

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

C12N 9/54

C11D 3/386

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00810741.6

[43]公开日 2002年10月9日

[11]公开号 CN 1373802A

[22]申请日 2000.7.11 [21]申请号 00810741.6

[30]优先权

[32]1999.7.22 [33]US [31]60/144,991

[86]国际申请 PCT/US00/18852 2000.7.11

[87]国际公布 WO01/07575 英 2001.2.1

[85]进入国家阶段日期 2002.1.22

[71]申请人 宝洁公司

地址 美国俄亥俄

[72]发明人 D·N·鲁宾夫

E·E·希克斯基

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事
务所

代理人 李 瑛

权利要求书4页 说明书27页 附图页数0页

[54]发明名称 在特定表位区域具有氨基酸缺失和取代的枯草杆菌蛋白酶变体

[57]摘要

本发明涉及枯草杆菌蛋白酶样蛋白酶的变体,该变体相对其相应的野生型蛋白酶具有降低的免疫原性。本发明还涉及这样一种变体,该变体在一个或多个表位区域还具有一个或多个氨基酸取代或还具有一个或多个稳定化取代。本发明还涉及编码这种变体的突变基因和含有这种变体的清洁和个人护理组合物。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

权 利 要 求 书

1. 一种枯草杆菌蛋白酶样蛋白酶变体，其特征在于所述变体具有野生型氨基酸序列经修饰后的氨基酸序列，该野生型序列包含一个第一表位区域和一个第二表位区域，其中所述的修饰后的氨基酸序列包括一个或多个表位区域中的一个或多个位点的缺失，其中：

(a) 当第一表位区域中发生缺失时，缺失位于对应于枯草杆菌蛋白酶BPN'的位点104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 112, 113, 114, 116, 117, 118, 119, 123, 和125中的一个或多个位点上；和

(b) 当第二表位区域中发生缺失时，缺失位于对应于枯草杆菌蛋白酶BPN'的位点220, 221, 222, 223, 224, 225, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 239, 240, 242, 243, 244, 245和246中的一个或多个位点上。

2. 一种枯草杆菌蛋白酶样蛋白酶变体，其特征在于所述变体具有野生型氨基酸序列经修饰后的氨基酸序列，该野生型序列包含一个第一表位区域和一个第二表位区域，其中所述的修饰后的氨基酸序列包括一个或多个表位区域中的两个或多个位点的缺失，其中：

(a) 当第一表位区域中发生缺失时，缺失位于对应于枯草杆菌蛋白酶BPN'的位点103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125和126中的一个或多个位点上；和

(b) 当第二表位区域中发生缺失时，缺失位于对应于枯草杆菌蛋白酶BPN'的位点220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245和246中的一个或多个位点上。

3. 根据上述权利要求中的任一权利要求所述的变体，其中所述变体还包括对应于枯草杆菌蛋白酶BPN'的位点103, 104, 105, 106, 107,

108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 126, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245和246中的一个或多个位点上的取代。

4. 一种枯草杆菌蛋白酶样蛋白酶变体，其特征在于所述变体具有野生型氨基酸序列经修饰后的氨基酸序列，该野生型序列包含一个第一表位区域、一个第二表位区域以及一个第三表位区域，其中所述的修饰后的氨基酸序列包含两个或多个表位区域中的一个或多个位点的缺失，其中：

(a) 当第一表位区域中发生缺失时，缺失位于对应于枯草杆菌蛋白酶BPN'的位点103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125和126中的一个或多个位点上；

(b) 当第二表位区域中发生缺失时，缺失位于对应于枯草杆菌蛋白酶BPN'的位点220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245和246中的一个或多个位点上；和

(c) 当第三表位区域中发生缺失时，缺失位于对应于枯草杆菌蛋白酶BPN'的位点70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83和84中的一个或多个位点上。

5. 根据权利要求4所述的变体，其中丝氨酸蛋白酶选自枯草杆菌蛋白酶BPN'，枯草杆菌蛋白酶Carlsberg，枯草杆菌蛋白酶DY，枯草杆菌蛋白酶309，蛋白酶K和铝热酶并且其中所述变体还包含一种或多种稳定突变。

6. 根据权利要求5所述的变体，其中当第三表位区域中发生缺失时，缺失位于对应于枯草杆菌蛋白酶BPN'的位点70, 73, 74, 75, 76, 77,

78, 79, 80, 81和82中的一个或多个位点上。

7. 根据权利要求4所述的变体, 其中所述变体还包括对应于枯草杆菌蛋白酶BPN'的位点70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 126, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245和246中的一个或多个位点上的取代。

8. 一种清洁组合物, 该组合物含有如权利要求1所述变体和一种清洁组合物载体。

9. 一种个人护理组合物, 其特征在于所述组合物含有一种个人护理用载体和一种丝氨酸蛋白酶变体, 该变体具有野生型氨基酸序列经修饰后的氨基酸序列, 该野生型序列包含一个第一表位区域、一个第二表位区域以及一个第三表位区域, 其中所述的修饰后的氨基酸序列包含一个或多个表位区域中的一个或多个位点的缺失, 其中:

(a) 当第一表位区域中发生缺失时, 缺失位于对应于枯草杆菌蛋白酶BPN'的位点103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124和125中的一个或多个位点上;

(b) 当第二表位区域中发生缺失时, 缺失位于对应于枯草杆菌蛋白酶BPN'的位点220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245和246中的一个或多个位点上; 和

(c) 当第三表位区域中发生缺失时, 缺失位于对应于枯草杆菌蛋白酶BPN'的位点70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83和84中的一个或多个位点上。

10. 一种个人护理用组合物，该组合物包含如权利要求1所述的变体以及一种个人护理用载体。

11. 一种清洁组合物，该组合物含有如权利要求4所述变体和一种清洁组合物载体。

12. 一种个人护理组合物，该组合物含有如权利要求4所述变体和一种个人护理用载体。

说明书

在特定表位区域具有氨基酸缺失
和取代的枯草杆菌蛋白酶变体

发明领域

本发明涉及基因工程枯草杆菌蛋白酶，该蛋白酶被用于组合物，例如个人护理组合物、洗衣用组合物、坚硬表面清洁组合物和精细织品清洁组合物。

发明背景

酶是最大一类天然生成蛋白质。其中的一类酶是能催化水解其它蛋白质的蛋白酶。通过将天然生成及基因工程蛋白酶掺加到清洁组合物中，尤其是与洗衣用有关的那些清洁组合物中已使得这种水解蛋白质的能力得以开发利用。

清洁领域中，最常用的蛋白酶是丝氨酸蛋白酶。大多数丝氨酸蛋白酶是细菌生成的，而其中的一小部分是由其它微生物生成的，例如真菌。参见，Siezen，Roland J.等人“枯草杆菌蛋白酶的同源性模拟及蛋白质工程策略，枯草杆菌蛋白酶样丝氨酸蛋白酶家族”，*蛋白质工程*，Vol. 4, No. 7, 719 - 737页 (1991)。遗憾地是，野生型蛋白酶在其天然环境中的功效往往不能被优化用于非天然清洁组合物的环境中。具体地说，蛋白酶特性，例如，热稳定性、pH 稳定性、氧化稳定性以及底物特异性等，在该蛋白酶天然环境之外都未必能达到最佳使用状态。

现已用几种方法改变丝氨酸蛋白酶的野生型氨基酸序列，以增强该蛋白酶在非天然洗涤环境中的功效。这些方法包括蛋白酶的基因重构以增强蛋白酶在迥然不同条件下的热稳定性和氧化稳定性。

