



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113366103 A

(43) 申请公布日 2021.09.07

(21) 申请号 201980082881.7

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
11105

(22) 申请日 2019.12.19

代理人 张文辉

(30) 优先权数据

18215408.8 2018.12.21 EP

(51) Int.Cl.

C12N 9/80 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.06.15

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2019/086399 2019.12.19

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/127796 EN 2020.06.25

(71) 申请人 诺维信公司

地址 丹麦鲍斯韦

(72) 发明人 C.B.奥伦施莱格 D.R.塞古拉

J.萨洛蒙 F.B.加西亚

L.E.T.巴尔斯坦 C.B.罗森

权利要求书4页 说明书84页
序列表(电子公布)

(54) 发明名称

具有肽聚糖降解活性的多肽以及编码其的
多核苷酸

(57) 摘要

本发明涉及包含具有肽聚糖降解活性的多
肽的清洁组合物,以及这些清洁组合物用于清洁
物品如纺织品或表面的用途。

1. 一种清洁组合物, 该清洁组合物包含肽聚糖降解酶、至少一种表面活性剂以及选自助洗剂和漂白组分的至少一种另外的清洁组分。

2. 如权利要求1所述的清洁组合物, 该清洁组合物包含肽聚糖降解酶、至少5wt%阴离子表面活性剂以及选自至少一种助洗剂和至少一种漂白组分的至少一种另外的清洁组分。

3. 如权利要求1或2所述的清洁组合物, 其中该肽聚糖降解酶具有N-乙酰基胞壁酰基-L-丙氨酸酰胺酶活性。

4. 如权利要求1-3中任一项所述的清洁组合物, 其中该肽聚糖降解酶具有肽聚糖裂解酶活性。

5. 如权利要求3或4所述的清洁组合物, 其中该肽聚糖降解酶具有N-乙酰基胞壁酰基-L-丙氨酸酰胺酶活性和肽聚糖裂解酶活性。

6. 如前述权利要求中任一项所述的清洁组合物, 其中该肽聚糖降解酶包含基序N[IV]X[AG][GAS]A[AY][LV]L (SEQ ID NO:111)。

7. 如权利要求6所述的清洁组合物, 其中该肽聚糖降解酶选自由以下组成的组: SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:96、SEQ ID NO:99和SEQ ID NO:108以及与其具有至少至少60%, 例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的多肽, 并且其中该酶具有肽聚糖降解活性。

8. 如前述权利要求中任一项所述的清洁组合物, 该清洁组合物包含约5wt%至约60wt%的至少一种表面活性剂, 优选地至少一种阴离子表面活性剂, 并且进一步包含:

a. 约5wt%至约50wt%的至少一种助洗剂, 优选地GLDA、MGDA、HEDP或DTMPA; 和/或

b. 约1wt%至约20wt%的至少一种漂白组分, 优选地漂白催化剂, 如MnTACN。

9. 如前述权利要求中任一项所述的清洁组合物, 其中该具有肽聚糖降解酶活性的多肽选自由以下组成的组:

i. 与SEQ ID NO:3具有至少至少60%, 例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,

ii. 与SEQ ID NO:6具有至少至少60%, 例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,

iii. 与SEQ ID NO:9具有至少至少60%, 例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,

iv. 与SEQ ID NO:12具有至少至少60%, 例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,

v. 与SEQ ID NO:15具有至少至少60%, 例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、

80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽，

xxxii. 与SEQ ID NO:96具有至少至少60%，例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽，

xxxiii. 与SEQ ID NO:99具有至少至少60%，例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽，

xxxiv. 与SEQ ID NO:102具有至少至少60%，例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽，

xxxv. 与SEQ ID NO:105具有至少至少60%，例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽，以及

xxxvi. 与SEQ ID NO:108具有至少至少60%，例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽。

10. 如权利要求9所述的清洁组合物，其中该多肽具有N-乙酰基胞壁酰基-L-丙氨酸酰胺酶和肽聚糖裂解酶活性。

11. 如前述权利要求中任一项所述的组合物用于清洁物品的用途，其中该物品是纺织品或表面。

12. 如权利要求11所述的用途，

- a) 用于防止、减少或去除该物品的粘性；
- b) 用于预处理该物品上的污渍；
- c) 用于在洗涤周期期间防止、减少或去除污垢的再沉积；
- d) 用于防止、减少或去除污垢在该物品上的附着；
- e) 用于维持或改进该物品的白度；和/或
- f) 用于防止、减少或去除该物品的恶臭；

其中该物品是纺织品。

13. 一种清洁物品的方法，该方法包括如下步骤：

a) 使该物品与包含肽聚糖降解酶和清洁组分的溶液接触，该肽聚糖降解酶具有肽聚糖裂解酶活性，并且优选地具有N-乙酰基胞壁酰基-L-丙氨酸酰胺酶活性，其中该清洁组分选自5wt%至60wt%的至少一种表面活性剂；5wt%至50wt%的至少一种助洗剂；和1wt%至20wt%的至少一种漂白组分；以及任选地

b) 冲洗该物品；

其中该物品优选地是纺织品。

具有肽聚糖降解活性的多肽以及编码其的多核苷酸

[0001] 序列表的引用

[0002] 本申请含有计算机可读形式的序列表,将其通过引用并入本文。

[0003] 发明背景

技术领域

[0004] 本发明涉及具有肽聚糖降解活性的多肽,编码这些多肽的多核苷酸以及属于肽聚糖降解酶家族的催化结构域。本发明进一步涉及包含此类多肽的组合物、特别是清洁组合物,具有肽聚糖降解活性的多肽在清洁过程中和/或用于去除或减少源自细菌的肽聚糖的用途,以及用于去除或减少肽聚糖的方法。本发明进一步涉及包含编码这些多肽的多核苷酸的核酸构建体、载体以及宿主细胞,连同生产和使用这些多肽和催化结构域的方法。

背景技术

[0005] 几十年来,酶一直被用于洗涤剂中。通常将多种酶的混合物添加至洗涤剂组合物中。酶混合物通常包含多种酶,其中每种酶各自靶向特异性底物,例如淀粉酶对淀粉污渍有活性、蛋白酶对蛋白质污渍有活性等。纺织品和表面(如衣物和餐具)会被许多不同类型的污垢弄脏。污垢可以由蛋白质、油脂、淀粉等组成。由不同有机材料如食物污渍、皮脂、死细胞材料、来自例如生物膜的EPS(细胞外聚合物基质)组成的复杂污渍难以用传统的ADW(自动餐具洗涤)和衣物洗涤剂组合物完全去除。来自细菌细胞壁的肽聚糖有助于有机物质。大量细菌存在于衣物洗涤物品中。当细菌裂解时,被破坏的细胞在纺织品中或在硬表面如洗衣机的内表面上留下大量的源自细胞壁的肽聚糖。此肽聚糖底物可以是粘性的或粘合的,当其存在于纺织品上时,吸引污垢并且可以使污垢再沉积或反染色,从而导致纺织品变灰。此外,特别难以从例如纺织品去除来自例如汗、香烟烟雾和污染的恶臭。恶臭是一个日益严重的问题,特别是在具有以下的变化习惯的洗衣中:较低温度洗涤;前装式洗衣机,此类洗衣机节约水但留下了载荷之间的残余水,从而使得细菌生物膜大量产生;挂干衣服而非器具干燥衣服以节约能量;以及合成织物如运动装的普及增加,这些合成织物与天然织物相比似乎保留了更多的气味。在常规的洗涤剂组合物如衣物洗涤剂中,通常通过添加香料来解决上述问题。然而,此种解决方案并不完全有效,因为它是短期的,而且仅用于遮蔽恶臭而不是解决恶臭的根本原因。因此,本领域中需要用于克服恶臭和再沉积的问题的新解决方案。

发明内容

[0006] 本发明涉及一种清洁组合物,该清洁组合物包含肽聚糖降解酶、至少一种表面活性剂以及选自助洗剂和漂白组分的至少一种另外的清洁组分。该清洁组合物可以例如包含肽聚糖降解酶、至少5wt%阴离子表面活性剂以及选自至少一种助洗剂和至少一种漂白组分的至少一种另外的清洁组分。

[0007] 本发明进一步涉及此种组合物用于清洁物品如纺织品或表面的用途。本发明进一

步涉及清洁物品的方法,该方法包括以下步骤:

[0008] a) 使该物品与包含肽聚糖降解酶和清洁组分的溶液接触,该肽聚糖降解酶具有肽聚糖裂解酶活性,并且优选地具有N-乙酰基胞壁酰基-L-丙氨酸酰胺酶活性;其中该清洁组分选自5wt%至60wt%的至少一种表面活性剂;5wt%至50wt%的至少一种助洗剂;和1至20wt%的至少一种漂白组分;以及任选地

[0009] b) 冲洗该物品,

[0010] 其中该物品优选地是纺织品。

[0011] 序列说明

[0012] SEQ ID NO:1DNA,其编码来自都浓哈马达氏菌(*Hamadaea tsunoensis*)的全长多肽

[0013] SEQ ID NO:2多肽,其来源于SEQ ID NO:1

[0014] SEQ ID NO:3成熟多肽,其获自都浓哈马达氏菌

[0015] SEQ ID NO:4DNA,其编码来自海栖小单孢菌(*Micromonospora maritima*)的全长多肽

[0016] SEQ ID NO:5多肽,其来源于SEQ ID NO:4

[0017] SEQ ID NO:6成熟多肽,其获自海栖小单孢菌

[0018] SEQ ID NO:7DNA,其编码来自类芽孢杆菌属物种(*Paenibacillus* sp.)的全长多肽

[0019] SEQ ID NO:8多肽,其来源于SEQ ID NO:7

[0020] SEQ ID NO:9成熟多肽,其获自类芽孢杆菌属物种

[0021] SEQ ID NO:10DNA,其编码来自野野村菌属物种(*Nonomuraea* sp.)的全长多肽

[0022] SEQ ID NO:11多肽,其来源于SEQ ID NO:10

[0023] SEQ ID NO:12成熟多肽,其获自野野村菌属物种

[0024] SEQ ID NO:13DNA,其编码来自抗生素溶杆菌(*Lysobacter antibioticus*)的全长多肽

[0025] SEQ ID NO:14多肽,其来源于SEQ ID NO:13

[0026] SEQ ID NO:15成熟多肽,其获自抗生素溶杆菌

[0027] SEQ ID NO:16DNA,其编码来自小单孢菌属物种(*Micromonospora* sp.)的全长多肽

[0028] SEQ ID NO:17多肽,其来源于SEQ ID NO:16

[0029] SEQ ID NO:18成熟多肽,其获自小单孢菌属物种

[0030] SEQ ID NO:19DNA,其编码来自科克斯野野村菌(*Nonomuraea coxensis*)的全长多肽

[0031] SEQ ID NO:20多肽,其来源于SEQ ID NO:19

[0032] SEQ ID NO:21成熟多肽,其获自科克斯野野村菌

[0033] SEQ ID NO:22DNA,其编码来自绛红色小单孢菌(*Micromonospora fulvopurpurea*)的全长多肽

[0034] SEQ ID NO:23多肽,其来源于SEQ ID NO:22

[0035] SEQ ID NO:24成熟多肽,其获自绛红色小单孢菌

- [0036] SEQ ID NO:25DNA,其编码来自脂环酸芽孢杆菌属物种(*Alicyclobacillus* sp.)的全长多肽
- [0037] SEQ ID NO:26多肽,其来源于SEQ ID NO:25
- [0038] SEQ ID NO:27成熟多肽,其获自脂环酸芽孢杆菌属物种
- [0039] SEQ ID NO:28DNA,其编码来自盐单胞菌属物种(*Halomonas* sp.)的全长多肽
- [0040] SEQ ID NO:29多肽,其来源于SEQ ID NO:28
- [0041] SEQ ID NO:30成熟多肽,其获自盐单胞菌属物种
- [0042] SEQ ID NO:31DNA,其编码来自烂泥假单胞菌(*Pseudomonas peli*)的全长多肽
- [0043] SEQ ID NO:32多肽,其来源于SEQ ID NO:31
- [0044] SEQ ID NO:33成熟多肽,其获自烂泥假单胞菌
- [0045] SEQ ID NO:34DNA,其编码来自盐单胞菌属物种的全长多肽
- [0046] SEQ ID NO:35多肽,其来源于SEQ ID NO:34
- [0047] SEQ ID NO:36成熟多肽,其获自盐单胞菌属物种
- [0048] SEQ ID NO:37DNA,其编码来自类产碱假单胞菌(*Pseudomonas pseudoalcaligenes*)的全长多肽
- [0049] SEQ ID NO:38多肽,其来源于SEQ ID NO:37
- [0050] SEQ ID NO:39成熟多肽,其获自类产碱假单胞菌
- [0051] SEQ ID NO:40DNA,其编码来自膨胀芽孢杆菌属物种(*Tumebacillus* sp.)的全长多肽
- [0052] SEQ ID NO:41多肽,其来源于SEQ ID NO:40
- [0053] SEQ ID NO:42成熟多肽,其获自膨胀芽孢杆菌属物种
- [0054] SEQ ID NO:43DNA,其编码来自迪氏野野村菌(*Nonomuraea dietziae*)的全长多肽
- [0055] SEQ ID NO:44多肽,其来源于SEQ ID NO:43
- [0056] SEQ ID NO:45成熟多肽,其获自迪氏野野村菌
- [0057] SEQ ID NO:46DNA,其编码来自糖莱斯菌(*Laceyella sacchari*)的全长多肽
- [0058] SEQ ID NO:47多肽,其来源于SEQ ID NO:46
- [0059] SEQ ID NO:48成熟多肽,其获自糖莱斯菌
- [0060] SEQ ID NO:49DNA,其编码来自产色嗜热葡萄孢菌(*Thermostaphylospora chromogena*)的全长多肽
- [0061] SEQ ID NO:50多肽,其来源于SEQ ID NO:49
- [0062] SEQ ID NO:51成熟多肽,其获自产色嗜热葡萄孢菌
- [0063] SEQ ID NO:52DNA,其编码来自明帆韩国生工菌(*Kribbella aluminosa*)的全长多肽
- [0064] SEQ ID NO:53多肽,其来源于SEQ ID NO:52
- [0065] SEQ ID NO:54成熟多肽,其获自明帆韩国生工菌
- [0066] SEQ ID NO:55DNA,其编码来自灰色链霉菌(*Streptomyces griseus*)的全长多肽
- [0067] SEQ ID NO:56多肽,其来源于SEQ ID NO:55
- [0068] SEQ ID NO:57成熟多肽,其获自灰色链霉菌
- [0069] SEQ ID NO:58DNA,其编码来自阿普利亚小单孢菌(*Micromonospora peucetia*)的

全长多肽

- [0070] SEQ ID NO:59多肽,其来源于SEQ ID NO:58
- [0071] SEQ ID NO:60成熟多肽,其获自阿普利亚小单孢菌
- [0072] SEQ ID NO:61DNA,其编码来自芽孢杆菌属物种(*Bacillus* sp.)的全长多肽
- [0073] SEQ ID NO:62多肽,其来源于SEQ ID NO:61
- [0074] SEQ ID NO:63成熟多肽,其获自芽孢杆菌属物种
- [0075] SEQ ID NO:64DNA,其编码来自耐热芽孢杆菌(*Bacillus sporothermodurans*)的全长多肽
- [0076] SEQ ID NO:65多肽,其来源于SEQ ID NO:64
- [0077] SEQ ID NO:66成熟多肽,其获自耐热芽孢杆菌
- [0078] SEQ ID NO:67DNA,其编码来自松树土类芽孢杆菌(*Paenibacillus pini*)的全长多肽
- [0079] SEQ ID NO:68多肽,其来源于SEQ ID NO:67
- [0080] SEQ ID NO:69成熟多肽,其获自松树土类芽孢杆菌
- [0081] SEQ ID NO:70DNA,其编码来自科氏芽孢杆菌(*Bacillus cohnii*)的全长多肽
- [0082] SEQ ID NO:71多肽,其来源于SEQ ID NO:70
- [0083] SEQ ID NO:72成熟多肽,其获自科氏芽孢杆菌
- [0084] SEQ ID NO:73DNA,其编码来自韩国生工菌属物种(*Kribbella* sp.)的全长多肽
- [0085] SEQ ID NO:74多肽,其来源于SEQ ID NO:73
- [0086] SEQ ID NO:75成熟多肽,其获自韩国生工菌属物种
- [0087] SEQ ID NO:76DNA,其编码来自芽孢杆菌属物种的全长多肽
- [0088] SEQ ID NO:77多肽,其来源于SEQ ID NO:76
- [0089] SEQ ID NO:78成熟多肽,其获自芽孢杆菌属物种
- [0090] SEQ ID NO:79DNA,其编码来自芽孢杆菌属物种的全长多肽
- [0091] SEQ ID NO:80多肽,其来源于SEQ ID NO:79
- [0092] SEQ ID NO:81成熟多肽,其获自芽孢杆菌属物种
- [0093] SEQ ID NO:82DNA,其编码来自芽孢杆菌属物种的全长多肽
- [0094] SEQ ID NO:83多肽,其来源于SEQ ID NO:82
- [0095] SEQ ID NO:84成熟多肽,其获自芽孢杆菌属物种
- [0096] SEQ ID NO:85DNA,其编码来自链霉菌属物种(*Streptomyces* sp.)的全长多肽
- [0097] SEQ ID NO:86多肽,其来源于SEQ ID NO:85
- [0098] SEQ ID NO:87成熟多肽,其获自链霉菌属物种
- [0099] SEQ ID NO:88DNA,其编码来自芽孢杆菌属物种的全长多肽
- [0100] SEQ ID NO:89多肽,其来源于SEQ ID NO:88
- [0101] SEQ ID NO:90成熟多肽,其获自芽孢杆菌属物种
- [0102] SEQ ID NO:91DNA,其编码来自芽孢杆菌属物种的全长多肽
- [0103] SEQ ID NO:92多肽,其来源于SEQ ID NO:91
- [0104] SEQ ID NO:93成熟多肽,其获自芽孢杆菌属物种
- [0105] SEQ ID NO:94DNA,其编码来自广州野野村菌(*Nonomuraea guangzhouensis*)的全

长多肽

- [0106] SEQ ID NO:95多肽,其来源于SEQ ID NO:94
- [0107] SEQ ID NO:96成熟多肽,其获自广州野野村菌
- [0108] SEQ ID NO:97DNA,其编码来自广州野野村菌的全长多肽
- [0109] SEQ ID NO:98多肽,其来源于SEQ ID NO:97
- [0110] SEQ ID NO:99成熟多肽,其获自广州野野村菌
- [0111] SEQ ID NO:100DNA,其编码来自科氏芽孢杆菌的全长多肽
- [0112] SEQ ID NO:101多肽,其来源于SEQ ID NO:100
- [0113] SEQ ID NO:102成熟多肽,其获自科氏芽孢杆菌
- [0114] SEQ ID NO:103DNA,其编码来自盐单胞菌属物种的全长多肽
- [0115] SEQ ID NO:104多肽,其来源于SEQ ID NO:103
- [0116] SEQ ID NO:105成熟多肽,其获自盐单胞菌属物种
- [0117] SEQ ID NO:106DNA,其编码来自辣椒溶杆菌 (*Lysobacter capsici*) 的全长多肽
- [0118] SEQ ID NO:107多肽,其来源于SEQ ID NO:106
- [0119] SEQ ID NO:108成熟多肽,其获自辣椒溶杆菌
- [0120] SEQ ID NO:109MKKPLGKIVASTALLISVAFSSSIASA (信号肽)
- [0121] SEQ ID NO:110HHHHHHPR (His标签)
- [0122] SEQ ID NO:111基序
- [0123] 定义

[0124] 肽聚糖降解酶:术语“肽聚糖降解酶”是指具有针对肽聚糖的活性的酶。肽聚糖 (PGN) 为革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌两者中的细菌细胞被膜的主要组分 (Jessica Human 和Laurel L.Lenz, J Innate Immun. [先天免疫杂志] 2009;1:88-97)。革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌两者的肽聚糖结构包含N-乙酰基葡萄糖胺 (NAG) 和 β - (1-4) -N-乙酰基胞壁酸 (NAM) 的重复二糖骨架,该N-乙酰基葡萄糖胺 (NAG) 与 β - (1-4) -N-乙酰基胞壁酸 (NAM) 通过附接于NAM残基的肽茎链交联 (Bourhis LL, Werts C Microbes Infect. [微生物与感染] 2007年4月;9 (5):629-36)。PGN的肽和糖肽片段通常被称为“胞壁肽”。PGN水解酶由其催化特异性定义。这些酶中有两类消化PGN聚糖骨架,切割NAM上游NAG-NAM键之间的PGN的N-乙酰基胞壁质酶,以及切割NAM-NAG键的N-乙酰基氨基葡萄糖苷酶。相反地,N-乙酰基胞壁酰基-L-丙氨酸酰胺酶在NAM与肽链的第一丙氨酸之间切割。因此,用N-乙酰基胞壁酰基-L-丙氨酸酰胺酶催化使PGN糖骨架与茎肽链分离 (Fournier B, Philpott DJ, Clin.Microbiol.Rev. [临床微生物学评论] 2005年7月;18 (3):521-40)。本发明的酶包含N-乙酰基胞壁酰基-L-丙氨酸酰胺酶 (EC 3.5.1.28) 结构域。在本发明的上下文中,N-乙酰基胞壁酰基-L-丙氨酸酰胺酶也可以称为肽聚糖酰胺水解酶。本发明的酶除了酰胺酶结构域之外还包含肽聚糖裂解酶结构域 (GH23样)。GH 23家族包含溶菌酶G型 (EC 3.2.1.17)、肽聚糖裂解酶 (EC 4.2.2.n1, 肽聚糖裂解外糖基转移酶,和4.2.2.n2, 肽聚糖裂解内糖基转移酶) 和几丁质酶 (EC 3.2.1.14)。本发明酶包含的结构域为肽聚糖裂解酶结构域 (EC 4.2.2.n1或4.2.2.n2)。肽聚糖裂解酶也称为裂解糖基转移酶。GH23的肽聚糖裂解酶构成了Blackburn和Clarke的组织方案的家族1 (Blackburn NT1, Clarke AJ. J Mol Evol. [分子进化学报] 2001Jan;52 (1):78-84)。此家族的酶切割肽聚糖中N-乙酰基胞壁酰基与N-乙酰基

葡萄糖氨基残基之间的 β -1,4-键。但是,与溶菌酶不同的是,肽聚糖裂解酶不是水解酶,而是催化胞壁酰基残基分子内转糖基化为C-6羟基基团,从而产生末端1,6-无水胞壁酸产物,该产物是缩醛而不是半缩醛(Höltje J.V.J Bacteriol.[细菌学杂志]1975年12月;124(3):1067-76)。因此,本发明的酶与溶菌酶不同。

[0125] 本发明的酶优选地包含N-乙酰基胞壁酰基-L-丙氨酸酰胺酶(EC 3.5.1.28)结构域以及肽聚糖裂解酶结构域(EC 4.2.2.n1或4.2.2.n2)。因此,在本发明中,肽聚糖降解酶优选地为N-乙酰基胞壁酰基-L-丙氨酸酰胺酶(EC 3.5.1.28)和肽聚糖裂解酶(EC 4.2.2.n1或4.2.2.n2),这些酶对肽聚糖具有酰胺酶和裂解酶活性。

[0126] 出于本发明的目的,可以根据以下实例部分中所述的程序确定肽聚糖裂解酶活性和N-乙酰基胞壁酰基-L-丙氨酸酰胺酶活性。

[0127] 术语“等位基因变体”意指占据同一染色体基因座的基因的两种或更多种替代形式中的任一种。等位基因变异通过突变而自然产生,并且可以导致群体内部的多态性。基因突变可以是沉默的(所编码的多肽无变化)或可以编码具有改变的氨基酸序列的多肽。多肽的等位基因变体是由基因的等位基因变体编码的多肽。

[0128] 生物膜是由其中细胞彼此粘附在一起或粘附至表面(如纺织品、餐具或硬表面)或另一种表面的任何群组的微生物产生的有机物质。这些粘附细胞通常嵌入细胞外聚合物(EPS)的自生基质中。生物膜EPS是一般由细胞外DNA、蛋白质和多糖组成的聚合物团块。生物膜可以形成在活的或非活的表面上。在生物膜中生长的微生物细胞与同一生物体的浮游细胞(相比之下,浮游细胞是可以在液体介质中漂浮或浮游的单个细胞)在生理上是不同的。生活在生物膜中的细菌通常与同一物种的浮游细菌具有显著不同的特性,因为膜的密集并且受保护环境允许它们以不同方式协作和相互作用。微生物的这一环境的一个益处是增加对洗涤剂和抗生素的抗性,因为,密集的细胞外基质和细胞的外层保护群落的内部。在生物膜基质受损时,生活在生物膜中的细菌不会失去作为浮游细胞生活的能力。关于产生衣物洗涤生物膜或EPS的细菌,可以在以下物种中找到:不动杆菌属物种(*Acinetobacter* sp.)、气微菌属物种(*Aeromicrobium* sp.)、短波单胞菌属物种(*Brevundimonas* sp.)、微杆菌属物种(*Microbacterium* sp.)、藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)、假单胞菌属物种(*Pseudomonas* sp.)、表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)和寡养单胞菌属物种(*Stenotrophomonas* sp)。在一方面,产生生物膜或EPS的菌株是假单胞菌属,例如铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、嗜碱假单胞菌(*Pseudomonas alcaliphila*)或荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)。

[0129] 术语“催化结构域”意指含有该酶的催化机构的酶的区域。

[0130] 术语“cDNA”意指可以通过从获得自真核或原核细胞的成熟的、剪接的mRNA分子进行反转录而制备的DNA分子。cDNA缺乏可以存在于对应基因组DNA中的内含子序列。初始的初级RNA转录物是mRNA的前体,其要通过一系列的步骤(包括剪接)进行加工,然后呈现为成熟的剪接的mRNA。

[0131] 术语“进化枝”意指基于追溯至共同祖先的同源性特征聚集在一起的一组多肽。多肽进化枝可以被看作是系统发生树,并且进化枝是由共同祖先及其所有直系后裔组成的一组多肽。实例6描述了系统发生树的生成。

[0132] 术语“编码序列”意指直接指定多肽的氨基酸序列的多核苷酸。编码序列的边界通

常由可读框确定,该可读框以起始密码子(例如ATG、GTG或TTG)开始并且以终止密码子(例如TAA、TAG或TGA)结束。编码序列可为基因组DNA、cDNA、合成DNA或其组合。

[0133] 术语“控制序列”意指表达编码本发明的成熟多肽的多核苷酸所必需的核酸序列。每个控制序列对于编码该多肽的多核苷酸来说可以是天然的(即,来自相同基因)或外源的(即,来自不同基因),或相对于彼此是天然的或外源的。此类控制序列包括但不限于前导序列、多腺苷酸化序列、前肽序列、启动子、信号肽序列、以及转录终止子。最少,控制序列包括启动子、以及转录和翻译终止信号。出于引入有利于将控制序列与编码多肽的多核苷酸的编码区连接的特异性限制性位点的目的,这些控制序列可以提供有多个接头。

[0134] 术语“清洁组分”指例如与本发明多肽不同的洗涤剂辅助剂成分。这些另外的清洁或辅助剂组分的精确性质、其掺入水平将取决于组合物的物理形式和将在其中使用组合物的操作的性质。适合的清洁组分包括,但不限于:以下描述的组分,如表面活性剂、助洗剂和共助洗剂、絮凝助剂、螯合试剂、染料转移抑制剂、酶(不为本发明的酶)、酶稳定剂、酶抑制剂、催化材料、漂白活化剂、过氧化氢、过氧化氢源、预形成的过酸、聚合剂、粘土去污剂/抗再沉淀剂、增亮剂、抑泡剂、染料、香料、结构弹性剂、织物软化剂、运载体、水溶助剂、织物调色剂、防沫剂、分散剂、加工助剂、和/或颜料。

[0135] 术语“清洁组合物”包括“洗涤剂组合物”并且是指用于从有待清洁的物品(例如纺织品)去除不希望的化合物的组合物。该洗涤剂组合物可以用于例如清洁纺织品,用于家用清洁和工业清洁二者。这些术语涵盖选择用于希望的具体类型的清洁组合物和产品的形式(例如,液体、凝胶、粉末、颗粒、糊状、或喷雾组合物)的任何材料/化合物,并且包括但不限于洗涤剂组合物,如液体和/或固体衣物洗涤剂和精细织物洗涤剂;织物清新剂;织物软化剂;以及纺织品和衣物预去污剂/预处理。除了含有本发明的酶之外,该洗涤剂配制品还可以含有一种或多种另外的酶(如蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶、角质酶、纤维素酶、内切葡聚糖酶、木葡聚糖酶、果胶酶、果胶裂解酶、黄原胶酶、过氧化物酶、卤代过氧合酶、过氧化氢酶、甘露聚糖酶、核酸酶或其任何混合物),和/或洗涤剂辅助剂成分,如表面活性剂、助洗剂、螯合剂或螯合试剂、漂白系统或漂白组分、聚合物、织物柔顺剂、增泡剂、抑泡剂、染料、香料、酶暗抑制剂、光学增亮剂、杀细菌剂、杀真菌剂、污垢悬浮剂、防蚀剂、酶抑制剂或稳定剂、酶活化剂、一种或多种转移酶、水解酶、氧化还原酶、上蓝剂和荧光染料、抗氧化剂以及增溶剂。

[0136] 术语“表达”包括涉及多肽产生的任何步骤,包括但不限于:转录、转录后修饰、翻译、翻译后修饰、以及分泌。

[0137] 术语“表达载体”意指直链或环状DNA分子,其包含编码多肽的多核苷酸并且可操作地连接至提供用于其表达的控制序列。

[0138] 术语“片段”意指具有从成熟多肽或结构域的氨基和/或羧基端缺失的一个或多个氨基酸的多肽;其中该片段具有肽聚糖降解活性。

[0139] 术语“宿主细胞”意指易于用包含本发明的多核苷酸的核酸构建体或表达载体进行转化、转染、转导等的任何细胞类型。术语“宿主细胞”涵盖由于复制期间出现的突变而与亲本细胞不相同的任何亲本细胞子代。

[0140] 术语“分离的”意指处于自然界中不存在的形式或环境中的物质。分离的物质的非限制性实例包括(1)任何非天然存在的物质,(2)包括但不限于任何酶、变体、核酸、蛋白质、肽或辅因子的任何物质,该物质至少部分地从与其性质相关的一种或多种或所有天然存在

的成分中去除；(3) 相对于自然界中发现的物质通过人工修饰的任何物质；或(4) 通过相对于与其天然相关的其他组分增加该物质的量而修饰的任何物质(例如，在宿主细胞中的重组生产；编码该物质的基因的多个拷贝；以及使用比与编码该物质的基因天然相关联的启动子更强的启动子)。分离的物质可以存在于发酵液样品中；例如宿主细胞可以经遗传修饰以表达本发明的多肽。来自该宿主细胞的发酵液将包含分离的多肽。本领域技术人员显而易见，本文披露的多肽优选地为经分离形式。

[0141] 术语“衣物洗涤”涉及家用衣物洗涤和工业衣物洗涤两者并且意指用含有本发明的清洁或洗涤剂组合物的溶液处理纺织品的过程。衣物洗涤过程可以例如使用例如家用或工业洗衣机进行或可以手动进行。

[0142] 术语“恶臭”意指清洁物品上不希望的气味。清洁的物品应气味清新并且干净，而没有粘附在该物品上的恶臭。恶臭的一个实例是具有令人不愉快的气味的化合物，这些化合物可以是微生物产生的。另一个实例是令人不愉快的气味，这些气味可以是粘附于已经与人类或动物接触的物品的汗味或体味。恶臭的另一个实例可以是来自香味料的气味，其粘附于物品，例如咖喱或气味强烈的其他香味料。

