



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107090014 B

(45) 授权公告日 2023.04.25

(21) 申请号 201610983448.9

C07K 5/10 (2006.01)

(22) 申请日 2009.03.26

C07K 2/00 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

C12N 9/96 (2006.01)

申请公布号 CN 107090014 A

C11D 3/386 (2006.01)

(43) 申请公布日 2017.08.25

C11D 3/37 (2006.01)

(30) 优先权数据

08153299.6 2008.03.26 EP

(56) 对比文件

W0 9525791 A1,1995.09.28

(62) 分案原申请数据

EP 0583534 B1,1997.03.05

200980110696.0 2009.03.26

W0 9813460 A1,1998.04.02

(73) 专利权人 诺维信公司

CN 1238001 A,1999.12.08

地址 丹麦鲍斯韦

CN 1238005 A,1999.12.08

(72) 发明人 洛恩·K·尼尔森

WO 03083030 A1,2003.10.09

利斯·M·米克尔森

WO 2007145963 A2,2007.12.21

艾斯本·P·弗里伊斯

Tsubuki S等.Purification and

于尔根·C·F·诺伊策尔

Characterization of a Z-Leu-Leu-Leu-MCA

奥勒·西蒙森 洛特·R·索伦森

Degrading Protease Expected to Regulate

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

Neurite Formation: A Novel Catalytic

11105

Activity in Proteasome.《Biochem Biophys

专利代理人 张文辉

Res Commun》.1993,第196卷(第3期),第1195-

1201页.

审查员 陈晋

(51) Int.Cl.

权利要求书1页 说明书13页

(54) 发明名称

稳定化的液体酶组合物

(57) 摘要

本发明涉及稳定化的液体酶组合物，具体地涉及肽醛或酮衍生物对在水性组合物如液体洗涤剂中稳定枯草杆菌蛋白酶类型的蛋白酶是特别有效的，其包括具有OH-取代的苯丙氨酸醛作为C末端残基的肽化合物。

1. 式 $B_2-B_1-B_0-H$ 的肽化合物,其中:

B_0 是Tyr残基;

B_1 是丙氨酸,半胱氨酸,甘氨酸,脯氨酸,丝氨酸,苏氨酸,缬氨酸,正缬氨酸或正亮氨酸的氨基酸残基;

B_2 由一个或两个包含N末端保护基团的氨基酸残基组成。

2. 式 $B_2-B_1-B_0-H$ 的肽化合物,其中:

B_0 是Tyr残基;

B_1 是丙氨酸,半胱氨酸,甘氨酸,脯氨酸,丝氨酸,苏氨酸,缬氨酸,正缬氨酸或正亮氨酸的氨基酸残基;且

B_2 是附接N末端保护基团的Gly、Arg或Leu残基,所述N末端保护基团选自:甲酰基、乙酰基、苯甲酰基、三氟乙酰基、氟代甲氧基羰基、甲氧基琥珀酰基、芳香族和脂肪族氨基甲酸酯保护基团、苄氧羰基、叔丁基氧羰基、金刚烷基氧羰基、对甲氧基苄基羰基(MOZ)、苄基(Bn)、对甲氧基苄基(PMB)和对甲氧基苯基(PMP)。

3. 权利要求2所述的肽化合物,其中所述N末端保护基团是苄氧羰基(Cbz)、对甲氧基苄基羰基(MOZ)、苄基(Bn)、对甲氧基苄基(PMB)或对甲氧基苯基(PMP)。

4. 权利要求1-3任一项所述的肽化合物,其为肽醛Z-RAY-H、Ac-GAY-H、Z-GAY-H、Z-RVY-H、Z-LVY-H、Ac-LGAY-H、Ac-FGAY-H、Ac-YGAY-H、Ac-FGVY-H或Ac-WLVY-H,其中Z是苄氧羰基而Ac是乙酰基。

5. 液体组合物,包含枯草杆菌蛋白酶和式 $B_2-B_1-B_0-H$ 的肽化合物,其中:

B_0 是Tyr残基;

B_1 是丙氨酸,半胱氨酸,甘氨酸,脯氨酸,丝氨酸,苏氨酸,缬氨酸,正缬氨酸或正亮氨酸的氨基酸残基;和

B_2 是附接N末端保护基团的Gly、Arg或Leu残基,所述N末端保护基团选自:甲酰基、乙酰基、苯甲酰基、三氟乙酰基、氟代甲氧基羰基、甲氧基琥珀酰基、芳香族和脂肪族氨基甲酸酯保护基团、苄氧羰基、叔丁基氧羰基、金刚烷基氧羰基、对甲氧基苄基羰基(MOZ)、苄基(Bn)、对甲氧基苄基(PMB)和对甲氧基苯基(PMP)。

6. 权利要求5的液体组合物,其为进一步包含表面活性剂的液体洗涤剂组合物。

稳定化的液体酶组合物

[0001] 本申请是申请日为2009年3月26日、申请号为“200980110696.0”(国际申请号为PCT/EP2009/053580),名称为“稳定化的液体酶组合物”的发明专利申请的分案申请。

发明领域

[0002] 本发明涉及包含枯草杆菌蛋白酶(subtilisin)和作为枯草杆菌蛋白酶的稳定剂的肽化合物的液体组合物。本发明亦涉及可用作枯草杆菌蛋白酶的稳定剂的肽化合物。

【0003】发明背景

[0004] 枯草杆菌蛋白酶类型的蛋白酶在液体水性洗涤剂领域中是众所周知的,特别是其在衣物洗涤中的用途。在上述液体洗涤剂中通常面对的问题是枯草杆菌蛋白酶对所述组合物中其他酶以及枯草杆菌蛋白酶自身的降解。其结果,在所述液体洗涤剂组合物中枯草杆菌蛋白酶和其他酶的稳定性降低,导致液体洗涤剂的洗涤性能降低。

