

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5973166号  
(P5973166)

(45) 発行日 平成28年8月23日 (2016. 8. 23)

(24) 登録日 平成28年7月22日 (2016. 7. 22)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 K 5/10 (2006. 01)

C O 7 K 5/10 Z N A

C O 7 K 5/08 (2006. 01)

C O 7 K 5/08

C 1 1 D 3/38 (2006. 01)

C 1 1 D 3/38

C 1 1 D 3/386 (2006. 01)

C 1 1 D 3/386

C 1 1 D 7/40 (2006. 01)

C 1 1 D 7/40

請求項の数 12 (全 16 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2011-501232 (P2011-501232)  
 (86) (22) 出願日 平成21年3月26日 (2009. 3. 26)  
 (65) 公表番号 特表2011-515449 (P2011-515449A)  
 (43) 公表日 平成23年5月19日 (2011. 5. 19)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2009/053580  
 (87) 国際公開番号 W02009/118375  
 (87) 国際公開日 平成21年10月1日 (2009. 10. 1)  
 審査請求日 平成24年3月26日 (2012. 3. 26)  
 審判番号 不服2015-8293 (P2015-8293/J1)  
 審判請求日 平成27年5月7日 (2015. 5. 7)  
 (31) 優先権主張番号 08153299.6  
 (32) 優先日 平成20年3月26日 (2008. 3. 26)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 500586299  
 ノボザイムス アクティーゼルスカブ  
 デンマーク国, デーコー 2880 バグ  
 スバエルト, クロシェイバイ 36  
 (74) 代理人 100099759  
 弁理士 青木 篤  
 (74) 代理人 100077517  
 弁理士 石田 敬  
 (74) 代理人 100087871  
 弁理士 福本 積  
 (74) 代理人 100087413  
 弁理士 古賀 哲次  
 (74) 代理人 100117019  
 弁理士 渡辺 陽一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 安定化された液体酵素組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式  $B_2 - B_1 - B_0 - H$  のペプチドアルデヒドであって、ここで

H は水素であり；

 $B_0$  は Tyr 残基であり； $B_1$  は 1 個のアミノ酸残基であり；そして $B_2$  は N 末端保護基が結合している 1 又は 2 個のアミノ酸残基である

ことを特徴とするペプチドアルデヒド。

【請求項 2】

 $B_1$  が Ala 又は Val 残基である、請求項 1 記載のペプチドアルデヒド。

10

【請求項 3】

 $B_2$  が N 末端保護基と結合している単一の Gly, Arg 又は Leu 残基である、請求項 1 又は 2 記載のペプチドアルデヒド。

【請求項 4】

 $B_2$  がベンジルオキシカルボニル (Cbz) と結合している単一残基である、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項記載のペプチドアルデヒド。

【請求項 5】

 $B_2$  がアセチル (Ac) N 末端保護基を含んで成る 2 個のアミノ酸残基から成る、請求項 1 又は 2 記載のペプチドアルデヒド。

【請求項 6】

20

B<sub>2</sub>の1個の残基がPhe, Gly又はLeuであり、B<sub>2</sub>の2番目の残基がPhe, Gly, Leu, Tyr又はTrpである、請求項5記載のペプチドアルデヒド。

【請求項7】

B<sub>1</sub>がAla又はVal残基であり；そして

B<sub>2</sub>がベンジルオキシカルボニル(Cbz)と結合している単一のGly, Arg又はLeu残基である

ことを特徴とする請求項1記載のペプチドアルデヒド。

【請求項8】

B<sub>1</sub>がAla又はVal残基であり；そして

B<sub>2</sub>がアセチル(Ac)N末端保護基を含んで成る2個のアミノ酸残基から成り、1個の残基がPhe, Gly又はLeuであり、2番目の残基がPhe, Gly, Leu, Tyr又はTrpであることを特徴とする請求項1記載のペプチドアルデヒド。

10

【請求項9】

式Z-RAY-H, Ac-GAY-H, Z-GAY-H, Z-RVY-H, Z-LVY-H, Ac-LGAY-H, Ac-FGAY-H, Ac-YGAY-H, Ac-FGVY-H又はAc-WLVY-H(ここでZはベンジルオキシカルボニルでありそしてAcはアセチルである)で表される、ペプチドアルデヒド。

【請求項10】

ペプチドアルデヒドZ-RAY-H, Z-GAY-H, Z-RVY-H又はZ-LVY-H(ここでZはベンジルオキシカルボニルである)である、請求項9記載のペプチドアルデヒド。

20

【請求項11】

サブチリシンと請求項1～10のいずれか1項記載のペプチドアルデヒドとを含んでなる液体組成物。

【請求項12】

界面活性剤を更に含んで成る液体洗剤組成物である、請求項11記載の液体組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、サブチリシンと該サブチリシン用の安定化剤としてのペプチド化合物とを含んで成る液体組成物に関する。本発明はまた、サブチリシン用の安定化剤として有用なペプチド化合物にも関する。

30

【背景技術】

【0002】

サブチリシン型プロテアーゼは液体水性洗剤において周知であり、特に洗濯の際の使用が知られている。そのような液体洗剤の場合に一般に遭遇する問題は、組成物中の別の酵素のサブチリシンによる分解とサブチリシンそれ自体の分解である。結果として、液体洗剤中のサブチリシンと別の酵素の安定性が低下し、洗浄力の低下した液体洗剤となる。

【0003】

従来技術は、例えば様々なサブチリシン阻害剤又は安定化剤を添加することにより、液体洗剤中の酵素の貯蔵安定性を改善することを広く扱っている。ホウ酸とボロン酸がタンパク質分解酵素を可逆的に阻害することが知られている。

40

【0004】

液体洗剤中の或る種のプロテアーゼを安定化するためのペプチドアルデヒドの使用はWO 94/04651, WO 98/13458, WO 98/13459, WO 98/13460及びWO 98/13462に開示されている。より詳しくは、WO 94/04651は、サブチリシン型プロテアーゼを安定化するためのペプチドアルデヒドPhe-Gly-Ala-PheH及びPhe-Gly-Ala-LeuHの使用を開示している。WO 94/04651もキモトリプシン型プロテアーゼを安定化するための好適なペプチドアルデヒドとしてのLeu-Leu-TyrHを開示している。更に、WO 94/04651は、ペプチドアルデヒドのN末端保護基としてメチルカルバメート又はメチル尿素を提案している。WO 98/13460は、ペプ

