

PŘÍHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: 11.07.2000

(32) Datum podání prioritní přihlášky: 22.07.1999

(31) Číslo prioritní přihlášky: 1999/144981

(33) Země priority: US

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: 12.06.2002
(Věstník č. 6/2002)

(86) PCT číslo: PCT/US00/18855

(87) PCT číslo zveřejnění: WO01/07484

(21) Číslo dokumentu:

2002 - 171

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl. ⁷:

C 12 N 9/50

C 07 K 17/00

(71) Přihlašovatel:

THE PROCTER & GAMBLE COMPANY, Cincinnati,
OH, US;

(72) Původce:

Weisgerber David John, Cincinnati, OH, US;
Rubingh Donn Nelton, Cincinnati, OH, US;
Correa Paul Elliot, Cincinnati, OH, US;

(74) Zástupce:

PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1, Praha 4,
14000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Proteinázový konjugát, čisticí prostředek a
prostředek osobní péče**

(57) Anotace:

Popisují se proteinázové konjugáty subtilizinu, obsahující proteinázovou část a jednu nebo více adičních částí. Každá adiční část je kovalentně zachycena na chránící poloze hydrolytického místa proteinázové části, kde tato poloha se vybrala z poloh 13, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 84, 85, 88, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 170, 186, 191, 192, 193, 194, 196, 259, 260, 261, 262, a 274 odpovídající subtilizinu BPN'. Proteinázové konjugáty vykazují zvýšenou imunogennost vůči základní proteináze. Dále se popisují čisticí prostředky a prostředky osobní péče obsahující proteinázové konjugáty.

Proteinázový konjugát, čisticí prostředek a prostředek osobní péče

Oblast techniky

Popisuje se chemicky upravené subtilizinové proteinázy, které je možné použít například jako prostředky osobní péče, prací prostředky, čisticí prostředky pro silně znečištěné povrchy a čisticí prostředky určené pro slabé znečištění.

Dosavadní stav techniky

Enzymy tvoří nejrozsáhlejší třídu přirozeně se vyskytujících proteinů. Jedna třída enzymů zahrnuje proteinázy, které katalyzují hydrolýzu jiných proteinů. Tato schopnost hydrolyzovat proteiny je v typickém případě využívána začleněním přirozeně se vyskytujících a geneticky manipulovaných proteináz do čisticích prostředků, zvláště těch, které se mohou použít jako prací prostředky.

V oboru čisticích prostředků se většinou nejvíce využívá proteináza serinu. Většina uvedených proteináz serinu produkují bakterie, zatímco ostatní proteinázy jsou produkovány jinými organizmy, jako jsou houby (popisuje se v publikaci Siezen et al., „Homology modelling and protein engineering strategy of subtilases, the family of subtilisin-like serin proteases,“ Protein Engineering, Vol.4, No. 7, pp. 719-737 (1991)). Na neštěstí účinnost proteináz divokého typu, kterou vykazují v jejich vlastním přirozeném prostředí, není možné optimalizovat v umělém prostředí čisticích prostředků. Charakteristiky proteináz, jako je například teplotní stabilita, pH stabilita, oxidační stabilita a substrátová specifita, není nutné optimalizovat při použití mimo přirozené prostředí proteinázy.

Aby došlo ke změně aminokyselinové sekvence divokého typu proteináz serinu s cílem zvýšit účinnost proteinázy

v nepřírodném čistícím prostředí zvolilo se několik přístupů. Tyto přístupy zahrnují genetickou manipulaci a/nebo chemickou úpravu proteináz za účelem zvýšit teplotní stabilitu a zlepšit oxidační stabilitu za zcela odlišných podmínek.

Avšak protože takové upravené proteinázy jsou pro savce cizorodé, mohou působit jako potencionální antigeny. Jako antigeny takové proteinázy způsobují u savců imunogenní a/nebo alergickou odezvu (což spadá pod jeden zde užívaný výraz imunogenní odezva).

Navíc, zatímco genetická manipulace a chemická úprava proteináz je nejdůležitější při pokračování výzkumu vzniku vysoce účinných proteináz pro využití v pracích prostředcích, takové proteinázy nenacházejí využití v prostředcích osobní péče a u slabě působících detergentů. Primární význam nepřítomnosti těchto proteináz v produktech, jako jsou například mýdla, gely, sprchové šampóny, šampóny na vlasy a mycí prostředky určené pro slabě znečištěné nádoby, je problém přecitlivělosti člověka vůči uvedeným prostředkům, která vede k nežádoucí imunitní odezvě. Je proto nutné připravit prostředek osobní péče nebo detergent určený pro slabé znečištění, které poskytují čistící vlastnosti proteináz, aniž vyvolávají imunitní odezvu.

Imunitní odezva na proteinázy se může minimalizovat imobilizací, granulací, potažením nebo rozpuštěním chemicky upravených proteináz, aby se zabránilo jejich rozptylu. Tyto metody, zatímco se používají v případech ve vzduchu rozptýlených proteináz, stále nezabrání nebezpečí spojenému s kontaktem tkáně s konečným prostředkem.

Také se navrhlo, aby se imunogennost proteinázy snížila zachycením polymerů na proteinázu (popisuje se například v dokumentech patent USA č. 4 179 337, (Davis et al., 18.12.1979), petent USA č. 5 856 451 (Olsen et al., Novo Nordisk, 5.1.1999), WO 99/00489 (Olsen et al., Novo Nordisk, 7.1.1999), WO 98/30 682 (Olsen et al., Novo Nordisk,

16.7.1998) a WO 98/35 026, Von der Osten et al., 13.8.1998). Takový závěr však nenaznačuje důležitost zachycených polymerů k určitým aminokyselinovým oblastem proteinázy za účelem, co nejvíce snížit imunogenní odezvu.

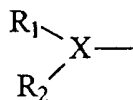
Nedávno se objevilo, že proteináza subtilizinu obsahuje tři epitopové oblasti a že konjugát jednoho nebo více polymerů, polypeptidů nebo jiných skupin může být připojen k jednomu nebo více těchto oblastí, přičemž se podstatně sníží imunogennost proteinázy (popisuje se v dokumentu patentové přihlášce USA č. 09/088 912 (Weisgerberg et al., The Procter and Gamble Co., 2.6.1998).

Jako alternativa způsobu ochrany oblastí epitopů proteinázy subtilizinu se zjistilo, že je možné využít prostorové ochrany jednoho nebo více hydrolytických míst (to jsou oblasti proteinázy, kde může dojít k hydrolýze *in vivo*) proteinázy, aby se předešlo nebo zabránilo přítomnosti epitopu a snížení imunogenosti proteinázy. Vynález popisuje chemicky upravené subtiliziny, kde je chemicky upravena oblast v sousedství jednoho nebo více hydrolytických míst. Připravily se proto proteinázy subtilizinu, které vyvolávají sníženou imunitní odezvu a přesto si zachovávají svojí aktivitu jako účinná a aktivní proteináza. Proteinázové konjugáty jsou vhodné pro použití v několika typech prostředků, které zahrnují, ale nejsou omezeny na prací prostředky, mycí prostředky na nádobí, mycí prostředky pro silně znečištěné povrchy, pleťové čistící prostředky, vlasové šampony, prostředky určené pro ústní hygienu a prostředky vhodné pro kontaktní čočky.

Podstata vynálezu

Vynález popisuje proteinázové konjugáty, které obsahují proteinázovou část a jednu nebo více adičních částí, kde každá adiční část je kovalentně zachycena na aminokyselině proteinázové části v poloze vybrané ze skupiny zahrnující 13,

14, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 84, 85, 88, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 170, 186, 191, 192, 193, 194, 196, 259, 260, 261, 262 a 274 odpovídající subtilizinu BPN', kde adiční části nezávisle na sobě mají obecný vzorec



kde symbol X se vybral ze skupiny obsahující žádnou část a spojovací část, symbol R_2 se vybral ze skupiny obsahující žádnou část, první polypeptid a první polymer a symbol R_2 se vybral ze skupiny obsahující žádnou část, druhý polypeptid a druhý polymér, kde alespoň jeden symbol z X, R_1 a R_2 představuje spojovací část.

Proteinázové konjugáty podle vynálezu snižují imunogennost vzhledem k základní proteináze. Proto jsou takové proteinázové konjugáty vhodné pro použití v několika typech prostředků, které zahrnují, ale nejsou omezeny na prací prostředky, prostředky na mytí nádobí, prostředky určené pro silně znečištěné povrchy, prostředky pro péči o pleť, kosmetické prostředky, prostředky pro ústní hygienu a prostředky určené pro kontaktní čočky.

Podstatné komponenty podle vynálezu se popisují dále v textu. Také jsou zahrnuty neomezuující popisy různých nožných a preferovaných složek, které je možné použít v různých provedeních vynálezu.

Vynález může dále obsahovat v podstatě libovolné zde popsané požadované nebo možné složky a/nebo omezení.

Všechny hodnoty vyjádřené v procentech a poměrné hodnoty jsou vyjádřeny v hmotnostních procentech nebo jsou to poměry hmotností, není-li uvedeno jinak. Všechna procenta se vypočítala na základě celkového prostředku, není-li uvedeno jinak.

Množství komponentů a sloučeniny se vztahuje k aktivnímu množství uvedeného komponentu nebo sloučeniny a neobsahují

nečistoty, například zbytková rozpouštědla nebo vedlejší produkty, které se mohou vyskytovat v běžně dostupných zdrojích.

Všechny zde uvedené dokumenty zahrnující patenty, patentové přihlášky a publikace jsou v textu citovány.

