



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년03월12일
 (11) 등록번호 10-1956895
 (24) 등록일자 2019년03월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C11D 3/386 (2006.01) **C07K 5/06** (2006.01)
C07K 5/08 (2006.01)
 (21) 출원번호 **10-2014-7001037**
 (22) 출원일자(국제) **2012년06월29일**
 심사청구일자 **2017년06월19일**
 (85) 번역문제출일자 **2014년01월14일**
 (65) 공개번호 **10-2014-0053102**
 (43) 공개일자 **2014년05월07일**
 (86) 국제출원번호 **PCT/EP2012/062760**
 (87) 국제공개번호 **WO 2013/004636**
 국제공개일자 **2013년01월10일**
 (30) 우선권주장
 11172357.3 2011년07월01일
 유럽특허청(EPO)(EP)
 (56) 선행기술조사문헌
 JP07278095 A
 (뒷면에 계속)
 전체 청구항 수 : 총 13 항

(73) 특허권자
노보자임스 에이/에스
 덴마크 디케이-2880 박스바에르트 크룩쇼이베이 36
 (72) 발명자
미켈센 리스 문크
 덴마크 디케이-2610 로에도브르 리스브로베이 34
폰지니 프란체스코
 이탈리아 아이-20094 코르시코 (엠아이) 포스콜로 36
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
특허법인와이에스장

심사관 : 윤미란

(54) 발명의 명칭 **안정화된 서브틸리신 조성물**

(57) 요약

펩티드 알데히드의 하이드로설파이트 부가물로의 전환은 펩티드 알데히드의 정제에서 수용성을 증가시키는데 사용될 수 있다. 유리하게, 이러한 하이드로설파이트 부가물은 그 자체가 서브틸리신 억제제 및 안정화제로서 효과적이며, 또한 존재한다면 제2 효소를 안정화시킬 수 있다. 하이드로설파이트 부가물은 서브틸리신 억제제로서 효과적이며, 하이드로설파이트 부가물은 저장 동안 액체 세제 중 자신의 억제력 및 안정화 효과를 유지한다. 따라서, 하이드로설파이트 부가물의 사용은, 하이드로설파이트 부가물을 펩티드 알데히드로 다시 전환시키는 비용 및 시간을 피할 수 있고, 추후 펩티드 알데히드의 건조를 피할 수 있으며, 이는 분말 형태로 또는 매우 희석된 수용액으로서 펩티드 알데히드를 취급하는 불편함을 피할 수 있다.

(72) 발명자

비사치아 로베르토

이탈리아 아이-24039 소토 일 몬테 지오반니 23세
(비지) 비아 모나스테롤로 3

카네보티 레나토

이탈리아 아이-20863 콘코레쥬 (엠비) 비아 아다
13

(56) 선행기술조사문헌

US04691007 A

US6500802 B1

US5436229 A

WO1998013459 A1

명세서

청구범위

청구항 1

서브틸리신, 및 화학식이 $X-B^1-NH-CHR-CHOH-SO_3M$ 인 펩티드 알데히드 하이드로설파이트 부가물을 포함하며, 상기 화학식에서

- a) M은 H(수소) 또는 알칼리 금속이고;
 - b) R은 $NH-CHR-CO$ 가 L-아미노산 또는 D-아미노산 잔기이도록 하는 기이며;
 - c) B^1 은 Ala, Cys, Gly, Pro, Ser, Thr, Val, Nva, 또는 Nle의 잔기이고;
 - d) X는 B^2 , B^3-B^2 , $Z-B^2$, 또는 $Z-B^3-B^2$ 이며, B^2 및 B^3 각각은 하나의 아미노산 잔기를 나타내고, Z는 N-말단 보호 기이고,
- B^2 는 Val, Gly, Ala, Arg, Leu, Phe 또는 Thr의 잔기이고,
- B^3 은 Phe, Tyr, Trp, 페닐글리신, Leu, Val, Nva, Nle 또는 Ile의 잔기인 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, R은 $NH-CHR-CO$ 가 Tyr, m-타이로신, 3,4-디하이드록시페닐알라닌, Phe, Val, Met, Nva, Leu, Ile 또는 Nle의 L-아미노산 또는 D-아미노산 잔기이도록 하는 기인 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, Z는 벤질옥시카르보닐(Cbz), p-메톡시벤질 카르보닐(MOZ), 벤질(Bn), 벤조일(Bz), p-메톡시벤질(PMB), p-메톡시페닐(PMP), 포르밀, 아세틸(Ac), 메틸옥시, 또는 메틸옥시카르보닐인 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 액체 또는 과립 형태인 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 계면활성제를 추가로 포함하는 제제인 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 제2 효소, 리파제, 큐티나제, 아밀라제, 카르보하이드라제, 셀룰라제, 펙티나제, 펙테이트 리아제, 만나나제, 아라비나제, 갈락타나제, 자일라나제, 옥시다제, 락카제 또는 퍼옥시다제를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 7

서브틸리신, 화학식이 $X-B^1-NH-CHR-CHOH-SO_3M$ (여기서, M, R, B^1 및 X는 제1항에 정의된 바와 같음)인 펩티드 알데히드 하이드로설파이트 부가물을 포함하는 수용액, 및 선택적으로 계면활성제를 혼합하는 단계를 포함하는, 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 조성물을 제조하는 방법.

청구항 8

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 조성물에 사용하기 위한, 화학식이 $X-B^1-NH-CHR-CHOH-SO_3M$ 이되, M 및 X는 제1항에 정의된 바와 같고, B^1 은 프롤린(Pro)과 상이한 아미노산 잔기이며, R은 $NH-CHR-CO$ 가 Tyr, m-타이로신, 3,4-디하이드록시페닐알라닌, Phe, Val, Met, Nva 또는 Nle의 L-아미노산 또는 D-아미노산 잔기이도록 하는 기

인 펩티드 알데히드 하이드로설파이트 부가물인 화합물.

청구항 9

제8항에 있어서, Cbz-RA-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H, Ac-GA-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H, Cbz-GA-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H, Cbz-GG-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H, Cbz-RV-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H, Cbz-LV-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H, Ac-LGA-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H, Ac-FGA-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H, Ac-YGA-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H, Ac-FGV-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H, 또는 Ac-WLV-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H(여기서, Ac는 아세틸이고 Cbz는 벤질옥시카르보닐임)인 화합물.

청구항 10

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 조성물에 사용하기 위한, 화학식이 X-B¹-NH-CHR-CHOH-SO₃M이되, M, R 및 X는 제1항에 정의된 바와 같고, B¹은 알라닌(Ala), 시스테인(Cys), 글리신(Gly), 세린(Ser), 트레오닌(Thr), 발린(Val), 노르발린(Nva) 또는 노르루신(Nle)의 아미노산 잔기인 펩티드 알데히드 하이드로설파이트 부가물인 화합물.

청구항 11

제10항에 있어서, Cbz-GA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H, Cbz-VA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H, Cbz-GA-NHCH(CH₂Ph)C(OH)(SO₃M)-H, Cbz-GA-NHCH(CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H, Cbz-GG-NHCH(CH₂Ph)C(OH)(SO₃M)-H, Ac-FGA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H, Ac-FGA-NHCH(CH₂Ph)C(OH)(SO₃M)-H, Ac-FGA-NHCH-(CH₂CH₂SCH₃)(SO₃M)-H, MeO-CO-VA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H, MeNCO-VA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H, MeO-CO-FGA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H, MeO-CO-FGA-NHCH(CH₂Ph)C(OH)(SO₃M)-H, MeSO₂-FGA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H, MeSO₂-VA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H, PhCH₂O(OH)(O)P-VA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H, EtSO₂-FGA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H, PhCH₂SO₂-VA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H, PhCH₂O(OH)(O)P-LA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H, PhCH₂O(OH)(O)P-FA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H, 또는 MeO(OH)(O)P-LGA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H(여기서, Ac는 아세틸이고 Cbz는 벤질옥시카르보닐임)인 화합물.

청구항 12

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 조성물에 사용하기 위한, 화학식이 X-B¹-NH-CHR-CHOH-SO₃M이되, R 및 M은 제1항에 정의된 바와 같고; B¹은 프롤린(Pro)과 상이한 하나의 아미노산 잔기를 나타내며; X는 B², B³-B², Z-B², Z-B³-B²이되, B³ 및 B²는 각각 하나의 아미노산 잔기를 나타내고, Z는 N-말단 보호기이며; B²는 Gly, Thr 또는 Val인 펩티드 알데히드 하이드로설파이트 부가물인 화합물.

청구항 13

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 조성물에 사용하기 위한, 화학식이 X-B¹-NH-CHR-CHOH-SO₃M이되, R 및 M은 제1항에 정의된 바와 같고; B¹은 프롤린(Pro)과 상이한 하나의 아미노산 잔기를 나타내며; X는 B³-B², Z-B³-B²이되, B³ 및 B²는 각각 하나의 아미노산 잔기를 나타내고, Z는 N-말단 보호기이며; B³은 Phe, Tyr, Trp, 페닐글리신, Leu, Val, Nva, Nle 또는 Ile인 펩티드 알데히드 하이드로설파이트 부가물인 화합물.

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 서열 목록에 대한 참조

[0002] 본 출원은 컴퓨터로 판독가능한 형태로 서열 목록을 포함한다.

[0003] 기술분야

[0004] 본 발명은 펩티드 알데히드 유도체에 의해 안정화되는 서브틸리신을 포함하는 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 또한 상기 조성물을 제조하는 방법, 및 조성물 중 사용을 위한 화합물에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] WO 제98/13458호, WO 제94/04651호, WO 제98/13460호, WO 제95/25791호, 및 WO 제2009/118375호는 펩티드 알데히드에 의해 안정화된 서브틸리신 유형의 프로테아제를 포함하는 액체 세제를 개시한다. WO 제2011/036153호는 미립자 서브틸리신 함유 세제에 펩티드 알데히드의 첨가로 세정력을 개선시킬 수 있음을 개시한다.