[0143] 术语“成熟多肽”意指在N末端加工(例如，信号肽的去除)后处于其成熟形式的多肽。

[0144] 在一方面，该成熟多肽是SEQ ID NO:2的氨基酸1至431。SEQ ID NO:2的氨基酸-29至-1是信号肽。在一方面，该成熟多肽是SEQ ID NO:5的氨基酸1至485。SEQ ID NO:5的氨基酸-30至-1是信号肽。在一方面，该成熟多肽是SEQ ID NO:8的氨基酸1至483。SEQ ID NO:8的氨基酸-26至-1是信号肽。在一方面，该成熟多肽是SEQ ID NO:11的氨基酸1至471。SEQ ID NO:11的氨基酸-22至-1是信号肽。在一方面，该成熟多肽是SEQ ID NO:14的氨基酸1至639。在一方面，该成熟多肽是SEQ ID NO:17的氨基酸1至484。SEQ ID NO:17的氨基酸-31至-1是信号肽。在一方面，该成熟多肽是SEQ ID NO:20的氨基酸1至480。SEQ ID NO:20的氨基酸-30至-1是信号肽。在一方面，该成熟多肽是SEQ ID NO:23的氨基酸1至485。SEQ ID NO:23的氨基酸-31至-1是信号肽。在一方面，该成熟多肽是SEQ ID NO:26的氨基酸1至491。SEQ ID NO:26的氨基酸-28至-1是信号肽。在一方面，该成熟多肽是SEQ ID NO:29的氨基酸1至289。SEQ ID NO:29的氨基酸-19至-1是信号肽。在一方面，该成熟多肽是SEQ ID NO:32的氨基酸1至245。SEQ ID NO:32的氨基酸-15至-1是信号肽。在一方面，该成熟多肽是SEQ ID NO:35的氨基酸1至280。SEQ ID NO:35的氨基酸-19至-1是信号肽。在一方面，该成熟多肽是SEQ ID NO:38的氨基酸1至238。SEQ ID NO:38的氨基酸-22至-1是信号肽。在一方面，该成熟多肽是SEQ ID NO:41的氨基酸1至498。SEQ ID NO:41的氨基酸-23至-1是信号肽。在一方面，该成熟多肽是SEQ ID NO:44的氨基酸1至476。SEQ ID NO:44的氨基酸-25至-1是信号肽。在一方面，该成熟多肽是SEQ ID NO:47的氨基酸1至474。SEQ ID NO:47的氨基酸-28至-1是信号肽。在一方面，该成熟多肽是SEQ ID NO:50的氨基酸1至473。SEQ ID NO:50的氨基酸-29至-1是信号肽。在一方面，该成熟多肽是SEQ ID NO:53的氨基酸1至414。SEQ ID NO:53的氨基酸-25至-1是信号肽。在一方面，该成熟多肽是SEQ ID NO:56的氨基酸1至412。SEQ ID NO:56的氨基酸-31至-1是信号肽。在一方面，该成熟多肽是SEQ ID NO:59的氨基酸1至637。SEQ ID NO:59的氨基酸-35至-1是信号肽。在一方面，该成熟多肽是SEQ ID NO:62的氨基酸1至599。SEQ ID NO:62的氨基酸-33至-1是信号肽。在一方面，该成熟多肽是SEQ

ID NO:65的氨基酸1至605。SEQ ID NO:65的氨基酸-31至-1是信号肽。在一方面,该成熟多肽是SEQ ID NO:68的氨基酸1至610。SEQ ID NO:68的氨基酸-36至-1是信号肽。在一方面,该成熟多肽是SEQ ID NO:71的氨基酸1至216。SEQ ID NO:71的氨基酸-20至-1是信号肽。在一方面,该成熟多肽是SEQ ID NO:74的氨基酸1至425。SEQ ID NO:74的氨基酸-26至-1是信号肽。在一方面,该成熟多肽是SEQ ID NO:77的氨基酸1至304。SEQ ID NO:77的氨基酸-25至-1是信号肽。在一方面,该成熟多肽是SEQ ID NO:80的氨基酸1至306。SEQ ID NO:80的氨基酸-29至-1是信号肽。在一方面,该成熟多肽是SEQ ID NO:83的氨基酸1至306。SEQ ID NO:83的氨基酸-23至-1是信号肽。在一方面,该成熟多肽是SEQ ID NO:86的氨基酸1至632。SEQ ID NO:86的氨基酸-35至-1是信号肽。在一方面,该成熟多肽是SEQ ID NO:89的氨基酸1至216。SEQ ID NO:89的氨基酸-24至-1是信号肽。在一方面,该成熟多肽是SEQ ID NO:92的氨基酸1至306。SEQ ID NO:92的氨基酸-27至-1是信号肽。在一方面,该成熟多肽是SEQ ID NO:95的氨基酸1至453。SEQ ID NO:95的氨基酸-29至-1是信号肽。在一方面,该成熟多肽是SEQ ID NO:98的氨基酸1至473。SEQ ID NO:98的氨基酸-29至-1是信号肽。在一方面,该成熟多肽是SEQ ID NO:101的氨基酸1至209。SEQ ID NO:101的氨基酸-27至-1是信号肽。在一方面,该成熟多肽是SEQ ID NO:104的氨基酸1至281。SEQ ID NO:104的氨基酸-24至-1是信号肽。在一方面,该成熟多肽是SEQ ID NO:107的氨基酸1至582。SEQ ID NO:107的氨基酸-57至-1是信号肽。

[0145] 在本领域中已知的是,宿主细胞可以产生由相同多核苷酸表达的两种或更多种不同的成熟多肽(即,具有不同的C末端和/或N末端氨基酸)的混合物。在本领域中还已知的是,不同的宿主细胞不同地加工多肽,并且因此一个表达多核苷酸的宿主细胞当与另一个表达相同多核苷酸的宿主细胞相比时可以产生不同的成熟多肽(例如,具有不同的C末端和/或N末端氨基酸)。

[0146] 术语“成熟多肽编码序列”意指编码具有肽聚糖降解活性的成熟多肽的多核苷酸。

[0147] 在一方面,成熟多肽编码序列是SEQ ID NO:1的核苷酸88至1380,并且SEQ ID NO:1的核苷酸1至87编码信号肽。在一方面,该成熟多肽编码序列是SEQ ID NO:4的核苷酸91至1545,并且SEQ ID NO:4的核苷酸1至90编码信号肽。在一方面,该成熟多肽编码序列是SEQ ID NO:7的核苷酸79至1527,并且SEQ ID NO:7的核苷酸1至78编码信号肽。在一方面,该成熟多肽编码序列是SEQ ID NO:10的核苷酸67至1479,并且SEQ ID NO:10的核苷酸1至66编码信号肽。在一方面,该成熟多肽编码序列是SEQ ID NO:13的核苷酸1至1917。在一方面,该成熟多肽编码序列是SEQ ID NO:16的核苷酸94至1545,并且SEQ ID NO:16的核苷酸1至93编码信号肽。在一方面,该成熟多肽编码序列是SEQ ID NO:19的核苷酸91至1530,并且SEQ ID NO:19的核苷酸1至90编码信号肽。在一方面,该成熟多肽编码序列是SEQ ID NO:22的核苷酸94至1548,并且SEQ ID NO:22的核苷酸1至93编码信号肽。在一方面,该成熟多肽编码序列是SEQ ID NO:25的核苷酸85至1557,并且SEQ ID NO:25的核苷酸1至84编码信号肽。在一方面,该成熟多肽编码序列是SEQ ID NO:28的核苷酸58至924,并且SEQ ID NO:28的核苷酸1至57编码信号肽。在一方面,该成熟多肽编码序列是SEQ ID NO:31的核苷酸46至780,并且SEQ ID NO:31的核苷酸1至45编码信号肽。在一方面,该成熟多肽编码序列是SEQ ID NO:34的核苷酸58至897,并且SEQ ID NO:34的核苷酸1至57编码信号肽。在一方面,该成熟多肽编码序列是SEQ ID NO:37的核苷酸67至780,并且SEQ ID NO:37的核苷酸1至66编码信号

肽。在一方面,该成熟多肽编码序列是SEQ ID NO:40的核苷酸70至1563,并且SEQ ID NO:40的核苷酸1至69编码信号肽。在一方面,该成熟多肽编码序列是SEQ ID NO:43的核苷酸76至1503,并且SEQ ID NO:43的核苷酸1至75编码信号肽。在一方面,该成熟多肽编码序列是SEQ ID NO:46的核苷酸85至1506,并且SEQ ID NO:46的核苷酸1至84编码信号肽。在一方面,该成熟多肽编码序列是SEQ ID NO:49的核苷酸88至1506,并且SEQ ID NO:49的核苷酸1至87编码信号肽。在一方面,该成熟多肽编码序列是SEQ ID NO:52的核苷酸76至1317,并且SEQ ID NO:52的核苷酸1至75编码信号肽。在一方面,该成熟多肽编码序列是SEQ ID NO:55的核苷酸94至1329,并且SEQ ID NO:55的核苷酸1至93编码信号肽。在一方面,该成熟多肽编码序列是SEQ ID NO:58的核苷酸106至2016,并且SEQ ID NO:58的核苷酸1至105编码信号肽。在一方面,该成熟多肽编码序列是SEQ ID NO:61的核苷酸100至1896,并且SEQ ID NO:61的核苷酸1至99编码信号肽。在一方面,该成熟多肽编码序列是SEQ ID NO:64的核苷酸94至1908,并且SEQ ID NO:64的核苷酸1至93编码信号肽。在一方面,该成熟多肽编码序列是SEQ ID NO:67的核苷酸109至1938,并且SEQ ID NO:67的核苷酸1至108编码信号肽。在一方面,该成熟多肽编码序列是SEQ ID NO:70的核苷酸61至708,并且SEQ ID NO:70的核苷酸1至60编码信号肽。在一方面,该成熟多肽编码序列是SEQ ID NO:73的核苷酸79至1353,并且SEQ ID NO:73的核苷酸1至78编码信号肽。在一方面,该成熟多肽编码序列是SEQ ID NO:76的核苷酸76至987,并且SEQ ID NO:76的核苷酸1至75编码信号肽。在一方面,该成熟多肽编码序列是SEQ ID NO:79的核苷酸73至990,并且SEQ ID NO:79的核苷酸1至72编码信号肽。在一方面,该成熟多肽编码序列是SEQ ID NO:82的核苷酸70至987,并且SEQ ID NO:82的核苷酸1至69编码信号肽。在一方面,该成熟多肽编码序列是SEQ ID NO:85的核苷酸106至2001,并且SEQ ID NO:85的核苷酸1至105编码信号肽。在一方面,该成熟多肽编码序列是SEQ ID NO:88的核苷酸73至720,并且SEQ ID NO:88的核苷酸1至72编码信号肽。在一方面,该成熟多肽编码序列是SEQ ID NO:91的核苷酸82至999,并且SEQ ID NO:91的核苷酸1至81编码信号肽。在一方面,该成熟多肽编码序列是SEQ ID NO:94的核苷酸88至1446,并且SEQ ID NO:94的核苷酸1至87编码信号肽。在一方面,该成熟多肽编码序列是SEQ ID NO:97的核苷酸88至1506,并且SEQ ID NO:97的核苷酸1至87编码信号肽。在一方面,该成熟多肽编码序列是SEQ ID NO:100的核苷酸82至708,并且SEQ ID NO:100的核苷酸1至81编码信号肽。在一方面,该成熟多肽编码序列是SEQ ID NO:103的核苷酸73至915,并且SEQ ID NO:103的核苷酸1至72编码信号肽。在一方面,该成熟多肽编码序列是SEQ ID NO:106的核苷酸172至1917,并且SEQ ID NO:106的核苷酸1至171编码信号肽。

[0148] 术语“核酸构建体”意指单链或双链的核酸分子,该核酸分子是从天然存在的基因中分离的,或以原本不存在于自然界中的方式被修饰成包含核酸的区段,或者是合成的,该核酸分子包含一个或多个控制序列。

[0149] 术语“可操作地连接”意指如下构型,在该构型中,控制序列被放置在相对于多核苷酸的编码序列适当的位置处,使得该控制序列指导该编码序列的表达。

[0150] 两个氨基酸序列之间或两个核苷酸序列之间的关联度通过参数“序列同一性”来描述。出于本发明的目的,使用如在EMBOSS软件包(EMBOSS:欧洲分子生物学开放软件包(EMBOSS:The European Molecular Biology Open Software Suite),Rice等人,2000,Trends Genet.[遗传学趋势]16:276-277)(优选5.0.0版本或更新版本)的尼德尔程序中所

实施的尼德曼-翁施算法 (Needleman-Wunsch algorithm) (Needleman和Wunsch,1970, J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]48:443-453) 来确定两个氨基酸序列之间的序列同一性。所使用的参数是空位开放罚分10、空位延伸罚分0.5和EBLOSUM62 (BLOSUM62的EMBOSS版) 取代矩阵。将标记为“最长同一性”的Needle的输出 (使用非简化选项获得) 用作同一性百分比并且计算如下:

[0151] $(\text{相同的残基} \times 100) / (\text{比对长度} - \text{比对中的空位总数})$

[0152] 出于本发明的目的,使用如在EMBOSS软件包 (EMBOSS:欧洲分子生物学开放软件包 (EMBOSS:The European Molecular Biology Open Software Suite),Rice等人,2000,同上) (优选5.0.0版本或更新版本) 的尼德尔程序中所实施的尼德曼-翁施算法 (Needleman和Wunsch,1970,同上) 来确定两个脱氧核糖核苷酸序列之间的序列同一性。所使用的参数是空位开放罚分10、空位延伸罚分0.5和EDNAFULL (NCBI NUC4.4的EMBOSS版) 取代矩阵。将标记为“最长同一性”的Needle的输出 (使用非简化选项获得) 用作同一性百分比并且计算如下:

[0153] $(\text{相同的脱氧核糖核苷酸} \times 100) / (\text{比对长度} - \text{比对中的空位总数})$

[0154] 术语“非常低严格条件”意指对于长度为至少100个核苷酸的探针而言,遵循标准DNA印迹程序,在42℃,于5X SSPE,0.3%SDS,200微克/ml剪切并变性的鲑鱼精子DNA和25%甲酰胺中预杂交和杂交12至24小时。最后在45℃使用2X SSC、0.2%SDS将运载体材料洗涤三次,每次15分钟。

[0155] 术语“低严格条件”意指对于长度为至少100个核苷酸的探针而言,遵循标准DNA印迹程序,在42℃,于5X SSPE,0.3%SDS,200微克/ml剪切并变性的鲑鱼精子DNA和25%甲酰胺中预杂交和杂交12至24小时。最后在50℃使用2X SSC、0.2%SDS将运载体材料洗涤三次,每次15分钟。

[0156] 术语“中严格条件”意指对于长度为至少100个核苷酸的探针而言,遵循标准DNA印迹程序,在42℃,于5X SSPE,0.3%SDS,200微克/ml剪切并变性的鲑鱼精子DNA和35%甲酰胺中预杂交和杂交12至24小时。最后在55℃使用2X SSC、0.2%SDS将运载体材料洗涤三次,每次15分钟。

[0157] 术语“中-高严格条件”意指对于长度为至少100个核苷酸的探针而言,遵循标准DNA印迹程序,在42℃,于5X SSPE,0.3%SDS,200微克/ml剪切并变性的鲑鱼精子DNA和35%甲酰胺中预杂交和杂交12至24小时。最后在60℃使用2X SSC、0.2%SDS将运载体材料洗涤三次,每次15分钟。

[0158] 术语“高严格条件”意指对于长度为至少100个核苷酸的探针而言,遵循标准DNA印迹程序,在42℃在5X SSPE、0.3%SDS、200微克/ml剪切并变性的鲑鱼精子DNA和50%甲酰胺中预杂交和杂交12至24小时。最后在65℃使用2X SSC、0.2%SDS将运载体材料洗涤三次,每次15分钟。

[0159] 术语“非常高严格条件”意指对于长度为至少100个核苷酸的探针而言,遵循标准DNA印迹程序,在42℃在5X SSPE,0.3%SDS,200微克/ml剪切并变性的鲑鱼精子DNA和50%甲酰胺中预杂交和杂交12至24小时。最后在70℃使用2X SSC、0.2%SDS将运载体材料洗涤三次,每次15分钟。]

[0160] 术语“变体”意指具有肽聚糖降解活性的、在一个或多个位置处包括改变(即,取

代、插入和/或缺失)的多肽。取代意指用不同的氨基酸替代占据某一位置的氨基酸;缺失意指去除占据某一位置的氨基酸;而插入意指在邻接并且紧随占据某一位置的氨基酸之后添加氨基酸。

[0161] 命名法:出于本发明的目的,命名法[E/Q]或[EQ]意指在此位置的氨基酸可以是谷氨酸(Glu,E)或谷氨酰胺(Gln,Q)。同样,命名法[V/G/A/I]或[VGAI]意指在此位置的氨基酸可以是缬氨酸(Val,V)、甘氨酸(Gly,G)、丙氨酸(Ala,A)或异亮氨酸(Ile,I),对于如本文所描述的其他组合,依次类推。除非进一步另有限制,否则氨基酸X被这样定义,使得它可以是20种天然氨基酸中的任一种。

具体实施方式

[0162] 如以上背景部分所提及,纺织品和表面(如衣物和餐具)会被许多不同类型的污垢弄脏。单一的复杂污渍,如食物污渍、皮脂、死细胞碎片、EPS或生物膜相关污渍,通常由不同有机材料如蛋白质、多糖、油脂等组成,这些有机材料通常难以用传统的洗涤剂组合物完全去除。此外,此类污渍可能产生如再沉积或恶臭的缺点。本发明的多肽解决了此问题,从而为复杂污渍如生物膜和EPS提供了良好的清洁效果,以及减少了来自例如纺织品和餐具的再沉积和恶臭。本发明的多肽是具有水解酶活性和优选地N-乙酰基胞壁酰基-L-丙氨酸酰胺酶活性的肽聚糖降解酶。本发明的多肽包含酰胺酶结构域,优选如PFAM(PF01510,Pfam版本31.0Finn(2016).Nucleic Acids Research[核酸研究],Database Issue[数据库卷]44:D279-D285)中定义的酰胺酶_2结构域。此外,本文描述了簇或进化枝,这些簇或进化枝由特定进化枝的多肽共享的特定基序定义。构建含有酰胺酶_2结构域的多肽序列的系统发生树。系统发生树通过多重比对含有至少一个如实例6中所述的酰胺酶_2结构域的成熟多肽序列构建。

[0163] 本发明的一个实施例涉及具有水解酶活性和优选地N-乙酰基胞壁酰基-L-丙氨酸酰胺酶活性的肽聚糖降解酶。本发明的一个实施例涉及具有水解酶活性和优选地N-乙酰基胞壁酰基-L-丙氨酸酰胺酶活性的肽聚糖降解酶,其中该多肽包含基序N[IV]X[AG][GAS]A[AY][LV]L(SEQ ID NO:111),其中X可以是任何天然存在的氨基酸,该氨基酸位于对应于海栖小单孢菌(SEQ ID NO:6)中位置85至93的位置中。

[0164] 可以将含有酰胺酶_2结构域的多肽分成不同的子簇。子簇由一个或多个短序列基序定义,以及通过含有如PFAM(PF01510,Pfam版本31.0)中所定义的酰胺酶_2结构域定义。我们将包含基序N[IV]X[AG][GAS]A[AY][LV]L(SEQ ID NO:111)的一个子簇表示为PGL进化枝。含有酰胺酶_2结构域以及基序的所有多肽序列将被表示为属于PGL进化枝。

[0165] 在一个实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:2的成熟多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,这些多肽具有肽聚糖降解活性。在一方面,这些多肽与SEQ ID NO:2的成熟多肽相差多达10个(例如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、或10个)氨基酸。

[0166] 在一个具体实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:2的成熟多肽具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有SEQ ID NO:2的成

熟多肽的至少至少70%的肽聚糖降解活性。

[0167] 在一个实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:5的成熟多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,这些多肽具有肽聚糖降解活性。在一方面,这些多肽与SEQ ID NO:5的成熟多肽相差多达10个(例如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、或10个)氨基酸。

[0168] 在一个具体实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:5的成熟多肽具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有SEQ ID NO:5的成熟多肽的至少至少70%的肽聚糖降解活性。

[0169] 在一个实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:8的成熟多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,这些多肽具有肽聚糖降解活性。在一方面,这些多肽与SEQ ID NO:8的成熟多肽相差多达10个(例如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、或10个)氨基酸。

[0170] 在一个具体实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:8的成熟多肽具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有SEQ ID NO:8的成熟多肽的至少至少70%的肽聚糖降解活性。

[0171] 在一个实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:11的成熟多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,这些多肽具有肽聚糖降解活性。在一方面,这些多肽与SEQ ID NO:11的成熟多肽相差多达10个(例如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、或10个)氨基酸。

[0172] 在一个具体实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:11的成熟多肽具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有SEQ ID NO:11的成熟多肽的至少至少70%的肽聚糖降解活性。

[0173] 在一个实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:14的成熟多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,这些多肽具有肽聚糖降解活性。在一方面,这些多肽与SEQ ID NO:14的成熟多肽相差多达10个(例如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、或10个)氨基酸。

[0174] 在一个具体实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:14的成熟多肽具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有SEQ ID NO:14的成熟多肽的至少至少70%的肽聚糖降解活性。

[0175] 在一个实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:17的成熟多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少

93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,这些多肽具有肽聚糖降解活性。在一方面,这些多肽与SEQ ID NO:17的成熟多肽相差多达10个(例如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、或10个)氨基酸。

[0176] 在一个具体实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:17的成熟多肽具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有SEQ ID NO:17的成熟多肽的至少至少70%的肽聚糖降解活性。

[0177] 在一个实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:20的成熟多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,这些多肽具有肽聚糖降解活性。在一方面,这些多肽与SEQ ID NO:20的成熟多肽相差多达10个(例如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、或10个)氨基酸。

[0178] 在一个具体实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:20的成熟多肽具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有SEQ ID NO:20的成熟多肽的至少至少70%的肽聚糖降解活性。

[0179] 在一个实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:23的成熟多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,这些多肽具有肽聚糖降解活性。在一方面,这些多肽与SEQ ID NO:23的成熟多肽相差多达10个(例如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、或10个)氨基酸。

[0180] 在一个具体实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:23的成熟多肽具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有SEQ ID NO:23的成熟多肽的至少至少70%的肽聚糖降解活性。

[0181] 在一个实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:26的成熟多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,这些多肽具有肽聚糖降解活性。在一方面,这些多肽与SEQ ID NO:26的成熟多肽相差多达10个(例如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、或10个)氨基酸。

[0182] 在一个具体实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:26的成熟多肽具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有SEQ ID NO:26的成熟多肽的至少至少70%的肽聚糖降解活性。

[0183] 在一个实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:29的成熟多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,这些多肽具有肽聚糖降解活性。在一方面,这些多肽与SEQ ID NO:29的成熟多肽相差多达10个(例如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、或10个)氨基酸。

[0184] 在一个具体实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:29的成熟多肽具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有SEQ ID NO:29的成熟多肽的至少至少70%的肽聚糖降解活性。

[0185] 在一个实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:32的成熟多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,这些多肽具有肽聚糖降解活性。在一方面,这些多肽与SEQ ID NO:32的成熟多肽相差多达10个(例如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、或10个)氨基酸。

[0186] 在一个具体实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:32的成熟多肽具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有SEQ ID NO:32的成熟多肽的至少至少70%的肽聚糖降解活性。

[0187] 在一个实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:35的成熟多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,这些多肽具有肽聚糖降解活性。在一方面,这些多肽与SEQ ID NO:35的成熟多肽相差多达10个(例如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、或10个)氨基酸。

[0188] 在一个具体实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:35的成熟多肽具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有SEQ ID NO:35的成熟多肽的至少至少70%的肽聚糖降解活性。

[0189] 在一个实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:38的成熟多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,这些多肽具有肽聚糖降解活性。在一方面,这些多肽与SEQ ID NO:38的成熟多肽相差多达10个(例如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、或10个)氨基酸。

[0190] 在一个具体实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:38的成熟多肽具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有SEQ ID NO:38的成熟多肽的至少至少70%的肽聚糖降解活性。

[0191] 在一个实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:41的成熟多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,这些多肽具有肽聚糖降解活性。在一方面,这些多肽与SEQ ID NO:41的成熟多肽相差多达10个(例如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、或10个)氨基酸。

[0192] 在一个具体实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:41的成熟多肽具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有SEQ ID NO:

41的成熟多肽的至少至少70%的肽聚糖降解活性。

[0193] 在一个实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:44的成熟多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,这些多肽具有肽聚糖降解活性。在一方面,这些多肽与SEQ ID NO:44的成熟多肽相差多达10个(例如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、或10个)氨基酸。

[0194] 在一个具体实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:44的成熟多肽具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有SEQ ID NO:44的成熟多肽的至少至少70%的肽聚糖降解活性。

[0195] 在一个实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:47的成熟多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,这些多肽具有肽聚糖降解活性。在一方面,这些多肽与SEQ ID NO:47的成熟多肽相差多达10个(例如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、或10个)氨基酸。

[0196] 在一个具体实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:47的成熟多肽具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有SEQ ID NO:47的成熟多肽的至少至少70%的肽聚糖降解活性。

[0197] 在一个实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:50的成熟多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,这些多肽具有肽聚糖降解活性。在一方面,这些多肽与SEQ ID NO:50的成熟多肽相差多达10个(例如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、或10个)氨基酸。

[0198] 在一个具体实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:50的成熟多肽具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有SEQ ID NO:50的成熟多肽的至少至少70%的肽聚糖降解活性。

[0199] 在一个实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:53的成熟多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,这些多肽具有肽聚糖降解活性。在一方面,这些多肽与SEQ ID NO:53的成熟多肽相差多达10个(例如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、或10个)氨基酸。

[0200] 在一个具体实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:53的成熟多肽具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有SEQ ID NO:53的成熟多肽的至少至少70%的肽聚糖降解活性。

[0201] 在一个实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:56的成熟多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少

93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,这些多肽具有肽聚糖降解活性。在一方面,这些多肽与SEQ ID NO:56的成熟多肽相差多达10个(例如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、或10个)氨基酸。

[0202] 在一个具体实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:56的成熟多肽具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有SEQ ID NO:56的成熟多肽的至少至少70%的肽聚糖降解活性。

[0203] 在一个实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:59的成熟多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,这些多肽具有肽聚糖降解活性。在一方面,这些多肽与SEQ ID NO:59的成熟多肽相差多达10个(例如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、或10个)氨基酸。

[0204] 在一个具体实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:59的成熟多肽具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有SEQ ID NO:59的成熟多肽的至少至少70%的肽聚糖降解活性。

[0205] 在一个实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:62的成熟多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,这些多肽具有肽聚糖降解活性。在一方面,这些多肽与SEQ ID NO:62的成熟多肽相差多达10个(例如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、或10个)氨基酸。

[0206] 在一个具体实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:62的成熟多肽具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有SEQ ID NO:62的成熟多肽的至少至少70%的肽聚糖降解活性。

[0207] 在一个实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:65的成熟多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,这些多肽具有肽聚糖降解活性。在一方面,这些多肽与SEQ ID NO:65的成熟多肽相差多达10个(例如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、或10个)氨基酸。

[0208] 在一个具体实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:65的成熟多肽具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有SEQ ID NO:65的成熟多肽的至少至少70%的肽聚糖降解活性。

[0209] 在一个实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:68的成熟多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,这些多肽具有肽聚糖降解活性。在一方面,这些多肽与SEQ ID NO:68的成熟多肽相差多达10个(例如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、或10个)氨基酸。

[0210] 在一个具体实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:68的成熟多肽具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有SEQ ID NO:68的成熟多肽的至少至少70%的肽聚糖降解活性。

[0211] 在一个实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:71的成熟多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,这些多肽具有肽聚糖降解活性。在一方面,这些多肽与SEQ ID NO:71的成熟多肽相差多达10个(例如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、或10个)氨基酸。

[0212] 在一个具体实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:71的成熟多肽具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有SEQ ID NO:71的成熟多肽的至少至少70%的肽聚糖降解活性。

[0213] 在一个实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:74的成熟多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,这些多肽具有肽聚糖降解活性。在一方面,这些多肽与SEQ ID NO:74的成熟多肽相差多达10个(例如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、或10个)氨基酸。

[0214] 在一个具体实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:74的成熟多肽具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有SEQ ID NO:74的成熟多肽的至少至少70%的肽聚糖降解活性。

[0215] 在一个实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:77的成熟多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,这些多肽具有肽聚糖降解活性。在一方面,这些多肽与SEQ ID NO:77的成熟多肽相差多达10个(例如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、或10个)氨基酸。

[0216] 在一个具体实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:77的成熟多肽具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有SEQ ID NO:77的成熟多肽的至少至少70%的肽聚糖降解活性。

[0217] 在一个实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:80的成熟多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,这些多肽具有肽聚糖降解活性。在一方面,这些多肽与SEQ ID NO:80的成熟多肽相差多达10个(例如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、或10个)氨基酸。

[0218] 在一个具体实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:80的成熟多肽具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有SEQ ID NO:

80的成熟多肽的至少至少70%的肽聚糖降解活性。

[0219] 在一个实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:83的成熟多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,这些多肽具有肽聚糖降解活性。在一方面,这些多肽与SEQ ID NO:83的成熟多肽相差多达10个(例如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、或10个)氨基酸。

[0220] 在一个具体实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:83的成熟多肽具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有SEQ ID NO:83的成熟多肽的至少至少70%的肽聚糖降解活性。

[0221] 在一个实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:86的成熟多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,这些多肽具有肽聚糖降解活性。在一方面,这些多肽与SEQ ID NO:86的成熟多肽相差多达10个(例如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、或10个)氨基酸。

[0222] 在一个具体实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:86的成熟多肽具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有SEQ ID NO:86的成熟多肽的至少至少70%的肽聚糖降解活性。

[0223] 在一个实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:89的成熟多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,这些多肽具有肽聚糖降解活性。在一方面,这些多肽与SEQ ID NO:89的成熟多肽相差多达10个(例如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、或10个)氨基酸。

[0224] 在一个具体实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:89的成熟多肽具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有SEQ ID NO:89的成熟多肽的至少至少70%的肽聚糖降解活性。

[0225] 在一个实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:92的成熟多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,这些多肽具有肽聚糖降解活性。在一方面,这些多肽与SEQ ID NO:92的成熟多肽相差多达10个(例如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、或10个)氨基酸。

[0226] 在一个具体实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:92的成熟多肽具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有SEQ ID NO:92的成熟多肽的至少至少70%的肽聚糖降解活性。

[0227] 在一个实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:95的成熟多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少

93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,这些多肽具有肽聚糖降解活性。在一方面,这些多肽与SEQ ID NO:95的成熟多肽相差多达10个(例如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、或10个)氨基酸。

[0228] 在一个具体实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:95的成熟多肽具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有SEQ ID NO:95的成熟多肽的至少至少70%的肽聚糖降解活性。

[0229] 在一个实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:98的成熟多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,这些多肽具有肽聚糖降解活性。在一方面,这些多肽与SEQ ID NO:98的成熟多肽相差多达10个(例如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、或10个)氨基酸。

[0230] 在一个具体实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:98的成熟多肽具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有SEQ ID NO:98的成熟多肽的至少至少70%的肽聚糖降解活性。

[0231] 在一个实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:101的成熟多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,这些多肽具有肽聚糖降解活性。在一方面,这些多肽与SEQ ID NO:101的成熟多肽相差多达10个(例如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、或10个)氨基酸。

[0232] 在一个具体实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:101的成熟多肽具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有SEQ ID NO:101的成熟多肽的至少至少70%的肽聚糖降解活性。

[0233] 在一个实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:104的成熟多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,这些多肽具有肽聚糖降解活性。在一方面,这些多肽与SEQ ID NO:104的成熟多肽相差多达10个(例如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、或10个)氨基酸。

