酸、又はホウ酸を添加することによって安定化されていてもよい。保護酵素は、欧州特許第 238216 号明細書に開示されている方法に従って調製され得る。

【0207】

分散剤

また、本発明の洗剤組成物は、分散剤を含有することも可能である。粉末洗剤は、分散剤を含み得る。適切な水溶性有機材料としては、ホモ若しくはコポリマー酸又はそれらの塩が挙げられ、ポリカルボン酸は、2 個以下の炭素原子によって互いに分離された少なくとも 2 個のカルボキシル基を含む。適切な分散剤が、例えば、Powdered Detergents, Surfactant science series volume 71, Marcel Dekker, Inc. に記載されている。

【0208】

移染防止剤

また、本発明のクリーニング組成物は、1 種以上の移染防止剤を含み得る。適切な高分子移染防止剤としては、以下に限定されないが、ポリビニルピロリドンポリマー、ポリアミン N-オキシドポリマー、N-ビニルピロリドン及び N-ビニルイミダゾールのコポリマー、ポリビニルオキサゾリドン、並びにポリビニルイミダゾール、又はそれらの混合物が挙げられる。主題の組成物中に存在する場合、移染防止剤は、組成物の約 0.0001 重量% ~ 約 10 重量%、約 0.01 重量% ~ 約 5 重量% のレベルにて、又は約 0.1 重量% ~ 約 3 重量% のレベルでも存在し得る。

【0209】

蛍光増白剤

また、洗剤組成物は、好ましくは、蛍光増白剤又は光学的増白剤など、クリーニング下の物品の色合いを調整し得る追加の成分を含有し得る。存在している場合、増白剤は、約 0.01 % ~ 約 0.5 % のレベルであることが好ましい。洗濯洗剤組成物での使用に適したあらゆる蛍光増白剤が、本発明の組成物に用いられ得る。最も一般的に用いられる蛍光増白剤は、ジアミノスチルベンスルホン酸誘導体、ジアリールピラゾリン誘導体、及びビスフェニル-ジスチル誘導体のクラスに属するものである。ジアミノスチルベンスルホン酸誘導体タイプの蛍光増白剤の例として：4, 4'-ビス-(2-ジエタノールアミノ-4-アニリノ-s-トリアジン-6-イルアミノ)スチルベン-2, 2'-ジスル

ホネート、4, 4'-ビス-(2, 4-ジアニリノ-s-トリアジン-6-イルアミノ)スチルベン-2, 2'-ジスルホネート、4, 4'-ビス-(2-アニリノ-4-(N-メチル-N-2-ヒドロキシエチルアミノ)-s-トリアジン-6-イルアミノ)スチルベン-2, 2'-ジスルホネート、4, 4'-ビス-(4-フェニル-1, 2, 3-トリアゾール-2-イル)スチルベン-2, 2'-ジスルホネート、及びナトリウム5-(2H-ナフト[1, 2-d][1, 2, 3]トリアゾール-2-イル)-2-[(E)-2-フェニルビニル]ベンゼンスルホネートのナトリウム塩が挙げられる。好ましい蛍光増白剤は、Ciba-Geigy AG, Basel, Switzerlandから市販されているTinopal DMS及びTinopal CBSである。Tinopal DMSは、4, 4'-ビス-(2-モルフォリノ-4-アニリノ-s-トリアジン-6-イルアミノ)スチルベン-2, 2'-ジスルホネートのジナトリウム塩である。Tinopal CBSは、2, 2'-ビス-(フェニルスチリル)-ジスルホネートのジナトリウム塩である。好ましい蛍光増白剤は、Paramount Minerals and Chemicals, Mumbai, Indiaによって供給される市販のParawhite KXでもある。Tinopal CBS-Xは、ジスチリルビフェニルジスルホン酸二ナトリウムとしても知られている4, 4'-ビス-(スルホスチリル)-ビフェニル二ナトリウム塩である。本発明で用いるのに適した他の蛍光剤としては、1-3-ジアリールピラゾリン及び7-アルキルアミノクマリンが挙げられる。

10

【0210】

適切な蛍光性増白剤レベルは、約0.01、0.05、約0.1、又は約0.2重量%の下限レベルから、0.5又は0.75重量%の上限レベルまでを含む。

20

【0211】

汚れ遊離ポリマー

また、洗剤組成物は、綿及びポリエステル系の布地など、布地から汚れを除去する、ポリエステル系の布地から疎水性の汚れを除去する一助となる1つ以上の汚れ遊離ポリマーを含み得る。汚れ遊離ポリマーは、例えば、非イオン性又はアニオン性テレフタレート系ポリマー、ポリビニルカプロラクタム及び関連するコポリマー、ビニルグラフトコポリマー、ポリエステルポリアミドであってもよく、例えば、Chapter 7, Powdered Detergents, Surfactant science series volume 71, Marcel Dekker, Inc.を参照されたい。別のタイプの汚れ遊離ポリマーは、コア構造と、当該コア構造に結合した複数のアルコキシレート基とを含む両親媒性アルコキシル化油脂クリーニングポリマーである。コア構造は、国際公開第2009/087523号パンフレット(本明細書において参照により組み込まれる)に詳述されているポリアルキレンイミン構造又はポリアルカノールアミン構造を含み得る。さらに、ランダムグラフトコポリマーは、適切な汚れ遊離ポリマーである。適切なグラフトコポリマーは、国際公開第2007/138054号パンフレット、国際公開第2006/108856号パンフレット、及び国際公開第2006/113314号パンフレット(参照により本明細書に組み込まれる)においてより詳細に記載されている。他の汚れ遊離ポリマーは、欧州特許第1867808号明細書又は国際公開第2003/040279号パンフレット(共に本明細書において参照により組み込まれる)に記載されるものなどの変性セルロース誘導体などのとりわけ置換セルロース系構造といった置換多糖構造である。適切なセルロース系ポリマーとしては、セルロース、セルロースエーテル、セルロースエステル、セルロースアミド、及びそれらの混合物が挙げられる。適切なセルロース系ポリマーとしては、アニオン性変性セルロース、非イオン性変性セルロース、カチオン性変性セルロース、双性イオン性変性セルロース、及びそれらの混合物が挙げられる。適切なセルロース系ポリマーとしては、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシルエチルセルロース、ヒドロキシルプロピルメチルセルロース、エステルカルボキシメチルセルロース、及びそれらの混合物が挙げられる。

30

40

【0212】

50

再沈着防止剤

また、本発明の洗剤組成物は、カルボキシメチルセルロース（ＣＭＣ）、ポリビニルアルコール（ＰＶＡ）、ポリビニルピロリドン（ＰＶＰ）、ポリオキシエチレン及び／又はポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、アクリル酸のホモポリマー、アクリル酸とマレイン酸とのコポリマー、並びにエトキシ化ポリエチレンイミンなどの１種以上の再沈着防止剤を含んでもよい。また、先の汚れ遊離ポリマーの下で記載されるセルロース系ポリマーは、再沈着防止剤としても機能し得る。

【０２１３】

レオロジー変性剤

また、本発明の洗剤組成物は、粘度低下剤とは異なる１種以上のレオロジー変性剤、構造化剤、又は増粘剤を含んでもよい。レオロジー変性剤は、非ポリマー性結晶質、ヒドロキシ官能性の材料、液体洗剤組成物の水性液体マトリックスにずり減粘特性を付与するポリマーレオロジー変性剤からなる群から選択される。洗剤のレオロジー及び粘性は、例えば、欧州特許第２１６９０４０号明細書に示される、当該技術分野において知られている方法によって変性且つ調節することができる。

【０２１４】

他の適切な補助材料として、以下に限定されないが、収縮防止剤、しわ防止剤、殺菌剤、バインダ、キャリア、染料、酵素安定化剤、布地軟化剤、充填材、起泡調節剤、ヒドロトロップ、香料、顔料、石鹼泡抑制剤、溶剤、並びに液体洗剤用構造化剤及び／又は構造弾性化剤が挙げられる。

【０２１５】

他の材料

また、本発明のクリーニング組成物に用いられる、当該技術分野において知られているいずれの洗剤成分も利用され得る。他の任意選択の洗剤成分として、単独の、又は組み合わせた抗腐食剤、収縮防止剤、汚れ再沈着防止剤、しわ防止剤、殺菌剤、結合剤、腐食防止剤、崩壊剤／崩壊薬剤、染料、酵素安定化剤（ホウ酸、ホウ酸塩、ＣＭＣ、及び／又はプロピレングリコールなどのポリオールが挙げられる）、粘土を含む布地柔軟仕上げ剤、充填剤／加工助剤、蛍光増白剤／光学的増白剤、起泡促進剤、泡（石鹼泡）調節剤、香料、汚れ懸濁剤、柔軟剤、起泡抑制剤、黄褐色阻害剤、及びウィッキング剤が挙げられる。洗剤で用いられる、当該技術分野において知られているあらゆる成分が利用され得る。そのような成分の選択は、十分に当業者の技術の範囲内である。

【０２１６】

洗剤生成物の製剤化

洗剤組成物は、好都合なあらゆる形態、例えば、バー、均質錠剤、２つ以上の層を有する錠剤、普通の、若しくは圧縮した粉末、顆粒、ペースト、ゲル、又は普通の、圧縮した、若しくは濃縮した液体であり得る。他の洗剤製剤形態として、単一単位用量形態、例えば層をなす形態及びパウチが挙げられる。

【０２１７】

パウチは、単一区画又は多区画として構成することができる。これは、例えば水との接触前にパウチから組成物を放出させることなく、組成物を保持するのに適した、あらゆる形態、形状、及び材質のものであり得る。パウチは、内容量を包含する水溶性フィルム製であり、区画に分けることができる。好ましいフィルムは、ポリマー材料、好ましくはフィルム又はシートに形成されるポリマーである。好ましいポリマー、コポリマー、又はその誘導体は、ポリアクリラート及び水溶性アクリラートコポリマー、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ナトリウムデキストリン、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、マルトデキストリン、ポリメタクリレートから選択され、最も好ましくは、ポリビニルアルコールコポリマー及びヒドロキシプロピルメチルセルロース（ＨＰＭＣ）である。好ましくは、フィルム中のポリマーのレベルは、例えば、少なくとも約６０％である。好ましい平均分子量は、典型的には、約２０，０００～約１５０，０００となる。また、膜は、加水分解的に分解可能且つ水