[0006] 알데히드는 NaHSO₃가 있는 가용성 부가물(비설파이트 또는 하이드로설파이트 부가물)을 형성할 수 있고, 펩티드 알데히드는 드물게 수용성인 경향이 있는 것이 잘 알려져 있다.

[0007] WO 제98/47523호 및 US 제6,500,802호는 펩티드-2-아미노-1-하이드록시알칸설폰산 및 프로테아제 억제제로서 이의 용도를 개시한다. US 제5,436,229호는 L-아르기닌 알데히드 유도체의 비설파이트 부가물 및 트롬빈 억제제로서 이의 용도를 개시한다.

[0008] US 제4,703,036호, US 제4,478,745호 및 US 제5,578,574호는 건조 형태로 펩티드 알데히드를 제조하는 방법을 개시한다.

발명의 내용

[0009] 안정화된 서브틸리신 조성물의 대규모 생산에서, 안전성 및 공정 고려 사항 모두에 있어서 액체 원료를 취급하는 것은 매우 바람직하다. 펩티드 알데히드는 드물게 수용성인 경향이 있는데, 이는 농축된 수용액의 제조를 어렵거나 불가능하게 만들고, 액체 제형에서의 사용을 위하여 또는 과립 조성물을 만드는 과립화를 위하여 안정화된 서브틸리신 용액을 만들 때 건조 생성물 또는 매우 희석된 수용액의 사용을 필요하게 만든다.

[0010] 펩티드 알데히드의 하이드로설파이트 부가물로의 전환은 펩티드 알데히드의 정제에서 수용성을 증가시키는데 사용될 수 있다. 유리하게, 본 발명자들은 이러한 하이드로설파이트 부가물이 그 자체가 서브틸리신 억제제 및 안정화제로서 효과적이며, 또한 존재한다면 제2(비 서브틸리신) 효소를 안정화시킬 수 있다는 것을 발견하였다. 본 발명자들은 하이드로설파이트 부가물이 서브틸리신 억제제로서 효과적임을 발견하였으며, 하이드로설파이트 부가물이 저장 동안 액체 세제 중 자신의 억제력 및 안정화 효과를 유지하는 것을 발견하였다. 따라서, 하이드로설파이트 부가물의 사용은, 하이드로설파이트 부가물을 펩티드 알데히드로 다시 전환시키는 비용 및 시간을 피할 수 있고, 추후 펩티드 알데히드의 건조를 피할 수 있으며, 이는 분말 형태로 또는 매우 희석된 수용액으로서 펩티드 알데히드를 취급하는 불편함을 피할 수 있다. 더욱이, 펩티드 알데히드 비설파이트 부가물의 첨가는 또한 서브틸리신 함유 세제의 세정력(세척 성능)을 개선시킬 수 있다.

[0011] 따라서, 본 발명은 서브틸리신, 및 화학식이 X-B¹-NH-CHR-CHOH-SO₃M인 펩티드 알데히드 하이드로설파이트 부가물을 포함하는 조성물을 제공한다. 상기 화학식의 기는 하기 의미를 가진다:

- [0012] a) M은 H(수소) 또는 알칼리 금속, 바람직하게는 Na 또는 K이고;
- [0013] b) R은 NH-CHR-CO가 L-아미노산 또는 D-아미노산 잔기(하기에서는 B⁰로 나타냄)이도록 하는 기이며;
- [0014] c) B¹은 하나의 아미노산 잔기이고;
- [0015] d) X는 선택적으로 N-말단 보호기를 포함하는 1개 이상(바람직하게는 1개 또는 2개)의 아미노산 잔기로 이루어진다.

[0016] 본 발명은 추가로 상기 조성물을 제조하는 방법을 제공하는데, 상기 방법은 서브틸리신, 화학식이 X-B¹-NH-CHR-CHOH-SO₃M(여기서, M, R, B¹ 및 X는 상기와 같이 정의됨)인 펩티드 알데히드 하이드로설파이트 부가물을 포함하는 수용액, 및 선택적으로 계면활성제를 혼합하는 단계를 포함한다.

[0017] 추가적으로, 본 발명은 상기 조성물에 사용하기 위한 화합물을 제공하는데, 상기 화합물은 화학식이 X-B¹-NH-CHR-CHOH-SO₃M인 펩티드 알데히드 하이드로설파이트 부가물이다. R은 p-하이드록시-벤질일 수 있고, M, B¹ 및 X는 상기와 같이 정의된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 안정화된 서브틸리신 조성물

[0019] 본 발명의 조성물은 서브틸리신 및 펩티드 알데히드 하이드로설파이트 부가물을 포함하고, 상기 조성물은 선택적으로 제2 효소를 포함할 수 있다. 본 조성물은 액체 또는 과립 형태일 수 있다. 본 조성물은 추가로 계면활성제를 포함하는 세제 조성물일 수 있다.

[0020] 액체 또는 과립 세제와 같은 조성물에서, 각각의 효소(서브틸리신 및 선택적인 제2 효소)의 양은 통상적으로 순수한 효소 단백질로서 계산된 0.04마이크로-M 내지 80마이크로-M(또는 마이크로-몰/kg), 특히 0.2마이크로-M 내지 30마이크로-M, 특히 0.4마이크로-M 내지 20마이크로-M(일반적으로, 1mg/1(또는 mg/kg) 내지 2000mg/1(또는 mg/kg), 특히 5mg/1 내지 750mg/1, 특히 10mg/1 내지 500mg/1)일 것이다. 효소 농축물과 같은 조성물에서, 각각의 효소의 양은 통상적으로 순수한 효소 단백질로서 계산된 0.01mM 내지 20mM, 특히 0.04mM 내지 10mM, 특히 0.1mM 내지 5mM(일반적으로, 0.3g/1 내지 500g/1, 특히 1g/1 내지 300g/1, 특히 3g/1 내지 150g/1)일 것이다.

[0021] 본 발명에 따른 효소 안정화제 또는 억제제 대 서브틸리신의 몰비는 적어도 1:1 또는 1.5:1이고, 상기 몰비는 1000:1 미만, 더 바람직하게는 500:1 미만, 훨씬 더 바람직하게는 100:1 내지 2:1 또는 20:1 내지 2:1이거나, 또는 가장 바람직하게 상기 몰비는 10:1 내지 3:1이다.

[0022] 펩티드 알데히드

[0023] 본 방법에서 사용되는 비설파이트 부가물은 화학식이 X-B¹-B⁰-H(여기서, 기는 상기와 같이 정의되며, B⁰은 화학식이 NH-CHR-CO인 L-배열 또는 D-배열인 단일의 아미노산 잔기임)인 펩티드 알데히드로부터 유도될 수 있다.

[0024] NH-CHR-CO(B⁰)는 L-아미노산 또는 D-아미노산 잔기인데, 여기서 R은 지방족 또는 방향족 측쇄, 예컨대 아랄킬 예를 들어 벤질일 수 있고, R은 선택적으로 치환될 수 있다. 더 구체적으로, B⁰ 잔기는 대형(bulky), 중성, 극성, 소수성 및/또는 방향족일 수 있고, 선택적으로는 치환될 수 있다. 예로는 Tyr(*p*-타이로신), *m*-타이로신, 3,4-디하이드록시페닐알라닌, Phe, Val, Met, 노르발린(Nva), Leu, Ile 또는 노르루신(Nle)의 D-형태 또는 L-형태, 특히 Tyr, *m*-타이로신, 3,4-디하이드록시페닐알라닌, Phe, Val, Met, Nva 또는 Nle의 D-형태 또는 L-형태가 있다.

[0025] 상기 화학식 X-B¹-B⁰-H에서, B¹ 잔기는 특히 소형, 지방족, 소수성 및/또는 중성일 수 있다. 예로는 알라닌(Ala), 시스테인(Cys), 글리신(Gly), 프롤린(Pro), 세린(Ser), 트레오닌(Thr), 발린(Val), 노르발린(Nva) 및 노르루신(Nle), 특히 Ala, Cys, Gly, Ser, Thr, Val, Nva 및 Nle이 있다.

[0026] X는 특히 선택적인 N-말단 보호기를 가지는 1개 또는 2개의 아미노산 잔기일 수 있다(즉, 화합물이 보호기가 있거나 보호기가 없는 트리펩티드 또는 테트라펩티드 알데히드임), 따라서, X는 B², B³-B², Z-B², Z-B³-B²일 수 있

으며, 여기서 B³ 및 B² 각각은 1개의 아미노산 잔기를 나타내고, Z는 N-말단 보호기이다.