50

チドアルデヒド又はトリフルオロメチルケトンであって、ペプチド鎖が2～5個のアミノ酸を含み、且つ該アルデヒド/トリフルオロメチルケトンがアミノ酸アラニン、バリン、イソロイシン、ロイシン、フェニルグリシン、フェニルアラニン又はホモフェニルアラニンから誘導され、そしてN末端保護基が好ましくはスルホンアミド又はアミドホスフェートである、ペプチドアルデヒド又はトリフルオロメチルケトンのいずれかのペプチド阻害剤の使用を提案している。

【0005】

WO 2007/141736, WO 2007/145963及びWO 2007/145964は、液体洗剤組成物を安定化するための可逆性ペプチドプロテアーゼ阻害剤の使用を開示している。US 2003/157088は、阻害剤で安定化された酵素を含有する組成物を開示している。

10

【0006】

WO 96/41638及びWO 2005/105826は、ペプチドアルデヒド及びケトンを開示している。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明者らは、驚くべきことに、C末端残基としてOH置換フェニルアラニンを有するペプチド化合物をはじめとする、或る種のペプチドアルデヒド又はケトン誘導体が、液体洗剤のような水性組成物中のサブチリシン型プロテアーゼを安定化するのに特に効果的であることを発見した。

【課題を解決するための手段】

20

【0008】

従って、本発明は、サブチリシンと式  $B_2 - B_1 - B_0 - R$  のペプチド化合物とを含んでなる液体組成物であって、ここで

・ R は水素、 $CH_3$ 、 $CX_3$ 、 $CHX_2$  又は  $CH_2X$  (X はハロゲン原子である) であり；そして

・  $B_1$  は単一アミノ酸残基である

ことを特徴とする液体組成物を提供する。

【0009】

$B_0$  はパラ位及び/又はメタ位にOH置換基を有するフェニルアラニン残基であってよく；そして  $B_2$  は1又は複数のアミノ酸残基から成ることができ、 $B_2$  は随意にN末端保護基を含んで成ることができる。あるいは、 $B_0$  は単一アミノ酸残基であってよく；そして  $B_2$  はN末端保護基が結合したGly, Arg又はLeu残基である。

30

【0010】

本発明は更に、式  $B_2 - B_1 - B_0 - R$  のペプチド化合物であって、式中

・ R は水素、 $CH_3$ 、 $CX_3$ 、 $CHX_2$  又は  $CH_2X$  (X はハロゲン原子である) であり；そして

・  $B_1$  は単一アミノ酸残基である

ことを特徴とするペプチド化合物を提供する。

【0011】

$B_0$  はパラ位及び/又はメタ位にOH置換基を有するフェニルアラニン残基であってよく；そして  $B_2$  はN末端保護基としてベンジルオキシカルボニルを有する1又は複数のアミノ酸残基から成ることができ、又は  $B_2$  はN末端保護基が結合したGly, Arg又はLeu残基であってよい。あるいは、 $B_0$  は単一アミノ酸残基であってよく； $B_1$  は小型のアミノ酸残基であってよく；そして  $B_2$  は芳香族N末端保護基が結合したGly, Arg又はLeuの残基である。

40

【発明を実施するための形態】

【0012】

定義

「アミノ酸残基」は、N末端が左側に書かれ、C末端が右側に書かれた  $-NH-CHR-CO-$  のような構造を有する基を示す。

50

## 【 0 0 1 3 】

アミノ酸残基は次のような略号を含む、標準的な 1 文字又は 3 文字記号を使って省略される：アラニン（A）、フェニルアラニン（F）、グリシン（G）、ロイシン（L）、アルギニン（R）、バリン（V）、トリプトファン（W）、チロシン（Y）。略号「Y-H」はチロシナールを表し、即ち、チロシン残基の C 末端がカルボン酸基からアルデヒド基に変換されていることを意味する。チロシナールは既知の方法により調製することができる。

## 【 0 0 1 4 】

## アミノ酸

$B_1$  及び  $B_2$  基中の各アミノ酸残基は、構造  $-NH-(CH(R))_n-C(=O)-$  [ここで  $n = 1 \sim 2$  (好ましくは 1) であり、そして R は次の基： $C_1 \sim C_6$  アルキル；フェニル； $C_7 \sim C_9$  アルキルアリール； $C_4 \sim C_8$  シクロアルキルから選択された、直鎖状又は分枝状及び/又は環状、置換又は非置換構造から選択される) を含む天然型の又は非天然型の - もしくは - アミノ酸であることができる。L 型と D 型の両方が含まれる。

10

## 【 0 0 1 5 】

アミノ酸は - アミノ酸、例えば任意の天然型アミノ酸、ノルバリン (Nva)、ノルロイシン (Nle)、ホモフェニルアラニン (Hph) 又はフェニルグリシン (Pgl) であってよい。 - アミノ炭素原子は D 配置又は L 配置のいずれであってもよい。

## 【 0 0 1 6 】

## ペプチド化合物

チロシンのような OH 置換フェニルアラニンは比較的親水性のアミノ酸であり、ペプチド中にそれが存在すると、一般に、フェニルアラニン、ロイシン、アラニン、システイン、イソロイシン、メチオニン及びバリンのようなより疎水性のアミノ酸 [これらは全てチロシンの負のハイドロパシー指標 (hydropathy index) に比較して正のハイドロパシー指標を有する] に比較して、ペプチドの溶解性が増加するだろう (Kyte & Doolittle (1982), J. Mol. Biol. 157 (1), pp 105-132) (ハイドロパシー指標が大きければ大きいほどより疎水性のアミノ酸になる)。