10

20

30

40

50

溶性のポリマー混合物、例えば、ポリラクチド及びポリビニルアルコール、並びに可塑剤、例えばグリセロール、エチレングリセロール、プロピレングリコール、ソルビトール、及びそれらの混合物を含む混合組成物のものであり得る。パウチは、水溶性フィルムによって分離された固体洗濯クリーニング組成物若しくは一部の成分及び／又は液体クリーニング組成物若しくは一部の成分を含むことができる。液体成分のための区画は、固体を含有する区画と、組成が異なり得る（例えば、米国特許出願公開第2009/0011970A1号明細書参照）。

【0218】

洗剤成分は、水溶性パウチ内又は錠剤の異なる層内の区画によって互いに物理的に分離されることによって、成分間の否定的な保存相互作用を回避することができる。また、区画の各々の様々な溶解プロファイルにより、洗浄溶液中の選択した成分の溶解遅延を起こすことができる。

【0219】

単位用量ではない液体又はゲル洗剤は水溶性であってもよく、典型的には、少なくとも20重量%且つ最大95%の水、例えば、最大約70%、最大約65%、最大約55%、最大約45%、又は最大約35%の水を含有する。濃縮された液体洗剤は、水含量がより低くてもよく、例えば、約30%以下又は約20%以下、例えば、約2%～約15%などの約1%～約20%の範囲内である。限定されないが、アルカノール、アミン、ジオール、エーテル、及びポリオールが挙げられる他の種類の液体が、水性液体又はゲル中に含まれてもよい。水溶性の液体又はゲル洗剤は、0～30%の有機溶剤を含有し得る。これ以外にも、液体又はゲル洗剤は、非水性であってもよい。

【0220】

液体洗剤組成物は、例えば、約pH7、約pH8、若しくは約pH9などの約6～約10の中程度のpHを有するように製剤化され得るか、又は例えば、約pH10、約pH11、若しくは約pH12などの約10～約12のより高いpHを有するように製剤化され得る。

【0221】

別段の指示がない限り、本明細書中で用いられる用語「液体」は、あらゆる種類の液体洗剤組成物、例えば、濃縮された液体、ゲル、又は、例えば1つ以上の区画を有するパウチの、液体若しくはゲル部分を包含するものとして理解されるべきである。

【0222】

顆粒状洗剤製剤

酵素含有コア及び任意選択により1つ以上のコーティングを含む顆粒の形態の酵素が、顆粒状（粉末）洗剤に一般的に用いられる。コアを調製する種々の方法が、当該技術分野においてよく知られており、例えば、a) 液体酵素含有溶液を噴霧乾燥させることと、b) 事前形成された不活性コア粒子を取り囲む層として、例えば流動床装置を用いて、酵素がコーティングされた層状生成物を生成することと、c) 事前形成されたコアの表面上且つ／又はその中に酵素を吸収させることと、d) 酵素含有ペーストを押し出すことと、e) 溶融ワックス中に酵素含有粉末を懸濁させて、微粒化して、小球状にした生成物をもたらすことと、f) 造粒成分の乾燥粉末組成物に酵素含有液を加えることによってミキサー造粒することと、g) より大きな粒子、ペレットなどの粉碎又は破碎によって酵素含有コアをサイズ縮小することと、h) 流動層造粒することとを含む。酵素含有コアは、例えば流動床乾燥機、又は飼料若しくは酵素産業において顆粒を乾燥させるための他の知られている方法を用いて、乾燥させて、典型的に0.1～10重量%の水の含水率をもたらし得る。

【0223】

酵素含有コアは、場合によっては、保存安定性を向上させ、且つ／又は粉塵形成を低減するためのコーティングと共に提供される。洗剤用の酵素顆粒に多くの場合用いられるコーティングのタイプは、塩コーティング、典型的には無機塩のコーティングであり、これは、例えば、流動床を用いて塩の溶液として塗布され得る。用いられ得る他のコーティ

ング材料として、例えば、ポリエチレングリコール（PEG）、メチルヒドロキシプロピルセルロース（MHP C）、及びポリビニルアルコール（PVA）がある。顆粒は、2つ以上のコーティング、例えば、塩コーティングに続いて、PEG、MHP C、又はPVAなどの材料の追加のコーティングを含有し得る。

【0224】

酵素顆粒及びその生成に関するさらなる詳細については、国際公開第2013/007594号パンフレット、並びに例えば国際公開第2009/092699号パンフレット、欧州特許第1705241号明細書、欧州特許第1382668号明細書、国際公開第2007/001262号パンフレット、米国特許第6,472,364号明細書、国際公開第2004/074419号パンフレット、及び国際公開第2009/102854号パンフレットを参照されたい。

10

【0225】

共顆粒中での酵素の製剤化

ヘキソサミニダーゼは、顆粒として、例えば、1種以上の酵素を組み合わせた複合顆粒として製剤化され得る。その際、各酵素は、より多くの顆粒中に存在して、洗剤内での酵素のより均一な分布を確実にすることとなる。これはまた、様々な粒径に起因して、各種酵素の物理的分離を低減する。洗剤業界用の多酵素複合顆粒を製造する方法が、I P . c o m 開示 I P C O M 0 0 0 2 0 0 7 3 9 D に開示されている。

【0226】

複合顆粒を用いた酵素の製剤化の別の例が、国際公開第2013/188331号パンフレットに開示されており、これは、（a）多酵素複合顆粒；（b）10wt未満のゼオライト（無水基準）；及び（c）10wt未満のリン酸塩（無水基準）を含む洗剤組成物に関し、前記酵素複合顆粒は、10～98重量%の吸湿成分を含み、組成物は加えて、20～80重量%の洗剤吸湿成分を含む。

20

また、国際公開第2013/188331号パンフレットは、表面、好ましくは布地表面を処理且つ／又はクリーニングする方法であって、（i）前記表面を、特許請求の範囲に記載され、且つ明細書中に記載される水性洗浄液中の洗剤組成物と接触させる工程と、（i i）表面を濯ぎ、且つ／又は乾燥させる工程とを含む方法に関する。

【0227】

液体製剤

また、本発明は、本発明のヘキソサミニダーゼバリエントを含む液体組成物に関する。組成物は、酵素安定剤（例としては、プロピレングリコール若しくはグリセロールなどのポリオール、糖若しくは糖アルコール、乳酸、可逆性プロテアーゼ阻害剤、ホウ酸若しくはホウ酸誘導体、例えば芳香族ホウ酸エステル、又は4-ホルミルフェニルボロン酸などのフェニルボロン酸誘導体が挙げられる）を含み得る。

30

【0228】

いくつかの実施形態では、充填剤又はキャリア材料が、そのような組成物の容量を増大させるために含まれる。適切な充填材又はキャリア材料として、硫酸塩、炭酸塩、及びケイ酸塩などの種々の塩、並びにタルク、粘土などが挙げられるが、これらに限定されない。液体組成物に適した充填材又はキャリア材料として、水、又はポリオール及びジオールが挙げられる低分子量の第一級アルコール及び第二級アルコールが挙げられるが、これらに限定されない。そのようなアルコールの例として、メタノール、エタノール、プロパノール、及びイソプロパノールが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、組成物は、そのような材料を約5%～約90%含有する。

40

【0229】

一態様では、液体製剤は、20～80重量%のポリオールを含む。一実施形態では、液体製剤は、0.001～2重量%の保存剤を含む。

【0230】

別の実施形態では、本発明は、

（A）0.001～25重量%の本発明のバリエント；

50

- (B) 20～80重量%のポリオール；
- (C) 任意選択の0.001～2重量%の保存剤；及び
- (D) 水

を含む液体製剤に関する。

【0231】

別の実施形態では、本発明は、

- (A) 0.001～25重量%の本発明のバリエーション；
- (B) 0.001～2重量%の保存剤；
- (C) 任意選択の20～80重量%のポリオール；及び
- (D) 水

を含む液体製剤に関する。

【0232】

別の実施形態では、液体製剤は、ポリオール、塩化ナトリウム、安息香酸ナトリウム、ソルビン酸カリウム、硫酸ナトリウム、硫酸カリウム、硫酸マグネシウム、チオ硫酸ナトリウム、炭酸カルシウム、クエン酸ナトリウム、デキストリン、グルコース、スクロース、ソルビトール、ラクトース、デンプン、PVA、酢酸塩及びリン酸塩からなる群から選択され、好ましくは、硫酸ナトリウム、デキストリン、セルロース、チオ硫酸ナトリウム、カオリン及び炭酸カルシウムからなる群から選択される配合剤などの1種以上の配合剤を含む。一実施形態では、ポリオールは、グリセロール、ソルビトール、プロピレングリコール(MPG)、エチレングリコール、ジエチレングリコール、トリエチレングリコール、1,2-プロピレングリコール又は1,3-プロピレングリコール、ジプロピレングリコール、約600未満の平均分子量を有するポリエチレングリコール(PEG)及び約600未満の平均分子量を有するポリプロピレングリコール(PPG)からなる群から選択され、より好ましくは、グリセロール、ソルビトール及びプロピレングリコール(MPG)又はその任意の組合せからなる群から選択される。