- [0027] B² 잔기는 특히 소형, 지방족 및/또는 중성일 수 있으며, 예컨대 Ala, Gly, Thr, Arg, Leu, Phe 또는 Val, 특히 Gly, Thr 또는 Val일 수 있다.
- [0028] B³ 잔기는 특히 대형, 소수성, 중성 및/또는 방향족일 수 있고, 선택적으로는 치환될 수 있으며, 예컨대 Phe, Tyr, Trp, 페닐알라닌, Leu, Val, Nva, Nle 또는 Ile일 수 있다.
- [0029] (존재한다면) N-말단 보호기 Z는 포르밀, 아세틸(Ac), 벤조일, 트리플루오로아세틸, 플루오로메톡시 카르보닐, 메톡시숙시닐, 방향족 및 지방족 우레탄 보호기, 벤질옥시카르보닐(Cbz), t-부틸옥시카르보닐, 아다만틸옥시카르보닐, p-메톡시벤질 카르보닐(MOZ), 벤질(Bn), p-메톡시벤질(PMB) 또는 p-메톡시페닐(PMP), 메톡시카르보닐(Moc); 메톡시아세틸(Mac); 메틸 카르바메이트 또는 메틸아미노 카르보닐/메틸 우레아 기로부터 선택될 수 있다. 보호기가 있는 테트라펩티드 알데히드(즉, X = Z-B³-B²)의 경우, Z는 바람직하게 소형 지방족 기, 예컨대 포르밀, 아세틸, 플루오로메톡시 카르보닐, t-부틸옥시카르보닐, 메톡시카르보닐(Moc); 메톡시아세틸(Mac); 메틸 카르바메이트 또는 메틸아미노 카르보닐/메틸 우레아 기이다. 보호기가 있는 트리펩티드 알데히드(즉, X = Z-B²)의 경우, Z는 바람직하게 대형 방향족 기, 예를 들어 벤조일, 벤질옥시카르보닐, p-메톡시벤질 카르보닐(MOZ), 벤질(Bn), p-메톡시벤질(PMB) 또는 p-메톡시페닐(PMP)이다.
- [0030] 적당한 펩티드 알데히드는 WO 제94/04651호, WO 제95/25791호, WO 제98/13458호, WO 제98/13459호, WO 제98/13460호, WO 제98/13461호, WO 제98/13462호, WO 제2007/141736호, WO 제2007/145963호, WO 제2009/118375호, WO 제2010/055052호 및 WO 제2011/036153호에 기술되어 있다. 더 구체적으로, 펩티드 알데히드는 Z-RAY-H, Ac-GAY-H, Z-GAY-H, Z-GAL-H, Z-VAL-H, Z-GAF-H, Z-GAV-H, Z-GGY-H, Z-GGF-H, Z-RVY-H, Z-LVY-H, Ac-LGAY-H, Ac-FGAY-H, Ac-YGAY-H, Ac-FGAL-H, Ac-FGAF-H, Ac-FGVY-H, Ac-FGAM-H, Ac-WLVY-H, MeO-CO-VAL-H, MeNCO-VAL-H, MeO-CO-FGAL-H, MeO-CO-FGAF-H, MeSO₂-FGAL-H, MeSO₂-VAL-H, PhCH₂O(OH)(O)P-VAL-H, EtSO₂-FGAL-H, PhCH₂SO₂-VAL-H, PhCH₂O(OH)(O)P-LAL-H, PhCH₂O(OH)(O)P-FAL-H, 또는 MeO(OH)(O)P-LGAL-H일 수 있다. 여기서, Z는 벤질옥시카르보닐이고, Me는 메틸이며, Et는 에틸이고, Ac는 아세틸이며, H는 수소이고, 나머지 문자는 표준 한문자 표기로 나타낸 아미노산 잔기를 나타낸다(예컨대, F = Phe, Y = Tyr, L = Leu).
- [0031] 대안적으로, 펩티드 알데히드는 화학식이 WO 제2010/055052호에 기술된 바와 같을 수 있으며:
- [0032] P-O-(A_i-X')_n-A_{n+1}-Q
- [0033] 여기서 Q는 수소, CH₃, CX₃, CHX₂, 또는 CH₂X이 되, X는 할로젠 원자이고;
- [0034] 하나의 X'는 "이중 N-캐핑 기" 인 CO, CO-CO, CS, CS-CS 또는 CS-CO, 가장 바람직하게는 유리도(urido)(CO)이며, 나머지 X'는 없고,
- [0035] N은 1 내지 10, 바람직하게는 2 내지 5, 가장 바람직하게는 2이며,
- [0036] 각각의 A_i 및 A_{n+1}은
- [0037] X= -CO-의 오른쪽에 대한 잔기에 있어서 -NH-CR-CO-, 또는
- [0038] X= -CO-의 왼쪽에 대한 잔기에 있어서 -CO-CR-NH-
- [0039] 의 구조를 가지는 아미노산 잔기이 되,
- [0040] R은 H- 또는 선택적으로 헤테로 원자를 포함할 수 있고 선택적으로 N 원자에 연결될 수 있는 선택적으로 치환된 알킬 또는 알킬아릴 기이고,
- [0041] P는 수소 또는 임의의 C-말단 보호기이다.
- [0042] 이와 같은 펩티드 알데히드의 예는 α-MAPI, β-MAPI, F-우레아-RVY-H, F-우레아-GGY-H, F-우레아-GAF-H, F-우레아-GAY-H, F-우레아-GAL-H, F-우레아-GA-Nva-H, F-우레아-GA-Nle-H, Y-우레아-RVY-H, Y-우레아-GAY-H, F-CS-RVF-H, F-CS-RVY-H, F-CS-GAY-H, 안티파인, GE20372A, GE20372B, 키모스타틴 A, 키모스타틴 B, 및 키모스타틴 C를 포함한다.
- [0043] 펩티드 알데히드의 추가 예는 WO 제2010/055052호 및 WO 제2009/118375호, WO 제94/04651호, WO 제98/13459호,

WO 제98/13461호, WO 제98/13462호, WO 제2007/145963호(P&G)에 개시되어 있으며, 이는 본원에 참조로 포함되어 있다.

[0044] **펩티드 알데히드 하이드로설파이트 부가물**

[0045] 펩티드 알데히드 하이드로설파이트 부가물은 상기 기술된 펩티드 알데히드로부터 유도될 수 있다.

[0046] 구체적인 예로는 Cbz-RA-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H, Ac-GA-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H, Cbz-GA-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H, Cbz-GA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H, Cbz-VA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H, Cbz-GA-NHCH(CH₂Ph)C(OH)(SO₃M)-H, Cbz-GA-NHCH(CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H, Cbz-GG-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H, Cbz-GG-NHCH(CH₂Ph)C(OH)(SO₃M)-H, Cbz-RV-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H, Cbz-LV-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H, Ac-LGA-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H, Ac-FGA-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H, Ac-YGA-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H, Ac-FGA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H, Ac-FGA-NHCH(CH₂Ph)C(OH)(SO₃M)-H, Ac-FGV-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H, Ac-FGA-NHCH-(CH₂CH₂SCH₃)(SO₃M)-H, Ac-WLV-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H, MeO-CO-VA-NHCH-(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H, MeNCO-VA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H, MeO-CO-FGA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H, MeO-CO-FGA-NHCH(CH₂Ph)C(OH)(SO₃M)-H, MeSO₂-FGA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H, MeSO₂-VA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H, PhCH₂O(OH)(O)P-VA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H, EtSO₂-FGA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H, PhCH₂SO₂-VA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H, PhCH₂O(OH)(O)P-LA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H, PhCH₂O(OH)(O)P-FA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H, MeO(OH)(O)P-LGA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H, 및 F-우레아-RV-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H가 있으며, 여기서 M은 음전하, H, Na, 또는 K 또는 다른 반대 이온이다.

[0047] **서브틸리신**

[0048] 서브틸리신은 세린 프로테아제의 하위 그룹이다. 세린 프로테아제는 펩티드 결합의 가수분해를 촉진하는 효소이며, 상기 세린 프로테아제에는 활성 부위에 필수적인 세린 잔기가 있다(White, Handler 및 Smith, 1973 "Principles of Biochemistry," Fifth Edition, McGraw-Hill Book Company, NY, pp. 271-272). 서브틸리신은 문헌[Siezen *et al.*, Protein Engng. 4 (1991) 719-737]; 및 [Siezen *et al.*, Protein Science 6 (1997) 501-523]에 정의된 바와 같은 I-S1 및 I-S2 하위 그룹을 포함하거나, 바람직하게는 상기 I-S1 및 I-S2 하위 그룹으로 이루어진다. 세린 프로테아제의 활성 부위의 고도로 보존된 구조로 인하여, 본 발명에 따른 서브틸리신은 Siezen *et al.*(상기함)에 의하여 서브틸라제로 지정된 제안된 하위 그룹과 기능적으로 동등할 수 있다.

[0049] 서브틸리신은 화학적으로 또는 유전자가 변형된 돌연변이체(단백질 조작 변이체)를 포함하여, 동물, 식물 또는 미생물 기원을 가질 수 있다. 서브틸리신의 예로는 바실러스(*Bacillus*), 예컨대 서브틸리신 노보(Novo), 서브틸리신 칼스버그(Carlsberg), 서브틸리신 BPN', 서브틸리신 309, 서브틸리신 147 및 서브틸리신 168(WO 제 89/06279호에 기술되어 있음) 및 프로테아제 PD138(WO 제93/18140호)로부터 유래하는 것이 있다. 예는 WO 제 98/020115호, WO 제01/44452호, WO 제01/58275호, WO 제01/58276호, WO 제03/006602호 및 WO 제04/099401호에 기술되어 있다. 기타 다른 예로는 WO 제92/19729호, WO 제98/20115호, WO 제98/20116호, WO 제98/34946호, WO 제2011/036263호에 기술된 변이체 및 프로테아제의 혼합물이 있다.

[0050] 상업적으로 입수가능한 서브틸리신의 예는 Kannase™, Everlase™, Relase™, Esperase™, Alcalase™, Durazym™, Savinase™, Ovozyme™, Liquanase™, Coronase™, Polarzyme™, Pyrase™, 췌장 트립신 노보(Pancreatic Trypsin NOVO: PTN), Bio-Feed™ Pro 및 Clear-Lens™ Pro; Blaze(모두 Novozymes A/S(덴마크 백스베어드 소재)로부터 입수가능함)를 포함한다. 기타 다른 상업적으로 입수가능한 서브틸리신은 Ronozyme™ Pro, Maxatase™, Maxacal™, Maxapem™, Opticlean™, Properase™, Purafast™, Purafect™, Purafect Ox™, Purafact Prime™, Excellase™, FN2™, FN3™ 및 FN4™(Genencor International Inc., Gist-Brocades, BASF, 또는 DSM으로부터 입수가능함)를 포함한다. 기타 다른 예로는 Primase™ 및 Duralase™, Blap R, Blap S 및 Blap X(Henkel로부터 입수가능함)가 있다.