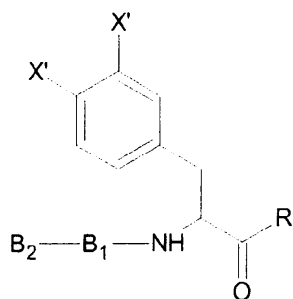
20

## 【 0 0 1 7 】

ペプチド化合物は式

## 【 化 1 】

30



40

## 【 0 0 1 8 】

[式中、R は水素、 $CH_3$ 、 $CX_3$ 、 $CHX_2$  又は  $CH_2X$  (X はハロゲン原子である) であり；X' は OH 又は H であり、少なくとも 1 つの X' 基が OH であり； $B_1$  は単一アミノ酸残基であり；そして  $B_2$  は 1 又は複数のアミノ酸残基であり、 $B_2$  は随意に N 末端保護基を含んで成る]。

を有することができる。

## 【 0 0 1 9 】

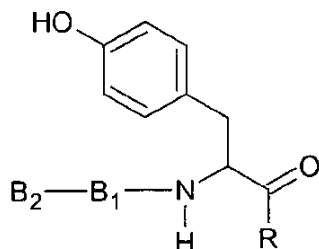
よって、 $B_0$  (C 末端のアミノ酸残基) は、チロシン残基 (パラ (p) - チロシン)、メ

50

タ(m) - チロシン又は 3, 4 - ジヒドロキシフェニルアラニンであってよい。チロシン残基の場合、ペプチド化合物は次の式を有する：

【 0 0 2 0 】

【 化 2 】



10

【 0 0 2 1 】

本発明の特定の一態様では、ペプチド化合物は、C末端残基を包含する3個のみのアミノ酸残基を含んで成る。本発明のこの観点では、合成はよりコストが効果的であり、化合物はより高度に効果的な酵素活性阻害剤であると証明された。好ましくは、わずか3個のアミノ酸残基を有するペプチド化合物は、N末端保護基により保護される。従って、この観点では、本発明は、B<sub>2</sub>がN末端保護基を含んで成る単一アミノ酸残基である化合物に関する。

20

【 0 0 2 2 】

本発明の好ましい観点では、ペプチド化合物は3個のみのアミノ酸残基を含んで成り、B<sub>2</sub>がN末端保護基を含有するアルギニン、グリシン及びロイシンの中から選択されるといふアルデヒド化合物である。ペプチド化合物がわずか3個のアミノ酸残基を含んで成るアルデヒドである場合、B<sub>2</sub>は好ましくはN末端保護基を含有するアルギニンとグリシンの中から選択される。

【 0 0 2 3 】

本発明の別の観点では、ペプチド化合物は少なくとも4個のアミノ酸残基を含んで成る。好ましくは、少なくとも4個のアミノ酸残基を有するペプチド化合物がN末端保護基により保護される。従って、この観点では、本発明は、B<sub>2</sub>がN末端保護基を含んで成る少なくとも2個のアミノ酸残基である化合物に関する。

30

【 0 0 2 4 】

好ましい観点では、ペプチド化合物が少なくとも4個のアミノ酸残基を含んで成る場合、B<sub>2</sub>は無極性の側鎖を有するN末端アミノ酸残基を含んで成る。より具体的な態様では、B<sub>1</sub>への結合箇所から数えてB<sub>2</sub>の2番目のアミノ酸残基は無極性の側鎖を有する。更により具体的な態様では、ペプチド化合物は4個のアミノ酸残基を含んで成り、ここで無極性の側鎖を有するN末端アミノ酸残基はグリシン、ロイシン、フェニルアラニン、チロシン及びトリプトファンの中から選択される。好ましくは、該N末端アミノ酸残基が更にN末端保護基を含んで成る。

40

【 0 0 2 5 】

B<sub>1</sub>は小型のアミノ酸残基であるのが好ましい。より好ましくは、B<sub>1</sub>はアラニン又はバリンである。この点では、次のものが小型アミノ酸であるとみなされる：アラニン、システイン、グリシン、プロリン、セリン、スレオニン、バリン、ノルバリン、ノルロイシン。

【 0 0 2 6 】

ペプチド化合物は、Rが水素であり、B<sub>1</sub>が好ましくはバリンやアラニンのような小型アミノ酸の中から選択された単一アミノ酸であり、B<sub>2</sub>が少なくとも2個のアミノ酸残基を含んで成り、そして前記2個のアミノ酸残基のうちの少なくとも1個がフェニルアラニ

50

ン、グリシン及びロイシンの中から選択され、そしてB<sub>2</sub>の2番目のアミノ酸残基がフェニルアラニン、グリシン、ロイシン、チロシン及びトリプトファンの中から選択された無極性の側鎖を有するというアルデヒドである。好ましくは、B<sub>2</sub>はアセチル(Ac) N末端保護基を含んで成り、特に、ペプチドアルデヒド化合物Ac-FGAY-H, Ac-LGAY-H, Ac-YGAY-H, Ac-FGVY-H及びAc-WLVY-Hを提供する。好ましくは、本発明のこの観点に従う化合物は、10個未満の残基、例えば9, 8, 7, 6, 5個又は最も好ましくは4個のアミノ酸残基を含んで成る。

【0027】

別の観点では、ペプチド化合物はトリペプチドアルデヒドであり、Rが水素であり、B<sub>1</sub>が小型アミノ酸、例えばバリン及びアラニンの中から選択された単一アミノ酸であり、B<sub>2</sub>がアルギニン、グリシン及びロイシンの中から選択されたアミノ酸残基を含んで成る。好ましくは、B<sub>2</sub>がベンジルオキシカルボニル(Z)及びアセチル(Ac)の中から選択されたN末端保護基を含んで成り、特に、ペプチドアルデヒド化合物Z-RAY-H, Z-GAY-H, Z-GAL-H, Z-GAF-H, Z-GAV-H, Z-RVY-H, Z-LVY-H及びAc-GAY-Hを提供する。最も好ましくは、この観点によれば、ベンジルオキシカルボニル(Z) N末端保護基を含んで成る。

【0028】

好ましい観点では、ペプチド化合物が少なくとも4個のアミノ酸残基を含んで成る場合、B<sub>2</sub>は無極性の側鎖を有するN末端アミノ酸残基を含んで成る。本発明の範囲内では、「無極性の側鎖を有するアミノ酸」とは、次の群：フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、バリン、アラニン、プロリン、グリシン、ノルバリン又はノルロイシンから選択された1又は複数のアミノ酸残基を意味する。