【0233】

別の実施形態では、液体製剤は、20～80%のポリオール（すなわち、ポリオールの総量）、例えば、25～75%のポリオール、30～70%のポリオール、35～65%のポリオール、又は40～60%のポリオールを含む。一実施形態では、液体製剤は、20～80%のポリオール、例えば、25～75%のポリオール、30～70%のポリオール、35～65%のポリオール、又は40～60%のポリオールを含み、ポリオールは、グリセロール、ソルビトール、プロピレングリコール(MPG)、エチレングリコール、ジエチレングリコール、トリエチレングリコール、1,2-プロピレングリコール又は1,3-プロピレングリコール、ジプロピレングリコール、約600未満の平均分子量を有するポリエチレングリコール(PEG)及び約600未満の平均分子量を有するポリプロピレングリコール(PPG)からなる群から選択される。一実施形態では、液体製剤は、20～80%のポリオール（すなわち、ポリオールの総量）、例えば25～75%のポリオール、30～70%のポリオール、35～65%のポリオール又は40～60%のポリオールを含み、ポリオールは、グリセロール、ソルビトール及びプロピレングリコール(MPG)からなる群から選択される。

【0234】

別の実施形態では、保存剤は、ソルビン酸ナトリウム、ソルビン酸カリウム、安息香酸ナトリウム及び安息香酸カリウム又はそれらの任意の組合せからなる群から選択される。一実施形態では、液体製剤は、0.02～1.5重量%の保存剤、例えば、0.05～1重量%の保存剤又は0.1～0.5重量%の保存剤を含む。一実施形態では、液体製剤は、0.001～2重量%の保存剤（すなわち、保存剤の総量）、例えば、0.02～1.5重量%の保存剤、0.05～1重量%の保存剤、又は0.1～0.5重量%の保存剤を含み、保存剤は、ソルビン酸ナトリウム、ソルビン酸カリウム、安息香酸ナトリウム及び安息香酸カリウム又はそれらの任意の組合せからなる群から選択される。

【0235】

10

20

30

40

50

別の実施形態では、液体製剤はさらに、例えば先に記載の1つ以上の追加の酵素を含む。

【0236】

ヘキソサミニダーゼバリエーションの使用

本発明のヘキソサミニダーゼバリエーションは、クリーニングプロセス、例えば洗濯又は硬質表面クリーニングにおける、特に洗濯での使用に適している。したがって、本発明の一態様は、品目を洗濯する方法に関し、品目は生地であり、この方法は、

- a) 品目を、本発明のヘキソサミニダーゼバリエーションを含む洗浄液に曝すこと；
- b) 少なくとも1つの洗浄サイクルを完了すること；及び、任意選択により
- c) 品目を濯ぐこと

を含む。

【0237】

液体洗浄溶液のpHは、典型的には約5.5～約10の範囲内、より典型的には約7～約9の範囲内、例えば、約7～約8.5又は約7～約8の範囲内にある。

【0238】

洗浄液は、温度が5℃～95℃の範囲、又は10℃～80℃の範囲、10℃～70℃の範囲、10℃～60℃の範囲、10℃～50℃の範囲、15℃～40℃の範囲、又は20℃～30℃の範囲の温度を有し得る。

【0239】

洗浄液中のヘキソサミニダーゼバリエーション酵素の濃度は、典型的には、0.0001mg/l～10mg/l、0.0002mg/l～10mg/l、0.001mg/l～10mg/l、0.002mg/l～10mg/l、0.01mg/l～10mg/l、0.02mg/l～10mg/l、0.1mg/l～10mg/l、0.2mg/l～10mg/l又は0.2mg/l～5mg/lの酵素タンパク質の範囲内にある。

【0240】

一実施形態では、ヘキソサミニダーゼバリエーション又はバリエーションを含む洗剤組成物は、硬質表面のクリーニングに使用することができ、硬質表面は、例えば、食器類、テーブルトップ、壁若しくは床などの表面、又は洗濯機若しくは食器洗浄機などの機械の内面であり得る。

【0241】

Tシャツ又はスポーツウエアなどの品目が用いられる場合、それらは使用者の身体由来の細菌、及びそれらが用いられる残りの環境由来の細菌に曝露される。これにより、品目が洗浄された後ですら、その品目に悪臭が生じ得る。したがって、本発明はまた、生地に付いた悪臭の除去又は低減方法に関する。悪臭は、臭いが不快な化合物を生成する細菌によって引き起こされ得る。そのような不快な臭いがする化合物の一例として、E-2-ノネナールがある。悪臭は、まだ濡れている新たに洗浄された生地にも存在し得るし、悪臭は、新たに洗浄されてから乾燥させた生地にも存在し得る。また、悪臭は、洗浄後しばらく溜めておいた生地にも存在し得る。したがって、本発明はまた、濡れた又は乾いた生地由来のE-2-ノネナールなどの悪臭の削減又は除去のための、本発明のヘキソサミニダーゼバリエーションの使用に関する。

【0242】

一実施形態では、本発明のヘキソサミニダーゼバリエーションは、親又は配列番号1などの参照ヘキソサミニダーゼと比較して、悪臭除去特性が向上している（ここで、悪臭は、国際公開第2017/186943号パンフレットの実施例9に記載のように測定される）。

【0243】

本発明は、以下の番号を付した段落によってさらに定義される。

1. 配列番号1のヘキソサミニダーゼポリペプチドのバリエーションであって、配列番号1と比較して、

配列番号1の位置163、227、252及び309に対応する1つ以上の位置、好ま

10

20

30

40

50

しくは2、3又は4つの位置での置換；並びに

配列番号1の位置106、111、120、124、127、150、170、171、178、199、208、254、255及び278に対応する1つ以上の位置での置換を含み；

ヘキササミニダーゼ活性を有し、且つ配列番号1、配列番号2又は配列番号3のポリペプチドに対して少なくとも60%、例えば少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%又は少なくとも95%の配列同一性（但し、100%未満の配列同一性）を有するバリエーション。

2. 配列番号1と比較して、S163P、N227T、N252P及びK309Eからなる群から選択される2、3又は4つの置換を含み；

V106M、V106N、D111R、T120V、Y124I、Y124K、Y124L、R127P、E150N、L170G、D171F、D171H、Q178K、S199W、S208W、F254I、T255D及びI278Vからなる群から選択される少なくとも1つの置換をさらに含む、段落1のヘキササミニダーゼバリエーション。

3. 配列番号1と比較して、H15Y、S186R、S225G、E232D、G235W、N260Q、H272V、S279D、Y281P、K308Q及びK312Qからなる群から選択される少なくとも1つの置換、例えば前記置換の2、3、4、5、6、7、8、9、10個又は全てをさらに含む、段落1又は2のヘキササミニダーゼバリエーション。

4. 配列番号1と比較して、Q3I、A49W及びN59Eからなる群から選択される1つ以上の置換、好ましくは前記置換の2つ若しくは3つ全て；又はQ3F、V140I、Q215K及びN267Tからなる群から選択される1つ以上の置換、好ましくは前記置換の2つ、3つ若しくは4つ全てをさらに含む、段落3のヘキササミニダーゼバリエーション。

5. 配列番号1と比較して、

S163P、N227T、N252P及びK309Eの置換；並びに

H15Y、S186R、S225G、E232D、G235W、N260Q、H272V、S279D、Y281P、K308Q及びK312Qからなる群から選択される少なくとも1つの置換、例えば前記置換の2、3、4、5、6、7、8、9、10又は全てを含む、段落1～4のいずれかのヘキササミニダーゼバリエーション。

6. 配列番号1と比較して、V106M/N、D111R、T120V、Y124I/K/L、R127P、E150N、L170G、D171F/H、Q178K、S199W、S208W、T255D、N267T、I278V及びK308Eからなる群から選択される少なくとも1つの置換、例えば前記置換の少なくとも2つを含み；且つ配列番号2又は配列番号3に対して、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%又は少なくとも95%の配列同一性（但し、100%未満の配列同一性）を有する、段落1～5のいずれかのヘキササミニダーゼバリエーション。

7. 配列番号1と比較して、V106M/N、D111R、T120V、E150N、L170G、D171F、Q178K、S199W、S208W、T255D及びI278Vからなる群から選択される少なくとも1つの置換、例えば前記置換の少なくとも2つを含み；且つ配列番号2又は配列番号3に対して、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%又は少なくとも95%の配列同一性（但し、100%未満の配列同一性）を有する、段落1～6のいずれかのヘキササミニダーゼバリエーション。

8. 配列番号1と比較して、V106M/N、D111R、T120V、E150N、D171F及びI278Vからなる群から選択される少なくとも1つの置換、例えば前記置換の少なくとも2つを含み；且つ配列番号2又は配列番号3に対して、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%又は少なくとも95%の配列同一性（但し、100%未満の配列同一性）を有する、段落1～7のいずれかのヘキササミニダーゼバリエーション。

9. D111R、T120V及びE150Nからなる群から選択される少なくとも1つの置換を含み；且つ配列番号2又は配列番号3に対して、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%又は少なくとも95%の配列同一性（但し、100%未満の配列同一性）を有する、段落1～8のいずれかのヘキソサミニダーゼバリエント。

10. 置換D111R+T120V、D111R+E150N、T120V+E150N又は3つ全ての置換D111R+T120V+E150Nを含む、段落9のヘキソサミニダーゼバリエント。

11. 配列番号2と比較して、以下の置換又は置換セット：

- D111R
- D111R+T120V
- D111R+T120V+E150N
- D111R+T120V+E150N+D171F+I278V
- D111R+T120V+T255D
- D111R+T120V+Y124I
- D111R+T120V+Y124K+Q178K
- D111R+T120V+Y124L+Q178K
- D111R+Y124K+D171FD171F+S208W+N267T
- D171F+T255D
- D171H
- I278V
- K308E
- N267T
- R127P
- T120V+D171F
- T120V+D171F+N267T
- T120V+S208W+N267T
- T120V+T255D
- T120V+T255D+N267T
- T120V+Y124K+Q178K
- V106M+D111R+T120V+D171F
- V106M+Q178K+T255D
- V106M+T120V+D171F+Q178K
- V106M+T120V+Y124I+D171F
- V106M+T120V+Y124I+Q178K
- V106M+T120V+Y124K+D171F
- V106M+T120V+Y124L+Q178K
- V106N+D111R+T120V+E150N
- V106N+S208W+N267T
- V106N+T120V+D171F
- V106N+T120V+D171F+S208W
- V106N+T120V+E150N+D171F+I278V
- V106N+T120V+N267T