[0005] 现有技术主要致力于改善液体洗涤剂中酶的储藏稳定性,例如通过添加不同的枯草杆菌蛋白酶抑制剂或稳定剂。已知硼酸和代硼酸(boronic acid)能够可逆的抑制蛋白分解酶。

[0006] 使用肽醛(peptide aldehyde)在液体洗涤剂中稳定一些蛋白酶公开于WO 94/04651、WO 98/13458、WO 98/13459、WO 98/13460和WO 98/13462。更具体而言,WO94/04651公开了使用肽醛Phe-Gly-Ala-PheH和Phe-Gly-Ala-LeuH以供稳定枯草杆菌蛋白酶类型的蛋白酶。WO94/04651亦公开了Leu-Leu-TyrH作为合适的肽醛以供稳定胰凝乳蛋白酶类型的蛋白酶。此外,WO94/04651建议使用氨基甲酸甲酯或甲基脲作为所述肽醛的N-末端保护基团。WO98/13460公开了使用肽蛋白酶抑制剂,或者是肽醛或者是三氟代甲基酮,其中所述肽链包含2-5个氨基酸,且所述醛/三氟甲基酮来源于氨基酸丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯甘氨酸(phenylglycine)、苯丙氨酸或高苯丙氨酸(homophenylalanine),以及其中所述N-末端保护基团优选为磺酰胺(sulphonamide)或酰胺基磷酸(amidophosphate)。

[0007] WO2007/141736、WO2007/145963和WO2007/145964公开了使用可逆的肽蛋白酶抑制剂以稳定液体洗涤剂组合物。US2003/157088描述了含有经抑制剂稳定化的酶的组合物。

[0008] WO 96/41638和WO 2005/105826公开了肽醛和酮。

发明内容

[0009] 本发明人令人惊讶的发现一些肽醛或酮衍生物对于在水性组合物,如液体洗涤剂中稳定枯草杆菌蛋白酶类型的蛋白酶特别有效,所述组合物包括具有OH-取代的苯丙氨酸作为C-末端残基的肽化合物。

[0010] 相应的,本发明提供了包含枯草杆菌蛋白酶和式B₂-B₁-B₀-R肽化合物的液体组合物,其中:

[0011] • R是氢、CH₃、CX₃、CHX₂或CH₂X,其中X是卤素原子;且

[0012] • B₁是单氨基酸残基。

[0013] B₀可在对位和/或间位具有OH取代的苯丙氨酸残基;而B₂可由一个或多个氨基酸

残基组成， B_2 任选地包括N-末端保护基团。或者， B_0 可为单氨基酸残基；而 B_2 是有N-末端保护基团附接的Gly、Arg或Leu残基。

[0014] 本发明进一步提供了式 $B_2-B_1-B_0-R$ 的肽化合物，其中：

[0015] • R是氢、 CH_3 、 CX_3 、 CHX_2 或 CH_2X ，其中X是卤素原子；且

[0016] • B_1 是单氨基酸残基。

[0017] B_0 可为在对位和/或间位具有OH取代的苯丙氨酸残基；而 B_2 可由一个或多个具有苄氧羰基作为N-末端保护基团的氨基酸残基组成，或 B_2 可为有N-末端保护基团附接的Gly、Arg或Leu残基。或者， B_0 可为单氨基酸残基，而 B_1 可为小氨基酸残基，而 B_2 可为有芳香族N-末端保护基团附接的Gly、Arg或Leu残基。

[0018] 具体地，本发明涉及如下各项：

[0019] 1. 一种液体组合物，包含枯草杆菌蛋白酶和式 $B_2-B_1-B_0-R$ 的肽化合物，其中：

[0020] R是氢、 CH_3 、 CX_3 、 CHX_2 或 CH_2X ，其中X是卤素原子；

[0021] B_0 是在对位和/或间位有OH取代的苯丙氨酸残基；

[0022] B_1 是单氨基酸残基；且

[0023] B_2 由一个或多个氨基酸残基组成，所述氨基酸残基任选地包含N末端保护基团。

[0024] 2. 项1的液体组合物，其中 B_2 由一个或两个包含N末端保护基团的氨基酸残基组成。

[0025] 3. 一种液体组合物，包含枯草杆菌蛋白酶和式 $B_2-B_1-B_0-R$ 的肽化合物，其中：

[0026] R是氢、 CH_3 、 CX_3 、 CHX_2 或 CH_2X ，其中X是卤素原子；

[0027] B_0 是单氨基酸残基；

[0028] B_1 是单氨基酸残基；且

[0029] B_2 是附接N末端保护基团的Gly、Arg或Leu残基。

[0030] 4. 项1-3任一项所述的液体组合物，其中 B_0 是酪氨酸残基。

[0031] 5. 项1-4任一项所述的液体组合物，其中 B_1 是Ala、Cys、Gly、Pro、Ser、Thr、Val、Nva或Nle残基。

[0032] 6. 项1-5任一项所述的液体组合物，其中 B_2 包含选自下组的N末端保护基团：甲酰基、乙酰基、苯甲酰基、三氟乙酰基、氟代甲氧基羰基、甲氧基琥珀酰基、芳香族和脂肪族氨基甲酸酯保护基团、苄氧羰基、叔丁基氧羰基、金刚烷基氧羰基、对甲氧基苄基羰基(MOZ)、苄基(Bn)、对甲氧基苄基(PMB)或对甲氧基苯基(PMP)。

[0033] 7. 项1-6任一项所述的液体组合物，其中所述肽化合物为肽醛Z-RAY-H、Ac-GAY-H、Z-GAY-H、Z-GAL-H、Z-GAF-H、Z-GAV-H、Z-RVY-H、Z-LVY-H、Ac-LGAY-H、Ac-FGAY-H、Ac-YGAY-H、Ac-FGVY-H或Ac-WLVY-H，其中Z是苄氧羰基而Ac是乙酰基。

