

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-507855
(P2025-507855A)

(43)公表日 令和7年3月21日(2025.3.21)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	9/22 (2006.01)	C 1 2 N	9/22	Z N A	4 B 0 6 5
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15		4 H 0 0 3
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19		
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21		
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全77頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-551981(P2024-551981)			(71)出願人	500586299
(86)(22)出願日	令和5年2月28日(2023.2.28)				ノボザイムス アクティーゼルスカブ
(85)翻訳文提出日	令和6年8月30日(2024.8.30)				デンマーク国, デーコー 2 8 8 0 バ
(86)国際出願番号	PCT/EP2023/054907				グスバエルト, クロシェイバイ 3 6
(87)国際公開番号	WO2023/165950			(74)代理人	100099759
(87)国際公開日	令和5年9月7日(2023.9.7)				弁理士 青木 篤
(31)優先権主張番号	22160258.4			(74)代理人	100123582
(32)優先日	令和4年3月4日(2022.3.4)				弁理士 三橋 真二
(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
	最終頁に続く				弁理士 中島 勝
				(74)代理人	100138210
					弁理士 池田 達則
				(74)代理人	100182730
					最終頁に続く

(54)【発明の名称】 D N a s e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実現することが見出された、親D N a s eと比較した変更を示す新規のD N a s eバリエントに関する。また、本発明は、D N a s eバリエントを含む洗剤組成物、並びにD N a s e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D N A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】

A111P、D32E、V35I、S69V、Q102E、K105N、及びG181Nからなる群から選択される少なくとも2つの置換、例えば少なくとも3つの置換を含むDNaseバリエーションであって、位置番号は配列番号1の付番に基づき、前記バリエーションは、配列番号1、配列番号2、又は配列番号3のポリペプチドに対して少なくとも60%且つ100%未満の配列同一性を有し、前記バリエーションはDNase活性を有する、DNaseバリエーション。

【請求項2】

前記バリエーションは前記置換A111Pを含む、請求項1に記載のバリエーション。

10

【請求項3】

S26H、D32E、V35I、K65E、K67A、S69E、S69V、S98R、Q102E、K105N、S115T、Q150E、Q157E、T159Q、G161R、A172E、G181N、S182Y、S182V、K185E、V187N、K192I、A206G、Q208V、及びK212Eからなる群から選択される2つ以上の置換をさらに含む、請求項2に記載のバリエーション。

【請求項4】

前記バリエーションは：

D32E+V35I、例えばD32E+V35I+A111P；及び／又は
G181N、例えばA111P+G181N；及び／又は
S69V+Q102E

20

を含む、請求項1～3のいずれか一項に記載のバリエーション。

【請求項5】

前記バリエーションは：

D32E+V35I+A111P、並びに、場合によっては、S26H、K65E、K67A、S69E、S69V、S98R、Q102E、K105N、S115T、Q150E、Q157E、T159Q、G161R、A172E、G181N、S182Y、S182V、K185E、V187N、K192I、A206G、Q208V、及びK212Eからなる群から選択される1つ以上の追加の置換；

D32E+V35I+A111P+G181N、並びに、場合によっては、S26H、K65E、K67A、S69E、S69V、S98R、Q102E、K105N、S115T、Q150E、Q157E、T159Q、G161R、A172E、S182Y、S182V、K185E、V187N、K192I、A206G、Q208V、及びK212Eからなる群から選択される1つ以上の追加の置換；

30

D32E+V35I+Q102E+A111P+G181N、並びに、場合によっては、S26H、K65E、K67A、S69E、S69V、S98R、K105N、S115T、Q150E、Q157E、T159Q、G161R、A172E、S182Y、S182V、K185E、V187N、K192I、A206G、Q208V、及びK212Eからなる群から選択される1つ以上の追加の置換；

D32E+V35I+K105N+A111P+G181N、並びに、場合によっては、S26H、K65E、K67A、S69E、S69V、S98R、Q102E、S115T、Q150E、Q157E、T159Q、G161R、A172E、S182Y、S182V、K185E、V187N、K192I、A206G、Q208V、及びK212Eからなる群から選択される1つ以上の追加の置換；

40

D32E+V35I+S69V+Q102E+A111P、並びに、場合によっては、S26H、K65E、K67A、S98R、K105N、S115T、Q150E、Q157E、T159Q、G161R、A172E、G181N、S182Y、S182V、K185E、V187N、K192I、A206G、Q208V、及びK212Eからなる群から選択される1つ以上の追加の置換；

D32E+V35I+S69V+Q102E+A111P+G181N、並びに、場合に

50

よっては、S 2 6 H、K 6 5 E、K 6 7 A、S 9 8 R、K 1 0 5 N、S 1 1 5 T、Q 1 5 0 E、Q 1 5 7 E、T 1 5 9 Q、G 1 6 1 R、A 1 7 2 E、S 1 8 2 Y、S 1 8 2 V、K 1 8 5 E、V 1 8 7 N、K 1 9 2 I、A 2 0 6 G、Q 2 0 8 V、及び K 2 1 2 E からなる群から選択される1つ以上の追加の置換；

S 6 9 V + Q 1 0 2 E + A 1 1 1 P、並びに、場合によっては、S 2 6 H、D 3 2 E、V 3 5 I、K 6 5 E、K 6 7 A、S 9 8 R、K 1 0 5 N、S 1 1 5 T、Q 1 5 0 E、Q 1 5 7 E、T 1 5 9 Q、G 1 6 1 R、A 1 7 2 E、G 1 8 1 N、S 1 8 2 Y、S 1 8 2 V、K 1 8 5 E、V 1 8 7 N、K 1 9 2 I、A 2 0 6 G、Q 2 0 8 V、及び K 2 1 2 E からなる群から選択される1つ以上の追加の置換；

S 6 9 V + Q 1 0 2 E + G 1 8 1 N、並びに、場合によっては、S 2 6 H、D 3 2 E、V 3 5 I、K 6 5 E、K 6 7 A、S 9 8 R、K 1 0 5 N、A 1 1 1 P、S 1 1 5 T、Q 1 5 0 E、Q 1 5 7 E、T 1 5 9 Q、G 1 6 1 R、A 1 7 2 E、S 1 8 2 Y、S 1 8 2 V、K 1 8 5 E、V 1 8 7 N、K 1 9 2 I、A 2 0 6 G、Q 2 0 8 V、及び K 2 1 2 E からなる群から選択される1つ以上の追加の置換；

S 6 9 V + Q 1 0 2 E + A 1 1 1 P + G 1 8 1 N、並びに、場合によっては、S 2 6 H、D 3 2 E、V 3 5 I、K 6 5 E、K 6 7 A、S 9 8 R、K 1 0 5 N、S 1 1 5 T、Q 1 5 0 E、Q 1 5 7 E、T 1 5 9 Q、G 1 6 1 R、A 1 7 2 E、S 1 8 2 Y、S 1 8 2 V、K 1 8 5 E、V 1 8 7 N、K 1 9 2 I、A 2 0 6 G、Q 2 0 8 V、及び K 2 1 2 E からなる群から選択される1つ以上の追加の置換；

Q 1 0 2 E + K 1 0 5 N + A 1 1 1 P + G 1 8 1 N、並びに、場合によっては、S 2 6 H、D 3 2 E、V 3 5 I、K 6 5 E、K 6 7 A、S 6 9 E、S 6 9 V、S 9 8 R、S 1 1 5 T、Q 1 5 0 E、Q 1 5 7 E、T 1 5 9 Q、G 1 6 1 R、A 1 7 2 E、S 1 8 2 Y、S 1 8 2 V、K 1 8 5 E、V 1 8 7 N、K 1 9 2 I、A 2 0 6 G、Q 2 0 8 V、及び K 2 1 2 E からなる群から選択される1つ以上の追加の置換；

S 6 9 V + Q 1 0 2 E + K 1 0 5 N + A 1 1 1 P + G 1 8 1 N、並びに、場合によっては、S 2 6 H、D 3 2 E、V 3 5 I、K 6 5 E、K 6 7 A、S 9 8 R、S 1 1 5 T、Q 1 5 0 E、Q 1 5 7 E、T 1 5 9 Q、G 1 6 1 R、A 1 7 2 E、S 1 8 2 Y、S 1 8 2 V、K 1 8 5 E、V 1 8 7 N、K 1 9 2 I、A 2 0 6 G、Q 2 0 8 V、及び K 2 1 2 E からなる群から選択される1つ以上の追加の置換；又は

D 3 2 E + V 3 5 I + K 1 0 5 N + A 1 1 1 P、並びに、場合によっては、S 2 6 H、K 6 5 E、K 6 7 A、S 6 9 E、S 6 9 V、S 9 8 R、Q 1 0 2 E、S 1 1 5 T、Q 1 5 0 E、Q 1 5 7 E、T 1 5 9 Q、G 1 6 1 R、A 1 7 2 E、G 1 8 1 N、S 1 8 2 Y、S 1 8 2 V、K 1 8 5 E、V 1 8 7 N、K 1 9 2 I、A 2 0 6 G、Q 2 0 8 V、及び K 2 1 2 E からなる群から選択される1つ以上の追加の置換

を含む、請求項 1～4 のいずれか一項に記載のバリエーション。

【請求項 6】

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 6 5 %、例えば、少なくとも 7 0 %、少なくとも 7 5 %、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 % であるが、1 0 0 % 未満の配列同一性を有する、請求項 1～5 のいずれか一項に記載のバリエーション。

【請求項 7】

- ・ S 6 9 V + K 8 6 E + Q 1 0 2 E + K 1 4 7 N + K 1 5 5 E + A 1 7 2 D + K 1 9 2 A + Q 2 0 8 V；
- ・ G 2 0 C + K 3 0 C + D 3 2 E + V 3 5 I + A 1 1 1 P；
- ・ S 6 9 V + K 8 6 E + Q 1 0 2 E + K 1 4 7 N + K 1 5 5 E + A 1 7 2 D + G 1 8 1 N + K 1 9 2 A + Q 2 0 8 V；
- ・ D 3 2 E + V 3 5 I + N 7 7 E + A 1 1 1 P + G 1 8 1 N + S 1 8 2 V；
- ・ D 3 2 E + E 3 4 N + V 3 5 I + K 8 6 E + A 1 1 1 P + G 1 8 1 N；
- ・ S 6 9 V + K 8 6 E + Q 1 0 2 E + K 1 0 5 T + K 1 4 7 N + K 1 5 5 E + A 1 7 2 D + K 1 9 2 A + Q 2 0 8 V；

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

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

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

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

H + Q 1 5 0 E + G 1 6 1 R + G 1 8 1 N + K 1 9 2 I ;

・ D 3 2 P + S 6 9 V + Q 1 0 2 E + K 1 0 5 D + A 1 1 1 P + S 1 1 5 T + Q 1 5 0 E + G 1 6 1 R + G 1 8 1 N + V 1 8 7 N + K 1 9 2 I ; and

・ S 6 9 V + Q 1 0 2 E + K 1 0 5 N + A 1 1 1 P + S 1 1 5 T + G 1 3 7 R + Q 1 5 0 E + G 1 6 1 R + G 1 8 1 N + V 1 8 7 N + K 1 9 2 I

からなる群から選択される置換のセットを含む、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載のバリエーション。

【請求項 8】

前記置換のセットの 1 つと共に、配列番号 1、配列番号 2、又は配列番号 3 を含むか、又はこれからなる、請求項 7 に記載のバリエーション。

10

【請求項 9】

前記バリエーションは、配列番号 1 のポリペプチドと、又は前記置換のないバリエーション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、安定性が向上しており、例えば、前記安定性の向上は、洗剤安定性及び熱安定性からなる群から選択される、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載のバリエーション。

【請求項 10】

請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の D N a s e バリエーション及び少なくとも 1 つの洗剤補助成分を含む洗剤組成物。

【請求項 11】

洗濯物又は硬質面クリーニング、例えば食器洗浄等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 D N a s e バリエーション又は請求項 10 に記載の洗剤組成物の使用。

20

【請求項 12】

品目をクリーニングする方法であって、前記品目を、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の D N a s e バリエーション又は請求項 10 に記載の洗剤組成物を含む洗浄液に曝すことを含み、例えば、前記品目は生地又は硬質面である、方法。

【請求項 13】

生地の洗濯方法であって：

a) 前記生地を、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の D N a s e バリエーション又は請求項 10 に記載の洗剤組成物を含む洗浄液に曝すことと；

30

b) 少なくとも 1 つの洗浄サイクルを完了することと；場合によっては

c) 前記品目を濯ぐことと

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バリエーション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構築物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】

D N a s e バリエーションを生成する方法であって：

a) 前記バリエーション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と；

40

b) 前記バリエーションを回収することと

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、参照により本明細書に組み込まれるコンピュータ可読形式の配列表を含む。

【0002】

本発明は、安定性の向上、例えば洗剤安定性の向上を実現することが見出された、親 D

50

N a s eと比較した変更を示す新規のD N a s e（デオキシリボヌクレアーゼ）バリエーションに関する。また、本発明は、D N a s eバリエーションを含む洗剤組成物、並びにD N a s eバリエーションを用いる方法及び生成する方法、並びにバリエーションをコードする単離D N A配列、発現ベクター、及び宿主細胞に関する。本発明のバリエーションは、クリーニングプロセス、並びに洗剤組成物、例えば洗濯組成物及び食器洗浄組成物での使用に適している。

【背景技術】

【0003】

微生物は、一般に、多くの自然、産業、及び医療環境において表面に、バイオポリマー及び高分子が挙げられる細胞外物質によってカプセル化されて、生きたまま付着している。結果として生じる、粘性の莢膜を有する微生物の層は、バイオフィームと呼ばれる。バイオフィームは、自然環境における細菌の優勢な増殖方法であり、バイオフィーム内で増殖する細菌は、独特な生理学的特性を示す。浮遊状態で（*p l a n k t o n i c a l l y*）増殖する対応物と比較して、バイオフィーム内の細菌は、抗生物質、紫外線照射、洗剤、及び宿主免疫応答に対して、より耐性である。

10

【0004】

バイオフィームは、グラム陽性菌及びグラム陰性菌、海藻、原生動物、並びに／又は酵母若しくは糸状菌、並びにウイルス並びに／又はバクテリオファージが挙げられる1種以上の微生物を含み得る。問題となるバイオフィームの例として、歯垢、医療移植片の感染があるが、船体の初期汚染もある。バイオフィームは、ヒトにおける多くの感染症の病因となり、露出した表面の生物付着に関しては産業界で重要な問題であり、その場合、バイオフィームコロニー形成は、局所的生態系のベースコンポーネントを形成する虞があり、これは、産業プロセス及び産業コンポーネントを混乱させ、且つこれらに干渉し得る。

20

【0005】

洗濯品目、例えばTシャツ及びスポーツウエア、並びに他の衣料品目を用いる場合、これらは、使用者の身体由来の、そしてそれらが用いられる環境以外の細菌に曝露される。これらの細菌の一部は、洗濯品目に付着することができ、その品目にバイオフィームを形成する。細菌の存在は、洗濯品目が粘着性になり、これによって汚れが粘着性の領域に付着することを意味する。この汚れは、商業的に入手可能な洗剤組成物によって除去するのが困難であることが示されており、品目の悪臭、並びに黄ばみ及び黒ずみ等の難しい問題の原因となる。細菌から生じる悪臭は、除去するのが困難であり得、そして洗浄後ですら残る虞がある。なぜなら、細菌が生地表面に付着することによって、悪臭の源であり続け得るからである。さらに、非常に汚れた洗濯品目を、あまり汚れていない洗濯品目と一緒に洗浄すると、洗浄液中に存在する汚れが、バイオフィームに付着する傾向がある。結果として、洗濯物品目は、洗浄中に汚れの「再沈着」を受ける虞がある。