の少なくとも1つを含む、段落1～10のいずれかのヘキソサミニダーゼバリエント。

12. 配列番号3と比較して、以下の置換又は置換セット：

- L170G
- E150N+F254I
- F254I
- V106N
- D111R+T120V
- D111R+T120V+E150N

・ D 1 1 1 R + T 1 2 0 V + E 1 5 0 N + D 1 7 1 F + I 2 7 8 V
 ・ D 1 1 1 R + T 1 2 0 V + T 2 5 5 D
 ・ D 1 1 1 R + T 1 2 0 V + Y 1 2 4 I
 ・ D 1 1 1 R + T 1 2 0 V + Y 1 2 4 K + Q 1 7 8 K
 ・ D 1 1 1 R + T 1 2 0 V + Y 1 2 4 L + Q 1 7 8 K
 ・ D 1 1 1 R + Y 1 2 4 K + D 1 7 1 F
 ・ D 1 7 1 F + S 2 0 8 W + N 2 6 7 T
 ・ D 1 7 1 F + T 2 5 5 D
 ・ D 1 7 1 H
 ・ I 2 7 8 V
 ・ K 3 0 8 E
 ・ N 2 6 7 T
 ・ R 1 2 7 P
 ・ T 1 2 0 V + D 1 7 1 F
 ・ T 1 2 0 V + D 1 7 1 F + N 2 6 7 T
 ・ T 1 2 0 V + S 2 0 8 W + N 2 6 7 T
 ・ T 1 2 0 V + T 2 5 5 D
 ・ T 1 2 0 V + T 2 5 5 D + N 2 6 7 T
 ・ T 1 2 0 V + Y 1 2 4 K + Q 1 7 8 K
 ・ V 1 0 6 M + D 1 1 1 R + T 1 2 0 V + D 1 7 1 F
 ・ V 1 0 6 M + Q 1 7 8 K + T 2 5 5 D
 ・ V 1 0 6 M + T 1 2 0 V + D 1 7 1 F + Q 1 7 8 K
 ・ V 1 0 6 M + T 1 2 0 V + Y 1 2 4 I + D 1 7 1 F
 ・ V 1 0 6 M + T 1 2 0 V + Y 1 2 4 I + Q 1 7 8 K
 ・ V 1 0 6 M + T 1 2 0 V + Y 1 2 4 K + D 1 7 1 F
 ・ V 1 0 6 M + T 1 2 0 V + Y 1 2 4 L + Q 1 7 8 K
 ・ V 1 0 6 N + D 1 1 1 R + T 1 2 0 V + E 1 5 0 N
 ・ V 1 0 6 N + S 2 0 8 W + N 2 6 7 T
 ・ V 1 0 6 N + T 1 2 0 V + D 1 7 1 F
 ・ V 1 0 6 N + T 1 2 0 V + D 1 7 1 F + S 2 0 8 W
 ・ V 1 0 6 N + T 1 2 0 V + E 1 5 0 N + D 1 7 1 F + I 2 7 8 V
 ・ V 1 0 6 N + T 1 2 0 V + N 2 6 7 T

10

20

30

の少なくとも1つを含む、段落1～10のいずれかのヘキソサミニダーゼバリエント。

13．配列番号1と比較して、以下の置換又は置換セット：

・ Q 3 I + H 1 5 Y + A 4 9 W + N 5 9 E + D 1 1 1 R + T 1 2 0 V + S 1 6 3 P + S 1
 8 6 R + S 2 2 5 G + N 2 2 7 T + E 2 3 2 D + G 2 3 5 W + N 2 5 2 P + N 2 6 0 Q +
 H 2 7 2 V + S 2 7 9 D + Y 2 8 1 P + K 3 0 8 Q + K 3 0 9 E + K 3 1 2 Q
 ・ Q 3 I + H 1 5 Y + A 4 9 W + N 5 9 E + D 1 1 1 R + T 1 2 0 V + E 1 5 0 N + S 1
 6 3 P + S 1 8 6 R + S 2 2 5 G + N 2 2 7 T + E 2 3 2 D + G 2 3 5 W + N 2 5 2 P +
 N 2 6 0 Q + H 2 7 2 V + S 2 7 9 D + Y 2 8 1 P + K 3 0 8 Q + K 3 0 9 E + K 3 1 2
 Q
 ・ Q 3 I + H 1 5 Y + A 4 9 W + N 5 9 E + D 1 1 1 R + T 1 2 0 V + E 1 5 0 N + S 1
 6 3 P + D 1 7 1 F + S 1 8 6 R + S 2 2 5 G + N 2 2 7 T + E 2 3 2 D + G 2 3 5 W +
 N 2 5 2 P + N 2 6 0 Q + H 2 7 2 V + I 2 7 8 V + S 2 7 9 D + Y 2 8 1 P + K 3 0 8
 Q + K 3 0 9 E + K 3 1 2 Q
 ・ Q 3 I + H 1 5 Y + A 4 9 W + N 5 9 E + D 1 1 1 R + T 1 2 0 V + S 1 6 3 P + S 1
 8 6 R + S 2 2 5 G + N 2 2 7 T + E 2 3 2 D + G 2 3 5 W + N 2 5 2 P + T 2 5 5 D +
 N 2 6 0 Q + H 2 7 2 V + S 2 7 9 D + Y 2 8 1 P + K 3 0 8 Q + K 3 0 9 E + K 3 1 2
 Q
 ・ Q 3 I + H 1 5 Y + A 4 9 W + N 5 9 E + D 1 1 1 R + T 1 2 0 V + Y 1 2 4 I + S 1

40

50

Q
• Q 3 I + H 1 5 Y + A 4 9 W + N 5 9 E + T 1 2 0 V + S 1 6 3 P + S 1 8 6 R + S 2
2 5 G + N 2 2 7 T + E 2 3 2 D + G 2 3 5 W + N 2 5 2 P + T 2 5 5 D + N 2 6 0 Q +

50

H 2 7 2 V + S 2 7 9 D + Y 2 8 1 P + K 3 0 8 Q + K 3 0 9 E + K 3 1 2 Q
 • Q 3 I + H 1 5 Y + A 4 9 W + N 5 9 E + T 1 2 0 V + S 1 6 3 P + S 1 8 6 R + S 2
 2 5 G + N 2 2 7 T + E 2 3 2 D + G 2 3 5 W + N 2 5 2 P + T 2 5 5 D + N 2 6 0 Q +
 N 2 6 7 T + H 2 7 2 V + S 2 7 9 D + Y 2 8 1 P + K 3 0 8 Q + K 3 0 9 E + K 3 1 2
 Q
 • Q 3 I + H 1 5 Y + A 4 9 W + N 5 9 E + T 1 2 0 V + Y 1 2 4 K + S 1 6 3 P + Q 1
 7 8 K + S 1 8 6 R + S 2 2 5 G + N 2 2 7 T + E 2 3 2 D + G 2 3 5 W + N 2 5 2 P +
 N 2 6 0 Q + H 2 7 2 V + S 2 7 9 D + Y 2 8 1 P + K 3 0 8 Q + K 3 0 9 E + K 3 1 2
 Q
 • Q 3 I + H 1 5 Y + A 4 9 W + N 5 9 E + V 1 0 6 M + D 1 1 1 R + T 1 2 0 V + S 1 10
 6 3 P + D 1 7 1 F + S 1 8 6 R + S 2 2 5 G + N 2 2 7 T + E 2 3 2 D + G 2 3 5 W +
 N 2 5 2 P + N 2 6 0 Q + H 2 7 2 V + S 2 7 9 D + Y 2 8 1 P + K 3 0 8 Q + K 3 0 9
 E + K 3 1 2 Q
 • Q 3 I + H 1 5 Y + A 4 9 W + N 5 9 E + V 1 0 6 M + S 1 6 3 P + Q 1 7 8 K + S 1
 8 6 R + S 2 2 5 G + N 2 2 7 T + E 2 3 2 D + G 2 3 5 W + N 2 5 2 P + T 2 5 5 D +
 N 2 6 0 Q + H 2 7 2 V + S 2 7 9 D + Y 2 8 1 P + K 3 0 8 Q + K 3 0 9 E + K 3 1 2
 Q
 • Q 3 I + H 1 5 Y + A 4 9 W + N 5 9 E + V 1 0 6 M + T 1 2 0 V + S 1 6 3 P + D 1
 7 1 F + Q 1 7 8 K + S 1 8 6 R + S 2 2 5 G + N 2 2 7 T + E 2 3 2 D + G 2 3 5 W +
 N 2 5 2 P + N 2 6 0 Q + H 2 7 2 V + S 2 7 9 D + Y 2 8 1 P + K 3 0 8 Q + K 3 0 9 20
 E + K 3 1 2 Q
 • Q 3 I + H 1 5 Y + A 4 9 W + N 5 9 E + V 1 0 6 M + T 1 2 0 V + Y 1 2 4 I + S 1
 6 3 P + D 1 7 1 F + S 1 8 6 R + S 2 2 5 G + N 2 2 7 T + E 2 3 2 D + G 2 3 5 W +
 N 2 5 2 P + N 2 6 0 Q + H 2 7 2 V + S 2 7 9 D + Y 2 8 1 P + K 3 0 8 Q + K 3 0 9
 E + K 3 1 2 Q
 • Q 3 I + H 1 5 Y + A 4 9 W + N 5 9 E + V 1 0 6 M + T 1 2 0 V + Y 1 2 4 I + S 1
 6 3 P + Q 1 7 8 K + S 1 8 6 R + S 2 2 5 G + N 2 2 7 T + E 2 3 2 D + G 2 3 5 W +
 N 2 5 2 P + N 2 6 0 Q + H 2 7 2 V + S 2 7 9 D + Y 2 8 1 P + K 3 0 8 Q + K 3 0 9
 E + K 3 1 2 Q
 • Q 3 I + H 1 5 Y + A 4 9 W + N 5 9 E + V 1 0 6 M + T 1 2 0 V + Y 1 2 4 K + S 1 30
 6 3 P + D 1 7 1 F + S 1 8 6 R + S 2 2 5 G + N 2 2 7 T + E 2 3 2 D + G 2 3 5 W +
 N 2 5 2 P + N 2 6 0 Q + H 2 7 2 V + S 2 7 9 D + Y 2 8 1 P + K 3 0 8 Q + K 3 0 9
 E + K 3 1 2 Q
 • Q 3 I + H 1 5 Y + A 4 9 W + N 5 9 E + V 1 0 6 M + T 1 2 0 V + Y 1 2 4 L + S 1
 6 3 P + Q 1 7 8 K + S 1 8 6 R + S 2 2 5 G + N 2 2 7 T + E 2 3 2 D + G 2 3 5 W +
 N 2 5 2 P + N 2 6 0 Q + H 2 7 2 V + S 2 7 9 D + Y 2 8 1 P + K 3 0 8 Q + K 3 0 9
 E + K 3 1 2 Q
 • Q 3 I + H 1 5 Y + A 4 9 W + N 5 9 E + V 1 0 6 N + D 1 1 1 R + T 1 2 0 V + E 1
 5 0 N + S 1 6 3 P + S 1 8 6 R + S 2 2 5 G + N 2 2 7 T + E 2 3 2 D + G 2 3 5 W +
 N 2 5 2 P + N 2 6 0 Q + H 2 7 2 V + S 2 7 9 D + Y 2 8 1 P + K 3 0 8 Q + K 3 0 9 40
 E + K 3 1 2 Q
 • Q 3 I + H 1 5 Y + A 4 9 W + N 5 9 E + V 1 0 6 N + S 1 6 3 P + S 1 8 6 R + S 2
 0 8 W + S 2 2 5 G + N 2 2 7 T + E 2 3 2 D + G 2 3 5 W + N 2 5 2 P + N 2 6 0 Q +
 N 2 6 7 T + H 2 7 2 V + S 2 7 9 D + Y 2 8 1 P + K 3 0 8 Q + K 3 0 9 E + K 3 1 2
 Q
 • Q 3 I + H 1 5 Y + A 4 9 W + N 5 9 E + V 1 0 6 N + T 1 2 0 V + S 1 6 3 P + D 1
 7 1 F + S 1 8 6 R + S 2 2 5 G + N 2 2 7 T + E 2 3 2 D + G 2 3 5 W + N 2 5 2 P +
 N 2 6 0 Q + H 2 7 2 V + S 2 7 9 D + Y 2 8 1 P + K 3 0 8 Q + K 3 0 9 E + K 3 1 2
 Q
 • Q 3 I + H 1 5 Y + A 4 9 W + N 5 9 E + V 1 0 6 N + T 1 2 0 V + S 1 6 3 P + D 1 50
 7 1 F + S 1 8 6 R + S 2 2 5 G + N 2 2 7 T + E 2 3 2 D + G 2 3 5 W + N 2 5 2 P +
 N 2 6 0 Q + H 2 7 2 V + S 2 7 9 D + Y 2 8 1 P + K 3 0 8 Q + K 3 0 9 E + K 3 1 2
 Q