[0234] 在一个具体实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:104的成熟多肽具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有SEQ ID NO:104的成熟多肽的至少至少70%的肽聚糖降解活性。

[0235] 在一个实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:107的成熟多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,这些多肽具有肽聚糖降解活性。在一方面,这些多肽与SEQ ID NO:107的成熟多肽相差多达10个(例如1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、或10个)氨基酸。

[0236] 在一个具体实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:107的成熟多肽具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有SEQ ID NO:107的成熟多肽的至少至少70%的肽聚糖降解活性。

[0237] 在一个具体实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:3的多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有肽聚糖降解活性。

[0238] 在一个具体实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:6的多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有肽聚糖降解活性。

[0239] 在一个具体实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:9的多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有肽聚糖降解活性。

[0240] 在一个具体实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:12的多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有肽聚糖降解活性。

[0241] 在一个具体实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:15的多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有肽聚糖降解活性。

[0242] 在一个具体实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:18的多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有肽聚糖降解活性。

[0243] 在一个具体实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:21的多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有肽聚糖降解活性。

[0244] 在一个具体实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:24的多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有肽聚糖降解活性。

[0245] 在一个具体实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:27的多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的

多肽,并且其中该多肽具有肽聚糖降解活性。

[0246] 在一个具体实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:30的多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有肽聚糖降解活性。

[0247] 在一个具体实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:33的多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有肽聚糖降解活性。

[0248] 在一个具体实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:36的多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有肽聚糖降解活性。

[0249] 在一个具体实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:39的多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有肽聚糖降解活性。

[0250] 在一个具体实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:42的多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有肽聚糖降解活性。

[0251] 在一个具体实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:45的多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有肽聚糖降解活性。

[0252] 在一个具体实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:48的多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有肽聚糖降解活性。

[0253] 在一个具体实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:51的多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有肽聚糖降解活性。

[0254] 在一个具体实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:54的多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有肽聚糖降解活性。

[0255] 在一个具体实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:57的多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少

93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有肽聚糖降解活性。

[0256] 在一个具体实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:60的多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有肽聚糖降解活性。

[0257] 在一个具体实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:63的多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有肽聚糖降解活性。

[0258] 在一个具体实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:66的多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有肽聚糖降解活性。

[0259] 在一个具体实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:69的多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有肽聚糖降解活性。

[0260] 在一个具体实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:72的多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有肽聚糖降解活性。

[0261] 在一个具体实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:75的多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有肽聚糖降解活性。

[0262] 在一个具体实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:78的多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有肽聚糖降解活性。

[0263] 在一个具体实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:81的多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有肽聚糖降解活性。

[0264] 在一个具体实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:84的多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有肽聚糖降解活性。

[0265] 在一个具体实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:87的多肽具有至少60%,例如至

少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有肽聚糖降解活性。

[0266] 在一个具体实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:90的多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有肽聚糖降解活性。

[0267] 在一个具体实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:93的多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有肽聚糖降解活性。

[0268] 在一个具体实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:96的多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有肽聚糖降解活性。

[0269] 在一个具体实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:99的多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有肽聚糖降解活性。

[0270] 在一个具体实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:102的多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有肽聚糖降解活性。

[0271] 在一个具体实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:105的多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有肽聚糖降解活性。

[0272] 在一个具体实施例中,本发明涉及与SEQ ID NO:108的多肽具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有肽聚糖降解活性。

[0273] 本发明的一个实施例涉及一种多肽,其中该多肽包含基序N[IV]X[AG][GAS]A[AY][LV]L(SEQ ID NO:111),其中该多肽选自由以下组成的组:SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:96、SEQ ID NO:99和SEQ ID NO:108以及与其具有至少至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有

肽聚糖降解活性。

[0274] 本发明的一个实施例涉及一种多肽,其中该多肽包含基序N[IV]X[AG][GAS]A[AY][LV]L (SEQ ID NO:111),其中该多肽选自由以下组成的组:SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:96、SEQ ID NO:99和SEQ ID NO:108以及与其具有至少至少60%序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有肽聚糖降解活性。

[0275] 本发明的一个实施例涉及一种多肽,其中该多肽包含基序N[IV]X[AG][GAS]A[AY][LV]L (SEQ ID NO:111),其中该多肽选自由以下组成的组:SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:96、SEQ ID NO:99和SEQ ID NO:108以及与其具有至少至少70%序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有肽聚糖降解活性。

[0276] 本发明的一个实施例涉及一种多肽,其中该多肽包含基序N[IV]X[AG][GAS]A[AY][LV]L (SEQ ID NO:111),其中该多肽选自由以下组成的组:SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:96、SEQ ID NO:99和SEQ ID NO:108以及与其具有至少至少80%序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有肽聚糖降解活性。

[0277] 本发明的一个实施例涉及一种多肽,其中该多肽包含基序N[IV]X[AG][GAS]A[AY][LV]L (SEQ ID NO:111),其中该多肽选自由以下组成的组:SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:96、SEQ ID NO:99和SEQ ID NO:108以及与其具有至少至少90%序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有肽聚糖降解活性。

[0278] 本发明的一个实施例涉及一种多肽,其中该多肽包含基序N[IV]X[AG][GAS]A[AY][LV]L (SEQ ID NO:111),其中该多肽选自由以下组成的组:SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:96、SEQ ID NO:99和SEQ ID NO:108以及与其具有至少至少95%序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有肽聚糖降解活性。

[0279] 本发明的一个实施例涉及一种多肽,其中该多肽包含基序N[IV]X[AG][GAS]A[AY][LV]L (SEQ ID NO:111),其中该多肽选自由以下组成的组:SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:27、SEQ

ID NO:42、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:96、SEQ ID NO:99和SEQ ID NO:108以及与其具有至少至少98%序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有肽聚糖降解活性。

[0280] 本发明的一个实施例涉及一种多肽,其中该多肽包含基序N[IV]X[AG][GAS]A[AY][LV]L (SEQ ID NO:111),其中该多肽选自由以下组成的组:SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:96、SEQ ID NO:99和SEQ ID NO:108以及与其具有至少至少99%序列同一性的多肽,并且其中该多肽具有肽聚糖降解活性。

[0281] 在本文披露的任何实施例中,多肽优选地经分离,即,多肽为如上文所定义的经“分离”形式或处于上文所定义的经“分离”环境中。

[0282] 本发明的一种多肽优选地包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列或其等位基因变体或由其组成;或是其具有肽聚糖降解活性的片段。在另一方面,该多肽包含SEQ ID NO:3所示的成熟多肽或由其组成。在另一方面,该多肽包含SEQ ID NO:2的氨基酸1至431或由其组成。

[0283] 本发明的多肽优选地包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列或其等位基因变体,或由其组成;或是其具有肽聚糖降解活性的片段。在另一方面,该多肽包含SEQ ID NO:6所示的成熟多肽或由其组成。在另一方面,该多肽包含SEQ ID NO:5的氨基酸1至485或由其组成。

[0284] 本发明的多肽优选地包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列或其等位基因变体,或由其组成;或是其具有肽聚糖降解活性的片段。在另一方面,该多肽包含SEQ ID NO:9所示的成熟多肽或由其组成。在另一方面,该多肽包含SEQ ID NO:8的氨基酸1至483或由其组成。

[0285] 本发明的多肽优选地包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列或其等位基因变体,或由其组成;或是其具有肽聚糖降解活性的片段。在另一方面,该多肽包含SEQ ID NO:12所示的成熟多肽或由其组成。在另一方面,该多肽包含SEQ ID NO:11的氨基酸1至471或由其组成。

[0286] 本发明的多肽优选地包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列或其等位基因变体,或由其组成;或是其具有肽聚糖降解活性的片段。在另一方面,该多肽包含SEQ ID NO:15所示的成熟多肽或由其组成。在另一方面,该多肽包含SEQ ID NO:14的氨基酸1至639或由其组成。

[0287] 本发明的多肽优选地包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列或其等位基因变体,或由其组成;或是其具有肽聚糖降解活性的片段。在另一方面,该多肽包含SEQ ID NO:18所示的成熟多肽或由其组成。在另一方面,该多肽包含SEQ ID NO:17的氨基酸1至484或由其组成。

[0288] 本发明的多肽优选地包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列或其等位基因变体,或由其组成;或是其具有肽聚糖降解活性的片段。在另一方面,该多肽包含SEQ ID NO:21所示的成熟多肽或由其组成。在另一方面,该多肽包含SEQ ID NO:20的氨基酸1至480或由其组成。

[0289] 本发明的多肽优选地包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列或其等位基因变体,或由其组成;或是其具有肽聚糖降解活性的片段。在另一方面,该多肽包含SEQ ID NO:24所示的成熟多肽或由其组成。在另一方面,该多肽包含SEQ ID NO:23的氨基酸1至485或由其组成。

[0290] 本发明的多肽优选地包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列或其等位基因变体,或由其组成;或是其具有肽聚糖降解活性的片段。在另一方面,该多肽包含SEQ ID NO:27所示的成

熟多肽或由其组成。在另一方面,该多肽包含SEQ ID NO:26的氨基酸1至491或由其组成。

[0291] 本发明的多肽优选地包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列或其等位基因变体,或由其组成;或是其具有肽聚糖降解活性的片段。在另一方面,该多肽包含SEQ ID NO:30所示的成熟多肽或由其组成。在另一方面,该多肽包含SEQ ID NO:29的氨基酸1至289或由其组成。

[0292] 本发明的多肽优选地包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列或其等位基因变体,或由其组成;或是其具有肽聚糖降解活性的片段。在另一方面,该多肽包含SEQ ID NO:33所示的成熟多肽或由其组成。在另一方面,该多肽包含SEQ ID NO:32的氨基酸1至245或由其组成。

[0293] 本发明的多肽优选地包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列或其等位基因变体,或由其组成;或是其具有肽聚糖降解活性的片段。在另一方面,该多肽包含SEQ ID NO:36所示的成熟多肽或由其组成。在另一方面,该多肽包含SEQ ID NO:35的氨基酸1至280或由其组成。

[0294] 本发明的多肽优选地包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列或其等位基因变体,或由其组成;或是其具有肽聚糖降解活性的片段。在另一方面,该多肽包含SEQ ID NO:39所示的成熟多肽或由其组成。在另一方面,该多肽包含SEQ ID NO:38的氨基酸1至238或由其组成。

[0295] 本发明的多肽优选地包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列或其等位基因变体,或由其组成;或是其具有肽聚糖降解活性的片段。在另一方面,该多肽包含SEQ ID NO:42所示的成熟多肽或由其组成。在另一方面,该多肽包含SEQ ID NO:41的氨基酸1至498或由其组成。

[0296] 本发明的多肽优选地包含SEQ ID NO:44的氨基酸序列或其等位基因变体,或由其组成;或是其具有肽聚糖降解活性的片段。在另一方面,该多肽包含SEQ ID NO:45所示的成熟多肽或由其组成。在另一方面,该多肽包含SEQ ID NO:44的氨基酸1至476或由其组成。

[0297] 本发明的多肽优选地包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列或其等位基因变体,或由其组成;或是其具有肽聚糖降解活性的片段。在另一方面,该多肽包含SEQ ID NO:48所示的成熟多肽或由其组成。在另一方面,该多肽包含SEQ ID NO:47的氨基酸1至474或由其组成。

[0298] 本发明的多肽优选地包含SEQ ID NO:50的氨基酸序列或其等位基因变体,或由其组成;或是其具有肽聚糖降解活性的片段。在另一方面,该多肽包含SEQ ID NO:51所示的成熟多肽或由其组成。在另一方面,该多肽包含SEQ ID NO:50的氨基酸1至473或由其组成。

[0299] 本发明的多肽优选地包含SEQ ID NO:53的氨基酸序列或其等位基因变体,或由其组成;或是其具有肽聚糖降解活性的片段。在另一方面,该多肽包含SEQ ID NO:54所示的成熟多肽或由其组成。在另一方面,该多肽包含SEQ ID NO:53的氨基酸1至414或由其组成。

[0300] 本发明的多肽优选地包含SEQ ID NO:56的氨基酸序列或其等位基因变体,或由其组成;或是其具有肽聚糖降解活性的片段。在另一方面,该多肽包含SEQ ID NO:57所示的成熟多肽或由其组成。在另一方面,该多肽包含SEQ ID NO:56的氨基酸1至412或由其组成。

[0301] 本发明的多肽优选地包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列或其等位基因变体,或由其组成;或是其具有肽聚糖降解活性的片段。在另一方面,该多肽包含SEQ ID NO:60所示的成熟多肽或由其组成。在另一方面,该多肽包含SEQ ID NO:59的氨基酸1至637或由其组成。

[0302] 本发明的多肽优选地包含SEQ ID NO:62的氨基酸序列或其等位基因变体,或由其组成;或是其具有肽聚糖降解活性的片段。在另一方面,该多肽包含SEQ ID NO:63所示的成熟多肽或由其组成。在另一方面,该多肽包含SEQ ID NO:62的氨基酸1至599或由其组成。

[0303] 本发明的多肽优选地包含SEQ ID NO:65的氨基酸序列或其等位基因变体,或由其组成;或是其具有肽聚糖降解活性的片段。在另一方面,该多肽包含SEQ ID NO:66所示的成

熟多肽或由其组成。在另一方面,该多肽包含SEQ ID NO:65的氨基酸1至605或由其组成。

[0304] 本发明的多肽优选地包含SEQ ID NO:68的氨基酸序列或其等位基因变体,或由其组成;或是其具有肽聚糖降解活性的片段。在另一方面,该多肽包含SEQ ID NO:69所示的成熟多肽或由其组成。在另一方面,该多肽包含SEQ ID NO:68的氨基酸1至610或由其组成。

[0305] 本发明的多肽优选地包含SEQ ID NO:71的氨基酸序列或其等位基因变体,或由其组成;或是其具有肽聚糖降解活性的片段。在另一方面,该多肽包含SEQ ID NO:72所示的成熟多肽或由其组成。在另一方面,该多肽包含SEQ ID NO:71的氨基酸1至216或由其组成。

[0306] 本发明的多肽优选地包含SEQ ID NO:74的氨基酸序列或其等位基因变体,或由其组成;或是其具有肽聚糖降解活性的片段。在另一方面,该多肽包含SEQ ID NO:75所示的成熟多肽或由其组成。在另一方面,该多肽包含SEQ ID NO:74的氨基酸1至425或由其组成。

[0307] 本发明的多肽优选地包含SEQ ID NO:77的氨基酸序列或其等位基因变体,或由其组成;或是其具有肽聚糖降解活性的片段。在另一方面,该多肽包含SEQ ID NO:78所示的成熟多肽或由其组成。在另一方面,该多肽包含SEQ ID NO:77的氨基酸1至304或由其组成。

[0308] 本发明的多肽优选地包含SEQ ID NO:80的氨基酸序列或其等位基因变体,或由其组成;或是其具有肽聚糖降解活性的片段。在另一方面,该多肽包含SEQ ID NO:81所示的成熟多肽或由其组成。在另一方面,该多肽包含SEQ ID NO:80的氨基酸1至306或由其组成。

[0309] 本发明的多肽优选地包含SEQ ID NO:83的氨基酸序列或其等位基因变体,或由其组成;或是其具有肽聚糖降解活性的片段。在另一方面,该多肽包含SEQ ID NO:84所示的成熟多肽或由其组成。在另一方面,该多肽包含SEQ ID NO:83的氨基酸1至306或由其组成。

[0310] 本发明的多肽优选地包含SEQ ID NO:86的氨基酸序列或其等位基因变体,或由其组成;或是其具有肽聚糖降解活性的片段。在另一方面,该多肽包含SEQ ID NO:87所示的成熟多肽或由其组成。在另一方面,该多肽包含SEQ ID NO:86的氨基酸1至632或由其组成。

[0311] 本发明的多肽优选地包含SEQ ID NO:89的氨基酸序列或其等位基因变体,或由其组成;或是其具有肽聚糖降解活性的片段。在另一方面,该多肽包含SEQ ID NO:90所示的成熟多肽或由其组成。在另一方面,该多肽包含SEQ ID NO:89的氨基酸1至216或由其组成。

[0312] 本发明的多肽优选地包含SEQ ID NO:92的氨基酸序列或其等位基因变体,或由其组成;或是其具有肽聚糖降解活性的片段。在另一方面,该多肽包含SEQ ID NO:93所示的成熟多肽或由其组成。在另一方面,该多肽包含SEQ ID NO:92的氨基酸1至306或由其组成。

[0313] 本发明的多肽优选地包含SEQ ID NO:95的氨基酸序列或其等位基因变体,或由其组成;或是其具有肽聚糖降解活性的片段。在另一方面,该多肽包含SEQ ID NO:96所示的成熟多肽或由其组成。在另一方面,该多肽包含SEQ ID NO:95的氨基酸1至453或由其组成。

[0314] 本发明的多肽优选地包含SEQ ID NO:98的氨基酸序列或其等位基因变体,或由其组成;或是其具有肽聚糖降解活性的片段。在另一方面,该多肽包含SEQ ID NO:99所示的成熟多肽或由其组成。在另一方面,该多肽包含SEQ ID NO:98的氨基酸1至473或由其组成。

[0315] 本发明的多肽优选地包含SEQ ID NO:101的氨基酸序列或其等位基因变体,或由其组成;或是其具有肽聚糖降解活性的片段。在另一方面,该多肽包含SEQ ID NO:102所示的成熟多肽或由其组成。在另一方面,该多肽包含SEQ ID NO:101的氨基酸1至209或由其组成。

[0316] 本发明的多肽优选地包含SEQ ID NO:104的氨基酸序列或其等位基因变体,或由

其组成;或是其具有肽聚糖降解活性的片段。在另一方面,该多肽包含SEQ ID NO:105所示的成熟多肽或由其组成。在另一方面,该多肽包含SEQ ID NO:104的氨基酸1至281或由其组成。

[0317] 本发明的多肽优选地包含SEQ ID NO:107的氨基酸序列或其等位基因变体,或由其组成;或是其具有肽聚糖降解活性的片段。在另一方面,该多肽包含SEQ ID NO:108所示的成熟多肽或由其组成。在另一方面,该多肽包含SEQ ID NO:107的氨基酸1至582或由其组成。

[0318] 在另一个实施例中,本发明涉及一种由如下多核苷酸编码的具有肽聚糖降解活性的多肽,该多核苷酸在非常低的严格条件、低严格条件、中严格条件、中-高严格条件、高严格条件或非常高的严格条件下与以下杂交:(i) SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:85、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:94、SEQ ID NO:97、SEQ ID NO:100、SEQ ID NO:103或SEQ ID NO:106,(ii) SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:85、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:94、SEQ ID NO:97、SEQ ID NO:100、SEQ ID NO:103或SEQ ID NO:106的成熟多肽编码序列;或(iii) (i) 或(ii) 的全长互补序列(Sambrook等人,1989,Molecular Cloning,A Laboratory Manual[分子克隆:实验室手册],第2版,Cold Spring Harbor[冷泉港],New York[纽约])。此类多肽优选地经分离。

[0319] 可以使用SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:85、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:94、SEQ ID NO:97、SEQ ID NO:100、SEQ ID NO:103、SEQ ID NO:106的多核苷酸或其子序列以及其片段设计核酸探针来根据本领域熟知的方法从不同属或物种的菌株鉴定和克隆编码具有肽聚糖降解活性的多肽的DNA。特别地,可以遵循标准DNA印迹程序,使用此类探针来与目的细胞的基因组DNA或cDNA杂交,以便鉴定和分离其中的相应基因。此类探针可明显短于完整序列,但是长度应为至少15个,例如至少25个、至少35个、或至少70个核苷酸。优选地,核酸探针长度为至少100个核苷酸,例如长度为至少200个核苷酸、至少300个核苷酸、至少400个核苷酸、至少500个核苷酸、至少600个核苷酸、至少700个核苷酸、至少800个核苷酸、或至少900个核苷酸。DNA和RNA探针两者都可使用。典型地将探针进行标记(例如,用³²P、³H、³⁵S、生物素、或抗生物素蛋白),用于检

测相应的基因。此类探针涵盖于本发明中。

[0320] 可以筛选由此类其他菌株制备的基因组DNA或cDNA文库的与上述探针杂交并编码具有肽聚糖降解活性的多肽的DNA。来自此类其他菌株的基因组DNA或其他DNA可通过琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶电泳或其他分离技术来分离。可将来自文库的DNA或分离的DNA转移到并固定在硝化纤维素或另一个适合的运载体材料上。为了鉴定与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:85、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:94、SEQ ID NO:97、SEQ ID NO:100、SEQ ID NO:103、SEQ ID NO:106或其子序列杂交的克隆或DNA,在DNA印迹中使用载体材料。

[0321] 出于本发明的目的,杂交指示,该多核苷酸与对应于以下的经标记核酸探针杂交:(i) SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:85、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:94、SEQ ID NO:97、SEQ ID NO:100、SEQ ID NO:103或SEQ ID NO:106;(ii) SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:85、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:94、SEQ ID NO:97、SEQ ID NO:100、SEQ ID NO:103或SEQ ID NO:106的成熟多肽编码序列;(iii) 其全长互补序列;或(iv) 其子序列;杂交是在非常低的至非常高的严格条件下进行。可以使用例如X-射线胶片或本领域已知的任何其他检测手段来检测在这些条件下核酸探针杂交的分子。

[0322] 在另一个实施例中,本发明涉及具有肽聚糖降解活性的多肽,该多肽由与SEQ ID NO:1的成熟多肽编码序列具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%序列同一性的多核苷酸编码。

[0323] 在另一个实施例中,本发明涉及具有肽聚糖降解活性的多肽,该多肽由与SEQ ID NO:4的成熟多肽编码序列具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%序列同一性的多核苷酸编码。

[0324] 在另一个实施例中,本发明涉及具有肽聚糖降解活性的多肽,该多肽由与SEQ ID NO:7的成熟多肽编码序列具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少

[0354] 在另一个实施例中,本发明涉及具有肽聚糖降解活性的多肽,该多肽由与SEQ ID NO:97的成熟多肽编码序列具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%序列同一性的多核苷酸编码。

[0355] 在另一个实施例中,本发明涉及具有肽聚糖降解活性的多肽,该多肽由与SEQ ID NO:100的成熟多肽编码序列具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%序列同一性的多核苷酸编码。

[0356] 在另一个实施例中,本发明涉及具有肽聚糖降解活性的多肽,该多肽由与SEQ ID NO:103的成熟多肽编码序列具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%序列同一性的多核苷酸编码。

[0357] 在另一个实施例中,本发明涉及具有肽聚糖降解活性的多肽,该多肽由与SEQ ID NO:106的成熟多肽编码序列具有至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、或100%序列同一性的多核苷酸编码。

[0358] 在另一个实施例中,本发明涉及在一个或多个位置处包含取代、缺失、和/或插入的SEQ ID NO:3所示的多肽的变体。在一个实施例中,引入SEQ ID NO:3所示的多肽中的氨基酸取代、缺失和/或插入的数目多达10个,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、或10个。

[0359] 在另一个实施例中,本发明涉及在一个或多个位置处包含取代、缺失、和/或插入的SEQ ID NO:6所示的多肽的变体。在一个实施例中,引入SEQ ID NO:6所示的多肽中的氨基酸取代、缺失和/或插入的数目多达10个,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、或10个。

[0360] 在另一个实施例中,本发明涉及在一个或多个位置处包含取代、缺失、和/或插入的SEQ ID NO:9所示的多肽的变体。在一个实施例中,引入SEQ ID NO:9所示的多肽中的氨基酸取代、缺失和/或插入的数目多达10个,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、或10个。

[0361] 在另一个实施例中,本发明涉及在一个或多个位置处包含取代、缺失、和/或插入的SEQ ID NO:12所示的多肽的变体。在一个实施例中,引入SEQ ID NO:12所示的多肽中的氨基酸取代、缺失和/或插入的数目多达10个,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、或10个。

[0362] 在另一个实施例中,本发明涉及在一个或多个位置处包含取代、缺失、和/或插入的SEQ ID NO:15所示的多肽的变体。在一个实施例中,引入SEQ ID NO:15所示的多肽中的氨基酸取代、缺失和/或插入的数目多达10个,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、或10个。

[0363] 在另一个实施例中,本发明涉及在一个或多个位置处包含取代、缺失、和/或插入的SEQ ID NO:18所示的多肽的变体。在一个实施例中,引入SEQ ID NO:18所示的多肽中的氨基酸取代、缺失和/或插入的数目多达10个,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、或10个。

[0364] 在另一个实施例中,本发明涉及在一个或多个位置处包含取代、缺失、和/或插入的SEQ ID NO:21所示的多肽的变体。在一个实施例中,引入SEQ ID NO:21所示的多肽中的氨基酸取代、缺失和/或插入的数目多达10个,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、或10个。

[0365] 在另一个实施例中,本发明涉及在一个或多个位置处包含取代、缺失、和/或插入的SEQ ID NO:24所示的多肽的变体。在一个实施例中,引入SEQ ID NO:24所示的多肽中的

的氨基酸取代、缺失和/或插入的数目多达10个,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、或10个。

[0392] 在另一个实施例中,本发明涉及在一个或多个位置处包含取代、缺失、和/或插入的SEQ ID NO:105所示的多肽的变体。在一个实施例中,引入SEQ ID NO:105所示的多肽中的氨基酸取代、缺失和/或插入的数目多达10个,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、或10个。

[0393] 在另一个实施例中,本发明涉及在一个或多个位置处包含取代、缺失、和/或插入的SEQ ID NO:108所示的多肽的变体。在一个实施例中,引入SEQ ID NO:108所示的多肽中的氨基酸取代、缺失和/或插入的数目多达10个,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、或10个。

[0394] 本文任何上述实施例或别处中的氨基酸改变可以具有微小性质,即,不会显著地影响蛋白质的折叠和/或活性的保守氨基酸取代或插入;典型地为1-30个氨基酸的小缺失;小的氨基末端或羧基末端延伸,如氨基末端的甲硫氨酸残基;多达20-25个残基的小接头肽;或小的延伸,其通过改变净电荷或另一功能(例如聚组氨酸标签、抗原表位或结合结构域)来促进纯化。

[0395] 保守取代的实例是在下组之内:碱性氨基酸(精氨酸、赖氨酸和组氨酸)、酸性氨基酸(谷氨酸和天冬氨酸)、极性氨基酸(谷氨酰胺和天冬酰胺)、疏水性氨基酸(亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸)、芳香族氨基酸(苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸)以及小氨基酸(甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸和甲硫氨酸)。通常不会改变比活性的氨基酸取代是本领域已知的并且例如由H.Neurath和R.L.Hill,1979,于The Proteins[蛋白质],Academic Press[学术出版社],纽约中描述。常见取代为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和Asp/Gly。

[0396] 可以根据本领域已知的程序,如定点诱变或丙氨酸扫描诱变(Cunningham和Wells,1989,Science[科学]244:1081-1085)来鉴定多肽中的必需氨基酸。在后一项技术中,在该分子中的每个残基处引入单个丙氨酸突变,并且测试所得分子的肽聚糖降解活性以鉴定对于该分子的活性关键的氨基酸残基。还参见,Hilton等人,1996,J.Biol.Chem.[生物化学杂志]271:4699-4708。酶或其他生物学相互作用的活性位点还可以通过对结构的物理分析来确定,如通过如下述技术来确定:核磁共振、晶体学、电子衍射或光亲和标记,连同对推定的接触位点氨基酸进行突变。参见例如,de Vos等人,1992,Science[科学]255:306-312;Smith等人,1992,J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]224:899-904;Wlodaver等人,1992,FEBS Lett.[欧洲生化学会联合会快报]309:59-64。还可以从与相关多肽的比对来推断必需氨基酸的身份。

[0397] 使用已知的诱变、重组和/或改组方法,随后进行相关的筛选程序可以做出单或多氨基酸取代、缺失和/或插入并对其进行测试,该相关的筛选程序例如由Reidhaar-Olson和Sauer,1988,Science[科学]241:53-57;Bowie和Sauer,1989,Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]86:2152-2156;WO 95/17413;或WO 95/22625披露的那些。其他可以使用的方法包括易错PCR、噬菌体展示(例如Lowman等人,1991,Biochemistry[生物化学]30:10832-10837;美国专利号5,223,409;WO 92/06204)以及区域定向诱变(Derbyshire等人,1986,Gene[基因]46:145;Ner等人,1988,DNA 7:127)。

[0398] 诱变/改组方法可以与高通量、自动化的筛选方法组合以检测由宿主细胞表达的克隆的、诱变的多肽的活性(Ness等人,1999,Nature Biotechnology[自然生物技术]17:

893-896)。可从宿主细胞回收编码活性多肽的诱变的DNA分子,并使用本领域的标准方法快速测序。这些方法允许快速确定多肽中各个氨基酸残基的重要性。

[0399] 多肽可以是杂合多肽,其中一种多肽的区域在另一种多肽的区域的N末端或C末端处融合。

[0400] 多肽可以是融合多肽或可切割的融合多肽,其中另一种多肽在本发明多肽的N末端或C末端处融合。通过将编码另一种多肽的多核苷酸融合于本发明的多核苷酸来产生融合多肽。用于产生融合多肽的技术是本领域已知的,且包括连接编码多肽的编码序列使得它们符合读框,而且融合多肽的表达处于一个或多个相同的启动子和终止子的控制之下。还可以使用内含肽技术构建融合多肽,其中在翻译后产生融合多肽(Cooper等人,1993,EMBO J.[欧洲分子生物学学会杂志]12:2575-2583;Dawson等人,1994,Science[科学]266:776-779)。

[0401] 融合多肽可进一步包含两个多肽之间的切割位点。在融合蛋白分泌之时,位点被切割,从而释放出这两种多肽。切割位点的实例包括但不限于在以下文献中披露的位点:Martin等人,2003,J.Ind.Microbiol.Biotechnol.[工业微生物生物技术杂志]3:568-576;Svetina等人,2000,J.Biotechnol.[生物技术杂志]76:245-251;Rasmussen-Wilson等人,1997,Appl.Environ.Microbiol.[应用与环境微生物学]63:3488-3493;Ward等人,1995,Biotechnology[生物技术]13:498-503;和Contreras等人,1991,Biotechnology[生物技术]9:378-381;Eaton等人,1986,Biochemistry[生物化学]25:505-512;Collins-Racie等人,1995,Biotechnology[生物技术]13:982-987;Carter等人,1989,Proteins:Structure,Function,and Genetics[蛋白质:结构、功能以及遗传学]6:240-248;以及Stevens,2003,Drug Discovery World[世界药物发现]4:35-48。

[0402] 具有肽聚糖降解活性的多肽的来源

[0403] 本发明的具有肽聚糖降解活性的多肽可获自任何属的微生物。出于本发明的目的,如本文结合给定来源使用的术语“获得自”应当意指由多核苷酸编码的多肽是由该来源或由已经插入了来自该来源的多核苷酸的菌株产生的。在一方面,获得自给定来源的多肽被分泌到细胞外。在一方面,该多肽是脂环酸芽孢杆菌属多肽。在一方面,该多肽是膨胀芽孢杆菌属多肽。在一方面,该多肽是盐单胞菌属多肽。在一方面,该多肽是韩国生工菌属多肽,例如获自铝克里布所菌的多肽。在一方面,该多肽是链霉菌属多肽,例如获自灰色链霉菌的多肽。在一方面,该多肽是野野村菌属多肽,例如获自科克斯野野村菌、迪氏野野村菌或广州野野村菌的多肽。在一方面,该多肽是小单胞菌属多肽,例如获自阿普利亚小单胞菌、绛红色小单胞菌或海栖小单胞菌的多肽。在一方面,该多肽是莱斯菌属(Laceyella)多肽,例如获自糖莱斯菌的多肽。在另一方面,该多肽是芽孢杆菌属多肽,例如获自耐热芽孢杆菌或科氏芽孢杆菌的多肽。在一方面,该多肽是溶杆菌属(Lysobacter)多肽,例如获自抗生素溶杆菌或辣椒溶杆菌的多肽。在一方面,该多肽是哈马达氏菌属(Hamadaea)多肽,例如获自都浓哈马达氏菌的多肽。在一方面,该多肽是类芽孢杆菌属多肽,例如获自松树土类芽孢杆菌的多肽。在一方面,该多肽是嗜热葡萄孢菌(Thermotaphylospora)多肽,例如获自产色嗜热葡萄孢菌的多肽。在一方面,该多肽是假单胞菌属多肽,例如获自烂泥假单胞菌或类产碱假单胞菌的多肽。