但是，由于这种修饰的蛋白酶对于哺乳动物是外源性的，所以它们是潜在的抗原。作为抗原，这些蛋白酶会引起哺乳动物的免疫原性和/

或变应原应答（本发明中统称为免疫原性应答）。

另外，虽然在通过基因工程来开发用于洗衣的更高效蛋白酶的持续研究中已取得了显著的成效，但是遗传工程蛋白酶尚未商业化用于个人护理组合物和精细织品洗涤剂中。肥皂、凝胶、浴液以及香波等产品中不添加工程蛋白酶的主要原因是由于人体致敏会导致不良的免疫应答的问题。因此，提供一种具有工程蛋白酶的清洁性能但又能使所激发的免疫应答降至最低程度的个人护理组合物或精细织品洗涤剂将具有十分重要的意义。

减弱蛋白酶免疫活性的一种方法就是重构该蛋白酶一个或多个表位。表位是抗原中的氨基酸区域，它们能够通过抗体结合或者通过主要组织相容性复合物蛋白(MHC)将加工过的抗原呈递给T细胞来激发免疫应答。表位的变化能够影响它们作为抗原的功效。参见Walsh, B. J. 和 M. E. H. Howden, “在修饰表位图谱基础上检测变应原中IgE结合序列的方法”，免疫学方法杂志, Vol. 121, 275 - 280页(1989)。

本发明人已经发现那些通常称为枯草杆菌蛋白酶的丝氨酸蛋白酶，包括枯草杆菌蛋白酶BPN'，在与枯草杆菌蛋白酶BPN'对应的第103 - 126和220-246以及70 - 84个氨基酸位点上具有突出的表位区域。在本发明中，本发明人已对该枯草杆菌蛋白酶进行了基因重构从而减弱由该表位区域决定的免疫原性。这样做，本发明人已发现了能激发减弱的免疫应答但仍保持其作为有效的清洗蛋白酶的活性的枯草杆菌蛋白酶。因此，本发明的蛋白酶适于在几种类型的组合物中使用，该组合物包括但不限于，洗衣、清洁餐具、清洁坚硬表面，护肤、护发、美容、口腔护理以及清洁接触透镜的组合物。

发明概述

本发明涉及与其相应的野生型蛋白酶相比免疫原性降低的丝氨酸蛋白酶变体。更具体地是，本发明涉及具有野生型氨基酸序列经修饰后的氨基酸序列的丝氨酸蛋白酶变体，该野生型序列包含一个对应于枯草杆菌蛋白酶BPN'的第103 - 126位点的第一表位区域、一个对应于枯草杆

菌蛋白酶BPN'的第220 - 246位点的第二表位区域以及一个对应于枯草杆菌蛋白酶BPN'的第70 - 84位点的第三表位区域，其中所述的修饰后的氨基酸序列包括一个或多个表位区域中的一个或多个位点的缺失。本发明还涉及这样的变体，该变体另外还具有一个或多个表位区域中的一个或多个氨基酸取代或另外具有一个或多个稳定化取代。

本发明还涉及编码这种变体的突变基因和含有这种变体的清洁及个人护理组合物。

发明详述

本发明的必需组分如下所述。另外还包括对用于本发明的实施方案中的各种任选及优选组分的非限制性描述。

本发明可以包括任何本发明所述的必需或任选组分和/或限量，或者由或基本由任何本发明所述的必需或任选组分和/或限量所组成。

除另有说明外，所有百分比和比率都以重量来计算。除另有说明外，所有百分比都是根据组合物总量来计算的。

所有组分或组成含量都以该组分或组成的活性物含量为参照，并且排除杂质，例如，可能存在于商业来源产品中的残留溶剂或副产物。

本发明中所提及的所有文献，包括所有专利、专利申请以及印刷出版物均在此全文引入作为参考。

本发明使用缩写来描述氨基酸。表1中提供了本发明使用的一系列缩写：

表 I

<u>氨基酸</u>	<u>三字母缩写</u>	<u>单字母缩写</u>
丙氨酸	Ala	A
精氨酸	Arg	R
天冬酰胺	Asn	N
天冬氨酸	Asp	D
半胱氨酸	Cys	C
谷氨酰胺	Gln	Q

谷氨酸	Glu	E
甘氨酸	Gly	G
组氨酸	His	H
异亮氨酸	Ile	I
亮氨酸	Leu	L
赖氨酸	Lys	K
甲硫氨酸	Met	M
苯丙氨酸	Phe	F
脯氨酸	Pro	P
丝氨酸	Ser	S
苏氨酸	Thr	T
色氨酸	Trp	W
酪氨酸	Tyr	Y
缬氨酸	Val	V

定义

本发明使用的术语“突变”是指基因序列和/或由该基因序列产生的氨基酸序列中的变化。突变包括野生型蛋白质序列中氨基酸残基的缺失、取代以及插入。

本发明使用的术语“野生型”是指未突变的生物体所产生的蛋白质，在本文中具体的是蛋白酶。

本发明使用的术语“变体”是指这样的蛋白质，其氨基酸序列不同于对应的野生型蛋白酶的氨基酸序列，在本文中具体的是蛋白酶。

如本文所述，当本发明的变体不只限于那些枯草杆菌蛋白酶BPN'的变体时，所有氨基酸编号方式均参照由SEQ ID NO: 1表示的枯草杆菌蛋白酶BPN'的氨基酸序列。枯草杆菌蛋白酶BPN'的氨基酸序列的进一步描述见Wells 等人，*核酸研究*，Vol. II，7911 - 7925页 (1983)，该文献引入本文作为参考。

本发明的变体

本发明人已经发现与枯草杆菌蛋白酶BPN'的位点103 - 126（被本文定义为第一个表位区域），220-246（被本文定义为第二个表位区域）以及70 - 84（被本文定义为第三个表位区域）对应的丝氨酸蛋白酶中的三个表位区域。本发明人还发现一个或多个表位区域中的一个或多个氨基酸的缺失和/或取代产生了与对应的野生型丝氨酸蛋白酶相比，其激发的变应原应答和/或免疫应答减弱了的变体。

本文使用的变体可以参照表征变体的缺失氨基酸位点来表示。例如，对应于枯草杆菌蛋白酶 BPN' 的位点104发生缺失的丝氨酸蛋白酶变体可被表示为 D 104。作为一个附加的实例，对应于枯草杆菌蛋白酶 BPN' 的位点104、105、106、107、108、109、110、112、113、114、116、117、118、119、123和125中的每一位点发生缺失的丝氨酸蛋白酶变体可被表示为 D 104-110、112-114、116-119、123, 125。类似地，取代可以通过提供野生型氨基酸残基，然后写上位点序号，然后再写上需要取代的取代氨基酸残基来表示。其中取代的氨基酸残基可以是任何天然的氨基酸，以符号“*”来表示。一个变体含有的多个取代用符号“+”隔开。举例说明，在109位点上进行的丙氨酸取代天冬酰胺被表示为Asn109Ala 或 N109A。既含有缺失又含有取代的变体通过上述表示法的结合来表示。例如，一个在位点109和122上发生取代以及在位点104上发生缺失的变体的实例被表示为 D104, N109A+I122A或D104, Asn109Ala+I122Ala。

本发明的变体是枯草杆菌蛋白酶样蛋白酶的变体。如本文中使用的术语“枯草杆菌蛋白酶样蛋白酶”是指一种与枯草杆菌蛋白酶BPN'具有至少50%，优选80%氨基酸序列同源性的蛋白酶。野生型枯草杆菌蛋白酶样蛋白酶由，例如，嗜碱性芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、*Bacillus amylosaccharicus*，地衣芽孢杆菌、迟缓芽孢杆菌、以及枯草芽孢杆菌等微生物产生。关于枯草杆菌蛋白酶样丝氨酸蛋白酶及其同源性的讨论可参见Siezen 等人，“枯草杆菌蛋白酶的同源性模拟和蛋白质工程策略，枯草杆菌蛋白酶样丝氨酸蛋白酶家族”，蛋白质工程，Vol. 4, No. 7,