【0029】

特に好ましい本発明のペプチドアルデヒドとしては、Z-RAY-H, Ac-GAY-H, Z-GAY-H, Z-GAL-H, Z-GAF-H, Z-GAV-H, Z-RVY-H, Z-LVY-H, Ac-LGAY-H, Ac-FGAY-H, Ac-YGAY-H, Ac-FGVY-H又はAc-WLVY-Hが挙げられ、ここでZはベンジルオキシカルボニルでありそしてAcはアセチルである。

【0030】

N末端保護基

N末端保護基は、ペプチド合成に使用することができる任意のアミノ末端保護基であってよい。Gross & Meinhofer編、The Peptides, 第3巻; 3-88 (1981), Academic Press, New York, 1981は、多数の適当なアミン保護基を開示しており、その目的のため参考として本明細書に組み込まれる。

【0031】

好適な基の例としては、ホルミル、アセチル、ベンゾイル、トリフルオロアセチル、フルオロメトキシカルボニル、メトキシスクシニル、芳香族ウレタン保護基、例えばベンジルオキシカルボニル; 及び脂肪族ウレタン保護基、例えばt-ブチルオキシカルボニル又はアダマンチルオキシカルボニル、p-メトキシベンジルカルボニル(MOZ)、ベンジル(Bn)、p-メトキシベンジル(PMB)又はp-メトキシフェニル(PMP)が挙げられる。

【0032】

好ましくは、本発明のN末端保護基はホルミル、アセチル、ベンゾイル、芳香族又は脂肪族ウレタンの中から、より好ましくはアセチル又はベンジルオキシカルボニルから選択される。ペプチド化合物が3個のアミノ酸を含む場合、N末端保護基は、好ましくは芳香族もしくは脂肪族ウレタン又は芳香族N末端保護基、特にベンジルオキシカルボニル(Cbz)、p-メトキシベンジルカルボニル(MOZ)、ベンジル(Bn)、p-メトキシベンジル(PMB)又はp-メトキシフェニル(PMP)、更に好ましくはベンジルオキシカルボニルである。ペプチド化合物が4個以上のアミノ酸を含む場合、N末端保護基はホルミル、アセチル又はベンゾイルが好ましく、より好ましくはアセチルである。

## 【0033】

液体組成物

好ましい態様では、本発明のペプチド化合物は液体組成物中のサブチリシンを安定化するため又は阻害するために使用され、該液体組成物は界面活性剤と別の酵素とを更に含んでもよい。

## 【0034】

一観点では更に、本発明は、サブチリシン型プロテアーゼをはじめとする酵素を安定化するためそして/又は阻害するための上記に定義したような化合物の使用に関する。好ましい観点では、液体洗剤において酵素が安定化されそして/又は阻害される。液体洗剤への該ペプチド化合物の添加が洗浄力を増加してもよい。

10

## 【0035】

液体組成物は、サブチリシンと随意に第二の酵素とを含んで成る酵素組成物であってよい。第二の酵素はどんな市販の酵素であってもよく、特にプロテアーゼ、アミラーゼ、リパーゼ、セルラーゼ、マンナーゼ、オキシドレダクターゼ、リアーゼ及びそれらの混合物から成る群より選択された酵素であってよい。同一クラスからの酵素（例えばプロテアーゼ）の混合物も含まれる。酵素組成物は別の安定化剤、例えばポリオール、例えばグリセロール又はプロピレングリコールを、例えば25～75重量%の量で含んでもよい。

## 【0036】

液体組成物に使用される酵素の量は、酵素（1又は複数）の型や組成物の種類に従って異なる。液体洗剤のような組成物では、各酵素の量は、純粋な酵素タンパク質として計算すると、典型的には0.04～80マイクロM（ $\mu\text{M}$ ）、特に0.2～30マイクロM、特に0.4～20マイクロM（通常1～2000 mg/l、特に5～750 mg/l、特に10～500 mg/l）であろう。酵素濃縮液のような組成物では、各酵素の量は、純粋な酵素タンパク質として計算すると、典型的には0.01～20 mM、特に0.04～10 mM、特に0.1～5 mM（通常0.3～500 g/l、特に1～300 g/l、特に3～150 g/l）であろう。

20

## 【0037】

酵素は一般に、当業者に既知であろう洗濯効果を提供するのに十分なレベルで洗剤組成物に含められる。通常これは0.0001% (w/w)～5% (w/w)の範囲内であろう。典型的な量は、液体洗剤組成物の重量で0.01%～1%の範囲内である。プロテアーゼに対する本発明に係る酵素安定化剤または阻害剤のモル比は、少なくとも1：1又は1.5：1であり、それは1000：1未満、より好ましくは500：1未満であり、更により好ましくは100：1～2：1、又は20：1～2：1、最も好ましくは該モル比が10：1～3：1である。

30

## 【0038】

特定の一観点では、本発明は、1～95重量%の洗剤界面活性剤（1又は複数）と、0.0001～5重量%のサブチリシンと、0.00001～1重量%の上記で定義したペプチド阻害剤とを含んで成る組成物に関する。より特定の態様では、本発明は、2～60重量%の洗剤界面活性剤（1又は複数）と、0.0005～1重量%のサブチリシンと、0.00005～0.2重量%の上記で定義したペプチド阻害剤とを含んで成る組成物に関する。更により特定の態様では、本発明は、3～50重量%の洗剤界面活性剤（1又は複数）と、0.001～0.5重量%のサブチリシンと、0.0001～0.1重量%の上記で定義したペプチド阻害剤とを含んで成る組成物に関する。

40

## 【0039】

サブチリシン

サブチリシンは動物、植物又は微生物起源のものであってよく、化学的に又は遺伝学的に修飾された変異体を包含する。それはセリンプロテアーゼ、好ましくはアルカリ性細菌プロテアーゼであってよい。その例は、Siezen他（Protein Engineering, 1991, 第4巻, 第7号, 719-737頁）により定義されたI-S群からのサブチリシン型プロテアーゼである。サブチリシンの例は、パチルス由来のもの、例えばサブチリシンノボ（Novo）、サブチリシンカールスバーグ（Carlsberg）、サブチリシンBPN'、サブチリシン309、サブチリシン147、サブチリシン168である（WO 89/06279に記載）。例はWO 1998/0