V textu jsou uvedeny obchodní jména materiálů, které zahrnují, ale nejsou omezeny na enzymy. Vynález se neomezuje na materiály s jistým obchodním jménem. V proteinázových konjugátech a prostředcích je možné použít ekvivalentní materiály (například ty, které je možné získat z různých zdrojů s různým názvem nebo s různým katalogovým (referenčním) číslem).

K popisu aminokyselin je možné použít zkratky. Tabulka č. 1 poskytuje seznam zkratk.

Tabulka č. 1:

aminokyselina	třípísmenná zkratka	jednopísmenná zkratka
alanin	Ala	A
arginin	Arg	R
asparagin	Asn	A
kyselina aspartová	Asp	D
cystein	Cys	C
glutamin	Gln	Q
kyselina glutamová	Glu	E
glycin	Gly	G
histidin	His	H
isoleucin	Ile	I
leucin	Leu	L
lysin	Lys	K
methionin	Met	M
fenylalanin	Phe	F
prolin	Pro	P

serin	Ser	S
threonin	Thr	T
tryptofan	Trp	W
tyrosin	Tyr	Y
valin	Val	V

Definice

Termín „mutace“ znamená změny genové sekvence a/nebo aminokyselinové sekvence produkované těmito genovými sekvencemi. Mutace zahrnují delece, substituce a adice aminokyselinových zbytků do sekvence proteinu divokého typu.

Termín „základní“ znamená protein (divokého typu nebo jeho variantu), která se využívá k další modifikaci za vzniku proteinázového konjugátu.

Termín „protein divokého typu“ znamená protein, například proteinázu nebo její enzym produkovaný přirozeně se vyskytujícím organismem.

Termín „varianta proteinu“ znamená protein, který má aminokyselinovou sekvenci, která se liší od sekvence odpovídající proteinu divokého typu.

Všechny molekulové hmotnosti polymerů se exprimují jako průměr molekulových hmotností.

Zatímco konjugáty podle vynálezu se neomezují na ty, které obsahují subtilizin BPN' a jeho varianty, číslování aminokyselin se provádí s ohledem na aminokyselinovou sekvenci subtilizinu BPN, která je reprezentována SEQ ID NO: 1. Aminokyselinová sekvence subtilizinu BPN se dále popisuje v publikaci Wells et al., Nucleic Acids Research, Vol. II, pp. 7911-7925(1983).

Konjugáty proteináz podle vynálezu

Konjugáty proteináz podle vynálezu jsou sloučeniny, které obsahují proteinázové části a jednu nebo více dalších částí,

kde proteinázová část a další části jsou spojeny prostřednictvím kovalentního spojení (to je kovalentní vazba).

Proteinázové části

Proteinázové části jsou proteinázy podobné subtilizinu, buď divokého typu nebo jeho varianty. Termín „proteináza podobná subtilizinu“ znamená proteináza, která vykazuje alespoň 50 % a preferuje se 80 % shodu aminokyseliny se sekvencemi subtilizinu BPN'. Proteinázy podobné subtilizinu divokého typu produkují například mikroorganismy *Bacillus alcalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus amylosaccharicus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus* a *Bacillus subtilis*. Serinové proteinázy podobné subtilizinu a jejich homology se popisují v publikaci Siezen et al., „Homology modelling and protein engineering strategy of subtilases, the family of subtilisin-like serine proteases“, Protein Engineering, Vol. 4, No. 7, pp. 719-737 (1991).

Preferované proteinázové části vhodné pro použití zahrnují například ty získané z mikroorganismu *Baccillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis* a *Bacillus subtilis*, dále subtilizin BPN, subtilizin Carlsberg, subtilizin DY, subtilizin 309, proteinázu K a termitázu, dále A/S Alcalase® (běžně dostupné u firmy Novo Industries, Kodaň, Dánsko), Esperase® (Novo Industries), Savinase® (Novo Industries), Maxatase® (běžně dostupné u firmy Genencor International Inc.), Maxacal® (Genencor International Inc.), Maxapem 15® (Genencor International Inc.) a jejich varianty. Zvláště preferované proteinázové části vhodné pro použití zahrnují ty získané z mikroorganismu *Bacillus amyloliquefaciens* a jejich varianty. Nejvíce preferované proteinázové části jsou subtilizin BPN' a jeho varianty.

Zvláště preferované varianty subtilizinu BPN', které se zde nazývají „proteináza A“ se popisují v patentu USA č. 5 030

378 (Venegas, 9.7.1991). Tyto sloučeniny jsou charakterizované aminokyselinovou sekvencí BPN's následujícími mutacemi:

- (a) Aminokyselina Gly v poloze 166 se substituuje aminokyselinovým zbytkem vybraným z Asn, Ser, Lys, Arg, His, Gln, Ala a Glu. Aminokyselina Gly v poloze 169 se substituovala aminokyselinou Ser a aminokyselina Met v poloze 222 se substituovala aminokyselinovým zbytkem vybraným z aminokyselin Gln, Phe, His, Asn, Glu, Ala a Thr nebo
- (b) aminokyselina v poloze 160 se substituovala aminokyselinou Ala a aminokyselina Met v poloze 222 se substituovala aminokyselinou Ala.

Navíc používané preferované varianty subtilizinu BPN' nazvané „proteínázy B“ se popisují v dokumentu EP 251 446 (Genencor International, Inc., 7.1.1988). Tyto látky jsou charakterizované aminokyselinovou sekvencí subtilizinu divokého typu BPN's mutacemi v jedné nebo více z následujících poloh: Tyr21, Thr22, Ser24, Asp36, Ala45, Ala48, Ser49, Met50, His67, Ser87, Lys94, Val95, Gly97, Ser101, Gly102, Gly103, Ile107, Gly110, Met124, Gly127, Gly128, Pro129, Leu135, Lys170, Tyr171, Pro172, Asp197, Met199, Ser204, Lys213, Tyr214, Gly215 a Ser221 nebo ve dvou nebo více polohách uvedených shora v textu kombinovaných s jednou nebo více mutací v polohách vybraných z Asp32, Ser33, Tyr104, Ala152, asn155, Glu156, Gly166, Gly169, Phe189, Tyr217 a Met222.

Jiné preferované varianty subtilizinu BPN' nazvané „proteínázy C“ se popisují v dokumentu WO 95/10 615 (Genencor International inc., 20.4.1995). Tyto sloučeniny jsou charakterizované aminokyselinovou sekvencí subtilizinu BPN' divokého typu s mutací v poloze Asn76 v kombinaci s mutacemi v jedné nebo více jiných poloh vybraných z Asn99, Ser101, Gln103, tyr104, Ser105, Ile107, Asn109, Asn123, Leu126, Gly127, Gly128, Leu135, Glu156, Gly166, Glu195, Asp197,

Ser204, Gln206, Pro210, Ala216, Tyr217, Asn218, Met222, Ser260, Lys265 a Ala274.

Jiné preferované varianty subtilizinu BPN' nazvané „proteínázy D“ se popisují v patentu USA 4 760 025 (Estell et al., 26.7.1988). Sloučenina jsou charakterizované aminokyselinovou sekvencí subtilizinu BPN' divokého typu s mutacemi v jedné nebo více poloh aminokyselin vybraných ze skupiny obsahující Asp32, Ser33, His64, Tyr104, Asn155, Glu156, Gly166, Gly169, Phe189, Tyr217 a Met222.

Výhodnější proteínázové části se vybraly ze skupiny obsahující Alcalase®, subtilizin BPN', proteínázu A, proteínázu B, proteínázu C a proteínázu D, přičemž nejvýhodnější je proteínáza D.

Proteínázové části obsahují alespoň dvě počáteční hydrolytická místa nebo oblasti proteínázové části, která je zvláště náchylná k hydrolýze *in vivo*. Oblast, která je nejvíce náchylná k hydrolýze *in vivo*, odpovídá polohám aminokyselin 160 až 165, které odpovídají subtilizinu BPN'. Jiná oblast náchylná k hydrolýze *in vivo*, jsou polohy aminokyselin 19 a 20, které odpovídají subtilizinu BPN'. Zjistilo se, že tato hydrolytická místa jsou chráněna před hydrolýzou a tak před expozicí epitopů kovalentním připojením jedné nebo více dalších částí k aminokyselině proteínázové části v poloze vybrané z poloh 13, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 84, 85, 88, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 170, 186, 191, 192, 193, 194, 196, 259, 260, 261, 262 a 274, které odpovídají subtilizinu BPN'. Takové polohy se společně nazývají „polohy ochrany hydrolytických míst“.

Polohy se s výhodou vybraly s poloh 13, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 170, 186, 191, 192, 193, 194, 196, 259, 260, 261 a 262, které odpovídají subtilizinu BPN'. Výhodnější je, když se polohy vybraly z poloh 14, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 170, 186, 191, 192, 193, 194, 196, 259, 260,

261 a 262, které odpovídají subtilizinu BPN'. Více se preferují polohy vybrané z poloh 18, 19, 20, 21, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 170, 186, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 259, 160, 261 a 262, které odpovídají subtilizinu BPN'. Dokonce více se preferuje, když se polohy vyberou z poloh 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 170, 186, 191, 192, 193, 194, 196, 259, 260, 261 a 262, které odpovídají subtilizinu BPN'. V této skupině se polohy přednostně vybraly ze skupin 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 170, 191, 192, 193, 194, 261 a 262, které odpovídají subtilizinu BPN'. Více se preferuje, když se polohy vybraly z poloh 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 192, 193, 194, 261 a 262, které odpovídají subtilizinu BPN'. Nejvýhodnější polohy se vybraly z poloh 160, 161, 162, 163 a 261, které odpovídají BPN'.