[illegible]

• Q 3 F + H 1 5 Y + V 1 4 0 I + S 1 6 3 P + S 1 8 6 R + S 1 9 9 W + Q 2 1 5 K +
S 2 2 5 G + N 2 2 7 T + E 2 3 2 D + G 2 3 5 W + N 2 5 2 P + N 2 6 0 Q + N 2 6 7
T + H 2 7 2 V + I 2 7 8 V + S 2 7 9 D + Y 2 8 1 P + K 3 0 8 Q + K 3 0 9 E + K 3
1 2 Q

50

の 1 つを含む、段落 1 ～ 1 2 のいずれかのヘキソサミニダーゼバリエント。

1 4 . 配列番号 2 又は配列番号 3 に対して少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 % 又は少なくとも 9 5 % の配列同一性（但し、1 0 0 % 未満の配列同一性）を有する、段落 1 ～ 1 3 のいずれかのヘキソサミニダーゼバリエント。

1 5 . 配列番号 1、配列番号 2 若しくは配列番号 3 のポリペプチド、又は前記置換のないバリエントと同じアミノ酸配列を有する親ポリペプチドと比較して、安定性が向上している、段落 1 ～ 1 4 のいずれかのヘキソサミニダーゼバリエント。

1 6 . 安定性の向上は、洗剤安定性及び熱安定性からなる群から選択される、段落 1 5 のヘキソサミニダーゼバリエント。

1 7 . 段落 1 ～ 1 6 のいずれかのヘキソサミニダーゼバリエント及び少なくとも 1 つの洗剤補助成分を含む洗剤組成物。 10

1 8 . 洗濯又は硬質表面クリーニング、例えば食器洗浄などのクリーニングプロセスにおける、段落 1 ～ 1 6 のいずれかのヘキソサミニダーゼバリエント又は段落 1 7 の洗剤組成物の使用。

1 9 . 段落 1 ～ 1 6 のいずれかのヘキソサミニダーゼバリエントを含む洗浄液、又は段落 1 7 の洗剤組成物に、品目を曝すことを含む、品目をクリーニングする方法。

2 0 . 品目は、生地或いは硬質表面、例えば食器類、又はテーブルトップ、壁若しくは床などの表面、又は洗浄機若しくは食器洗浄機などの機械の内面である、段落 1 9 の方法。

2 1 . 生地の洗濯方法であって、

a) 生地を、段落 1 ～ 1 6 のいずれかのヘキソサミニダーゼバリエントを含む洗浄液、又は段落 1 7 の洗剤組成物に曝すことと； 20

b) 少なくとも 1 つの洗浄サイクルを完了すること；及び、任意選択により

c) 品目を濯ぐこと

を含む方法。

2 2 . 以下：

(a) 段落 1 ～ 1 7 のいずれか 1 つのヘキソサミニダーゼバリエントを含むコア、及び、任意選択により

(b) コアを囲繞する 1 つ以上の層からなるコーティングを含む顆粒。

2 3 . 段落 1 ～ 1 7 のいずれか 1 つのヘキソサミニダーゼバリエント、及び酵素安定剤、例えばプロピレングリコール若しくはグリセロールなどのポリオール、糖若しくは糖アルコール、乳酸、可逆性プロテアーゼ阻害剤、ホウ酸若しくはホウ酸誘導体、例えば芳香族ホウ酸エステル、又は 4 - ホルミルフェニルボロン酸などのフェニルボロン酸誘導体を含む液体組成物。 30

2 4 . 段落 1 ～ 1 7 のいずれかのヘキソサミニダーゼバリエントをコードするポリヌクレオチド、ポリヌクレオチドを含む核酸コンストラクト若しくは発現ベクター、又はポリヌクレオチドで形質転換した組換え宿主細胞。

2 5 . ヘキソサミニダーゼバリエントを生成する方法であって、

a) バリエントの発現に適した条件の下で段落 2 4 の組換え宿主細胞を培養すること；及び 40

b) バリエントを回収すること

を含む方法。

【 0 2 4 4 】

本発明を以下の実施例によりさらに記載するが、これらは本発明の範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。

【実施例 1】

【 0 2 4 5 】

材料及び方法

ヘキソサミニダーゼ活性アッセイ：

ヘキソサミニダーゼ活性は、例えば、以下のアッセイの 1 つを用いて決定し得る。 50

【0246】

アッセイ1

ヘキソサミニダーゼポリペプチドのヘキソサミニダーゼ活性は、基質として4-ニトロフェニルN-アセチル-β-D-グルコサミニド (Sigma-Aldrich) を用いて判定することができる。酵素反応を、96ウェル平底ポリスチレンマイクロタイタープレート (Thermo Scientific) において以下の条件により3反復で実行する：100 μlの総反応容量中、50 mMの2-(N-モルフォリノ) エタンスルホン酸 pH 6 バッファ、1.5 mg/mlの4-ニトロフェニルN-アセチル-β-D-グルコサミニド、及び20 μg/mlの精製酵素試料。酵素を含まないブランク試料を並行して実行する。反応は、Thermomixer comfort (Eppendorf) 中、37℃で行う。10分のインキュベーション後、5 μlの1M NaOHを各反応混合液に加えて、酵素反応を停止する。POLARstar Omegaプレートリーダー (BMG LABTECH) を用いて、405 nmで吸光度を読み取ることにより、4-ニトロフェニルN-アセチル-β-D-グルコサミニド基質の酵素加水分解により放出された4-ニトロフェノレートイオンの形成を推定した。ブランクを超える吸光度の増加 (試料とブランク間の405 nmでの吸光度の差) は、ヘキソサミニダーゼ活性を示す。

10

【0247】

アッセイ2

ヘキソサミニダーゼポリペプチドのヘキソサミニダーゼ活性は、基質として4-メチルウンベリフェリルN-アセチル-β-D-グルコサミニド (Sigma-Aldrich) を用いて判定することができる。酵素反応を、96ウェル平底ポリスチレンマイクロタイタープレート (Thermo Scientific) において以下の条件により3反復で実行する：200 μlの総反応容量中、20 mMの3-モルフォリノプロパン-1-スルホン酸 pH 7 バッファ、5 mMの4-メチルウンベリフェリルN-アセチル-β-D-グルコサミニド、及び20 nMの精製酵素試料。酵素を含まないブランク試料を並行して実行する。反応は、周囲温度20～25℃で実施する。SpectraMax M2eプレートリーダーを用いて、酵素と基質を混合した直後に反応速度を追跡する。励起波長は368 nmに設定し、蛍光発光読み取りは448 nmで行う。反応を60秒間隔で30分間追跡する。蛍光シグナルの増加を用いて、4-メチルウンベリフェリルN-アセチル-β-D-グルコサミニド基質の酵素加水分解に起因して遊離した4-メチルウンベリフェリルイオンの形成を推定する。