[0404] 应理解的是,对于前述物种,本发明涵盖完全和不完全阶段(perfect and

imperfect states),和其他分类学等同物(equivalent),例如无性型,而与它们已知的种名无关。本领域的技术人员会容易地识别适当等同物的身份。

[0405] 这些物种的菌株可容易地在许多培养物保藏中心为公众所获得,例如美国典型培养物保藏中心(ATCC)、德国微生物菌种保藏中心(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH,DSMZ)、荷兰菌种保藏中心(Centraalbureau Voor Schimmelcultures,CBS)和美国农业研究服务专利培养物保藏中心北方地区研究中心(Agricultural Research Service Patent Culture Collection,Northern Regional Research Center,NRRL)。

[0406] 可以使用以上提到的探针从其他来源,包括从自然界(例如,土壤、堆肥、水等)分离的微生物或直接从天然材料(例如,土壤、堆肥、水等)获得的DNA样品鉴定和获得该多肽。用于从天然生境中直接分离微生物和DNA的技术是本领域熟知的。然后通过类似地筛选另一微生物的基因组DNA或cDNA文库或混合的DNA样品来获得编码该多肽的多核苷酸。一旦已经用一种或多种探针检测到编码多肽的多核苷酸,则可以通过利用本领域普通技术人员已知的技术(参见例如,Sambrook等人,1989,同上)分离或克隆多核苷酸。

[0407] 核酸构建体

[0408] 本发明还涉及核酸构建体,这些核酸构建体包含可操作地连接至一个或多个控制序列的本发明的多核苷酸,在与控制序列相容的条件下,该一个或多个控制序列指导该编码序列在合适的宿主细胞中的表达。

[0409] 可用许多方式操作该多核苷酸以提供多肽的表达。取决于表达载体,在多核苷酸插入载体之前对其进行操作可能是理想的或必需的。用于利用重组DNA方法修饰多核苷酸的技术是本领域熟知的。

[0410] 控制序列可为启动子,即,被宿主细胞识别用于表达编码本发明的多肽的多核苷酸的多核苷酸。该启动子包含介导多肽的表达的转录控制序列。该启动子可以是在宿主细胞中显示出转录活性的任何多核苷酸,包括变体、截短型及杂合型启动子,并且可以从编码与该宿主细胞同源或异源的细胞外或细胞内多肽的基因获得。

[0411] 用于在细菌宿主细胞中指导本发明核酸构建体的转录的适合启动子的实例是从以下基因中获得的启动子:解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) α -淀粉酶基因(*amyQ*)、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*) α -淀粉酶基因(*amyL*)、地衣芽孢杆菌青霉素酶基因(*penP*)、嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*)产麦芽糖淀粉酶基因(*amyM*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)果聚糖蔗糖酶基因(*sacB*)、枯草芽孢杆菌*xylA*和*xylB*基因、苏云金芽孢杆菌*cryIIIA*基因(Agaisse和Lereclus,1994,Molecular Microbiology[分子微生物学]13:97-107)、大肠杆菌(*E.coli*)*lac*操纵子、大肠杆菌*trc*启动子(Egon等人,1988,Gene[基因]69:301-315)、天蓝链霉菌(*Streptomyces coelicolor*)琼脂水解酶基因(*dagA*)和原核 β -内酰胺酶基因(Villa-Kamaroff等人,1978,Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]75:3727-3731)以及*tac*启动子(DeBoer等人,1983,Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]80:21-25)。其他启动子描述于Gilbert等人,1980,Scientific American[科学美国人]242:74-94的“Useful proteins from recombinant bacteria[来自重组细菌的有用蛋白质]”;和在Sambrook等人,1989,同上。串联启动子的实例披露于WO 99/43835中。

[0412] 用于指导本发明的核酸构建体在丝状真菌宿主细胞中的转录的合适启动子的实例是从以下的基因中获得的启动子：构巢曲霉乙酰胺酶、黑曲霉中性 α -淀粉酶、黑曲霉酸稳定性 α -淀粉酶、黑曲霉或泡盛曲霉葡糖淀粉酶(glaA)、米曲霉TAKA淀粉酶、米曲霉碱性蛋白酶、米曲霉磷酸丙糖异构酶、尖孢镰孢胰蛋白酶样蛋白酶(WO 96/00787)、镶片镰孢淀粉葡糖苷酶(WO 00/56900)、镶片镰孢Daria(WO 00/56900)、镶片镰孢Quinn(WO 00/56900)、米黑根毛霉(Rhizomucor miehei)脂肪酶、米黑根毛霉天冬氨酸蛋白酶、里氏木霉 β -葡糖苷酶、里氏木霉纤维二糖水解脱酶I、里氏木霉纤维二糖水解脱酶II、里氏木霉内切葡聚糖酶I、里氏木霉内切葡聚糖酶II、里氏木霉内切葡聚糖酶III、里氏木霉内切葡聚糖酶V、里氏木霉木聚糖酶I、里氏木霉木聚糖酶II、里氏木霉木聚糖酶III、里氏木霉 β -木糖苷酶和里氏木霉翻译延伸因子,以及NA2-tpi启动子(来自曲霉属中性 α -淀粉酶基因的修饰的启动子,其中已用来自曲霉属磷酸丙糖异构酶基因的未翻译的前导序列替代未翻译的前导序列;非限制性实例包括来自黑曲霉中性 α -淀粉酶基因的经修饰的启动子,其中已经用来自构巢曲霉或米曲霉丙糖磷酸异构酶基因的未翻译的前导序列替代未翻译的前导序列);及其变体、截短型、以及杂合型启动子。其他启动子在美国专利号6,011,147中描述。

[0413] 在酵母宿主中,有用的启动子从以下的基因获得:酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)烯醇酶(ENO-1)、酿酒酵母半乳糖激酶(GAL1)、酿酒酵母醇脱氢酶/甘油醛-3-磷酸脱氢酶(ADH1、ADH2/GAP)、酿酒酵母丙糖磷酸异构酶(TPI)、酿酒酵母金属硫蛋白(CUP1)、以及酿酒酵母3-磷酸甘油酸激酶。酵母宿主细胞的其他有用的启动子由Romanos等人,1992,Yeast[酵母]8:423-488描述。

[0414] 控制序列也可为由宿主细胞识别以终止转录的转录终止子。该终止子可操作地连接至编码该多肽的多核苷酸的3'-末端。在宿主细胞中有功能的任何终止子可用于本发明中。

[0415] 细菌宿主细胞的优选终止子从以下的基因获得:克劳氏芽孢杆菌碱性蛋白酶(aprH)、地衣芽孢杆菌 α -淀粉酶(amyL)、和大肠杆菌核糖体RNA(rrnB)。

[0416] 丝状真菌宿主细胞的优选终止子从以下的基因中获得:构巢曲霉乙酰胺酶、构巢曲霉邻氨基苯甲酸合酶、黑曲霉葡糖淀粉酶、黑曲霉 α -葡糖苷酶、米曲霉TAKA淀粉酶、尖孢镰孢胰蛋白酶样蛋白酶、里氏木霉 β -葡糖苷酶、里氏木霉纤维二糖水解脱酶I、里氏木霉纤维二糖水解脱酶II、里氏木霉内切葡聚糖酶I、里氏木霉内切葡聚糖酶II、里氏木霉内切葡聚糖酶III、里氏木霉内切葡聚糖酶V、里氏木霉木聚糖酶I、里氏木霉木聚糖酶II、里氏木霉木聚糖酶III、里氏木霉 β -木糖苷酶和里氏木霉翻译延伸因子。

[0417] 酵母宿主细胞的优选终止子从以下的基因获得:酿酒酵母烯醇酶、酿酒酵母细胞色素C(CYC1)以及酿酒酵母甘油醛-3-磷酸脱氢酶。酵母宿主细胞的其他有用的终止子由Romanos等人(1992,同上)描述。

[0418] 控制序列还可以是启动子下游和基因的编码序列上游的mRNA稳定子区,其增加基因的表达。

[0419] 合适的mRNA稳定子区的实例从以下基因中获得:苏云金芽孢杆菌cryIIIA基因(WO 94/25612)和枯草芽孢杆菌SP82基因(Hue等人,1995,Journal of Bacteriology[细菌学杂志]177:3465-3471)。

[0420] 控制序列也可以是前导序列,即对宿主细胞翻译很重要的mRNA的非翻译区域。该

前导序列可操作地连接至编码该多肽的多核苷酸的5'-末端。可以使用在宿主细胞中有功能的任何前导序列。

[0421] 用于丝状真菌宿主细胞的优选前导序列从米曲霉TAKA淀粉酶和构巢曲霉丙糖磷酸异构酶的基因获得。

[0422] 酵母宿主细胞的合适的前导序列从以下的基因获得：酿酒酵母烯醇酶(ENO-1)、酿酒酵母3-磷酸甘油酸激酶、酿酒酵母 α -因子和酿酒酵母醇脱氢酶/甘油醛-3-磷酸脱氢酶(ADH2/GAP)。

[0423] 控制序列还可以是多腺苷酸化序列，一种可操作地连接至该多核苷酸的3'-末端并且当转录时由宿主细胞识别为将多腺苷酸残基添加至所转录的mRNA的信号的序列。可以使用在宿主细胞中有功能的任何多腺苷酸化序列。

[0424] 丝状真菌宿主细胞的优选多腺苷酸化序列从以下的基因中获得：构巢曲霉邻氨基苯甲酸合酶、黑曲霉葡糖淀粉酶、黑曲霉 α -葡糖苷酶、米曲霉TAKA淀粉酶和尖孢镰孢胰蛋白酶样蛋白酶。

[0425] 酵母宿主细胞的有用的多腺苷酸化序列由Guo和Sherman,1995,Mol.Cellular Biol.[分子细胞生物学]15:5983-5990描述。

[0426] 控制序列还可以是编码与多肽的N末端连接的信号肽并指导多肽进入细胞的分泌途径的信号肽编码区。多核苷酸的编码序列的5'端本身可以含有在翻译阅读框中天然与编码多肽的编码序列区段相连接的信号肽编码序列。可替代地，编码序列的5'端可以含有对编码序列而言外源的信号肽编码序列。在编码序列不天然地含有信号肽编码序列的情况下，可能需要外源信号肽编码序列。可替代地，外源信号肽编码序列可以单纯地替代天然信号肽编码序列以便增强多肽的分泌。然而，可以使用指导已表达多肽进入宿主细胞的分泌途径的任何信号肽编码序列。

[0427] 用于细菌宿主细胞的有效信号肽编码序列是从芽孢杆菌NCIB 11837产麦芽糖淀粉酶、地衣芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶、地衣芽孢杆菌 β -内酰胺酶、嗜热脂肪芽孢杆菌 α -淀粉酶、嗜热脂肪芽孢杆菌中性蛋白酶(nprT,nprS,nprM)和枯草芽孢杆菌prsA的基因获得的信号肽编码序列。其他信号肽由Simonen和Palva,1993,Microbiological Reviews[微生物评论]57:109-137描述。

[0428] 用于丝状真菌宿主细胞的有效信号肽编码序列是从以下酶的基因获得的信号肽编码序列：黑曲霉中性淀粉酶、黑曲霉葡糖淀粉酶、米曲霉TAKA淀粉酶、特异腐质霉纤维素酶、特异腐质霉内切葡聚糖酶V、疏棉状腐质霉脂肪酶和米黑根毛霉天冬氨酸蛋白酶。

[0429] 用于酵母宿主细胞的有用的信号肽从酿酒酵母 α -因子和酿酒酵母转化酶的基因获得。其他的有用的信号肽编码序列由Romanos等人(1992,同上)描述。

[0430] 控制序列还可以是编码位于多肽的N末端的前肽的前肽编码序列。所得的多肽被称为前体酶(proenzyme)或多肽原(或在一些情况下被称为酶原(zymogen))。多肽原通常是无活性的并且可通过催化切割或自身催化切割来自多肽原的前肽而转化为活性多肽。前肽编码序列可以从以下的基因获得：枯草芽孢杆菌碱性蛋白酶(aprE)、枯草芽孢杆菌中性蛋白酶(nprT)、嗜热毁丝霉(Myceliophthora thermophila)漆酶(WO 95/33836)、米黑根毛霉天冬氨酸蛋白酶和酿酒酵母 α -因子。

[0431] 在信号肽序列和前肽序列二者都存在的情况下，该前肽序列位于紧邻多肽的N末

端且该信号肽序列位于紧邻前肽序列的N末端。

[0432] 还可希望的是添加调节序列,这些调节序列调节宿主细胞生长相关的多肽的表达。调节序列的实例是引起基因表达以响应于化学或物理刺激(包括调节化合物的存在)而开启或关闭的那些。原核系统中的调节序列包括lac、tac、和trp操纵子系统。在酵母中,可以使用ADH2系统或GAL1系统。在丝状真菌中,可以使用黑曲霉葡萄糖淀粉酶启动子、米曲霉TAKA α -淀粉酶启动子和米曲霉葡萄糖淀粉酶启动子、里氏木霉纤维二糖水解酶I启动子以及里氏木霉纤维二糖水解酶II启动子。调节序列的其他实例是允许基因扩增的那些序列。在真核系统中,这些调节序列包括在甲氨蝶呤存在下扩增的二氢叶酸还原酶基因以及用重金属扩增的金属硫蛋白基因。在这些情况中,编码多肽的多核苷酸会与调节序列可操作地连接。

[0433] 表达载体

[0434] 本发明还涉及包含本发明的多核苷酸、启动子、以及转录和翻译终止信号的重组表达载体。多个核苷酸和控制序列可连接在一起以产生重组表达载体,该重组表达载体可包括一个或多个便利的限制性位点以允许编码该多肽的多核苷酸在此类位点处的插入或取代。可替代地,可以通过将多核苷酸或包含该多核苷酸的核酸构建体插入用于表达的适当载体中而表达该多核苷酸。在产生表达载体时,编码序列如此位于载体中,使得编码序列与用于表达的适当控制序列可操作地连接。

[0435] 重组表达载体可以是方便地经受重组DNA程序并且可以引起多核苷酸表达的任何载体(例如,质粒或病毒)。载体的选择将典型地取决于载体与待引入载体的宿主细胞的相容性。载体可以是直链或闭合环状质粒。

[0436] 载体可以是自主复制载体,即作为染色体外实体存在的载体,其复制独立于染色体复制,例如质粒、染色体外元件、微染色体或人工染色体。载体可以含有用于确保自我复制的任何手段。可替代地,载体可以是这样的载体,当它引入宿主细胞中时整合入基因组中并与其中已整合了它的一个或多个染色体一起复制。此外,可以使用单独的载体或质粒或两个或更多个载体或质粒,其共同含有待引入宿主细胞基因组的总DNA,或可以使用转座子。

[0437] 载体优选地含有允许方便地选择转化细胞、转染细胞、转导细胞等细胞的一个或多个选择性标记。选择性标记是一种基因,其产物提供了杀生物剂抗性或病毒抗性、对重金属抗性、对营养缺陷型的原养型等。

[0438] 细菌选择性标记的实例是地衣芽孢杆菌或枯草芽孢杆菌da1基因、或赋予抗生素抗性(如氨苄青霉素、氯霉素、卡那霉素、新霉素、大观霉素、或四环素抗性)的标记。酵母宿主细胞的适合的标记包括但不限于:ADE2、HIS3、LEU2、LYS2、MET3、TRP1和URA3。用于在丝状真菌宿主细胞中使用的选择性标记包括但不限于adeA(磷酸核糖酰氨基咪唑-琥珀羧胺合酶)、adeB(磷酸核糖酰-氨基咪唑合酶)、amdS(乙酰胺酶)、argB(鸟氨酸氨甲酰基转移酶)、bar(草丁膦乙酰转移酶)、hph(潮霉素磷酸转移酶)、niaD(硝酸还原酶)、pyrG(乳清酸核苷-5'-磷酸脱羧酶)、sC(硫酸腺苷基转移酶)以及trpC(邻氨基苯甲酸合酶)以及其等同物。优选的用于曲霉细胞中的是构巢曲霉或米曲霉amdS和pyrG基因以及吸水链霉菌(*Streptomyces hygroscopicus*) bar基因。优选的用于木霉属细胞的是adeA、adeB、amdS、hph以及pyrG基因。

[0439] 选择性标记可以是如WO 2010/039889中所述的双选择性标记系统。在一个方面，双选择性标记是hph-tk双选择性标记系统。

[0440] 载体优选地含有允许载体整合到宿主细胞的基因组中或载体在细胞中独立于基因组自主复制的一个或多个元件。

[0441] 对于整合到宿主细胞基因组中，载体可以依靠编码该多肽的多核苷酸序列或用于通过同源或非同源重组整合到该基因组中的该载体的任何其他元件。可替代地，载体可以含有用于指导通过同源重组而整合入宿主细胞基因组中的染色体中的精确位置处的另外的多核苷酸。为了增加在精确位置处整合的可能性，整合元件应当含有足够数目的核酸，例如100至10,000个碱基对、400至10,000个碱基对和800至10,000个碱基对，这些核酸与相应的靶序列具有高度序列同一性以增强同源重组的概率。整合元件可以是与宿主细胞基因组内的靶序列同源的任何序列。此外，整合元件可以是非编码或编码的多核苷酸。另一方面，载体可以通过非同源重组整合入宿主细胞的基因组中。

[0442] 为了自主复制，载体可以进一步包含复制起点，该复制起点使得载体在讨论中的宿主细胞中自主复制成为可能。复制起点可以是在细胞中发挥作用的介导自主复制的任何质粒复制子。术语“复制起点”或“质粒复制子”意指使质粒或载体能够在体内复制的多核苷酸。

[0443] 细菌复制起点的实例是允许在大肠杆菌中复制的质粒pBR322、pUC19、pACYC177、和pACYC184的复制起点，以及允许在芽孢杆菌属中复制的质粒pUB110、pE194、pTA1060、和pAMB1的复制起点。

[0444] 用于酵母宿主细胞中的复制起点的实例是2微米复制起点、ARS1、ARS4、ARS1与CEN3的组合、及ARS4与CEN6的组合。

[0445] 在丝状真菌细胞中有用的复制起点的实例是AMA1和ANS1 (Gems等人, 1991, Gene [基因] 98:61-67; Cullen等人, 1987, Nucleic Acids Res. [核酸研究] 15:9163-9175; WO 00/24883)。可根据WO 00/24883中披露的方法完成AMA1基因的分离和包含该基因的质粒或载体的构建。

[0446] 可将本发明多核苷酸的多于一个拷贝插入宿主细胞以增加多肽的产生。通过将序列的至少一个另外的拷贝整合到宿主细胞基因组中或者通过包括与该多核苷酸一起的可扩增的选择性标记基因可以获得多核苷酸的增加的拷贝数目，其中通过在适当的选择性试剂的存在下培养细胞可以选择包含选择性标记基因的经扩增的拷贝以及由此该多核苷酸的另外的拷贝的细胞。

[0447] 用于连接以上所述的元件以构建本发明的重组表达载体的程序是本领域的普通技术人员熟知的(参见例如, Sambrook等人, 1989, 同上)。

[0448] 宿主细胞

[0449] 本发明还涉及重组宿主细胞，这些宿主细胞包含可操作地连接至一个或多个控制序列的本发明的多核苷酸，该一个或多个控制序列指导本发明的多肽的产生。将包含多核苷酸的构建体或载体引入宿主细胞中，这样使得该构建体或载体作为染色体整合体或作为自主复制的染色体外载体维持，如较早前所述。术语“宿主细胞”涵盖由于复制期间出现的突变而与亲本细胞不相同的任何亲本细胞子代。宿主细胞的选择将在很大程度上取决于编码多肽的基因及其来源。

[0450] 宿主细胞可以是在本发明的多肽的重组产生中有用的任何细胞,例如原核生物或真核生物。

[0451] 原核宿主细胞可以是任何革兰氏阳性或革兰氏阴性细菌。革兰氏阳性细菌包括但不限于:芽孢杆菌属、梭菌属、肠球菌属、土芽孢杆菌属(*Geobacillus*)、乳杆菌属、乳球菌属、大洋芽孢杆菌属、葡萄球菌属、链球菌属和链霉菌属。革兰氏阴性细菌包括但不限于:弯曲杆菌属(*Campylobacter*)、大肠杆菌、黄杆菌属(*Flavobacterium*)、梭杆菌属(*Fusobacterium*)、螺杆菌属(*Helicobacter*)、泥杆菌属(*Ilyobacter*)、奈瑟氏菌属(*Neisseria*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、沙门氏菌属(*Salmonella*)、以及脲原体属(*Ureaplasma*)。

[0452] 细菌宿主细胞可以是任何芽孢杆菌属细胞,包括但不限于:嗜碱芽孢杆菌(*Bacillus alkalophilus*)、高地芽孢杆菌(*Bacillus altitudinis*)、解淀粉芽孢杆菌、植物解淀粉芽孢杆菌亚种(*B.amyloliquefaciens subsp.plantarum*)、短芽孢杆菌(*Bacillus brevis*)、环状芽孢杆菌(*Bacillus circulans*)、克劳氏芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*)、坚强芽孢杆菌(*Bacillus firmus*)、灿烂芽孢杆菌(*Bacillus lautus*)、迟缓芽孢杆菌(*Bacillus lentus*)、地衣芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)、甲基营养型芽孢杆菌(*Bacillus methylophilus*)、短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)、沙福芽孢杆菌(*Bacillus safensis*)、嗜热脂肪芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、以及苏云金芽孢杆菌细胞。

[0453] 细菌宿主细胞还可以是任何链球菌属细胞,包括但不限于类马链球菌(*Streptococcus equisimilis*)、酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)、乳房链球菌(*Streptococcus uberis*)以及马链球菌兽疫亚种(*Streptococcus equi subsp.Zooepidemicus*)细胞。

[0454] 细菌宿主细胞还可以是任何链霉菌属细胞,包括但不限于:不产色链霉菌(*Streptomyces achromogenes*)、除虫链霉菌(*Streptomyces avermitilis*)、天蓝链霉菌(*Streptomyces coelicolor*)、灰色链霉菌(*Streptomyces griseus*)和浅青紫链霉菌(*Streptomyces lividans*)细胞。

[0455] 将DNA引入芽孢杆菌属细胞中可以通过以下方式来实现:原生质体转化(参见,例如,Chang和Cohen,1979,Mol.Gen.Genet.[分子与普通遗传学]168:111-115)、感受态细胞转化(参见例如,Young和Spizizen,1961,J.Bacteriol.[细菌学杂志]81:823-829;或Dubnau和Davidoff-Abelson,1971,J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]56:209-221)、电穿孔(参见例如,Shigekawa和Dower,1988,Biotechniques[生物技术]6:742-751)或接合(参见例如,Koehler和Thorne,1987,J.Bacteriol.[细菌学杂志]169:5271-5278)。将DNA引入大肠杆菌细胞中可以通过以下方式来实现:原生质体转化(参见例如,Hanahan,1983,J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]166:557-580)或电穿孔(参见例如,Dower等人,1988,Nucleic Acids Res.[核酸研究]16:6127-6145)。将DNA引入链霉菌属细胞中可以通过以下方式来实现:原生质体转化、电穿孔(参见例如,Gong等人,2004,Folia Microbiol.(Praha)[叶线形微生物学(布拉格)]49:399-405)、接合(参见例如,Mazodier等人,1989,J.Bacteriol.[细菌学杂志]171:3583-3585)、或转导(参见例如,Burke等人,2001,Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]98:6289-6294)。将DNA引入假单胞菌属细

胞中可以通过以下方式来实现:电穿孔(参见例如,Choi等人,2006,J.Microbiol.Methods [微生物学方法杂志]64:391-397)或接合(参见例如,Pinedo和Smets,2005,Appl.Environ.Microbiol.[应用与环境微生物学]71:51-57)。将DNA引入链球菌属细胞中可以通过以下方式来实现:天然感受态(natural competence)(参见例如,Perry和Kuramitsu,1981,Infect.Immun.[感染与免疫]32:1295-1297)、原生质体转化(参见例如,Catt和Jollick,1991,Microbios[微生物学]68:189-207)、电穿孔(参见例如,Buckley等人,1999,Appl.Environ.Microbiol.[应用与环境微生物学]65:3800-3804)、或接合(参见例如,Clewell,1981,Microbiol.Rev.[微生物学评论]45:409-436)。然而,可以使用本领域已知的将DNA引入宿主细胞中的任何方法。

[0456] 宿主细胞还可以是真核生物,如哺乳动物、昆虫、植物或真菌细胞。

[0457] 宿主细胞可以是真菌细胞。如本文所用的“真菌”包括子囊菌门(Ascomycota)、担子菌门(Basidiomycota)、壶菌门(Chytridiomycota)和接合菌门(Zygomycota)以及卵菌门(Oomycota)和所有有丝分裂孢子真菌(如由Hawksworth等人在以下文献中所定义:Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi[安斯沃思和拜斯比真菌字典],第8版,1995,CAB International[国际应用生物科学中心],University Press[大学出版社],Cambridge,UK[英国剑桥])。

[0458] 真菌宿主细胞可以为酵母细胞。如本文使用的“酵母”包括产子囊酵母(ascosporogenous yeast)(内孢霉目(Endomycetales))、产担子酵母(basidiosporogenous yeast)和属于半知菌纲(Fungi Imperfecti)(芽孢纲(Blastomycetes))的酵母。由于酵母的分类可在将来变化,出于本发明的目的,酵母应当如Biology and Activities of Yeast[酵母的生物学与活性](Skinner,Passmore和Davenport编辑,Soc.App.Bacteriol.Symposium Series No.9[应用细菌学学会专题论文集系列9],1980)中所描述的那样定义。

[0459] 酵母宿主细胞可以是假丝酵母属(Candida)、汉逊酵母属(Hansenula)、克鲁弗酵母属(Kluyveromyces)、毕赤酵母属(Pichia)、酵母属(Saccharomyces)、裂殖酵母属(Schizosaccharomyces)或耶氏酵母属(Yarrowia)细胞,如乳酸克鲁弗酵母(Kluyveromyces lactis)、卡尔酵母(Saccharomyces carlsbergensis)、酿酒酵母、糖化酵母(Saccharomyces diastaticus)、道格拉氏酵母(Saccharomyces douglasii)、克鲁弗酵母(Saccharomyces kluyveri)、诺地酵母(Saccharomyces norbensis)、卵形酵母(Saccharomyces oviformis)或解脂耶氏酵母(Yarrowia lipolytica)细胞。

[0460] 真菌宿主细胞可为丝状真菌细胞。“丝状真菌”包括真菌门(Eumycota)和卵菌门(Oomycota)的亚门的所有丝状形式(如由Hawksworth等人,1995(同上)所定义的)。丝状真菌通常的特征在于由几丁质、纤维素、葡聚糖、壳聚糖、甘露聚糖和其他复杂多糖构成的菌丝体壁。营养生长是通过菌丝延伸来进行的,而碳分解代谢是专性需氧的。相反,酵母(如酿酒酵母)的营养生长是通过单细胞菌体的出芽(budding)来进行的,而碳分解代谢可以是发酵性的。

[0461] 丝状真菌宿主细胞可以是枝顶孢霉属、曲霉属、短梗霉属(Aureobasidium)、烟管霉属(Bjerkandera)、拟腊菌属(Ceriporiopsis)、金孢子菌属(Chrysosporium)、鬼伞属(Coprinus)、革盖菌属(Coriolus)、隐球菌属(Cryptococcus)、线黑粉菌科

(*Filibasidium*)、镰孢属(*Fusarium*)、腐质霉属(*Humicola*)、梨孢菌属(*Magnaporthe*)、毛霉属(*Mucor*)、毁丝霉属(*Myceliophthora*)、新美鞭菌属(*Neocallimastix*)、链孢菌属(*Neurospora*)、拟青霉属(*Paecilomyces*)、青霉属、平革菌属(*Phanerochaete*)、射脉菌属(*Phlebia*)、瘤胃壶菌属(*Piromyces*)、侧耳属(*Pleurotus*)、裂褶菌属(*Schizophyllum*)、篮状菌属、嗜热子囊菌属(*Thermoascus*)、梭孢壳属(*Thielavia*)、弯颈霉属(*Tolypocladium*)、栓菌属(*Trametes*)或木霉属细胞。

[0462] 例如,丝状真菌宿主细胞可以是泡盛曲霉、臭曲霉(*Aspergillus foetidus*)、烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)、日本曲霉(*Aspergillus japonicus*)、构巢曲霉、黑曲霉、米曲霉、黑刺烟管菌(*Bjerkandera adusta*)、干拟蜡菌(*Ceriporiopsis aneirina*)、卡内基拟蜡菌(*Ceriporiopsis caregiea*)、浅黄拟蜡孔菌(*Ceriporiopsis gilvescens*)、潘诺希塔拟蜡菌(*Ceriporiopsis pannocinta*)、环带拟蜡菌(*Ceriporiopsis rivulosa*)、微红拟蜡菌(*Ceriporiopsis subrufa*)、虫拟蜡菌(*Ceriporiopsis subvermispora*)、狭边金孢子菌(*Chrysosporium inops*)、嗜角质金孢子菌(*Chrysosporium keratinophilum*)、卢克诺文思金孢子菌(*Chrysosporium lucknowense*)、粪状金孢子菌(*Chrysosporium merdarium*)、租金孢子菌(*Chrysosporium pannicola*)、女王杜香金孢子菌(*Chrysosporium queenslandicum*)、热带金孢子菌(*Chrysosporium tropicum*)、褐薄金孢子菌(*Chrysosporium zonatum*)、灰盖鬼伞(*Coprinus cinereus*)、毛革盖菌(*Coriolus hirsutus*)、杆孢状镰孢(*Fusarium bactridioides*)、谷类镰孢(*Fusarium cerealis*)、库威镰孢(*Fusarium crookwellense*)、大刀镰孢(*Fusarium culmorum*)、禾谷镰孢(*Fusarium graminearum*)、禾赤镰孢(*Fusarium graminum*)、异孢镰孢(*Fusarium heterosporum*)、合欢木镰孢(*Fusarium negundi*)、尖孢镰孢(*Fusarium oxysporum*)、多枝镰孢(*Fusarium reticulatum*)、粉红镰孢(*Fusarium roseum*)、接骨木镰孢(*Fusarium sambucinum*)、肤色镰孢(*Fusarium sarcochromum*)、拟分枝孢镰孢(*Fusarium sporotrichioides*)、硫色镰孢(*Fusarium sulphureum*)、圆镰孢(*Fusarium torulosum*)、拟丝孢镰孢(*Fusarium trichothecioides*)、镶片镰孢、特异腐质霉、柔毛腐质霉、米黑毛霉、嗜热毁丝霉、粗糙链孢菌(*Neurospora crassa*)、产紫青霉(*Penicillium purpurogenum*)、黄孢平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*)、射脉菌(*Phlebia radiata*)、刺芹侧耳(*Pleurotus eryngii*)、土生梭孢壳霉(*Thielavia terrestris*)、长域毛栓菌(*Trametes villosa*)、变色栓菌(*Trametes versicolor*)、哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*)、康宁木霉(*Trichoderma koningii*)、长枝木霉(*Trichoderma longibrachiatum*)、里氏木霉、或绿色木霉(*Trichoderma viride*)细胞。