V preferovaném provedení podle vynálezu proteinázové části obsahují upravenou sekvenci základní aminokyselinové sekvence. Základní aminokyselinová sekvence může být libovolná ze shora uvedených proteináz se stejnými preferovaným omezením, jak se popisuje shora v textu. V jednom provedení se základní aminokyselinová sekvence substituovala v jednom nebo více základním aminokyselinovém zbytku aminokyselinou za vzniku proteinázové části, která je vhodná pro zachycení jedné nebo více adičních částí. V souladu s vynálezem je možné substituci provést v jedné nebo více chránících polohách hydrolytických míst. Chránící polohy hydrolytických míst a preferovaná omezení se popisují shora v textu.

Za účelem dosáhnout selektivního zachycení v jedné nebo více chránících poloh hydrolytických míst jedné nebo více adičních částí k části proteinázy se substituce provede substituční aminokyselinou, která není přítomna v základní aminokyselinové sekvenci. Proto je možné použít libovolnou substituční aminokyselinu, která je jedinečná v případě základní aminokyselinové sekvence. Protože například cysteinový zbytek se nevyskytuje v aminokyselinové sekvenci

divokého typu subtilizinu BPN', je vhodná substituce subtilizinu BPN' s jedním nebo více cysteinovými zbytky v jedné nebo více chránících polohách hydrolytického místa. Jestliže se cysteinový zbytek objeví v poloze jiné než je chránící poloha hydrolytického místa základní aminokyselinové sekvence, je výhodné substituovat jiný aminokyselinový zbytek v každé z těchto poloh, aby se umožnilo selektivní párování s jednou nebo více adičních částí v chránící poloze hydrolytického místa. Cystein je nejvýhodnější aminokyselina pro substituci v jedné nebo více ochránících polohách hydrolytického místa.

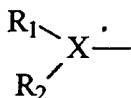
Jinou preferovanou substituční aminokyselinou je lyzin. V případě, že substituční aminokyselina je lyzin, preferuje se mutovat lyzinové zbytky, které se vyskytují v polohách jiných než je chránící poloha hydrolytického místa základní aminokyselinové sekvence, na jiný aminokyselinový zbytek tak, že funkce jednoho nebo více lyzinových zbytků v chránící poloze hydrolytického místa je selektivní. Lyzinový zbytek se například objevil v poloze 170 subtilizinu BPN', která tvoří chránící polohu hydrolytického místa, jak se definuje shora v textu. Může být provedena místně selektivní mutace všech ostatních lyzinových zbytků vyskytujících se v sekvenci subtilizinu BPN' následována selektivní funkcionalizací lyzinového zbytku v poloze 170 s adiční částí. V jiném případě aminokyselinové zbytky v libovolných chránících polohách hydrolytického místa se mohou mutovat například na lyzin, pak následuje selektivní funkcionalizace v uvedených polohách adiční částí.

Adiční části

Proteinázové konjugáty podle vynálezu obsahují jednu nebo více adičních částí, kde každá adiční část je kovalentně připojena k jednomu aminokyselinovému zbytku v chránící poloze hydrolytického místa. Adiční část může být libovolná chemická

struktura. Upřednostňuje se, když adiční části prostorově brání chránící polohu hydrolytického místa, ke které jsou připojeny, nebo libovolnou jinou chránící polohu hydrolytického místa, jak se definuje shora v textu. Neomezené příklady takových adičních částí zahrnují organické molekuly, které mají molekulovou hmotnost menší než je přibližně 1 600, upřednostňuje se molekulová hmotnost nižší než je přibližně 800, výhodnější je molekulová hmotnost nižší než přibližně 400 a nejvýhodnější je molekulová hmotnost nižší než přibližně 300. Mohou to být polypeptidy a polymery. Termín „polypeptid“ znamená molekulu obsahující dva nebo více aminokyselinových zbytků. Termín „polymer“ znamená libovolnou molekulu, která obsahuje dvě nebo více shodných monomerních (upřednostňuje se pět nebo více shodných) jednotek.

Adiční část má přednostně obecný vzorec



kde symbol X se vybral ze skupiny obsahující žádnou část a spojovací část, symbol R_2 se vybral ze skupiny obsahující žádnou část, první polypeptid a první polymer a symbol R_1 se vybral ze skupiny obsahující žádnou část, druhý polypeptid a druhý polymér, kde alespoň jeden symbol z X, R_1 a R_2 představuje spojovací část.

Je výhodné, když proteinázové konjugáty obsahují přibližně 1 až 15 adičních částí, výhodnější je přibližně 2 až 10 adičních částí a nejvýhodnější je přibližně 1 až 5 adičních částí.

Kdy symbol R_1 a R_2 je každý nezávisle na sobě polypeptidová nebo polymerová část, symbol R_1 a R_2 může být shodný nebo odlišný. Výhodné je, v případě, že symbol R_1 je polypeptidová část, symbol R_2 se vybral ze skupiny zahrnující žádnou část a polypeptidovou část a nejvíce se preferuje žádná

část. Nejvíce se preferuje, když symbol R_1 je polypeptidová část, pak symbol R_2 se vybral ze skupiny zahrnující žádnou část a shodnou polypeptidovou část a nejvýhodnější je když symbol R_2 nepředstavuje žádnou část. Výhodné je, když symbol R_1 je polymerová část, symbol R_2 se vybral ze skupiny zahrnující žádnou část a shodnou polymerovou část. V případě, že alespoň jeden ze symbolů R_1 a R_2 je první polymer respektive druhý polymer, pak symbol X je s výhodou jiný než žádná část.

Polypeptidové části

Zde popsané polypeptidové části zahrnují ty, které obsahují dvě nebo více aminokyselinových zbytků. Preferované polypeptidové části se vybraly z proteinů, které zahrnují enzymy. Preferované enzymy zahrnují proteinázy, celulázy, lipázy, amylázy, peroxidázy, mikroperoxidázy, hemicelulázy, xylnázy, fosfolipázy, esterázy, kutinázy, pektinázy, keratinázy, reduktázy (zahrnující například reduktázu NADH), oxidázy, fenoloxidázy, lipoxygenázy, ligninázy, pululanázy, tanázy, pentosanázy, malanázy, b-glukanázy, arabinosidázy, hyaluronidázy, chondroitinázy, laktázy, transferázy, izomerázy (zahrnující například isomerázu glukózy a xylózy), lyázy, ligázy, syntetázy a enzymy pocházející z ovoce (zahrnující například papain). Více preferované enzymy vhodné pro použití jako polypeptidové části zahrnují proteinázy, celulázy, amylázy, lipázy a enzymy pocházející z ovoce, přičemž více se preferují proteinázy.

Příklady lipáz vhodných pro použití jako polypeptidové části zahrnují ty získané z následujících organismů: *Humicola*, *Pseudonomas*, *Fusarium*, *Mucor*, *Chromabakterium*, *Aspergillus*, *Candida*, *Geotricum*, *Penicillium*, *Rhizopus* a *Bacillus*.

Příklady komerčních lipáz zahrnují Lipolase®, Lipolase Ultra®, Lipozyme®, Palatase®, Novozym435® a Lecfitase® (všechny uvedené prostředky jsou běžně dostupné od firmy Novo

Nordisk, Kodaň, Dánsko), Lumafast® (běžně dostupné u firmy Genencor, Int., Rochester, NY) a Lipomax® (Genencor, Int.).

Příklady proteináz vhodných pro použití jako polypeptidové části, která zahrnuje serinové proteinázy, chymotripsin a enzymy typu elastázy. Nejvíce preferované protienázy vhodné pro použití jako polypeptidová část zahrnují serinové proteinázy, jak se definovaly shora v textu v sekci „proteinázové části“.

Nejvíce se preferuje, když polypeptidová část je serinová proteináza pak polypeptidová část nese nezávisle definici proteinázové části, jak se popisuje shora v textu. Jak se popisuje shora v textu polypeptidová část má upravenou aminokyselinovou sekvenci základní aminokyselinové sekvence, kde k úpravě došlo v jedné nebo více chránících poloh hydrolytického místa, jak se popisuje shora v textu (základní aminokyselinová sekvence se zde označuje jako druhá základní aminokyselinová sekvence). V tomto případě jedna ze spojovacích částí (kde existuje spojovací část) nebo proteinázová část (kde neexistuje spojovací část) je kovalentně zachycena na polypeptidové části prostřednictvím jedné ze substitučních aminokyselin přítomných v jedné z ochranných poloh hydrolytického místa polypeptidové části. V případě, že polypeptidová část je serinová proteináza, stejně preferované, více preferované a nejvíce preferované řazení do skupin chránících poloh hydrolytického místa se aplikuje způsobem popsaným shora v textu v případě proteináz a jejich odpovídajících základních aminokyselinových sekvencí.

V případě, že polypeptidová část je serinová proteináza, polypeptidová část a proteinázová část jsou ekvivalentní částí. v tomto případě polypeptidová část a proteinázová část se přednostně zachycují přes disulfidový můstek, kde symbol X nepředstavuje žádnou část a nejvíce se preferuje, když symbol R₂ nepředstavuje žádnou část.

Polymerové části

Adiční části mohou obsahovat polymerové části. Termín polymerová část znamená libovolnou molekulu, která obsahuje dvě nebo více shodných (přednostně pět nebo více) monomerních jednotek. Příklady vhodných polymerních částí zahrnují polyalkylenoxidy, polyalkoholy, polyvinylalkoholy, polykarboxyláty, polyvinylpyrrolidony, celulózy, dextrany, škroby, glykogeny, agarózy, guarový polysacharid, pululan, inulin, xantamová guma, karagenan, pektin, hydrolyzáty kyseliny alginové a hydrozyláty chitosanu. Preferované polyalkylenoxidy zahrnují polyethylenglykoly, methoxypolyethylenglykoly a polypropylenglykoly a polypropylenglykoly. Preferované dextrany zahrnují karboxymethyldextrany. Preferované celulózy zahrnují methylcelulózu, karboxymethylcelulózu, ethylcelulózu, hydroxyethylcelulózu, karboxyethylcelulózu a hydroxypropylcelulózu. Preferované škroby zahrnují hydroxyethylové škroby a hydroxypropylové škroby. Více preferované polymery jsou polyalkylenoxidy. Nejvíce preferované polymerní části je polyethylenglykol.