[0051] **제2 효소**

- [0052] 서브틸리신에 추가적으로, 세제 조성물은 선택적으로 제2 효소, 예를 들어 리파제, 큐티나제, 아밀라제, 카르보하이드라제, 셀룰라제, 펙티나제, 펙테이트 리아제, 만나나제, 아라비나제, 갈락타나제, 자일라나제, 옥시다제, 락카제, 및/또는 퍼옥시다제를 포함할 수 있다. 조성물은 1개, 2개 이상의 비 서브틸리신 효소를 포함할 수 있다.
- [0053] 리파제 및 큐티나제
- [0054] 적당한 리파제 및 큐티나제는 박테리아 또는 진균 기원의 것을 포함한다. 화학적으로 변형되거나 또는 단백질 조각된 돌연변이체가 포함된다. 예로는 EP 제258,068호 및 EP 제305,216호에 기술된 바와 같은 썬모마이세스 (*Thermomyces*) 유래, 예컨대 티. 라누기노수스(*T. lanuginosus*; 이전에는 후미콜라 라누기노사(*Humicola lanuginosa*)로 명명됨) 유래의 리파제, WO 제96/13580호에 기술된 후미콜라, 예컨대 에이치. 인솔렌스(*H. insolens*) 유래의 큐티나제, 예컨대 피. 알카리게네스(*P. alcaligenes*) 또는 피. 수도알카리게네스(*P. pseudoalcaligenes*)(EP 제218,272호), 피. 세파시아(*P. cepacia*)(EP 제331,376호), 피. 스투체리(*P. stutzeri*)(GB 제1,372,034호), 피. 플루오레센스(*P. fluorescens*), 수도모나스 종(*Pseudomonas sp.*) 균주 SD 705(WO 제95/06720호 및 WO 제96/27002호), 피. 위스콘시넨시스(*P. wisconsinensis*)(WO 제96/12012호) 유래의 수도모나스 리파제, 비. 서브틸리스(*B. subtilis*)(Dartois et al., 1993, *Biochemica et Biophysica Acta*, 1131: 253-360), 비. 스테아로써모필러스(*B. stearothermophilus*)(JP 제64/744992호) 또는 비. 푸미러스(*B. pumilus*)(WO 제91/16422호) 유래의 바실러스 리파제를 포함한다.
- [0055] 기타 다른 예로는 리파제 변이체, 예를 들어 WO 제92/05249호, WO 제94/01541호, EP 제407,225호, EP 제260,105호, WO 제95/35381호, WO 제96/00292호, WO 제95/30744호, WO 제94/25578호, WO 제95/14783호, WO 제95/22615호, WO 제97/04079호, WO 제97/07202호, WO 제00/060063호, WO 제2007/087508호 및 WO 제2009/109500호에 기술된 것이 있다.
- [0056] 바람직한 상업적으로 입수가 가능한 리파제 효소는 Lipolase™, Lipolase Ultra™, 및 Lipex™, Lecitase™, Lipolex™; Lipoclean™, Lipoprime™(Novozymes A/S)을 포함한다. 기타 다른 상업적으로 입수가 가능한 리파제는 Lumafast(Genencor Int Inc); Lipomax(Gist-Brocades/Genencor Int Inc) 및 바실러스 종 리파제(Solvay)를 포함한다.
- [0057] 아밀라제
- [0058] 적당한 아밀라제(α 및/또는 β)는 박테리아 또는 진균 기원의 것을 포함한다. 화학적으로 변형되거나 또는 단백질 조각된 돌연변이체가 포함된다. 아밀라제는 예를 들어 바실러스, 예컨대 바실러스 리체니포르미스 (*Bacillus licheniformis*)의 특수 균주로부터 얻은 α -아밀라제를 포함하며, 이는 GB 제1,296,839호에 더 상세히 기술되어 있다.
- [0059] 유용한 아밀라제의 예로는 WO 제94/02597호, WO 제94/18314호, WO 제96/23873호, 및 WO 제97/43424호에 기술된 변이체, 특히 15번, 23번, 105번, 106번, 124번, 128번, 133번, 154번, 156번, 181번, 188번, 190번, 197번, 202번, 208번, 209번, 243번, 264번, 304번, 305번, 391번, 408번, 및 444번 위치 중 하나 이상에서 치환이 있는 변이체가 있다.
- [0060] 상업적으로 입수가 가능한 아밀라제로는 Stainzyme; Stainzyme Plus; Duramyl™, Termamyl™, Termamyl Ultra; Natalase, Fungamyl™ 및 BAN™(Novozymes A/S), Rapidase™ 및 Purastar™(Genencor International Inc.)가 있다.
- [0061] 리아제
- [0062] 펙테이트 리아제는 예컨대 US 제6,124,127호, WO 제1999/027083호, WO 제1999/027084호, WO 제2002/006442호, WO 제2002/092741호, WO 제2003/095638호에 기술된 바와 같은, 바실러스, 특히 비. 리체니포르미스 또는 비. 아가라드하에렌스(*B. agaradhaerens*)로부터 유래한 야생형 효소, 또는 이 중 임의의 것 유래의 변이체일 수 있다. 상업적으로 입수가 가능한 펙테이트 리아제로는 Xpect; Pectawash 및 Pectaway(Novozymes A/S)가 있다.
- [0063] 만나나제
- [0064] 만나나제는 패밀리 5 또는 26의 알칼리 만나나제일 수 있다. 이는 바실러스 또는 후미콜라, 특히 비. 아가라드하에렌스, 비. 리체니포르미스, 비. 할로두란스(*B. halodurans*), 비. 클라우시이(*B. clausii*), 또는 에이치. 인

솔렌스 유래의 야생형일 수 있다. 적당한 만나나제는 WO 제1999/064619호에 기술되어 있다. 상업적으로 입수가 가능한 만나나제로는 Mannaway(Novozymes A/S)가 있다.

[0065] **셀룰라제**

[0066] 적당한 셀룰라제는 박테리아 또는 진균 기원의 것을 포함한다. 화학적으로 변형되거나 또는 단백질 조작된 돌연 변이체가 포함된다. 적당한 셀룰라제는 바실러스 속, 수도모나스 속, 후미콜라 속, 푸사리움 속, 티에라비아 속, 아크레모니움 속 유래의 셀룰라제, 예컨대 US 제4,435,307호, US 제5,648,263호, US 제5,691,178호, US 제5,776,757호 및 WO 제89/09259호에 개시된 후미콜라 인솔렌스, 마이셀리오프토라 써모필라(*Myceliophthora thermophila*) 및 푸사리움 옥시스포룸(*Fusarium oxysporum*)으로부터 생성된 진균 셀룰라제를 포함한다.

[0067] 특히 적당한 셀룰라제는 색상 보호 이점이 있는 알칼리 또는 중성 셀룰라제가 있다. 이와 같은 셀룰라제의 예로는 EP 제0,495,257호, EP 제0,531,372호, WO 제96/11262호, WO 제96/29397호, WO 제98/08940호에 기술된 셀룰라제가 있다. 기타 다른 예로는 셀룰라제 변이체, 예를 들어 WO 제94/07998호, EP 제0,531,315호, US 제5,457,046호, US 제5,686,593호, US 제5,763,254호, WO 제95/24471호, WO 제98/12307호 및 WO 제99/01544호에 기술된 것이 있다.

[0068] 상업적으로 입수가 가능한 셀룰라제로는 Celluzyme, Celluclean; Endloase; Carezyme; Renozyme; whitezyme(Novozymes A/S)이 있다.

[0069] **펩티드 알데히드 및 하이드로설파이트/비설파이트 부가물의 제조**

[0070] 펩티드 알데히드는 교재, 예컨대 [March, J. Advanced Organic Chemistry, fourth edition, Wiley-Interscience, US 1992, p 895]에 기술된 바와 같이, 소듐 비설파이트와의 반응에 의해 수용성 하이드로설파이트 부가물로 전환될 수 있다.

[0071] 하이드로설파이트 부가물로의 전환은 가역적이다(Ex J. Am. Chem. Soc. 1978, 100, 1228). 따라서, 부가물은 부분적으로 또는 완전히 되돌아가서 액체 세제, 액체 서브틸리신 제형, 또는 세탁수 중에서 펩티드 알데히드를 방출할 수 있다.

[0072] 해당 펩티드 알데히드는 공지된 방법, 예컨대 최종 건조 단계를 생략함으로써 US 제4,703,036호, US 제4,478,745호 또는 US 제5,578,574호에 기술된 바와 같이 제조될 수 있거나, 또는 문헌[J. Pept. Sci. 2007; 13; 1-15]에서 검토되거나 문헌[Synthesis 1983, 676]에 예시된 방법 중 임의의 것에 의해 제조될 수 있다. 펩티드 알데히드는 고체로서 미정제의 것이거나, 정제되거나 분리될 수 있거나, 유기 용매에 의해 용액 중에 보관될 수 있다.

[0073] 비설파이트 부가물의 수용액은 공지된 방법에 의해, 예컨대 WO 제98/47523호; US 제6,500,802호; US 제5,436,229호; 문헌[J. Am. Chem. Soc. 1978, 100, 1228]; [Org. Synth., Coll. Vol. 7: 361]에 기술된 바와 같이, 해당 펩티드 알데히드를 소듐 비설파이트(소듐 하이드로겐 설파이트, NaHSO₃); 포타슘 비설파이트(KHSO₃)의 수용액과 반응시킴으로써 제조될 수 있다.

[0074] **세제 조성물**

[0075] 세제는 과립 또는 액체 세제일 수 있다. 액체 세제는 고체(또는 기체)가 아닌 물리적 형태이며, 부을 수 있는 액체, 부을 수 있는 겔 또는 부을 수 있지 않은 겔일 수 있다. 액체 세제는 등방성 또는 구조화, 바람직하게는 등방성일 수 있다. 이는 자동 세척기에서의 세척 또는 손 세척에 유용한 제형을 포함한다. 세제는 적어도 하나의 계면활성제를 포함한다. 세제는 또한 빌더(builder)를 포함할 수 있다.

[0076] 미립자 세제 조성물은 과립 또는 분말, 또는 정제로 압착된 분말/과립, 브리케트일 수 있다. 조성물은 정제, 막대 또는 파우치, 예를 들어 다중 구획 파우치의 형태일 수 있다. 조성물은 분말, 예를 들어 자유 유동성 분말, 예를 들어 덩어리, 분무 건조된 분말, 캡슐형, 압출형, 칩형, 국수형, 플레이크 또는 이의 임의의 조합의 형태일 수 있다.