30

【0006】

国際公開第2014／087011号パンフレットは、細菌D N a s eポリペプチド、並びにバイオフィームの破壊及び防止のための方法を開示する。国際公開第2015／155350号パンフレットは、真菌源から得られた特定のD N a s eポリペプチドを含む洗剤組成物を開示する。国際公開第2017／064269号パンフレットは、安定性が向上したコウジカビ（*A s p e r g i l l u s o r y z a e*）由来の真菌D N a s eのバリエーションを開示する。これらの開示にも拘わらず、洗剤組成物内のD N a s e酵素をさらに向上させる、例えば酵素の安定性をさらに向上させることが依然として必要とされている。

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、発明者らによって見出された特定の置換を、特に有利となるように組み合わせることによって得られる、親D N a s eと比較して特性が向上した、特に安定性が向上したD N a s eバリエーションを提供する。

【課題を解決するための手段】

50

【0008】

本発明は、32、35、69、102、105、111、及び181位の2つ以上において置換を有する配列番号1、配列番号2、又は配列番号3の単離DNaseバリエントに関し、位置番号は配列番号1に基づく。

【0009】

また、本発明は、本明細書中で開示されるDNase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構築物、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に、例えば洗濯物のためにDNaseバリエント及び組成物を用いる方法に関する。

10

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】配列番号1、2、及び3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】

【0011】

配列表フリーテキスト

配列番号1は、コウジカビ (*Aspergillus oryzae*) から得られた成熟DNaseポリペプチドである。

【0012】

配列番号2は、N末端がトランケートされた、コウジカビ (*Aspergillus oryzae*) から得られた成熟DNaseポリペプチドである。

20

【0013】

配列番号3は、N末端がトランケートされた、コウジカビ (*Aspergillus oryzae*) から得られた成熟DNaseポリペプチドである。

【0014】

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「a」、「an」、及び「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。

【0015】

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、本明細書中で用いら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と同じ意味を有する。

30

【0016】

DNase：用語「DNase」は、DNAにおけるホスホジエステル結合の加水切断を触媒することでDNAを分解する、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は、エステラーゼ（EC番号3.1）（ヒドロラーゼのサブグループ）に属する。DNaseは、EC 3.1.21に分類される。本発明の目的のために、DNase活性は、アッセイIに記載される手順に従って判定され得る。用語「DNase」及び「DNase活性を有するポリペプチド」は、本出願の全体を通して互換的に用いられ得る。

40

【0017】

DNaseバリエント：「DNaseバリエント」は、1つ以上の個々の変異、典型的には置換、又は置換の組合せを有する配列番号1、2、又は3のDNaseのバリエントである。

【0018】

発現：用語「発現」は、バリエント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。

【0019】

発現ベクター：「発現ベクター」は、バリエントをコードするDNA配列を含む直鎖状又は環状のDNA構築物を指し、このコード配列は、適切な宿主においてDNAの発現を

50

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は、転写、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を生じさせるためのプロモータを含み得る。

【0020】

伸長：用語「伸長」は、バリエントのアミノ末端及び／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」バリエントは、DNase活性を有する。

【0021】

断片：用語「断片」は、1つ以上のアミノ酸がバリエントのアミノ末端及び／又はカルボキシル末端に不在であるバリエントを意味し、この断片は、DNase活性を有する。本発明の文脈における断片として、1つ以上のアミノ酸がアミノ末端に不在である配列番号1のバリエント、例えば、15個のN末端アミノ酸が存在しない配列番号2又は17個のN末端アミノ酸が存在しない配列番号3が挙げられる。

【0022】

宿主細胞：「宿主細胞」は、発現ベクター、ファージ、ウイルス、又は他のDNA構築物（バリエントをコードするポリヌクレオチドを含む）が導入された生物である。例示的な宿主株として、注目する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）がある。

【0023】

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ント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、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、性質の向上は、特に、安定性の向上、例えば、洗剤組成物中での保存安定性の向上が挙げられる保存安定性の向上、洗剤組成物中での使用中の安定性の向上、及び／又は熱安定性の向上である。加えて、本発明のバリエントはまた、他の性質の向上、例えば、DNase活性の向上、例えば、比活性の向上及び／又は洗浄性能の向上を有し得る。

【0024】

単離：用語「単離」は、ポリペプチドバリエント、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、細胞等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ポリペプチドバリエント、核酸、細胞、又は他の特定の物質若しくは成分を意味する。ゆえに、単離ポリペプチド、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。単離ポリペプチドとして、宿主細胞中で発現された分泌バリエント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。典型的には、本発明の単離バリエントは、知られているタンパク質精製方法を用いて培養ブロス中の他の成分から分離されることとなる。

【0025】

成熟ポリペプチド：用語「成熟ポリペプチド」は、N末端プロセシング及び／又はC末端プロセシング（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。

【0026】

当該技術において、宿主細胞が、同じポリヌクレオチドによって発現される2つ以上の異なる成熟ポリペプチド（すなわち、異なるC末端及び／又はN末端アミノ酸を有する）の混合物を生成し得ることが知られている。また、異なる宿主細胞が、ポリペプチドを異なってプロセシングすることで、ポリヌクレオチドを発現する一方の宿主細胞が、同じポリヌクレオチドを発現する別の宿主細胞と比較して、異なる成熟ポリペプチド（例えば、異なるC末端及び／又はN末端アミノ酸を有する）を生成し得ることが知られている。本発明の文脈において、成熟ポリペプチドは典型的に、宿主細胞によってN末端プロセシ

10

20

30

40

50

グされるので、成熟ポリペプチドは、配列番号 1 に示される成熟ポリペプチドの 2 2 1 アミノ酸残基よりも少なくなり得、例えば、配列番号 2 に示される 2 0 6 アミノ酸、又は配列番号 3 に示される 2 0 4 アミノ酸となり得る。

【0027】

成熟ポリペプチドコード配列：用語「成熟ポリペプチドコード配列」は、DNase 活性を有する成熟ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを意味する。

【0028】

変異体：用語「変異体」は、バリエントをコードするポリヌクレオチドを意味する。

【0029】

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。

10

【0030】

核酸：用語「核酸」は、バリエント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' への向きで示される。

【0031】

核酸構築物：用語「核酸構築物」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、又は合成である、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。

20

【0032】

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、コード配列の発現が調節配列の制御下にあるように、調節配列がコード配列に作動可能に連結されている。

【0033】

親又は親 DNase：用語「親」又は「親 DNase」は、本発明の DNase バリエントを生成するように変更がなされる DNase ポリペプチドを意味する。ゆえに、親は、本明細書中で開示されるバリエントの同一のアミノ酸配列を有するが、本明細書中で開示される指定された変更、典型的には置換を有していない DNase ポリペプチドである。

30

【0034】

特定の実施形態において、DNase 親は、配列番号 1、配列番号 2、又は配列番号 3 を有するポリペプチド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 DNase である。

40

【0035】

親 DNase は、例えば、真菌種、例えばアスペルギルス (*Aspergillus*) 属種、例えばコウジカビ (*Aspergillus oryzae*) から得ることができる。

【0036】

50

一実施形態において、親DNase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DNaseである。好ましい実施形態において、親DNaseは、配列番号1のポリペプチドである。

【0037】

組換え：用語「組換え」は、その従来の意味で、自然界で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。ゆえに、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、又は自然界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、「遺伝子修飾された」及び「トランスジェニック」と同義である。

10

【0038】

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、パラメータ「配列同一性」によって説明される。

【0039】

本発明の目的のために、2つのアミノ酸配列間の配列同一性は、好ましくはバージョン6.6.0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プログラム中に実装されているNeedleman-Wunschアルゴリズム（Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453）を用いて、「最長の同一性」の出力として求められる。用いたパラメータは、10のギャップオープンペナルティ、0.5のギャップエクステンションペナルティ、そしてEBL0SUM62（BL0SUM62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、no brief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。「最長の同一性」と標識されるNeedleの出力は、下記のように算出される：

20

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

。

【0040】

配列同一性パーセンテージは、本明細書中で、配列番号1、配列番号2、又は配列番号3を参照して言及され得る。先で説明されるように、宿主細胞が、2つ以上の異なる成熟ポリペプチドの混合物を生成し得ること、そして異なる宿主細胞が、ポリペプチドを異なってプロセッシングすることが知られている。配列番号1の成熟ポリペプチドの場合、これは、異なるN末端トランケーションにより、例えば、配列番号2（206アミノ酸残基、配列番号1のアミノ酸16～221に相当）又は配列番号3（204アミノ酸残基、配列番号1のアミノ酸18～221に相当）のポリペプチドとして発現され得ることが見出された。配列番号1、2、及び3は、N末端のトランケーション以外は同一であるので、配列番号1に対する所定の配列同一性パーセントを有するポリペプチドへの本明細書中でのあらゆる言及は、配列番号2又は配列番号3に対する配列同一性パーセントを有するポリペプチドを含むとも理解されるべきである。

30

40

【0041】

シグナルペプチド：「シグナルペプチド」は、タンパク質のN末端部分に付着したアミノ酸の配列であり、これは、細胞の外側へのタンパク質の分泌を促進する。細胞外タンパク質の成熟形態は、シグナルペプチドを欠いており、これは、分泌プロセスの間に切断される。

【0042】

バリエーション：用語「バリエーション」は、DNase活性を有するポリペプチドであって、1箇所以上の位置での置換、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

50

ミノ酸による置換を意味しており；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、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。本発明のバリエーションは、本明細書中で詳細に説明されるように、配列番号1と比較した種々の置換を含む。

【0043】

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用語「天然に存在する」は、自然界で見出されるもの（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、自然界では見出されないもの（例えば、ラボで生成された、又は野生型配列の修飾による組換え核酸及びタンパク質配列）を指す。

【0044】

バイオフィーム：バイオフィームは、細胞が、生地表面、又は皿類表面若しくは他の硬質面等の表面上で互いに付着しているあらゆる微生物群である。この接着細胞は、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り、この浮遊細胞は、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極めて異なる特性を有する。この環境の一利益は、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増大することである。洗濯物において、バイオフィーム産生細菌は、以下の種に見出され得る：アシネトバクター（*Acinetobacter*）属種、アエロミクロビウム（*Aeromicrobium*）属種、ブレブンディモナス（*Brevundimonas*）属種、マイクロバクテリウム（*Microbacterium*）属種、ミクロコッカス・ルテウス（*Micrococcus luteus*）、シュードモナス（*Pseudomonas*）属種、表皮ブドウ球菌（*Staphylococcus epidermidis*）、及びステノトロホモナス（*Stenotrophomonas*）属種。

【0045】

DNAse活性の向上：用語「DNAse活性の向上」は、例えばDNAにおけるホスホジエステル結合の加水分解切断の触媒作用の増大による、変更されたDNAse活性（親DNAseの活性と比較した、例えば配列番号1を有するDNAseと比較した活性の変更を提示するDNAseバリエーション）と本明細書中で定義される。活性の向上は、例えば比活性の向上であり得る。

【0046】

安定性：用語「安定性」は、保存安定性、及び使用中の、例えば洗浄プロセス中の安定性を含み、時間の関数としての本発明に従うDNAseバリエーションの安定性、例えば、溶液中、特に洗剤溶液中でDNAse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、例えばビルダー、界面活性剤の量その他によって影響される。DNAse安定性は、実施例において記載されるように測定され得、且つ、例えば、親DNAse又は参照配列、例えば配列番号1と比較して、融点（ T_m ）又は半減期向上因子（HIF）として表現され得る。用語「安定性の向上」又は「安定性の増大」は、本明細書中で、バリエーション中に置換のない親DNAseの安定性と比較して、且つ／又は配列番号1と比較して、溶液中の安定性の増大を提示するバリエーションDNAseと定義される。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。

【0047】

洗浄性能の向上：用語「洗浄性能の向上」は、DNase親又は配列番号1を有するDNaseと比較した、本発明に従うDNaseバリエーションのディープクリーニング効果（「ディープクリーニング」は、バイオフィーム又はその成分の破壊又は除去を指す）の向上と定義され得る。また、DNaseバリエーションは、悪臭除去を向上させ得る。用語「悪臭」は、クリーンな品目に対して望ましくない臭いを意味する。クリーニングされた品目は、その品目に付着する悪臭がなく、フレッシュ且つクリーンな臭いがするはずである。悪臭の一例として、微生物によって生成され得る不快な臭いを有する化合物がある。別の例として、ヒト又は動物と接触していた品目に付着した汗又は体臭によって引き起こされる不快な臭いがある。悪臭の別の例として、品目に付着する香辛料、例えばカレー、又は強烈な臭いがする他の香辛料由来の臭いがあり得る。悪臭を付着する品目の能力を測定する一方法が、本明細書中で開示されるアッセイIIの使用によるものである。

10

【0048】

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、布切れをフラットに展延して、室温にて一晚空気乾燥させる。洗浄した布切れが全て、洗浄の翌日に評価される。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、布切れの光反射率の評価が実施される。入射光にUVを含むことなく測定が行われ、460nmでの反射率が抽出される。

【0049】

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

【0050】

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、ジェ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、タブ等の単一単位用量（SUD）組成物；繊細な布地用の液体洗剤；手洗い用食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；家庭用及び産業用の種々の錠剤、顆粒、液体、及びリンスエイドタイプが挙げられる食洗機用洗浄剤；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、義歯洗浄剤、自動車又はカーペットシャンプー、浴室クリーナーが挙げられる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」又は前処理タイプ等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。一部の実施形態において、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」）。代替的な実施形態において、この用語は、食器、カトラリー等のクリーニングに用いられるもの等の他の洗剤（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。本発明に従う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

【0051】

布地：用語「布地」は、あらゆる生地材料を包含する。ゆえに、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

【0052】

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。

【0053】

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を含み、以下に限定されないが、手動食器洗浄組成物が挙げられる食器洗浄洗剤組成物等の硬質面クリーニング用組成物、口内洗剤組成物、義歯洗剤組成物、及びパーソナルクレンジング組成物が挙げられる。

10

【0054】

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、当該技術における当業者によって容易に確定され、これは、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等の多くの要因に基づく。DNase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DNaseバリエーションの量を指す。

【0055】

関連洗浄条件：用語「関連洗浄条件」は、本明細書中で、洗剤マーケットセグメントにおいて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のに用いられる。

20

【0056】

洗浄液：用語「洗浄液」（又は「洗浄水」）は、本発明のDNaseバリエーションを含む水溶液を指す。洗浄液は、水、及びDNaseバリエーションを含む洗剤組成物を含有する溶液（例えば洗浄機又は食器洗浄機において見出される）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、本明細書中で他に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。

【0057】

水硬度：本明細書中で用いられる用語「水の硬度」又は「硬度」又は「dH」若しくは「°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。

30

【0058】

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、ジェル、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DNaseバリエーション酵素と適合性である。補助材料に関するより詳細な情報が、以下でさらに提供される。

【0059】

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られる。

40

【0060】

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。

【0061】

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。

50

【0062】

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DNAse中の対応するアミノ酸位置が決定される。別のDNAse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いずれか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、Needleman-Wunsch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。用いたパラメータは、10のギャップオープンペナルティ、0.5のギャップエクステンションペナルティ、そしてEBL0SUM62（EBL0SUM62のEMBOSSバージョン）置換マトリックスである。

10

【0063】

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している。承認されたIUPACの一字又は三文字のアミノ酸略号が採用される。

【0064】

置換。アミノ酸置換の場合、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、それぞれ205位及び411位でのアルギニン（R）によるグリシン（G）、そしてフェニルアラニン（F）によるセリン（S）の置換を表す。これ以外にも、多数の変異が、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」）。

20

【0065】

欠失。アミノ酸欠失の場合、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*」と命名される。多数の欠失が、加算記号（「+」）によって区切られる（例えば、「G195*+S411*」）。

30

【0066】

挿入。アミノ酸挿入の場合、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。多数のアミノ酸の挿入が、[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等]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。

【0067】

そのような場合、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の小文字の追加によって付番される。ゆえに、上記の例では、配列は以下である：

40

【0068】

【表1】

親:	バリエーション:
195	195 195a 195b
G	G - K - A

【0069】

50

多数の変更。多数の変更を含むバリエーションが、先で説明されるように、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位で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、多数の変更は、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。