719 - 737页 (1991)。

本发明的变体是具有野生型氨基酸序列经修饰后的氨基酸序列的丝氨酸蛋白酶变体，该野生型序列包含一个第一表位区域、一个第二表位区域以及一个第三表位区域，其中所述的修饰后的氨基酸序列包括一个或多个表位区域中的一个或多个位点的缺失，其中：

(a) 当第一表位区域中发生缺失时，缺失位于对应于枯草杆菌蛋白酶BPN'的位点103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125和126中的一个或多个位点上；

(b) 当第二表位区域中发生缺失时，缺失位于对应于枯草杆菌蛋白酶BPN'的位点220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245和246中的一个或多个位点上；和

(c) 当第三表位区域中发生缺失时，缺失位于对应于枯草杆菌蛋白酶BPN'的位点70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83和84中的一个或多个位点上。

优选地，其中缺失发生在第一表位区域中时，缺失位于对应于枯草杆菌蛋白酶BPN'的位点104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 112, 113, 114, 116, 117, 118, 119, 123和125中的一个或多个位点。在特别优选的实施方案中，缺失至少是对应于枯草杆菌蛋白酶BPN'的位点104的缺失。

优选地，其中缺失发生在第二表位区域中时，缺失位于对应于枯草杆菌蛋白酶BPN'的位点220, 221, 222, 223, 224, 225, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 239, 240, 242, 243, 244, 245和246中的一个或多个位点上。

优选地，其中缺失发生在第三表位区域中时，缺失位于对应于枯草杆菌蛋白酶BPN'的位点73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81和82中的一个或多个位点上。更优选地是，缺失位于对应于枯草杆菌蛋白酶BPN'的位点70, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81和82中的一个或多个位点上。

甚至更优选地是，缺失位于对应于枯草杆菌蛋白酶BPN'的位点75，76，77，78，79，80，81和82中的一个或多个位点上。最优选地是，缺失位于位点78和79中的一个或多个位点上。本发明优选的变体包括含有D70，75-82；D75-82；D70，78，79；D70；D75；D76；D78；D79；D81；或D82的变体。更优选的变体包括含有D70，75-82；D75-82；D70，78，79；D70；D78；或D79的变体。

在本发明的一个更优选的实施方案中，所述变体具有野生型氨基酸序列经修饰后的氨基酸序列，该野生型序列包含一个第一表位区域和一个第二表位区域，其中所述的修饰后的氨基酸序列包括一个或多个表位区域中的一个或多个位点的缺失，其中：

(a) 当第一表位区域中发生缺失时，缺失位于对应于枯草杆菌蛋白酶BPN'的位点104，105，106，107，108，109，110，112，113，114，116，117，118，119，123，和125中的一个或多个位点上；

(b) 当第二表位区域中发生缺失时，缺失位于对应于枯草杆菌蛋白酶BPN'的位点220，221，222，223，224，225，227，228，229，230，231，232，233，239，240，，242，243，244，245和246中的一个或多个位点上。

在本发明的另一个优选的实施方案中，所述变体具有野生型氨基酸序列经修饰后的氨基酸序列，该野生型序列包含一个第一表位区域和一个第二表位区域，其中所述的修饰后的氨基酸序列包括一个或多个表位区域中的两个或多个位点的缺失，其中：

(a) 当第一表位区域中发生缺失时，缺失位于对应于枯草杆菌蛋白酶BPN'的位点103，104，105，106，107，108，109，110，111，112，113，114，115，116，117，118，119，120，121，122，123，124，125和126中的一个或多个位点上，优选地位于对应于枯草杆菌蛋白酶BPN'的位点104，105，106，107，108，109，110，112，113，114，116，117，118，119，123和125中的一个或多个位点上；和

(b) 当第二表位区域中发生缺失时，缺失位于对应于枯草杆菌蛋白酶BPN'的位点220，221，222，223，224，225，226，227，228，229，

230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245和246中的一个或多个位点上, 优选地位于对应于枯草杆菌蛋白酶BPN'的位点220, 221, 222, 223, 224, 225, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 239, 240, 242, 243, 244, 245, 和246中的一个或多个位点上。

在本发明的甚至更优选的实施方案中, 所述变体具有野生型氨基酸序列经修饰后的氨基酸序列, 该野生型序列包含一个第一表位区域和一个第二表位区域和一个第一表位区域, 其中所述的修饰后的氨基酸序列包括两个或多个表位区域中的一个或多个位点的缺失, 其中:

(a) 当第一表位区域中发生缺失时, 缺失位于对应于枯草杆菌蛋白酶BPN'的位点103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125和126中的一个或多个位点上, 优选地位于对应于枯草杆菌蛋白酶BPN'的位点104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 112, 113, 114, 116, 117, 118, 119, 123和125中的一个或多个位点上;

(b) 当第二表位区域中发生缺失时, 缺失位于对应于枯草杆菌蛋白酶BPN'的位点220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245和246中的一个或多个位点上, 优选地位于对应于枯草杆菌蛋白酶BPN'的位点220, 221, 222, 223, 224, 225, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 239, 240, 242, 243, 244, 245, 和246中的一个或多个位点上; 和

(c) 当第三表位区域中发生缺失时, 缺失位于对应于枯草杆菌蛋白酶BPN'的位点70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83和84中的一个或多个位点上; 优选地位于对应于枯草杆菌蛋白酶BPN'的位点73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81和82中的一个或多个位点上, 更优选地位于对应于枯草杆菌蛋白酶BPN'的位点75, 76, 77, 78, 79, 80, 81和82中的一个或多个位点上。

在这个实施方案中, 短语“两个或多个表位区域中的一个或多个位

点的缺失”是指在本文所定义的一个表位区域中的一个或多个位点的缺失，在本文所定义的另一个表位区域中的一个或多个位点的缺失，和在本文所定义的剩余表位区域中的一个或多个位点的可选择性缺失。

除了一个或多个缺失外，本发明的变体可以任选地进一步包括对应于枯草杆菌蛋白酶BPN'的位点70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 126, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245和246中的一个或多个位点的取代。优选地是对应于枯草杆菌蛋白酶BPN'的位点73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81和82中的一个或多个位点的取代；更优选地是对应于枯草杆菌蛋白酶BPN'的位点70, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81和82中的一个或多个位点的取代；甚至更优选地是对应于枯草杆菌蛋白酶BPN'的位点75, 76, 77, 78, 79, 80, 81和82中的一个或多个位点的取代；最优选地是对应于枯草杆菌蛋白酶BPN'的位点78和79中的一个或多个位点的取代。当然，如果任意位点发生缺失，则该位点不能再发生取代。一个或多个上述位点上的取代可以通过用另外一个天然氨基酸残基如表I中给定的一个氨基酸残基取代野生型的氨基酸残基来进行。

为了，例如，通过表位区域的突变来重新稳定蛋白酶或增强变体的蛋白水解活性，可以另外在丝氨酸蛋白酶的任何位点上进行一个或多个附加的取代突变（“稳定化取代”）。本技术领域已知有多种这样的稳定化突变。这种稳定化突变的实例已被公开在下列文献中：例如 WO 95/10591, Baeck等，1995年4月20日公开；USP 4914031, Zukowski等，1990年4月3日颁布；USP 5470733, Bryan等，1995年11月28日颁布；USP 5567601, Bryan等，1996年10月22日颁布；WO 89/07642, USP 5707848, Bryan等，1998年1月13日颁布；Van Eekelen等，1989年8月24日颁布；WO 87/04461, Stabinsky等，1987年7月30日颁布；USP 4760025, Estell等，1988年7月26日颁布；WO 92/11348, Branner等，1992年7月9日公

开; EP 0405901, Casteleijn等, 1991年1月2日公开; WO 91/00345, Branner等, 1991年1月10日公开; 和WO 94/10020, Brode等, 1995年3月23日公开。