50

20115, WO 01/44452, WO 01/58275, WO 01/58276, WO 2003/006602及びWO 2004/099401中に記載されている。

【 0 0 4 0 】

市販のプロテアーゼ（ペプチダーゼ）の例としては、カンナーゼ（Kannase）（登録商標）、エバーラーゼ（Everlase）（登録商標）、エスペラーゼ（Eaperase）（登録商標）、アルカラーゼ（Alcalase）（登録商標）、ノイトラーゼ（Neutrased）（登録商標）、デュラザイム（Durazym）（登録商標）、サビナーゼ（登録商標）、オボザイム（Ovozyme）（登録商標）、リカナーゼ（Liquanase）（登録商標）、ポーラーザイム（Polarzyme）（登録商標）、ピラーゼ（Pyrase）（登録商標）、腓トリプシンNOVO（PTN）、バイオ・フィード（Bio-Feed）（登録商標）Pro、及びクリアーレンズ（Clear-Lens）（登録商標）Pro（これら全てNovozymes A/S, Bagsvaerd, Denmarkより入手可能）が挙げられる。別の市販のプロテアーゼとしては、ロノザイム（Ronozyme）（登録商標）Pro、マキサターゼ（Maxatase）（登録商標）、マキサカル（Maxacal）（登録商標）、マキサペム（Maxapem）（登録商標）、オプチクリーン（Opticlean）（登録商標）、プロペラーゼ（Properase）（登録商標）、ピュラフェクト（Purafect）（登録商標）、ピュラフェクトOx（Purafect Ox）（登録商標）、及びピュラフェクト・プライム（Purafect Prime）（これら全てGenencor International Inc., Gist-Brocades, BASFから又はDSM Nutritional Productsから入手可能）が挙げられる。

10

【 0 0 4 1 】

第二の酵素

20

サブチリシンに加えて、液体組成物はアミラーゼ類、リパーゼ類、セルラーゼ類、マンナーゼ類、オキシドレダクターゼ類及びリアーゼ類から成る群から選択された第二の酵素を含んで成ることができ；特に好ましいのは第二の酵素がリパーゼである液体組成物である。

【 0 0 4 2 】

好適なアミラーゼ（及び／又は）類としては、細菌又は真菌起源のものが挙げられる。化学的に又は遺伝子的に修飾された変異体も含まれる。アミラーゼ類としては例えば、GB 1,296,839に記載されたB. リケニフォルミス（*B. licheniformis*）由来の - アミラーゼが挙げられる。市販のアミラーゼはデュラミル（Duramyl）（登録商標）、ターマミル（Termamyl）、ステインザイム（Stainzyme）（登録商標）、ステインザイム・プラス（Stainzyme Plus）（登録商標）、ターマミル・ウルトラ（Termamyl Ultra）（登録商標）、ファンガミル（Fungamyl）（登録商標）及びBAN（登録商標）（Novozymes A/Sより入手可能）及びラピダーゼ（Rapidase）（登録商標）、マキサミルP（Maxamyl P）（登録商標）、ピューラスター（Purastar）及びピューラスターOxAm（Gist-Brocades 及びGenencor Inc.より入手可能）である。

30

【 0 0 4 3 】

好適なセルラーゼ類は細菌又は真菌起源のものであることができる。化学的に又は遺伝的に修飾された変異体も含まれる。それはフミコラ・インソレンス（*Humicola insolens*）由来（US 4,435,307）又はトリコデルマ（*Trichoderma*）、例えばT. リーセイ（*T. reesei*）又はT. ビリデ（*T. viride*）由来の真菌セルラーゼであってよい。セルラーゼ類の例はEP 0 495 257中に記載されている。市販のセルラーゼ類としては、ケアザイム（Carezyme）（登録商標）、セルザイム（Celluzyme）（登録商標）、セルクリーン（Celluclean）（登録商標）、セルクラスト（Celluclast）（登録商標）及びエンドラーゼ（Endolase）（登録商標）（Novozymesより入手可能）、ピュラダックス（Puradax）、ピュラダックスHA及びピュラダックスEG（Genencorより入手可能）が挙げられる。

40

【 0 0 4 4 】

好適なオキシドレダクターゼ類としてはベルオキシダーゼ又はオキシダーゼ、例えばラッカーゼが挙げられる。化学的に又は遺伝的に修飾された変異体も含まれる。ベルオキシダーゼは植物、細菌又は真菌起源のものであってよい。例はコプリヌス（*Coprinus*）の株、例えばC. シネリウス（*C. cinerius*）又はC. マクロリズス（*C. macrorhizus*）由

50



来、又はバチルス (*Bacillus*) の株、例えば *B. ピュミルス* (*B. pumilus*) 由来のペルオキシダーゼ、特に WO 91/05858 に記載のペルオキシダーゼである。ここで好適なラッカーゼ類としては細菌又は真菌起源のものが挙げられる。その例としてはトラメテス (*Trametes*) の株、例えば *T. ビロサ* (*T. villosa*) 又は *T. ベルシコロール* (*T. versicolor*) 由来、又はコプリヌス (*Coprinus*) の株、例えば *C. シネレウス* (*C. cinereus*) 由来、又はミセリオフトラ (*Myceliophthora*) の株、例えば *M. サーモフィラ* (*M. thermophila*) 由来のラッカーゼである。