[0077] 세제 성분은 물에 용해될 수 있는 파우치 또는 상이한 층의 정제(하기 단위 용량을 참조함)로 구획에 의해 물리적으로 서로 분리될 수 있다. 이에 의하여 성분 간의 부정적인 저장 상의 상호작용은 피할 수 있다. 각각의 구획의 상이한 용해 프로파일은 또한 세정 용액 중 선택된 성분의 용해의 지연이 일어나게 할 수 있다.

[0078] 파우치는 예컨대 물과의 접촉 전에 파우치로부터 조성물의 방출이 가능하게 하지 않으면서, 조성물을 유지하는데 적당한 임의의 형태, 형상 및 물질을 가질 수 있다. 파우치는 내부 용적을 둘러싸는 수용성 필름으로 만들어

진다. 상기 내부 용적은 파우치의 구획으로 나누어질 수 있다. 바람직한 필름은 중합체 물질, 바람직하게는 필름 또는 시트로 형성되는 중합체이다. 바람직한 중합체, 공중합체 또는 이의 유도체는 폴리아크릴레이트, 및 수용성 아크릴레이트 공중합체, 메틸 셀룰로스, 카르복시 메틸 셀룰로스, 소듐 텍스트린, 에틸 셀룰로스, 하이드록시에틸 셀룰로스, 하이드록시프로필 메틸 셀룰로스, 말토 텍스트린, 폴리 메타크릴레이트, 가장 바람직하게는 폴리비닐 알코올 공중합체 및 하이드록시프로필 메틸 셀룰로스(HPMC)로부터 선택된다. 바람직하게 필름 중 중합체, 예를 들어 PVA의 수준은 적어도 약 60%이다. 바람직한 평균 분자량은 통상적으로 약 20,000 내지 약 150,000일 것이다. 필름은 또한 가수분해로 분해 가능한 수용성 중합체 배합물, 예를 들어 폴리락티드 및 폴리비닐 알코올(Chris Craft In. Prod. Of Gary, Ind.(미국)에 의해 판매되는 바와 같은 상표 번호 M8630으로 알려짐)을 글리세롤, 에틸렌 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 소르비톨 및 이의 혼합물과 같은 가소제와 함께 포함하는 배합 조성물일 수 있다. 파우치는 고체 세탁 세정 조성물 또는 부분 성분 및/또는 수용성 필름에 의해 분리된 액체 세정 조성물 또는 부분 성분을 포함할 수 있다. 조성물 중 액체 성분을 위한 구획은 고체를 포함하는 구획과 상이할 수 있다(예컨대 US 제2009/0011970호 참조).

[0079] 세제 성분의 선택은 예를 들어 식물 관리를 위하여 세정될 식물의 유형의 고려 사항, 얼룩의 유형 및/또는 정도, 세정이 실시되는 온도, 및 세제 제품의 제형을 포함할 수 있다. 하기 언급된 성분이 특정 기능에 따라 일반적인 헤더(header)로 분류되지만, 성분은 추가적인 기능을 포함할 수 있음이 당업자에 의해 인식될 것이므로 이는 제한으로 해석되어서는 안된다.

[0080] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 안정화된 서브틸리신 조성물은 세척액 1리터당 0.001mg 내지 100mg의 단백질, 예를 들어 0.01mg 내지 100mg의 단백질, 바람직하게는 0.005mg 내지 50mg의 단백질, 더 바람직하게는 0.01mg 내지 25mg의 단백질, 훨씬 더 바람직하게는 0.05mg 내지 10mg의 단백질, 가장 바람직하게는 0.05mg 내지 5mg의 단백질, 그리고 심지어 가장 바람직하게는 0.01mg 내지 1mg의 단백질에 해당하는 양으로 세제 조성물에 첨가될 수 있다.

[0081] 단위 용량

[0082] 단위 용량 제품은 재사용할 수 없는 용기 중 단일 용량으로 포장한 것이다. 세탁 및 식기세척용 세제에 갈수록 더 사용된다. 세제 단위 용량 제품은 단일 세척에 사용되는 세제의 양을 (예컨대, 수용성 필름으로 만들어진 파우치 내로) 포장한 것이다.

[0083] 하나의 양태에서, 세제 조성물은 단위 용량 형태이다. 단위 용량 형태의 세제 제품은 정제, 캡슐, 사쇄, 파우치 등을 포함한다. 하나의 양태에서, 본원에서의 사용을 위한 것으로 수용성 필름 및 수용성 파우치로 감싸져 있는 정제가 있다. 본 발명의 세제 조성물의 중량은 약 10그램 내지 약 25그램, 약 12그램 내지 약 24그램 또는 심지어 14그램 내지 22그램이다. 이러한 중량은 자동 식기세척기용 세제 제품 디스펜서 피트에 매우 편리하다. 세제 조성물을 봉하는 수용성 물질이 있는 단위 용량 제품의 경우에, 수용성 물질은 조성물의 부분으로서 고려되지 않는다. 하나의 양태에서 단위 용량 형태는 수용성 파우치(즉, 세제 조성물을 봉하는 수용성 필름)이고, 하나의 양태에서 다중 구획 파우치는 복수의 구획을 형성하는 복수의 필름을 가진다. 이러한 구성은 조성물의 최적화 및 유연성에 기여한다. 이는 상이한 성분들의 분리 및 제어 방출을 가능하게 한다. 하나의 양태에서, 하나의 구획은 고체 형태로 세제 조성물을 포함하고, 다른 구획은 액체 형태로 세제 조성물을 포함한다.

[0084] 하나의 양태에서, 2개의 상이한 구획이 있는 다중 구획 파우치 실시형태는 2가지의 상이한 세정제를 포함할 수 있다. 하나의 양태에서, 이러한 2개 구획의 필름은 상이한 용해 프로파일을 가지며, 이는 상이한 시각에 동일 또는 상이한 제제의 방출을 가능하게 한다. 예를 들어, 하나의 구획(제1 구획)으로부터의 제제는 세척 공정에서 일찍 전달되어 오염 제거를 도울 수 있고, 다른 구획(제2 구획)으로부터의 제2 제제는 제1 구획으로부터의 제제보다 적어도 2분, 또는 심지어 5분 늦게 전달될 수 있다.

[0085] 하나의 양태에서, 적어도 2개의 상이한 구획이 2가지 상이한 세제 조성물을 포함하는, 다른 구획 상에 겹쳐진 2개의 나란히 있는 구획을 포함하는 다중 구획 파우치가 개시된다.

[0086] 복수의 구획을 형성하는 복수의 수용성 동봉 물질에 의해 다중 구획 팩이 형성되며, 구획 중 하나는 세제 조성물의 일부 또는 모든 성분을 포함할 것이고, 다른 구획은 액체 조성물을 포함할 수 있으며, 액체 조성물은 수성일 수 있고(즉, 액체 조성물의 중량에 대하여 물을 10% 초과로 포함함), 구획은 따뜻한 수용성 물질로 만들어질 수 있다. 하나의 실시형태에서, 하나의 구획은 차가운 수용성 물질로 만들어진다. 이는 상이한 성분들의 분리 및 제어 방출을 가능하게 한다. 다른 실시형태에서, 구획은 모두 따뜻한 수용성 물질로 만들어진다.

[0087] 적당한 팩은 다른 구획 상에 겹쳐진(즉, 위에 놓여진) 적어도 2개의 나란히 있는 구획을 포함하며, 특히 파우치

가 적당하다. 이러한 배치는 팩의 긴밀함, 견고성 및 강도에 기여하고, 이는 추가적으로 수용성 물질의 필요량을 최소화한다. 이는 3개의 구획을 형성하는데 단지 3조각의 물질만을 필요로 한다. 팩의 견고성은 또한 팩의 물리적 온전성을 손상시키지 않고 매우 얇은 필름의 사용을 가능하게 한다. 구획이 고정된 기하학적 구조의 기계 디스펜서에 사용되도록 접힐 필요가 없으므로, 팩은 또한 사용하기에 매우 용이하다. 팩의 구획 중 적어도 2개는 2가지의 상이한 세제 조성물을 포함한다. 본원에서 "상이한 조성물"은 적어도 1가지 성분이 상이한 세제 조성물을 의미한다.

[0088] 하나의 양태에서, 구획 중 적어도 1개는 고체 세제 조성물을 포함하고, 다른 구획은 수성 액체 세제 조성물을 포함하며, 조성물은 통상적으로 고체 대 액체 중량비가 약 20:1 내지 약 1:20, 약 18:1 내지 약 2:1 또는 약 15:1 내지 약 5:1이다. 이러한 종류의 팩은 넓은 범위의 고체:액체 비율 값을 가지는 조성물을 수용할 수 있으므로, 매우 다용성이다. 많은 세제 성분이 특히 고체 형태로의, 하나의 양태에서 분말 형태로의 사용에 적당하므로 파우치는 높은 고체:액체 비율을 가진다. 본원에서 정의된 고체:액체 비율은 팩 중 모든 고체 조성물의 중량과 모든 액체 조성물의 중량 사이의 관계를 말한다.

[0089] 적당한 고체:액체 중량비는 약 2:1 내지 약 18:1, 또는 약 5:1 내지 약 15:1이다. 이러한 중량비는 세제의 성분의 대부분이 액체 형태인 경우에 적당하다.

[0090] 하나의 양태에서, 2개의 나란히 있는 구획은 동일 또는 상이할 수 있는 액체 세제 조성물을 포함하고, 다른 구획은 고체 세제 조성물을 예를 들어 분말 형태로, 하나의 양태에서는 고밀화된 분말을 포함한다. 고체 조성물은 팩의 강도 및 견고성에 기여한다.