【0070】

異なる変更。異なる変更が、ある位置にて導入され得る場合、異なる変更は、カンマによって区切られ、例えば、「R170Y, E」は、170位のアルギニンの、チロシン又はグルタミン酸による置換を表す。ゆえに、「Y167G, A+R170G, A」は、以下のバリエーション：「Y167G+R170G」、「Y167G+R170A」、「Y167A+R170G」、及び「Y167A+R170A」を示す。

10

【0071】

本発明は、新規のDNaseバリエーション、特に、コウジカビ（*Aspergillus oryzae*）が挙げられるアスペルギルス（*Aspergillus*）属から得られるDNaseのバリエーションを提供する。本発明のDNaseは、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%の配列同一性を有し、本明細書中に記載される配列番号1内の111、32、35、69、102、105、及び181からなる群から選択される位置にて、少なくとも2つの置換、例えば少なくとも3つの置換を含む。

【0072】

一実施形態において、本発明は、26、32、35、65、67、69、98、102、105、111、115、150、157、159、161、172、181、182、185、187、192、206、208、及び212からなる群から選択される位置にて3つ以上の置換を含むDNaseバリエーションを提供し、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のポリペプチドに対して少なくとも60%且つ100%未満の配列同一性を有し、バリエーションはDNase活性を有する。

20

【0073】

より詳細には、バリエーションは、S26H、D32E、V35I、K65E、K67A、S69E、S69V、S98R、Q102E、K105N、A111P、S115T、Q150E、Q157E、T159Q、G161R、A172E、G181N、S182Y、S182V、K185E、V187N、K192I、A206G、Q208V、及びK212Eからなる群から選択される3つ以上の置換を含み得、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のポリペプチドに対して少なくとも60%且つ100%未満の配列同一性を有し、バリエーションはDNase活性を有する。一態様において、バリエーションは、A111P、D32E、V35I、S69V、Q102E、K105N、及びG181Nからなる群から選択される2つ以上の置換、例えば3つ以上の置換、並びに、場合によっては、先で一覧にした他の置換の1つ以上を含む。

30

【0074】

また、本発明は、組成物、特に、洗剤組成物、例えばDNaseバリエーションを含む洗濯組成物、及びDNaseバリエーションを用いる方法を提供する。さらに提供されるのは、バリエーションをコードする単離DNA配列、発現ベクター、及び宿主細胞、並びにDNaseバリエーションを生成する方法である。

40

【0075】

バリエーション

前記の通り、一実施形態において、本発明のDNaseバリエーションは、26、32、35、65、67、69、98、102、105、111、115、150、157、159、161、172、181、182、185、187、192、206、208、及び212からなる群から選択される位置にて3つ以上の置換、特に、S26H、D32E、

50

V 3 5 I、K 6 5 E、K 6 7 A、S 6 9 E、S 6 9 V、S 9 8 R、Q 1 0 2 E、K 1 0 5 N、A 1 1 1 P、S 1 1 5 T、Q 1 5 0 E、Q 1 5 7 E、T 1 5 9 Q、G 1 6 1 R、A 1 7 2 E、G 1 8 1 N、S 1 8 2 Y、S 1 8 2 V、K 1 8 5 E、V 1 8 7 N、K 1 9 2 I、A 2 0 6 G、Q 2 0 8 V、及びK 2 1 2 Eからなる群から選択される3つ以上の置換を含み、付番は配列番号1に基づく。一部の実施形態において、バリエントは、前記置換のうちの4つ、5つ、又はそれ以上を含み得る。

【0076】

より詳細には、本発明は、一態様において、1 1 1、3 2、3 5、1 0 2、1 0 5、及び1 8 1からなる群から選択される位置にて少なくとも2つの置換、例えば少なくとも3つの置換、特に、A 1 1 1 P、D 3 2 E、V 3 5 I、S 6 9 V、Q 1 0 2 E、K 1 0 5 N、及びG 1 8 1 Nからなる群から選択される少なくとも2つの置換、例えば前記置換のうちの少なくとも3つを含むD N a s eバリエントに関し、位置番号は、配列番号1の付番に基づき、バリエントは、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%且つ100%未満の配列同一性を有し、バリエントはD N a s e活性を有する。

10

【0077】

特定の好ましい実施形態において、バリエントは置換A 1 1 1 Pを含む。好ましくは、この実施形態のバリエントは、置換A 1 1 1 P、並びにS 2 6 H、D 3 2 E、V 3 5 I、K 6 5 E、K 6 7 A、S 6 9 E、S 6 9 V、S 9 8 R、Q 1 0 2 E、K 1 0 5 N、S 1 1 5 T、Q 1 5 0 E、Q 1 5 7 E、T 1 5 9 Q、G 1 6 1 R、A 1 7 2 E、G 1 8 1 N、S 1 8 2 Y、S 1 8 2 V、K 1 8 5 E、V 1 8 7 N、K 1 9 2 I、A 2 0 6 G、Q 2 0 8 V、及びK 2 1 2 Eからなる群から選択される2つ以上の置換を含む。

20

【0078】

置換A 1 1 1 Pを有するそのようなD N a s eバリエントのうち、好ましいバリエントとして、置換D 3 2 E + V 3 5 I及び／又は置換G 1 8 1 Nを含むものが挙げられる。置換A 1 1 1 Pを有するバリエントの他の好ましい実施形態として、置換S 6 9 V及び／又はQ 1 0 2 Eを含むもの、並びに置換K 1 0 5 Nを含むものが挙げられる。

【0079】

他の実施形態において、バリエントは、好ましくは置換A 1 1 1 Pと組み合わせて、置換K 1 0 5 Nを含む。この実施形態のバリエントはさらに、先で一覧にされるもののうちの少なくとも1つの追加の置換、すなわち、S 2 6 H、D 3 2 E、V 3 5 I、K 6 5 E、K 6 7 A、S 6 9 E、S 6 9 V、S 9 8 R、Q 1 0 2 E、S 1 1 5 T、Q 1 5 0 E、Q 1 5 7 E、T 1 5 9 Q、G 1 6 1 R、A 1 7 2 E、G 1 8 1 N、S 1 8 2 Y、S 1 8 2 V、K 1 8 5 E、V 1 8 7 N、K 1 9 2 I、A 2 0 6 G、Q 2 0 8 V、及びK 2 1 2 Eの1つ以上、例えば、前記追加の置換の2つ以上を含み得る。

30

【0080】

さらに他の実施形態において、バリエントは、置換S 6 9 V及び／又はQ 1 0 2 E、好ましくはS 6 9 V + Q 1 0 2 Eを含む。この実施形態のバリエントはさらに、先で一覧にされるもののうちの少なくとも1つの追加の置換、すなわち、S 2 6 H、D 3 2 E、V 3 5 I、K 6 5 E、K 6 7 A、S 9 8 R、K 1 0 5 N、A 1 1 1 P、S 1 1 5 T、Q 1 5 0 E、Q 1 5 7 E、T 1 5 9 Q、G 1 6 1 R、A 1 7 2 E、G 1 8 1 N、S 1 8 2 Y、S 1 8 2 V、K 1 8 5 E、V 1 8 7 N、K 1 9 2 I、A 2 0 6 G、Q 2 0 8 V、及びK 2 1 2 Eの1つ以上、例えば前記追加の置換の2つ以上を含み得る。

40

【0081】

好ましい一実施形態において、バリエントは置換D 3 2 E + V 3 5 I + A 1 1 1 Pを含む。この実施形態のバリエントはさらに、先で一覧にされるもののうちの少なくとも1つの追加の置換、すなわち、S 2 6 H、K 6 5 E、K 6 7 A、S 6 9 E、S 6 9 V、S 9 8 R、Q 1 0 2 E、K 1 0 5 N、S 1 1 5 T、Q 1 5 0 E、Q 1 5 7 E、T 1 5 9 Q、G 1 6 1 R、A 1 7 2 E、G 1 8 1 N、S 1 8 2 Y、S 1 8 2 V、K 1 8 5 E、V 1 8 7 N、K 1 9 2 I、A 2 0 6 G、Q 2 0 8 V、及びK 2 1 2 Eの1つ以上、例えば前記追加の置

50

換の2つ以上を含み得る。

【0082】

別の好ましい実施形態において、バリエントは置換A111P+G181Nを含む。この実施形態のバリエントはさらに、先で一覧にされるもののうちの少なくとも1つの追加の置換、すなわち、S26H、D32E、V35I、K65E、K67A、S69E、S69V、S98R、Q102E、K105N、S115T、Q150E、Q157E、T159Q、G161R、A172E、S182Y、S182V、K185E、V187N、K192I、A206G、Q208V、及びK212Eの1つ以上、例えば前記追加の置換の2つ以上を含み得る。

【0083】

さらに好ましい実施形態において、バリエントは置換D32E+V35I+A111P+G181Nを含む。この実施形態のバリエントはさらに、先で一覧にされるもののうちの少なくとも1つの追加の置換、すなわち、S26H、K65E、K67A、S69E、S69V、S98R、Q102E、K105N、S115T、Q150E、Q157E、T159Q、G161R、A172E、S182Y、S182V、K185E、V187N、K192I、A206G、Q208V、及びK212Eの1つ以上を含み得る。

【0084】

別の実施形態において、バリエントは、置換D32E+V35I+Q102E+A111P+G181N、並びに、場合によっては、S26H、K65E、K67A、S69E、S69V、S98R、K105N、S115T、Q150E、Q157E、T159Q、G161R、A172E、S182Y、S182V、K185E、V187N、K192I、A206G、Q208V、及びK212Eからなる群から選択される1つ以上の追加の置換を含む。

【0085】

別の実施形態において、バリエントは、置換D32E+V35I+K105N+A111P+G181N、並びに、場合によっては、S26H、K65E、K67A、S69E、S69V、S98R、Q102E、S115T、Q150E、Q157E、T159Q、G161R、A172E、S182Y、S182V、K185E、V187N、K192I、A206G、Q208V、及びK212Eからなる群から選択される1つ以上の追加の置換を含む。

【0086】

別の実施形態において、バリエントは、置換D32E+V35I+S69V+Q102E+A111P、並びに、場合によっては、S26H、K65E、K67A、S98R、K105N、S115T、Q150E、Q157E、T159Q、G161R、A172E、G181N、S182Y、S182V、K185E、V187N、K192I、A206G、Q208V、及びK212Eからなる群から選択される1つ以上の追加の置換を含む。

【0087】

別の実施形態において、バリエントは、置換D32E+V35I+S69V+Q102E+A111P+G181N、並びに、場合によっては、S26H、K65E、K67A、S98R、K105N、S115T、Q150E、Q157E、T159Q、G161R、A172E、S182Y、S182V、K185E、V187N、K192I、A206G、Q208V、及びK212Eからなる群から選択される1つ以上の追加の置換を含む。

【0088】

別の実施形態において、バリエントは、置換S69V+Q102E+A111P、並びに、場合によっては、S26H、D32E、V35I、K65E、K67A、S98R、K105N、S115T、Q150E、Q157E、T159Q、G161R、A172E、G181N、S182Y、S182V、K185E、V187N、K192I、A206G、Q208V、及びK212Eからなる群から選択される1つ以上の追加の置換を

10

20

30

40

50

含む。

【0089】

別の実施形態において、バリエントは、置換 $S69V + Q102E + G181N$ 、並びに、場合によっては、 $S26H$ 、 $D32E$ 、 $V35I$ 、 $K65E$ 、 $K67A$ 、 $S98R$ 、 $K105N$ 、 $A111P$ 、 $S115T$ 、 $Q150E$ 、 $Q157E$ 、 $T159Q$ 、 $G161R$ 、 $A172E$ 、 $S182Y$ 、 $S182V$ 、 $K185E$ 、 $V187N$ 、 $K192I$ 、 $A206G$ 、 $Q208V$ 、及び $K212E$ からなる群から選択される1つ以上の追加の置換を含む。

【0090】

別の実施形態において、バリエントは、置換 $S69V + Q102E + A111P + G181N$ 、並びに、場合によっては、 $S26H$ 、 $D32E$ 、 $V35I$ 、 $K65E$ 、 $K67A$ 、 $S98R$ 、 $K105N$ 、 $S115T$ 、 $Q150E$ 、 $Q157E$ 、 $T159Q$ 、 $G161R$ 、 $A172E$ 、 $S182Y$ 、 $S182V$ 、 $K185E$ 、 $V187N$ 、 $K192I$ 、 $A206G$ 、 $Q208V$ 、及び $K212E$ からなる群から選択される1つ以上の追加の置換を含む。

10

【0091】

別の実施形態において、バリエントは、置換 $Q102E + K105N + A111P + G181N$ 、並びに、場合によっては、 $S26H$ 、 $D32E$ 、 $V35I$ 、 $K65E$ 、 $K67A$ 、 $S69E$ 、 $S69V$ 、 $S98R$ 、 $S115T$ 、 $Q150E$ 、 $Q157E$ 、 $T159Q$ 、 $G161R$ 、 $A172E$ 、 $S182Y$ 、 $S182V$ 、 $K185E$ 、 $V187N$ 、 $K192I$ 、 $A206G$ 、 $Q208V$ 、及び $K212E$ からなる群から選択される1つ以上の追加の置換を含む。

20

【0092】

別の実施形態において、バリエントは、置換 $S69V + Q102E + K105N + A111P + G181N$ 、並びに、場合によっては、 $S26H$ 、 $D32E$ 、 $V35I$ 、 $K65E$ 、 $K67A$ 、 $S98R$ 、 $S115T$ 、 $Q150E$ 、 $Q157E$ 、 $T159Q$ 、 $G161R$ 、 $A172E$ 、 $S182Y$ 、 $S182V$ 、 $K185E$ 、 $V187N$ 、 $K192I$ 、 $A206G$ 、 $Q208V$ 、及び $K212E$ からなる群から選択される1つ以上の追加の置換を含む。

【0093】

別の実施形態において、バリエントは、置換 $D32E + V35I + K105N + A111P$ 、並びに、場合によっては、 $S26H$ 、 $K65E$ 、 $K67A$ 、 $S69E$ 、 $S69V$ 、 $S98R$ 、 $Q102E$ 、 $S115T$ 、 $Q150E$ 、 $Q157E$ 、 $T159Q$ 、 $G161R$ 、 $A172E$ 、 $G181N$ 、 $S182Y$ 、 $S182V$ 、 $K185E$ 、 $V187N$ 、 $K192I$ 、 $A206G$ 、 $Q208V$ 、及び $K212E$ からなる群から選択される1つ以上の追加の置換を含む。

30

【0094】

本発明の好ましい $DNaSe$ バリエントの例として、以下の置換セットの1つ、及び、場合によっては、本明細書中で開示される1つ以上の追加の置換を含むものが挙げられる：

40

- $D32E + V35I + A111P$
- $D32E + V35I + A111P + G181N$
- $D32E + V35I + Q102E + A111P + G181N$
- $D32E + V35I + K105N + A111P + G181N$
- $D32E + V35I + S69V + Q102E + A111P$
- $D32E + V35I + S69V + Q102E + A111P + G181N$
- $S69V + Q102E + A111P$
- $S69V + Q102E + G181N$
- $S69V + Q102E + A111P + G181N$
- $Q102E + K105N + A111P + G181N$

50

- S 6 9 V + Q 1 0 2 E + K 1 0 5 N + A 1 1 1 P + G 1 8 1 N
 - D 3 2 E + V 3 5 I + K 1 0 5 N + A 1 1 1 P
- 【 0 0 9 5 】

バリエーションは、例えば、これらの置換セットの1つを有する配列番号1、配列番号2、又は配列番号3を含み得るか、又はそれらからなり得る。

【 0 0 9 6 】

本明細書中の先で、又は他で開示される実施形態のいずれにおいても、D N a s e バリエーションはさらに、1つ以上の追加の変更、例えば先で開示されるもの以外の1つ以上の追加の置換を含み得る。そのような追加の置換の非限定的な例として、K 1 8 S、T 1 9 P、D 3 2 P、K 8 6 E、A 1 0 1 E、A 1 0 1 T、K 1 0 5 D、K 1 0 5 E、K 1 0 5 T、G 1 3 7 R、N 1 4 6 H、K 1 4 7 N、K 1 5 5 E、A 1 7 2 D、K 1 7 8 S、K 1 9 2 A、N 2 1 4 D、及びN 2 1 7 Aのいずれか1つ以上を含む。