20

30

【0248】

結果を、3反復で実施した各反応についての368 nmの励起及び448 nmの蛍光発光を用いて毎分相対蛍光単位 (RFU/min) として測定した平均反応初速度を示す。ブランクを超える増加した値 (Δ RFU/min) は、ヘキソサミニダーゼ活性を示す。

【0249】

増殖及び発現

ヘキソサミニダーゼポリペプチドを、標準的な96ウェルマイクロタイタープレート (200 μlプロス/ウェル) 中で増殖させたバチルス属 (Bacillus) 宿主細胞中で発現させた。増殖及び発現に使用したプロスは、6 μg/mlのクロラムフェニコールを補充したCal18-2であった (Ostergaard et al., 2010, Identification and characterization of a bacterial glutamic peptidase, BMC Biochem. 11: 47)。マイクロタイタープレートを225 rpmで振盪させながら30℃で3日間増殖させた。増殖後、プレートを遠心分離し、上清を以下に記載するようにストレスを加え、安定性についてアッセイした。増殖、ストレス、及びアッセイに関連する全ての工程を、96ウェル又は384ウェルフォーマットのマイクロタイタープレートで行った。

40

【0250】

液体洗剤中の上清におけるバリエーションの安定性の測定

50

上清を、濃縮80% (v/v) Persil (登録商標) ProClean (登録商標) Power Liquid 2in1洗剤 (Henkel) で希釈した。混合後、試料を2つの部分に分割した。1つの部分を、選択されたストレス時間の間、室温 (21℃、非ストレス試料) でインキュベートし、第2の部分を、選択された高いストレス温度で、選択されたストレス時間の間、PCR装置でインキュベートした (「ストレス試料」)。加えられたストレス条件は、以下の個々の実施例において見出すことができる。インキュベーション後、試料を希釈緩衝液 (100mM トリス-HCl、0.01% (v/v) Triton (登録商標) X-100、pH 8.0) で8倍に希釈した後、非ストレス試料及びストレス試料の活性を、5µlの試料を、35µlのアッセイ溶液 (1.0mg/ml のp-ニトロフェニル-N-アセチル-β-D-グルコサミニド (Sigma Aldrich) を補充した45mM クエン酸緩衝液 pH 5.0を含む384ウェルマイクロタイタープレートに移すことによって決定した。室温で9時間インキュベートした後、40µlの停止溶液 (0.4M Na₂CO₃) を添加することによって反応を停止し、405nmでの吸光度 (A₄₀₅) を読み取った。各試料について、残留活性 (RA) を以下のように計算した:

$$RA = A_{405} (\text{ストレス試料}) / A_{405} (\text{非ストレス試料})。$$

【0251】

全てのA₄₀₅測定値をブランク試料 (ヘキソサミニダーゼ非含有) のシグナルで補正した後、RA値を計算した。RA値を使用して、バリエーション及びバックボーン (個々の実施例に示すように、配列番号2、配列番号3、又は参照ヘキソサミニダーゼ) の半減期を算出した: 半減期 (分) = 各バリエーション及びバックボーンの60 (分) × Ln (0.5) / Ln (RA)。各バリエーションについて、半減期向上因子 (HIF) を次のように計算する: HIF = 半減期 (バリエーション) / 半減期 (バックボーン)。このセットアップにおけるバックボーンのHIFは、定義により1であるので、安定性が向上したバリエーションは、HIF > 1を有する。

【0252】

精製バリエーション

増殖、発現、精製

精製のために、ヘキソサミニダーゼポリペプチドをバチルス属 (Bacillus) 宿主細胞中で発現させ、それぞれ100mlのPS-1培地を含有する500mlの振盪フラスコ中で増殖させた。振盪フラスコを270rpmで振盪させながら30℃で4日間増殖させた。培養ブ罗斯を遠心分離 (26,000×g、20分) して、上清を沈殿物から慎重にデカントした。上清をNalgene 0.2µm濾過ユニットで濾過して、バチルス属 (Bacillus) 宿主細胞の残りを除去した。0.2µmの濾液を、G25 Sephadex カラム (GE Healthcare) 上の20mM MES/NaOH、pH 6.0に移した。G25で移された溶液を、20mM MES/NaOH、pH 6.0で平衡化したSOURCE Qカラム (GE Healthcare) に適用した。カラムを平衡バッファで入念に洗浄した後、ヘキソサミニダーゼを、同一のバッファ中の線形NaCl勾配 (0→1.0M NaCl) で、カラム体積の5倍量で溶出した。溶出中に画分を回収し、回収された画分をSDS-PAGEによって分析した。クーマシー染色で1つのバンドのみ観察された画分を、精製調製物としてプールし、さらなる実験に使用した。

【0253】

精製バリエーションの安定性 (半減期) の測定

上記のように精製された成熟ポリペプチドの半減期として表される安定性を、96ウェル平底ポリスチレンマイクロタイタープレート (Thermo Scientific) 中、300µL、5µMの各バリエーション試料を37℃で7日間、以下の条件下でインキュベートして決定した: 20体積% EPPS (100mM、pH 8.3)、0.01重量% Triton (登録商標) X-100及び80体積% Persil (登録商標) ProClean (登録商標) Power Liquid 2in1洗剤 (=「ストレスプレート

」)。1、3及び7日目に、ストレスプレートからのアリコート20 μ Lを、基質として4-メチルウンベリフェリルN-アセチル-D-グルコサミニド(Sigma-Aldrich)を使用して、残留活性を分析した：ストレスプレートからの20 μ Lの試料及びクエン酸緩衝液(45mM、pH5.3、0.01重量%Brj(登録商標)L23)中の100 μ Lの基質を、6mMの基質を含む溶液中、208nMの試料の濃度に混合した。反応混合物をPCRインキュベーター中、45℃で90分間加熱し、120 μ LのNa₂CO₃(0.6M、pH10.3)の添加により反応を停止させた。吸光度を、標準プレート分光光度計(SpectraMax 5e)で405nmで測定した。

【0254】

ストレスを受けた試料の半減期を、試料の活性減衰データ(log(活性)対時間)の線形化、その後の線形回帰によって推定して、試料の半減期($t^{1/2}$)を決定した。半減期向上因子(HIF)を、ヘキソサミニダーゼバリエントの半減期と参照ヘキソサミニダーゼの半減期との間の比として計算した：

$$HIF = t^{1/2}(\text{バリエント}) / t^{1/2}(\text{参照})$$

【0255】

実施例1-ヘキソサミニダーゼバリエントの安定性

上清中の本発明のヘキソサミニダーゼバリエントの洗剤安定性を、上記の方法を用いて、配列番号3のヘキソサミニダーゼの半減期と比較した半減期として決定した。この実施例におけるストレス条件は、80%Persil(登録商標)ProClean(登録商標)Power Liquid 2in1洗剤中、62℃で210分間であった。結果を、以下の表1において、配列番号3の半減期と比較した半減期向上因子HIFとして表す。

【0256】

【表2】

表1.ヘキソサミニダーゼバリエントの半減期向上因子(HIF)

配列番号1と比較した置換	配列番号3と比較した置換	配列番号3と比較したHIF
Q3F H15Y V140I S163P L170G S186R Q215K S225G N227T E232D G235W N252P N260Q N267T H272V S279D Y281P K308Q K309E K312Q	L170G	2.87
Q3F H15Y V140I E150N S163P S186R Q215K S225G N227T E232D G235W N252P F254I N260Q N267T H272V S279D Y281P K308Q K309E K312Q	E150N F254I	1.69
Q3F H15Y V140I S163P S186R Q215K S225G N227T E232D G235W N252P F254I N260Q N267T H272V S279D Y281P K308Q K309E K312Q	F254I	2.64
Q3F H15Y V106N V140I S163P S186R Q215K S225G N227T E232D G235W N252P N260Q N267T H272V S279D Y281P K308Q K309E K312Q	V106N	3.42

【0257】

実施例2-ヘキソサミニダーゼバリエントの安定性

上清中の本発明のヘキソサミニダーゼバリエントの洗剤安定性を、上記の方法を使用して、配列番号2のヘキソサミニダーゼの半減期と比較した半減期として決定し、ストレス条件は57℃の温度及び360分のインキュベーション時間であった。結果を、以下の表2に、配列番号2のヘキソサミニダーゼの半減期と比較した半減期向上因子HIFとして表す。

【0258】

10

20

30

40

50

【表 3】

表 2. ヘキサミニダーゼバリエントの半減期向上因子(HIF)