#### 【 0 0 4 5 】

好適な脂質分解酵素としては、細菌又は真菌起源のリパーゼ又はクチナーゼが挙げられる。化学的に又は遺伝子的に修飾された変異体も含まれる、例としては、EP 258 068 と EP 305 216 に記載されたサーモマイセス・ラヌギノサス (*Thermomyces lanuginosus*) (フミコラ・ラヌギノーザ (*Humicola lanuginosa*)) 由来のリパーゼ、例えば EP 238 023 に記載されたリゾムコル・ミーハイ (*Rhizomucor miehei*) リパーゼ、カンジダ (*Candida*) リパーゼ、*C. カンタークチカ* (*Cantarctica*) リパーゼ、例えば EP 214 761 に記載された *C. アンタークチカ* (*C. antarctica*) リパーゼ A 又は B、フザリウム・オキシスポラム (*Fusarium oxysporum*) リパーゼ (WO 98/26057)、シュードモナス (*Pseudomonas*) リパーゼ、例えば *P. シュードアルカリゲネス* (*P. pseudoalcaligenes*) 及び *P. アルカリゲネス* (*P. alcaligenes*) リパーゼ、例えば EP 218 272 に記載のもの、*P. セパシア* (*P. cepacia*) リパーゼ、例えば EP 331 376 に記載のもの、*P. スツゼリ* (*P. stutzeri*) リパーゼ、例えば BP 1,372,034 に開示されたもの、*P. フルオレセンス* (*P. fluorescens*) リパーゼ、バチルス (*Bacillus*) リパーゼ、例えば *B. サチリス* (*B. subtilis*) リパーゼ (Dartois 他 (1993) *Biochemica et Biophysica acta* 1131, 253-260)、*B. ステアロサーモフィルス* (*B. stearothermophilus*) リパーゼ (JP 64/744992)、*B. ピュミルス* (*B. pumilus*) リパーゼ (WO 91/16422)、ペニシリウム・カメンベルティ (*Penicillium camembertii*) リパーゼ (Yamaguchi 他 (1991), *Gene* 103, 61-67)、ゲオトリカム・カンジダム (*Geotrichum candidum*) リパーゼ (Shimada, Y. 他 (1989), *J. Biochem.* 106, 383-388) 及び様々なリゾプス (*Rhizopus*) リパーゼ類、例えば *R. デレマール* (*R. delemar*) リパーゼ (Hass, M.J. 他 (1991), *Gene* 109, 117-113)、*R. ニベウス* (*R. niveus*) リパーゼ (Kugimiya 他 (1992), *Biosci. Biotech. Biochem.* 56, 716-719) 及び *R. オリゼ* (*R. oryzae*) リパーゼが挙げられる。追加の例はシュードモナス・メンドシナ (*Pseudomonas mendocina*) 由来のクチナーゼ (WO 88/09367)、フザリウム・ソラニ・ピシ (*Fusarium solani pisi*) 由来のクチナーゼ (WO 90/09446) 及びフミコラ・インソレンス (*Humicola insolens*) 由来のクチナーゼ (WO 2001/092502) である。脂質分解酵素はリパーゼ変異体、例えば WO 2000/060063 に記載のものであってよい。

#### 【 0 0 4 6 】

市販のリパーゼ類の例としては、ライベックス (*Lipex*) (登録商標)、リポプライム (*Lipoprime*) (登録商標)、リポパン (*Lipopan*) (登録商標)、リポパン F (登録商標)、リポパン Xtra (登録商標)、リポラーゼ (*Lipolase*) (登録商標)、リポラーゼ Ultra (登録商標)、リポザイム (*Lipozyme*) (登録商標)、パラターゼ (*Palatase*) (登録商標)、レシナーゼ (*Resinase*) (登録商標)、ノボザイム (*Novozyme*) (登録商標) 43 5 及びレシターゼ (*Lecitase*) (登録商標) (これら全て Novozymes A/S より入手可能) が挙げられる。別の市販のリパーゼ類としては、ルマファースト (*Lumafast*) (登録商標) [Genencor International Inc. からのシュードモナス・メンドシナ (*Pseudomonas mendocina*) リパーゼ] ; リポマックス (*Lipomax*) (登録商標) [Gist-Brocades/Genencor Int. Inc. からの *Ps. シュードアルカリゲネス* (*Ps. pseudoalcaligenes*) リパーゼ] ; 及び Solvay enzymes からのバチルス (*Bacillus*) 種リパーゼが挙げられる。更なるリパーゼ類は別の供給業者、例えばリパーゼ P “アマノ (Amano)” (Amano Pharmaceutical Co. Ltd.) から入手可能である。

#### 【 0 0 4 7 】

好適なマンナーゼ類としては細菌又は真菌起源のものが挙げられる。化学的に又は遺

伝子的に修飾された変異体も含まれる。市販のマンナナーゼ類の例としてマンナウェイ (Mannaway) (登録商標) (Novozymesの製品) とマンナスター (MannaStar) (Genencorの製品) が挙げられる。

【 0 0 4 8 】

好適なリアーゼ類としては細菌又は真菌起源のものが挙げられる。化学的に又は遺伝子的に修飾された変異体も含まれる。リアーゼ類の例としてはペクテートリアーゼとペクチンリアーゼが挙げられる。市販のリアーゼ類の例はペクタウオッシュ (Pectawash) (登録商標) 及びペクタウェイ (Pectaway) (登録商標) (ともにNovozymesの製品) が挙げられる。

【 0 0 4 9 】

本発明を下記の実施例により更に説明するが、この実施例は本発明の範囲を限定すると見なしてはならない。

【実施例】

【 0 0 5 0 】

実施例 1

様々なペプチドアルデヒドが一般のペプチド合成会社により、全て > 80% の純度で製造された。ペプチドアルデヒドを使用前に 10 mg/ml の濃度になるように DMSO 中に溶かした。

【 0 0 5 1 】

様々な安定化剤を試験するためにモデル液体洗剤を調製した：

【 0 0 5 2 】

洗剤基剤：

【表 1】

成分	% w/w
アルキルエトキシ硫酸ナトリウム (C9-15, 2EO)	6.0
ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム	3.0
トルエンスルホン酸ナトリウム	3.0
オレイン酸	2.0
第一アルコールエトキシレート (C12-15, 7EO)	3.0
第一アルコールエトキシレート (C12-15, 3EO)	2.5
エタノール	0.5
モノプロピレングリコール	2.0
クエン酸三ナトリウム・2H <sub>2</sub> O	4.0
トリエタノールアミン	0.4
脱イオン水	Ad 100%
NaOHで8.5にpHを調整	

【 0 0 5 3 】

酵素を含む参照洗剤を調製した：

洗剤 A：

【 0 0 5 4 】

【表 2】

成分	% w/w
洗剤基剤	99.0
プロテアーゼ (サビナーゼ (Savinase) 16.0 LEX)	0.5
リパーゼ (リベックス (Lipex) 100L)	0.5