V případě, že každý ze symbolů R_1 a R_2 nezávisle na sobě jsou polymerní části, symbol R_1 a R_2 vykazují celkovou molekulovou hmotnost (to znamená molekulovou hmotnost symbolu R_1 plus molekulovou hmotnost symbolu R_2) přibližně 0,2 kDa až přibližně 40 kDa, více se preferuje přibližně hodnota 0,5 kDa až 40 kDa, dokonce více se preferuje hodnota přibližně 0,5 kDa až 20 kDa a nejvíce se preferuje hodnota od 1 kDa až 10 kDa.

V případě, že symboly R_1 a R_2 jsou každý polymerová část, každý symbol R_1 a R_2 nezávisle vykazuje hodnotu molekulové hmotnosti přibližně 0,1 kDa až přibližně 20 kDa, více se preferuje hodnota od 0,25 kDa až přibližně 20 kDa, dokonce více se preferuje hodnota od 0,5 kDa až přibližně 10 kDa a nejvíce se preferuje hodnota od přibližně 0,5 kDa až přibližně 5 kDa.

V případě, že každý symbol R_1 a R_2 je polymerová část, poměr molekulových hmotností symbolu R_1 až R_2 je přednostně v rozmezí od 1:10 až přibližně 10:1, více se preferují poměry 1:5 až 5:1, ale nejvíce se preferují poměry 1:3 až 3:1.

V případě, že symbol R_1 je polymerová část a symbol R_2 nepředstavuje žádnou část, symbol R_1 přednostně má molekulovou hmotnost přibližně 0,1 kDa až 40 kDa, více se preferuje hodnota přibližně 0,5 kDa až 40 kDa, dokonce více se preferuje hodnota přibližně 0,5 kDa až 20 kDa a nejvíce se preferuje hodnota přibližně 1 kDa až 10 kDa.

Spojovací části

Symbol X nepředstavuje žádnou část nebo představuje spojovací část, která je kovalentně zachycena na jedné nebo více polypeptidových částí a/nebo na jednu nebo více polymerních částí, a je také kovalentně přichycena na aminokyselinovém zbytku jedné z chránících poloh hydrolytického místa proteinázové části. Spojovací část může být v obecném případě libovolná malá molekula, to znamená molekula, která má molekulovou hmotnost menší než je přibližně 1 600, upřednostňuje se nižší než přibližně 800, více se upřednostňuje méně než přibližně 400 a více se upřednostňuje méně než přibližně 300. Nejvíce preferované spojovací části zahrnují ty, které jsou schopny se kovalentně vázat na cysteinový zbytek nebo lyzinový zbytek, přičemž výhodný je cysteinový zbytek.

Příklady spojovacích částí se popisují v dokumentech patent USA č. 5 446 090 (Harris, 29.8.1995), patent USA č. 5 171 264 (Merrill, 13.12.1992), patent USA č. 5 162 430 (Rhee et al., 10. 11.1992), patent USA č. 5 153 265 (Shadle et al., 6.10.1992), patent USA č. 5 122 614, (Zalipsky, 16.6.1992, Goodson et al., „Site -directed pegylation of recombinant interleukin-2 at its glycosylation site“ Biotechnology, Vol.8, No.4, pp. 343-346 (1990)), Kogan, „The synthesis of

substituted methoxy-poly(ethyleneglycol) derivatives suitable for selective protein modification", Synthetic Communications, Vol. 22, pp. 2417-2424 (1992) a Ishii et al., „Effects of the state of the succinimido-ring on the fluorescence and structural properties of pyrenemaleimide-labeled aa-tropomyosin", Biophysical Journal, Vol. 50, pp.75-80 (1986). Nejvíce preferovanou spojovací částí je substituovaný (například alkylem) nebo nesubstituovaný sukcinimid.

Jako příklad se mohou použít další nelimitující činidla za vzniku spojovací části: ester N-[alfa-maleimidoacetoxy]sukcinimidu, N-5-azido-2-nitrobenzoaloxysukcinimid, bismaleimido-hexan, ester N-[beta-maleimidopropoxy]sukcinimidu, bis[2-(sukcinimidyloxykerbonyloxy)ethyl]sulfon, bis[sulfosukcinimidyl]suberát, 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzen, dimethyladipimát . 2 HCl, dimethylpimelimidát . 2HCl, dimethylsuberimát . 2 HCl, disukcinimidylglutarát, disukcinimidylsuberát, ester m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysukcinimidu, N-hydroxysukcinimidyl-4-azidosalicylická kyselina, N-sukcinimidyl-6-[4'-azido-2'-nitrofenylamino]hexanoát, N-hydroxysukcinimidyl, 2,3-dibromopropionát, sukcinimidyl, 4-[N-maleimidomethyl]cyklohexan-1-karboxylát, sukcinimidyl-4-(p-maleimidofenyl)butyrát, sukcinimidyl-6-[(beta-maleimidopropionamido)hexanoát], bis[2-(sulfosukcinimidyloxykarbonyloxy)ethyl]sulfon, ester N-[beta-maleimidobutyryloxy]sukcinimidu, N-hydroxysulfosukcinimidyl-4-azidobenzoát, ester N-[kappa-maleimidoundekanoyloxy]sulfosukcinimidu, ester m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysulfosukcinimidu, sulfosukcinimidyl[4-azidosalicylamido]hexanoát, sulfosukcinimidyl-7-azido-4-methylkumarin-3-acetát, sulfosukcinimidyl-6-[4'-azido-2'-nitrofenylamino]hexanoát, sulfosukcinimidyl-4-[p-azidofenyl]butyrát, sulfosukcinimidyl[4-jodoacetyl]aminobenzoát, sulfosukcinimidyl-4-[N-maleimidomethyl]cyklohexan-1-karboxylát a sulfosukcinimidyl-4-(p-maleimidofenyl)butyrát. Každý z těchto

činidel je běžně dostupný u firmy Pierce Chemical Co., Rockford, IL.

Další možné části

Proteinázový konjugát může navíc obsahovat jednu nebo více jiných chemických struktur, které zahrnují (například) jednu nebo více malých molekul polypeptidů a/nebo polymerů zachycených na jiných zbytcích proteinázy nebo dokonce v poloze chránící hydrolytické místo, která ne nese adiční část (zde se označuje jako „doplňková část“). Doplňkové části mohou zahrnovat polypeptidové části, polymerové části a spojovací části, jak se popisují shora v textu. Navíc například jeden nebo více polymerů (nejvíce se preferuje polyethylenglykol), který má molekulovou hmotnost přibližně 100 Da až 500 Da, s výhodou přibližně 100 Da až 2 000 Da, více se preferuje 100 Da až 1 000 Da, stále více se preferuje 100 Da až 750 Da a nejvíce se preferuje 300 Da, se může kovalentně zachytit na proteinázovou část na zbytku jiném než jsou zde uvedené. Takové polymerové části se mohou přímo zachytit na proteinázové části v libovolné poloze proteinázové části za použití zde popsaných postupů stejně jako těch, které jsou dobře známy v oboru (zahrnující zde popsané spojovací části). Neomezující příklady konjugace polymeru tohoto volitelného typu se popisuje v dokumentu WO 99/00849 (Olson et al., Novo Nordisk A/S, 7.1.1999).

Způsob přípravy

Připravily se proteinázové části vykazující substituci v jedné nebo více chránících poloh hydrolytického místa (nebo v libovolné jiné poloze části) mutací nukleotidových sekvencí, které kódují základní aminokyselinovou sekvenci. Takové metody jsou dobře známy v oboru a neomezující příklady takových metod jsou popsány dále v textu:

Fágemid (pSS-5) obsahující gen subtilizinu BPN'divokého typu (popisuje se v publikaci Mitchison, C. and J.A.Wells, „Protein Engineering of disulfide bonds in subtilisin BPN,“ Biochemistry, Vol. 28, pp. 4807-4815 (1989) se transformoval do mikroorganismu *Escherichia coli* dut-ung kmen CJ23. Jednořetězcové templátové DNA obsahující uracil vznikla za použití pomocného fágu VCSM13 (popisuje se v publikaci Kunkel et al., „Rapid and efficient sitespecific mutagenesis without fenotypic selections,“ Methods in enzymology, vol 154, pp.367-382 (1987), který se upravil způsobem popsáným v publikaci Yuckenberg et al., „Site-directed in vitro mutagenesis using uracil containing DNA a phagemid vectors,“ Directed mutagenesis - A practical approuch, McPherson, M. J. ed., pp. 27-48 (1991). Primer site-directed mutagenesis modified from the method disclosed in Zoller, M. J., and M. Smith, „Oligonucleotide - directed mutagenesis using M13 - derived vectors: An efficient and general procedure for the production of point mutations in any fragment of DNA,“ Nucleic Acids Research, Vol. 10, pp. 6487-6500 (1982) se používá k produkci všech mutantů (jako se popisuje v publikaci uvedené shora v textu Yuckenberg et al., „Site-directed in vitro mutagenesis using uracil containing DNA a phagemid vectors,“ Directed mutagenesis - A practical approuch, McPherson, M. J. ed., pp. 27-48 (1991)).