配列番号1と比較した置換	配列番号2と比較した置換	配列番号2と比較したHIF
Q3I H15Y A49W N59E D111R T120V S163P S186R S225G N227T E232D G235W N252P N260Q H272V S279D Y281P K308Q K309E K312Q	D111R T120V	1.59
Q3I H15Y A49W N59E D111R T120V E150N S163P S186R S225G N227T E232D G235W N252P N260Q H272V S279D Y281P K308Q K309E K312Q	D111R T120V E150N	1.52
Q3I H15Y A49W N59E D111R T120V E150N S163P D171F S186R S225G N227T E232D G235W N252P N260Q H272V I278V S279D Y281P K308Q K309E K312Q	D111R T120V E150N D171F I278V	2.41
Q3I H15Y A49W N59E D111R T120V S163P S186R S225G N227T E232D G235W N252P T255D N260Q H272V S279D Y281P K308Q K309E K312Q	D111R T120V T255D	2.36
Q3I H15Y A49W N59E D111R T120V Y124I S163P S186R S225G N227T E232D G235W N252P N260Q H272V S279D Y281P K308Q K309E K312Q	D111R T120V Y124I	2.83
Q3I H15Y A49W N59E D111R T120V Y124K S163P Q178K S186R S225G N227T E232D G235W N252P N260Q H272V S279D Y281P K308Q K309E K312Q	D111R T120V Y124K Q178K	1.74
Q3I H15Y A49W N59E D111R T120V Y124L S163P Q178K S186R S225G N227T E232D G235W N252P N260Q H272V S279D Y281P K308Q K309E K312Q	D111R T120V Y124L Q178K	2.04
Q3I H15Y A49W N59E D111R Y124K S163P D171F S186R S225G N227T E232D G235W N252P N260Q H272V S279D Y281P K308Q K309E K312Q	D111R Y124K D171F	2.07
Q3I H15Y A49W N59E S163P D171F S186R S208W S225G N227T E232D G235W N252P N260Q N267T H272V S279D Y281P K308Q K309E K312Q	D171F S208W N267T	3.25
Q3I H15Y A49W N59E S163P D171F S186R S225G N227T E232D G235W N252P T255D N260Q H272V S279D Y281P K308Q K309E K312Q	D171F T255D	1.63
Q3I H15Y A49W N59E S163P D171H S186R S225G N227T E232D G235W N252P N260Q H272V S279D Y281P K308Q K309E K312Q	D171H	2.81
Q3I H15Y A49W N59E S163P S186R S225G N227T E232D G235W N252P N260Q H272V I278V S279D Y281P K308Q K309E K312Q	I278V	1.94
Q3I H15Y A49W N59E S163P S186R S225G N227T E232D G235W N252P N260Q H272V S279D Y281P K308E K309E K312Q	K308E	1.75
Q3I H15Y A49W N59E S163P S186R S225G N227T E232D G235W N252P N260Q N267T H272V S279D Y281P K308Q K309E K312Q	N267T	3.28
Q3I H15Y A49W N59E R127P S163P S186R S225G N227T E232D G235W N252P N260Q H272V S279D Y281P K308Q K309E K312Q	R127P	1.86

【 0 2 5 9 】

10

20

30

40

50

【表 4】

Q3I H15Y A49W N59E T120V S163P D171F S186R S225G N227T E232D G235W N252P N260Q H272V S279D Y281P K308Q K309E K312Q	T120V D171F	1.61
Q3I H15Y A49W N59E T120V S163P D171F S186R S225G N227T E232D G235W N252P N260Q N267T H272V S279D Y281P K308Q K309E K312Q	T120V D171F N267T	2.88
Q3I H15Y A49W N59E T120V S163P S186R S208W S225G N227T E232D G235W N252P N260Q N267T H272V S279D Y281P K308Q K309E K312Q	T120V S208W N267T	2.70
Q3I H15Y A49W N59E T120V S163P S186R S225G N227T E232D G235W N252P T255D N260Q H272V S279D Y281P K308Q K309E K312Q	T120V T255D	2.00
Q3I H15Y A49W N59E T120V S163P S186R S225G N227T E232D G235W N252P T255D N260Q N267T H272V S279D Y281P K308Q K309E K312Q	T120V T255D N267T	2.04
Q3I H15Y A49W N59E T120V Y124K S163P Q178K S186R S225G N227T E232D G235W N252P N260Q H272V S279D Y281P K308Q K309E K312Q	T120V Y124K Q178K	1.54
Q3I H15Y A49W N59E V106M D111R T120V S163P D171F S186R S225G N227T E232D G235W N252P N260Q H272V S279D Y281P K308Q K309E K312Q	V106M D111R T120V D171F	2.03
Q3I H15Y A49W N59E V106M S163P Q178K S186R S225G N227T E232D G235W N252P T255D N260Q H272V S279D Y281P K308Q K309E K312Q	V106M Q178K T255D	2.14
Q3I H15Y A49W N59E V106M T120V S163P D171F Q178K S186R S225G N227T E232D G235W N252P N260Q H272V S279D Y281P K308Q K309E K312Q	V106M T120V D171F Q178K	1.73
Q3I H15Y A49W N59E V106M T120V Y124I S163P D171F S186R S225G N227T E232D G235W N252P N260Q H272V S279D Y281P K308Q K309E K312Q	V106M T120V Y124I D171F	2.20
Q3I H15Y A49W N59E V106M T120V Y124I S163P Q178K S186R S225G N227T E232D G235W N252P N260Q H272V S279D Y281P K308Q K309E K312Q	V106M T120V Y124I Q178K	2.06
Q3I H15Y A49W N59E V106M T120V Y124K S163P D171F S186R S225G N227T E232D G235W N252P N260Q H272V S279D Y281P K308Q K309E K312Q	V106M T120V Y124K D171F	2.85
Q3I H15Y A49W N59E V106M T120V Y124L S163P Q178K S186R S225G N227T E232D G235W N252P N260Q H272V S279D Y281P K308Q K309E K312Q	V106M T120V Y124L Q178K	2.32
Q3I H15Y A49W N59E V106N D111R T120V E150N S163P S186R S225G N227T E232D G235W N252P N260Q H272V S279D Y281P K308Q K309E K312Q	V106N D111R T120V E150N	2.09
Q3I H15Y A49W N59E V106N S163P S186R S208W S225G N227T E232D G235W N252P N260Q N267T H272V S279D Y281P K308Q K309E K312Q	V106N S208W N267T	1.84
Q3I H15Y A49W N59E V106N T120V S163P D171F S186R S225G N227T E232D G235W N252P N260Q H272V S279D Y281P K308Q K309E K312Q	V106N T120V D171F	1.53

10

20

30

40

【 0 2 6 0 】

【表 5】

Q3I H15Y A49W N59E V106N T120V S163P D171F S186R S208W S225G N227T E232D G235W N252P N260Q H272V S279D Y281P K308Q K309E K312Q	V106N T120V D171F S208W	1.67
Q3I H15Y A49W N59E V106N T120V E150N S163P D171F S186R S225G N227T E232D G235W N252P N260Q H272V I278V S279D Y281P K308Q K309E K312Q	V106N T120V E150N D171F I278V	1.52
Q3I H15Y A49W N59E V106N T120V S163P S186R S225G N227T E232D G235W N252P N260Q N267T H272V S279D Y281P K308Q K309E K312Q	V106N T120V N267T	3.75

10

【 0 2 6 1 】

実施例 3－ヘキソサミニダーゼバリエントの安定性

上清中の本発明のヘキソサミニダーゼバリエントの洗剤安定性を、上記の方法を用いて、置換 S 1 6 3 P + Q 2 1 5 K + N 2 2 7 T + N 2 5 2 P + F 2 7 6 A + K 3 0 8 E + K 3 0 9 E + K 3 1 2 E を有する配列番号 1 のバリエントである配列番号 4 の半減期と比較した半減期として決定した。ストレス条件は、温度 6 2 °C、インキュベーション時間 1 5 0 分であった。この実施例で試験したバリエントは、以下の表 3 に示すような 1 つ以上の置換を有する配列番号 3 のバリエントであり、結果を、配列番号 4 の参照ヘキソサミニダーゼの半減期と比較した半減期向上因子 H I F として表す。

20

【 0 2 6 2 】

【表 6】

表 3. ヘキソサミニダーゼバリエントの半減期向上因子(HIF)

配列番号 3 と比較した置換	参照ヘキソサミニダーゼ (配列番号 4) と比較した HIF
配列番号 3	1.30
D111R	1.84
D111R E150N	2.10
D111R E150N L170G	2.54
D111R E150N L170G I278V	1.71
D111R E150N S199W I278V	1.69
D111R I278V	3.73
D111R L170G	1.88
D111R L170G I278V	3.45
D111R L170G S199W	2.37
E150N	3.50
E150N I278V	3.42
E150N L170G	2.46
E150N L170G I278V	1.82
E150N S199W	1.73
I278V	3.08
L170G	2.65
L170G I278V	1.62
L170G S199W	1.53
L170G S199W I278V	2.17
S199W I278V	1.53

30

40

50

【0263】

実施例4－精製ヘキソサミニダーゼバリアントの安定性

精製された形態の本発明のヘキソサミニダーゼバリアントの洗剤安定性を、上記の方法を用いて配列番号3のヘキソサミニダーゼの半減期と比較した半減期として決定した（80体積％Persil（登録商標）ProClean（登録商標）Power Liquid 2 in 1 洗剤中、37℃で7日間）。結果を、以下の表4において、配列番号3の半減期と比較した半減期向上因子HIFとして表す。

【0264】

【表7】

表4. ヘキソサミニダーゼバリアントの半減期向上因子(HIF)

配列番号3と比較した置換	配列番号3と比較した HIF
V106N D111R T120V E150N	14.75
D111R T120V E150N	19.94
V106N T120V E150N D171F I278V	24.39
D111R T120V E150N D171F I278V	20.41

【0265】

実施例5：精製ヘキソサミニダーゼポリペプチドの熱安定性

テリバチルス・サッカロフィルス（*Terribacillus saccharophilus*）由来の野生型ヘキソサミニダーゼ（配列番号1）とその3つのバリアント（配列番号2、3及び4）の熱安定性を、上記の方法を用いて、以下の組成を有するモデル液体洗剤中で、nDSFによって決定した：

【0266】

【表8】

表5: 液体モデル洗剤の組成

成分	有効成分の含有量 (w/w%)
LAS (直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩)	12
AEO (アルコールエトキシレート)	11
AEOS (アルコールエーテル硫酸塩), SLES (ラウリルエーテル硫酸ナトリウム)	5
MPG (プロパン-1,2-ジオール)	6
エタノール	3
TEA (2,2',2''-ニトリロトリエタノール)	3
ココ脂肪酸	2.75
大豆脂肪酸	2.75
グリセロール	2
水酸化ナトリウム (固体結晶)	2
クエン酸ナトリウム	2
ギ酸ナトリウム	1
DTMPA (ジエチレントリアミンペンタ(メチレンホスホン酸))	0.2
PCA (コポリ(アクリル酸/マレイン酸), ナトリウム塩)	0.2