10

20

30

40

50

## 【 0 0 5 5 】

更に本発明の安定化剤を含む下記の洗剤を調製した。これら全ての試料を100 gの洗剤に標準化した：

## 【 0 0 5 6 】

## 【表 3】

洗剤 ID	洗剤 A	安定化剤 (10 mg/ml溶液から)	プロテアーゼに対する 阻害剤のモル超過分
B1	100 g	1.3 mg Z-RAY-H	3
B2	100 g	2.2 mg Z-RAY-H	5
B3	100 g	4.4 mg Z-RAY-H	10
C1	100 g	2.8 mg Ac-GAY-H	10
C2	100 g	7.0 mg Ac-GAY-H	25
D1	100 g	1.8 mg Z-GAY-H	5
D2	100 g	3.6 mg Z-GAY-H	10
E1	100 g	1.4 mg Z-RVY-H	3
E2	100 g	2.3 mg Z-RVY-H	5
E3	100 g	4.6 mg Z-RVY-H	10
F1	100 g	1.3 mg Z-LVY-H	3
F2	100 g	2.1 mg Z-LVY-H	5
F3	100 g	4.3 mg Z-LVY-H	10
G1	100 g	1.1 mg Ac-LGAY-H	3
G2	100 g	1.9 mg Ac-LGAY-H	5
G3	100 g	3.7 mg Ac-LGAY-H	10
H1	100 g	0.6 mg Ac-FGAY-H	1.5
H2	100 g	1.2 mg Ac-FGAY-H	3
H3	100 g	2 mg Ac-FGAY-H	5
H4	100 g	4 mg Ac-FGAY-H	10
H5	100 g	10 mg Ac-FGAY-H	25
I1	100 g	1.2 mg Ac-YGAY-H	3
I2	100 g	2.1 mg Ac-YGAY-H	5
I3	100 g	4.2 mg Ac-YGAY-H	10
J1	100 g	1.3 mg Ac-FGVY-H	3
J2	100 g	2.1 mg Ac-FGVY-H	5
J3	100 g	4.3 mg Ac-FGVY-H	10
K1	100 g	1.5 mg Ac-WLVY-H	3
K2	100 g	2.5 mg Ac-WLVY-H	5
K3	100 g	5.1 mg Ac-WLVY-H	10

## 【 0 0 5 7 】

洗剤を35 と40 の密閉ガラス中に維持した。リパーゼとプロテアーゼの残留活性を、標準酵素分析法を使って様々な時点で測定した（-18 で貯蔵した参照に対する比較により）（プロテアーゼは40 ，pH 8.3でのN，N - ジメチルカゼインの加水分解により測定し、そしてリパーゼは40 ，pH 7.7での吉草酸 p - ニトロフェニルの加水分解により測定した）。下表において、3 × はプロテアーゼ等に比較した阻害剤の3モル超過分を表す。

## 【 0 0 5 8 】

【表 4】

洗剤	残留プロテアーゼ活性	残留リパーゼ活性
	1 週間 40° C	1 週間 35° C
A (参照)	11%	3%
B1 (Z-RAY-H, 3x)	49%	12%
B2 (Z-RAY-H, 5x)	69%	37%
B3 (Z-RAY-H, 10x)	79%	63%
C1 (Ac-GAY-H, 10x)	59%	
C2 (Ac-GAY-H, 25x)	73%	62%
D1 (Z-GAY-H, 5x)	55%	22%
D2 (Z-GAY-H, 10x)	77%	49%
E1 (Z-RVY-H, 3x)	54%	21%
E2 (Z-RVY-H, 5x)	67%	36%
E3 (Z-RVY-H, 10x)	80%	61%
F1 (Z-LVY-H, 3x)	32%	7%
F2 (Z-LVY-H, 5x)	43%	15%
F3 (Z-LVY-H, 10x)	59%	33%
G1 (Ac-LGAY-H, 3x)	62%	33%
G2 (Ac-LGAY-H, 5x)	82%	56%
G3 (Ac-LGAY-H, 10x)	90%	66%
H1 (Ac-FGAY-H, 1.5x)	24%	4%
H2 (Ac-FGAY-H, 3x)	42%	12%
H3 (Ac-FGAY-H, 5x)	78%	63%
H4 (Ac-FGAY-H, 10x)	91%	72%
H5 (Ac-FGAY-H, 25x)	93%	72%
I1 (Ac-YGAY-H, 3x)	53%	14%
I2 (Ac-YGAY-H, 5x)	90%	66%
I3 (Ac-YGAY-H, 10x)	88%	75%
J1 (Ac-FGVY-H, 3x)	62%	48%
J2 (Ac-FGVY-H, 5x)	82%	66%
J3 (Ac-FGVY-H, 10x)	96%	70%
K1 (Ac-WLVY-H, 3x)	26%	3%
K2 (Ac-WLVY-H, 5x)	35%	8%
K3 (Ac-WLVY-H, 10x)	53%	18%

## 【0059】

上記結果は、チロシナルペプチドアルデヒドが非常に有効なプロテアーゼ安定化剤であることを証明する。

## 【0060】

## 実施例 2

次の酵素を含有する参照洗剤を調製した：

洗剤 L：

## 【0061】

10

20

30

40

【表 5】

成分	% w/w
実施例 1 からの洗剤基剤	98.5
プロテアーゼ (サビナーゼ (Savinase) 16.0 LEX)	0.5
リパーゼ (リベックス (Lipex) 100L)	0.5
アミラーゼ (ステインザイム (Stainzyme) 12L)	0.5

【0062】

10

本発明に係る安定化剤を含有する下記の洗剤を調製し、100 g の洗剤に標準化した。

【0063】

【表 6】

洗剤ID	洗剤L	安定化剤 (10 mg/ml 溶液から)	プロテアーゼに対する阻害剤の モル超過分
M	100 g	2 mg Ac-FGAY-H	5

20

【0064】

洗剤を25 と35 の密閉ガラス中に維持した。リパーゼ、アミラーゼ及びプロテアーゼの残留活性を、様々な時点で (w = 週間)、標準酵素分析法を使って測定した (-18 で保存した参照に対する比較により) (プロテアーゼは40 , pH 8.3でのN, N - ジメチルカゼインの加水分解により測定し、リパーゼは40 , pH 7.7での吉草酸 p - ニトロフェニルの加水分解により測定し、そしてアミラーゼは37 , pH 7.35での 4 , 6 - エチリデン - (G<sub>7</sub>) p - ニトロフェニル - (G<sub>1</sub>) - , D - マルトヘプタソイドの加水分解により測定した)。