[0463] 可以将真菌细胞通过涉及原生质体形成、原生质体转化、以及细胞壁再生的方法以本身已知的方式转化。用于转化曲霉属和木霉属宿主细胞的适合程序描述于以下文献中:EP 238023, Yelton等人, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA [美国国家科学院院刊] 81: 1470-1474以及Christensen等人, 1988, Bio/Technology [生物/技术] 6: 1419-1422。用于转化镰孢属物种的适合方法由Malardier等人, 1989, Gene [基因] 78: 147-156和WO 96/00787描述。可以使用由以下文献描述的程序转化酵母:Becker和Guarente, 在Abelson, J.N. 和 Simon, M.I. 编辑, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology [酵母遗传学与分子生物学指南], Methods in Enzymology [酶学方法], 第194卷, 第182-187页, Academic

Press, Inc. [学术出版社有限公司], 纽约); Ito 等人, 1983, J. Bacteriol. [细菌学杂志] 153:163; 以及 Hinnen 等人, 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA [美国国家科学院院刊] 75: 1920。

[0464] 产生方法

[0465] 本发明还涉及产生本发明的多肽的方法, 这些方法包括 (a) 在有益于产生该多肽的条件下培养细胞, 该细胞以其野生型形式产生该多肽; 和任选地 (b) 回收该多肽。

[0466] 本发明还涉及产生本发明的多肽的重组方法, 这些方法包括 (a) 在有益于产生该多肽的条件下培养能够表达该多肽的本发明的重组宿主细胞; 和任选地 (b) 回收该多肽。

[0467] 本发明的一个实施例涉及一种产生多肽的方法, 其中该多肽选自由以下组成的组: SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:84、SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:90、SEQ ID NO:93、SEQ ID NO:96、SEQ ID NO:99、SEQ ID NO:102、SEQ ID NO:105、SEQ ID NO:108 以及与其具有至少至少至少 60%, 例如至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 或 100% 的多肽, 该方法包括 (a) 在有益于产生该多肽的条件下培养能够表达该多肽之一的本发明的重组宿主细胞; 和任选地 (b) 回收该多肽。

[0468] 宿主细胞是在适合使用本领域已知的方法产生多肽的营养培养基中培养的。例如, 可以通过摇瓶培养、或在实验室或工业发酵罐中小规模或大规模发酵 (包括连续、分批、补料分批或固态发酵) 培养细胞, 该培养在适合的培养基中并且在允许表达和/或分离多肽的条件下进行。使用本领域中已知的程序, 培养发生在包含碳和氮来源及无机盐的适合的营养培养基中。适合的培养基可从商业供应商获得或可以根据公开的组成 (例如, 在美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection) 的目录中) 制备。如果多肽被分泌到该营养培养基中, 那么可以直接从该培养基中回收该多肽。如果多肽不进行分泌, 那么其可以从细胞裂解液中进行回收。

[0469] 可以使用本领域已知的对于多肽是特异性的方法来检测多肽。这些检测方法包括但不限于: 特异性抗体的使用、酶产物的形成或酶底物的消失。例如, 可以使用酶测定来确定多肽的活性。

[0470] 可以使用本领域已知的方法来回收多肽。例如, 可通过常规方法, 包括但不限于收集、离心、过滤、提取、喷雾干燥、蒸发或沉淀, 从营养培养基回收多肽。在一个方面, 回收包含多肽的发酵液。

[0471] 可以通过本领域已知的多种程序纯化该多肽, 包括但不限于色谱法 (例如, 离子交换色谱法、亲和色谱法、疏水色谱法、聚焦色谱法和尺寸排阻色谱法)、电泳程序 (例如, 制备型等电聚焦电泳)、差异性溶解 (例如, 硫酸铵沉淀)、SDS-PAGE 或提取 (参见例如, Protein Purification [蛋白质纯化], Janson 和 Ryden 编辑, VCH Publishers [VCH 出版公司], 纽约, 1989), 以便获得基本上纯的多肽。

[0472] 在替代性方面, 不回收多肽, 而是将表达该多肽的本发明的宿主细胞用作多肽的

来源。另一种选择是使用多肽表达为多肽来源的上清液。

[0473] 颗粒中酶的配制

[0474] 无尘颗粒可以例如如在US 4,106,991和4,661,452中所披露而产生,并且可以任选地通过本领域已知的方法进行包衣。蜡状包衣材料的实例是平均分子量为1000至20000的聚(环氧乙烷)产品(聚乙二醇,PEG);具有16至50个环氧乙烷单元的乙氧基化壬基酚;乙氧基化脂肪醇,其中该醇含有12至20个碳原子,并且其中存在15至80个环氧乙烷单元;脂肪醇;脂肪酸;以及脂肪酸的甘油单酯、甘油二酯和甘油三酯。适合用于通过流化床技术应用的成膜包衣材料的实例在GB 1483591中给出。液体酶制剂可以例如通过根据已确立的方法添加多元醇(如丙二醇)、糖或糖醇、乳酸或硼酸而稳定化。受保护的酶可以根据EP 238,216中披露的方法来制备。

[0475] 本发明的一种或多种组合物可以被配制为颗粒,例如,配制为结合一种或多种酶的共颗粒。然后,每种酶将存在于多种颗粒中,这些颗粒确保酶在洗涤剂中的分布更均匀。这还减少了由于不同的粒度,不同酶的物理隔离。用于生产针对洗涤剂工业的多酶共颗粒的方法披露于IP.com披露内容IPCOM000200739D中。

[0476] 通过使用共颗粒的酶的配制品的另一个实例披露于WO 2013/188331中,其涉及包含以下的洗涤剂组合物:(a)多酶共颗粒;(b)少于10wt%沸石(无水的基础上);和(c)少于10wt%磷酸盐(无水的基础上),其中所述酶共颗粒包含从10wt%至98wt%的水分汇组分(sink component),并且该组合物另外还包含从20wt%至80wt%的洗涤剂水分汇组分。WO 2013/188331还涉及处理和/或清洁表面(优选织物表面)的方法,该方法包括以下步骤:(i)将所述表面在水性洗涤液中与洗涤剂组合物接触,(ii)冲洗和/或干燥该表面。

[0477] 该多酶共颗粒可以包含本发明的酶和一种或多种选自下组的酶,该组由以下组成:蛋白酶、脂肪酶、纤维素酶、木葡聚糖酶、过水解酶、过氧化物酶、脂氧合酶、漆酶、半纤维素酶、蛋白酶、纤维素酶、纤维二糖脱氢酶、木聚糖酶、磷脂酶、酯酶、角质酶、果胶酶、甘露聚糖酶、果胶裂解酶、角蛋白酶、还原酶、氧化酶、酚氧化酶、木质素酶、支链淀粉酶、鞣酸酶、戊聚糖酶、地衣多糖酶、葡聚糖酶、阿拉伯糖苷酶、透明质酸酶、软骨素酶、淀粉酶、核酸酶、氨基己糖苷酶及其混合物。

[0478] 本发明的一个实施例涉及包含本发明的酶的酶颗粒/粒子。该颗粒由核心以及任选地包围该核心的一种或多种包衣(外层)构成。典型地,该颗粒/粒子的粒度(granule/particle size)(测量为当量球径(基于体积的平均粒度))是20-2000 μm ,特别是50-1500 μm 、100-1500 μm 或250-1200 μm 。

[0479] 该核心可以包括另外的材料如填料、纤维材料(纤维素或合成纤维)、稳定剂、增溶剂、悬浮剂、粘度调节剂、轻球体、增塑剂、盐、润滑剂和芳香剂。

[0480] 该核心可以包括粘合剂,如合成聚合物、蜡、脂肪、或碳水化合物。

[0481] 该核心典型地作为均匀的共混物可以包含多价阳离子的盐、还原剂、抗氧化剂、过氧化物分解催化剂和/或酸性缓冲液组分。

[0482] 该核心可以由惰性粒子组成,其中酶被吸附到该惰性粒子之内,或者被施用(例如通过流化床包衣)到该惰性粒子的表面上。

[0483] 该核心的直径可以是20-2000 μm ,具体地50-1500 μm 、100-1500 μm 或250-1200 μm 。

[0484] 该核心可以通过粒化成分的共混物来制备,例如通过包括造粒技术的方法,例如

结晶、沉淀、锅包衣 (pan-coating)、流化床包衣、流化床凝集、旋转雾化、挤压、颗粒化 (prilling)、滚圆 (spheronization)、粒度减小法、转鼓造粒 (drum granulation) 和/或高剪切造粒。

[0485] 用于制备核心的方法可在 C.E. Capes, Handbook of Powder Technology; Particle size enlargement [粉末技术手册; 粒度增大]; 第1卷; 1980; Elsevier [爱思唯尔公司] 中发现。

[0486] 该酶颗粒/粒子的核心可以被至少一个包衣包围, 例如, 以改进储存稳定性、以减少在处理过程中的粉尘形成或用于着色该颗粒。该一个或多个任选的包衣可以包括盐包衣、或其他适合的包衣材料, 如聚乙二醇 (PEG)、甲基羟基-丙基纤维素 (MHPC) 以及聚乙烯醇 (PVA)。具有多种包衣的酶颗粒的实例示于 WO 93/07263 和 WO 97/23606 中。

[0487] 可以将该包衣按核心的重量计以至少 0.1% (例如, 至少 0.5%、1% 或 5%) 的量施加。该量至多可以是 100%、70%、50%、40% 或 30%。

[0488] 该包衣优选地是至少 0.1 μm 厚, 特别是至少 0.5 μm 、至少 1 μm 或至少 5 μm 厚。在一个具体实施例中, 包衣的厚度是低于 100 μm 。在更特定的实施例中, 包衣的厚度是低于 60 μm 。在甚至更特别的实施例中, 包衣的总厚度是低于 40 μm 。

[0489] 该包衣应当通过形成基本上连续的层来密封该核心单元。基本上连续的层应当理解为具有极少或没有孔洞的包衣, 使得密封/封闭的核心单元具有极少或没有未包衣的区域。该层或包衣在厚度上应是均匀的。

[0490] 该包衣可以进一步含有其他本领域已知的材料, 例如填料、防粘剂、颜料、染料、增塑剂和/或粘合剂, 例如二氧化钛、高岭土、碳酸钙或滑石。

[0491] 盐包衣可以包含按重量 w/w 计至少 60% 的盐, 例如, 按重量 w/w 计, 至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95% 或至少 99%。

[0492] 该盐可以从盐溶液 (其中该盐是完全溶解的) 中添加, 或者从盐悬浮液 (其中该细粒子是小于 50 μm , 如小于 10 μm 或小于 5 μm) 中添加。

[0493] 该盐包衣可以包含单一盐或者两种或更多种盐的混合物。该盐可以是水溶性的, 具体地具有在 20°C 下在 100g 水中至少 0.1 克的溶解度, 优选地至少 0.5g/100g 水, 例如, 至少 1g/100g 水, 例如, 至少 5g/100g 水。

[0494] 该盐可以是无机盐, 例如硫酸盐、亚硫酸盐、磷酸盐、膦酸盐、硝酸盐、氯盐或碳酸盐或者简单有机酸 (少于 10 个碳原子, 例如 6 个或更少的碳原子) 的盐例如柠檬酸盐、丙二酸盐或乙酸盐。在这些盐中的阳离子的实例是碱或碱土金属离子、铵离子或第一过渡系的金属离子, 例如钠、钾、镁、钙、锌或铝。阴离子的实例包括氯、溴、碘、硫酸根、亚硫酸根、亚硫酸氢根、硫代硫酸根、磷酸根、磷酸二氢根、二碱式磷酸根、次磷酸根、焦磷酸二氢根、四硼酸根、硼酸根、碳酸根、碳酸氢根、硅酸根、柠檬酸根、苹果酸根、马来酸根、丙二酸根、琥珀酸根、乳酸根、甲酸根、乙酸根、丁酸根、丙酸根、苯甲酸根、酒石酸根、抗坏血酸根或葡萄糖酸根。特别地, 可以使用硫酸根、亚硫酸根、磷酸根、膦酸根、硝酸根、氯或碳酸根的碱或碱土金属盐或者简单有机酸的盐如柠檬酸盐、丙二酸盐或乙酸盐。

[0495] 在包衣中的盐可以在 20°C 下具有超过 60% 的恒定湿度, 特别地超过 70%、超过 80% 或超过 85%, 或者它可以是此盐的另一种水合物形式 (例如, 无水物)。该盐包衣可以如在 WO 00/01793 或 WO 2006/034710 中所描述。

[0496] 适合的盐的具体实例是NaCl ($\text{CH}_{20^\circ\text{C}}=76\%$)、 Na_2CO_3 ($\text{CH}_{20^\circ\text{C}}=92\%$)、 NaNO_3 ($\text{CH}_{20^\circ\text{C}}=73\%$)、 Na_2HPO_4 ($\text{CH}_{20^\circ\text{C}}=95\%$)、 Na_3PO_4 ($\text{CH}_{25^\circ\text{C}}=92\%$)、 NH_4Cl ($\text{CH}_{20^\circ\text{C}}=79.5\%$)、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ($\text{CH}_{20^\circ\text{C}}=93,0\%$)、 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ($\text{CH}_{20^\circ\text{C}}=93.1\%$)、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ($\text{CH}_{20^\circ\text{C}}=81.1\%$)、KCl ($\text{CH}_{20^\circ\text{C}}=85\%$)、 K_2HPO_4 ($\text{CH}_{20^\circ\text{C}}=92\%$)、 KH_2PO_4 ($\text{CH}_{20^\circ\text{C}}=96.5\%$)、 KNO_3 ($\text{CH}_{20^\circ\text{C}}=93.5\%$)、 Na_2SO_4 ($\text{CH}_{20^\circ\text{C}}=93\%$)、 K_2SO_4 ($\text{CH}_{20^\circ\text{C}}=98\%$)、 KHSO_4 ($\text{CH}_{20^\circ\text{C}}=86\%$)、 MgSO_4 ($\text{CH}_{20^\circ\text{C}}=90\%$)、 ZnSO_4 ($\text{CH}_{20^\circ\text{C}}=90\%$) 以及柠檬酸钠 ($\text{CH}_{25^\circ\text{C}}=86\%$)。其他实例包括 NaH_2PO_4 、 $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ 、 CuSO_4 、 $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 以及乙酸镁。

[0497] 该盐可以处于无水形式,或者它可以是水合盐,即具有结晶化的一个或多个结合水的结晶盐水合物,例如描述于WO 99/32595中。具体实例包括无水硫酸钠(Na_2SO_4)、无水硫酸镁(MgSO_4)、七水硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)、七水硫酸锌($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)、七水磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)、六水硝酸镁($\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)、二水柠檬酸钠以及四水乙酸镁。优选地,作为盐溶液使用该盐,例如使用流化床。

[0498] 因此,在另一个方面,本发明提供了颗粒,其包含:

[0499] (a) 包含根据本发明的酶的核心,

[0500] (b) 任选地由包围该核心的一个或多个层组成的包衣;以及

[0501] (c) 优选地,该颗粒是包含优选选自蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶的一种或多种其他酶的共颗粒。

[0502] 在一个实施例中,本发明提供了颗粒,该颗粒包含:

[0503] (a) 包含具有肽聚糖去除活性的多肽的核心,其中该多肽包含基序N[IV]X[AG][GAS]A[AY][LV]L (SEQ ID NO:111),

[0504] (b) 任选地由包围该核心的一个或多个层组成的包衣;以及

[0505] (c) 优选地,该颗粒是包含优选选自蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶的一种或多种其他酶的共颗粒。

[0506] 在一个实施例中,本发明提供了颗粒,该颗粒包含:

[0507] (a) 包含具有肽聚糖去除活性的多肽的核心,其中该多肽选自由以下组成的组: SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:84、SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:90、SEQ ID NO:93、SEQ ID NO:96、SEQ ID NO:99、SEQ ID NO:102、SEQ ID NO:105、SEQ ID NO:108以及与其具有至少至少至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的多肽,

[0508] (b) 任选地由包围该核心的一个或多个层组成的包衣;以及

[0509] (c) 优选地,该颗粒是包含优选选自蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶的一种或多种其他酶的共颗粒。

[0510] 发酵液配制品或细胞组合物

[0511] 本发明还涉及包含本发明的多肽的发酵液配制品或细胞组合物。该发酵液产物进一步包含在发酵过程中使用的另外的成分,例如像细胞(包括含有编码本发明的多肽的基

因的宿主细胞,这些宿主细胞用于产生目的多肽)、细胞碎片、生物质、发酵培养基和/或发酵产物。在一些实施例中,组合物是含有一种或多种有机酸、杀灭的细胞和/或细胞碎片以及培养基的细胞杀灭的全培养液。

[0512] 如本文所用的术语“发酵液”是指由细胞发酵产生的、不经历或经历最少的回收和/或纯化的制剂。例如,当微生物培养物在允许蛋白质合成(例如,由宿主细胞表达酶)并且将蛋白质分泌到细胞培养基中的碳限制条件下孵育生长到饱和时,产生发酵液。该发酵液可以含有在发酵结束时得到的发酵材料的未分级的或分级的内容物。典型地,该发酵液是未分级的并且包含用过的培养基以及例如通过离心去除微生物细胞(例如,丝状真菌细胞)之后存在的细胞碎片。在一些实施例中,发酵液含有用过的细胞培养基、胞外酶以及有活力的和/或无活力的微生物细胞。

[0513] 在实施例中,发酵液配制品和细胞组合物包含第一有机酸组分(包含至少一种1-5个碳的有机酸和/或其盐)和第二有机酸组分(包含至少一种6个或更多个碳的有机酸和/或其盐)。在特定实施例中,第一有机酸组分是乙酸、甲酸、丙酸、其盐或前述两种或更多种的混合物;并且该第二有机酸组分是苯甲酸、环己烷羧酸、4-甲基戊酸、苯乙酸、其盐或前述两种或更多种的混合物。

[0514] 在一方面,组合物含有至少一种有机酸,并且任选地进一步含有杀灭的细胞和/或细胞碎片。在一个实施例中,从细胞杀灭的全培养液中去除这些杀灭的细胞和/或细胞碎片,以提供不含这些组分的组合物。

[0515] 这些发酵液配制品或细胞组合物可以进一步包含防腐剂和/或抗微生物(例如,抑菌)剂,包括但不限于山梨醇、氯化钠、山梨酸钾、以及本领域已知的其他试剂。

[0516] 该细胞杀灭的全培养液或组合物可以含有在发酵结束时得到的发酵材料的未分级的内容物。典型地,该细胞杀灭的全培养液或组合物包含用过的培养基以及在微生物细胞(例如,丝状真菌细胞)生长至饱和、在碳限制条件下孵育以允许蛋白合成之后存在的细胞碎片。在一些实施例中,细胞杀灭的全培养液或组合物含有用过的细胞培养基、胞外酶和杀灭的丝状真菌细胞。在一些实施例中,可以使用本领域已知的方法来使细胞杀灭的全培养液或组合物中存在的微生物细胞透性化和/或裂解。

[0517] 如本文所述的全培养液或细胞组合物典型地是液体,但是可以含有不溶性组分,例如杀灭的细胞、细胞碎片、培养基组分和/或一种或多种不溶性酶。在一些实施例中,可以去除不溶性组分以提供澄清的液体组合物。

[0518] 本发明的全培养液配制品和细胞组合物可以通过W0 90/15861或W0 2010/096673中所述的方法来产生。

[0519] 组合物

[0520] 本发明还涉及包含本发明的多肽的组合物。优选地,这些组合物富含这种多肽。术语“富含”指示该组合物的肽聚糖降解活性已经增加,例如,富集因子为至少1.1。

[0521] 这些组合物可以包含本发明的多肽作为主要酶组分,例如单组分组合物。可替代地,这些组合物可以包含多种酶活性,如选自下组的一种或多种酶,该组由以下组成:水解酶、异构酶、连接酶、裂解酶、氧化还原酶、或转移酶,例如, α -半乳糖苷酶、 α -葡萄糖苷酶、氨肽酶、淀粉酶、 β -半乳糖苷酶、 β -葡萄糖苷酶、 β -木糖苷酶、糖酶、羧肽酶、过氧化氢酶、纤维素二糖水解酶、纤维素酶、几丁质酶、角质酶、环糊精葡萄糖基转移酶、脱氧核糖核酸酶、内切葡

聚糖酶、酯酶、葡糖淀粉酶、转化酶、漆酶、脂肪酶、甘露糖苷酶、变聚糖酶、氧化酶、果胶分解酶、过氧化物酶、植酸酶、多酚氧化酶、蛋白水解酶、核糖核酸酶、转谷氨酰胺酶、或木聚糖酶。

[0522] 本发明涉及清洁组合物，例如洗涤剂组合物，这些清洁组合物包含肽聚糖降解酶以及一种或多种其他清洁组合物组分。另外的组分的选择处于技术人员的能力范围内并且包括常规的成分，包括下文所述的示例性非限制性组分。

[0523] 本发明的一个方面涉及包含具有肽聚糖降解活性的多肽的清洁组合物，其中该多肽包含基序N[IV]X[AG][GAS]A[AY][LV]L (SEQ ID NO:111) 以及至少一种清洁组分。

[0524] 本发明的一个方面涉及清洁组合物，其包含：

[0525] a) 具有肽聚糖降解活性的多肽，其中该多肽选自由以下组成的组：

[0526] i. 与SEQ ID NO:3具有至少至少60%，例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽，

[0527] ii. 与SEQ ID NO:6具有至少至少60%，例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽，

[0528] iii. 与SEQ ID NO:9具有至少至少60%，例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽，

[0529] iv. 与SEQ ID NO:12具有至少至少60%，例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽，

[0530] v. 与SEQ ID NO:15具有至少至少60%，例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽，

[0531] vi. 与SEQ ID NO:18具有至少至少60%，例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽，

[0532] vii. 与SEQ ID NO:21具有至少至少60%，例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽，

[0533] viii. 与SEQ ID NO:24具有至少至少60%，例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽，

[0534] ix. 与SEQ ID NO:27具有至少至少60%，例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽，

[0535] x. 与SEQ ID NO:30具有至少至少60%，例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、

96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的多肽,以及

[0562] b) 至少一种清洁组分,优选地选自表面活性剂、助洗剂、漂白组分、聚合物、分散剂和另外的酶。

[0563] 一个实施例涉及清洁组合物,该清洁组合物包含:

[0564] a) 具有肽聚糖去除活性并且包含基序N[IV]X[AG][GAS]A[AY][LV]L (SEQ ID NO: 111)的多肽,其中该多肽选自由以下组成的组:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:84、SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:90、SEQ ID NO:93、SEQ ID NO:96、SEQ ID NO:99、SEQ ID NO:102、SEQ ID NO:105、SEQ ID NO:108以及与其具有至少至少至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的多肽;以及

[0565] b) 至少一种清洁组分,优选地选自表面活性剂、助洗剂、漂白组分、聚合物、分散剂和另外的酶。

[0566] 该肽聚糖降解酶可以以如下水平包括在本发明的清洁组合物中:至少0.0001到至少100、至少0.001到至少100、至少0.01到至少100、至少0.02到至少100、至少0.01到至少100、至少0.1到至少100、至少0.2到至少100、至少0.5到至少100mg/mL,优选地,该清洁组合物例如洗涤剂中的肽聚糖降解酶的浓度在0.01至100、0.1至50或1至10mg/ml的范围内。因此,该洗涤剂组合物可以包含至少0.00008%,优选地至少0.002%、0.003%、0.004%、0.005%、0.006%、0.008%、0.01%、0.02%、0.03%、0.05%、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%或1.0%的肽聚糖降解酶蛋白。

[0567] 清洁组分的选择可以包括(用于纺织品护理)待清洁的纺织品的类型、污垢的类型和/或程度、进行清洁时的温度以及洗涤剂产品的配制的考虑。尽管根据特定的功能性对以下提及的组分由通用标题进行分类,但是这并不被解释为限制,因为如将被普通技术人员所理解,组分可以包含另外的功能性。

[0568] 表面活性剂

[0569] 清洁组合物可以包含一种或多种表面活性剂,它们可以是阴离子的和/或阳离子的和/或非离子的和/或半极性的和/或兼性离子的,或其混合物。在特定的实施例中,洗涤剂组合物包括一种或多种非离子表面活性剂和一种或多种阴离子表面活性剂的混合物。该一种或多种表面活性剂典型地以按重量计约1%至70%,如约1wt%至约40wt%、或约3wt%至约20wt%、或约3wt%至约10wt%的水平存在。

[0570] 基于所希望的清洁应用来选择该一种或多种表面活性剂,并且该一种或多种表面活性剂可以包括本领域中已知的任何常规表面活性剂。

[0571] 当被包括在其中时,该洗涤剂将通常含有按重量计约1%至约70%的阴离子表面活性剂,如约5wt%至约50wt%,包括约5wt%至约20wt%、或约15wt%至约20wt%、或约20wt%至约25wt%、或至少30wt%、至少40wt%或至少50wt%的阴离子表面活性剂。阴离子

表面活性剂的非限制性实例包括硫酸盐和磺酸盐,特别是烷基苯磺酸盐,如直链烷基苯磺酸盐(LAS)、LAS的异构体、支链烷基苯磺酸盐(BABS)、苯基链烷磺酸盐、 α -烯烴磺酸盐(AOS)、烯烴磺酸盐、链烯烴磺酸盐、链烷-2,3-二基双(硫酸盐)、羟基链烷磺酸盐以及二磺酸盐、烷基硫酸盐(AS)(如十二烷基硫酸钠(SDS))、脂肪醇硫酸盐(FAS)、伯醇硫酸盐(PAS)、醇醚硫酸盐(AES或AEOS或FES,也被称为醇乙氧基硫酸盐或脂肪醇醚硫酸盐)、仲链烷磺酸盐(SAS)、石蜡磺酸盐(PS)、酯磺酸盐、磺化的脂肪酸甘油酯、 α -磺基脂肪酸甲酯(α -SFMe或SES)(包括甲酯磺酸盐(MES))、烷基琥珀酸或烯基琥珀酸、十二烯基/十四烯基琥珀酸(DTSA)、氨基酸的脂肪酸衍生物、磺基琥珀酸的二酯和单酯或脂肪酸盐(皂)、及其组合。

[0572] 当被包括在其中时,该洗涤剂将通常含有约1重量%至约40重量%的阳离子表面活性剂,例如约0.5%至约30%,特别是约1%至约20%、约3%至约10%,如约3%至约5%、约8%至约12%或约10%至约12%。阳离子表面活性剂的非限制性实例包括烷基二甲基乙醇季胺(ADMEAQ)、十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、二甲基二硬脂酰氯化铵(DSDMAC)、以及烷基苄基二甲基铵、烷基季铵化合物、烷氧基化季铵(AQA)化合物、酯季铵及其组合。

[0573] 当被包括在其中时,该洗涤剂将通常含有按重量计约0.2%至约40%的非离子表面活性剂,例如从约0.5wt%至约30wt%,特别是从约1wt%至约20wt%、从约3wt%至约10wt%,如从约3wt%至约5wt%、从约8wt%至约12wt%或从约10wt%至约12wt%。非离子表面活性剂的非限制性实例包括醇乙氧基化物(AE或AEO)、醇丙氧基化物、丙氧基化的脂肪醇(PFA)、烷氧基化的脂肪酸烷基酯(如乙氧基化的和/或丙氧基化的脂肪酸烷基酯)、烷基酚乙氧基化物(APE)、壬基酚乙氧基化物(NPE)、烷基多糖苷(APG)、烷氧基化胺、脂肪酸单乙醇酰胺(FAM)、脂肪酸二乙醇酰胺(FADA)、乙氧基化的脂肪酸单乙醇酰胺(EFAM)、丙氧基化的脂肪酸单乙醇酰胺(PFAM)、多羟基烷基脂肪酸酰胺、或葡萄糖胺的N-酰基N-烷基衍生物(葡糖酰胺(GA)、或脂肪酸葡糖酰胺(FAGA))、以及以SPAN和TWEEN商品名可获得的产品、及其组合。

[0574] 当被包括在其中时,该洗涤剂将通常含有按重量计约0.01%至约10%的半极性表面活性剂。半极性表面活性剂的非限制性实例包括氧化胺(AO),如烷基二甲胺氧化物、N-(椰油基烷基)-N,N-二甲胺氧化物和N-(牛油-烷基)-N,N-双(2-羟乙基)胺氧化物、及其组合。

[0575] 当被包括在其中时,该洗涤剂将通常含有按重量计约0.01%至约10%的兼性离子表面活性剂。兼性离子表面活性剂的非限制性实例包括甜菜碱,如烷基二甲基甜菜碱、磺基甜菜碱、及其组合。

[0576] 典型地,清洁组合物中存在超过一种表面活性剂,例如,至少一种阴离子和至少一种非离子表面活性剂。优选地,存在的所有表面活性剂的量(总量),即存在的阴离子、非离子、两性离子和阳离子表面活性剂的量优选地为按重量计约1wt%至80wt%,如约1wt%至70wt%,如约1wt%至50wt%,如约1wt%至约40wt%,或约5wt%至约40wt%,或约10wt%至约60wt%。存在的表面活性剂之间的比率取决于特定组合物,但是当组合物中包括阴离子和非离子表面活性剂时,重量比可以是30:1至10:1、20:1至1:10、25:1至1:2、20:1至1:5的阴离子与非离子表面活性剂的重重量比。

[0577] 一个实施例涉及一种清洁组合物,该清洁组合物包含肽聚糖降解酶,优选地具有N-乙酰基胞壁酰基-L-丙氨酸酰胺酶和肽聚糖裂解酶活性的肽聚糖降解酶,并且其中清洁

组分是至少一种表面活性剂,优选阴离子和/或非离子表面活性剂,优选地,其中组合物包含1至70wt%,优选5至40wt%的表面活性剂,其中表面活性剂优选选自烷基苯磺酸盐例如LAS、烷基硫酸盐(AS)及其混合物,优选地,清洁组合物包含至少20wt%的烷基苯磺酸盐表面活性剂。

[0578] 一个实施例涉及一种清洁组合物,该清洁组合物包含肽聚糖降解酶,优选地具有N-乙酰基胞壁酰基-L-丙氨酸酰胺酶和肽聚糖裂解酶活性的肽聚糖降解酶,其中清洁组合物包含至少一种阴离子表面活性剂,并且其中清洁组合物另外包含非离子表面活性剂,并且优选地,其中阴离子与非离子表面活性剂的重量比为25:1至1:2或1.5:1至1:10。

[0579] 助洗剂和共助洗剂

[0580] 清洁组合物可以含有按重量计约0-65%,如约5%至约50%、如约0.5%至约20%的洗涤剂助洗剂或共助洗剂、或其混合物。在餐具洗涤洗涤剂中,助洗剂的水平典型地是40%-65%,特别是50%-65%。助洗剂和/或共助洗剂可以特别是与Ca和Mg形成水溶性络合物的螯合试剂。可以利用本领域已知的用于在清洁洗涤剂中使用的任何助洗剂和/或共助洗剂。助洗剂的非限制性实例包括沸石、二磷酸盐(焦磷酸盐)、三磷酸盐如三磷酸钠(STP或STPP)、碳酸盐如碳酸钠、可溶性硅酸盐如偏硅酸钠、层状硅酸盐(例如来自赫斯特公司(Hoechst)的SKS-6)、乙醇胺如2-氨基乙-1-醇(MEA)、二乙醇胺(DEA,也称为2,2'-亚氨基二乙-1-醇)、三乙醇胺(TEA,也称为2,2',2''-次氨基三乙-1-醇)以及(羧甲基)菊粉(CMI)、及其组合。