10

【 0 0 9 7 】

本発明の特定のD N a s e バリエーションの例として、以下からなる群から選択される置換のセットを含むバリエーションが挙げられる：

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

20

30

40

50

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

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

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

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

10

20

30

【0098】
 バリエーションは、例えば、これらの置換セットの1つを有する配列番号1、配列番号2、
 又は配列番号3を含み得るか、又はそれらからなり得る。

【0099】
 好ましい実施形態において、本発明のDNaseバリエーションは、置換D32E + V35
 I + A111Pを有する配列番号1、配列番号2、又は配列番号3を含むか、又はそれか
 らなる。

【0100】
 別の好ましい実施形態において、本発明のDNaseバリエーションは、置換D32E + V
 35I + K105N + A111P + G181N + S182Yを有する配列番号1、配列番
 号2、又は配列番号3を含むか、又はそれからなる。

40

【0101】
 別の好ましい実施形態において、本発明のDNaseバリエーションは、置換S26H + S
 69V + Q102E + A111P + Q157E + T159Q + A172Eを有する配列番
 号1、配列番号2、又は配列番号3を含むか、又はそれからなる。

【0102】
 別の好ましい実施形態において、本発明のDNaseバリエーションは、置換S69V + Q
 102E + K105N + A111P + S115T + Q150E + G161R + G181N
 + V187N + K192Iを有する配列番号1、配列番号2、又は配列番号3を含むか、
 又はそれからなる。

【0103】

50

別の好ましい実施形態において、本発明の D N a s e バリエントは、置換 D 3 2 E + V 3 5 I + K 6 7 A + A 1 1 1 P + G 1 8 1 N + A 2 0 6 G + Q 2 0 8 V を有する配列番号 1、配列番号 2、又は配列番号 3 を含むか、又はそれからなる。

【0104】

別の好ましい実施形態において、本発明の D N a s e バリエントは、置換 D 3 2 E + V 3 5 I + A 1 1 1 P + G 1 8 1 N + S 1 8 2 V + K 1 8 5 E を有する配列番号 1、配列番号 2、又は配列番号 3 を含むか、又はそれからなる。

【0105】

別の好ましい実施形態において、本発明の D N a s e バリエントは、置換 S 6 9 V + Q 1 0 2 E + K 1 0 5 N + A 1 1 1 P + S 1 1 5 T + G 1 6 1 R + G 1 8 1 N + V 1 8 7 N + K 1 9 2 I を有する配列番号 1、配列番号 2、又は配列番号 3 を含むか、又はそれからなる。

10

【0106】

別の好ましい実施形態において、本発明の D N a s e バリエントは、置換 D 3 2 E + V 3 5 I + S 6 9 E + S 9 8 R + K 1 0 5 N + A 1 1 1 P + G 1 8 1 N + S 1 8 2 Y を有する配列番号 1、配列番号 2、又は配列番号 3 を含むか、又はそれからなる。

【0107】

別の好ましい実施形態において、本発明の D N a s e バリエントは、置換 D 3 2 E + V 3 5 I + K 6 5 E + K 1 0 5 N + A 1 1 1 P + G 1 8 1 N + S 1 8 2 Y + K 2 1 2 E を有する配列番号 1、配列番号 2、又は配列番号 3 を含むか、又はそれからなる。

20

【0108】

別の好ましい実施形態において、本発明の D N a s e バリエントは、置換 D 3 2 E + V 3 5 I + K 6 5 E + K 6 7 A + K 1 0 5 N + A 1 1 1 P + G 1 8 1 N + S 1 8 2 Y を有する配列番号 1、配列番号 2、又は配列番号 3 を含むか、又はそれからなる。

【0109】

本明細書中で開示される D N a s e バリエントは、バリエント内に置換のない親 D N a s e に対して少なくとも 60% の配列同一性を有する。D N a s e バリエントは、例えば、親 D N a s e 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。D N a s e バリエントは、例えば、親 D N a s e 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%、且つ 100% 未満の配列同一性を有し得る。

30

【0110】

特に、本明細書中で開示される D N a s e 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。D N a s e 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。D N a s e 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%、且つ 100% 未満の配列同一性を有し得る。

40

【0111】

一態様において、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変更の数は、1～20 個、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は 10 個の変更改等の 1～10 個である。

【0112】

本発明のバリエントは、場合によっては、マイナーな性質のもの、例えば、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等の小さなアミノ若

50

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。

【0113】

保存的置換の例が、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によって記載されている。一般的な置換として、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

【0114】

これ以外にも、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、アミノ酸変化は、ポリペプチドの熱安定性を向上させる場合がある、基質特異性を変更する場合がある、最適なpHを変える場合がある等々である。

20

【0115】

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）等の当該技術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、DNase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。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、又は光親和性標識等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.* 309:59-64参照。また、必須アミノ酸の特定を、関連するポリペプチドとのアラインメントから推定することができ、且つ／或いは関連するポリペプチドとの配列相同性、又は、典型的には類似の三次元構造、機能、及びかなりの配列類似性を有する、共通の祖先から派生するポリペプチド／タンパク質を有するポリペプチドファミリー若しくはタンパク質ファミリー内の保存された触媒機構から推定することができる。加えて、又はこれ以外にも、必須アミノ酸、及び／又はポリペプチドの活性部位を特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を用いることができる。例えば、Jumper et al., 2021, “Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold”, *Nature* 596:583-589を参照。

30

40

【0116】

本発明のバリエーションは、例えば、195～230個のアミノ酸、好ましくは200～225個のアミノ酸、例えば204～221個のアミノ酸からなり得る。バリエーションは、場合によっては、N末端及び／若しくはC末端での1つ以上のアミノ酸の伸長、又はN末端及び／若しくはC末端での1つ以上のアミノ酸のランケーションを含み得る。例えば、バリエーションは、いくつかのN末端アミノ酸が、配列番号1と比較して不在である断片を含

50

み得、例えば配列番号 2 又は配列番号 3 のバリエーションがある。

【0117】

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、安定性が向上する、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する。上記のように、安定性の向上は、例えば、本明細書中の例に記載されるように、融点（ T_m ）又は半減期向上因子（HIF）によって表され得る。

【0118】

一実施形態において、DNase バリエーションは、親 DNase と比較して、熱安定性として表される安定性が向上する。好ましくは、バリエーションは、例えば本明細書中の例に記載されるように判定される融点（ T_m ）が、親のものよりも少なくとも 1°C 高い、例えば、親の T_m よりも少なくとも 2°C 、少なくとも 3°C 、又は少なくとも 4°C 高い。好ましい実施形態において、バリエーションは、融点が親の T_m よりも少なくとも 5°C 、少なくとも 6°C 、少なくとも 7°C 、少なくとも 8°C 、少なくとも 9°C 、又は少なくとも 10°C 高くなり得る。

10

【0119】

一実施形態において、DNase バリエーションは、半減期向上因子（HIF）として表される安定性が、親 DNase と比較して向上している、すなわち HIF 値が 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例に記載されるように判定される、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。

20

【0120】

本発明の DNase バリエーションは、当該技術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。

【0121】

バリエーションの生成

また、本発明は、本明細書中で開示される置換を有する DNase 活性を有するバリエーションを得る方法に関する。一実施形態において、当該方法は、（a）親 DNase 中に、111、32、35、69、102、105、及び 181 からなる群から選択される位置にて、少なくとも 2 つの置換、例えば少なくとも 3 つの置換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%、且つ 100% 未満の配列同一性を有し、バリエーションは DNase 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。

30

【0122】

別の実施形態において、当該方法は、（a）親 DNase 中に、26、32、35、65、67、69、98、102、105、111、115、150、157、159、161、172、181、182、185、187、192、206、208、及び 212 からなる群から選択される位置にて 3 つ以上の置換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%、且つ 100% 未満の配列同一性を有し、バリエーションは DNase 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。

40

【0123】

別の実施形態において、当該方法は、（a）親 DNase 中に、S26H、D32E、V35I、K65E、K67A、S69E、S69V、S98R、Q102E、K105

50

N、A 1 1 1 P、S 1 1 5 T、Q 1 5 0 E、Q 1 5 7 E、T 1 5 9 Q、G 1 6 1 R、A 1 7 2 E、G 1 8 1 N、S 1 8 2 Y、S 1 8 2 V、K 1 8 5 E、V 1 8 7 N、K 1 9 2 I、A 2 0 6 G、Q 2 0 8 V、及びK 2 1 2 Eからなる群から選択される3つ以上の置換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、バリエントは、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%、且つ100%未満の配列同一性を有し、バリエントはDNase活性を有する、導入することと；(b)バリエントを回収することを含む。

【0124】

別の実施形態において、当該方法は、(a)親DNase中に、A 1 1 1 P、D 3 2 E、V 3 5 I、S 6 9 V、Q 1 0 2 E、K 1 0 5 N、及びG 1 8 1 Nからなる群から選択される少なくとも2つの置換、例えば少なくとも3つの置換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、バリエントは、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%、且つ100%未満の配列同一性を有し、バリエントはDNase活性を有する、導入することと；(b)バリエントを回収することを含む。

【0125】

他の実施形態において、当該方法は、(a)親DNase中に見出し「バリエント」下で先に一覧にされる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、バリエントは、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%、且つ100%未満の配列同一性を有し、バリエントはDNase活性を有する、導入することと；(b)バリエントを回収することを含む。

【0126】

バリエントは、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シャッフリング等の、当該技術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。

【0127】

ポリヌクレオチド

また、本発明は、本発明のバリエントをコードするポリヌクレオチドに関する。

【0128】

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。

【0129】

一態様において、ポリヌクレオチドは単離、好ましくは精製されている。

【0130】

核酸構築物

また、本発明は、本発明のバリエント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構築物に関する。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において周知である。

【0131】

ポリヌクレオチドは、バリエント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

10

20

30

40

50

法は、当該技術において周知である。

【0132】

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構築物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。

10

【0133】

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、当該技術において周知である。

20

【0134】

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。

【0135】

ポリヌクレオチドを含む構築物又はベクターが宿主細胞中に導入されることで、構築物又はベクターは、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。

30

【0136】

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。

【0137】

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 (*Bacillus*) 属、クロストリジウム (*Clostridium*) 属、エンテロコッカス (*Enterococcus*) 属、ゲオバチルス (*Geobacillus*) 属、ラクトバチルス (*Lactobacillus*) 属、ラクトコッカス (*Lactococcus*) 属、オセアノバチルス (*Oceanobacillus*) 属、スタフィロコッカス (*Staphylococcus*) 属、ストレプトコッカス (*Streptococcus*) 属、及びストレプトマイセス (*Streptomyces*) 属が挙げられるが、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 (*Campylobacter*) 属、大腸菌 (*E. coli*)、フラボバクテリウム (*Flavobacterium*) 属、フソバクテリウム (*Fusobacterium*) 属、ヘリコバクター (*Helicobacter*) 属、イリオバクター (*Ilyobacter*) 属、ナイセリア (*Neisseria*) 属、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属、サルモネラ (*Salmonella*) 属、及びウレアプラズマ (*Ureaplasma*) 属が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0138】

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*

50

us alkalophilus)、バチルス・アミロリクエファシエンズ (*Bacillus amyloliquefaciens*)、バチルス・ブレビス (*Bacillus brevis*)、バチルス・サークルス (*Bacillus circulans*)、バチルス・クラウジイ (*Bacillus clausii*)、バチルス・コアグランス (*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*)、枯草菌 (*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。

【0139】

真菌宿主細胞は、酵母細胞又は糸状真菌細胞であり得る。

【0140】

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

【0141】

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。

【0142】

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と；場合によっては (b) バリエントを回収することを含む方法に関する。

【0143】

宿主細胞は、当該技術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）。バリエーションが栄養培地中に分泌されるならば、バリエーションは、培地から直接的に回収され得る。バリエーションが分泌されなければ、細胞可溶化物から回収され得る。

【0144】

バリエーションは、バリエーションに特有である、当該技術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、又はバリエーション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。

10

【0145】

バリエーションは、当該技術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。

【0146】

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: 3-10参照）。

20

【0147】

代替の態様において、バリエーションは回収されない。

【0148】

組成物

本発明はさらに、本発明に従う少なくとも1つのDNase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、品目のディープクリーニングが挙げられるがこれに限定されないディープクリーニング効果を向上させるために、品目の粘着性を妨げ、且つ／又は引き下げるために、品目についての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妨げ、且つ／又は引き下げるために、品目への汚れの付着を妨げ、且つ／又は引き下げるために、品目の白さを維持するか、又は向上させるために、そして品目からの悪臭を妨げ、且つ／又は引き下げるために用いられ得る。本発明のDNaseバリエーションは、粉末及び液体のクリーニング組成物中で、そして例えば単一ユニット用量組成物中で有用である。

30

【0149】

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、キャリア、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。

40

【0150】

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こととなる。

【0151】

クリーニング補助成分は、DNase以外の1つ以上の酵素であってもよい。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、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、キサンターゼ、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が、以下に記載され

50

る。

【0152】

クリーニング組成物は、適切なあらゆる形態、例えば、バー、均質錠剤、2つ以上の層を有する錠剤、1つ以上の区画を有するパウチ、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、若しくは濃縮した溶液に製剤化され得る。ゆえに、クリーニング組成物は、例えば、液体洗剤、又は、場合によっては「濃縮した」か、若しくは「圧縮した」形態の、粉末若しくは顆粒状の洗剤であり得る。また、単一ユニット用量組成物の形態であってもよい。

【0153】

クリーニング組成物中のDNase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DNase濃度等の要因に応じて変わり得る。DNase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の量で含まれることとなる。DNase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のレベルにて含まれ得る。この文脈における単位「ppm」は、液体組成物（例えば、液体、ジェルその他）に加えられる酵素についてmg/l、又は固体組成物（例えば、粉末、粒状体、錠剤その他）に加えられる酵素についてmg/kgを指すことが意図される。

【0154】

一部の態様において、洗剤組成物は、例えば、高い温度且つ／又はpH、例えば40℃以上且つ／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。一部の態様において、洗剤組成物は、例えば、低い温度且つ／又はpH、例えば20℃以下且つ／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、場合によっては最低限の水により、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。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。

【0155】

界面活性剤

界面活性剤は、先に記載されるノニオン性、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が用いられるが、両性界面活性剤が用いられてもよい。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）等のアルキル硫酸塩（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。

【 0 1 5 6 】

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）アンモニウム塩等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（A E又はA E O）、アルコールプロポキシレート、プロポキシ化脂肪族アルコール（P F A）、エトキシ化及び／又はプロポキシ化脂肪酸アルキルエステル等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（A P E）、ノニルフェノールエトキシレート（N P E）、アルキルポリグリコシド（A P G）、アルコキシ化アミン、脂肪酸モノエタノールアミド（F A M）、脂肪酸ジエタノールアミド（F A D A）、エトキシ化脂肪酸モノエタノールアミド（E F A M）、プロポキシ化脂肪酸モノエタノールアミド（P F A M）、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、G A又は脂肪酸グルカミド、F A G A）、並びに商品名S P A N及びT W E E N（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、B A S F社製P l u r a f a c（商標）、L u t e n s o l（商標）、及びP l u r o n i c（登録商標）、C o g n i s社製D e h y p o n（商標）シリーズ、並びにC l a r i a n t社製G e n a p o l（商標）シリーズが挙げられる。

10

【 0 1 5 7 】

20

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、B R I T E S I L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、C a及びM g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（S T P又はS T P P）等の三リン酸塩、炭酸ナトリウム等の炭酸塩、メタケイ酸ナトリウム等の可溶性ケイ酸塩、積層ケイ酸塩（例えば、H o e c h s tのS K S－6）、及び（カルボキシメチル）イヌリン（C M I）、及びそれらの組合せが挙げられる。ビルダーの更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