[0091] 특히 자동 식기세척기에서 디스펜서 피트의 이유로, 본원에서 단위 용량 형태 제품은 정사각형 또는 직사각형의 하부를 가지고, 높이는 약 1cm 내지 약 5cm, 또는 약 1cm 내지 약 4cm이다. 하나의 양태에서, 고체 조성물의 중량은 약 5그램 내지 약 20그램, 또는 약 10그램 내지 약 15그램이고, 액체 조성물의 중량은 약 0.5그램 내지 약 4그램, 또는 약 0.8그램 내지 약 3그램이다. 하나의 양태에서, 상이한 구획을 형성하는 필름 중 적어도 2개는 동일 조건 하에서 용해도가 상이하다. 이는 상이한 시점에 필름이 부분적으로 또는 전적으로 동봉하는 조성물의 방출을 가능하게 한다.

[0092] 다중 구획 파우치의 성분의 제어 방출은 필름의 두께 및/또는 필름 물질의 용해도를 변경시킴으로써 달성될 수 있다. 필름 물질의 용해도는 예를 들어 WO 제2002/102955호에 기술된 바와 같이 필름을 가교시킴으로써 지연될 수 있다. 행균 방출용으로 설계된 기타 다른 수용성 필름은 US 제4,765,916호 및 US 제4,972,017호에 기술되어 있다. 필름의 왁스 코팅(US 제5,453,216호 참조)은 행균 방출에 도움을 줄 수 있다. pH 제어 방출 수단은 US 제5,453,216호에 기술되어 있으며, 특히 선택적인 아세틸화 정도를 가지는 아미노-아세틸화 다당류이다.

[0093] 구획이 용해도가 상이한 필름으로 만들어진, 상이한 구획이 있는 다중 구획 파우치에 의해 방출의 지연을 얻는 기타 다른 수단은 US 제6,727,215호에 교시되어 있다.

[0094] 계면활성제

[0095] 세제 조성물은 1가지 이상의 계면활성제를 포함할 수 있으며, 상기 계면활성제는 음이온성 및/또는 양이온성 및/또는 비이온성 및/또는 반극성 및/또는 양쪽이온성, 또는 이의 혼합물일 수 있다. 특정 실시형태에서, 세제 조성물은 1가지 이상의 비이온성 계면활성제 및 1가지 이상의 음이온성 계면활성제의 혼합물을 포함하지만, 또한 개별적으로도 사용될 수 있다.

[0096] 계면활성제(들)는 통상적으로 약 0.1중량% 내지 60중량%, 예를 들어 약 1중량% 내지 약 40중량%, 또는 약 3중량% 내지 약 20중량%, 또는 약 3중량% 내지 약 10중량%의 수준으로 존재한다. 계면활성제(들)는 원하는 세정 적용에 기초하여 선택되며, 당업계에 공지된 임의의 통상적인 계면활성제(들)를 포함한다. 세제에서의 사용을 위하여 당업계에 공지된 임의의 계면활성제가 이용될 수 있다.

[0097] 음이온성 계면활성제의 비제한적인 예는 설페이트 및 설포네이트, 특히 선형 알킬벤젠설포네이트(LAS), LAS의 이성질체, 분지형 알킬벤젠설포네이트(BABS), 페닐알칸설포네이트, 알파-올레핀설포네이트(AOS), 올레핀 설포네이트, 알켄 설포네이트, 알칸-2,3-디일비스(설페이트), 하이드록시알칸설포네이트 및 디설포네이트, 알킬 설페이트(AS) 예를 들어 소듐 도데실 설페이트(SDS), 지방 알코올 설페이트(FAS), 일차 알코올 설페이트(PAS), 알코올 에테르설페이트(AES 또는 AEOS 또는 FES, 또한 알코올 에톡시설페이트 또는 지방 알코올 에테르 설페이트로 알려짐), 예를 들어 소듐 라우릴 에테르 설페이트(SLES), 비누 또는 지방산; 2차 알칸설포네이트(SAS), 파라핀 설포네이트(PS), 에스테르 설포네이트, 설포네이트화 지방산 글리세롤 에스테르, 알파-설포 지방산 메틸 에스테르(알파-SFMe 또는 SES) 예를 들어 메틸 에스테르 설포네이트(MES), 알킬숙신산 또는 알케닐숙신산, 도데세

닐/테트라세닐 숙신산(DTSA), 아미노산의 지방산 유도체, 설폰-숙신산 또는 비누의 디에스테르 및 모노에스테르, 및 이의 조합물을 포함한다.

[0098] 세제에 포함될 때, 세제는 음이온성 계면활성제를 보통 약 1중량% 내지 약 40중량%, 예를 들어 약 5중량% 내지 약 30중량%, 예를 들어 약 5중량% 내지 약 15중량%, 또는 약 20중량% 내지 약 25중량%로 포함할 것이다.

[0099] 비이온성 계면활성제의 비제한적인 예는 알코올 에톡실레이트(AE 또는 AEO), 알코올 프로폭실레이트, 프로폭실화 지방 알코올(PFA), 알콕실화 지방산 알킬 에스테르, 예를 들어 에톡실화 및/또는 프로폭실화 지방산 알킬 에스테르, 알킬페놀 에톡실레이트(APE), 노닐페놀 에톡실레이트(NPE), 알킬폴리글리코시드(APG), 알콕실화 아민, 지방산 모노에탄올아미드(FAM), 지방산 디에탄올아미드(FADA), 에톡실화 지방산 모노에탄올아미드(EFAM), 프로폭실화 지방산 모노에탄올아미드(PFAM), 폴리하이드록시 알킬 지방산 아미드, 또는 글루코사민의 N-아실 N-알킬 유도체(글루카미드, GA, 또는 지방산 글루카미드, FAGA)뿐만 아니라, 상표명 SPAN 및 TWEEN 하에서 이용가능한 제품, 및 이의 조합물을 포함한다.

[0100] 세제에 포함될 때, 세제는 비이온성 계면활성제를 보통 약 0.2중량% 내지 약 40중량%, 예를 들어 약 0.5중량% 내지 약 30중량%, 특히 약 1중량% 내지 약 20중량%, 약 3중량% 내지 약 10중량%, 예를 들어 약 3중량% 내지 약 5중량%, 또는 약 8중량% 내지 약 12중량%로 포함할 것이다.

[0101] 빌더

[0102] 세제 조성물은 세제 빌더 또는 보조 빌더(co-builder), 또는 이의 혼합물을 약 0중량% 내지 65중량% 포함할 수 있다. 식기 세척용 세제에서, 빌더의 수준은 통상적으로 40% 내지 65%, 특히 50% 내지 65%이다. 빌더 및/또는 보조 빌더는 특히 Ca 및 Mg와 수용성 착물을 형성하는 킬레이트화제일 수 있다. 세척용 세제에서의 사용을 위하여 당업계에 공지된 임의의 빌더 및/또는 보조 빌더가 이용될 수 있다. 빌더의 비제한적인 예는 제올라이트, 디포스페이트(피로포스페이트), 트리포스페이트, 예를 들어 소듐 트리포스페이트(STP 또는 STPP), 니트릴로트리아세트산, 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA), 디에틸렌트리아민펜타아세트산, 알킬숙신산 또는 알케닐숙신산, 카르보네이트 예를 들어 소듐 카르보네이트, 가용성 실리케이트 예를 들어 소듐 메타실리케이트, 층상 실리케이트(예컨대, SKS-6(Hoechst)), 에탄올아민 예를 들어 2-아미노에탄-1-올(MEA), 이미노디에탄올(DEA) 및 2,2',2''-니트릴로트리아에탄올(TEA), 및 카르복시메틸이눌린(CMI), 및 이의 조합물을 포함한다.

[0103] 빌더는 강한 빌더, 예를 들어 메틸 글리신 디아세트산("MGDA") 또는 N,N-디카르복시메틸 글루탐산 테트라소듐 염(GLDA)일 수 있거나, 빌더는 중간 빌더, 예를 들어 소듐 트리-폴리-포스페이트(STPP)일 수 있거나, 또는 약한 빌더, 예를 들어 소듐 시트레이트일 수 있다.

[0104] 표백 시스템

[0105] 세제 조성물은 표백 시스템을 0중량% 내지 50중량% 함유할 수 있다. 세척용 세제에서의 사용을 위하여 당업계에 공지된 임의의 표백 시스템이 이용될 수 있다. 적당한 표백 시스템 성분은 표백 촉매, 광표백제, 표백 활성화제, 과산화수소의 공급원 예를 들어 소듐 퍼카르보네이트 및 소듐 퍼보레이트, 미리 형성된 과산(peracid) 및 이의 혼합물을 포함한다. 적당한 미리 형성된 과산은 이에 제한되는 것은 아니지만 퍼옥시카르복시산 및 염, 퍼카르본산 및 염, 피어미드산 및 염, 퍼옥시일황산 및 염, 예를 들어 Oxone(R), 및 이의 혼합물을 포함한다. 표백 시스템의 비제한적인 예는 과산화물계 표백 시스템을 포함하며, 이는 예를 들어 무기염, 예를 들어 알칼리 금속 염, 예를 들어 퍼보레이트(보통 모노-수화물 또는 테트라-수화물), 퍼카르보네이트, 퍼셀페이트, 퍼포스페이트, 퍼실리케이트 염의 나트륨 염을 과산 형성 표백 활성화제와 조합하여 포함할 수 있다. 표백 활성화제는 본원에서 과산화수소와 같은 과산소 표백제와 반응하여 과산을 형성하는 화합물을 의미한다. 이렇게 형성된 과산은 활성화된 표백제를 구성한다. 본원에서 사용되는 적당한 표백 활성화제는 에스테르 아미드, 이미드 또는 무수물의 부류에 속하는 것을 포함한다. 적당한 예로는 테트라세틸 아틸렌 디아민(TAED), 소듐 3,5,5-트리메틸 헥사노일옥시벤젠 설포네이트, 디퍼옥시 도데칸산, 4-(도데카노일옥시)벤젠설포네이트(LOBS), 4-(테카노일옥시)벤젠설포네이트, 4-(테카노일옥시)벤조에이트(DOBS), 4-(3,5,5-트리메틸헥사노일옥시)벤젠설포네이트(ISONOBS), 테트라아세틸에틸렌디아민(TAED) 및 4-(노나노일옥시)벤젠설포네이트(NOBS), 및/또는 WO 제98/17767 호에 개시된 것이 있다. 관심의 표백 활성화제의 특정 패밀리는 EP 제624154호에 개시되었으며, 상기 패밀리에서 특히 바람직한 것은 아세틸 트리에틸 시트레이트(ATC)이다. ATC 또는 트리아신(Triacin)과 같은 단쇄 트리글리세리드는 궁극적으로 시트르산과 알코올로 분해되므로 친환경적이라는 이점이 있다. 또한 아세틸 트리에틸 시트레이트와 트리아세틴은 저장 시 제품에서의 가수 분해 안정성이 양호하고, 효율적인 표백 활성화제이다. 마지막으로 ATC는 세탁 첨가제에 양호한 형성(building) 능력을 제공한다. 대안적으로, 표백 시스템은 예를 들어 아

미드, 이미드, 또는 설펜 유형의 피옥시산을 포함할 수 있다. 표백 시스템은 또한 과산, 예를 들어 6-(프탈로일 아미노)피카프론산(PAP)을 포함할 수 있다. 표백 시스템은 또한 표백 촉매를 포함할 수 있다.