优选的稳定化突变包括一个或多个下列突变: I107V; K213R; Y217L; Y217K; N218S; G169A; M50F; Q19E; P5A; S9A; I31L; E156S; G169A; N212G; S188P; T254A; S3C+Q206C和Q271E。更优选的稳定化突变包括一个或多个P5A; S9A; I31L; E156S; G169A; N212G; S188P; T254A; S3C+Q206C; Q271E; Y217L和Y217K。最优选的稳定化突变包括Y217L和Y217K。

制备方法

所述变体通过使编码野生型丝氨酸蛋白酶的核苷酸序列发生突变制备而成, 由此得到的变体具有修饰的氨基酸序列。这类方法为本领域所熟知; 一种这样的方法如下所述:

将含有野生型枯草杆菌蛋白酶 BPN' 基因 (Mitchison, C. 和 J. A. Wells, “枯草杆菌蛋白酶 BPN' 中二硫键的蛋白质工程”, *生物化学*, Vol. 28, pp. 4807 - 4815 (1989)) 的噬菌粒 (pSS-5) 转化入大肠杆菌 *dut-ung*-菌株 CJ236, 以及对 Yuckenberg 等人, “使用含尿嘧啶的 DNA 和噬菌粒载体的体外定点诱变”, 定点诱变 - 一种实用的方法, McPherson, M. J. 编著, 27 - 48 页 (1991) 一文中描述的方法改进后, 用 VCSM13 辅助噬菌体 (Kunkel 等人, “不需表型选择的快速、有效的定点诱变”, *酶学方法*, Vol 154, 367 - 382 页 (1987)) 制备含尿嘧啶的单链 DNA 模板。由 Zoller 和 Smith 的方法改进而来的引物定点诱变 (Zoller, M. J. 和 M. Smith, “用 M13 衍生的载体进行寡核苷酸定点诱变: 一种用于在任意 DNA 片段中产生点突变的有效的通用方法”, *核酸研究*, Vol. 10, 6487 - 6500 页 (1982)) 被用来制备所有的突变体 (基本上如 Yuckenberg 等人所提供的, 上述)。

用 380B DNA 合成仪 (Applied Biosystems Inc.) 制备寡核苷酸。将诱变反应产物转入大肠杆菌 MM294 菌株 (美国典型培养物保藏中心大肠

杆菌33625)中。所有突变都经DNA测序证实,并将分离的DNA转入枯草芽孢杆菌表达菌株PG632(Saunders 等人,“从枯草芽孢杆菌中分泌人甲状旁腺激素的34-氨基酸片段的信号序列切割位点的优化”,*基因*, Vol. 102, 277 - 282页(1991)以及 Yang 等人,“枯草芽孢杆菌中性蛋白酶基因的克隆以及该克隆基因在建立体外衍生的缺失突变中的应用”,*细菌学杂志*, Vol. 160, 15 - 21页(1984))。对变体活性的初步评价由用突变质粒转化的PG 632细胞水解酪蛋白的能力来确定。

按下述方法进行发酵。用一升含有10 g/L 葡萄糖的LB肉汤将含有目的变体的枯草芽孢杆菌细胞(PG632)培养至对数中期,接种到总体积为9升的Biostat C 发酵罐(Braun Biotech, Inc., Allentown, PA)中。发酵培养基中含有酵母提取物、酪蛋白水解产物、可溶性部分水解的淀粉(Maltrin M-250)、消泡剂、缓冲液、以及微量矿物质(参见“芽孢杆菌的生物学:工业应用”,Doi, R. H.和M. McGloughlin, 编著(1992))。发酵操作过程中肉汤的pH恒定保持在7.5。加入卡那霉素(50 μ g/mL)对诱变质粒进行抗生素选择。细胞在37 $^{\circ}$ C下培养18小时直至 A_{600} 约为60,收获产物。

通过下述步骤处理发酵培养液来得到纯的变体。通过切向流过0.16 μ m滤膜滤除培养液中的枯草芽孢杆菌细胞。然后,用8,000分子量切断滤膜超滤浓缩无细胞培养液。用浓缩后的MES缓冲液(2-(N-吗啉代)乙磺酸)将pH值调至5.5。通过用S-琼脂糖凝胶进行的阳离子交换色谱法,并用NaCl 梯度洗脱进一步纯化该变体(参见Scopes, R. K. “蛋白质纯化原理及操作”, Springer-Verlag, 纽约(1984))。

用pNA测定法(DeIMar等人,分析化学, Vol. 99, 316 - 320页(1979))测定梯度洗脱期间收集的级分中的活性变体浓度。本测定法可以测量出变体水解可溶性合成底物琥珀酰-丙氨酸-丙氨酸-脯氨酸-苯丙氨酸-对硝基苯胺(sAAPF-pNA)时释放出对硝基苯胺的速率。用分光光度计在410 nm处测量由水解反应产生的黄色的速率,该速率与活性酶浓度成比例。此外,用280 nm处的吸光度测量值确定总蛋白浓度。活性酶/总蛋白之比给出变体纯度,并可用来鉴定作为原液收集的级分。

为了避免存储过程中变体的自身溶解，向从色谱柱中得到的收集级分中加入等重量的丙二醇。当纯化过程完成后，采用SDS-PAGE（十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳）检测变体原液的纯度，用II-T型胰蛋白酶抑制剂：火鸡卵清(Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri)通过活性位点滴定方法测定绝对酶浓度。

在以使用为目的的制备中，通过Sephadex-G25 (Pharmacia, Piscataway, New Jersey)大小排阻柱洗脱酶原液以除去丙二醇，并更换缓冲液。将酶原液中的MES缓冲液更换成含有0.01M的CaCl₂和用HCl将pH调成8.6的0.1 M tris缓冲液（三（羟甲基-氨基甲烷））。所有实验在25℃的恒温下，于pH8.6的tris缓冲液中进行。

分析方法

可以用下列方法测试所述变体的酶促活性和/或变应原应答，这两种方法都是本领域技术人员已知的。或者也可以使用本领域熟知的其它方法。

变体活性

可以用本领域熟知的方法来测定本发明所述变体的蛋白酶活性。两种这样的方法描述如下：

皮肤碎屑活性方法

用Scotch®#3750G带，反复地从受试者腿部剥取人体皮肤碎屑直到带子上基本铺满碎屑。然后，将带子切割成1平方英寸的正方形，放在一边。在10 mm×35 mm 陪替氏培养皿中，将2mL 0.75 mg/mL的对照酶（例如，枯草杆菌蛋白酶 BPN'）或待测变体加入到0.01 M KH₂PO₄ pH 5.5 缓冲液中。向该溶液中加入1mL 2.5% 月桂酸钠pH 8.6 溶液。将溶液置于平台振荡器上轻轻混合。将上述制得的正方形带在不断轻轻混合下浸泡于溶液中（碎屑面向上）10分钟。然后，用自来水轻轻漂洗正方形带15秒。将Stevenel蓝染液（3 mL，购自Sigma Chemical Co., St. Louis, MO）吸移到一干净的陪替氏培养皿中。在轻轻混合下将漂洗过的正方形带置于染液中（碎屑面向上）3分钟。从染液中取出正方形带，在两个盛有300mL

蒸馏水的烧杯中连续漂洗，每次15秒。空气干燥该正方形带。视觉或用比色计比较从对照酶获得的正方形带与从变体获得的正方形带之间颜色强度的差异。与对照酶正方形带相比，变体正方形带的颜色强度较弱，这说明变体的活性较高。