30

40

50

、*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*DTMPA*又は*DTMP*）、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）（*PA*）又はコポリ（アクリル酸／マレイン酸）（*PA／PMA*）又はポリアスパラギン酸が挙げられる。更なる例示的なビルダー及び／又はコビルダーが、例えば、国際公開第09／102854号パンフレット、米国特許第5977053号明細書に記載されている。一部の態様において、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／又はそれらの塩等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

20

【0158】

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%等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。

【0159】

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）等のアルカリ金属塩が挙げられる。

30

【0160】

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で形成され得る。

【0161】

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、ジペルオキシブラシル酸、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

40

50

して最良に添加され得るものと理解される。

【0162】

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 (T A E D)、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 (I S O N O B S)、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 (L O B S)、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 (D O B A)、4-(ノナノイルオキシ) ベンゼン-1-スルホン酸ナトリウム (N O B S)、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、E P 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 (A T C) が特に好ましい。A T C 又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、A T C 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。

10

【0163】

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 (M n T A C N) 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 (M e 3-T A C N) 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 (M e 4-T A C N)、特に M e 3-T A C N とのマンガンの錯体、例えば、二核マンガン錯体 [(M e 3-T A C N) M n (O) 3 M n (M e 3-T A C N)] (P F 6) 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-κ N-メタニリリデン) トリフェノラト-κ 3 O] マンガン (I I I) 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。

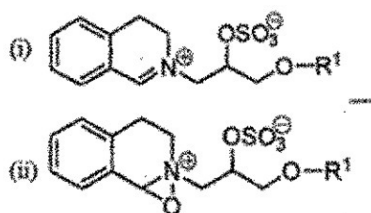
20

【0164】

過酸の供給源が含まれる一部の態様において、以下の式のもの：

30

【化 1】



(i i i) 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。

40

【0165】

他の例示的な漂白系が、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

50

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。

【0166】

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。

【0167】

ヒドロトロップ

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（SXS）、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。

【0168】

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）（PVPNO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。更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。

【0169】

布地色調剤

また、本発明の洗剤組成物は、染料又は顔料等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

10

20

30

40

50

。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。

10

【0170】

酵素

洗剤組成物は、タンパク分解酵素、リパーゼ、クチナーゼ、アミラーゼ、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、キシラナーゼ、ヘキソサミニダーゼ、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等の1種以上の追加の酵素を含んでもよい。

20

【0171】

一般に、選択された酵素の性質は、選択された洗剤と適合性であるべきであり（すなわち、最適なpH、他の酵素成分及び非酵素成分との適合性等）、そして酵素は、有効量で存在すべきである。

【0172】

セルラーゼ

適切なセルラーゼとして、細菌起源又は真菌起源のものが挙げられる。化学的に修飾された変異体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、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、バチルス（*Bacillus*）属、シュドモナス（*Pseudomonas*）属、フミコラ（*Humicola*）属、フザリウム（*Fusarium*）属、チエラビア（*Thielavia*）属、アクレモニウム（*Acremonium*）属由来のセルラーゼ、例えば、フミコラ・インソレンス（*Humicola insolens*）、ミセリオフトラ・テルモフィラ（*Myceliophthora thermophila*）、及びフザリウム・オキシスポルム（*Fusarium oxysporum*）から産生される真菌セルラーゼが挙げられる。

30

【0173】

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等のセルラーゼバリエーションがある。

40

【0174】

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

50

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。

【0175】

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)、Clazinase (商標) 及び Puradax HA (商標) (Genencor International Inc.)、並びに KAC-500 (B) (商標) (花王株式会社) が挙げられる。

10

【0176】

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等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、トリプシン等のS1ファミリ、又はスブチリシン等のS8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M4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、M5、M7、若しくはM35ファミリ由来のものであってもよい。

20

【0177】

用語「スブチラーゼ」は、Siezen et al., Protein Eng. 4 (1991) 719-737及びSiezen et al., Protein Sci. 6 (1997) 501-523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、ケキシシンファミリ、及びピロリシンファミリに分割され得る。

30

【0178】

洗剤使用に適したプロテアーゼは、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属等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 (*Bacillus*) 属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 (*Bacillus*) 属種の例として、バチルス・レンタス (*Bacillus lentus*)、バチルス・アルカロフィラス (*Bacillus alkalophilus*)、枯草菌 (*Bacillus subtilis*)、バチルス・アミロリクエファシエンス (*Bacillus amyloliquefaciens*)、バチルス・リケニフォルミス (*Bacillus licheniformis*) バチルス・プミルス (*Bacillus pumilus*)、及びバチルス・ギブソニ (*Bacillus gibsonii*) が挙げられる。特定のスブチリシンとして、スブチリシンレンタス、スブチリシンノボ、スブチリシンカールスバーグ、スブチリシンBPN'、スブチリシン309、スブチリシン147、及びスブチリシン168、並びに例えばプロテアーゼPD138 (国際公開第93/18140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01/16285号パンフレット及び国際公開第02/16547号パンフレットに記載されるものがある。

40

【0179】

トリプシン様プロテアーゼの例として、国際公開第94/25583号パンフレット及び国際公開第2005/040372号パンフレットに記載されるフザリウム (*Fusa*

50

rium) 属プロテアーゼ、並びに国際公開第2005/052161号パンフレット及び国際公開第2005/052146号パンフレットに記載される、セルロモナス (Cellulomonas) 属に由来するキモトリプシンプロテアーゼが挙げられる。

【0180】

メタロプロテアーゼの例として、国際公開第2007/044993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 (Bacillus amyloliquefaciens) に由来するもの、並びに、例えば、国際公開第2015/158723号パンフレット及び国際公開第2016/075078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。

【0181】

有用なプロテアーゼの例として、国際公開第89/06279号パンフレット、国際公開第92/19729号パンフレット、国際公開第96/34946号パンフレット、国際公開第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。

【0182】

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。

【0183】

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。

10

【0184】

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}（商標）、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）及びその変異体（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。

20

30

40

【0185】

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（*Thermomyces*）属由来、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（*Humicola*）属、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（*Pseudomonas*）属（これらの一部は、

50

現在、バークホルデリア (*Burkholderia*) 属と改名されている)、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 SD 705* (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 (*Streptomyces*) 属リパーゼ (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 fusca*) 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)、枯草菌 (*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。

10

20

【0186】

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等のリパーゼバリエーションがある。

30

【0187】

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。

【0188】

更に他の例として、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・アンタラクティカ (*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。

40

【0189】

アミラーゼ

本発明の *DNase* 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

50

はグルコアミラーゼであり得、細菌起源又は真菌起源のものであってもよい。化学修飾された変異体、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 (*Bacillus*) 属、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。

【0190】

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、154、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。

【0191】

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。

【0192】

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。

【0193】

適切な更なるアミラーゼは、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。

【0194】

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として、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 位において欠失を有するものがある。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として、183 位及び 184 位における欠失、並びに 140 位、195 位、206 位、243 位、260 位、304 位、及び 476 位の 1 つ以上における置換を有するものがある。

10

【0195】

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。

20

【0196】

更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：

30

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

40

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、場合によってはさらに、243 位の置換並びに／又は 180 位及び／若しくは 181 位の欠失を含む。

【0197】

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

50

； R 3 2 0、H 3 2 4、E 3 4 5、Y 3 9 6、R 4 0 0、W 4 3 9、R 4 4 4、N 4 4 5、K 4 4 6、Q 4 4 9、R 4 5 8、N 4 7 1、N 4 8 4 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、D 1 8 3 及び G 1 8 4 の欠失を有し、且つ置換 R 1 1 8 K、N 1 9 5 F、R 3 2 0 K、及び R 4 5 8 K を有するバリエーション、並びに群：M 9、G 1 4 9、G 1 8 2、G 1 8 6、M 2 0 2、T 2 5 7、Y 2 9 5、N 2 9 9、M 3 2 3、E 3 4 5、及び A 3 3 9 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。

【0198】

他の例として、国際公開第 2 0 1 1 / 0 9 8 5 3 1 号パンフレット、国際公開第 2 0 1 3 / 0 0 1 0 7 8 号パンフレット、及び国際公開第 2 0 1 3 / 0 0 1 0 8 7 号パンフレットに記載されるもの等のアミラーゼバリエーションがある。

10

【0199】

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 S 1 0 0 (Genencor International Inc. / DuPont 製) が挙げられる。

20

【0200】

ヘキソサミニダーゼ

また、本発明の DNase を含む洗剤組成物は、1 つ以上のヘキソサミニダーゼを含んでもよい。用語「ヘキソサミニダーゼ」は、「ジスベルシン」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 EC 3. 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。

【0201】

ヘキソサミニダーゼ活性を有するポリペプチドは、あらゆる属の微生物から、特に細菌又は菌類から得ることができる。好ましくは、ヘキソサミニダーゼ、例えばディスパーシンは、テルリバチルス (Terribacillus) 属、クルトバクテリウム (Curtobacterium) 属、アグリゲイティバクター (Aggregatibacter) 属、ヘモフィラス (Haemophilus) 属、又はアクチノバチルス (Actinobacillus) 属、好ましくは Terribacillus) 属から得られる。また、ヘキソサミニダーゼは、これら又は他の生物のいずれからでも得られるポリペプチドのバリエーションであり得る。

30

【0202】

適切なヘキソサミニダーゼとして、国際公開第 2 0 1 7 1 8 6 9 3 6 号パンフレット、国際公開第 2 0 1 7 1 8 6 9 3 7 号パンフレット、国際公開第 2 0 1 7 1 8 6 9 4 3 号パンフレット、国際公開第 2 0 1 7 2 0 7 7 7 0 号パンフレット、国際公開第 2 0 1 8 1 8 4 8 7 3 号パンフレット、国際公開第 2 0 1 9 0 8 6 5 2 0 号パンフレット、国際公開第 2 0 1 9 0 8 6 5 2 8 号パンフレット、国際公開第 2 0 1 9 0 8 6 5 3 0 号パンフレット、国際公開第 2 0 1 9 0 8 6 5 3 2 号パンフレット、国際公開第 2 0 1 9 0 8 6 5 2 1 号パンフレット、国際公開第 2 0 1 9 0 8 6 5 2 6 号パンフレット、国際公開第 2 0 2 0 0 0 2 6 0 4 号パンフレット、国際公開第 2 0 2 0 0 0 2 6 0 8 号パンフレット、国際公開第 2 0 2 0 0 0 7 8 6 3 号パンフレット、国際公開第 2 0 2 0 0 0 7 8 7 5 号パンフレット、国際公開第 2 0 2 0 0 0 8 0 2 4 号パンフレット、国際公開第 2 0 2 0 0 7 0 0 6 3 号パンフレット、国際公開第 2 0 2 0 0 7 0 2 4 9 号パンフレット、国際公開第 2 0 2 0

40

50

【 0 2 0 3 】

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。化学修飾又は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、ヒトヨタケ (*Coprinosia*) 属、例えばウシグソヒトヨタケ (*C. cinerea*) 由来のペルオキシダーゼ (EP 179, 486 号明細書)、並びにその、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るもの等のバリエーションが挙げられる。また、ペルオキシダーゼとして、クロロペルオキシダーゼ、ブロモペルオキシダーゼ等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ブ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 (EC 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される。ハロペルオキシダーゼは、多種の真菌、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 (*Caldariomyces*) 属、例えば *C. fumago*、アルテルナリア (*Alternaria*) 属、クルブラリア (*Curvularia*) 属、例えば、*C. verruculosa* 及び *C. inaequalis*、ドレクスレラ (*Drechslera*) 属、ウロクラジウム (*Urocladium*) 属、及びボトリチス (*Botrytis*) 属から単離されている。また、ハロペルオキシダーゼは、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属、例えば *P. pyrrocinia*、及びストレプトマイセス (*Streptomyces*) 属、例えば *S. aureofaciens* 等の細菌から単離されている。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 (*Curvularia*) 属種、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. 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. verruculosa* CBS 147.63 若しくは *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 (*Geniculosporium*) 属種から誘導可能である。

【 0 2 0 4 】

オキシダーゼとして、酵素分類 E C 1 . 1 0 . 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

50

示す化合物、例えば、カテコールオキシダーゼ（EC 1.10.3.1）、*o*-アミノフェノールオキシダーゼ（EC 1.10.3.4）、若しくはビリルビンオキシダーゼ（EC 1.3.3.5）が挙げられる。

【0205】

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。

【0206】

真菌由来の適切な例として、バチルス（*Bacillus*）属、ニューロスポラ（*Neurospora*）属、例えば*N.クラッサ*（*N. crassa*）、ポドスポラ（*Podospira*）属、ボトリチス（*Botrytis*）属、コリビア（*Collybia*）属、ツリガネタケ（*Fomes*）属、レンチヌス（*Lentinus*）属、ヒラタケ（*Pleurotus*）属、カワラタケ（*Trametes*）属、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（*Rhizoctonia*）属、例えば*R. ソラニ*（*R. solani*）、ヒトヨタケ（*Coprinopsis*）属、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（*Psathyrella*）属、例えばイタチタケ（*P. condelleana*）、ヒカゲタケ（*Panaeolus*）属、例えばワライタケ（*P. papilionaceus*）、ミセリオフトラ（*Myceliophthora*）属、例えば*M. サーモフィラ*（*M. thermophila*）、シタリジウム（*Schytalidium*）属、例えば*S. サーモフィルム*（*S. thermophilum*）、ポリボルス（*Polyporus*）属、例えば*P. ピンシツス*（*P. pinsitus*）、フレビア（*Phlebia*）属、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（*Coriolus*）属、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。

【0207】

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

【0208】

ヒトヨタケ（*Coprinopsis*）属又はミセリオフトラ（*Myceliophthora*）属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・テルモフィラ（*Myceliophthora thermophila*）から得られるラッカーゼが好ましい。

【0209】

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、スラリー等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。

【0210】

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、場合によっては、当該技術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238,216号明細書に開示されている方法に従って調製され得る。

【0211】

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、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。

10

【0212】

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、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。

20

【0213】

蛍光増白剤

また、潜在組成物は、好ましくは、蛍光増白剤又は光学的増白剤等、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リ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。また、好ましい蛍光増白剤は、Paramount Minerals and Chemicals, Mumbai, India製の市販のParawhite KXである。Tinopal CBS-Xは、ジスチリルビス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)-ビスフェニル二ナトリウムである。本発明で用いるのに適した他の蛍光剤として、1-3-ジアリールピラゾリ

30

40

50

ン及び7-アルキルアミノクマリンが挙げられる。

【0214】

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

【0215】

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等、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（本明細書において参照により組み込まれる）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）に記載されるもの等の変性セルロース誘導体等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、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、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、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、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。

【0216】

再沈着防止剤

また、本発明の洗剤組成物として、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等の1種以上の再沈着防止剤が挙げられ得る。また、先の汚れ遊離ポリマーの下に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。

【0217】

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。

【0218】

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／又は構造成弾性化剤が挙げられる。

【0219】

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等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。

10

【0220】

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、単一ユニット用量形態、例えば層をなす形態及びパウチが挙げられる。

20

【0221】

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、ポリアクリレート及び水溶性アクリレートコポリマー、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）。

30

40

【0222】

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。

【0223】

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%等の

50

約 1 % ~ 約 2 0 % 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 ~ 3 0 % 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。

【0224】

液体洗剤組成物は、例えば、約 pH 7、約 pH 8、若しくは約 pH 9 等の約 6 ~ 約 1 0 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 pH 1 0、約 pH 1 1、若しくは約 pH 1 2 等の約 1 0 ~ 約 1 2 のより高い pH を有するように製剤化され得る。

【0225】

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、ジェル、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。

【0226】

顆粒状洗剤製剤

酵素含有コア及び場合によっては 1 種以上の被覆剤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、当該技術において周知であり、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、ペレット等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 ~ 1 0 重量 % の水の含水率をもたらし得る。