[0581] 洗涤剂组合物还可以含有按重量计0-50%,如约5%至约30%的洗涤剂共助洗剂。洗涤剂组合物可以包括单独的共助洗剂,或与助洗剂(例如沸石助洗剂)组合。共助洗剂的非限制性实例包括聚丙烯酸酯的均聚物或其共聚物,如聚(丙烯酸)(PAA)或共聚(丙烯酸/马来酸)(PAA/PMA)。另外的非限制性实例包括柠檬酸盐、螯合剂(如氨基羧酸盐、氨基多羧酸盐和膦酸盐)、以及烷基琥珀酸或烯基琥珀酸。另外的具体实例包括2,2',2''-次氨基三乙酸(NTA)、乙二胺四乙酸(EDTA)、二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)、亚氨基二琥珀酸(IDS)、乙二胺-N,N'-二丁二酸(EDDS)、甲基甘氨酸二乙酸(MGDA)、谷氨酸-N,N-二乙酸(GLDA)、1-羟基乙烷-1,1-二膦酸(HEDP)、乙二胺四(亚甲基膦酸)(EDTMPA)、二亚乙基三胺五(亚甲基膦酸)(DTMPA或DTPMPA)、N-(2-羟乙基)亚氨基二乙酸(EDG)、天冬氨酸-N-单乙酸(ASMA)、天冬氨酸-N,N-二乙酸(ASDA)、天冬氨酸-N-单丙酸(ASMP)、亚氨基二琥珀酸(IDA)、N-(2-磺甲基)-天冬氨酸(SMAS)、N-(2-磺乙基)-天冬氨酸(SEAS)、N-(2-磺甲基)-谷氨酸(SMGL)、N-(2-磺乙基)-谷氨酸(SEGL)、N-甲基亚氨基二乙酸(MIDA)、 α -丙氨酸-N,N-二乙酸(α -ALDA)、丝氨酸-N,N-二乙酸(SEDPA)、异丝氨酸-N,N-二乙酸(ISDA)、苯丙氨酸-N,N-二乙酸(PHDA)、邻氨基苯甲酸-N,N-二乙酸(ANDA)、磺胺酸-N,N-二乙酸(SLDA)、牛磺酸-N,N-二乙酸(TUDA)以及磺甲基-N,N-二乙酸(SMDA)、N-(2-羟乙基)亚乙基二胺-N,N',N''-三乙酸盐(HEDTA)、二乙醇甘氨酸(DEG)、二亚乙基三胺五(亚甲基膦酸)(DTPMP)、氨基三(亚甲基膦酸)(ATMP)、及其组合和盐。另外的示例性助洗剂和/或共助洗剂描述于例如WO 09/102854、US 5977053中

[0582] 漂白系统

[0583] 清洁组合物可以含有按重量计0-30%,如约1%至约20%、如约0.01%至约10%的漂白系统。可以利用包含本领域已知的用于在清洁洗涤剂中使用的组分的任何漂白系统。合适的漂白系统组分包括过氧化氢源;过酸源;和漂白催化剂或增效剂。

[0584] 过氧化氢源:

[0585] 合适的过氧化氢源是无机过酸盐,包括碱金属盐(如过碳酸钠和过硼酸钠(通常是一水合物或四水合物)),以及过氧化氢-尿素(1/1)。

[0586] 过酸源:

[0587] 过酸可以是(a)直接作为预形成过酸掺入,或(b)从过氧化氢和漂白活化剂(过水解)在洗涤液中原位形成,或(c)从过氧化氢和过水解酶和后者合适的底物(例如酯)在洗涤液中原位形成。

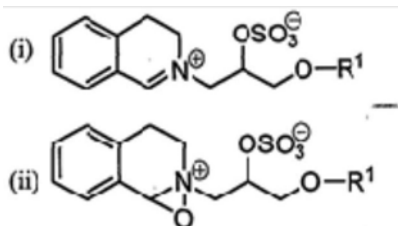
[0588] a) 合适的预形成过酸包括但不限于过氧羧酸(如过氧苯甲酸)及其环取代的衍生物、过氧- α -萘甲酸、过氧邻苯二甲酸、过氧月桂酸、过氧硬脂酸、 ϵ -邻苯二甲酰亚氨基过氧己酸[邻苯二甲酰亚氨基过氧己酸(PAP)]、和邻-羧基苯甲酰氨基过氧己酸;脂族和芳族二过氧二羧酸,如二过氧十二烷二酸、二过氧壬二酸、二过氧癸二酸、二过氧巴西基酸、2-癸基二过氧丁二酸、以及二过氧邻苯二甲酸、-间苯二甲酸和-对苯二甲酸;过亚氨酸;过氧单硫酸;过氧二硫酸;过氧磷酸;过氧硅酸;以及所述化合物的混合物。应理解的是,在一些情况下,所提到的过酸可能最好是作为合适的盐添加,如碱金属盐(例如Oxone®)或碱土金属盐。

[0589] b) 合适的漂白活化剂包括属于酯、酰胺、酰亚胺、腈类或酸酐类别的那些,以及适用时,其盐。合适的实例是四乙酰基乙二胺(TAED)、4-[(3,5,5-三甲基己酰基)氧基]苯-1-磺酸钠(ISONOBS)、4-(十二酰基氧基)苯-1-磺酸钠(LOBS)、4-(癸酰基氧基)苯-1-磺酸钠、4-(癸酰基氧基)苯甲酸(DOBA)、4-(壬酰基氧基)苯-1-磺酸钠(NOBS)和/或披露于W098/17767中的那些。目的漂白活化剂的特定家族披露于EP624154中并且在该家族中特别优选的是乙酰柠檬酸三乙酯(ATC)。ATC或短链甘油三酸酯(像三醋精)具有它们是环境友好的优点。此外,乙酰柠檬酸三乙酯和三醋精在储存时在产品中具有良好的水解稳定性,并且是有效的漂白活化剂。最后,ATC是多功能的,因为在过水解反应中释放的柠檬酸盐可以作为助洗剂起作用。

[0590] 漂白催化剂和增效剂

[0591] 该漂白系统还可以包括漂白催化剂或增效剂。可以用于本发明组合物中的漂白催化剂的一些非限制性实例包括草酸锰、乙酸锰、锰胶原、钴-胺催化剂和锰三氮杂环壬烷(MnTACN)催化剂;特别优选的是锰与1,4,7-三甲基-1,4,7-三氮杂环壬烷(Me3-TACN)或1,2,4,7-四甲基-1,4,7-三氮杂环壬烷(Me4-TACN)的络合物,特别是Me3-TACN,如双核锰络合物[(Me3-TACN)Mn(O)3Mn(Me3-TACN)](PF6)2、和[2,2',2''-次氨基三(乙烷-1,2-二基氮烷基亚基- κ N-甲基亚基)三酚并- κ 30]锰(III)。这些漂白催化剂还可以是其他金属化合物,如铁或钴络合物。

[0592] 在其中过酸源包括在内的一些实施例中,可以使用具有下式之一的有机漂白催化剂或漂白增效剂:



[0593]

[0594] (iii) 及其混合物;其中每个R1独立地是含有从9至24个碳的支链烷基基团或含有从11至24个碳的直链烷基基团,优选地每个R1独立地是含有从9至18个碳的支链烷基基团或含有从11至18个碳的直链烷基基团,更优选地每个R1独立地选自由以下组成的组:2-丙基庚基、2-丁基辛基、2-戊基壬基、2-己基癸基、十二烷基、十四烷基、十六烷基、十八烷基、异壬基、异癸基、异十三烷基以及异十五烷基。

[0595] 其他示例性漂白系统描述于例如WO 2007/087258、WO 2007/087244、WO 2007/087259、EP 1867708 (维生素K) 和WO 2007/087242中。合适的光漂白剂可以例如是磺化的酞菁锌或酞菁铝。

[0596] 金属护理剂

[0597] 金属护理剂可以防止或减少金属的锈蚀、腐蚀或氧化,这些金属包括铝、不锈钢和非铁金属,如银和铜。合适的实例包括以下的一个或多个:

[0598] (a) 苯并三唑类,包括苯并三唑或双-苯并三唑及其取代的衍生物。苯并三唑衍生物是其中芳环上可获得的取代位点被部分或完全取代的那些化合物。合适的取代基包括直链或支链C₁-C₂₀-烷基基团(例如C₁-C₂₀-烷基基团)和羟基、硫代、苯基或卤素(例如氟、氯、溴和碘)。

[0599] (b) 选自下组的金属盐和络合物,该组由以下组成:锌、锰、钛、锆、钪、钒、钴、镓和铈盐和/或络合物,这些金属处于氧化态II、III、IV、V或VI之一。在一方面,合适的金属盐和/或金属络合物可以选自下组,该组由以下组成:Mn(II) 硫酸盐、Mn(II) 柠檬酸盐、Mn(II) 硬脂酸盐、Mn(II) 乙酰丙酮酸盐、K⁺TiF₆ (例如,K₂TiF₆)、K⁺ZrF₆ (例如,K₂ZrF₆)、CoSO₄·Co(NO₃)₂和Ce(NO₃)₃、锌盐,例如,硫酸锌、水锌矿、或乙酸锌;

[0600] (c) 硅酸盐,包括硅酸钠或硅酸钾、二硅酸钠、偏硅酸钠、结晶页硅酸盐及其混合物。

[0601] WO 94/26860和WO 94/26859中披露了用作银/铜腐蚀抑制剂的另外合适的有机和无机氧化还原活性物质。优选地,本发明的组合物包含按重量计0.1%至5%的金属护理剂的组合物,优选地该金属护理剂是锌盐。

[0602] 水溶助剂

[0603] 该清洁组合物可以含有按重量计0-10%,例如按重量计0-5%,如约0.5%至约5%、或约3%至约5%的水溶助剂。可以利用本领域中已知的用于在洗涤剂中使用的任何水溶助剂。水溶助剂的非限制性实例包括苯磺酸钠、对甲苯磺酸钠(STS)、二甲苯磺酸钠(SXS)、枯烯磺酸钠(SCS)、伞花烃磺酸钠、氧化胺、醇和聚乙二醇醚、羟基萘甲酸钠、羟基萘磺酸钠、乙基己基磺酸钠、及其组合。

[0604] 聚合物

[0605] 该清洁组合物可以含有按重量计0-10%,如0.5%-5%、2%-5%、0.5%-2%或0.2%-1%的聚合物。可以利用本领域中已知的用于在洗涤剂中使用的任何聚合物。该聚合物可以作为如上文提到的共助洗剂起作用,或可以提供抗再沉积、纤维保护、污垢释放、染料转移抑制、油脂清洁和/或防沫特性。一些聚合物可以具有多于一种的上文提到的特性和/或多于一种的下文提到的基序。示例性聚合物包括(羧甲基)纤维素(CMC)、聚(乙烯醇)(PVA)、聚(乙烯吡咯烷酮)(PVP)、聚(乙二醇)或聚(环氧乙烷)(PEG)、乙氧基化的聚(亚乙基亚胺)、羧甲基菊粉(CMI)、和聚羧酸酯,如PAA、PAA/PMA、聚-天冬氨酸、和甲基丙烯酸月桂

酯/丙烯酸共聚物、疏水修饰的CMC (HM-CMC) 和硅酮、对苯二甲酸和低聚乙二醇的共聚物、聚(对苯二甲酸乙二酯)和聚(氧乙烯对苯二甲酸乙二酯)的共聚物(PET-POET)、PVP、聚(乙烯基咪唑)(PVI)、聚(乙烯吡啶-N-氧化物)(PVPO或PVPNO)以及聚乙烯吡咯烷酮-乙烯基咪唑(PVPVI)。合适的实例包括PVP-K15、PVP-K30、来自Ashl和Aqualon的ChromaBond S-400、ChromaBond S-403E和Chromabond S-100,以及来自BASF的**Sokalan®HP 165**、**Sokalan®HP 50**(分散剂)、**Sokalan®HP 53**(分散剂)、**Sokalan®HP 59**(分散剂)、**Sokalan®HP 56**(染料转移抑制剂)、**Sokalan®HP 66K**(染料转移抑制剂)。另外的示例性聚合物包括磺化的聚羧酸酯、聚环氧乙烷和聚环氧丙烷(PEO-PP0)以及乙氧基硫酸二季铵盐。其他示例性聚合物披露于例如W0 2006/130575中。还考虑了以上提到的聚合物的盐。特别优选的聚合物是来自BASF的乙氧基化的均聚物**Sokalan®HP 20**,其有助于防止洗涤液中的污垢再沉积。

[0606] 织物调色剂

[0607] 本发明的清洁组合物还可以包括织物调色剂,如染料或颜料,当配制在洗涤剂组合物中时,当所述织物与洗涤液接触时织物调色剂可以沉积在织物上,所述洗涤液包含所述洗涤剂组合物,并且因此通过可见光的吸收/反射改变所述织物的色彩。荧光增白剂发射至少一些可见光。相比之下,当织物调色剂吸收至少部分可见光谱时,它们改变表面的色彩。适合的织物调色剂包括染料和染料-粘土轭合物,并且还可以包括颜料。合适的染料包括小分子染料和聚合物染料。合适的小分子染料包括选自下组的小分子染料,该组由落入颜色索引(Colour Index)(C.I.)分类的以下染料组成:直接蓝、直接红、直接紫、酸性蓝、酸性红、酸性紫、碱性蓝、碱性紫和碱性红、或其混合物,例如描述于W0 2005/03274、W0 2005/03275、W0 2005/03276和EP1876226中(通过引用并入本文)。洗涤剂组合物优选地包含从约0.00003wt%至约0.2wt%、从约0.00008wt%至约0.05wt%、或甚至从约0.0001wt%至约0.04wt%的织物调色剂。该组合物可以包含从0.0001wt%至0.2wt%的织物调色剂,当该组合物处于单位剂量袋的形式时,这可以是尤其优选的。合适的调色剂还披露于例如W0 2007/087257和W0 2007/087243中。

[0608] 分散剂

[0609] 本发明的清洁组合物还可以含有分散剂。特别地,粉状洗涤剂可以包含分散剂。合适的水溶性有机材料包括均聚合或共聚合的酸或其盐,其中聚羧酸包含被不多于两个碳原子彼此分开的至少两个羧基。合适的分散剂例如描述于Powdered Detergents[粉状洗涤剂],Surfactant science series[表面活性剂科学系列],第71卷,马塞尔德克尔公司中。

[0610] 染料转移抑制剂

[0611] 本发明的清洁组合物还可以包括一种或多种染料转移抑制剂。合适的聚合物染料转移抑制剂包括但不限于聚乙烯吡咯烷酮聚合物、多胺N-氧化物聚合物、N-乙烯吡咯烷酮与N-乙烯基咪唑的共聚物、聚乙烯噁唑烷酮以及聚乙烯咪唑或其混合物。当在主题组合物中存在时,染料转移抑制剂可以按该组合物的重量计以从约0.0001%至约10%、从约0.01%至约5%或甚至从约0.1%至约3%的水平存在。

[0612] 荧光增白剂

[0613] 本发明的清洁组合物还将优选地含有另外的组分,这些组分可以给正在清洁的物品着色,例如荧光增白剂或光学增亮剂。当存在时,该增亮剂优选地以约0.01%至约0.5%

的水平存在。在本发明的组合物中可以使用合适用于在衣物洗涤剂组合物中使用的任何荧光增白剂。最常用的荧光增白剂是属于以下类别的那些：二氨基芪-磺酸衍生物、二芳基吡唑啉衍生物和二苯基-联苯乙烯基衍生物。荧光增白剂的二氨基芪-磺酸衍生物型的实例包括以下的钠盐：4,4'-双-(2-二乙醇氨基-4-苯胺基-s-三嗪-6-基氨基)芪-2,2'-二磺酸盐、4,4'-双-(2,4-二苯胺基-s-三嗪-6-基氨基)芪-2,2'-二磺酸盐、4,4'-双-(2-苯胺基-4-(N-甲基-N-2-羟基-乙基氨基)-s-三嗪-6-基氨基)芪-2,2'-二磺酸盐、4,4'-双-(4-苯基-1,2,3-三唑-2-基)芪-2,2'-二磺酸盐以及5-(2H-萘并[1,2-d][1,2,3]三唑-2-基)-2-[(E)-2-苯基乙烯基]苯磺酸钠。优选的荧光增白剂是可从汽巴-嘉基股份有限公司(Ciba-Geigy AG)(巴塞尔,瑞士)获得的天来宝(Tinopal)DMS和天来宝CBS。天来宝DMS是4,4'-双-(2-吗啉代-4-苯胺基-s-三嗪-6-基氨基)芪-2,2'-二磺酸盐的二钠盐。天来宝CBS是2,2'-双-(苯基-苯乙烯基)-二磺酸盐的二钠盐。还优选的是荧光增白剂是可商购的Parawhite KX,由印度孟买的派拉蒙矿物与化学品公司(Paramount Minerals and Chemicals)供应。合适用于本发明中使用的其他荧光剂包括1-3-二芳基吡唑啉和7-氨基香豆素。合适的荧光增亮剂水平包括从约0.01wt%、从0.05wt%、从约0.1wt%或甚至从约0.2wt%的较低水平至0.5wt%或甚至0.75wt%的较高水平。

[0614] 污垢释放聚合物

[0615] 本发明的清洁组合物还可以包括一种或多种污垢释放聚合物,这些聚合物帮助从织物(例如棉布和基于聚酯的织物)移除污垢,特别是从基于聚酯的织物去除疏水性污垢。污垢释放聚合物可以例如是基于非离子型或阴离子型对苯二甲酸的聚合物、聚乙烯基内酰胺和相关共聚物、乙烯基接枝共聚物、聚酯聚酰胺,参见例如Powdered Detergents[粉状洗涤剂],Surfactant science series[表面活性剂科学系列]第71卷,第7章,马塞尔·德克尔公司(Marcel Dekker, Inc.)。另一种类型的污垢释放聚合物是包含核心结构和附接至该核心结构的多个烷氧基化基团的两亲性烷氧基化油脂清洁聚合物。核心结构可以包含聚烷基亚胺结构或聚烷醇胺结构,如在W0 2009/087523中详细描述(通过引用特此并入)。此外,随机接枝共聚物是合适的污垢释放聚合物。适合的接枝共聚物更详细地描述于W0 2007/138054、W0 2006/108856以及W0 2006/113314中(通过引用并入本文)。合适的聚乙二醇聚合物包括包含以下的随机接枝共聚物:(i)含有聚乙二醇的亲水性主链;以及(ii)选自下组的一条或多条侧链,该组由以下组成:C4-C25烷基基团、聚丙烯、聚丁烯、饱和C1-C6单羧酸的乙烯基酯、丙烯酸或甲基丙烯酸的C1-C6烷基酯及其混合物。合适的聚乙二醇聚合物具有聚乙二醇主链(具有随机接枝的聚乙酸乙烯酯侧链)。聚乙二醇主链的平均分子量范围可以为从2,000Da至20,000Da、或从4,000Da至8,000Da。聚乙二醇主链与聚乙酸乙烯酯侧链的分子量比率可以在从1:1至1:5、或从1:1.2至1:2的范围内。每个环氧乙烷单元的接枝位点的平均数量可以小于1、或小于0.8,每个环氧乙烷单元的接枝位点的平均数量可在0.5至0.9的范围内,或每个环氧乙烷单元的接枝位点的平均数量可以在0.1至0.5、或0.2至0.4的范围内。合适的聚乙二醇聚合物是Sokalan HP22。其他污垢释放聚合物是取代的多糖结构,尤其是取代的纤维素结构,如修饰的纤维素衍生物,如EP 1867808或W0 2003/040279中所描述的那些(将二者都通过引用并入本文)。合适的纤维素聚合物包括纤维素、纤维素醚、纤维素酯、纤维素酰胺及其混合物。合适的纤维素聚合物包括阴离子修饰的纤维素、非离子修饰的纤维素、阳离子修饰的纤维素、两性离子修饰的纤维素及其混合物。合适的纤维素聚合

物包括甲基纤维素、羧甲基纤维素、乙基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、酯羧甲基纤维素及其混合物。

[0616] 抗再沉积剂

[0617] 本发明的清洁组合物还可以包括一种或多种抗再沉积剂,如羧甲基纤维素(CMC)、聚乙烯醇(PVA)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、聚氧乙烯和/或聚乙二醇(PEG)、丙烯酸的均聚物、丙烯酸和马来酸的共聚物、和乙氧基化的聚乙亚胺。以上在污垢释放聚合物下所描述的基于纤维素的聚合物还可以作为抗再沉积剂起作用。

[0618] 流变改性剂

[0619] 本发明的清洁组合物还可以包括一种或多种流变改性剂、结构剂或增稠剂,不同于降粘剂。流变改性剂选自下组,该组由以下组成:非聚合物结晶、羟基功能材料、聚合物流变改性剂,它们为液体洗涤剂组合物的水性液相基质赋予剪切稀化特征。可以通过本领域已知的方法修饰和调整洗涤剂的流变学和粘度,例如,如在EP 2169040中所示。

[0620] 其他合适的清洁组合物组分包括但不限于防缩剂、抗皱剂、杀细菌剂、粘合剂、运载体、染料、酶稳定剂、织物软化剂、填料、泡沫调节剂、水溶助剂、香料、颜料、抑泡剂、溶剂以及用于液体洗涤剂的结构剂和/或结构弹性剂。

[0621] 聚合物

[0622] 该清洁组合物可以含有按重量计0-10%,如0.5%-5%、2%-5%、0.5%-2%或0.2%-1%的聚合物。可以利用本领域中已知的用于在洗涤剂中使用的任何聚合物。该聚合物可以作为如上文提到的共助洗剂起作用,或可以提供抗再沉积、纤维保护、污垢释放、染料转移抑制、油脂清洁和/或防沫特性。一些聚合物可以具有多于一种的上文提到的特性和/或多于一种的下文提到的基序。示例性聚合物包括(羧甲基)纤维素(CMC)、聚(乙烯醇)(PVA)、聚(乙烯吡咯烷酮)(PVP)、聚(乙二醇)或聚(环氧乙烷)(PEG)、乙氧基化的聚(亚乙基亚胺)、羧甲基菊粉(CMI)、和聚羧酸酯,如PAA、PAA/PMA、聚-天冬氨酸、和甲基丙烯酸月桂酯/丙烯酸共聚物、疏水修饰的CMC(HM-CMC)和硅酮、对苯二甲酸和低聚乙二醇的共聚物、聚(对苯二甲酸乙二酯)和聚(氧乙烯对苯二甲酸乙二酯)的共聚物(PET-POET)、PVP、聚(乙烯基咪唑)(PVI)、聚(乙烯吡啶-N-氧化物)(PVPO或PVPNO)以及聚乙烯吡咯烷酮-乙烯基咪唑(PVPVI)。合适的实例包括PVP-K15、PVP-K30、来自Ashl和Aqualon的ChromaBond S-400、ChromaBond S-403E和Chromabond S-100,以及来自BASF的**Sokalan®**HP 165、**Sokalan®**HP 50(分散剂)、**Sokalan®**HP 53(分散剂)、**Sokalan®**HP 59(分散剂)、**Sokalan®**HP 56(染料转移抑制剂)、**Sokalan®**HP 66K(染料转移抑制剂)。另外的示例性聚合物包括磺化的聚羧酸酯、聚环氧乙烷和聚环氧丙烷(PEO-PPG)以及乙氧基硫酸二季铵盐。其他示例性聚合物披露于例如WO 2006/130575中。还考虑了以上提到的聚合物的盐。特别优选的聚合物是来自BASF的乙氧基化的均聚物**Sokalan®**HP20,其有助于防止洗涤液中的污垢再沉积。

[0623] 酶

[0624] 清洁组合物可以包含一种或多种另外的酶,如一种或多种脂肪酶、角质酶、淀粉酶、糖酶、纤维素酶、果胶酶、甘露聚糖酶、阿拉伯糖酶、半乳聚糖酶、木聚糖酶、氧化酶(例如漆酶)和/或过氧化物酶。一般而言,所选的一种或多种酶的特性应与所选的洗涤剂相容(即,最适pH、与其他酶和非酶成分的相容性等),并且该一种或多种酶应以有效量存在。

[0625] 甘露聚糖酶

[0626] 合适的甘露聚糖酶包括细菌或真菌来源的那些。包括化学或遗传修饰的突变体。甘露聚糖酶可以是家族5或26的碱性甘露聚糖酶。它可以是来自芽孢杆菌属或腐质霉属的野生型,特别是粘琼脂芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、嗜碱芽孢杆菌(*B. halodurans*)、克劳氏芽孢杆菌或特异腐质霉。合适的甘露聚糖酶描述于W0 1999/064619中。可商购的甘露聚糖酶是Mannaway(诺维信公司)。

[0627] 纤维素酶

[0628] 合适的纤维素酶包括细菌或真菌来源的完整纤维素酶或单组分内切葡聚糖酶。包括化学或遗传修饰的突变体。纤维素酶可以例如是单组分内切-1,4- β -葡聚糖酶(通常直接称为内切葡聚糖酶)或者是其混合物。合适的纤维素酶包括真菌纤维素酶,该真菌纤维素酶来自特异腐质霉(US 4,435,307)或来自木霉属,例如里氏木霉或绿色木霉。纤维素酶的实例在EP 0 495 257进行了描述。其他合适的纤维素酶来自梭孢壳菌属,例如如在W0 96/29397中描述的土生梭孢壳霉或如在W0 91/17244中描述的尖孢镰孢,或者来自如在W0 02/099091和JP 2000210081中所描述的芽孢杆菌属。其他实例是纤维素酶变体,如W0 94/07998、EP 0 531 315、US 5,457,046、US 5,686,593、US 5,763,254、W0 95/24471、W0 98/12307中描述的纤维素酶变体,市售纤维素酶包括

Carezyme®、Celluzyme®、Celluclean®、Celluclast®和Endolase®; Renozyme®; Whitezyme®(诺维信公司(Novozymes A/S)) Puradax®、Puradax HA和Puradax EG(获自杰能科公司(Genencor))。

[0629] 蛋白酶

[0630] 合适的蛋白酶可以是任何来源的,但优选地是细菌或真菌来源的,任选地呈蛋白质工程化的或化学修饰的突变体的形式。蛋白酶可以是碱性蛋白酶,例如丝氨酸蛋白酶或金属蛋白酶。丝氨酸蛋白酶可以例如是S1家族的(如胰蛋白酶)或S8家族的(如枯草杆菌蛋白酶(subtilisin))。金属蛋白酶可以例如是嗜热菌蛋白酶,例如来自M4家族的嗜热菌蛋白酶,或另一种金属蛋白酶,如来自M5、M7或M35家族的那些。

[0631] 术语“枯草杆菌酶(subtilase)”是指根据Siezen等人,Protein Eng.[蛋白质工程]4(1991)719-737和Siezen等人,Protein Sci.[蛋白质科学]6(1997)501-523的丝氨酸蛋白酶的亚组。丝氨酸蛋白酶是特征为在活性位点具有与底物形成共价加合物的丝氨酸的蛋白酶的亚组。枯草杆菌酶可以被划分为六个亚类:枯草杆菌蛋白酶家族、嗜热蛋白酶家族、蛋白酶K家族、羊毛硫氨酸抗生素肽酶家族、Kexin家族和Pyrolysin家族。

[0632] 尽管适于洗涤剂用途的蛋白酶可以从多种生物(包括例如曲霉属等真菌)获得,但洗涤剂蛋白酶通常已从细菌(特别是从芽孢杆菌属)获得。衍生出枯草杆菌酶的芽孢杆菌属物种的实例包括迟缓芽孢杆菌(*Bacillus lentus*)、嗜碱芽孢杆菌(*Bacillus alkalophilus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)、短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)和吉氏芽孢杆菌(*Bacillus gibsonii*)。特定的枯草杆菌蛋白酶包括枯草杆菌蛋白酶lentus、枯草杆菌蛋白酶Novo、枯草杆菌蛋白酶Carlsberg、枯草杆菌蛋白酶BPN'、枯草杆菌蛋白酶309、枯草杆菌蛋白酶147和枯草杆菌蛋白酶168、以及例如蛋白酶PD138(在W0 93/18140中描述)。其他有用的蛋白酶是例如在W0 01/16285和W0 02/16547中描述的那些。

[0633] 胰蛋白酶样蛋白酶的实例包括镰孢属 (*Fusarium*) 蛋白酶 (在WO 94/25583和WO 2005/040372中描述), 以及来源于纤维单胞菌 (*Cellulomonas*) 的糜蛋白酶 (在WO 2005/052161和WO 2005/052146中描述)。

[0634] 金属蛋白酶的实例包括在WO 2007/044993中描述的中性金属蛋白酶, 如来源于解淀粉芽孢杆菌的那些, 以及例如在WO 2015/158723和WO 2016/075078中描述的金属蛋白酶。

[0635] 有用的蛋白酶的实例是在WO 89/06279、WO 92/19729、WO 96/34946、WO 98/20115、WO 98/20116、WO 99/11768、WO 01/44452、WO 03/006602、WO 2004/003186、WO 2004/041979、WO 2007/006305、WO 2011/036263、WO 2014/207227、WO 2016/087617和WO 2016/174234中描述的蛋白酶变体。优选的蛋白酶变体可以例如包含选自下组的一个或多个突变, 该组由以下组成: 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和R269H, 其中位置编号对应于WO 2016/001449的SEQ ID NO:1所示的迟缓芽孢杆菌蛋白酶的位置。具有这些突变中的一个或多个的蛋白酶变体优选地是WO 2016/001449的SEQ ID NO:1所示的迟缓芽孢杆菌蛋白酶 (**Savinase®**, 也称为枯草杆菌蛋白酶309) 的变体或WO 2016/001449的SEQ ID NO:2所示的解淀粉芽孢杆菌蛋白酶 (BPN') 的变体。此类蛋白酶变体与WO 2016/001449的SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2优选地具有至少80%序列同一性。

[0636] 另一种目的蛋白酶是来自迟缓芽孢杆菌DSM 5483的碱性蛋白酶 (如例如在WO 91/02792中所述) 及其变体 (这些变体例如在WO 92/21760、WO 95/23221、EP 1921147、EP 1921148和WO 2016/096711中描述)。

[0637] 可替代地, 蛋白酶可以是具有WO 2004/067737的SEQ ID NO:1的TY145蛋白酶的变体, 例如在以下一个或多个位置 (对应于WO 2004/067737的SEQ ID NO:1的位置27、109、111、171、173、174、175、180、182、184、198、199和297) 处包含取代的变体, 其中所述蛋白酶变体与WO 2004/067737的SEQ ID NO:1具有至少75%但少于100%的序列同一性。目的TY145变体描述于例如WO 2015/014790、WO 2015/014803、WO 2015/014804、WO 2016/097350、WO 2016/097352、WO 2016/097357和WO 2016/097354中。

[0638] 优选的蛋白酶的实例包括:

[0639] (a) 包含选自下组的两个或更多个取代的WO 2016/001449的SEQ ID NO:1的变体, 该组由以下组成: S9E、N43R、N76D、Q206L、Y209W、S259D和L262E, 例如具有取代S9E、N43R、N76D、V205I、Q206L、Y209W、S259D、N261W和L262E, 或具有取代S9E、N43R、N76D、N185E、S188E、Q191N、A194P、Q206L、Y209W、S259D和L262E的变体, 其中位置编号基于WO 2016/001449的SEQ ID NO:2的编号;

[0640] (b) WO 2016/001449的SEQ ID NO:1的多肽的具有突变S99SE的变体, 其中位置编号基于WO 2016/001449的SEQ ID NO:2的编号;

[0641] (c) WO 2016/001449的SEQ ID NO:1的多肽的具有突变S99AD的变体,其中位置编号基于WO 2016/001449的SEQ ID NO:2的编号;

[0642] (d) 具有取代Y167A+R170S+A194P的WO 2016/001449的SEQ ID NO:1的多肽的变体,其中位置编号基于WO 2016/001449的SEQ ID NO:2的编号;

[0643] (e) 具有取代S9R+A15T+V68A+N218D+Q245R的WO 2016/001449的SEQ ID NO:1的多肽的变体,其中位置编号基于WO 2016/001449的SEQ ID NO:2的编号;

[0644] (f) 具有取代S9R+A15T+G61E+V68A+A194P+V205I+Q245R+N261D的WO 2016/001449的SEQ ID NO:1的多肽的变体,其中位置编号基于WO 2016/001449的SEQ ID NO:2的编号;