Oligonukleotidy se připravily použitím syntetizéru pro DNA typ 380 B (vyroben firmou Applied Biosystems Inc.). Produkty mutačních reakcí se transformovaly do mikroorganismu *Escherichia coli* kmene MM294 (uloženého v instituci American Type Culture Collection *E. coli* 33626). Všechny mutace se potvrdily sekvenací DNA a izolovaná DNA se transformovala do expresivního kmene *Bacillus subtilis* PG632 (popisuje se v publikaci Saunder et al., „Optimization of the Signal-sequence cleavage site for secretion from *Bacillus subtilis* of a 34-amino acid fragment of human parathyroid hormone,“ Gene,

Vol. 102, pp. 277-282 (1991) and Yang et al., „Cloning of the Neutral protease gene of *Bacillus subtilis* and the use of cloned gene to create an in vivo - derived deletion mutation,” *Journal of Bacteriology*, Vol. 160, pp. 15-21 (1984).

Fermentace probíhá následujícím způsobem. Buňky *Bacillus subtilis* (PG632) obsahující proteinázu se kultivovaly do střední logaritmické fáze v kultuře o objemu jednoho litru kultivačního média LB, které obsahuje 10 g/l glukózy a inukolovala se do fermentátoru Biostat C (vyrobený firmou Braun Biotech, Inc., Allentown, PA) v celkovém objemu 9 litrů. Fermentační médium obsahuje kvasinkový extrakt, hydrolyzát kaseinu, rozpustný částečně hydrolyzovaný škrob (Maltrin M-250), činidlo bránící tvoření pěny, pufrý a stopové množství minerálů (popisuje se v publikaci "Biology of Bacilli: Applications to Industry," Doi, R. H. and M. McGloughlin, eds. (1992)). Během fermentace se pH kultivačního média udržovala na hodnotě 7,5. Za účelem selekce na základě rezistence na antibiotika se přidal kanamycin (50 µg/ml). Buňky se nechaly kultivovat po dobu 18 hodin při teplotě 37 °C do té doby, kdy hodnota absorbance při vlnové délce 600 nm dosáhla hodnoty přibližně 600 a pak se shromáždil produkt.

Fermentační médium prošlo dalšími kroky, aby se získala čistá proteináza. Buňky mikroorganismu *Bacillus subtilis* se odstranily z kultivačního média tangenciálním tokem proti membráně o velikosti pórů 0,16 µm. Koncentrace kultivačního média bez buněk se pak zvýšila ultrafiltrací přes membránu, která odděluje molekuly s molekulovou hmotností 8 000. pH se pak upravilo na hodnotu 5,5 koncentrovaným pufrm MES (2-(N-morfolin)ethansulfonová kyselina). Proteináza se dále čistí chromatografií s výměnou kationtů na S sefaróze a eluuje se gradientem NaCl (Scopes, R. K., „Protein purification Principles and Practice ,” Springer-Verlag, New York (1984).

Test pNA (popisuje se v publikaci DelMar et al., *Analytical Biochemistry*, Vol. 99, pp. 316 - 320 (1979)) se

používal ke stanovení koncentrace aktivní proteinázy v případě frakcí získaných během eluce gradientem. Tento test měří rychlost, kterou se uvolňuje *p*-nitroanilin při hydrolýze rozpustného syntetického substrátu proteinázou, sukcinyl-alanin-alanin-prolin-fenylalanin-*p*-nitroanilin (sAAPF-*p*NA). Rychlost produkce žluté barvy z hydrolytické reakce se měřila při 410 nm na spektrofotometru a je přímo úměrná koncentraci proteinázové části. Navíc měření absorpance při vlnové délce 280 nm se použilo ke stanovení celkové koncentrace proteinu. Poměr aktivní proteináza/celkový protein udává čistotu proteinázy a používá se při identifikaci frakcí, které se pak spojí a vzniká zásobní roztok.

Aby se zabránilo autolýze během uchovávání proteinázy, přidá se do frakcí, které se získaly z chromatografické kolony stejná hmotnost propylenglykolu. Po ukončení procesu čištění se kontroluje čistota zásobního roztoku proteinázy použitím SDS-Page (elektroforéza na polyakrylovém gelu za použití SDS) a absolutní koncentrace enzymu se stanovila prostřednictvím metody titrace aktivního místa za použití inhibitoru trypsinu typu II-T pocházejícího z bílku vejce krocana (vyrábí firma Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri).

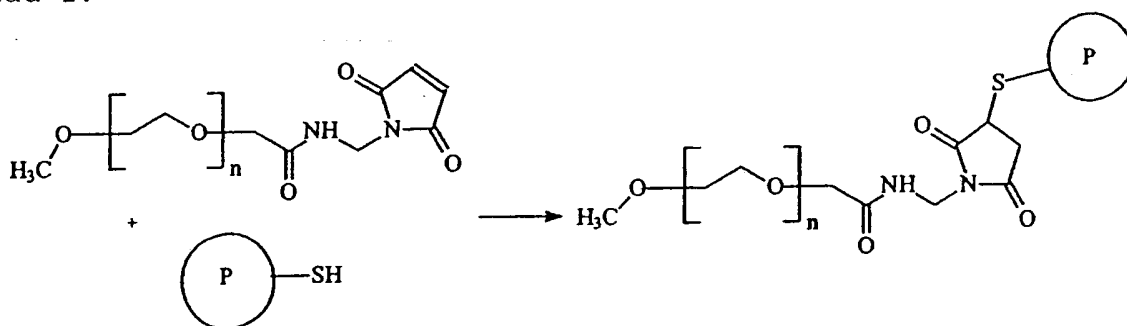
Při přípravě pro použití se k odstranění propylenglykolu ze zásobního roztoku proteinázy použila kolona, která dělí látky na základě velikosti molekul (Sephadex-G25, Pharmacia, Piscataway, New Jersey) a vyměnil se pufr. Pufr MES v zásobním roztoku enzymu se vyměnil za roztok 0,01 M KH_2PO_4 s hodnotou pH 5,5.

Připravené proteinázy je možné využít k funkcionalizaci jedné nebo více adičních částí za vzniku proteinázového konjugátu. Prekurzor adiční části (prekurzor adiční části reaguje s prekurzorem proteinázové části za vzniku proteinázového konjugátu, který je obsažen v adiční části a v proteinázové části) se přednostně aktivuje, aby se zvýšila reaktivita s prekurzorem proteinázové části. Způsob takové

aktivace je dobře znám v oboru. Neomezující příklady takových metod přípravy proteinázového konjugátu se popisují dále v textu.

Příklady provedení vynálezu

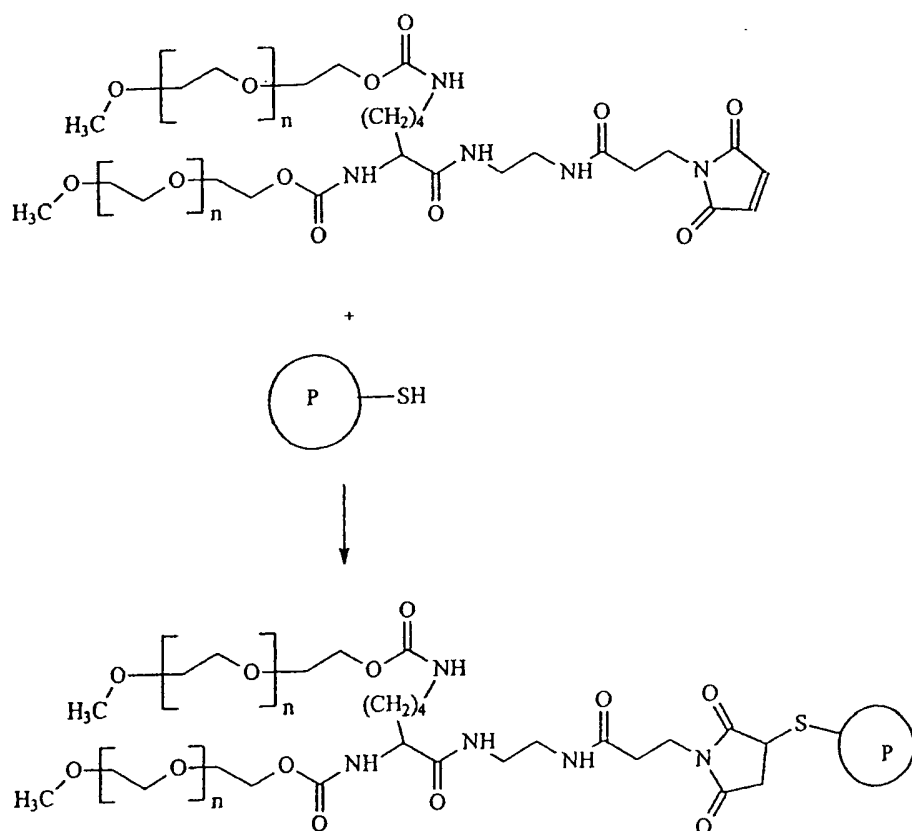
Příklad 1:



Proteináza obsahující cysetinový zbytek v jedné z chránících poloh hydrolytického místa je spojena s polymerovou částí podle shora uvedeného schématu za použití následující metody (kde symbol P reprezentuje proteinázovou část bez thiolové skupiny, která vzniká substitucí cysteinu a symbol n je počet opakujících se monomerních jednotek polyethylenglykolu (například symbol $n = 77$)).