着色胶原活性方法

将50mL含有0.01M CaCl₂的且pH为8.6的0.1 M tris缓冲液(三-羟甲基-氨基甲烷)和0.5 g azocoll (偶氮颜料浸渍的胶原, 购自Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)混合。25 °C下温育该混合物, 同时在平板振荡器上轻轻混合。用0.2微米注射滤器过滤2 mL该混合物, 读取该混合物在520 nm处的吸光度把分光光度计的调节器调整归零。向剩余的48ml tris/azocoll混合物中加入 1 ppm 对照酶(例如, 枯草杆菌蛋白酶 BPN['])或待测变体。在总共10分钟的时间内, 每隔2分钟用0.2微米注射滤器过滤2 mL 含对照物/ 变体的溶液。对于每份过滤后的样品, 立即读取520 nm处的吸光度。绘制结果数据相对于时间的曲线。对照物及所测耦合物的斜率表示该样品的相对活性。斜率越大表示活性越高。可以将所测变体的活性(斜率)表示为对照物活性(斜率)的百分比。

用于测定免疫原性的小鼠鼻内试验

用本领域已知方法或通过本文下述的用于测定免疫原性的小鼠鼻内试验可以测定本发明所述丝氨酸蛋白酶变体的免疫原性潜力。该试验类似于Robinson等, “小鼠对枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg (Alcalase) 的特异性抗体应答反应: 一种鼻内暴露模型的研制”, 基础和应用毒理学 (Fundamental and Applied Toxicology), Vol. 34, 15-24页 (1996) 和Robinson等, “利用小鼠鼻内试验 (MINT) 来测定洗涤剂酶的变应原效力: 与豚鼠气管内 (GPIT) 试验的比较”, 毒理学科学, Vol. 43, 39-46页 (1998) 中描述的测定法, 这两种测定法可以用来代替下文所述的试验。

重量大约为18至大约20克的BDF1雌性小鼠 (Charles River 实验室, Portage, MI) 被用于试验。给药前将这些小鼠隔离一个星期。将这些小

鼠关在放有木屑垫草的笼子中，这些笼子放置在控制湿度（30-70%）和温度（67-77°F）的房间内，该房间内进行12小时明暗交替的循环。这些小鼠随意食用 Purina[®] 鼠食（Purina Mills, Richmond, IN）和水。

用待测潜在抗原（作为阳性对照的枯草杆菌 BPN' 或本发明的变体）对一组中的5只小鼠进行给药。给药前，通过腹膜内（i. p.）注射Ketaset（88.8 mg/kg）和Rompun(6.67 mg/kg)的混合物对每只小鼠进行麻醉。将被麻醉的小鼠握在手掌中，背朝下，用5 mL溶解了蛋白酶的缓冲液（0.01 M KH₂PO₄, pH5.5）进行鼻内给药。当每组给药剂量相同时，可以针对不同的剂量进行试验。给药溶液被轻轻地点在每只小鼠的鼻孔外并被小鼠吸入。在第 3, 10, 17和24天重复给药。

在第29天收集血清样品。通过抗原捕获 ELISA 方法测定小鼠血清中的酶-特异性 IgG1抗体。利用标准的 ED₅₀值可以比较变体和枯草杆菌蛋白酶BPN' 的免疫原性。

本发明的组合物

本发明的变体可以用于适合使用各自野生型蛋白酶的任何情况。一个这样的实例包括清洁组合物。由于本发明变体能达到所希望的弱变应原性和/或免疫原性的要求，该变体还可以用于曾经从使用蛋白酶中受益最小的情况。这类情况的实例包括变体必定与哺乳动物皮肤紧密接触的情况，例如使用个人护理组合物的情况。

清洁组合物

所述变体可用于清洁组合物包括，但不限于，洗衣组合物、坚硬表面清洁组合物、包括餐具洗涤组合物在内的精细织品清洁组合物，以及自动洗碗机洗涤剂组合物。

本发明所述清洁组合物含有有效量的一种或多种本发明的变体以及清洁组合物载体。

本发明使用的“有效量的变体”或者类似表述是指达到特定清洁组合物中所需蛋白水解活性的变体的必需量。所述有效量可被本领域普通技术人员容易地确定，并取决于多种因素，例如所用变体的具体种类，

清洁的用途，清洁组合物的具体组成，以及需要使用的组合物是液体还是干的（例如，颗粒状、棒状）组合物，等。优选地，所述清洁组合物中包含约0.0001%~约10%，更优选约0.001%~约1%，以及最优选约0.01%~约0.1%的一种或多种本发明的变体。下面更详细地讨论了变体可以用于不同清洁组合物的几个实例。

除本发明的变体外，本发明的清洁组合物还含有其中含有一种或多种与变体相容的清洁组合物材料的清洁组合物载体。本发明使用的术语“清洁组合物材料”是指任何选定的用于特定类型的所需的清洁组合物和产品形式（例如，液体、颗粒、棒、喷雾剂、条、膏、凝胶）的材料，这些材料也与用于组合物中的变体相容。清洁组合物材料的具体选择可通过考虑待清洁的材料、针对使用过程中的清洁条件（例如，通过洗涤剂的使用）所需的组合物形式容易地进行。本发明所用的术语“相容的”是指清洁组合物材料不会使变体的蛋白水解活性降低到这样的程度，即在正常使用情况下变体不像所期望的那样有效。下文中举例详细说明了具体的清洁组合物材料。

本发明的变体可用于期望泡沫丰富且清洁效果良好的多种清洁剂组合物中。因此，所述变体可以与各种常规成分一起使用以便提供充分配制的坚硬表面清洁剂、餐具清洗组合物、织物洗涤组合物等。这类组合物可以是液体、颗粒、棒状等形式。这类组合物可以配制成“浓缩”清洁剂，该清洁剂含有多达约30%~约60%（重量）的表面活性剂。

本发明所述的清洁组合物可以任选地，以及优选地，包含各种表面活性剂（例如，阴离子、非离子或两性离子表面活性剂）。典型地，这类表面活性剂在组合物中的含量约5%~约35%。

用于本发明的表面活性剂的非限制性实例包括常规的 C_{11} - C_{18} 烷基苯磺酸盐以及伯和无规烷基硫酸盐，通式 $CH_3(CH_2)_x(CHOSO_3^-M^+)CH_3$ 和 $CH_3(CH_2)_y(CHOSO_3^-M^+)CH_2CH_3$ 的 C_{10} - C_{18} 仲(2, 3)烷基硫酸盐，其中 x 和 $(y+1)$ 是至少约为7的整数，优选至少约为9，以及 M 是一种水溶性的阳离子，特别是钠； C_{10} - C_{18} 烷基烷氧基硫酸盐（特别是EO 1-5乙氧基硫酸盐）； C_{10} - C_{18} 烷基烷氧基羧酸盐（特别是EO 1-5乙氧基羧酸盐）， C_{10} - C_{18} 烷基聚葡萄糖苷

及其相应的硫酸化聚葡萄糖苷； C_{12} - C_{18} α -磺化脂肪酸酯， C_{12} - C_{18} 烷基及烷基酚烷氧基化物（特别是乙氧基化物和混合的乙氧基/丙氧基）， C_{12} - C_{18} 甜菜碱及磺基甜菜碱， C_{10} - C_{18} 胺氧化物等。本发明优选烷基烷氧基硫酸盐（AES）和烷基烷氧基羧酸盐（AEC）。另外，根据配方师的愿望，将这类表面活性剂与胺氧化物和/或甜菜碱或磺基甜菜碱表面活性剂联用也是优选的。其它常规的有用表面活性剂列于标准教科书中。特别有用的表面活性剂包括 C_{10} - C_{18} N-甲基葡萄糖酰胺，其描述见1993年3月16日颁布的授予Connor 等人的美国专利5,194,639。

本发明所述组合物中可以含有多种用于洗涤剂洗涤组合物的其它成分，其中包括，例如，其它活性成分、载体、水溶助长剂、加工助剂、染料或色料以及用于液体制剂的溶剂。如果希望额外增加泡沫，则可以向组合物中加入 C_{10} - C_{16} 烷醇酰胺等增泡剂，典型地加入量为约1%~约10%。 C_{10} - C_{14} 一乙醇酰胺和二乙醇酰胺代表一类典型的这样的增泡剂。将这类增泡剂与高效发泡辅助表面活性剂，例如上述的胺氧化物、甜菜碱以及磺基甜菜碱联用也是有利的。如果需要，可以加入 $MgCl_2$ 、 $MgSO_4$ 等可溶性镁盐，典型地约0.1%~约2%，以提供额外的泡沫。