[0034] 8. 项1-7任一项所述的液体组合物，其为进一步包含表面活性剂的液体洗涤剂组合物。

[0035] 9. 式 $B_2-B_1-B_0-R$ 的肽化合物，其中：

[0036] R是氢、 CH_3 、 CX_3 、 CHX_2 或 CH_2X ，其中X是卤素原子；

[0037] B_0 是在对位和/或间位有OH取代的苯丙氨酸残基；

[0038] B_1 是单氨基酸残基；且

[0039] B_2 由一个或多个氨基酸残基组成，所述氨基酸残基具有苄氧羰基作为N末端保护

基团。

[0040] 10. 式 $B_2-B_1-B_0-R$ 的肽化合物,其中:

[0041] R是氢、 CH_3 、 CX_3 、 CHX_2 或 CH_2X ,其中X是卤素原子;

[0042] B_0 是在对位和/或间位有OH取代的苯丙氨酸残基;

[0043] B_1 是单氨基酸残基;且

[0044] B_2 是附接N末端保护基团的Gly、Arg或Leu残基。

[0045] 11. 项9或10的肽化合物,其中 B_2 包含选自下组的N末端保护基团:甲酰基、乙酰基、苯甲酰基、三氟乙酰基、氟代甲氧基羰基、甲氧基琥珀酰基、芳香族和脂肪族氨基甲酸酯保护基团、苄氧羰基、叔丁基氧羰基、金刚烷基氧羰基、对甲氧基苄基羰基(MOZ)、苄基(Bn)、对甲氧基苄基(PMB)或对甲氧基苯基(PMP)。

[0046] 12. 式 $B_2-B_1-B_0-R$ 的肽化合物,其中:

[0047] R是氢、 CH_3 、 CX_3 、 CHX_2 或 CH_2X ,其中X是卤素原子;

[0048] B_0 是单氨基酸残基;

[0049] B_1 是小氨基酸残基;且

[0050] B_2 是附接芳香族N末端保护基团的Gly、Arg或Leu残基。

[0051] 13. 项12的肽化合物,其中 B_0 是Tyr、Phe、Leu或Val残基。

[0052] 14. 项12或13的肽化合物,其中所述芳香族N末端保护基团是苄氧羰基(Cbz)、对甲氧基苄基羰基(MOZ)、苄基(Bn)、对甲氧基苄基(PMB)或对甲氧基苯基(PMP)。

[0053] 15. 项9-14任一项所述的肽化合物,其为肽醛Z-RAY-H、Ac-GAY-H、Z-GAY-H、Z-GAL-H、Z-GAF-H、Z-GAV-H、Z-RVY-H、Z-LVY-H、Ac-LGAY-H、Ac-FGAY-H、Ac-YGAY-H、Ac-FGVY-H或Ac-WLVY-H,其中Z是苄氧羰基而Ac是乙酰基。

[0054] 发明详述

[0055] 定义

[0056] “氨基酸残基”指具有类似-NH-CHR-CO-结构的基团,书写时N-末端在左而C-末端在右。

[0057] 氨基酸残基使用标准单字母或三字母缩写形式进行缩写,包括下列缩写:丙氨酸(A)、苯丙氨酸(F)、甘氨酸(G)、亮氨酸(L)、精氨酸(R)、缬氨酸(V)、色氨酸(W)和酪氨酸(Y)。缩写“Y-H”指酪氨酸(tyrosinal),意指酪氨酸残基的C-末端从羧基转化为醛基。酪氨酸可由已知方法制备。

[0058] 氨基酸

[0059] B_1 和 B_2 中的每个氨基酸残基可为天然或非天然存在的 α -或 β -氨基酸,其含有-NH-(CH(R))_n-C(=O)-结构,其中n=1-2(优选1)且R选自下组中的直链或支链和/或环化的、取代的或未取代的结构: C_1-C_6 烷基;苯基; C_7-C_9 烷基芳基; C_4-C_8 环烷基。L-和D-形式的氨基酸均包括在内。

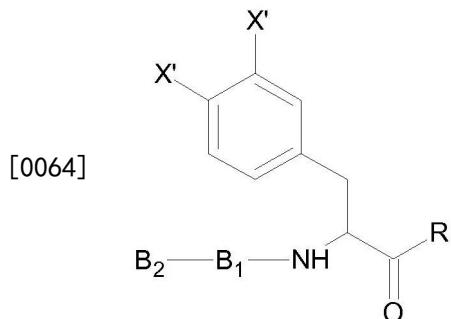
[0060] 所述氨基酸可为 α -氨基酸,如任何天然存在的氨基酸、正缬氨酸(Nva)、正亮氨酸(Nle)、高苯丙氨酸(Hph)或苯甘氨酸(Pgl)。所述 α -氨基碳原子可为D-或L-构型。

[0061] 肽化合物

[0062] OH-取代的苯丙氨酸,如酪氨酸,是相对较为亲水的氨基酸,且与更疏水的氨基酸如苯丙氨酸、亮氨酸、丙氨酸、半胱氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸和缬氨酸相比较,其在肽中的

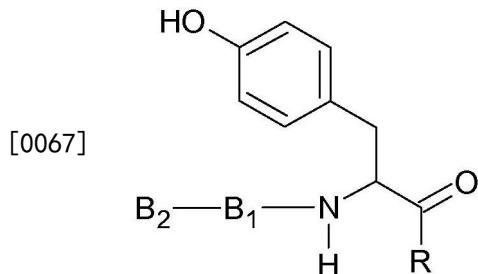
存在将通常增加所述肽的溶解度，上面列举的疏水氨基酸均与酪氨酸的负亲水指数相反，具有正的亲水指数(Kyte&Doolittle(1982),J.Mol.Biol.157(1),105-132页)(亲水指数越大，氨基酸就越疏水)。