Připravila se varianta subtilizinu BPN' vykazující substituci leucinu za tyrozin v poloze 217 a substituci cysteinu za serin v poloze 161. Dosáhla se koncentrace přibližně 2 mg/ml varianty v fosfátovém pufru (pH 5,5). Hodnota pH se pak upravila na hodnotu 7,5 ředěným roztokem hydroxidu sodného. Varianta se smíchala s monomethylpolyethylenglykolmaleimidem v poměru 25 : 1, přičemž varianta je v nadbytku. Po jedné hodině míchání při teplotě okolí se hodnota pH směsi upravila na hodnotu 5,5 ředěnou kyselinou fosforečnou a filtrací přes molekulární ultrafiltr se odstranil nadbytečný polymer. Koncentrát obsahuje čištěný proteinázový konjugát.

Příklad 2:



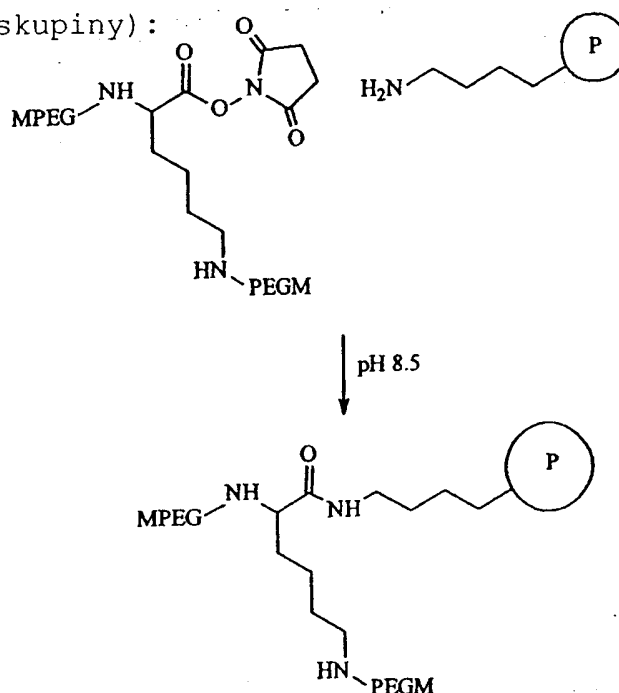
Proteinázové části obsahující cysteinový zbytek v jedné z chránících poloh hydrolytického místa je spojena s polymerní částí podle shora uvedeného schématu za použití následující metody (kdy symbol P znamená proteinázovou část bez thiolové skupiny, která vzniká substitucí cysteinu a symbol n je počet opakujících se monomerních jednotek každého polyethylenového glykolu (například symbol n má hodnotu 77)).

Připravila se varianta subtilizinu BPN' se substitucí leucinu za tyrozin v poloze 217 a se substitucí cysteinu za fenylalanin v poloze 261. Koncentrace varianty ve fosforečnanovém pufru (pH 5,5) je přibližně 2 mg/ml). Hodnota pH se pak zvýšila na hodnotu 7,5 ředěním hydroxidem sodným. Varianta se smíchala s dimethylpolyethylenglykolmaleimidem v poměru 25 : 1, kdy varianta je v nadbytku. Po jedné hodině míchání při teplotě okolí se pH směsi upravilo na hodnotu 5,5 ředěnou kyselinou fosforečnou a směs se filtrovala přes

molekulární filtr, který oddělí molekuly určité velikosti molekul, čímž se odstraní nadbytek polymeru. Koncentrace zahrnuje čištěný proteinázový konjugát.

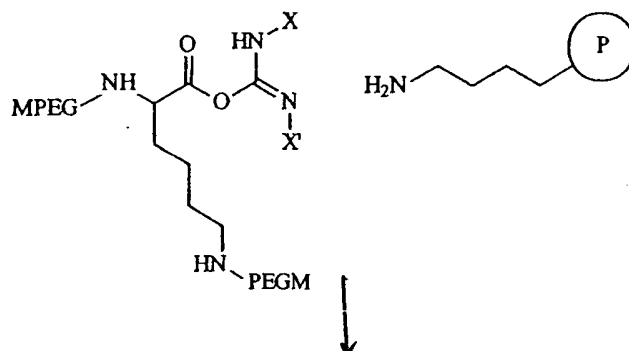
Příklad 3:

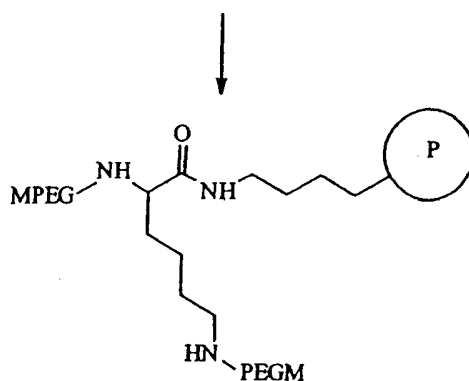
Polymer chráněný sukcinimidem se spojuje s lyzinem v jedné nebo více chránících polohách hydrolytického místa (kde MPEG a PEGM jsou ekvivalentní a reprezentují monomethylpolyethylglykoly a kde symbol P reprezentuje proteinázovou část bez lyzinové aminoskupiny):



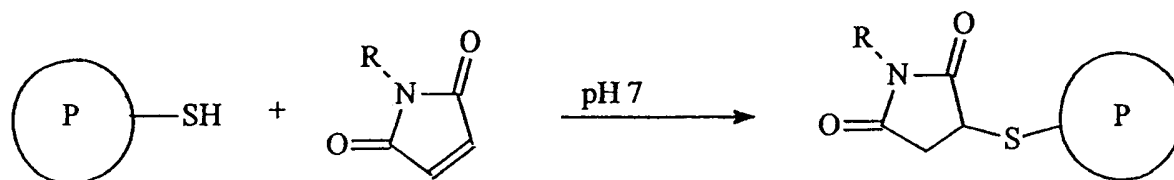
Příklad 4:

Polymer chráněný karbodiimidem se selektivně spojuje s lyzinem v jedné nebo více chráněných poloh hydrolytického místa (kde MPEG a PEGM jsou ekvivalentní a reprezentují monomethylpolyethylenglykoly, symbol P reprezentuje proteinázovou část bez lyzinové aminoskupiny a symbol X a X' jsou vedlejší řetězce obsahující karbodiimidovou část například alkyly.):





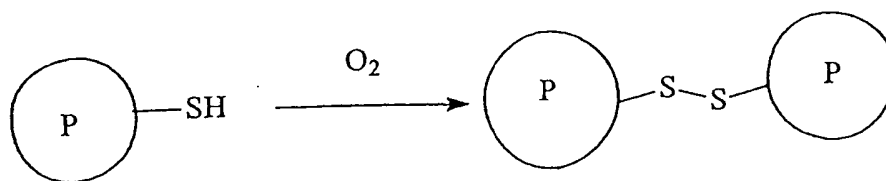
Příklad 5:



Proteinázová část obsahující cysteinový zbytek v jedné chránící poloze hydrolytického místa se spojila s alkylmaleimidem za použití následující metody (kde symbol P reprezentuje proteinázovou část bez thiolové skupiny, která vzniká substitucí cysteinu, a symbol R je alkylová skupina). V tomto příkladu každý symbol R₂ a R₂ nepředstavuje žádnou část a spojovací skupina se získala z alkylmaleimidu.

Připravila se varianta subtilizinu BPN' se substitucí leucinu za tyrozin v poloze 217 a substitucí cysteinu za serin v poloze 163. Připravilo se 20 ml roztoku varianty v koncentraci přibližně 1 mg/ml v pufru 0,01 M KH₂PO₄ (pH 7). K roztoku se přidalo 1,5 ekvivalentů alkylmaleimidu (například methylmaleimid). Roztok se mírně míchal při teplotě okolí po dobu přibližně jedné hodiny. Výsledný konjugát proteinázy se získal z roztoku standardní metodou.

Příklad 6:



2 ekvivalenty

1 ekvivalent

Proteinázová část obsahující cysteinový zbytek v jedné chránící poloze hydrolytického místa tvoří dimer za použití následující metody (symbol P reprezentuje proteinázovou část bez thiolové skupiny, která je výsledkem substituce cysteinu). V tomto příkladu proteinázová část a polypeptidová část jsou ekvivalentní (a symbol X nepředstavuje žádnou část).

Připravila se varianta subtilizinu BPN' se substitucí leucinu za tyrozin v poloze 217 a substituce cysteinu za serin v poloze 163. Připravilo se 20 ml varianty v koncentraci přibližně 1 mg/ml v pufru 0,01 M KH_2PO_4 (hodnota pH je 8,6). Kyslík se nechal probublávat roztokem v malé intenzitě při teplotě okolí po dobu přibližně jedné hodiny za vzniku dimeru proteinázového konjugátu. Výsledný proteinázový konjugát se získal z roztoku standardními metodami.

Analytické metody

Enzymatická aktivita a imunogenní odezvy se testovaly u proteinázových konjugátů za použití následujících metod, obě metody jsou známe v oboru. Alternativně se mohou použít i další metody, které jsou dobře známy v oboru.

Aktivita proteinázových konjugátů

Proteinázová aktivita proteinázových konjugátů podle vynálezu se může testovat způsoby, které jsou dobře známy v oboru. Dvě takové metody jsou uvedeny dále v textu.