10

20

30

40

50

【0267】

0、2、50及び250 g／Lの洗剤濃度における融解温度（Tm）として表した結果を以下の表6に提供するが、ここで「－」は、配列番号1の野生型ヘキソサミニダーゼが不安定であり、その結果、高い洗剤濃度ではTm値を決定することができなかったことを示している。

【0268】

【表9】

表 6.ヘキソサミニダーゼ(野生型及びバリエーション)の融解温度(Tm)

ヘキソサミニダーゼ	Tm °C, 0g/L 洗剤	Tm °C, 2g/L 洗剤	Tm °C, 50g/L 洗剤	Tm °C, 250g/L 洗剤
配列番号 1	50.5	40.9	-	-
配列番号 2	82.2	81.4	79.9	78.6
配列番号 3	84.8	83.6	82.4	81.5
配列番号 4	74.8	74.8	72.8	70.0

【0269】

本明細書中に記載され、且つ特許請求される本発明は、開示される本明細書中の特定の態様による範囲に限定されるべきではない。なぜなら、この態様は、本発明のいくつかの態様の例示として意図されているためである。均等なあらゆる態様が、本発明の範囲内であることが意図される。実際に、本明細書中に示され、且つ記載されるものに追加した本発明の種々の修飾が、前述の記載から当業者に明らかとなるであろう。また、そのような修飾が、添付の特許請求の範囲の範囲内に入ることが意図される。競合する場合、定義を含む本開示が優先される。

【図面】

【図1】

配列番号1 QDQKGGITIDISRKHYTVETLKSLVDEISYNGGNYVQLHFSNDENYAIASEYLGQSSEET
配列番号2 QDLEKGGITIDISRKHYTVETLKSLVDEISYNGGNYVQLHFSNDENYAIWSEYLGQSSEET
配列番号3 QDQKGGITIDISRKHYTVETLKSLVDEISYNGGNYVQLHFSNDENYAIASEYLGQSSEET
配列番号4 QDQKGGITIDISRKHYTVETLKSLVDEISYNGGNYVQLHFSNDENYAIASEYLGQSSEET

配列番号1 NNTYLTKNELLSLIAYSNDKDLVIPDIDLPAHSGWLELIKKKDKVLYNDIVTDYSEET
配列番号2 NNTYLTKNELLSLIAYSNDKDLVIPDIDLPAHSGWLELIKKKDKVLYNDIVTDYSEET
配列番号3 NNTYLTKNELLSLIAYSNDKDLVIPDIDLPAHSGWLELIKKKDKVLYNDIVTDYSEET
配列番号4 NNTYLTKNELLSLIAYSNDKDLVIPDIDLPAHSGWLELIKKKDKVLYNDIVTDYSEET

配列番号1 LDYYDNRAVDLTVNQLLDEVLDFYQPKFEGKQRIVLGGDEVSGSEVHQLDFIDFMNQIA
配列番号2 LDYYDNRAVDLTVNQLLDEVLDFYQPKFEGKQRIVLGGDEVSGSEVHQLDFIDFMNQIA
配列番号3 LDYYDNRAVDLTVNQLLDEVLDFYQPKFEGKQRIVLGGDEVSGSEVHQLDFIDFMNQIA
配列番号4 LDYYDNRAVDLTVNQLLDEVLDFYQPKFEGKQRIVLGGDEVSGSEVHQLDFIDFMNQIA

配列番号1 STVKESKYEPMWNSITSEGANLDDSFSLYWKQSTLSSGSESLNVEDFENWGFVSYN
配列番号2 STVKESKYEPMWNSITSEGANLDDSFSLYWKQSTLSSGSESLNVEDFENWGFVSYN
配列番号3 STVKESKYEPMWNSITSEGANLDDSFSLYWKQSTLSSGSESLNVEDFENWGFVSYN
配列番号4 STVKESKYEPMWNSITSEGANLDDSFSLYWKQSTLSSGSESLNVEDFENWGFVSYN

配列番号1 YNAYSFLPSNGFTQEDINEQMDYMNWAYAHNKFFYISDYHAYETSNVKGSSLTFWGE
配列番号2 YNAYSFLPSNGFTQEDINEQMDYMNWAYAHNKFFYISDYHAYETSNVKGSSLTFWGE
配列番号3 YNAYSFLPSNGFTQEDINEQMDYMNWAYAHNKFFYISDYHAYETSNVKGSSLTFWGE
配列番号4 YNAYSFLPSNGFTQEDINEQMDYMNWAYAHNKFFYISDYHAYETSNVKGSSLTFWGE

配列番号1 HATDLSQKKLLKQELPLIRHYLNL
配列番号2 HATDLSQKKLLKQELPLIRHYLNL
配列番号3 HATDLSQKKLLKQELPLIRHYLNL
配列番号4 HATDLSQKKLLKQELPLIRHYLNL

図1

【配列表】

2025511813000001.xml

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/058333

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C11D3/386 C12N9/24 ADD.				
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C11D C12N				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
X	WO 2020/207944 A1 (NOVOZYMES AS [DK]) 15 October 2020 (2020-10-15) Example 2a, SEQ :3, Claims -& Xx / S ET AL: "IBIS -Integrated Biotechnological Information Services", / 13 October 2020 (2020-10-13), XP055960990, Retrieved from the Internet: URL:http://ibis.internal.epo.org/exam/dbfe tch.jsp?id=CAS:2018_1888949_2245961435_1 [retrieved on 2022-09-14] -----	1-15		
X	EP 3 892 708 A1 (HENKEL AG & CO KGAA [DE]) 13 October 2021 (2021-10-13) Example 6 -----	1-15		
X	WO 2018/184873 A1 (NOVOZYMES AS [DK]) 11 October 2018 (2018-10-11) SEQ ID NO:83 -----	1-15		
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.				
* Special categories of cited documents : <table border="0"> <tr> <td> "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </td> <td> "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family </td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search 28 June 2023		Date of mailing of the international search report 25/09/2023		
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Gómez Ortiz, Mariola		

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/EP2023/058333
Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)		
1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing: a. ☒ forming part of the international application as filed. b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)). ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed. 2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing. 3. Additional comments:		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2023/058333

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

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

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

10

20

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims;; it is covered by claims Nos.:
1-15 (partially)

30

40

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/EP2023/058333

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-15(partially)

A variant of the hexosaminidase polypeptide of SEQ ID NO: 1, wherein the variant comprises, compared to SEQ ID NO: 1: a substitution position 163, of SEQ ID NO: 1; and a substitution at position 111 SEQ ID NO: 1; wherein the variant has hexosaminidase activity and has at least 60%, e.g., at least 65%, at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90% or at least 95% sequence identity, but less than 100% sequence identity, to the polypeptide of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 3.

2-15. claims: 1-15(partially)

A variant of the hexosaminidase polypeptide of SEQ ID NO: 1, wherein the variant comprises, compared to SEQ ID NO: 1: a substitution position N, etc (as in claim 1), of SEQ ID NO: 1; and a substitution at position X, Y, Z, etc of claim 1 SEQ ID NO: 1; wherein the variant has hexosaminidase activity and has at least 60%, e.g., at least 65%, at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90% or at least 95% sequence identity, but less than 100% sequence identity, to the polypeptide of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 3.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2023/058333

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2020207944 A1	15-10-2020	CN 113874499 A	31-12-2021
		EP 3953462 A1	16-02-2022
		US 2022364138 A1	17-11-2022
		WO 2020207944 A1	15-10-2020
EP 3892708 A1	13-10-2021	EP 3892708 A1	13-10-2021
		US 2021317387 A1	14-10-2021
WO 2018184873 A1	11-10-2018	CA 3058520 A1	11-10-2018
		CN 110651042 A	03-01-2020
		EP 3607060 A1	12-02-2020
		EP 3967756 A1	16-03-2022
		JP 7267931 B2	02-05-2023
		JP 2020516245 A	11-06-2020
		US 2020190439 A1	18-06-2020
		US 2023287307 A1	14-09-2023
		WO 2018184873 A1	11-10-2018
		ZA 201907277 B	28-06-2023
		ZA 202103338 B	29-03-2023

フロントページの続き

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

弁理士 大島 浩明

- (72)発明者 ラーズ ヘンリク オースターゴール
デンマーク国, 2 8 8 0 バグスバエルト, クロシェイバイ 3 6
- (72)発明者 アネット ヘレ ヨハンセン
デンマーク国, 2 8 8 0 バグスバエルト, クロシェイバイ 3 6
- (72)発明者 マーティン グドマン
デンマーク国, 2 8 8 0 バグスバエルト, クロシェイバイ 3 6
- (72)発明者 カスパー ダムゴール ティデマン
デンマーク国, 2 8 8 0 バグスバエルト, クロシェイバイ 3 6
- (72)発明者 ロルフ トーマス レンハート
デンマーク国, 2 8 8 0 バグスバエルト, クロシェイバイ 3 6
- (72)発明者 ローランド アレクサンダー パケ
デンマーク国, 2 8 8 0 バグスバエルト, クロシェイバイ 3 6
- (72)発明者 レベッカ ムンク バイボーグ
デンマーク国, 2 8 8 0 バグスバエルト, クロシェイバイ 3 6
- (72)発明者 ヨハネ モーク イェンスン
デンマーク国, 2 8 8 0 バグスバエルト, クロシェイバイ 3 6
- F ターム (参考) 4B065 AA01Y AA15X AB01 AC14 BA02 BB37 BC03 BC09 BC26 BD15
BD18 CA31
4H003 AB02 AB19 AB31 AC08 BA12 DA01 DB02 EB04 EB07 EB08
EB14 EB16 EB30 EB32 EC01 ED28