[0063] 所述肽化合物可具有下式



[0065] 其中R是氢、 CH_3 、 CX_3 、 CH_2X 或 $\text{CH}_2\text{X}'$ ，其中X是卤素原子； X' 是OH或H，至少一个 X' 是OH； B_1 是单氨基酸残基；且 B_2 是一个或更多氨基酸残基， B_2 任选地包含N-末端保护基团。

[0066] 因此， B_0 (在C末端的氨基酸残基)可为酪氨酸(对酪氨酸)、间酪氨酸或3,4-二羟基苯丙氨酸残基。为酪氨酸残基时，所述肽化合物具有下式：



[0068] 在本发明的一个特定方面，所述肽化合物包括C末端残基在内仅包含3个氨基酸残基。在本发明的该方面，合成是更成本集约的(cost-effective)，且所述肽化合物证明为高度有效的酶活性抑制剂。优选地，所述仅有三个氨基酸残基的肽化合物由N末端保护基团保护。因而，在此方面，本发明涉及其中 B_2 是包含N末端保护基团的单氨基酸残基的化合物。

[0069] 在本发明的一个优选方面，所述肽化合物为仅包含3个氨基酸残基的醛，其中 B_2 选自包含N末端保护基团的精氨酸、谷氨酸和亮氨酸。当所述肽化合物为仅包含3个氨基酸残基的醛时， B_2 优选自包含N末端保护基团的精氨酸和甘氨酸。

[0070] 在本发明的另一个方面，所述肽化合物包含至少四个氨基酸残基。优选地，所述具有至少四个氨基酸残基的肽化合物由N末端保护基团保护。因而，在该方面本发明涉及其中 B_2 是至少两个包含N-末端保护基团的氨基酸残基的化合物。

[0071] 在一个优选方面，当所述肽化合物包含至少四个氨基酸残基时， B_2 包含具有非极性侧链的N-末端氨基酸残基。在一个更特定的实施方案中，从与 B_1 的附接处计数的 B_2 的第二个氨基酸残基具有非极性侧链。在一个甚至更特定的实施方案中，所述肽化合物包含四个氨基酸残基，其中具有非极性侧链的N末端氨基酸残基选自甘氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸。优选地，所述N末端氨基酸残基进一步包含N末端保护基团。

[0072] 优选的是 B_1 为小氨基酸残基。更优选 B_1 为丙氨酸或缬氨酸。在此语境下，下述氨基酸视为小氨基酸：丙氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、缬氨酸、正缬氨酸和正亮氨酸。

[0073] 所述肽化合物可为醛，其中R是氢，B₁是单氨基酸残基，优选选自小氨基酸如缬氨酸和丙氨酸，B₂包含至少两个氨基酸残基，且其中所述两个氨基酸残基中的至少一个选自苯丙氨酸、甘氨酸和亮氨酸，且其中B₂的第二个氨基酸残基具有选自苯丙氨酸、甘氨酸、亮氨酸、酪氨酸和色氨酸的非极性侧链。优选地，B₂包括乙酰基(Ac)N末端保护基团，从而得到肽醛化合物Ac-FGAY-H、Ac-LGAY-H、Ac-YGAY-H、Ac-FGVY-H和Ac-WLVY-H，以及其他。优选地，根据本发明该方面的化合物包含少于10个氨基酸残基，如9、8、7、6、5或最优先4个氨基酸残基。

[0074] 在另一方面，所述肽化合物可为三肽醛，其中R是氢、B₁是选自小氨基酸(例如缬氨酸和丙氨酸)的单氨基酸，B₂包含选自精氨酸、谷氨酸和亮氨酸的氨基酸残基。优选地，B₂包括选自苄氧羰基(Z)和乙酰基(Ac)的N末端保护基团，从而得到肽醛化合物Z-RAY-H、Z-GAY-H、Z-GAL-H、Z-GAF-H、Z-GAV-H、Z-RVY-H、Z-LVY-H和Ac-GAY-H，以及其他。根据该方面最优先的，是苄氧羰基(Z)N末端保护基团。

[0075] 在一个优选方面，当所述肽化合物包含至少四个氨基酸残基时，B₂包含具有非极性侧链的N末端氨基酸残基。在本发明的语境下，“具有非极性侧链的氨基酸”是指选自下组的氨基酸或氨基酸残基：苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、缬氨酸、丙氨酸、脯氨酸、甘氨酸、正缬氨酸或正亮氨酸。

[0076] 特别优先的，本发明的肽醛包括Z-RAY-H、Ac-GAY-H、Z-GAY-H、Z-GAL-H、Z-GAF-H、Z-GAV-H、Z-RVY-H、Z-LVY-H、Ac-LGAY-H、Ac-FGAY-H、Ac-YGAY-H、Ac-FGVY-H或Ac-WLVY-H，其中Z是苄氧羰基而Ac是乙酰基。

[0077] N末端保护基团

[0078] 所述N末端保护基团可为任何用于肽合成的氨基末端保护基团。Gross和Meinhoffer编，《The Peptides》，Vol.3；3-88(1981)，Academic Press, New York 1981公开了多种合适的氨保护基团，并为此以提述的方式并入本文。

[0079] 合适基团的实例包括甲酰基、乙酰基、苯甲酰基、三氟乙酰基、氟代甲氧基羰基、甲氧基琥珀酰基、芳香族氨基甲酸酯保护基团，如苄氧羰基；以及脂肪族氨基甲酸酯保护基团，如叔丁基氧羰基或金刚烷基氧羰基、对甲氧基苄基羰基(MOZ)、苄基(Bn)、对甲氧基苄基(PMB)或对甲氧基苯基(PMP)。