[0645] (g) 具有取代S99D+S101R/E+S103A+V104I+G160S的WO 2016/001449的SEQ ID NO:1的多肽的变体;例如,具有取代S3T+V4I+S99D+S101E+S103A+V104I+G160S+V205I的WO 2016/001449的SEQ ID NO:1的变体,其中位置编号基于WO 2016/001449的SEQ ID NO:2的编号;

[0646] (h) 具有取代S24G+S53G+S78N+S101N+G128A/S+Y217Q的WO 2016/001449的SEQ ID NO:2的多肽的变体,其中位置编号基于WO 2016/001449的SEQ ID NO:2的编号;

[0647] (i) 以登录号BER84782披露于GENESEQP中的多肽,其对应于WO 2017/210295中的SEQ ID NO:302;

[0648] (j) 具有取代S99D+S101E+S103A+V104I+S156D+G160S+L262E的WO 2016/001449的SEQ ID NO:1的多肽的变体,其中位置编号基于WO 2016/001449的SEQ ID NO:2的编号;

[0649] (k) 具有取代S9R+A15T+G61E+V68A+N76D+S99G+N218D+Q245R的WO 2016/001449的SEQ ID NO:1的多肽的变体,其中位置编号基于WO 2016/001449的SEQ ID NO:2的编号;

[0650] (l) 具有取代V68A+S106A的WO 2016/001449的SEQ ID NO:1的多肽的变体,其中位置编号基于WO 2016/001449的SEQ ID NO:2的编号;以及

[0651] (m) 具有取代S27K+N109K+S111E+S171E+S173P+G174K+S175P+F180Y+G182A+L184F+Q198E+N199+T297P的WO 2004/067737的SEQ ID NO:1的多肽的变体,其中位置编号基于WO 2004/067737的SEQ ID NO:1的编号。

[0652] 合适的可商购的蛋白酶包括以下列商标名出售的那些: **Alcalase®**、**Duralase™**、**Durazym™**、**Relase®**、**Relase® Ultra**、**Savinase®**、**Savinase® Ultra**、**Primase™**、**Polarzyme®**、**Kannase®**、**Liquanase®**、**Liquanase® Ultra**、**Ovozyme®**、**Coronase®**、**Coronase® Ultra**、**Blaze®**、**Blaze Evity® 100T**、**Blaze Evity® 125T**、**Blaze Evity® 150T**、**Blaze Evity® 200T**、**Neutrase®**、**Everlase®**、**Esperase®**、**Progress® Uno**、**Progress® In**和**Progress® Excel** (诺维信公司 (Novozymes A/S)), 以下列商标名出售的那些: **Maxatase™**、**Maxacal™**、**Maxapem®**、**Purafect® 0x**、**Purafect® 0xP**、**Puramax®**、**FN2™**、**FN3™**、**FN4^{ex}™**、**Excellase®**、**Excellenz™ P1000**、**Excellenz™ P1250**、**Eraser™**、**Preferenz® P100**、**Purafect Prime**、**Preferenz P110™**、**Effectenz P1000™**、**Purafect®**、**Effectenz P1050™**、**Purafect® 0x**、**Effectenz™ P2000**、**Purafast™**、**Properase®**、**Opticlean™**和

Optimase® (丹斯尼克公司/杜邦公司 (Danisco/DuPont))、BLAP (在US 5352604的图29中显示的序列) 及其变体 (汉高公司 (Henkel AG))、以及来自花王株式会社 (Kao) 的KAP (嗜碱芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶)。

[0653] 脂肪酶和角质酶

[0654] 合适的脂肪酶和角质酶包括细菌或真菌来源的那些。包括化学修饰的突变体酶或蛋白质工程化的突变体酶。实例包括来自嗜热真菌属的脂肪酶, 例如, 如描述于EP 258068和EP 305216中的来自疏绵状嗜热丝孢菌 (早先命名为疏棉状腐质霉); 来自腐质霉属的角质酶, 例如特异腐质霉 (WO 96/13580); 来自假单胞菌属的菌株的脂肪酶 (这些中的一些现在改名为伯克霍尔德菌属), 例如产碱假单胞菌或类产碱假单胞菌 (EP 218272)、洋葱假单胞菌 (EP 331376)、假单胞菌属菌株SD705 (WO 95/06720和WO 96/27002)、威斯康星假单胞菌 (*P.wisconsinensis*) (WO 96/12012); GDSL-型链霉菌属脂肪酶 (WO 10/065455); 来自稻瘟病菌的角质酶 (WO 10/107560); 来自门多萨假单胞菌的角质酶 (US 5,389,536); 来自褐色嗜热裂孢菌 (*Thermobifida fusca*) 的脂肪酶 (WO 11/084412); 嗜热脂肪土芽孢杆菌脂肪酶 (WO 11/084417); 来自枯草芽孢杆菌的脂肪酶 (WO 11/084599); 以及来自灰色链霉菌 (WO 11/150157) 和始旋链霉菌 (*S.pristinaespiralis*) 的脂肪酶 (WO 12/137147)。

[0655] 其他实例是脂肪酶变体, 例如EP407225、W092/05249、W094/01541、W094/25578、W095/14783、W095/30744、W095/35381、W095/22615、W096/00292、W097/04079、W097/07202、W000/34450、W000/60063、W001/92502、W007/87508以及W009/109500中所述的那些。

[0656] 优选的商业化脂肪酶产品包括Lipolase[™]、Lipex[™]; Lipolex[™]和Lipoclean[™] (诺维信公司), Lumafast (来自杰能科公司 (Genencor)) 以及Lipomax (来自吉斯特布罗卡德斯公司 (Gist-Brocades))。仍其他实例是有时称为酰基转移酶或过水解酶的脂肪酶, 例如与南极假丝酵母 (*Candida antarctica*) 脂肪酶A具有同源性的酰基转移酶 (W010/111143)、来自耻垢分枝杆菌 (*Mycobacterium smegmatis*) 的酰基转移酶 (W005/56782)、来自CE 7家族的过水解酶 (W009/67279) 以及耻垢分枝杆菌过水解酶的变体 (特别是来自亨斯迈纺织品染化有限公司 (Huntsman Textile Effects Pte Ltd) 的商业产品Gentle Power Bleach中所用的S54V变体) (W010/100028)。

[0657] 淀粉酶

[0658] 适合的淀粉酶可以是 α -淀粉酶或葡糖淀粉酶并且可以是细菌或真菌来源的。包括化学修饰的突变体或蛋白质工程化的突变体。淀粉酶包括例如从芽孢杆菌属、例如地衣芽孢杆菌的特定菌株 (更详细地描述于GB 1,296,839中) 获得的 α -淀粉酶。

[0659] 适合的淀粉酶包括具有WO 95/10603中的SEQ ID NO:2的淀粉酶或其与SEQ ID NO:3具有90%序列同一性的变体。优选的变体描述于WO 94/02597、WO 94/18314、WO 97/43424中以及WO 99/019467的SEQ ID NO:4中, 如在以下位置的一个或多个中具有取代的变体: 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和444。

[0660] 不同的合适的淀粉酶包括具有WO 02/010355中的SEQ ID NO 6的淀粉酶或其与SEQ ID NO:6具有90%序列同一性的变体。SEQ ID NO:6的优选的变体是在位置181和182中具有缺失并且在位置193中具有取代的那些。

[0661] 其他合适的淀粉酶是包含WO 2006/066594的SEQ ID NO:6所示的来源于解淀粉芽

孢杆菌的 α -淀粉酶的残基1-33和WO 2006/066594的SEQ ID NO:4所示的地衣芽孢杆菌 α -淀粉酶的残基36-483的杂合 α -淀粉酶或其具有90%序列同一性的变体。此杂合 α -淀粉酶的优选的变体是在以下位置的一个或多个中具有取代、缺失或插入的那些：G48、T49、G107、H156、A181、N190、M197、I201、A209和Q264。包含WO 2006/066594的SEQ ID NO:6所示的来源于解淀粉芽孢杆菌的 α -淀粉酶的残基1-33和SEQ ID NO:4的残基36-483的杂合 α -淀粉酶的最优选的变体是具有以下取代的那些：

[0662] M197T；

[0663] H156Y+A181T+N190F+A209V+Q264S；或

[0664] G48A+T49I+G107A+H156Y+A181T+N190F+I201F+A209V+Q264S。

[0665] 另外的合适的淀粉酶是具有WO 99/019467中的SEQ ID NO:6的淀粉酶或其与SEQ ID NO:6具有90%序列同一性的变体。SEQ ID NO:6的优选的变体是在以下位置中的一个或多个中具有取代、缺失或插入的那些：R181、G182、H183、G184、N195、I206、E212、E216和K269。特别优选的淀粉酶是在位置R181和G182、或位置H183和G184中具有缺失的那些。

[0666] 可以使用的另外的淀粉酶是具有WO 96/023873的SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:7的那些或其与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:7具有90%序列同一性的变体。SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:7的优选的变体是在以下位置中的一个或多个中具有取代、缺失或插入的那些：140、181、182、183、184、195、206、212、243、260、269、304和476，使用WO 96/023873的SEQ ID 2进行编号。更优选的变体是在选自181、182、183和184的两个位置（如181和182、182和183、或位置183和184）中具有缺失的那些。SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:7的最优选的淀粉酶变体是在位置183和184中具有缺失并且在位置140、195、206、243、260、304和476中的一个或多个中具有取代的那些。

[0667] 可以使用的其他淀粉酶是具有WO 08/153815的SEQ ID NO:2、WO 01/66712中的SEQ ID NO:10的淀粉酶或其与WO 08/153815的SEQ ID NO:2具有90%序列同一性或WO 01/66712中的SEQ ID NO:10具有90%序列同一性的变体。WO 01/66712中的SEQ ID NO:10的优选的变体是在以下位置的一个或多个中具有取代、缺失或插入的那些：176、177、178、179、190、201、207、211和264。

[0668] 另外的合适的淀粉酶是具有WO 09/061380的SEQ ID NO:2的淀粉酶或其与SEQ ID NO:2具有90%序列同一性的变体。SEQ ID NO:2的优选的变体是在以下位置中的一个或多个中具有C末端截短和/或取代、缺失或插入的那些：Q87、Q98、S125、N128、T131、T165、K178、R180、S181、T182、G183、M201、F202、N225、S243、N272、N282、Y305、R309、D319、Q320、Q359、K444和G475。SEQ ID NO:2的更优选的变体是在以下位置的一个或多个中具有取代的那些：Q87E、R、Q98R、S125A、N128C、T131I、T165I、K178L、T182G、M201L、F202Y、N225E、R、N272E、R、S243Q、A、E、D、Y305R、R309A、Q320R、Q359E、K444E以及G475K，和/或在位置R180和/或S181或T182和/或G183处具有缺失的那些。SEQ ID NO:2的最优选的淀粉酶变体是具有以下取代的那些：

[0669] N128C+K178L+T182G+Y305R+G475K；

[0670] N128C+K178L+T182G+F202Y+Y305R+D319T+G475K；

[0671] S125A+N128C+K178L+T182G+Y305R+G475K；或

[0672] S125A+N128C+T131I+T165I+K178L+T182G+Y305R+G475K,其中这些变体是C末端截短的,并且任选地进一步包含在位置243处的取代和/或在位置180和/或位置181处的缺失。

[0673] 另外的合适的淀粉酶是具有W013184577的SEQ ID NO:1的淀粉酶或其与SEQ ID NO:1具有90%序列同一性的变体。SEQ ID NO:1的优选的变体是在以下位置的一个或多个中具有取代、缺失或插入的那些:K176、R178、G179、T180、G181、E187、N192、M199、I203、S241、R458、T459、D460、G476和G477。SEQ ID NO:1的更优选的变体是在以下位置的一个或多个中具有取代的那些:K176L、E187P、N192FYH、M199L、I203YF、S241QADN、R458N、T459S、D460T、G476K、以及G477K,和/或在位置R178和/或S179或T180和/或G181中具有缺失的那些。SEQ ID NO:1的最优选的淀粉酶变体是具有以下取代的那些:

[0674] E187P+I203Y+G476K

[0675] E187P+I203Y+R458N+T459S+D460T+G476K

[0676] 其中变体任选地进一步包含在位置241处的取代和/或在位置178和/或位置179处的缺失。

[0677] 另外的合适的淀粉酶是具有W010104675的SEQ ID NO:1的淀粉酶或其与SEQ ID NO:1具有90%序列同一性的变体。SEQ ID NO:1的优选的变体是在以下位置的一个或多个中具有取代、缺失或插入的那些:N21、D97、V128、K177、R179、S180、I181、G182、M200、L204、E242、G477和G478。SEQ ID NO:1的更优选的变体是在以下位置的一个或多个中具有取代的那些:N21D、D97N、V128I、K177L、M200L、L204YF、E242QA、G477K、以及G478K,和/或在位置R179和/或S180或I181和/或G182中具有缺失的那些。SEQ ID NO:1的最优选的淀粉酶变体是具有以下取代的那些:

[0678] N21D+D97N+V128I,

[0679] 其中变体任选地进一步包含在位置200处的取代和/或在位置180和/或位置181处的缺失。

[0680] 其他合适的淀粉酶是具有W001/66712中的SEQ ID NO:12的 α -淀粉酶或与SEQ ID NO:12具有至少90%序列同一性的变体。优选的淀粉酶变体是在W001/66712中的SEQ ID NO:12的以下位置的一个或多个中具有取代、缺失或插入的那些:R28、R118、N174;R181、G182、D183、G184、G186、W189、N195、M202、Y298、N299、K302、S303、N306、R310、N314;R320、H324、E345、Y396、R400、W439、R444、N445、K446、Q449、R458、N471、N484。特别优选的淀粉酶包括具有D183和G184的缺失并且具有取代R118K、N195F、R320K和R458K的变体,以及另外在一个或多个选自下组的位置中具有取代的变体:M9、G149、G182、G186、M202、T257、Y295、N299、M323、E345和A339,最优选的是另外在所有这些位置中具有取代的变体。

[0681] 其他实例是淀粉酶变体,如在W02011/098531、W02013/001078和W02013/001087中描述的那些。

[0682] 可商购的淀粉酶是DuramylTM、TermamylTM、FungamylTM、StainzymeTM、Stainzyme PlusTM、NatalaseTM、Liquozyme X和BANTM(来自诺维信公司),以及RapidaseTM、PurastarTM/EffectenzTM、Powerase、PreferenzTM S1000、PreferenzTM S100、PreferenzTM S110和PreferenzTM S210(来自杰能科国际有限公司/杜邦公司(Genencor International Inc./DuPont))。

[0683] 过氧化物酶/氧化酶

[0684] 过氧化物酶可以是包括由国际生物化学与分子生物学联合会 (IUBMB) 命名委员会陈述的酶分类 EC 1.11.1.7, 或源自其中的展示出过氧化物酶活性的任何片段。合适的过氧化物酶包括植物、细菌或真菌来源的那些。包括化学修饰的突变体或蛋白质工程化的突变体。有用的过氧化物酶的实例包括来自拟鬼伞属, 例如来自灰盖拟鬼伞 (*C. cinerea*) 的过氧化物酶 (EP 179,486), 及其变体, 如在 WO 93/24618、WO 95/10602 以及 WO 98/15257 中所描述的那些。过氧化物酶还可以包括卤代过氧化物酶, 如氯过氧化物酶、溴过氧化物酶以及表现出氯过氧化物酶或溴过氧化物酶活性的化合物。根据其对卤素离子的特异性将卤代过氧化物酶进行分类。氯过氧化物酶 (E.C.1.11.1.10) 催化从氯离子形成次氯酸盐。卤代过氧化物酶可以是氯过氧化物酶。优选地, 卤代过氧化物酶是钒卤代过氧化物酶, 即含钒酸盐的卤代过氧化物酶。在优选方法中, 将含钒酸盐的卤代过氧化物酶与氯根离子来源组合。已从许多不同真菌, 特别是从暗色丝孢菌 (*dematiaceous hyphomycete*) 真菌组中分离出了卤代过氧化物酶, 例如卡尔黑霉属 (*Caldariomyces*) (例如, 煤卡尔黑霉 (*C. fumago*))、链格孢属、弯孢属 (例如, 疣枝弯孢 (*C. verruculosa*) 和不等弯孢 (*C. inaequalis*))、内脐蠕孢属、细基格孢属以及葡萄孢属。还已从细菌, 例如假单胞菌属 (例如吡咯假单胞菌 (*P. pyrrocinia*)) 和链霉菌属 (例如, 金色链霉菌 (*S. aureofaciens*)) 中分离出了卤代过氧化物酶。卤代过氧化物酶可来源于弯孢属, 特别是疣枝弯孢或不等弯孢, 如描述于 WO 95/27046 中的不等弯孢 CBS 102.42; 或如描述于 WO 97/04102 中的疣枝弯孢 CBS 147.63 或疣枝弯孢 CBS 444.70; 或来源于如描述于 WO 01/79459 中的 *Drechslera hartlebii*、如描述于 WO 01/79458 中的盐沼小树状霉 (*Dendryphiella salina*)、如描述于 WO 01/79461 中的 *Phaeotrichoconis crotalarie*、或如描述于 WO 01/79460 中的 *Geniculosporium* 属物种。

[0685] 氧化酶包括由酶分类 EC 1.10.3.2 所包含的任何漆酶或源自其的展现出漆酶活性的任何片段、或展现出类似活性的化合物, 例如儿茶酚氧化酶 (EC 1.10.3.1)、邻氨基苯酚氧化酶 (EC 1.10.3.4) 或胆红素氧化酶 (EC 1.3.3.5)。优选的漆酶是微生物来源的酶。这些酶可以来源于植物、细菌或真菌 (包括丝状真菌和酵母)。来自真菌的合适实例包括可来源于以下的菌株的漆酶: 曲霉属, 脉孢菌属 (例如, 粗糙脉孢菌), 柄孢壳菌属, 葡萄孢属, 金钱菌属 (*Collybia*), 层孔菌属 (*Fomes*), 香菇属, 侧耳属, 栓菌属 (例如, 长绒毛栓菌和变色栓菌), 丝核菌属 (例如, 立枯丝核菌 (*R. solani*)), 拟鬼伞属 (例如, 灰盖拟鬼伞、毛头拟鬼伞 (*C. comatus*)、弗瑞氏拟鬼伞 (*C. friesii*) 及 *C. plicatilis*), 小脆柄菇属 (*Psathyrella*) (例如, 白黄小脆柄菇 (*P. condelleana*)), 斑褶菇属 (例如, 蝶形斑褶菇 (*P. papilionaceus*)), 毁丝霉属 (例如, 嗜热毁丝霉), *Schytalidium* (例如, *S. thermophilum*), 多孔菌属 (例如, *P. pinsitus*), 射脉菌属 (例如, 射脉侧菌 (*P. radiata*)) (WO 92/01046) 或革盖菌属 (例如, 毛革盖菌 (*C. hirsutus*)) (JP 2238885)。来自细菌的合适的实例包括可来源于芽孢杆菌属的菌株的漆酶。优选的是来源于拟鬼伞属或毁丝霉属的漆酶; 特别是来源于灰盖拟鬼伞的漆酶, 如披露于 WO 97/08325 中; 或来源于嗜热毁丝霉, 如披露于 WO 95/33836 中。

[0686] 微生物

[0687] 该洗涤剂添加剂以及洗涤剂组合物还可以包含一种或多种微生物, 如一种或多种真菌、酵母、或细菌。在实施例 1 中, 一种或多种微生物是脱水 (例如通过冻干) 的细菌或酵母, 例如乳酸杆菌菌株。在另一个实施例中, 微生物是一种或多种微生物孢子/芽孢 (与营养细胞相对), 例如细菌芽孢; 或真菌孢子、分生孢子、菌丝。优选地, 该一种或多种孢子/芽孢是

芽孢杆菌芽孢;甚至更优选地,该一种或多种孢子/芽孢是枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、或巨大芽孢杆菌的芽孢。微生物可以按与酶相同的方式包含在洗涤剂组合物或添加剂中(见上文)。

[0688] 洗涤剂产品的配制

[0689] 例如,本发明的清洁组合物可以被配制为手洗或机洗衣物洗涤剂组合物,包括适用于预处理有污渍的织物的衣物洗涤添加剂组合物,和冲洗添加型织物软化剂组合物,或被配制为用于一般家用硬表面清洁操作的洗涤剂组合物,或被配制以用于手洗或机洗餐具洗涤操作。在具体的方面,本发明提供了包含如本文所述的一种或多种酶的洗涤剂添加剂。本发明的清洁组合物可以处于任何常规形式,例如条,均匀的片剂,具有两层或更多层的片剂,具有一个或多个室的袋,规则的或压缩的粉末,颗粒,膏,凝胶,或规则的、压缩的或浓缩的液体。

[0690] 袋可以被配置为单一室或多室。它可以具有适合用于容持该组合物的任何形式、形状和材料,例如在与水接触之前,不允许该组合物从袋中释放出来。袋由水溶性膜制成,它包含了一个内部体积。可以将所述内部体积分成袋的室。优选的膜是聚合物材料,优选地形成膜或薄片的聚合物。优选的聚合物、共聚物或其衍生物选自聚丙烯酸酯、和水溶性丙烯酸酯共聚物、甲基纤维素、羧甲基纤维素、糊精钠、乙基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、麦芽糊精、聚甲基丙烯酸酯,最优选地是聚乙烯醇共聚物以及羟丙基甲基纤维素(HPMC)。优选地,聚合物在膜例如PVA中的水平是至少约60%。优选的平均分子量将典型地是约20,000至约150,000。膜还可以是共混组合物,这些共混组合物包含可水解降解并且可水溶的聚合物共混物,如聚乳酸和聚乙烯醇(已知在贸易参考号M8630下,如由美国印第安纳州的MonoSol有限责任公司(MonoSol LLC)销售)加增塑剂,像甘油、乙二醇、丙二醇、山梨醇及其混合物。袋可以包含固体洗衣清洁组合物或部分组分和/或液体清洁组合物或由水溶性膜分开的部分组分。可用于液体组分的室在组成上可以与含有固体的室不同:US 2009/0011970 A1。

[0691] 可以由水溶性袋中的或片剂的不同层中的室来将洗涤剂成分彼此物理分开。因此,可以避免组分间的不良的储存相互作用。在洗涤溶液中,每个室的不同溶解曲线还可以引起选择的组分的延迟溶解。

[0692] 非单位剂量的液体或凝胶洗涤剂可以是水性的,典型地含有按重量计至少20%并且最高达95%的水,例如高达约70%的水、高达约65%的水、高达约55%的水、高达约45%的水、高达约35%的水。包括但不限于链烷醇、胺、二醇、醚以及多元醇的其他类型的液体可以被包括在水性液体或凝胶中。水性液体或凝胶洗涤剂可以含有从0-30%的有机溶剂。液体或凝胶洗涤剂可以是非水性的。

[0693] 用途

[0694] 本发明还针对用于使用其组合物的方法。衣物/纺织品/织物(家庭衣物洗涤、工业衣物洗涤)。硬表面清洁(ADW、洗车、工业表面)

[0695] 清洁组合物的用途

[0696] 例如,本发明的洗涤剂组合物可以被配制为手洗或机洗衣物洗涤剂组合物,包括适用于预处理有污渍的织物的衣物洗涤添加剂组合物和冲洗添加型织物软化剂组合物,或被配制为用于一般家用硬表面清洁操作的洗涤剂组合物,或被配制以用于手洗或机洗餐具

洗涤操作。在具体的方面,本发明提供了包含如本文所述的一种或多种酶的洗涤剂添加剂。

[0697] 方法

[0698] 本发明进一步涉及处理织物的方法,该方法包括:

[0699] (a) 使织物与肽聚糖降解酶,优选地具有N-乙酰基胞壁酰基-L-丙氨酸酰胺酶和肽聚糖裂解酶活性的肽聚糖降解酶的水溶液接触;以及任选地

[0700] (b) 冲洗和干燥该纺织品。

[0701] 本发明进一步涉及用于清洁或洗涤物品的方法,该方法包括以下步骤:

[0702] a. 将物品暴露于包含至少一种肽聚糖降解酶,优选地具有N-乙酰基胞壁酰基-L-丙氨酸酰胺酶和/或肽聚糖裂解酶活性的肽聚糖降解酶的洗涤液,或包含此种酶的洗涤剂组合物中;

[0703] b. 完成至少一个洗涤周期;以及任选地

[0704] c. 冲洗该物品,

[0705] 其中该物品是织物。

[0706] 本发明进一步涉及用于清洁或洗涤物品的方法,该方法包括以下步骤:

[0707] a. 将物品暴露于包含多肽的洗涤液或包含多肽的洗涤剂组合物中,优选地,其中该多肽具有N-乙酰基胞壁酰基-L-丙氨酸酰胺酶和/或肽聚糖裂解酶活性;

[0708] b. 完成至少一个洗涤周期;以及任选地

[0709] c. 冲洗该物品,

[0710] 其中该物品是织物。

[0711] 本发明进一步涉及用于清洁或洗涤物品的方法,该方法包括以下步骤:

[0712] a. 将物品暴露于包含多肽的洗涤液或包含多肽的洗涤剂组合物中,优选地,其中该多肽具有N-乙酰基胞壁酰基-L-丙氨酸酰胺酶和/或肽聚糖裂解酶活性,并且其中该多肽包含基序N[IV]X[AG][GAS]A[AY][LV]L (SEQ ID NO:111);

[0713] b. 完成至少一个洗涤周期;以及任选地

[0714] c. 冲洗该物品,

[0715] 其中该物品是织物。

[0716] 本发明进一步涉及用于清洁或洗涤物品的方法,该方法包括以下步骤:

[0717] a. 将物品暴露于包含多肽的洗涤液或包含多肽的洗涤剂组合物中,优选地,其中选自自由以下组成的组:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:84、SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:90、SEQ ID NO:93、SEQ ID NO:96、SEQ ID NO:99、SEQ ID NO:102、SEQ ID NO:105、SEQ ID NO:108以及与其具有至少至少至少60%,例如至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的多肽;

[0718] b. 完成至少一个洗涤周期;以及任选地

[0719] c. 冲洗该物品,

[0720] 其中该物品是织物。

[0721] 该液体溶液的pH在1至11的范围内,如在5.5至11的范围内,如在7至9的范围内、在7至8的范围内或在7至8.5的范围内。

[0722] 该洗涤液可以具有在5℃至95℃范围内、或在10℃至80℃范围内、在10℃至70℃范围内、在10℃至60℃范围内、在10℃至50℃范围内、在15℃至40℃范围内或在20℃至30℃范围内的温度。在一方面,该洗涤液的温度是30℃。

[0723] 该洗涤液中肽聚糖降解酶的浓度典型地在以下范围内:至少0.00001ppm至至少10ppm、至少0.00002ppm至至少10ppm、至少0.0001ppm至至少10ppm、至少0.0002ppm至至少10ppm、至少0.001ppm至至少10ppm、至少0.002ppm至至少10ppm、至少0.01ppm至至少10ppm、至少0.02ppm至至少10ppm、至少0.1ppm至至少10ppm、至少0.2ppm至至少10ppm、至少0.5ppm至至少5ppm。

[0724] 通过以下实例进一步描述本发明,这些实例不应当理解为对本发明的范围进行限制。

[0725] 实例

[0726] 培养基和溶液

[0727] 模式洗涤剂A:12wt%LAS、1.1wt%AE0 Biosoft N25-7 (N1)、7wt%AEOS (SLES)、6wt%MPG、3wt%乙醇、3wt%TEA (三乙醇胺)、2.75wt%可可皂、2.75wt%大豆皂、2wt%甘油、2wt%氢氧化钠、2wt%柠檬酸钠、1wt%甲酸钠、0.2wt%DTMPA、0.2wt%PCA。

[0728] 模式洗涤剂O:4wt%十二烷基苯磺酸钠 (LAS)、8wt%月桂基醚硫酸钠 (SLES/AEOS)、1wt%皂 (大豆脂肪酸)、4wt%醇乙氧基化物 (AE0)、0.4wt%三乙醇胺 (TEA)、2wt%柠檬酸钠、0.02wt%氯化钙二水合物。

[0729] 对于实例4,通过将3.33g/l洗涤剂溶解在硬度为15°dH的水中来制备模式洗涤剂A的洗涤液。

[0730] 对于实例5,分别将2.67g/l模式O和0.44g/l模式A溶解在自来水中。

[0731] 测定

[0732] 肽聚糖降解活性测量

[0733] 使用制造商推荐的Invitrogen™ EnzChek™溶菌酶测定试剂盒 (赛默飞世尔公司 (ThermoFisher), E22013) 来评估肽聚糖降解活性。将随试剂盒提供的DQ™底物溶解在miliQ-H₂O中,得到1.0mg/ml底物储备溶液。通过将50μl储备底物溶液与随试剂盒提供的950μl 1x反应缓冲液混合将此溶液进一步稀释至50μg/ml。将浓缩的酶溶液在1x反应缓冲液中稀释至2μg/ml。将50μl的50μg/ml底物溶液与50μl 1x反应缓冲液或50μl 2μg/ml酶溶液混合,使反应物中的最终酶浓度为1μg/ml。将样品在37℃下孵育,并使用POLARstar Omega板读取器分光光度计 (BMG LABTECH) 在485nm的激发波长、520nm的发射波长和1500的增益下测量荧光产生。

[0734] 绘制荧光单位相对于时间的曲线,并估计初始斜率。结果如下表所给。

[0735] 观察到该酶具有明显的肽聚糖降解酶活性。

[0736]

酶	初始斜率 (荧光单位/分钟)
没有酶	-189.64
SEQ ID NO:6	13228

[0737] 实例1:多肽的克隆和表达:菌株和DNA

[0738] 从不同国家收集的土壤样品中分离的细菌菌株和环境细菌群落中分离出编码SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:85、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:94、SEQ ID NO:97、SEQ ID NO:100、SEQ ID NO:103和SEQ ID NO:106的基因的DNA(见表1)。将来自不同菌株和细菌群落的染色体DNA使用Illumina技术进行全基因组测序。分析了含有如PFAM(PF01510,Pfam版本31.0Finn(2016).Nucleic Acids Research[核酸研究],Database Issue[数据库卷]44:D279-D285)中定义的酰胺酶_2结构域的蛋白质序列的基因组序列。

[0739] 表1:

[0740]

酶	供体	来源国
SEQ ID NO:	脂环酸芽孢杆菌属物种	丹麦
3	都浓哈马达氏菌	日本
6	海栖小单胞菌	美国
9	类芽孢杆菌属物种	美国
12	野野村菌属物种	英国
15	抗生素溶杆菌	中国
18	小单胞菌属物种	英国
21	科克斯野野村菌	菲律宾, 1990 年
24	绛红色小单胞菌	未知菌株, 1970 年分离
27	脂环酸芽孢杆菌属物种	丹麦
30	盐单胞菌属物种	美国
33	烂泥假单胞菌	美国
36	盐单胞菌属物种	美国
39	类产碱假单胞菌	美国
42	膨胀芽孢杆菌属物种	美国
45	迪氏野野村菌	英国
48	糖莱斯菌	丹麦

[0741]	51	产色嗜热葡萄孢菌	未知, 采样日期 1990 年 8 月 22 日
	54	明帆韩国生工菌	中国
	57	灰色链霉菌	美国
	60	阿普利亚小单孢菌	英国
	63	芽孢杆菌属物种	日本
	66	耐热芽孢杆菌	丹麦
	69	松树土类芽孢杆菌	瑞典
	72	科氏芽孢杆菌	美国
	75	韩国生工菌属物种	英国
	78	芽孢杆菌属物种	美国
	81	芽孢杆菌属物种	美国
	84	芽孢杆菌属物种	美国
	87	链霉菌属物种	中国
	90	芽孢杆菌属物种	美国
	93	芽孢杆菌属物种	美国
	96	广州野野村菌	英国
	99	广州野野村菌	英国
	102	科氏芽孢杆菌	丹麦
	105	盐单胞菌属物种	美国
	108	辣椒溶杆菌	美国