【0227】

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 等の材料の追加のコーティングを含有し得る。

【0228】

酵素顆粒及びその生成に関する更なる詳細については、国際公開第 2 0 1 3 / 0 0 7 5 9 4 号パンフレット、並びに例えば国際公開第 2 0 0 9 / 0 9 2 6 9 9 号パンフレット、欧州特許第 1 7 0 5 2 4 1 号明細書、欧州特許第 1 3 8 2 6 6 8 号明細書、国際公開第 2 0 0 7 / 0 0 1 2 6 2 号パンフレット、米国特許第 6 , 4 7 2 , 3 6 4 号明細書、国際公開第 2 0 0 4 / 0 7 4 4 1 9 号パンフレット、及び国際公開第 2 0 0 9 / 1 0 2 8 5 4 号パンフレットを参照されたい。

【0229】

共顆粒中での酵素の製剤化

D N a s e 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。

10

20

30

40

50

【0230】

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。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、(ii)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。

10

【0231】

液体製剤

また、本発明は、本発明のDNaseバリエーションを含む液体組成物に関する。当該組成物は、酵素安定剤（例として、プロピレングリコール若しくはグリセロール等のポリオール、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等のフェニルボロン酸誘導体が挙げられる）を含み得る。

【0232】

一部の実施形態において、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、及びケイ酸塩等の種々の塩、並びにタルク、粘土等が挙げられるが、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。一部の実施形態において、組成物は、そのような材料を約5%～約90%含有する。

20

【0233】

別の態様において、液体製剤は、20～80重量%のポリオールを含む。一実施形態において、液体製剤は、0.001～2重量%の保存剤を含む。

【0234】

別の実施形態において、本発明は：

- (A) 0.001～25重量%の本発明のバリエーション；
- (B) 20～80重量%のポリオール；
- (C) 場合によっては0.001～2重量%の保存剤；及び
- (D) 水

を含む液体製剤に関する。

30

【0235】

別の実施形態において、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) 場合によっては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。

40

【0236】

別の実施形態において、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等の1種以上の

50

配合剤を含む。一実施形態において、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、平均分子量が約600未満のポリエチレングリコール（PEG）、及び平均分子量が約600未満の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）、又はそれらのあらゆる組合せからなる群から選択される。

【0237】

別の実施形態において、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。一実施形態において、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、平均分子量が約600未満のポリエチレングリコール（PEG）、及び平均分子量が約600未満の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。一実施形態において、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。

【0238】

別の実施形態において、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、又はそれらのあらゆる組合せからなる群から選択される。一実施形態において、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。一実施形態において、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、又はそれらのあらゆる組合せからなる群から選択される。

【0239】

別の実施形態において、液体製剤はさらに、例えば先に記載される、1つ以上の追加の酵素を含む。

【0240】

D N a s e バリエーションの使用

本発明のD N a s e バリエーションは、クリーニングプロセス、例えば、特に洗濯物についての、洗濯物クリーニング又は硬質面クリーニングでの使用に適している。ゆえに、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、当該方法は：

- 品目を、本発明のD N a s e バリエーションを含む洗浄液に曝す工程と；
- 少なくとも1つの洗浄サイクルを完了する工程と；場合によっては
- 品目を濯ぐステップ工程と

を含む。

【0241】

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。

【0242】

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℃の範囲内であり得る。

【0243】

洗浄液中のDNase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。

【0244】

Tシャツ又はスポーツウエア等の品目は、用いられる場合、使用者の身体由来の、そして当該品目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。ゆえに、本発明はまた、悪臭、例えば濡れているか、又は乾いた生地由来のE-2-ノネナールの削減又は除去のための、本発明のDNaseバリエーションの使用に関する。

10

【0245】

一実施形態において、本発明のDNaseバリエーションは、親又は配列番号1等の参照DNaseと比較して、悪臭除去性質が向上し、悪臭は、アッセイIIに記載されるように測定される。

20

【0246】

本発明は、以下の実施例によってさらに説明され、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】

【0247】

アッセイ及び洗剤組成物
モデル洗剤A2（液体）

成分：12%のLAS、12%のAEO、4%のAEOS/SLES、2%のMPG（モノプロピレングリコール）、3%のエタノール、2%のTEA、3%の石鹼、0.5%のNaOH、3.9%のクエン酸ナトリウム、1.5%のDTMPA Na7、0.5%のフェノキシエタノール、及び100%まで水（パーセンテージは全てw/wである）；pHをNaOHにより8.4に調整

30

【0248】

アッセイI：DNase活性の試験

DNase活性を、DNase Test Agar with Methyl Green（BD、Franklin Lakes、NJ、米国）により判定することができ、これは、供給業者のマニュアルに従って調製される。簡潔には、21gのアガーを、500mlの水中に溶解させてから、121℃にて15分間オートクレーブする。オートクレーブにかけたアガーを水浴中で48℃にして、20mlのアガーをペトリ皿中に注ぎ入れて、インキュベーションによって室温にて一晚固化させる。固化したアガープレート上に、5μlの酵素溶液を加えて、DNase活性を、スポットで置いた酵素溶液の周囲の無色のゾーンとして観察する。

40

【0249】

アッセイII：Eノーズを用いた、生地のE-2-ノネナールの分析。

生地に付いた悪臭の存在を試験する方法として、E-2-ノネナールが、ランドリーの悪臭に寄与することから、この化合物を悪臭のマーカーとして用いるものがある。E-2-ノネナールの溶液を、5cm×5cmの生地布切れに加えて、布切れを、ガスクロマトグラフィ（GC）分析用の20mLガラスバイアル内に置いて、バイアルをキャッピング

50

する。40℃にて20分のインキュベーション後、Heracles II Electronic nose (Alpha M.O.S. (仏国) 製) (2つのFID、カラム1: MXT5及びカラム2: MXT1701を有する二重カラムガスクロマトグラフ) により、キャッピングしたバイアルの5mLの頭隙を分析する。

【0250】

方法

PCR、クローニング、ライゲーションヌクレオチド等の一般的な方法が当業者に周知であり、例えば、“Molecular cloning: A laboratory manual”, Sambrook et al. (1989), Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY; Ausubel, F. M. et al. (eds.); “Current protocols in Molecular Biology”, John Wiley and Sons, (1995); Harwood, C. R., and Cutting, S. M. (eds.); “DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes I and II”, D. N. Glover ed. (1985); “Oligonucleotide Synthesis”, M. J. Gait ed. (1984); “Nucleic Acid Hybridization”, B. D. Hames & S. J. Higgins eds (1985); “A Practical Guide To Molecular Cloning”, B. Perbal, (1984) において見出すことができる。

10

20

【0251】

実施例1: DNaseバリエーションの調製及び初期スクリーニング

配列番号1のDNaseの部位特異的バリエーションを、所望の新しい変異を含有する特定のプライマーを用いて生成した。選択した新しいコドンは、コウジカビ (*Aspergillus oryzae*) 中の特定のアミノ酸について天然存在比が最も高いコドンであった。形質転換基質を、PCRを用いて形成した:

【0252】

1) N末端及びC末端断片の別々の増幅 (変異部位と比較)

N末端断片を、ユニバーサルフォワードプライマー及び位置特異的リバースプライマーを用いて増幅させた。C末端断片を、変異特異的フォワードプライマー及びユニバーサルリバースプライマーを用いて増幅させた。双方のユニバーサルプライマーは、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属ゲノムにおける相同組込みに必須の配列と相補的である。

30

【0253】

2) 細胞内でのインビボ組換えによるN末端断片及びC末端断片のアセンブリ。

結果として生じる形質転換基質を、コウジカビ (*Aspergillus oryzae*) 中に形質転換して、形質転換体を、唯一の窒素源としての硝酸塩での増殖によって選択した。各タイプの3つの単一コロニーを、マイクロタイタープレート中に採取して、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属に特有のプロス中で30℃にて4日間増殖させた。

40

【0254】

上清を、初期安定性スクリーニングに用いた。初期スクリーニングに基づいて、注目する置換を、多数の置換を含有する新しいバリエーション中に組み合わせ、これを精製して、以下に記載する更なる安定性試験に供した。

【0255】

実施例2: DNaseバリエーションの精製

配列番号1と比較して多数の置換を含有するコウジカビ (*A. oryzae*) DNase培養上清の精製を、以下のようにCaptomMCによって実行した: 培養プロスを、Nalgene 0.2µm濾過ユニットに通して濾過して、宿主細胞を除去した。濾過した上清を、20mM MES (2-(N-モルフォリノ)エタンスルホン酸)、pH 6

50

．0で平衡化した25mL Capto MMCコラム (Cytiva) にアブライした。希釈剤として20mM MES、pH6.0バッファを用いる1:3のインライン希釈により、上清をアブライした。カラムを、20mM MES、pH6.0で洗浄してから、ステップグラディエントにより、100% 50mMトリス、1M NaCl、pH9.0に溶出して、5カラム容量について保持した。画分を、SDS-PAGEによって分析して、更なる実験用の精製酵素調製物として用いる純度に従ってプールした。

【0256】

実施例3：nDSFによる精製DNaseバリエントの融点 (T_m) の判定

精製DNaseバリエントを、0.01%のトリトンX-100により0.6mg/mLに希釈した。濃度は280nmでの吸光度から算出した。40μL希釈試料を、40μLのバッファ (0.2M Hepes、20mM MgCl₂、pH8.5) 又は40μLの20%モデル洗剤A2と混合した。

【0257】

精製DNaseバリエントの熱的安定性を、温度上昇 (20℃~95℃、上昇速度3.3℃/分) の際のアンフォールディングに起因する固有のトリプトファン及びチロシン蛍光の変化を測定するPrometheus NT.48又はNT.Plex機器 (Nano Temper Technologies GmbH、独国) を用いて、差分スキャニング蛍光測定 (nanoDSF又はnDSF) によって推定した。融点を、第1及び第2の誘導体を用いる溶融曲線中の変曲点から算出する。バリエントを、通常、三反復で試験した。

【0258】

実施例4：精製DNaseバリエントについての保存安定性アッセイ

配列番号1と比較して多数の置換を有する本発明の精製DNaseバリエントの保存安定性を、バリエントを40℃又は45℃の高温にて洗剤組成物中で7日間保存する促進保存安定性アッセイを用いて判定した。残存するDNase活性を、種々のインキュベーション時間後に判定して、結果を、同じ温度にて保存した配列番号1の野生型DNaseについての結果と比較した。

【0259】

精製DNaseバリエントを、0.01%のトリトンX-100で、最終反応において10ppmから150ppmに及ぶ濃度に希釈した。酵素濃度は、280nmでの吸光度から算出した。15μLの希釈DNase試料を、285μLの濃縮モデル洗剤A2及び0.5%のプロテアーゼ (Progress Uno 101L、Novozymes A/S) と混合して、磁気バーを用いるマイクロタイタープレート (洗剤プレート、Nunc U96 PP 0.5mL) のウェルに加えた。混合後、洗剤プレートを、Bio san PST-100HLサーモミキサ中で40℃又は45℃にてインキュベートした。

【0260】

種々のインキュベーション時間 (例えば、0、3、24、96、及び168時間) 後、残存するDNase活性を測定した。洗剤プレート由来の5μLを、195μLのDNA基質溶液 (50mMトリスpH7、20mM MgCl₂、20mM CaCl₂、1.3mM EDTA中の3.3mgのDNA (Sigma D1626)) と混合した。粘性を、Hamilton MicroLab STARによる吸引中に、圧力検知を用いて30分間、毎分測定して、活性を、測定した粘性の引下げから算出した。各バリエントを、2つの異なる酵素濃度の各々にて二反復で試験した。

【0261】

洗剤とのインキュベーション中の活性の低下は、指数関数的であると仮定した。半減期 ($T_{1/2}$) を、対数 (仮性) 対インキュベーション時間の線形回帰から見出して、半減期向上因子 (HIF又は $T_{1/2}IF$) を、参照、この場合では配列番号1のDNaseの半減期と比較した、DNaseバリエントの半減期として算出した。40℃又は45℃にてアッセイしたバリエントを、同じ温度にてアッセイした配列番号1のDNaseと比較した。配列番号1のDNaseのHIF値は、1と定義した。

【 0 2 6 2 】

実施例 5：融点及び保存安定性の結果

本発明の D N a s e バリエントの融点 (T_m) 及び半減期向上因子 (H I F) (先に記載したように判定) についての結果を、以下の表 1 及び表 2 に示す。表 1 に、実施例 3 に記載するバッファ及びモデル洗剤 A 2 の双方において n D S F によって判定した融点 (T_m) についてのデータを示す。表 2 に、実施例 4 に記載する示す温度でのモデル洗剤 A 2 において判定した、配列番号 1 の D N a s e と比較した半減期向上因子 (H I F) についてのデータを示す。

【 0 2 6 3 】

【表 2】

表 1: 配列番号 1 のバリエントの融点(T_m)

配列番号 1 と比較した置換	バッファ T _m	モデル def. A2 T _m
野生型(配列番号 1)	76.0	64.0
D32E V35I A111P	80.7	70.2
D32E V35I Q102E A111P	82.7	73.6
D32E V35I A111P S115T	83.9	74.9
D32E V35I Q85E A111P	81.4	72.6
D32E V35I A111P N214D	80.9	72.6
K18Q D32E V35I A111P	81.4	72.2
D32E V35I A111P G199E	80.7	
D32E V35I D72V A111P	82.0	
S69V K86E Q102E S115T K147N K155E A172D K192A Q208V	79.9	70.4
S69V K86E Q102E K105T K147N K155E A172D K192A Q208V	78.9	70.9
S69V K86E Q102E K105D K147N K155E A172D K192A Q208V	79.8	72.0
S69V K86E Q102E K147N K155E A172D G181N K192A Q208V	78.1	69.0
G20C K30C D32E V35I A111P	77.5	67.2
S69V Q102E Q157E T159Q G181N	80.8	70.2
A101E K105N N146H V148I N214D Y218E	77.1	71.3
D32E V35I A111P K147N	79.9	68.5
S26H D32E V35I A111P	80.5	69.1
D32E V35I S69E A111P	81.4	70.6
D32E V35I K105D A111P S115T	85.8	71.9
D32E V35I A101E K105T A111P G181N	84.6	74.6
D32E V35I K105N A111P G181N S182Y	83.5	72.4
S69V K86E Q102E F112W K147N K155E A172D K192A Q208V	82.1	73.6
S69V K86E Q102E G136E K147N K155E A172D K192A Q208V	82.3	72.7
A101E A111P Q150E Q208V	82.3	68.2
S69V Q102E A111P Q157E T159Q A172E	82.1	70.0
S69V Q102E S115T Q157E T159Q A172E	82.2	69.9
D32E V35I K105T A111P G181N	82.3	68.1
D32E V35I A101E K105N A111P	82.4	68.1
S26H S69V Q102E A111P Q157E T159Q A172E	82.7	70.2
D32E V35I S69V Q102E A111P Q157E T159Q A172E	82.4	70.3