[0080] 本发明的N末端保护基团优选选自甲酰基、乙酰基、苯甲酰基、芳香族或脂肪族氨基甲酸酯，更优选乙酰基或苄氧羰基。当所述肽化合物包含三个氨基酸时，所述N末端保护基团优选为芳香族或脂肪族氨基甲酸酯或芳香族N末端保护基团，特别是苄氧羰基(Cbz)、对甲氧基苄基羰基(MOZ)、苄基(Bn)、对甲氧基苄基(PMB)或对甲氧基苯基(PMP)，更优选苄氧羰基。当所述肽化合物包含四个或更多氨基酸时，所述N末端保护基团优选为甲酰基、乙酰基或苯甲酰基，更优选乙酰基。

[0081] 液体组合物

[0082] 在一个优选实施方案中，本发明的肽化合物用于在液体组合物中稳定或抑制枯草杆菌蛋白酶，其可进一步包括表面活性剂和其他酶。

[0083] 在一个方面，本发明进一步涉及使用如上定义的化合物用于稳定和/或抑制酶，包括枯草杆菌蛋白酶类型的蛋白酶。在一个优选方面，所述酶在液体洗涤剂中经稳定化或受抑制。将所述肽化合物添加至所述液体洗涤剂可增加去污性能(detergency)。

[0084] 所述液体组合物可为包括枯草杆菌蛋白酶和任选地第二种酶的酶组合物。所述第二种酶可为任何商业上可得到的酶,特别是选自下组的酶:蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶、纤维素酶、甘露聚糖酶、氧化还原酶、裂合酶和其任意混合物。亦包括来自同一类型(例如,蛋白酶)的酶混合物。所述酶组合物亦可包括其他稳定剂,例如多元醇,如甘油或丙二醇,例如以按重量计25-75%的量。

[0085] 用于所述液体组合物的酶量根据酶类型和组合物类型的不同而变化。在如液体洗涤剂的组合物中,每种酶的量以纯酶蛋白质计算通常为0.04-80μM,特别是0.2-30μM,尤其是0.4-20μM(通常为1-2000mg/1,特别是5-750mg/1,尤其是10-500mg/1)。在如酶浓缩物(enzyme concentrate)的组合物中,每种酶的量以纯酶蛋白质计算通常为0.01-20mM,特别是0.04-10mM,尤其是0.1-5mM(通常为0.3-500g/1,特别是1-300g/1,尤其是3-150g/1)。

[0086] 所述酶通常以足以提供本领域技术人员已知的洗涤中效果(in-wash effect)的水平掺入洗涤剂组合物。通常这在0.0001% (w/w) 到5% (w/w) 的范围内。通常的量按液体洗涤剂组合的重量计在0.01%到1%的范围内。根据本发明酶稳定剂或抑制剂对蛋白酶的摩尔比例为至少1:1或1.5:1,且少于1000:1,较优选少于500:1,甚至更优选为100:1到2:1或20:1到2:1,或最优选的,所述摩尔比例是10:1到3:1。

[0087] 在一个特定方面,本发明涉及包含1到95%重量%去污表面活性剂,按重量计0.0001到5%的枯草杆菌蛋白酶,以及0.00001到1%重量%的如上定义的肽抑制剂的组合物。在一个更特定的实施方案中,本发明涉及包含重量计2到60%的去污表面活性剂,按重量计0.0005到1%的枯草杆菌蛋白酶,以及重量计0.00005到0.2%的如上定义的肽抑制剂的组合物。在一个还更特定的实施方案中,本发明涉及包含重量计3到50%的去污表面活性剂,按重量计0.001到0.5%的枯草杆菌蛋白酶,以及重量计0.0001到0.1%的如上定义的肽抑制剂的组合物。

[0088] 枯草杆菌蛋白酶

[0089] 所述枯草杆菌蛋白酶可为动物、植物或微生物来源的,包括化学或遗传修饰的突变体。其可为丝氨酸蛋白酶,优选碱性微生物蛋白酶。实例包括来自由Siezen等(Protein Engineering, 1991, vol. 4 no. 7 pp. 719-737)定义的I-S组枯草杆菌蛋白酶类型的蛋白酶。枯草杆菌蛋白酶的实例为来源于芽孢杆菌属(Bacillus)的那些,例如枯草杆菌蛋白酶Novo、枯草杆菌蛋白酶Carlsberg、枯草杆菌蛋白酶BPN'、枯草杆菌蛋白酶309、枯草杆菌蛋白酶147和枯草杆菌蛋白酶168(描述于WO89/06279)。实例描述于WO 1998/020115、WO 01/44452、WO 01/58275、WO 01/58276、WO 2003/006602和WO 2004/099401。

[0090] 商业上可得到的蛋白酶(肽酶)的实例包括KannaseTM、EverlaseTM、EsperaseTM、AlcalaseTM、NeutraseTM、DurazymTM、SavinaseTM、OvozymeTM、LiquanaseTM、PolarzymeTM、PyraseTM、Pancreatic Trypsin NOVO(PTN)、Bio-FeedTM Pro和Clear-LensTM Pro(全部可从Novozymes A/S, Bagsvaerd, Denmark获得)。其他商业上可得到的蛋白酶包括RonozymeTM、MaxataseTM、MaxacalTM、MaxapemTM、OpticleanTM、ProperaseTM、PurafectTM、Purafect OxTM和Purafact PrimeTM(可从Genencor International Inc., Gist-Brocades, BASF或DSM Nutritional Products获得)。