Způsob stanovení aktivity šupin kůže

Použitím lepicí pásky Scotch® #3750G se z nohou opakovaně izolovaly šupinky lidské kůže až je páska matná. Páska se pak nastříhá na kousky o velikosti 2,5 cm². V petriho misce o rozměrech 10 krát 35 mm se do pufru 0,01 M KH₂PO₄ pH 5,5 přidají 2 ml 0,75 mg/ml kontrolního enzymu (například subtilizin BPN') nebo testovaného proteinázového konjugátu. K roztoku se přidá 1 ml 2,5 % laurátu sodného s pH 8,6. Roztok se míchá na míchadle. Dříve připravené čtverečky lepicí pásky se namočily do roztoku (šupinami nahoru) po dobu deseti minut a pokračovalo se v míchání. Čtverečky lepicí pásky se pak promyjí ve vodě pod kohoutkem po dobu 15 vteřin. Do čisté petriho misky se pak pipetou nanese 3 ml Stevenelova modrého barviva (běžně dostupného u firmy Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Opláchnuté čtverce se umístily do barviva po dobu tří minut (šupinami nahoru) a jemně se míchaly. Čtverečky lepicí pásky se odstranily z barviva a promyly se dvakrát po sobě v kádince o objemu 300 ml v destilované vodě. Jedno promytí trvalo 15 vteřin. Čtverečky lepicí pásky se nechaly schnout na vzduchu. Vizuálně a pomocí chromometru se porovnávala intenzita barvy mezi čtverečky lepicí pásky získané použitím kontrolního enzymu a čtverečky lepicí pásky získané použitím proteinázového konjugátu. V porovnání se čtverečkem s kontrolním enzymem čtvereček lepicí pásky s proteinázovým konjugátem vykazuje menší intenzitu zbarvení, což naznačuje, že proteinázový konjugát má vysokou aktivitu.

Způsob stanovení aktivity kolagenu barvením

Kombinuje se 50 ml pufru 0,1 M Tris (tris-hydroxymethylaminomethan), který obsahuje 0,01 M CaCl₂. Hodnota pH je 8,6. Vznikne 0,5 g látky Azocoll (což je azobarvivem impregnovaný kolagen, který je běžně dostupný u firmy Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Tato směs se inkubuje při teplotě 25 °C, zatímco se jemně míchá na míchadle. Směs o objemu 2 ml se filtruje přes filtr o velikosti pórů 0,2

mikronů a hodnota absorbance směsi se odečítá na spektrofotometru při vlnové délce 520 nm. Za účelem testování zbývajících 48 ml směsi Tris/Azocoll se přidá 1 ppm kontrolního enzymu (což je například subtilizin BPN') nebo proteinázový konjugát. Každé 2 minuty se filtrují 2 ml roztoku, který obsahuje kontrolní/proteinázový konjugát přes filtr s velikostí pórů 0,2 ^{um} mikrony, přičemž celková doba filtrace je 10 minut. V případě každého filtrovaného vzorku se absorbance odečítá při vlnové délce 520 nm. Výsledky se vynesly do grafu proti času. Strmost křivky pro kontrolní a testovaný konjugát ukazují relativní aktivity vzorků. Vyšší strmost ukazuje vyšší aktivitu. Aktivita testovaného proteinázového konjugátu (strmost) se může exprimovat jako procento kontrolní aktivity (strmost).

Myší intranasální test imunogennosti

Imunogenní potenciál proteinázových konjugátů podle vynálezu se může stanovit použitím metod známých v oboru nebo myším intranasálním testem imunogennosti, který se popisuje dále v textu. Tento test je podobný testům popsáným v publikaci Robinson et al., „Specific antibody responses to subtilisin Carlsberg (Alcalase) in mice: Development of an intranasal exposure model,” Fundamental and Applied Toxicology, Vol. 34, pp. 15- 24 (1996) a Robinson et al., „Use of the mouse intranasal test (MINT) to determine the allergenic potency of detergent enzymes: Comparison to the guinea pig intratracheal (GPIT) test”, Toxicological Science, Vol. 43, pp. 39-46 (1998). Oba testy je možné použít místo testu uvedeného dále v textu.

Pro test se použila samice myši BDF1 (Charles River Laboratories, Portage, MI) s tělesnou hmotností přibližně 18 až 20 gramů. Myši se drží jeden týden před aplikací dávky v karanténě. Myši se pěstují v klecích s podestýlkou z dřevěných pilin a v kleci se reguluje vlhkost (30 až 70 %),

teplota (při teplotě 20 °C až 25 °C) a s cykly světlo-tma trvajícími 12 hodin. Myši se krmily krmivem Purina® (Purina Mills, Richmond, IN) a vodou podle libosti.

Testovaný potencionální antigen (buď subtilizin BPN', jako pozitivní kontrola nebo proteinázový konjugát podle vynálezu) se aplikuje pěti myším ve skupině. Před aplikací se provedla anesteze intraperitoneální injekcí (i.p.) směsí přípravků Ketaset (88,8 mg/kg) a Rompum (6,67 mg/kg). Zvířata, kterým se provádí anesteze se drží na dlani ruky zády dolů a aplikuje se jim intranasálně 5 ml proteinázy v roztoku pufru (0,01 M KH_2PO_4 , pH 5,5). Zatímco každé skupině se aplikovala stejná dávka, mohou se testovat různé dávky. Roztok se nanese vně každé nozdry a myš ho inhalovala. Aplikace se opakuje v den 3, 10, 17 a 24.

V den 29 se shromáždily vzorky séra. V myším séru se testem ELISA měřilo množství IgG1 protilátek specifických pro enzym. Imunogennost proteinázového konjugátu se může porovnat s imunogenností subtilizinu BPN' použitím standardních hodnot ED_{50} .

Prostředky podle vynálezu

Proteinázové konjugáty se mohou použít při libovolné aplikaci, která je vhodná pro základní proteinázu. Jedním takový příkladem je čisticí prostředek. Vzhledem k požadované snížené imunogennosti proteinázového konjugátu, se může proteinázový konjugát dále použít při aplikacích, které vykazují minimální výhody z použití proteináz. Příklady takových aplikací zahrnují ty, ve kterých proteinázový konjugát se nezbytně dostává do blízkého kontaktu s kůží savce (zvláště s lidskou kůží), jako je použití prostředků osobní péče.

Čisticí prostředky

Proteinázové konjugáty se mohou použít v čistících prostředcích, které zahrnují, ale nejsou omezeny na prací prostředky, čistící prostředky určené na silně znečištěné povrchy, čistící prostředky určená na nádobí a detergenty určené do myček nádobí.

Čistící prostředky obsahují účinné množství jedné nebo více proteinázových konjugátů podle vynálezu a nosič.

Termín „účinné množství proteinázového konjugátu“ nebo podobně znamená množství proteinázového konjugátu nezbytného k dosažení proteolytické aktivity nezbytné pro specificky čistící prostředek. Pro odborníka je jednoduché stanovit takové účinné množství a takový odhad je založen na mnoha faktorech, jako je používaný proteinázový konjugát, druh aplikace, specifická látka čistícího prostředku a zda se použije kapalný nebo suchý (granulát nebo tyčinka) prostředek a podobně. Čistící prostředek s výhodou obsahuje přibližně 0,0001 % až 10 % jednoho nebo více proteinázových konjugátů podle vynálezu, více se preferuje přibližně 0,001 % až 1 % a nejvíce se preferuje 0,01 % až 0,1 %. Dále v textu se popisují příklady různých čistících prostředků, kde je možné použít proteinázové konjugáty.

Navíc proteinázové konjugáty a čistící prostředky dále obsahují nosič čistící sloučeniny obsahující jeden nebo více čistících materiálů kompatibilních s proteinázovým konjugátem. Termín „čistící materiál“ znamená libovolný materiál vybraný z určitého typu požadované čistící sloučeniny a formy produktu (například kapalina, granule, tyčinka, sprej, pasta, gel), přičemž uvedený materiál je také kompatibilní s proteinázovým konjugátem, který se používá v čistícím prostředku. Specifický výběr čistícího prostředku se často uskuteční na povrchu materiálu, který se čistí, a na požadované formě prostředku vhodném pro podmínky čištění během použití (například během použití pracího prostředku). Termín „kompatibilní“ znamená, že čistící prostředek neredukuje proteolytickou aktivitu

proteínázového konjugátu v takovém rozsahu, že proteínáza stává neúčinnou, jak se požaduje během normálních podmínek použití. Specifické čisticí materiály se popisují dále v textu.

Proteínázové konjugáty podle vynálezu se mohou použít v různých detergentech, kde se vyžaduje tvorba bublin a dobré čisticí vlastnosti. Takové proteínázové konjugáty se mohou použít s různými běžnými látkami, aby vznikl čisticí prostředek určený pro silně znečištěné povrchy, prostředky určené pro myčky na nádobí, prostředky pro praní barevného prádla a podobně. Takové prostředky mohou být ve formě roztoků, granulí, tyčinek a podobně. Takové kompozice se mohou tvořit ve formě „koncentrovaného“ detergentu, který obsahuje přibližně 30 % až 60 % (hmotnostních) povrchově aktivního činidla.

Čisticí prostředky mohou obsahovat různé povrchově aktivní činidla (například anionogenní, neionogenní nebo zwitterionogenní povrchově aktivní činidla). Taková povrchově aktivní činidla jsou v typickém případě přítomny v množství od přibližně 5 % do 35 %.

Nelimitující příklady povrchově aktivních činidel zahrnují C_{11} - C_{18} alkylbenzensulfonáty a primární a náhodné alkylsulfáty, C_{10} - C_{18} sekundární (2,3)-alkylsulfáty vzorce $CH_3(CH_2)_x(CHOSO_3)^- M^+$ CH_2CH_3 , kde symbol x a $(y+1)$ jsou celá čísla, jejichž hodnota je alespoň 7, s výhodou alespoň 9 a symbol M je ve vodě rozpustný kation, zvláště sodík, C_{10} - C_{18} alkylalkoxysulfáty (zvláště EO 1-5 ethoxysulfáty), C_{10} - C_{18} alkylalkoxykarboxyláty (zvláště EO 1-5 ethoxykarboxyláty), C_{10} - C_{18} alkylpolyglykosidy a jejich odpovídající sulfátované polyglykosidy, C_{12} - C_{18} a-sulfo-nátované estery mastných kyselin, C_{12} - C_{18} alkyl a alkylfenolalkoxyláty (zvláště ethoxaláty a smíchané ethoxyskupiny a propoxyskupiny), C_{12} - C_{18} betainy a sulfobetainy („sultainy“), C_{10} - C_{18} aminoxidy a podobně. Preferují se alkyloxysulfáty (AES) a alkyloxykarboxyláty (AEC). Výhodné je

použití takových povrchově aktivních činidel v kombinaci s aminoroxidem a/nebo s betainem nebo sultainem v závislosti na požadované formě čistícího prostředku. Jiné běžné použitelné povrchově aktivní činidla jsou uvedena ve standardních textech. Zvláště použitelné povrchově aktivní činidla zahrnují C_{10} - C_{18} -a-methylglukamidy popsané v dokumentu patent USA č. 5 194 639 (Connor et al., 16.3.1993).