【 0 2 6 4 】

【表 3】

配列番号 1 と比較した置換	バツファ Tm	モデル det. A2 Tm
S69V Q102E K105N A111P S115T Q150E G161R A172D G181N V187N K192I	91.4	80.9
D32P S69V Q102E K105N A111P S115T Q150E G161R G181N V187N K192I	91.0	76.7
S69V Q102E K105N A111P S115T Q150E K160T G161R G181N V187N K192I	89.6	80.3
K65Q S69V Q102E K105N A111P S115T Q150E G161R G181N V187N K192I	90.9	80.9
S69V Q102E K105N A111P S115T V138M Q150E G161R G181N V187N K192I	87.3	74.6
S26H D32E V35I A111P K155L	79.0	67.4
D32E V35I K82G A111P G181N S182V	79.3	63.3
D32E V35I N77E A111P G181N S182V	78.2	63.1
K18S D32E V35I Q102E K105E A111P	82.8	70.5
T19P D32E V35I Q102E K105E A111P	82.0	66.3
K67A S69V Q102E K147N Q157E T159Q A172E D197S	82.1	71.3
S69V Q102E V138A S144R Q157E T159Q A172E G181N	79.6	64.7
S69V Q102E K105N A111P S115T Q150E G161R G181N V187N K192I	90.6	75.2
E6D A101E Q150E G181N Q208V	80.2	70.5
S69V Q102E K105N A111P S115T G137R Q150E G161R G181N V187N K192I	90.1	75.7
D32E V35I S69V K86E Q102E K105N A111P S115T V127T G137R K147N Q150E K155E T159Q G161R A172D G181N V187N K192A Q208V N217A	89.8	78.8
D32E V35I S69V K86E Q102E K105N A111P S115T K147N Q150E K155E T159Q G161R A172D G181N V187N K192A Q208V N217A	86.3	79.8
D32E V35I A111P N140H	80.0	69.5
D32E V35I A111P G181N S182V K185E	81.6	69.9
D32E E34N V35I K86E A111P G181N	78.7	67.6
D32E V35I K67A S69R A111P G181N K212E	84.4	69.1
D32E V35I K67A A111P P175N S182V	80.9	64.4
D32E V35I K67A A111P G181N A206G Q208V	84.5	69.9
D32E V35I A101E Q102E A111P G181N	81.8	68.5
D32E V35I S69V K86E Q102E A111P K147N K155E T159Q A172D K178S G181N K192A Q208V N217A	80.0	68.6
D32E V35I K65Q S69V K86E Q102E A111P K147N K155E T159Q A172D G181N K192A Q208V N217A	80.0	70.5
D32E V35I S69V K86E Q102E A111P K155E T159Q A172D G181N K192A Q208V N217A	79.8	69.0
D32E V35I S69V K86E Q102E A111P K147N K155E T159Q A172D G181N K192A Q208V N217A	79.9	68.8
S69V Q102E K105N A111P S115T G161R G181N V187N K192I	89.3	73.0
S69A Q102E K105N A111P S115T Q150E G161R G181N	91.0	76.0

【 0 2 6 5 】

10

20

30

40

50

【表 4】

配列番号 1 と比較した置換	パッファ T _m	モデル det. A2 T _m
V187N K192I		
S69V D72S Q102E K105N A111P S115T Q150E G161R G181N V187N K192I	89.6	74.0
N4K D32E V35I S98R K105N A111P G181N S182Y K212E	83.7	70.4
D32E V35I S98R A111P G181N S182Y	81.7	66.8
D32E V35I S98R K105N A111P Q158D G181N S182Y	83.7	69.9
D32E V35I S69E S98R K105N A111P G181N S182Y	85.2	72.6
K18S D32E V35I S98R K105N A111P G181N S182Y	83.6	69.9
D32E V35I S98R A101T K105N A111P G181N S182Y	84.2	70.1
D32E V35I S98R K105N A111P G181N S182Y D189N N214D	84.2	70.1
D32E V35I S98R K105N A111P K147N G181N S182Y	83.5	69.6
V12L D32E V35I S98R K105N A111P G181N S182Y	83.9	69.7
D32E V35I S98R K105N A111P G181N S182Y Q208V	83.8	71.4
D32P S69V Q102E K105D A111P S115T Q150E G161R G181N V187N K192I	91.6	77.4
D32E V35I K67A A101E K105D A111P N217A	84.8	72.7
D32E V35I K65E A101E K105T A111P N217A	82.8	72.9
D32E V35I A101T K105N A111P K147E G181N S182Y	82.4	72.1
D32E V35I S69E K105N A111P K147E G181N S182Y	83.9	75.9
D32E V35I K65E K105N A111P G181N S182Y K212E	84.1	74.3
D32E V35I K67A K105N A111P G181N S182Y K212E	85.6	73.3
D32E V35I K65E K67A K105N A111P G181N S182Y	87.2	78.3
D32E V35I A101T K105N A111P G181N S182Y N214D	83.3	71.1
T19P D32E V35I A101E K105T A111P K160A G181N	82.6	71.5
T19P D32E V35I A101E K105T A111P K178S G181N	83.4	70.6
K18S T19P D32E V35I A101E K105T A111P G181N	83.1	69.9
K18S D32E V35I A101E K105T A111P G181N K212E	84.0	72.8
D32E V35I A101E K105T A111P G181N K212E N214D	83.8	71.5
D32P S69V Q102E K105N A111P S115T N146H Q150E G161R G181N V187N K192I	90.8	75.4
D32P S69V Q102E K105N A111P S115T S134H Q150E G161R G181N V187N K192I	90.3	72.7
S26H S69V Q102E A111P K147N A149S Q150E Q157E T159Q A172E	83.9	74.0
S26H S69V Q102E A111P N146H Q150E Q157E T159Q A172E	83.0	71.2
D32P S69A Q102E K105N A111P S115T N146H Q150E G161R G181N K192I	91.4	77.5
D32E V35I K53F K105N A111P G181N S182Y K212E	83.6	72.6
K18Q D32E V35I K105E A111P K155F	80.5	67.6
D32E V35I A101E K105T A111P G181N K212E Y218E	81.5	70.0
D32E V35I K82T A101E K105T A111P G181N K212E	83.8	72.4
D32E V35I A111P K147N K204L	79.8	70.2
D32E V35I A111P K185I K215T	79.2	69.3

【 0 2 6 6 】

10

20

30

40

50

【表 5】

配列番号 1 と比較した置換	パッファ T _m	モデル det. A2 T _m
K18F D32E V35I A111P K185Q	79.8	68.7
D32E V35I A111P K204L K215I	79.6	69.4
D32E V35I K67A A111P K204G	82.3	70.1
D32E V35I A111P K178M K212T	79.5	68.7
D32E V35I K67A K105T A111P K185G K212M	83.3	71.0
D32E V35I K67A K105T A111P K147N K190N	83.8	72.7
D32E V35I K67A K105T A111P K178L K185T	82.6	72.1
D32E V35I K67A K105T A111P K190V K204G	83.7	70.6
K18M D32E V35I K67A K105T A111P K178S	83.2	71.2
K18Q D32E V35I K67A K105T A111P K215V	83.0	70.4
S26H D32P S69V Q102E K105N A111P S115T N146H Q150E G161R G181N V187N K192I	90.9	78.7
D32P S69V Q102E K105N A111P S115T T120H N146H Q150E G161R G181N V187N K192I	90.5	78.7
D32P Q102E K105N A111P S115T Q150E G161R G181N V187N K192I	90.5	77.2
D32P S69V Q102E K105N A111P S115T Q150E Q157E G181N V187N K192I	90.8	82.6
D32E V35I K67A S69V K105T A111P Q157E G181N A206G Q208V	87.4	75.7
D32E V35I K105T A111P G181N K204W K215L	83.0	72.4
D32E V35I K105T A111P G181N K185L K192V K204W	83.5	72.7
D32E V35I K105T A111P K178L G181N K212T	83.0	72.1
S26H D32E V35I K67A S69R A111P G181N K212E	85.1	73.0
D32E V35I K67A A111P Q157E G181N Q208V	85.0	72.8
D32E V35I K67A A111P Q157E A172E G181N A206G Q208V	85.1	71.4
K18S D32E V35I K67A K105T A111P K185L K192F	83.9	76.6
K18S D32E V35I A111P K178S K212L	79.5	69.4
D32E V35I K67A A111P Q157E T159Q G181N A206G Q208V	84.4	70.8
K18S D32E V35I A111P K185I K215T	79.0	69.5

【 0 2 6 7 】

【表 6】

表2: 配列番号1のバリエーションの保存安定性(半減期向上因子、HIF)

配列番号 1 と比較した置換	HIF avg.	ストレス temp. °C
野生型(配列番号 1)	1.0	40/45
D32E V35I A111P	2.0	40
D32E V35I Q102E A111P	1.6	40
D32E V35I A111P S115T	1.5	40
D32E V35I Q85E A111P	1.5	40
D32E V35I A111P N214D	1.4	40
K18Q D32E V35I A111P	1.4	40
D32E V35I A111P G199E	1.4	40
D32E V35I D72V A111P	2.4	40
G20C K30C D32E V35I A111P	1.4	40
D32E V35I A111P K147N	1.8	40
S26H D32E V35I A111P	3.4	40
D32E V35I S69E A111P	2.8	40
D32E V35I K105D A111P S115T	1.6	40
D32E V35I A101E K105T A111P G181N	2.3	40
D32E V35I K105N A111P G181N S182Y	2.2	40
A101E A111P Q150E Q208V	1.3	40
S69V Q102E A111P Q157E T159Q A172E	1.3	40
D32E V35I A101E K105E A111P S182V	1.7	40
D32E V35I K67A K105T A111P	3.8	40
D32E V35I K105T A111P G181N	2.9	40
D32E V35I A101E K105N A111P	1.9	40
S26H S69V Q102E A111P Q157E T159Q A172E	2.3	45
D32E V35I S69V Q102E A111P Q157E T159Q A172E	1.2	40
S26H D32E V35I A111P K155L	1.2	40
D32E V35I K82G A111P G181N S182V	2.3	40
D32E V35I N77E A111P G181N S182V	2.5	40
K18S D32E V35I Q102E K105E A111P	1.7	40
T19P D32E V35I Q102E K105E A111P	2.2	40
K67A S69V Q102E K147N Q157E T159Q A172E D197S	1.2	40
S69V Q102E V138A S144R Q157E T159Q A172E G181N	1.6	40
S69V Q102E K105N A111P S115T Q150E G161R G181N V187N K192I	3.6	40
S69V Q102E K105N A111P S115T G137R Q150E G161R G181N V187N K192I	3.5	40
D32E V35I A111P N140H	2.6	40
D32E V35I A111P G181N S182V K185E	2.1	40
D32E E34N V35I K86E A111P G181N	1.6	40
D32E V35I K67A S69R A111P G181N K212E	3.1	40
D32E V35I K67A A111P P175N S182V	2.9	40
D32E V35I K67A A111P G181N A206G Q208V	3.0	40
D32E V35I A101E Q102E A111P G181N	1.7	40

【 0 2 6 8 】

10

20

30

40

50

【表 7】

配列番号 1 と比較した置換	HIF avg.	ストレス temp. °C
S69V Q102E K105N A111P S115T G161R G181N V187N K192I	4.8	45
S69A Q102E K105N A111P S115T Q150E G161R G181N V187N K192I	5.2	40
S69V D72S Q102E K105N A111P S115T Q150E G161R G181N V187N K192I	4.3	40
N4K D32E V35I S98R K105N A111P G181N S182Y K212E	2.5	40
D32E V35I S98R A111P G181N S182Y	2.3	40
D32E V35I S98R K105N A111P Q158D G181N S182Y	2.4	40
D32E V35I S69E S98R K105N A111P G181N S182Y	2.4	40
K18S D32E V35I S98R K105N A111P G181N S182Y	2.1	40
D32E V35I S98R A101T K105N A111P G181N S182Y	2.5	40
D32E V35I S98R K105N A111P G181N S182Y D189N N214D	2.4	40
D32E V35I S98R K105N A111P K147N G181N S182Y	2.4	40
V12L D32E V35I S98R K105N A111P G181N S182Y	2.3	40
D32E V35I S98R K105N A111P G181N S182Y Q208V	2.4	40
D32P S69V Q102E K105D A111P S115T Q150E G161R G181N V187N K192I	1.5	45
D32E V35I K67A A101E K105D A111P N217A	2.6	45
D32E V35I K65E A101E K105T A111P N217A	1.8	45
D32E V35I A101T K105N A111P K147E G181N S182Y	2.4	45
D32E V35I S69E K105N A111P K147E G181N S182Y	2.5	45
D32E V35I K65E K105N A111P G181N S182Y K212E	2.5	45
D32E V35I K67A K105N A111P G181N S182Y K212E	3.2	45
D32E V35I K65E K67A K105N A111P G181N S182Y	3.1	45
D32E V35I A101T K105N A111P G181N S182Y N214D	2.7	45
T19P D32E V35I A101E K105T A111P K160A G181N	1.2	45
T19P D32E V35I A101E K105T A111P K178S G181N	2.1	45
K18S T19P D32E V35I A101E K105T A111P G181N	1.9	45
K18S D32E V35I A101E K105T A111P G181N K212E	1.9	45
D32E V35I A101E K105T A111P G181N K212E N214D	2.3	45
D32P S69V Q102E K105N A111P S115T N146H Q150E G161R G181N V187N K192I	4.5	45
S26H S69V Q102E A111P K147N A149S Q150E Q157E T159Q A172E	3.5	45
S26H S69V Q102E A111P N146H Q150E Q157E T159Q A172E	1.8	45
D32P S69A Q102E K105N A111P S115T N146H Q150E G161R G181N K192I	4.5	45
D32E V35I K53F K105N A111P G181N S182Y K212E	2.7	45
K18Q D32E V35I K105E A111P K155F	1.2	45
D32E V35I A101E K105T A111P G181N K212E Y218E	2.2	45
D32E V35I K82T A101E K105T A111P G181N K212E	2.3	45
D32E V35I A111P K147N K204L	2.2	45
D32E V35I A111P K185I K215T	2.3	45
K18F D32E V35I A111P K185Q	1.2	45
D32E V35I A111P K204L K215I	2.1	45
D32E V35I K67A A111P K204G	2.8	45

【 0 2 6 9 】

10

20

30

40

50

【表 8】

配列番号 1 と比較した置換	HIF avg.	ストレス temp. °C
D32E V35I A111P K178M K212T	2.1	45
D32E V35I K67A K105T A111P K185G K212M	2.8	45
D32E V35I K67A K105T A111P K147N K190N	2.8	45
D32E V35I K67A K105T A111P K178L K185T	4.6	45
D32E V35I K67A K105T A111P K190V K204G	3.0	45
K18M D32E V35I K67A K105T A111P K178S	1.8	45
K18Q D32E V35I K67A K105T A111P K215V	2.0	45
S26H D32P S69V Q102E K105N A111P S115T N146H Q150E G161R G181N V187N K192I	4.8	45
D32P S69V Q102E K105N A111P S115T T120H N146H Q150E G161R G181N V187N K192I	5.2	45
D32P Q102E K105N A111P S115T Q150E G161R G181N V187N K192I	5.1	45
D32P S69V Q102E K105N A111P S115T Q150E Q157E G181N V187N K192I	3.8	45
D32E V35I K67A S69V K105T A111P Q157E G181N A206G Q208V	4.6	45
D32E V35I K105T A111P G181N K204W K215L	2.3	45
D32E V35I K105T A111P G181N K185L K192V K204W	2.9	45
D32E V35I K105T A111P K178L G181N K212T	2.8	45
S26H D32E V35I K67A S69R A111P G181N K212E	5.8	45
D32E V35I K67A A111P Q157E G181N Q208V	4.4	45
D32E V35I K67A A111P Q157E A172E G181N A206G Q208V	4.0	45
K18S D32E V35I K67A K105T A111P K185L K192F	2.5	45
K18S D32E V35I A111P K178S K212L	1.9	45
D32E V35I K67A A111P Q157E T159Q G181N A206G Q208V	2.7	45
K18S D32E V35I A111P K185I K215T	2.1	45

【0270】

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こととなる。

【0271】

本発明は、以下の付番した段落によってさらに定義される。

【0272】

1. 111、32、35、69、102、105、及び181からなる群から選択される位置にて、少なくとも2つの置換、例えば少なくとも3つの置換を含むDNaseバリエーションであって、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のポリペプチドに対して少なくとも60%且つ100%未満の配列同一性を有し、バリエーションはDNase活性を有する、DNaseバリエーション。

【0273】

2. 26、32、35、65、67、69、98、102、105、111、115、150、157、159、161、172、181、182、185、187、192、206、208、及び212からなる群から選択される位置にて3つ以上の置換を含むDNaseバリエーションであって、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のポリペプチドに対して少なくとも60%且つ100%未満の配列同一性を有し、バリエーションはDNase活性を有する、DNaseバリエーション。

アント。

【0274】

3. S26H、D32E、V35I、K65E、K67A、S69E、S69V、S98R、Q102E、K105N、A111P、S115T、Q150E、Q157E、T159Q、G161R、A172E、G181N、S182Y、S182V、K185E、V187N、K192I、A206G、Q208V、及びK212Eからなる群から選択される3つ以上の置換を含むDNaseバリエーションであって、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のポリペプチドに対して少なくとも60%且つ100%未満の配列同一性を有し、バリエーションはDNase活性を有する、DNaseバリエーション。