本发明所述的液体洗涤剂组合物可以包含水以及其它溶剂作为载体。低分子量的伯或仲醇的实例有甲醇、乙醇、丙醇以及异丙醇，它们都是合适的。优选一元醇来溶解表面活性剂，但是含有约2~约6个碳原子和约2~约6个羟基的多元醇（例如，1,3-丙二醇、乙二醇、丙三醇以及1,2-丙二醇）也可以使用。所述组合物可以包含约5%~约90%，典型地约10%~约50%的这类载体。

本发明的洗涤剂组合物优选地被配制成在含水的清洁操作使用中，使得洗涤用水的pH值为约6.8~约11。因此，典型地将成品在该范围内配制。将pH值控制在推荐使用水平的技术包括，例如缓冲液、碱和酸的使用。这类技术为本领域技术人员所熟知。

当配制本发明所述的坚硬表面清洁组合物和织物清洁组合物时，配方师可能希望使用约5%~约50%（重量）的各种助洗剂。典型的助洗剂包括1-10微米沸石、聚羧酸盐例如柠檬酸盐和氧代丁二酸氢盐、层叠硅酸

盐、磷酸盐等。其它常规助洗剂见标准配方手册。

同样，配方师可能希望在这类组合物中使用各种另外的酶，例如纤维素酶、脂肪酶、淀粉酶和蛋白酶，典型用量为约 0.001% ~ 约 1% (重量)。各种去污酶及织物护理酶都为洗衣洗涤剂领域所熟知。

各种漂白化合物，例如过碳酸盐、过硼酸盐等也可以用于此类组合物中，典型用量为约 1% ~ 约 15% (重量)。如果需要，这类组合物还可以包含漂白活化剂，例如四乙酰乙二胺、壬酰羧苯磺酸盐等，这些也为本领域已知。典型用量为约 1% ~ 约 10% (重量)。

去污剂，尤其是阴离子低聚酯型，螯合剂，尤其是氨基磷酸盐以及乙二胺丁二酸氢盐，粘土污垢去除剂，尤其是乙氧基化四亚乙基五胺，分散剂，尤其是聚丙烯酸盐和聚天冬氨酸盐，增白剂，尤其是阴离子增白剂，抑泡剂，尤其是硅氧烷及仲醇，织物软化剂，尤其是绿土粘土等都可以用于这类组合物中，用量为约 1% ~ 35% (重量)。标准配方手册以及公开的专利中都包含了对这类常规材料的丰富详尽的描述。

酶稳定剂也可以用于清洁组合物中。这类酶稳定剂包括丙二醇 (优选为约 1% ~ 约 10%)、甲酸钠 (优选为约 0.1% ~ 约 1%) 以及甲酸钙 (优选为约 0.1% ~ 约 1%)。

本发明所述的变体也可以用于坚硬表面清洁组合物中。本发明使用的“坚硬表面清洁组合物”是指用于清洁坚硬表面，例如地板、墙壁、浴室瓷砖等的液态及颗粒状的清洁剂组合物。本发明所述的坚硬表面清洁组合物包含有效量的一种或多种本发明所述变体，优选组合物中的变体含量为约 0.001% ~ 约 10%，更优选约 0.01% ~ 约 5%，还更优选约 0.05% ~ 约 1% (重量)。除含有一种或多种变体外，这类坚硬表面清洁组合物典型地还包括一种表面活性剂和一种水溶性的螯合助洗剂。但是，在某些专用产品，例如喷雾型窗户清洁剂中，有时并不使用所述表面活性剂，这是由于它们可能会在玻璃表面产生薄膜状和/或斑点状的残迹。

当含有表面活性剂组分时，其在本发明组合物中的含量可低至 0.1%，但是，典型地，该组合物中表面活性剂的含量为约 0.25% ~ 约 10%，更优选约 1% ~ 约 5%。

典型地，所述组合物中包含约0.5% ~ 约 50%的去垢助剂，优选地约1%~ 约10%。

优选的pH范围应为约7~ 12。如果需要调节pH，常用的pH调节剂，例如氢氧化钠、碳酸钠或盐酸都可以使用。

溶剂也可以包含在所述组合物中。有用的溶剂包括，但不限于，乙二醇醚例如二甘醇单己基醚，二甘醇单丁基醚，乙二醇单丁基醚，乙二醇单己基醚，丙二醇单丁基醚，二丙二醇单丁基醚，以及二醇例如2，2，4-三甲基-1，3-戊二醇和2-乙基-1，3-己二醇。在使用时，这类溶剂的典型用量为约0.5%~ 约15%，更优选约3%~ 约11%。

此外，当向要清洁的表面“全强度”施用本发明的组合物而不清洗该表面时，可以在该组合物中使用高挥发性溶剂，例如异丙醇或乙醇以加快表面上组合物的蒸发。使用时，挥发性溶剂在组合物中的典型用量为约2%~ 约12%。

通过下列实施例来说明本发明的坚硬表面清洁组合物。

实施例1-6

液态坚硬表面清洁组合物

	实施例1	实施例2	实施例3	实施例4	实施例5	实施例6
变体 D 108	0.05%	0.50%	0.02%	0.03%	0.30%	0.05%
EDTA	-	-	2.90%	2.90%	-	-
柠檬酸钠	-	-	-	-	2.90%	2.90%
十二烷基苯磺酸钠	1.95%	-	1.95%	-	1.95%	-
十二烷基硫酸钠	-	2.20%	-	2.20%	-	2.20%
十二烷基(乙氧基)硫酸钠	-	2.20%	-	2.20%	-	2.20%
十二烷基二甲胺氧化物	-	0.50%	-	0.50%	-	0.50%
枯烯磺酸钠	1.30%	-	1.30%	-	1.30%	-
己基卡必醇	6.30%	6.30%	6.30%	6.30%	6.30%	6.30%
水	90.4%	88.3%	87.53%	85.87%	87.25%	85.85%

所有配方均调至 pH 7。

在本发明的另一个实施方案中，餐具洗涤组合物包含一种或多种本发明所述的变体。本发明使用的“餐具洗涤组合物”是指用于清洁餐具的所有形式的组合物，包括但不限于颗粒状的以及液态的形式。本发明的餐具洗涤组合物通过下列实施例来说明。

实施例7- 10

液态餐具洗涤剂

	实施例7	实施例8	实施例9	实施例10
变体 D223	0.05 %	0.50 %	0.02 %	0.40 %
C ₁₂ - C ₁₄ N-甲基葡糖酰胺	0.90 %	0.90 %	0.90 %	0.90 %
C ₁₂ 乙氧基 (1) 硫酸盐	12.0 %	12.0 %	12.0 %	12.0 %
2-甲基十一烷酸	4.50 %	4.50 %	4.50 %	4.50 %
C ₁₂ 乙氧基 (2) 羧酸盐	4.50 %	4.50 %	4.50 %	4.50 %
C ₁₂ 脂肪醇乙氧基化物 (4)	3.00 %	3.00 %	3.00 %	3.00 %
C ₁₂ 氧化胺	3.00 %	3.00 %	3.00 %	3.00 %
枯烯磺酸钠	2.00 %	2.00 %	2.00 %	2.00 %
乙醇	4.00 %	4.00 %	4.00 %	4.00 %
Mg ²⁺ (作为 MgCl ₂)	0.20 %	0.20 %	0.20 %	0.20 %
Ca ²⁺ (作为 CaCl ₂)	0.40 %	0.40 %	0.40 %	0.40 %
水	65.45 %	65 %	65.48 %	65.1 %