[0742] 实例2:本发明多肽的克隆和表达

[0743] 使用含有突出端克隆载体的特异性引物,通过标准PCR技术从相应细菌菌株的基因组DNA扩增编码肽聚糖降解酶基因SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:85、SEQ ID NO:88、SEQ ID NO:91、SEQ ID NO:94、SEQ ID NO:97、SEQ ID NO:100、SEQ ID NO:103和SEQ ID NO:106的成熟肽的DNA。如WO 2012/025577中所述,将扩增的PCR片段插入到芽孢杆菌表达载体中。简言之,将编码基因的成熟肽的DNA框内克隆到克劳氏芽孢杆菌分泌信号(BcSP;具有以下氨基酸序列:MKKPLGKIVASTALLISVAFSSSIASA (SEQ ID NO:109))中。BcSP替代了该基因中的天然分泌信号。在BcSP序列的下游,引入亲和标签序列以便于纯化过程(His标签;具有以下氨基酸序列:HHHHHHP (SEQ ID NO:110))因此,被表达的基因包括BcSP序列,其后是His标签序列,随后是成熟的野生型基因序列。将最终表达质粒(BcSP-His标签-PGL基因)转化到枯草芽孢杆菌表达宿主中。在转化时将BcSP-融合基因通过同源重组整合至枯草芽孢杆菌宿主细胞基因组中。在三联启动子系统的控制下表达该基因构建体(如描述于WO 99/43835中)。将编码氯霉素乙酰转移酶的基因用作标记物(如描述于Diderichsen等人,1993,Plasmid[质粒]30:312-315中)。在每ml补充有6毫克氯霉素的LB培养基琼脂上选择转化体。选择一个含有PGL表达构建体的重组枯草芽孢杆菌克隆,并且在旋转摇床上在500ml带挡板的锥形瓶中进行培养,每个锥形瓶含有100ml基

于酵母提取物的培养基。在30℃至37℃的3-5天的培养时间后,通过离心收获含有酶的上清液并通过His标签纯化对这些酶进行纯化。

[0744] 实例3:His标签纯化方法

[0745] 在5mL HisTrap Excel柱(通用电气医疗集团生命科学部(GE Healthcare Life Sciences))上,使用Ni²⁺作为金属离子,通过固定化金属层析(IMAC)纯化带有His标签的酶。该纯化发生在pH 7下,并用咪唑对结合蛋白进行洗脱。通过SDS-PAGE检查纯化的酶的纯度,并且在50mM HEPES、100mM NaCl pH 7.0中缓冲液交换后通过280nm的吸光度确定酶的浓度

[0746] 实例4:藤黄微球菌的接种

[0747] 将藤黄微球菌从-80℃冷冻储备物中取出,并在TSA板上生长3天。每10ml TSB玻璃管用其中的一个菌落接种,涡旋混合并在30℃下在200rpm振荡下孵育过夜。然后将细菌转移到50ml Falcon管中,在Sorvall离心机中在3000rpm 20℃下5min。去除上清液,并再悬浮在每管10ml PBS中。将细胞洗涤两次,添加到50ml管中并混合。制备培养物的溶液,如在CLARIOstar®读取器中所测量,OD600为0.5。制备100mL,并在整个测试中保持在持续搅拌下。

[0748] 通过将0.167g模式A洗涤剂与50mL自来水在100mL BlueCap瓶中混合,在使用前搅拌2-5min来制备含有3.33g/L模式A洗涤剂的洗涤剂溶液。将此溶液用于装置中未添加细菌的第一行和最后一行(见下文)。通过制备含有藤黄微球菌(OD600为0.5)和0.33g模式A洗涤剂的自来水溶液,搅拌2-5min来制备含有细菌的洗涤剂溶液。将其用作48孔板中孔的混合物(赛默科技公司(Thermo Scientific),Nunc A/S,未处理,PS,无菌,目录号150787)。产生具有空白和酶的装置,以便随机化板中重复样的位置,以解释系统模制变化。一个实例可如下所示:

	1 未添加细菌	2 添加细菌	3 添加 细菌	4 添加细 菌	5 添加细 菌	6 添加细 菌	7 添加细菌	8 未添加细 菌
[0749] A	对照, 无酶	空白, 无酶	Enz1	Enz3	Enz2	Enz4	参考酶	对照, 无酶
B	对照, 无酶	空白, 无酶	Enz1	Enz3	Enz2	Enz4	参考酶	对照, 无酶
C	对照, 无酶	空白, 无酶	Enz1	Enz3	Enz2	Enz4	参考酶	对照, 无酶
D	对照, 无酶	参考酶	Enz2	Enz4	Enz1	Enz3	空白, 无酶	对照, 无酶
E	对照, 无酶	参考酶	Enz2	Enz4	Enz1	Enz3	空白, 无酶	对照, 无酶
F	对照, 无酶	参考酶	Enz2	Enz4	Enz1	Enz3	空白, 无酶	对照, 无酶

[0750] 通过向每个孔中添加0.5mL藤黄微球菌测试溶液,将洗涤剂混合物+/-细菌添加到孔中。根据装置添加10μl具有制备的浓度的酶溶液。使板在30℃下孵育1.5h。孵育后,通过将板在拉链袋中倒置在纸巾上从板去除溶液。将板翻转并叩击两次,然后用0.75mL 0.9% NaCl溶液冲洗。通过将板在拉链袋中倒置在纸巾上从板去除溶液。将板翻转并叩击两次,并重复冲洗和冲刷步骤。将0.5mL结晶紫0.095%添加到每个孔中。使其在台面上孵育15min,然后通过如下操作从板去除上清液:将板在拉链袋中倒置在纸巾上,并将板叩击两次以确保充分去除,重复直到未结合的染料溶液滴去除,然后用1mL0.9%NaCl轻轻冲洗。如前所述去除冲洗溶液并叩击。将孔中的有色物用0.5mL 96%乙醇溶解,用手快速振荡,直至液体透明。在CLARIOstar®读取器中测量吸光度595,并且如果其高于3,则在新孔中稀释样品。

[0751] 如下测量的结果提供于下表2中:

- [0752] 来自A₅₉₀的Y%附接抑制=(1-(A_{590对照}/A_{590enzx}))*100%。
- [0753] A₅₉₀对照=藤黄微球菌的洗涤剂溶液中的A₅₉₀附接；
- [0754] A₅₉₀enzx=洗涤剂+酶中的A₅₉₀附接。
- [0755] 表2:藤黄微球菌的附接抑制

[0756]

酶	模式 A pH 7.0 Y%附接抑制	模式 A pH 7.8 Y%附接抑制	1x PBS pH 6.0 Y%附接抑制
第 1 天			
SEQ ID NO: 6 (1 ppm)	46.9	43	30.5
SEQ ID NO: 30 (10 ppm)	-	-3.5	39.9

[0757]

酶	模式 A pH 7.0 Y%附接抑制	模式 A pH 7.8 Y%附接抑制	1x PBS pH 6.0 Y%附接抑制
第 4 天			
SEQ ID NO: 6 (1 ppm)	41.8	45.6	22.4
SEQ ID NO: 12 (1 ppm)	40.9	17.5	-
SEQ ID NO: 12 (10 ppm)	40.8	33.9	72.9
第 14 天			
SEQ ID NO: 6 (1 ppm)	-	52.4	43.2
SEQ ID NO: 15 (0.01 ppm)	-	23.5	-
SEQ ID NO: 15 (0.1 ppm)	-	51.5	-
SEQ ID NO: 15 (0.5 ppm)	-	60.1	-
SEQ ID NO: 15 (1 ppm)	-	65.2	-
SEQ ID NO: 15 (2 ppm)	-	59.1	-
SEQ ID NO: 15 (5 ppm)	-	62.6	17.5
第 22 天			
SEQ ID NO: 6 (1 ppm)	-	50.7	-
SEQ ID NO: 21 (1 ppm)	-	5.4	-
SEQ ID NO: 21 (10 ppm)	-	34.8	-
第 23 天			
SEQ ID NO: 6 (1 ppm)	-	57.1	-
SEQ ID NO: 99 (1 ppm)	-	42.7	-
SEQ ID NO: 99 (10 ppm)	-	47.5	-
第 25 天			
SEQ ID NO: 6 (1 ppm)	-	73.9	-
SEQ ID NO: 18 (1 ppm)	-	67.1	-
SEQ ID NO: 18 (10 ppm)	-	88.2	-
第 28 天			
SEQ ID NO: 6 (1 ppm)	-	32.5	-
SEQ ID NO: 108 (1 ppm)	-	13.3	-
SEQ ID NO: 108 (2.5 ppm)	-	17.1	-
SEQ ID NO: 108 (5 ppm)	-	21.2	-
SEQ ID NO: 108 (10 ppm)	-	24.6	-
第 29 天			
SEQ ID NO: 6 (1 ppm)	-	31.8	-
SEQ ID NO: 9 (1 ppm)	-	17.8	-
SEQ ID NO: 9 (10 ppm)	-	52	-
第 30 天			
SEQ ID NO: 6 (1 ppm)	-	34.5	-
SEQ ID NO: 27 (1 ppm)	-	1.3	-
SEQ ID NO: 27 (10 ppm)	-	4.2	-
SEQ ID NO: 45 (1 ppm)	-	20.1	-
SEQ ID NO: 45 (10 ppm)	-	27.3	-
第 31 天			

[0758]

酶	模式 A pH 7.0 Y%附接抑制	模式 A pH 7.8 Y%附接抑制	1x PBS pH 6.0 Y%附接抑制
SEQ ID NO: 6 (1 ppm)	-	30.7	-
SEQ ID NO: 48 (10 ppm)	-	12	-
SEQ ID NO: 69 (10 ppm)	-	3.2	-
第 32 天			
SEQ ID NO: 6 (1 ppm)	-	34.4	-
SEQ ID NO: 87 (1 ppm)	-	4.1	-
SEQ ID NO: 87 (10 ppm)	-	10	-

[0759] 由于例如实验室温度和湿度的波动以及日常细胞活力的略微变化,测试结果具有特定的日常变化,因此应比较同一天的附接抑制结果。我们关于测定和酶的经历显示,当酶在另一天重复时,附接和抑制模式的日常波动通常在酶之间产生相同的性能模式。一些酶在pH 6.0和7.0下更好地起作用,而其他酶在pH 7.8下最佳地起作用,这已经对所选酶进行了测试。将SEQ ID NO:6用作参考酶来作为测定的对照并测量日常变化。

[0760] 结论:在此实验中,SEQ ID NO:6显示在pH 6、pH 7和pH 7.8下对藤黄微球菌附接具有强的抑制作用。10ppm SEQ ID NO:30显示在pH 6下对藤黄微球菌具有的抑制作用等同于1ppm浓度的SEQ ID NO:6的作用,但在pH 7.8下没有性能。与对照酶SEQ ID NO:6相比,SEQ ID NO:12在pH 7下显示良好的性能。SEQ ID NO:12在pH 7.8下的性能不太突出,但仍然存在显著作用。可以在pH 7.8下给与非常低(0.01ppm)的SEQ ID NO:15,并仍提供强的抗附接益处。在pH 7.8下,0.5ppm和1.0ppm的SEQ ID NO:15的抑制作用趋向于高于SEQ ID NO:6。在pH 6下,5ppm的SEQ ID NO:15的性能似乎低于1ppm的SEQ ID NO:6。SEQ ID No:21、99、108、9、27、45、48、69和87也显示抑制附接益处。SEQ ID NO:18在pH 7.8下在使用1ppm的情况下对藤黄微球菌具有非常高的抗附接性能,并且该性能在使用10ppm时增加。

[0761] 实例5:从藤黄微球菌制备粗细胞壁提取物以及OD降低活性测定

[0762] 细胞壁提取物的制备

[0763] 按照Mukamolova等人,Molecular Microbiology[分子微生物学](2006) 59(1), 84-98描述的方案制备来自藤黄微球菌的细胞壁提取物。简而言之,将在1L LB培养基中生长过夜的藤黄微球菌细胞在10,000g下离心30分钟,用去离子水洗涤,再悬浮于200ml 5%(w/v) SDS中并煮沸20分钟。离心后,将颗粒再悬浮于100ml 4%(w/v) SDS中,并再次煮沸20min。然后用100ml热(65℃)水彻底洗涤颗粒,以去除SDS。最后,用10ml丙酮洗涤,空气干燥过夜,称重并储存在-20℃下。

[0764] 使用来自藤黄微球菌的粗细胞壁提取物进行的OD降低测定

[0765] 将如上述制备的0.6g藤黄微球菌细胞壁提取物再悬浮在15ml去离子水(储备溶液40mg/ml)中,并通过注射器针头以破坏大片状物。将此储备溶液储存在4℃下。

[0766] 从储备溶液在50mM MES(2-(N-吗啉基)乙烷磺酸)pH 6缓冲液和两种模式洗涤剂,即模式O和A(分别为含2.67g/L模式O和0.44g/L模式A的自来水)中制备0.75mg/ml的细胞壁提取物工作溶液。每次在进行OD降低测定时新鲜制备这些工作溶液。

[0767] 接着,将150μL粗细胞壁提取物工作溶液等分试样分配在96孔微量滴定板(赛默科技公司(Thermo Scientific),Nuncclon Delta表面,目录号167008)的孔中,并与50μL在50mM HEPES 100mM NaCl pH7缓冲液中含有80ppm经纯化酶(3、6、9、12、15、18、21、24、27、

30、33、36、39、42、45、48、51、54、57、60、63、66、69、72、75、78、81、84、87、90、93、96、99、102、105或108)的溶液或HEPES缓冲液(作为对照)混合,并在30℃下在600rpm下振荡下在Eppendorf ThermoMixer C中孵育。在600nm下在SpectraMax M3仪器中测量时间=0时和与酶一起过夜孵育后样品的吸光度。一式两份地测试酶。下表3中列出了OD降低测量的平均值(通过过夜孵育后获得的OD减去时间0时的OD计算)。

[0768] 表3:OD降低值(过夜孵育后的OD减去时间0时的OD)

SEQ ID NO:	MES + HEPES	模式 A	模式 O
3	0.27	0.03	0.00
6	0.42	0.13	0.21
9	0.20	0.03	0.00
12	0.35	0.20	0.46
15	0.65	0.79	0.54
18	0.71	0.90	0.82
21	0.10	0.02	0.00
24	0.12	0.00	0.00
27	0.08	0.03	0.00
30	0.15	0.49	0.50
33	0.36	0.15	0.32
36	0.12	0.00	0.00

[0769]

SEQ ID NO:	MES + HEPES	模式 A	模式 O
39	0.36	0.25	0.36
42	0.21	0.02	0.00
45	0.30	0.03	0.00
48	0.10	0.03	0.00
51	0.23	0.00	0.00
54	0.03	0.17	0.23
57	0.23	0.33	0.58
60	0.11	0.23	0.30
63	0.18	0.15	0.30
66	0.47	0.16	0.40
69	0.46	0.16	0.23
72	0.45	0.17	0.29
75	0.53	0.20	0.55
78	0.29	0.19	0.32
81	0.64	0.16	0.27
84	0.60	0.15	0.35
87	0.35	0.17	0.30
90	0.18	0.16	0.23
93	0.78	0.19	0.10
96	0.36	0.15	0.14
99	0.27	0.72	0.66
102	0.25	0.16	0.21
105	0.10	0.15	0.25
108	0.60	0.03	0.16

[0770]

[0771] 表3中的结果显示,使OD降低的酶可以水解溶液中存在的细胞壁提取物。

[0772] 实例6:PGL结构域、进化枝和系统发生树的构建

[0773] 本发明的多肽具有水解酶活性,并且包含酰胺酶_2结构域以及簇,如进化枝。从含

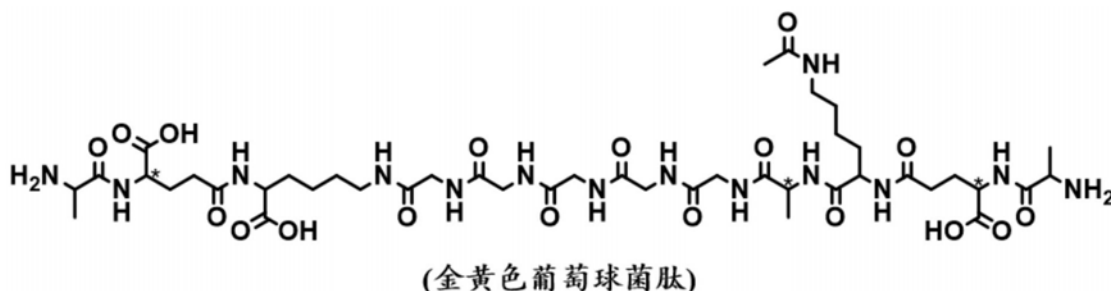
有如PFAM (PF01510, Pfam版本31.0Finn (2016). Nucleic Acids Research [核酸研究], Database Issue [数据库卷] 44:D279-D285) 中定义的酰胺酶_2结构域的多肽序列构建系统发生树。系统发生树通过多重比对包含至少一个酰胺酶_2结构域的成熟多肽序列构建。使用MUSCLE算法版本3.8.31 (Edgar, 2004. Nucleic Acids Research [核酸研究] 32 (5): 1792-1797) 比对序列, 使用FastTree版本2.1.8 (Price等人, 2010, PloS one [美国科学公共图书馆] 5 (3)) 构建树, 并使用iTOL (Letunic和Bork, 2007. Bioinformatics [生物信息学] 23 (1): 127-128) 可视化。

[0774] 对系统发生树的分析显示含有酰胺酶_2结构域的多肽可以分离成不同的子簇。子簇由一个或多个短序列基序定义, 以及通过含有如PFAM (PF01510, Pfam版本31.0) 中所定义的酰胺酶_2结构域定义。我们将包含基序N[IV]X[AG][GAS]A[AY][LV]L (SEQ ID NO:111) 的一个子簇表示为PGL进化枝, 该基序位于对应于海栖小单孢菌 (SEQ ID NO:6) 中的位置324至328的位置中。含有酰胺酶_2结构域以及基序的所有多肽序列将被表示为属于PGL进化枝。进化枝中包括的多肽是SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:96、SEQ ID NO:99和SEQ ID NO:108。

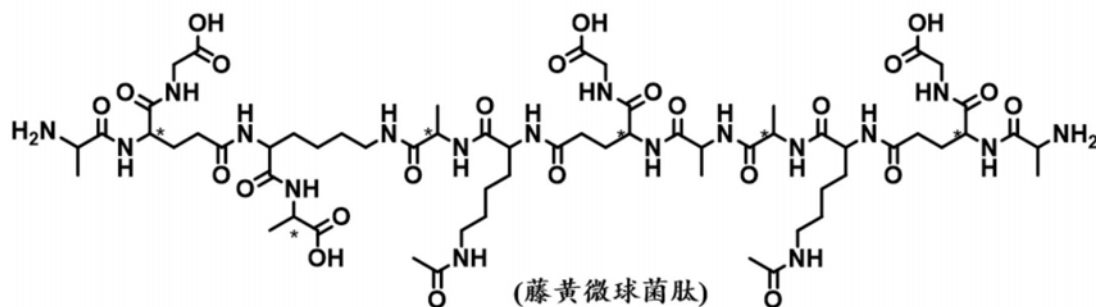
[0775] 实例7:N-乙酰基胞壁酰基-L-丙氨酸酰胺酶测定

[0776] 底物合成

[0777] 从市售甲基2-乙酰胺基-4,6-O-苯亚甲基-2-脱氧- α -D-吡喃葡萄糖苷和适当的肽序列以三个步骤进行肽聚糖片段(1)和(2)的有机合成。使用的两种肽(在本文中称为金黄色葡萄球菌(S. aureus)肽和藤黄微球菌肽; 见下文)均由TAG哥本哈根公司 (TAG Copenhagen A/S) 合成和提供。在以下结构式中, 星号(*)表示D-立体化学。

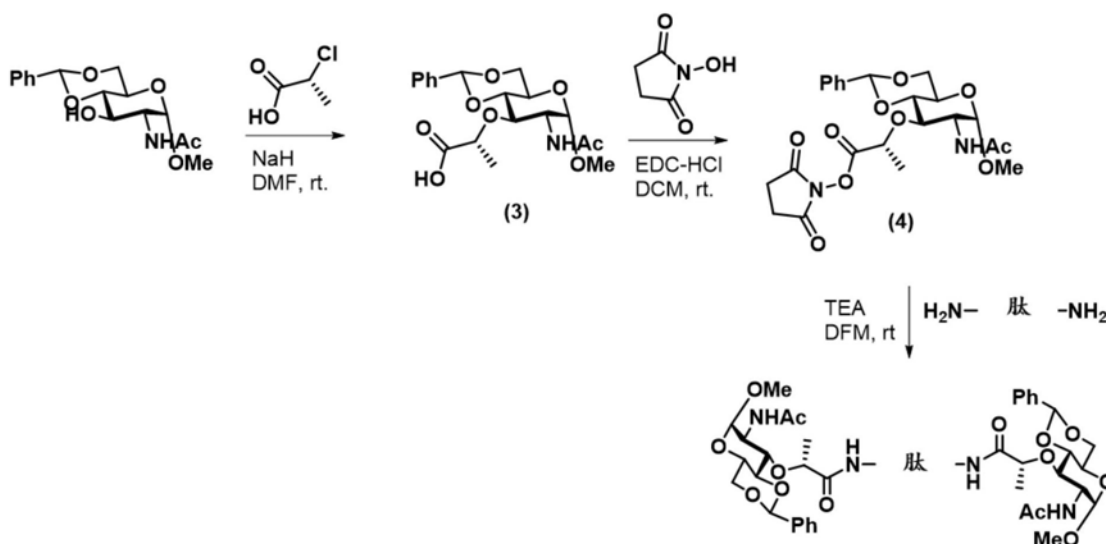


[0778]



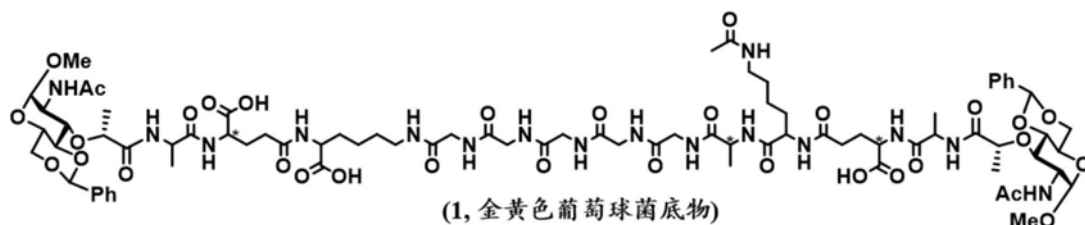
[0779] 参考以下示意性概述, 通过使用来自D. Hesse等人, J. Org. Chem. [有机化学杂志] 2004, 69, 778-784的方案使甲基2-乙酰胺基-4,6-O-苯亚甲基-2-脱氧- α -D-吡喃葡萄糖苷

与(S)-2-氯丙酸初次偶联来进行用胞壁酸衍生物修饰的肽的合成,得到化合物(3)。然后通过如下步骤合成相应的胞壁酸NHS-酯衍生物(4):在室温(rt)下用N-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳化二亚胺盐酸盐(EDC-HCl, 1.5eq.)和N-羟基丁二酰亚胺(1.15eq.)在无水二氯甲烷(DCM, 2mL)中的溶液处理200mg (3) 4小时,随后将溶液用DCM(10mL)稀释,用2.5% NaHSO₄和盐水洗涤,经无水NaSO₄干燥,过滤并在真空中浓缩。在室温下,在三乙胺(TEA, 3.5当量)存在下,在无水二甲基甲酰胺(DMF, 300μL)中,将2.1当量所要产物(4)不经进一步纯化即用于与肽(20mg)通过过夜反应偶联。将所要产物(金黄色葡萄球菌底物1或藤黄微球菌底物2)不经进一步纯化即用于酰胺酶评定。

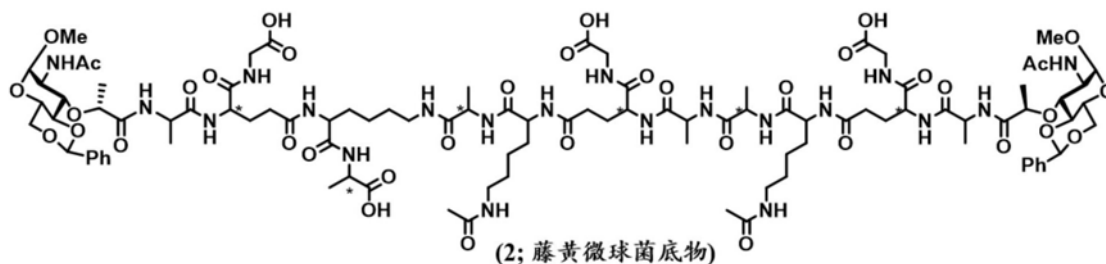


[0780]

[0781] 得到以下经修饰肽,金黄色葡萄球菌底物1或藤黄微球菌底物2:

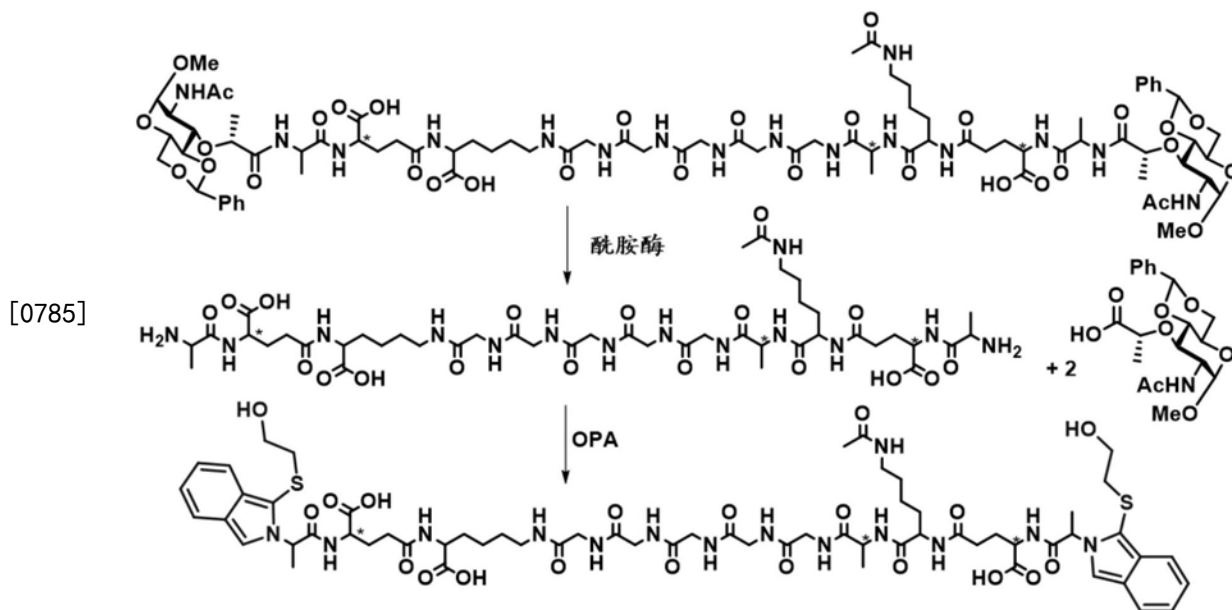


[0782]



[0783] 酰胺酶测定

[0784] 如下所说明,酰胺酶在肽与胞壁酸(MurNAc)基序之间切割,释放一个或两个新的N末端:



[0786] 当暴露于标准邻苯二甲醛 (OPA) 测定条件时,新形成的肽胺 (N末端) 反应产生荧光读数 (激发=340nm,发射=455nm)。通过如下步骤制备OPA溶液:将800mg邻苯二甲醛溶解在10mL 95%EtOH中,随后添加含有2mL 2-巯基乙醇的1L 0.5M硼酸盐缓冲液 (pH 9.0)。

[0787] 通过在37℃下在50mM MES缓冲液 (pH 6.0,100mM NaCl) 中孵育并振荡酰胺酶 (最终浓度20μg/mL) 以及MurNAc-肽-MurNAc底物 (底物1或2,最终浓度5mM) 过夜来进行酰胺酶反应,随后通过OPA测定和MALDI-TOF分析反应产物。

[0788] 通过将100μL OPA溶液添加到10μL反应样品中来进行酰胺酶评定 (OPA测定)。将混合物转移至96孔板中并在孵育5min后在分光光度计中监测 (激发=340nm,发射=455nm)。包括未修饰的金黄色葡萄球菌和藤黄微球菌肽 (即,具有上文所示的氨基末端) 作为对照。

[0789] 结果

[0790] 下表4显示了对于单独的和用SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:33的酰胺酶处理后的金黄色葡萄球菌和藤黄微球菌肽 (具有氨基末端) 和底物 (具有MurNAc末端) 以及对于单独的酰胺酶 (阴性对照) 测量的荧光。

[0791] 可以看出,MurNAc-肽-MurNAc底物 (金黄色葡萄球菌底物和藤黄微球菌底物) 直至用SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:33的酰胺酶处理为止产生最小的OPA反应,其中荧光反应显著增加。正如所预期,酰胺酶似乎对未修饰的肽 (金黄色葡萄球菌肽和藤黄微球菌肽) 没有活性。

[0792] 用SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:33的酰胺酶处理金黄色葡萄球菌和藤黄微球菌底物之前和之后的MALDI-TOF MS分析 (数据未显示) 证实OPA反应是在肽与MurNAc基序之间进行酶促切割以释放MurNAc基序,从而产生游离肽N末端的结果。

[0793] 表4

[0794]	肽/底物+酶	荧光 (RFU; 340、455 nm)
	SEQ ID NO: 6	29
	SEQ ID NO: 33	27
	金黄色葡萄球菌肽	8420
	金黄色葡萄球菌肽+ SEQ ID NO: 6	8240
	金黄色葡萄球菌肽+ SEQ ID NO: 33	8547
	金黄色葡萄球菌底物	515
	金黄色葡萄球菌底物+ SEQ ID NO: 6	7077
	金黄色葡萄球菌底物+ SEQ ID NO: 33	5704
	藤黄微球菌肽	3447
	藤黄微球菌肽+ SEQ ID NO: 6	3340
	藤黄微球菌肽+ SEQ ID NO: 33	3298
	藤黄微球菌底物	381
	藤黄微球菌底物+ SEQ ID NO: 6	3166
	藤黄微球菌底物+ SEQ ID NO: 33	1853

[0795] 实例8:N-乙酰基胞壁酰基-L-丙氨酸酰胺酶测定,额外的酰胺酶测试

[0796] 如实例7中所述,针对金黄色葡萄球菌底物(底物1)测试了与SEQ ID NO:6的酰胺酶在同一家族内的若干其他酶。此表明SEQ ID NO:3、45、24和12的酰胺酶对金黄色葡萄球菌底物具有相当活性;参见下表5中的结果,其中包括个别酶(在没有肽或底物的情况下)作为阴性对照。

[0797] 表5

[0798]	肽/底物+酶	荧光 (RFU; 340、455 nm)
	金黄色葡萄球菌肽	8458
	金黄色葡萄球菌底物	735
	SEQ ID NO: 3	33
	SEQ ID NO: 6	21
[0799]	SEQ ID NO: 12	54
	SEQ ID NO: 24	108
	SEQ ID NO: 45	44
	金黄色葡萄球菌底物+ SEQ ID NO: 3	6810
	金黄色葡萄球菌底物+ SEQ ID NO: 6	7584
	金黄色葡萄球菌底物+ SEQ ID NO: 24	6903
	金黄色葡萄球菌底物+ SEQ ID NO: 12	6602
	金黄色葡萄球菌底物+ SEQ ID NO: 45	6851

[0800] 在类似的实验中测试SEQ ID NO:105的酶,并对金黄色葡萄球菌底物具有相当活性;参见表6。

[0801] 表6

[0802]

肽/底物+酶	荧光 (RFU; 340、455 nm)
SEQ ID NO: 105	37
金黄色葡萄球菌底物	756
金黄色葡萄球菌底物+ SEQ ID NO: 105	6328