10

【0275】

4. A111P、D32E、V35I、S69V、Q102E、K105N、及びG181Nからなる群から選択される少なくとも2つの置換、例えば少なくとも3つの置換を含むDNaseバリエーションであって、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のポリペプチドに対して少なくとも60%且つ100%未満の配列同一性を有し、バリエーションはDNase活性を有する、DNaseバリエーション。

【0276】

5. バリエーションは、置換A111Pを含む、先の段落のいずれかのバリエーション。

【0277】

6. S26H、D32E、V35I、K65E、K67A、S69E、S69V、S98R、Q102E、K105N、S115T、Q150E、Q157E、T159Q、G161R、A172E、G181N、S182Y、S182V、K185E、V187N、K192I、A206G、Q208V、及びK212Eからなる群から選択される2つ以上の置換を含む、段落5のバリエーション。

20

【0278】

7. 置換D32E+V35I及び／又は置換G181Nを含む、先の段落のいずれかのバリエーション。

【0279】

8. 置換D32E+V35I+A111Pを含む、先の段落のいずれかのバリエーション。

30

【0280】

9. 置換A111P+G181Nを含む、先の段落のいずれかのバリエーション。

【0281】

10. 置換S69V及び／又はQ102Eを含む、先の段落のいずれかのバリエーション。

【0282】

11. 置換K105Nを含む、先の段落のいずれかのバリエーション。

【0283】

12. バリエーションは、置換D32E+V35I+A111P、並びに、場合によっては、S26H、K65E、K67A、S69E、S69V、S98R、Q102E、K105N、S115T、Q150E、Q157E、T159Q、G161R、A172E、G181N、S182Y、S182V、K185E、V187N、K192I、A206G、Q208V、及びK212Eからなる群から選択される1つ以上の追加の置換を含む、先の段落のいずれかのバリエーション。

40

【0284】

13. バリエーションは、置換D32E+V35I+A111P+G181N、並びに、場合によっては、S26H、K65E、K67A、S69E、S69V、S98R、Q102E、K105N、S115T、Q150E、Q157E、T159Q、G161R、A172E、S182Y、S182V、K185E、V187N、K192I、A206G、Q208V、及びK212Eからなる群から選択される1つ以上の追加の置換を含む、先の段落のいずれかのバリエーション。

50

【0285】

14. バリエントは、置換 $D32E + V35I + Q102E + A111P + G181N$ 、並びに、場合によっては、 $S26H$ 、 $K65E$ 、 $K67A$ 、 $S69E$ 、 $S69V$ 、 $S98R$ 、 $K105N$ 、 $S115T$ 、 $Q150E$ 、 $Q157E$ 、 $T159Q$ 、 $G161R$ 、 $A172E$ 、 $S182Y$ 、 $S182V$ 、 $K185E$ 、 $V187N$ 、 $K192I$ 、 $A206G$ 、 $Q208V$ 、及び $K212E$ からなる群から選択される1つ以上の追加の置換を含む、先の段落のいずれかのバリエント。

【0286】

15. バリエントは、置換 $D32E + V35I + K105N + A111P + G181N$ 、並びに、場合によっては、 $S26H$ 、 $K65E$ 、 $K67A$ 、 $S69E$ 、 $S69V$ 、 $S98R$ 、 $Q102E$ 、 $S115T$ 、 $Q150E$ 、 $Q157E$ 、 $T159Q$ 、 $G161R$ 、 $A172E$ 、 $S182Y$ 、 $S182V$ 、 $K185E$ 、 $V187N$ 、 $K192I$ 、 $A206G$ 、 $Q208V$ 、及び $K212E$ からなる群から選択される1つ以上の追加の置換を含む、先の段落のいずれかのバリエント。

10

【0287】

16. バリエントは、置換 $D32E + V35I + S69V + Q102E + A111P$ 、並びに、場合によっては、 $S26H$ 、 $K65E$ 、 $K67A$ 、 $S98R$ 、 $K105N$ 、 $S115T$ 、 $Q150E$ 、 $Q157E$ 、 $T159Q$ 、 $G161R$ 、 $A172E$ 、 $G181N$ 、 $S182Y$ 、 $S182V$ 、 $K185E$ 、 $V187N$ 、 $K192I$ 、 $A206G$ 、 $Q208V$ 、及び $K212E$ からなる群から選択される1つ以上の追加の置換を含む、先の段落のい

20

【0288】

17. バリエントは、置換 $D32E + V35I + S69V + Q102E + A111P + G181N$ 、並びに、場合によっては、 $S26H$ 、 $K65E$ 、 $K67A$ 、 $S98R$ 、 $K105N$ 、 $S115T$ 、 $Q150E$ 、 $Q157E$ 、 $T159Q$ 、 $G161R$ 、 $A172E$ 、 $S182Y$ 、 $S182V$ 、 $K185E$ 、 $V187N$ 、 $K192I$ 、 $A206G$ 、 $Q208V$ 、及び $K212E$ からなる群から選択される1つ以上の追加の置換を含む、先の段落のい

【0289】

18. バリエントは、置換 $S69V + Q102E + A111P$ 、並びに、場合によっては、 $S26H$ 、 $D32E$ 、 $V35I$ 、 $K65E$ 、 $K67A$ 、 $S98R$ 、 $K105N$ 、 $S115T$ 、 $Q150E$ 、 $Q157E$ 、 $T159Q$ 、 $G161R$ 、 $A172E$ 、 $G181N$ 、 $S182Y$ 、 $S182V$ 、 $K185E$ 、 $V187N$ 、 $K192I$ 、 $A206G$ 、 $Q208V$ 、及び $K212E$ からなる群から選択される1つ以上の追加の置換を含む、先の段落のい

30

【0290】

19. バリエントは、置換 $S69V + Q102E + G181N$ 、並びに、場合によっては、 $S26H$ 、 $D32E$ 、 $V35I$ 、 $K65E$ 、 $K67A$ 、 $S98R$ 、 $K105N$ 、 $A111P$ 、 $S115T$ 、 $Q150E$ 、 $Q157E$ 、 $T159Q$ 、 $G161R$ 、 $A172E$ 、 $S182Y$ 、 $S182V$ 、 $K185E$ 、 $V187N$ 、 $K192I$ 、 $A206G$ 、 $Q208V$ 、及び $K212E$ からなる群から選択される1つ以上の追加の置換を含む、先の段落のい

40

【0291】

20. バリエントは、置換 $S69V + Q102E + A111P + G181N$ 、並びに、場合によっては、 $S26H$ 、 $D32E$ 、 $V35I$ 、 $K65E$ 、 $K67A$ 、 $S98R$ 、 $K105N$ 、 $S115T$ 、 $Q150E$ 、 $Q157E$ 、 $T159Q$ 、 $G161R$ 、 $A172E$ 、 $S182Y$ 、 $S182V$ 、 $K185E$ 、 $V187N$ 、 $K192I$ 、 $A206G$ 、 $Q208V$ 、及び $K212E$ からなる群から選択される1つ以上の追加の置換を含む、先の段落のい

【0292】

50

21. バリエントは、置換 Q102E + K105N + A111P + G181N、並びに、場合によっては、S26H、D32E、V35I、K65E、K67A、S69E、S69V、S98R、S115T、Q150E、Q157E、T159Q、G161R、A172E、S182Y、S182V、K185E、V187N、K192I、A206G、Q208V、及び K212E からなる群から選択される 1 つ以上の追加の置換を含む、先の段落のいずれかのバリエント。

【0293】

22. バリエントは、置換 S69V + Q102E + K105N + A111P + G181N、並びに、場合によっては、S26H、D32E、V35I、K65E、K67A、S98R、S115T、Q150E、Q157E、T159Q、G161R、A172E、S182Y、S182V、K185E、V187N、K192I、A206G、Q208V、及び K212E からなる群から選択される 1 つ以上の追加の置換を含む、先の段落のいずれかのバリエント。

10

【0294】

23. バリエントは、置換 D32E + V35I + K105N + A111P、並びに、場合によっては、S26H、K65E、K67A、S69E、S69V、S98R、Q102E、S115T、Q150E、Q157E、T159Q、G161R、A172E、G181N、S182Y、S182V、K185E、V187N、K192I、A206G、Q208V、及び K212E からなる群から選択される 1 つ以上の追加の置換を含む、先の段落のいずれかのバリエント。

20

【0295】

24. K18S、T19P、D32P、K86E、A101E、A101T、K105D、K105E、K105T、G137R、N146H、K147N、K155E、A172D、K178S、K192A、N214D、及び N217A からなる群から選択される少なくとも 1 つの更なる置換を含む、先の段落のいずれかのバリエント。

【0296】

25. 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 65%、例えば、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%、且つ 100% 未満の配列同一性を有する、先の段落のいずれかのバリエント。

30

【0297】

26. 置換の数は、1~20 個、例えば、1~10 個又は 1~5 個、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は 10 個の置換である、先の段落のいずれかのバリエント。

【0298】

27. 195~230 個のアミノ酸、好ましくは 200~225 個のアミノ酸、例えば 204~221 個のアミノ酸からなる、先の段落のいずれかのバリエント。

【0299】

28.

・ S69V + K86E + Q102E + K147N + K155E + A172D + K192A + Q208V ;

40

・ G20C + K30C + D32E + V35I + A111P ;

・ S69V + K86E + Q102E + K147N + K155E + A172D + G181N + K192A + Q208V ;

・ D32E + V35I + N77E + A111P + G181N + S182V ;

・ D32E + E34N + V35I + K86E + A111P + G181N ;

・ S69V + K86E + Q102E + K105T + K147N + K155E + A172D + K192A + Q208V ;

・ S69V + Q102E + Q157E + T159Q + N214D + N217A ;

・ S26H + D32E + V35I + A111P + K155L ;

50

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

10

20

30

40

50

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

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

10

20

30

40

50

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

E + G 1 6 1 R + G 1 8 1 N + V 1 8 7 N + K 1 9 2 I ; 及び

・ S 6 9 V + Q 1 0 2 E + K 1 0 5 N + A 1 1 1 P + S 1 1 5 T + G 1 3 7 R + Q 1 5 0 E + G 1 6 1 R + G 1 8 1 N + V 1 8 7 N + K 1 9 2 I

からなる群から選択される置換のセットを含む、先の段落のいずれかのバリエント。

【0300】

29. 前記置換のセットの1つと共に、配列番号1、配列番号2、又は配列番号3を含むか、又はこれからなる、段落28のバリエント。

【0301】

30. バリエントは、配列番号1のポリペプチドと、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、先の段落のいずれかのバリエント。

10

【0302】

31. 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30のバリエント。

【0303】

32. 段落1～31のいずれかのDNase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。

【0304】

33. 洗濯物又は硬質面クリーニング、例えば食器洗浄等のクリーニングプロセスにおける、段落1～31のいずれかのDNaseバリエント又は段落32の洗剤組成物の使用。

20

【0305】

34. 段落1～31のいずれかのDNaseバリエント又は段落32の洗剤組成物を含む洗浄液に品目を曝すことを含む、品目をクリーニングする方法。

【0306】

35. 品目は、生地又は硬質面、例えば皿類、又はテーブルトップ等の表面、壁若しくはフロア、又は洗浄機若しくは食器洗浄機等の機械の内面である、段落34の方法。

【0307】

36. 生地の洗濯方法であって：

a) 生地を、段落1～31のいずれかのDNaseバリエント又は段落32の洗剤組成物を含む洗浄液に曝すことと；

30

b) 少なくとも1つの洗浄サイクルを完了することと；場合によっては

c) 品目を濯ぐことと

を含む方法。

【0308】

37. 以下を含む顆粒：

(a) 段落1～31のいずれか1つのDNaseバリエントを含むコアと、場合によっては

(b) コアを取り囲む1つ以上の層からなるコーティングと

を含む顆粒。

【0309】

38. 段落1～31のいずれか1つのDNaseバリエント、及び酵素安定剤、例えば、ポリオール、例えばプロピレングリコール若しくはグリセロール、糖若しくは糖アルコール、乳酸、可逆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、又はフェニルボロン酸誘導体、例えば4-ホルミルフェニルボロン酸を含む液体組成物。

40

【0310】

39. 段落1～31のいずれかのDNase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構築物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。

【0311】

50

40. DNase 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39の組換え宿主細胞を培養することと；
b. バリエントを回収することと
を含む方法。

【図面】

【図1】

```
配列1 VPVNPEPDATSVENVALEKTGSGDSQSDPIKADLEVKGQSALPFDVDCWAILCKGAPNVLQ
配列2 -----ALKTGSGDSQSDPIKADLEVKGQSALPFDVDCWAILCKGAPNVLQ
配列3 -----KTGSGDSQSDPIKADLEVKGQSALPFDVDCWAILCKGAPNVLQ
*****

配列1 RVNEKTNNSNRDRSGANKGPFKDPQKWGIKALPPKNPSWSAQDFKSPEEYAFASSLQGGT
配列2 RVNEKTNNSNRDRSGANKGPFKDPQKWGIKALPPKNPSWSAQDFKSPEEYAFASSLQGGT
配列3 RVNEKTNNSNRDRSGANKGPFKDPQKWGIKALPPKNPSWSAQDFKSPEEYAFASSLQGGT
*****

配列1 NAILAPVNLASQNSQGGVLNGFYSAKVAQFDPSKPPQTKGTWFOITKFTGAAGPYCKAL
配列2 NAILAPVNLASQNSQGGVLNGFYSAKVAQFDPSKPPQTKGTWFOITKFTGAAGPYCKAL
配列3 NAILAPVNLASQNSQGGVLNGFYSAKVAQFDPSKPPQTKGTWFOITKFTGAAGPYCKAL
*****

配列1 GSNDKSVCDKNKNLAGDWGFDPAKWAYQYDEKNNKENYVGK
配列2 GSNDKSVCDKNKNLAGDWGFDPAKWAYQYDEKNNKENYVGK
配列3 GSNDKSVCDKNKNLAGDWGFDPAKWAYQYDEKNNKENYVGK
*****
```

10

図1

【配列表】

20

202550785500001.xml

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/054907

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N9/22
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)
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, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DATABASE NCBI Ref Seq [Online] NCBI; 24 January 2020 (2020-01-24), Kjaerbolling T ET AL: "uncharacterized protein BDW43draft_322506 [Aspergillus alliaceus]", XP055948978, Database accession no. XP_031895814 the whole document	1
A	WO 2017/064269 A1 (NOVOZYMES AS [DK]) 20 April 2017 (2017-04-20) the whole document	1-15

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 April 2023

Date of mailing of the international search report

22/05/2023

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Strobel, Andreas

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2023/054907

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:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2023/054907

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2017064269 A1	20-04-2017	CN 108291212 A	17-07-2018
		EP 3362556 A1	22-08-2018
		US 2018163189 A1	14-06-2018
		US 2020002692 A1	02-01-2020
		US 2022064614 A1	03-03-2022
		WO 2017064269 A1	20-04-2017

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 1 1 D 3/386(2006.01)**C 1 1 D 3/386****C 1 2 N 15/55 (2006.01)****C 1 2 N 15/55****C 1 2 N 15/63 (2006.01)****C 1 2 N 15/63****Z**

,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,CO,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,IR,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,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

イエスパ ビン

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

トリーネ ホルスト ソーアアンسن

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

ラース リーマン ヒュリング クレステンسن

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

ペンファイ チャン

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

ヤン クロールヒーゼ ベスタ

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

イエスパ ヘンレク ロング

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

F ターム (参考)

4B065 AA01X AA01Y AA57X AA57Y AA72X AA72Y AA83X AA83Y AA90X AA90Y
AB01 AC14 BA02 CA31 CA57
4H003 AB19 DA01 DA05 DA17 DA19 EA21 EB08 EB14 EB16 EC01
ED02 ED28 FA28 FA34