[0091] 第二种酶

[0092] 除枯草杆菌蛋白酶外,所述液体组合物可包括选自下组的第二种酶:淀粉酶、脂肪

酶、纤维素酶、甘露聚糖酶、氧化还原酶和裂合酶；特别优选的是其中所述第二种酶为脂肪酶的液体组合物。

[0093] 合适的淀粉酶(α和/或β)包括细菌或真菌来源的那些。包括化学和遗传修饰的突变体。淀粉酶包括，例如，来自地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*)的α淀粉酶，描述于GB 1,296,839中。商业上可得到的淀粉酶包括DuramylTM、TermamylTM、StainzymeTM、Stainzyme PlusTM、Termamyl UltraTM、FungamylTM和BANTM(可从Novozymes A/S获得)和RapidaseTM、Maxamyl PTM、Purastar和Purastar OxAm(可从Gist-Brocades和Genencor Inc.获得)。

[0094] 合适的纤维素酶可为细菌或真菌来源的。包括化学和遗传修饰的突变体。其可为来自特异腐质霉(*Humicola insolens*) (US 4,435,307)或来自木霉属(*Trichoderma*)，例如里氏木霉(*T. reesei*)或绿色木霉(*T. viride*)的真菌纤维素酶。纤维素酶的实例描述于EP 0 495 257。商业上可得到的纤维素酶包括CarezymeTM、CelluzymeTM、CellucleanTM、CelluclastTM和EndolaseTM(可得自Novozymes)、Puradax、Puradax HA和Puradax EG(可得自Genencor)。

[0095] 合适的氧化还原酶包括过氧化物酶或氧化酶，如漆酶。包括化学和遗传修饰的突变体。所述过氧化物酶可为植物、细菌或真菌来源的。实例为来源于鬼伞属(*Coprinus*)，如灰盖鬼伞(*C. cinerius*)或长根鬼伞(*C. macrorhizus*)菌株的过氧化物酶，或来自芽孢杆菌属，例如，短小芽孢杆菌(*B. pumilus*)菌株的过氧化物酶，特别是根据W091/05858的过氧化物酶。本文中合适的漆酶包括细菌或真菌来源的那些。实例为来自栓菌属(*Trametes*)，例如，长绒毛栓菌(*T. villosa*)或变色栓菌(*T. versicolor*)菌株的漆酶，或者来自鬼伞属，例如，灰盖鬼伞菌株的漆酶，或者来自毁丝霉属(*Myceliophthora*)，例如，嗜热毁丝霉(*M. thermophila*)菌株的漆酶。

[0096] 合适的脂肪分解酶包括细菌或真菌来源的脂肪酶或角质酶(cutinase)。包括化学和遗传修饰的突变体。实例包括EP 258 068和EP 305 216中所述来自细毛嗜热霉(*Thermomyces lanuginosus*) (疏棉状腐质霉(*Humicola lanuginosa*))的脂肪酶，来自曼赫根毛霉(*Rhizomucor miehei*)的脂肪酶，例如，如EP 238 023中所述，念珠菌属(*Candida*)脂肪酶，如南极念珠菌(*C. antarctica*)脂肪酶，例如，EP 214 761中描述的南极念珠菌脂肪酶A或B，尖镰孢(*Fusarium oxysporum*)脂肪酶(WO 98/26057)，假单胞菌属(*Pseudomonas*)脂肪酶如类产碱假单胞菌(*P. pseudoalcaligenes*)和产碱假单胞菌(*P. alcaligenes*)脂肪酶，例如，如EP 218 272中所述，洋葱假单胞菌(*P. cepacia*)脂肪酶，例如，如EP 331 376中所述，施氏假单胞菌(*P. stutzeri*)脂肪酶，例如，如BP 1,372,034中所公开，荧光假单胞菌(*P. fluorescens*)脂肪酶，芽孢杆菌属(*Bacillus*)脂肪酶，例如，枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)脂肪酶(Dartois等，(1993), *Biochemica et Biophysica acta* 1131, 253-260)，嗜热脂肪芽孢杆菌(*B. stearothermophilus*)脂肪酶(JP64/744992)和短小芽孢杆菌(*B. pumilus*)脂肪酶(W091/16422)。沙门柏干酪青霉(*Penicillium camembertii*)脂肪酶(Yamaguchi等，(1991), *Gene* 103, 61-67)，念珠地丝菌(白地霉)(*Geotrichum candidum*)脂肪酶(Schimada, Y. 等，(1989), *J. Biochem.* 106, 383-388)，和多种根霉属(*Rhizopus*)脂肪酶如德氏根霉(*R. delemar*)脂肪酶(Hass, M. J等，(1991), *Gene* 109, 117-113)，雪白根霉(*R. niveus*)脂肪酶(Kugimiya等，(1992), *Biosci. Biotech. Bio-chem.* 56, 716-719)和米根霉(*R. oryzae*)脂肪酶。其他实例为来自门多萨假单胞菌(*Pseudomonas mendocina*)的角质

酶(WO 88/09367),来自豌豆腐皮镰孢(*Fusarium solani pisi*)的角质酶(WO 90/09446)和来自特异腐质霉的角质酶(WO 2001/0952502)。所述脂肪分解酶可为脂肪酶变体,例如,WO2000/060063中所述的。

[0097] 商业上可得到的脂肪酶实例包括LipexTM、LipoprimeTM、LipopanTM、Lipopan FTM、Lipopan XtraTM、LipolaseTM、LipolaseTM Ultra、LipozymeTM、PalataseTM、ResinaseTM、NovozymTM435和LecitaseTM(全部可从NovozymesA/S获得)。其他商业上可得到的脂肪酶包括LumafastTM(来自GenencorInternational Inc.的门多萨假单胞菌脂肪酶);LipomaxTM(来自Gist-Brocades/Genencor Int. Inc.的类产碱假单胞菌脂肪酶);和来自Solvay enzymes的芽孢杆菌属菌种脂肪酶。另外的脂肪酶如Lipase P "Amano"(Amano Pharmaceutical Co.Ltd.)可从其他供应商获得。

[0098] 合适的甘露聚糖酶包括那些细菌或真菌来源的。包括化学和遗传修饰的突变体。商业上可得到的甘露聚糖酶的实例包括MannawayTM(Novozymes的产品)和MannaStar(Genencor的产品)。