[0106] 세제 조성물의 기타 다른 성분(이는 모두 당업계에 잘 알려져 있음)은 하이드로트롭프, 직물 색조 부여제 (fabric hueing agent), 소포제, 오염 제거 중합체, 오염 재부착 방지제 등을 포함한다.

[0107] **방법 및 조성물**

[0108] 제1 양태에서, 본 발명은 서브틸리신 및 화학식이 $X-B^1-NH-CHR-CHOH-SO_3M$ 인 펩티드 알데히드 하이드로설파이트 부가물을 포함하는 조성물을 제공하며, 여기서

[0109] a) M은 H(수소) 또는 알칼리 금속이고;

[0110] b) R은 $NH-CHR-CO$ 가 L-아미노산 또는 D-아미노산 잔기이도록 하는 기이며;

[0111] c) B^1 은 하나의 아미노산 잔기이고;

[0112] d) X는 선택적으로 N-말단 보호기를 포함하는 하나 이상의 아미노산 잔기로 이루어진다.

[0113] 실시형태에서, R은 $NH-CHR-CO$ 가 Tyr, m-타이로신, 3,4-디하이드록시페닐알라닌, Phe, Val, Met, Nva, Leu, Ile 또는 Nle의 L-아미노산 또는 D-아미노산 잔기이도록 하는 기이다.

[0114] 실시형태에서, B^1 은 Ala, Cys, Gly, Pro, Ser, Thr, Val, Nva, 또는 Nle의 잔기이다.

[0115] 실시형태에서, X는 B^2 , B^3-B^2 , $Z-B^2$, 또는 $Z-B^3-B^2$ 이며, B^2 및 B^3 각각은 하나의 아미노산 잔기를 나타내고, Z는 B-말단 보호기이다. 바람직하게, B^2 는 Val, Gly, Ala, Arg, Leu, Phe 또는 Thr의 잔기이다. 바람직하게, B^3 은 Phe, Tyr, Trp, 페닐글리신, Leu, Val, Nva, Nle 또는 Ile의 잔기이다.

[0116] 실시형태에서, Z는 벤질옥시카르보닐(Cbz), p-메톡시벤질 카르보닐(MOZ), 벤질(Bn), 벤조일(Bz), p-메톡시벤질 (PMB), p-메톡시페닐(PMP), 포르밀, 아세틸(Ac), 메틸옥시, 또는 메틸옥시카르보닐이다.

[0117] 실시형태에서, 조성물은 액체 또는 과립 형태이다. 바람직하게, 조성물은 계면활성제를 추가로 포함하는 세제이다.

[0118] 실시형태에서, 조성물은 제2 효소, 특히 리파제, 큐티나제, 아밀라제, 카르보하이드라제, 셀룰라제, 펙티나제, 펙테이트 리아제, 만나나제, 아라비나제, 갈락타나제, 자일라나제, 옥시다제, 락카제 또는 피옥시다제를 추가로 포함한다.

[0119] 다른 양태에서, 본 발명은 상기 기술된 바와 같은 본 발명의 조성물을 제조하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 서브틸리신, 상기 기술된 바와 같은 화학식이 $X-B^1-NH-CHR-CHOH-SO_3M$ 인 펩티드 알데히드 하이드로설파이트 부가물을 포함하는 수용액, 및 선택적으로 계면활성제를 혼합하는 단계를 포함한다.

[0120] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명의 조성물에 사용하기 위한 화합물을 제공하며, 상기 화합물은 화학식이 $X-B^1-NH-CHR-CHOH-SO_3M$ 인 펩티드 알데히드 하이드로설파이트 부가물인데, 여기서 M 및 X는 상기 기술된 바와 같이 정의되고, B^1 은 프롤린(Pro)과 상이한 아미노산 잔기이며, R은 $NH-CHR-CO$ 가 Tyr, m-타이로신, 3,4-디하이드록시페닐알라닌, Phe, Val, Met, Nva 또는 Nle의 L-아미노산 또는 D-아미노산 잔기이도록 하는 기이다.

[0121] 실시형태에서, 화합물은 $Cbz-RA-NHCH(CH_2C_6H_4OH)C(OH)(SO_3M)-H$, $Ac-GA-NHCH(CH_2C_6H_4OH)C(OH)(SO_3M)-H$, $Cbz-GA-NHCH(CH_2C_6H_4OH)C(OH)(SO_3M)-H$, $Cbz-GG-NHCH(CH_2C_6H_4OH)C(OH)(SO_3M)-H$, $Cbz-RV-NHCH(CH_2C_6H_4OH)C(OH)(SO_3M)-H$, $Cbz-LV-NHCH(CH_2C_6H_4OH)C(OH)(SO_3M)-H$, $Ac-LGA-NHCH(CH_2C_6H_4OH)C(OH)(SO_3M)-H$, $Ac-FGA-NHCH(CH_2C_6H_4OH)C(OH)(SO_3M)-H$, $Ac-YGA-NHCH(CH_2C_6H_4OH)C(OH)(SO_3M)-H$, $Ac-FGV-NHCH(CH_2C_6H_4OH)C(OH)(SO_3M)-H$, 또는 $Ac-WLV-NHCH(CH_2C_6H_4OH)C(OH)(SO_3M)-H$ 이며, 여기서 Ac는 아세틸이고 Cbz는 벤질옥시카르보닐이다.

[0122] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명의 조성물에 사용하기 위한 화합물을 제공하며, 상기 화합물은 화학식이 $X-B^1-NH-CHR-CHOH-SO_3M$ 인 펩티드 알데히드 하이드로설파이트 부가물인데, 여기서 M, R 및 X는 상기 기술된 바와

같이 정의되고, B¹은 알라닌(Ala), 시스테인(Cys), 글리신(Gly), 세린(Ser), 트레오닌(Thr), 발린(Val), 노르발린(Nva) 및 노르루신(Nle)의 아미노산 잔기이다.

[0123] 실시형태에서, 화합물은 Cbz-GA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂))C(OH)(SO₃M)-H, Cbz-VA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂))C(OH)(SO₃M)-H, Cbz-GA-NHCH(CH₂Ph)C(OH)(SO₃M)-H, Cbz-GA-NHCH(CH(CH₃)₂))C(OH)(SO₃M)-H, Cbz-GG-NHCH(CH₂Ph)C(OH)(SO₃M)-H, Ac-FGA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂))C(OH)(SO₃M)-H, Ac-FGA-NHCH(CH₂Ph)C(OH)(SO₃M)-H, Ac-FGA-NHCH-(CH₂CH₂SCH₃)(SO₃M)-H, MeO-CO-VA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂))C(OH)(SO₃M)-H, MeNCO-VA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂))C(OH)(SO₃M)-H, MeO-CO-FGA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂))C(OH)(SO₃M)-H, MeO-CO-FGA-NHCH(CH₂Ph)C(OH)(SO₃M)-H, MeSO₂-FGA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂))C(OH)(SO₃M)-H, MeSO₂-VA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂))C(OH)(SO₃M)-H, PhCH₂O(OH)(O)P-VA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂))C(OH)(SO₃M)-H, EtSO₂-FGA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂))C(OH)(SO₃M)-H, PhCH₂SO₂-VA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂))C(OH)(SO₃M)-H, PhCH₂O(OH)(O)P-LA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂))C(OH)(SO₃M)-H, PhCH₂O(OH)(O)P-FA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂))C(OH)(SO₃M)-H, 및 MeO(OH)(O)P-LGA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂))C(OH)(SO₃M)-H이며, 여기서 Ac는 아세틸이고 Cbz는 벤질옥시카르보닐이다.

[0124] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명의 조성물에 사용하기 위한 화합물을 제공하며, 상기 화합물은 화학식이 X-B¹-NH-CHR-CHOH-SO₃M인 펩티드 알데히드 하이드로설파이트 부가물인데, 여기서 R 및 M은 상기 기술된 바와 같이 정의되고; B¹은 프롤린(Pro)과 상이한 하나의 아미노산 잔기를 나타내며; X는 B², B³-B², Z-B², Z-B³-B²이 되, B³ 및 B²는 각각 하나의 아미노산 잔기를 나타내고, Z는 N-말단 보호기이며; B²는 Gly, Thr 또는 Val이다.

[0125] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명의 조성물에 사용하기 위한 화합물을 제공하며, 상기 화합물은 화학식이 X-B¹-NH-CHR-CHOH-SO₃M인 펩티드 알데히드 하이드로설파이트 부가물인데, 여기서 R 및 M은 상기 기술된 바와 같이 정의되고, B¹은 프롤린(Pro)과 상이한 하나의 아미노산 잔기를 나타내며; X는 B³-B², Z-B³-B²이 되, B³ 및 B²는 각각 하나의 아미노산 잔기를 나타내고, Z는 N-말단 보호기이며; B³은 Phe, Tyr, Trp, 페닐글리신, Leu, Val, Nva, Nle 또는 Ile이다.