所有配方均调至pH 7。

本发明的液体织物清洁组合物通过下列实施例来说明。

实施例11 - 13

液态织物清洁组合物

	实施例 11	实施例 12	实施例 13
变体 D107, Y217K	0.05 %	0.03 %	0.30 %
C ₁₂ - C ₁₄ 烷基硫酸钠	20.0 %	20.0 %	20.0 %
2-丁基辛酸	5.0 %	5.0 %	5.0 %
柠檬酸钠	1.0%	1.0%	1.0%
C ₁₀ 脂肪醇乙氧基化物 (3)	13.0 %	13.0 %	13.0 %
一乙醇胺	2.50 %	2.50 %	2.50 %
水/丙二醇/乙醇(100:1:1)	58.45 %	58.47%	58.20 %

个人护理组合物

本发明所述的变体特别适合用于个人护理组合物，例如留存型和漂洗型护发剂，香波、留存型和漂洗型防治粉刺组合物、面乳及护肤剂、淋浴凝胶、肥皂、泡沫及非泡沫型洁面剂、化妆品、手用、面用及体用洗液和保湿剂、留存型面部保湿剂，化妆及清洁擦剂、口腔护理组合物和接触透镜护理组合物。本发明所述的个人护理组合物包含一种或多种

本发明所述的变体和个人护理载体。

为了便于说明，本发明所述变体适合包含在下列参考文献中所述的组合物中：1997年6月24日颁布的授予Linares等人的美国专利US5, 641, 479(皮肤清洁剂)；1997年2月4日颁布的授予Wivell 等人的美国专利US5, 599, 549(皮肤清洁剂)；1996年12月17日颁布的授予Ha 等人的美国专利US5, 585, 104 (皮肤清洁剂)；1996年7月30日颁布的授予Kefauver 等人的美国专利US5, 540, 852 (皮肤清洁剂)；1996年4月23日颁布的授予Dunbar 等人的美国专利US5, 510, 050 (皮肤清洁剂)；1997年3月18日颁布的授予Guang Lin 等人的美国专利US5, 612, 324 (抗粉刺制剂)；1996年12月24日颁布的授予Warren 等人的美国专利5, 587, 176 (抗粉刺制剂)；1996年8月27日颁布的授予Venkateswaran的美国专利US5, 549, 888 (抗粉刺制剂)；1995年11月28日颁布的授予Corless 等人的美国专利US5, 470, 884 (抗粉刺制剂)；1997年7月22日颁布的授予Gordon 等人的美国专利US5, 650, 384 (淋浴凝胶)；1997年3月4日颁布的授予Moore 等人的美国专利US5, 607, 678 (淋浴凝胶)；1997年4月29日颁布的授予Coffindaffer 等人的美国专利 US5, 624, 666 (头发调理剂和/或洗发香波)；1997年4月8日颁布的授予Bolich等人的美国专利US5, 618, 524 (头发调理剂和/或洗发香波)；1997年3月18日颁布的授予Inman的美国专利US5, 612, 301, (头发调理剂和/或洗发香波)；1996年11月12日颁布的授予Wells的美国专利US 5, 573, 709 (头发调理剂和/或洗发香波)；1996年1月9日颁布的授予Pings的美国专利 5, 482, 703 (头发调理剂和/或洗发香波)；1994年4月12日再颁布的授予Grote 等人的美国专利 Re. 34, 584 (头发调理剂和/或洗发香波)；1997年6月24日颁布的授予Date 等人的美国专利US 5, 641, 493 (化妆品)；1997年2月25日颁布的授予Blank 等人的美国专利US5, 605, 894(化妆品)；1996年12月17日颁布的授予Yoshioka等人的美国专利US5, 585, 090(化妆品)；1990年7月3日颁布的授予Cheney等人的美国专利US4, 939, 179(手用、面用及体用洗液)；1997年3月4日颁布的授予McAtee 等人的美国专利US5, 607, 980 (手用、面用及体用润肤剂)；1977年8月30日颁布的授予Richter 等人的美国专

利US4, 045, 364 (化妆用或清洁用的擦剂); 1994年10月12日公开的 Touchet 等人的欧洲专利申请, EP 0 619 074 (化妆用或清洁用的擦剂); 1990年12月4日颁布的授予Brown-Skrobot 等人的美国专利US4, 975, 217 (化妆用或清洁用的擦剂); 1992年3月17日颁布的授予Seibel的美国专利US5, 096, 700 (口腔清洁组合物); 1991年7月2日颁布的授予Sampathkumar 的美国专利US5, 028, 414 (口腔清洁组合物); 1991年7月2日颁布的授予Benedict 等人的美国专利 US5, 028, 415 (口腔清洁组合物); 1989年9月5日颁布的授予Davies 等人的美国专利 US4, 863, 627 (接触透镜清洁组合物); 1988年5月24日颁布的授予Huth等人的美国专利 Re. 32, 672(接触透镜清洁组合物); 以及1986年9月2日颁布的授予Schafer的美国专利US4, 609, 493 (接触透镜清洁组合物)。

为了进一步说明本发明所述的口腔清洁组合物, 可以向组合物中加入药学上可接受量的一种或多种本发明所述变体用来清除牙齿或假牙上的蛋白性污渍。本发明使用的“口腔清洁组合物”是指洁齿剂、牙膏、牙胶、牙粉、漱口剂、口腔喷雾剂、口胶、口香糖、糖锭、香囊、片剂、生物凝胶、预防用糊剂、牙齿处理溶液等。优选地, 所述的口腔清洁组合物包括约0.0001% ~ 约 20% (重量)的一种或多种本发明所述的变体, 更优选约0.001% ~ 约10%, 还更优选约0.01% ~ 约5%, 以及药学上可接受的载体。本发明使用的“药学上可接受的”是指该术语描述的药物、药剂或惰性成分适合用于与人和低等动物的组织接触而没有过度毒性、不相容性、不稳定性、刺激作用、过敏反应等, 而具有合理的效果/风险比。

典型地, 所述口腔清洁组合物的药学上可接受的口腔清洁载体成分通常占组合物重量的约 50% ~ 约99.99%, 优选约65% ~ 约99.99%, 更优选约 65% ~ 约99%。

可加入到本发明所述口腔清洁组合物的口腔清洁组分中的药学上可接受的载体成分以及任选成分为本技术领域技术人员所熟知。多种多样的组合物类型、口腔清洁组合物中使用的载体成分以及任选成分都已在本发明上述的参考文献中公开。

在本发明的另一个实施方案中, 用于在口腔外清洁假牙的假牙清洁

组合物包含一种或多种本发明所述的变体。这类假牙清洁组合物中包含有效量的一种或多种变体以及假牙清洁载体，所述变体在组合物中的重量百分含量优选约0.0001%~约50%，更优选约0.001%~约35%，还更优选约0.01%~约20%。各种假牙清洁组合物形式，例如泡腾片等都为本技术领域所熟知（参见，例如美国专利US5,055,305, Young），并且通常适合于掺入一种或多种变体用于清除假牙上的蛋白性污渍。

在本发明的另一个实施方案中，接触透镜清洁组合物中包括一种或多种本发明所述的变体。这类接触透镜清洁组合物中包含有效量的一种或多种变体以及接触透镜清洁载体，所述变体在组合物中所占重量百分比优选约0.01%~50%，更优选约0.01%~约20%，还更优选约1%~约5%。各种接触透镜清洁组合物形式，例如片剂、液体等都为本技术领域所熟知，并且通常适合于掺入一种或多种本发明的变体用于清除接触透镜上的蛋白性污渍。