[0099] 合适的裂合酶包括那些细菌或真菌来源的。包括化学和遗传修饰的突变体。裂合酶的实例包括果胶酸裂合酶(pectate lyase)和果胶裂合酶(pectin lyase)。商业上可得到的裂合酶实例为PectawashTM和PectawayTM(Novozymes的产品)。

[0100] 本发明进一步由下述实施例描述,其不应认为是对于本发明范围的限制。

实施例

[0101] 实施例1

[0102] 不同的肽醛由定制肽合成公司产生,均具有>80%的纯度。在使用前,将肽醛溶解于DMSO至10mg/ml的浓度。

[0103] 制备模型液体稀释剂以供测试不同的稳定剂:

[0104] 洗涤剂基质:

[0105]

组分	% w/w
烷基乙氧基硫酸钠(C9-15,2EO)	6.0
十二烷基苯磺酸钠	3.0
甲苯磺酸钠	3.0
油酸	2.0
伯醇乙氧基化物(C12-15,7EO)	3.0
伯醇乙氧基化物(C12-15,3EO)	2.5
乙醇	0.5
单丙二醇	2.0
二水合柠檬酸三钠	4.0
三乙醇胺	0.4
去离子水	加至100%
pH用NaOH调至8.5	

[0106] 制备了具有酶的对照洗涤剂:

[0107] 洗涤剂A:

[0108]	组分	% w/w
	洗涤剂基质	99.0
	蛋白酶 (Savinase 16.0LEX)	0.5
	脂肪酶 (Lipex 100L)	0.5

[0109] 进一步,制备了下列具有本发明稳定剂的洗涤剂,所有的试样标准化为100g的洗涤剂:

洗涤剂 ID	洗涤剂 A	稳定剂 (来自 10 mg/ml 溶液)	抑制剂相对于蛋白酶过量的摩尔数
B1	100 g	1,3 mg Z-RAY-H	3
B2	100 g	2,2 mg Z-RAY-H	5
B3	100 g	4,4 mg Z-RAY-H	10
C1	100 g	2.8 mg Ac-GAY-H	10
C2	100 g	7.0 mg Ac-GAY-H	25
D1	100 g	1.8 mg Z-GAY-H	5
D2	100 g	3.6 mg Z-GAY-H	10
E1	100 g	1,4 mg Z-RVY-H	3

[0111]

E2	100 g	2,3 mg Z-RVY-H	5
E3	100 g	4,6 mg Z-RVY-H	10
F1	100 g	1,3 mg Z-LVY-H	3
F2	100 g	2,1 mg Z-LVY-H	5
F3	100 g	4,3 mg Z-LVY-H	10
G1	100 g	1,1 mg Ac-LGAY-H	3
G2	100 g	1,9 mg Ac-LGAY-H	5
G3	100 g	3,7 mg Ac-LGAY-H	10
H1	100 g	0.6 mg Ac-FGAY-H	1.5
H2	100 g	1.2 mg Ac-FGAY-H	3
H3	100 g	2 mg Ac-FGAY-H	5
H4	100 g	4 mg Ac-FGAY-H	10
H5	100 g	10 mg Ac-FGAY-H	25
I1	100 g	1,2 mg Ac-YGAY-H	3
I2	100 g	2,1 mg Ac-YGAY-H	5
I3	100 g	4,2 mg Ac-YGAY-H	10
J1	100 g	1,3 mg Ac-FGVY-H	3
J2	100 g	2,1 mg Ac-FGVY-H	5
J3	100 g	4,3 mg Ac-FGVY-H	10
K1	100 g	1,5 mg Ac-WLVY-H	3
K2	100 g	2,5 mg Ac-WLVY-H	5
K3	100 g	5,1 mg Ac-WLVY-H	10

[0112] 将洗涤剂在35°C和40°C置于加封的玻璃杯中。残余的脂肪酶和蛋白酶活性在不同时间测量(通过与在-18°C下储藏的对照相比较),使用标准酶分析方法(蛋白酶通过在40°C,pH8.3水解N,N-二甲基酪蛋白测量,而脂肪酶通过在40°C,pH7.7水解戊酸对硝基苯酯来测量)进行。在下表中,3x指与蛋白酶比较3摩尔过量(surplus)的抑制剂,其余类推。

[0113]

洗涤剂	残余蛋白酶活性		残余脂肪酶活性 一周 35°C
	一周 40°C		
A (对照)	11%		3%
B1 (Z-RAY-H, 3x)	49%		12%
B2 (Z-RAY-H, 5x)	69%		37%
B3 (Z-RAY-H, 10x)	79%		63%
C1 (Ac-GAY-H, 10x)	59%		
C2 (Ac-GAY-H, 25x)	73%		62%

[0114]	D1 (Z-GAY-H, 5x)	55%	22%
	D2 (Z-GAY-H, 10x)	77%	49%
	E1 (Z-RVY-H, 3x)	54%	21%
	E2 (Z-RVY-H, 5x)	67%	36%
	E3 (Z-RVY-H, 10x)	80%	61%
	F1 (Z-LVY-H, 3x)	32%	7%
	F2 (Z-LVY-H, 5x)	43%	15%
	F3 (Z-LVY-H, 10x)	59%	33%
	G1 (Ac-LGAY-H, 3x)	62%	33%
	G2 (Ac-LGAY-H, 5x)	82%	56%
	G3 (Ac-LGAY-H, 10x)	90%	66%
	H1 (Ac-FGAY-H, 1.5x)	24%	4%
	H2 (Ac-FGAY-H, 3x)	42%	12%
	H3 (Ac-FGAY-H, 5x)	78%	63%
	H4 (Ac-FGAY-H, 10x)	91%	72%
	H5 (Ac-FGAY-H, 25x)	93%	72%
	I1 (Ac-YGAY-H, 3x)	53%	14%
	I2 (Ac-YGAY-H, 5x)	90%	66%
	I3 (Ac-YGAY-H, 10x)	88%	75%
	J1 (Ac-FGVY-H, 3x)	62%	48%
	J2 (Ac-FGVY-H, 5x)	82%	66%
	J3 (Ac-FGVY-H, 10x)	96%	70%
	K1 (Ac-WLVY-H, 3x)	26%	3%
	K2 (Ac-WLVY-H, 5x)	35%	8%
	K3 (Ac-WLVY-H, 10x)	53%	18%