【0065】

【表 7】

30

% 残留活性	残留プロテアーゼ 活性		残留リパーゼ 活性		残留アミラーゼ 活性	
洗剤	4w35°C	13w25°C	4w35°C	13w25°C	4w35°C	13w25°C
L (参照)	35%	62%	1%	2%	34%	42%
M (Ac-FGAY-H, 5x)	91%	100%	16%	71%	70%	88%

【0066】

チロシナルペプチドアルデヒドが液体洗剤中のプロテアーゼ、リパーゼ及びアミラーゼの貯蔵安定性を有意に改善することがわかった。

40

【0067】

### 実施例 3

ペプチドアルデヒド Z - G A F - H、Z - G A L - H 及び Z - G A Y - H を全て純度 > 80% で、ペプチド合成により製造した。該ペプチドアルデヒドを使用前に10 mg/ml の濃度になるようDMSO中に溶解した。

酵素を含む次の洗剤 N を調製した：

【0068】

【表 8】

成分	% w/w
アルキルエトキシ硫酸ナトリウム (C9-15, 2EO)	20.0
トルエンスルホン酸ナトリウム	3.0
オレイン酸	4.0
第一アルコールエトキシレート (C12-15, 7EO)	2.5
第一アルコールエトキシレート (C12-15, 3EO)	2.0
エタノール	2.1
炭酸ナトリウム	4.5
クエン酸三ナトリウム・2H <sub>2</sub> O	5.0
脱イオン水	Ad 99%
NaOHでpHを8.0に調整	
プロテアーゼ (サピナーゼ (Savinase) 16.0 LEX)	0.5
リパーゼ (リベックス (Lipex) 100L)	0.5

10

【0069】

本発明の安定化剤を用いて次の洗剤を調製し、そして100 gの洗剤に標準化した：

【0070】

20

【表 9】

洗剤 ID	洗剤 N	安定化剤 (10 mg/ml溶液から)	プロテアーゼに対する 阻害剤の モル超過分
P (参照)	100g	なし	0
Q1	100 g	0.16 mg Z-GAL-H	0.5
Q2	100 g	0.31 mg Z-GAL-H	1.0
Q3	100 g	0.62 mg Z-GAL-H	2.0
Q4	100 g	1.6 mg Z-GAL-H	5.0
R1	100 g	0.17 mg Z-GAF-H	0.5
R2	100 g	0.34 mg Z-GAF-H	1.0
R3	100 g	0.68 mg Z-GAF-H	2.0
R4	100 g	1.7 mg Z-GAF-H	5.0
S1	100 g	0.18 mg Z-GAY-H	0.5
S2	100 g	0.35 mg Z-GAY-H	1.0
S3	100 g	0.71 mg Z-GAY-H	2.0
S4	100 g	1.8 mg Z-GAY-H	5.0

30

40

【0071】

洗剤を40 の密閉ガラス中に置いた。1週間後、標準酵素分析法を使ってプロテアーゼの残留活性（-18 で保存した参照への比較により）を測定した（プロテアーゼは40 、pH 8.3でのN，N-ジメチルカゼインの加水分解により測定した）。

40 で1週間後の%残留プロテアーゼ活性：

【0072】

【表 1 0】

プロテアーゼ に対する阻害剤 のモル超過分	Det N (参照)	Det N +Z-GAL-H	Det N +Z-GAF-H	Det N +Z-GAY-H
0	7% (P)			
0.5		12% (Q1)	11% (R1)	13% (S1)
1		17% (Q2)	18% (R2)	28% (S2)
2		31% (Q3)	28% (R3)	41% (S3)
5		42% (Q4)	44% (R4)	65% (S4)

10

## 【 0 0 7 3 】

結果は3つのペプチドアルデヒド全てがプロテアーゼを有効に安定化することを証明する。チロシナルペプチドアルデヒドZ - G A Y - Hは、その他のペプチドアルデヒドと同じ残留活性に到達するのに、プロテアーゼに対する阻害剤のモル超過分がほぼ半分しか必要でないため、最も有効であることがわかった。

20

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
C 1 1 D 7/42	(2006.01)	C 1 1 D 7/42
C 1 1 D 17/08	(2006.01)	C 1 1 D 17/08

(74)代理人 100150810

弁理士 武居 良太郎

(74)代理人 100141977

弁理士 中島 勝

(72)発明者 ニールセン, ローン キールステイン

デンマーク国, デーコー - 2 8 8 0 バグスバエルト, クロシェイバイ 3 6, ノボザイムス アクティーゼルスカブ

(72)発明者 フリース, エスベン ペーター

デンマーク国, デーコー - 2 8 8 0 バグスバエルト, クロシェイバイ 3 6, ノボザイムス アクティーゼルスカブ

(72)発明者 ノーゼル, ユルゲン カーステン フランツ

デンマーク国, デーコー - 2 8 8 0 バグスバエルト, クロシェイバイ 3 6, ノボザイムス アクティーゼルスカブ

(72)発明者 シモンセン, オーレ

デンマーク国, デーコー - 2 8 8 0 バグスバエルト, クロシェイバイ 3 6, ノボザイムス アクティーゼルスカブ

(72)発明者 セーレンセン, ロッテ ルグホルム

デンマーク国, デーコー - 2 8 8 0 バグスバエルト, クロシェイバイ 3 6, ノボザイムス アクティーゼルスカブ

(72)発明者 ミケルセン, リーゼ モンク

デンマーク国, デーコー - 2 8 8 0 バグスバエルト, クロシェイバイ 3 6, ノボザイムス アクティーゼルスカブ

## 合議体

審判長 關 政立

審判官 内藤 伸一

審判官 新留 素子

(56)参考文献 特表平9 - 5 0 3 7 9 3 ( J P , A )

特開平10 - 6 6 5 7 1 ( J P , A )

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 5/00-5/12

C A / R E G I S T R Y

P u b M e d

T h o m s o n I n n o v a t i o n