[0126] 실시예

[0127] 완충제 및 기질로서 사용된 화학 물질은 적어도 시약 등급인 상품이였다.

[0128] 실시예 1

[0129] 펩티드 알데히드의 하이드로설파이트 부가물의 제조

[0130] 상기 기술된 바와 같은 화학식이 X-B¹-B⁰-H인 펩티드 알데히드는 상응하는 비설파이트 부가물로 전환된다. 주위 온도에서 에틸 아세테이트 8ml 중 1mmol X-B¹-B⁰-H의 교반된 현탁액에 물 6ml 중 1.06mmol 소듐 비설파이트(114mg)를 적가한 다음 반응물을 2시간 동안 교반시킨다. 수상을 분리하고, 유기층을 2ml 물로 세척한다(x 2). 합한 수상을 동결 건조시켜 백색 분말로써 X-B¹-NH-CHR-CHOH-SO₃Na(예상 수율 66%)을 제공한다.

[0131] 실시예 2

[0132] 펩티드 알데히드 하이드로설파이트 부가물의 액체 제형의 제조.

[0133] 고체인 X-B¹-NH-CHR-CHOH-SO₃Na 4mmol을 탈염수 6g에 용해시키고 35°C에서 30분 동안 교반시킨 다음, 냉각시켜 X-B¹-NH-CHR-CHOH-SO₃Na의 25% 수용액을 제공한다. 대안적으로, 상기 합성으로부터의 수상은 다음 단계에서 효소 안정화를 위하여 용이하게 사용될 수 있으며, 이 용액은 대략 3%(w/w)이다.

[0134] 실시예 3

[0135] 서브틸리신 및 펩티드 알데히드 하이드로설파이트 부가물을 포함하는 안정화된 서브틸리신 제형의 제조.

[0136] 상업적으로 입수가 가능한 Savinase 16L™(Novozymes A/S(덴마크 백스베어드 소재))에 상기 25% 수용액의 3.6%를

사용하여 0.9% X-B¹-NH-CHR-CHOH-SO₃Na을 첨가한다.

[0137] 실시예 4

[0138] 하이드로설파이트 부가물에 의한 서브틸리신의 안정화

[0139] 일반적인 실험 상세 내용: X-B¹-NH-CHR-CHOH-SO₃Na(펩티드 알데히드 하이드로설파이트 부가물은 서브틸리신을 포함하는 세제에 개별적으로 첨가될 수 있음)과 함께 또는 없이 서브틸리신(Savinase 16L) 및 리파제(Lipex 100 L)를 포함하는 세제를 -18℃; 35℃ 및 40℃에서 밀폐 유리에 넣는다. 프로테아제 및 리파제의 잔효성을 표준 분석 방법(프로테아제는 40℃, pH 8.3에서 N,N-디메틸카세인의 가수분해에 의하고, 리파제는 40℃, pH 7.7에서 pNp-발레레이트의 가수분해에 의함)을 사용하여 상이한 시간 후에 측정한다. 적당한 양의 펩티드 알데히드 하이드로설파이트 부가물을 이미 포함하는 세제에 서브틸리신을 첨가하여 유사한 시험을 수행할 수 있다. 언급한 펩티드 알데히드 비설파이트 부가물 모두에 대하여 유사한 결과를 얻을 수 있다.

[0140] 안정화된 서브틸리신 제형을 가지는 세제 조성물의 예로서, 표 1에 기술된 조성물을 만들었다.

표 1

세제 조성물.

[0141]

성분	%(w/w)
소듐 알킬에톡시 설페이트(C9-15, 2EO)	6.0
소듐 도데실 벤젠 설페이트	3.0
소듐 톨루엔 설페이트	3.0
올레산	2.0
일차 알코올 에톡실레이트(C12-15, 7EO)	3.0
일차 알코올 에톡실레이트(C12-15, 3EO)	2.5
에탄올	0.5
모노프로필렌 글리콜	2.0
트리-소듐 시트레이트 2H ₂ O	4.0
트리에탄올 아민	0.4
NaOH를 이용하여 pH를 8.5로 조정	
X-B ¹ -NH-CHR-CHOH-SO ₃ Na을 이용하여 안정화시킨 Savinase 제형; 또는 비교용 Savinase 16L	0.5
Lipex 100L™(Novozymes A/S로부터 입수가가능함)	0.5
물	100% 까지

[0142] 표 2에는 X= Cbz-Gly; B¹= Ala; R=-CH₂-p(C₆H₄)-OH로 얻은 결과, 즉 표 1에 기술된 세제에 있어서 40℃에서 1주일 항온처리한 후 측정된 안정도가 나타내어져 있다.

표 2

[0143]

표 1에 기술된 세제에 있어서 40℃에서 1주일 항온처리한 후 잔류 프로테아제 활성.

세제에 첨가된 억제제의 양	프로테아제 안정성 (잔류 활성)
없음	12%
7ppm	52%
14ppm	77%
18ppm	80%

[0144] 결과는 펩티드 알데히드의 하이드로설파이트 부가물의 첨가에 의한 서브틸리신의 안정화를 입증한다.

[0145] 실시예 5

[0146] 서브틸리신 및 리파제의 안정화

[0147] 안정화된 서브틸리신 제형을 가지는 세제 조성물의 예로서, 표 3에 기술된 조성물을 만들었다.

표 3

세제 조성물.

[0148]

성분	%(w/w)
소듐 도데실 벤젠 설포네이트	6.0
NaOH	1.4
대두 지방산(Edenor SJ)	3.0
코코 지방산(Coco fatty acid)(Radiacid 0631)	2.5
일차 알코올 에톡실레이트(C13, 8EO)	5.0
에탄올	5.0
모노프로필렌 글리콜	5.0
트리-소듐 시트레이트 2H ₂ O	0.5
트리에탄올 아민	2.0
포스포네이트 - Dequest 2066 C2	3.0
필요하다면 추가적인 NaOH를 이용하여 pH를 8.4로 조정	
서브틸리신: Savinase, X-B ¹ -NH-CHR-CHOH-SO ₃ Na를 이용하여 또는 4-포르밀페닐 보론산을 이용하여 안정시키거나, 또는 비교용으로 안정화제를 포함하지 않음	0.75
리파제: Lipex 100L™(Novozymes A/S로부터 입수가가능함)	0.15
물	100% 까지

[0149] 표 4에는 표 3에 기술된 세제에 있어서 35℃에서 2주일 항온처리한 후 측정된 결과가 나타내어져 있다.

표 4

[0150] 표 3에 기술된 세제에 있어서 35℃에서 2주일 항온처리한 후 서브틸리신(프로테아제) 및 리파제의 잔류 활성.

억제제	세제 중 억제제	서브틸리신	리파제
없음	-	2%	1%
4-포르밀페닐 보론산(종래 기술)	128ppm	8%	2%
X = Cbz-Gly; B ¹ = Ala; R = -CH ₂ -p(C ₆ H ₄)-OH	21ppm	63%	18%

[0151] 결과는 펩티드 알데히드의 하이드로설파이트 부가물의 첨가로 서브틸리신 및 제2 효소(리파제)를 안정화시킬 수 있으며, 펩티드 알데히드의 하이드로설파이트 부가물은 종래 기술의 안정화제보다 훨씬 더 효과적임을 입증한다.

[0152] 실시예 6

[0153] 서브틸리신 및 리파제의 안정화

[0154] 안정화된 서브틸리신 제형을 가지는 세제의 또 다른 예로서, 표 5에 기술된 조성물을 만들었다.

표 5

세제 조성물.

[0155]

성분	%(w/w)
상업적인 비효소 세제. 액체 EU 2x 용량. 2009년에 영국(UK)에서 구입	98.2
서브틸리신	1.4
리파제: Lipoclean 2000L(Novozymes A/S로부터 입수가가능함)	0.4

[0156] 표 6에는 표 5에 기술된 세제에 있어서 37℃에서 4주일 항온처리 후, 및 30℃에서 8주일 항온처리한 후 측정된 결과가 나타내어져 있다.

표 6

[0157] 표 5에 기술된 세제에 있어서 37℃에서 4주일 항온처리 후, 또는 30℃에서 8주일 항온처리한 후 서브틸리신(프로테아제) 및 리파제의 잔류 활성.

억제제	서브틸리신	세제에 첨가한 억제제의 양	서브틸리신	리파제
			37℃에서 4주일	30℃에서 8주일
없음	Coronase 48L	0	69%	28%
X = Cbz-Gly; B ¹ = Ala; R = -CH ₂ -p(C ₆ H ₄)-OH	Coronase 48L	59ppm	80%	61%
없음	Liquanase 2.5L	0	43%	0%
X = Cbz-Gly; B ¹ = Ala; R = -CH ₂ -p(C ₆ H ₄)-OH	Liquanase 2.5L	34ppm	83%	27%

[0158] 결과는 펩티드 알데히드의 하이드로설파이트 부가물의 첨가로 서브틸리신 및 다양한 서브틸리신에 대한 제2 효소(리파제)를 안정화시킬 수 있음을 입증한다.

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Novozymes A/S

<120> STABILIZED SUBTILISIN COMPOSITION

<130> 11717-WO-PCT

<160> 9

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide aldehyde

<400> 1

Leu Gly Ala Tyr

1

<210> 2

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide aldehyde

<400> 2

Phe Gly Ala Tyr

1

<210> 3

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide aldehyde

<400> 3

Tyr Gly Ala Tyr

1

<210> 4

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide aldehyde

<400> 4

Phe Gly Ala Leu

1

<210> 5

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide aldehyde

<400> 5

Phe Gly Ala Phe

1

<210> 6

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide aldehyde

<400> 6

Phe Gly Val Tyr

1

<210>

7

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide aldehyde

<400> 7

Phe Gly Ala Met

1

<210> 8

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide aldehyde

<400> 8

Trp Leu Val Tyr

1

<210> 9

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide aldehyde

<400> 9

Leu Gly Ala Leu

1