[0115] 结果表明酪氨酸肽醛为非常有效的蛋白酶稳定剂。

[0116] 实施例2

[0117] 制备了下述具有酶的对照洗涤剂：

[0118] 洗涤剂L:

组分	% w/w
来自实施例1的洗涤剂基质	98.5
蛋白酶 (Savinase 16.0LEX)	0.5
脂肪酶 (Lipex 100L)	0.5
淀粉酶 (Stainzyme 12L)	0.5

[0120] 制备了下列具有根据本发明稳定剂的洗涤剂并将其标准化至100g的洗涤剂：

[0121]	洗涤剂 ID	洗涤剂 L	稳定剂 (来自 10 mg/ml 溶液)	相对于蛋白酶过量的 抑制剂摩尔数
	M	100 g	2 mg Ac-FGAY-H	5

[0122] 将所述洗涤剂在25°C和35°C置于封闭的玻璃杯中。残余的脂肪酶、淀粉酶和蛋白酶活性在不同时间(w=周)测量(通过与储藏于-18°C的对照比较),使用标准酶分析方法(通过在40°C,pH8.3水解N,N-二甲基酪蛋白来测定蛋白酶,通过在40°C,pH7.7水解戊酸对硝基苯酯来测定脂肪酶,而通过在37°C,pH7.35水解4,6-亚乙基-(G7)对硝基苯基-(G1)-α,D-麦芽庚糖昔(4,6-ethylidene-(G7)p-nitrophenyl-(G1)-α,D-maltoheptasoid)来测定淀粉酶)进行。

[0123]	%残余活性	残余蛋白酶活性		残余脂肪酶活性		残余淀粉酶活性	
	洗涤剂	4w35°C	13w25°C	4w35°C	13w25°C	4w35°C	13w25°C
	L(对照)	35%	62%	1%	2%	34%	42%
	M(Ac-FGAY-H, 5x)	91%	100%	16%	71%	70%	88%

[0124] 可见所述酪氨酸肽醛显著地改善了蛋白酶、脂肪酶和淀粉酶在液体洗涤剂中的储藏稳定性。

[0125] 实施例3

[0126] 肽醛Z-GAF-H,Z-GAL-H和Z-GAY-H通过肽合成来产生,均具有>80%的纯度。在使用前将肽醛溶解于DMSO至10mg/ml的浓度。

[0127] 制备了下述具有酶的洗涤剂N:

组分	% w/w
烷基乙氧基硫酸钠(C9-15,2EO)	20.0
甲苯磺酸钠	3.0
油酸	4.0
伯醇乙氧基化物(C12-15,7EO)	2.5
伯醇乙氧基化物(C12-15,3EO)	2.0
乙醇	2.1
碳酸钠	4.5
二水合柠檬酸三钠	5.0
去离子水	加至99%
pH用NaOH调至8.0	
蛋白酶(Savinase 16.0LEX)	0.5
脂肪酶(Lipex 100L)	0.5

[0129] 制备了下述具有根据本发明稳定剂的洗涤剂并将其标准化至100g的洗涤剂:

洗涤剂 ID	洗涤剂 N	稳定剂 (来自 10 mg/ml 溶液)	相对于蛋白酶过量 的抑制剂摩尔数
P (对照)	100g	无	0
Q1	100 g	0.16 mg Z-GAL-H	0.5
Q2	100 g	0.31 mg Z-GAL-H	1.0
Q3	100 g	0.62 mg Z-GAL-H	2.0
Q4	100 g	1.6 mg Z-GAL-H	5.0
R1	100 g	0.17 mg Z-GAF-H	0.5
R2	100 g	0.34 mg Z-GAF-H	1.0
R3	100 g	0.68 mg Z-GAF-H	2.0
R4	100 g	1.7 mg Z-GAF-H	5.0
S1	100 g	0.18 mg Z-GAY-H	0.5
S2	100 g	0.35 mg Z-GAY-H	1.0
S3	100 g	0.71 mg Z-GAY-H	2.0
S4	100 g	1.8 mg Z-GAY-H	5.0

[0130] [0131] 将洗涤剂在40°C置于封闭的玻璃杯中。一周后,测定了残余的蛋白酶活性(通过与储藏在-18°C的对照相比较),使用标准的酶分析方法(通过在40°C, pH8.3水解N,N-二甲基酪蛋白来测定蛋白酶)进行。

[0132] 在40°C一周后的%残余蛋白酶活性:

相对于蛋白酶过量的 抑制剂摩尔数	Det N (对照)	Det N +Z-GAL-H	Det N +Z-GAF-H	Det N +Z-GAY-H
0	7% (P)			
0,5		12% (Q1)	11% (R1)	13% (S1)
1		17% (Q2)	18% (R2)	28% (S2)
2		31% (Q3)	28% (R3)	41% (S3)
5		42% (Q4)	44% (R4)	65% (S4)

[0133] [0134] 结果表明所有三种肽醛对于稳定所述蛋白酶均是有效的。发现酪氨酸肽醛Z-GAY-H为最有效的,因为其仅仅需要大约一半的相对于蛋白酶过量的抑制剂摩尔数就能达到与其他肽醛相同的残余活性。