本发明的接触透镜清洁组合物实施方案通过实施例14-17来说明。

实施例14-17

接触透镜清洁溶液

	实施例14	实施例15	实施例16	实施例17
变体D78, 103	0.01%	0.5%	0.1%	2.0%
葡萄糖	50.0%	50.0%	50.0%	50.0%
非离子型表面活性剂 (聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物)	2.0%	2.0%	2.0%	2.0%
阴离子型表面活性剂 (聚氧乙烯-烷基苯基醚硫酸酯钠)	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%
氯化钠	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%
硼砂	0.30%	0.30%	0.30%	0.30%
水	45.69%	45.20%	45.60%	43.70%

实施例18-21说明本发明的变体在洗浴产品中的使用。

实施例18-21

洗浴产品

	实施例18	实施例19	实施例20	实施例21
水	62.62%	65.72%	57.72%	60.72%
EDTA二钠	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%
丙三醇	3.0%	3.0%	3.0%	3.0%
Polyquaternium 10	0.4%	0.4%	0.4%	0.4%
月桂基醚硫酸钠	12.0%	12.0%	12.0%	12.0%
椰油酰胺MEA	2.8%	2.8%	2.8%	2.8%
月桂酰两性乙酸钠	6.0%	6.0%	6.0%	6.0%
肉豆蔻酸	1.6%	1.6%	1.6%	1.6%
硫酸镁七水合物	0.3%	0.3%	0.3%	0.3%
三羟基硬脂精	0.5%	0.5%	0.5%	0.5%
PEG-6辛酸/癸酸甘油三酯	3.0%	-	-	-
棉籽酸(cottonate) 脂肪酸蔗糖多酯	3.0%	-	-	-
二十二烷酸(behenate) 脂肪酸蔗糖多酯	3.0%	-	4.0%	-
矿脂	-	4.0%	8.0%	-
矿物油	-	-	-	6.0%
DMDM乙内酰脲	0.08%	0.08%	0.08%	0.08%
变体D78, 105, 223	0.1%	2.0%	2.0%	5.0%
柠檬酸	1.40%	1.40%	1.40%	1.40%

实施例22-25说明本发明的变体在洗面产品中的使用。

实施例22 - 25

洗面产品

	实施例22	实施例23	实施例24	实施例25
水	66.52%	65.17%	68.47%	68.72%
EDTA二钠	0.1%	0.1%	0.2%	0.2%
柠檬酸	-	-	1.4%	1.4%
月桂基醚-3硫酸钠	3.0%	3.5%	-	-
月桂基醚-4羧酸钠	3.0%	3.5%	-	-
月桂基醚-12	1.0%	1.2%	-	-
Polyquaternium 10	-	-	0.4%	0.4%
Polyquaternium 25	0.3%	0.3%	-	-
甘油	3.0%	3.0%	3.0%	3.0%
月桂酰两性乙酸钠	-	-	6.0%	6.0%
月桂酸	6.0%	6.0%	3.0%	3.0%
肉豆蔻酸	-	-	3.0%	3.0%
硫酸镁七水合物	2.3%	2.0%	2.0%	2.0%
三乙醇胺	4.0%	4.0%	4.0%	4.0%
三羟基硬脂精	0.5%	0.5%	0.5%	0.5%
二十二烷酸脂肪酸蔗糖多酯	2.0%	2.0%	-	-
棉籽酸脂肪酸蔗糖多酯	3.0%	2.0%	-	-
PEG-6辛酸/癸酸甘油三酯	-	-	-	2.0%
矿脂	-	-	4.0%	-
矿物油	-	-	-	2.0%
椰油酰氨基丙基甜菜碱	2.0%	3.0%	1.8%	1.8%
月桂基二甲胺氧化物	1.0%	1.2%	1.2%	1.2%
D-泛醇	1.0%	0.25%	0.25%	-
DMDM乙内酰脲	0.08%	0.08%	0.08%	0.08%
变体D 73-82, 103, Y217K	1.0%	2.0%	0.5%	0.5%
日用香料	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%

实施例26-27说明本发明的变体在留存型皮肤保湿组合物中的使用。

实施例26 - 27

留存型皮肤保湿组合物

	实施例26	实施例27
甘油	5.0%	-
硬脂酸	3.0%	-
C ₁₁₋₁₃ 异链烷烃	2.0%	-
乙二醇硬脂酸酯	1.5%	-
丙二醇	-	3.0%
矿物油	1.0%	10.0%
芝麻油	-	7.0%
矿脂	-	1.8%
三乙醇胺	0.7%	-
乙酸鲸蜡酯	0.65%	-
硬脂酸甘油酯	0.48%	2.0%
TEA硬脂酸酯	-	2.5%
鲸蜡醇	0.47%	-
羊毛脂醇	-	1.8%
DEA-磷酸鲸蜡酯	0.25%	-
对羟基苯甲酸甲酯	0.2%	0.2%
对羟基苯甲酸丙酯	0.12%	0.1%
Carbomer 934	0.11%	-
EDTA二钠	0.1%	-
变体 D 246	0.1%	0.5%
水	84.32%	71.1%

实施例28说明本发明的变体在擦净剂组合物中的使用。

实施例28

擦净剂组合物

丙二醇	1.0%
月桂基硫酸铵	0.6%
琥珀酸	4.0%
琥珀酸钠	3.2%
Triclosan [®]	0.15%
变体I122A	0.05%
水	91.0%

上述组合物被浸渍到一种由纤维素和/或聚酯所组成的机织吸收层上，以吸收层重量计，组合物约为250%。

序列表

<110> 宝洁公司

<120> 在特定表位区域具有氨基酸缺失和取代的枯草杆菌蛋白酶变体

<130> Deletionsubminor

<140> PCT/US00/

<141> 2000-07-11

<160> 1

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 275

<212> PRT

<213> 解淀粉芽孢杆菌

<400> 1

```

Ala Gln Ser Val Pro Tyr Gly Val Ser Gln Ile Lys Ala Pro Ala Leu
 1              5              10              15
His Ser Gln Gly Tyr Thr Gly Ser Asn Val Lys Val Ala Val Ile Asp
              20              25              30
Ser Gly Ile Asp Ser Ser His Pro Asp Leu Lys Val Ala Gly Gly Ala
              35              40              45
Ser Met Val Pro Ser Glu Thr Asn Pro Phe Gln Asp Asn Asn Ser His
              50              55              60
Gly Thr His Val Ala Gly Thr Val Ala Ala Leu Asn Asn Ser Ile Gly
 65              70              75              80
Val Leu Gly Val Ala Pro Ser Ala Ser Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu
              85              90              95
Gly Ala Asp Gly Ser Gly Gln Tyr Ser Trp Ile Ile Asn Gly Ile Glu
              100              105              110
Trp Ala Ile Ala Asn Asn Met Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly
              115              120              125
Pro Ser Gly Ser Ala Ala Leu Lys Ala Ala Val Asp Lys Ala Val Ala
              130              135              140
Ser Gly Val Val Val Val Ala Ala Ala Gly Asn Glu Gly Thr Ser Gly
 145              150              155              160
Ser Ser Ser Thr Val Gly Tyr Pro Gly Lys Tyr Pro Ser Val Ile Ala
              165              170              175
Val Gly Ala Val Asp Ser Ser Asn Gln Arg Ala Ser Phe Ser Ser Val
              180              185              190
Gly Pro Glu Leu Asp Val Met Ala Pro Gly Val Ser Ile Gln Ser Thr
              195              200              205
Leu Pro Gly Asn Lys Tyr Gly Ala Tyr Asn Gly Thr Ser Met Ala Ser
              210              215              220
Pro His Val Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lys His Pro Asn
 225              230              235              240

```

Trp Thr Asn Thr Gln Val Arg Ser Ser Leu Glu Asn Thr Thr Thr Lys
245 250 255

Leu Gly Asp Ser Phe Tyr Tyr Gly Lys Gly Leu Ile Asn Val Gln Ala
260 265 270

Ala Ala Gln
275