V detergentových čistících prostředcích je možné použít různé jiné látky, které mohou zahrnovat například aktivní složky, nosiče, hydrotropní látky, pomocná činidla, barviva, pigmenty a rozpouštědla v kapalné formě. Jestliže se vyžaduje silnější pění, může se do prostředku začlenit činidlo podporující tvorbu bublin, jako je C_{10} - C_{16} alkolamidy. V typickém případě se používají v množství přibližně 1 % až 10 %. C_{10} - C_{14} monoethanolamidy a diethanolamidy znázorňují typickou třídu takových činidel, které podporují tvorbu bublin. Použití takových činidel, jako jsou aminoroxidy, betainy a sultainy která silně pění, je také výhodné. Je-li to nutné mohou se přidat rozpustné sole hořčíku, jako je $MgCl_2$, $MgSO_4$ a podobně, v množství, které se v typickém případě pohybuje mezi 0,1 % až 2 % a tím se podpoří pění.

Kapalné detergentové prostředky mohou obsahovat jako nosiče vodu a jiná rozpouštědla. Také jsou vhodné primární nebo sekundární alkoholy s nízkou molekulovou hmotností, jako je methanol, ethanol, propanol a isopropanol. Při rozpouštění povrchově aktivních činidel jsou vhodné monohydrické alkoholy, ale mohou se také použít polyoly, které obsahují přibližně 2 až 6 atomů uhlíku a přibližně 2 až 6 hydroxyskupin (například 1,3-propanediol, ethylenglykol, glycerin a 1,2-propandiol). Prostředky mohou obsahovat přibližně 5 % až 90 % v typickém případě přibližně 10 % až 50 % takových nosičů.

Detergentové prostředky se mohou přednostně tvořit tak, že během použití při provádění čištění s vodou bude voda mít hodnotu pH přibližně 6,8 a 11. Hodnoty pH konečných produktů

jsou většinou v tomto rozmezí. Postupy pro regulaci pH zahrnují použití například pufrů, alkalických činidel a kyselin. Takové postupy jsou známy v oboru.

Když se připravují čisticí prostředky určené pro silně znečištěné povrchy a prací prostředky určené pro barevné prádlo podle vynálezu, je možné použít různá plnidla v množství, které tvoří přibližně 5 % až 50 % hmotnosti prostředku. V typickém případě plnidla zahrnují zeolity o velikosti 1 až 10 mikrónů, polykarboxyláty, jako je citrát a oxydisukcinát, vrstvené silikáty, fosforečnany a podobně. Jiná běžná plnidla jsou uvedena ve standardních seznamech.

V takových prostředcích se mohou použít různé další enzymy, jako jsou celulázy, lipázy, amylázy a proteinázy, přičemž typické množství se pohybuje od přibližně 0,001 % do 1 % hmotnosti. V oboru pracích prostředků jsou známy různé odpuzovače a enzymy vhodné pro ošetření textilií.

V takových prostředcích se mohou použít různé bělicí prostředky, jako jsou peroxouhličitany, peroxoboritany a podobně se mohou použít v typickém množství 1 % až 15 % (hmotnostní). Jestliže je to nutné, takové prostředky mohou také obsahovat bělicí aktivátory, jako je tetraacetylethylendiamin, nonanoyloxybenzensulfonát a podobně, které jsou dobře známy v oboru. Použité množství se v typickém případě pohybuje od 1 % do 10 % (hmotnostní).

V uvedených prostředcích se mohou také použít činidla uvolňující nečistoty, zvláště typ aniontového esteru, chelatační činidla, zvláště aminofosfonáty a ethylendiamin disukcináty, činidla uvolňující jílovitou půdu, zvláště ethoxylovaný tetraethylenpentamin, dispergační činidla, zvláště polyakryláty a polyaspartáty, opticky zjasňující prostředky, činidla působící proti pění, zvláště silikony a sekundární alkoholy, činidla zjemňující textilie, zvláště montmorillonitové jíly, v množství, které je v rozmezí přibližně 1 % až 35 % (hmotnostní). Standardní popisy a

zveřejněné patenty obsahují řadu detailních popisů takových běžných materiálů.

V čistících prostředcích je možné použít stabilizátory enzymů. Takové stabilizátory enzymů zahrnují propylenglykol (přednostně 1 % až 10 % (hmotnostních)), formát sodný (upřednostňuje se 0,1 % až 1 %) a formát vápenatý (upřednostňuje se přibližně 0,1 % až 1 %).

Varianty prostředků je také možné použít v prostředcích určených pro čištění silně znečištěných povrchů. Termín „silně znečištěné povrchy“ znamenají kapalné a granulátové detergenční prostředky pro čištění silně znečištěných povrchů, jako jsou podlahy, zdi, obklady a podobně. Prostředky určené pro silné znečištění podle vynálezu obsahují účinné množství jednoho nebo více proteinázových konjugátů podle vynálezu, přičemž se upřednostňuje přibližně 0,001 % a 10 %, více se upřednostňuje přibližně 0,01 % až 5 % a stále více se upřednostňuje přibližně 0,05 % až 1 % (hmotnostní) proteinázového konjugátu. Uvedený čistící prostředek vhodný pro silně znečištěné povrchy mimo jednoho nebo více proteinázových konjugátů zahrnuje povrchově aktivní činidlo a prostředek pro změkčování vody, který je rozpustný ve vodě. V jistých specializovaných prostředcích, jako je prostředek pro čištění skel ve spreji, se někdy nepoužívá povrchově aktivní činidlo, protože se může tvořit na skle film a/nebo šmouhy.

Když je přítomno povrchově aktivní činidlo, může tvořit pouze 0,1 % prostředku, ale v typickém případě prostředky budou obsahovat přibližně 0,25 % až 10 % povrchově aktivního činidla, více se upřednostňuje přibližně 1 % až 5 % povrchově aktivního činidla.

V typickém případě prostředky budou obsahovat přibližně 0,5 % až 50 % pracího plnidla, přičemž se upřednostňuje přibližně 1 % až 10 %.

Přednostně hodnota pH je v rozmezí 7 až 12. Jestliže je nutné upravit pH může se použít činidlo, jako je hydroxid sodný, uhličitán sodný nebo kyselina chlorovodíková.

Do prostředků je možné zahrnout rozpouštědla. Použitelná rozpouštědla zahrnují, ale nejsou omezena na glykolethery, jako je diethylenglykolmonohexylether, diethylenglykolmonobutylether, ethylenglykolmonobutylether, ethylenglykolmonohexylether, propylenglykolmonobutylether a dioly, jako je 2,2,4-trimethyl-1,3-pentandiol a 2-ethyl-1,3-hexandiol. Rozpouštědla jsou v typickém případě přítomna v množství 0,5 % až 15 %, více se preferuje přibližně 3 % až 11 %.

Navíc, v uvedených prostředcích je možné použít vysoce těkavá rozpouštědla, jako je isopropanol nebo ethanol, což umožňuje rychlejší odpařování prostředku z povrchů v případě, že prostředek není po aplikaci na povrch opláchnut. Těkavá rozpouštědla se v typickém případě v prostředku používají v množství přibližně 2 % až 12 %.

Příklad 7 až 12: Kapalně čistící prostředky vhodné pro silně znečištěné povrchy

	příklad 7	příklad 8	příklad 9	příklad 10	příklad 11	příklad 12
proteinázový konjugát v příkladu 3	0,05%	0,5%	0,02%	0,03%	0,3%	0,05%
EDTA			2,9%	2,9%		
citrát sodný					2,9%	2,9%
NaC ₁₂ alkylbenzen- sulfonát	1,95%		1,95%		1,95%	
NaC ₁₂ alkylsulfát		2,2%		2,2%		2,2%
NaC ₁₂ (ethoxy)sulfát		0,5%		0,5%		0,5%
C ₁₂ dimethylaminoxid		0,5%		0,5%		0,5%
natriumkumensulfonát	1,3%		1,3%		1,3%	
hexylkarbitol	6,3%	6,3%	6,3%	6,3%	6,3%	6,3%
voda	90,4%	88,3%	87,53	85,87	87,25	85,85%

			%	%	%	
--	--	--	---	---	---	--

pH všech prostředků se upravilo na hodnotu 7.

V jednom provedení podle vynálezu prostředek určený pro automatické myčky nádobí obsahuje jednu nebo více variant podle vynálezu. Termín „prostředek určený pro automatické myčky nádobí“ znamená všechny formy prostředků vhodných pro mytí nádobí, které zahrnují, ale nejsou omezeny na granulátové a kapalně formy.

Příklady 13 až 16: Kapalně detergenty určené pro mytí nádobí

	Příklad 13	Příklad 14	Příklad 15	Příklad 16
proteinázový konjugát v příkladu 1	0,05%	0,5%	0,02%	0,4%
C ₁₂ -C ₁₄ a-methylglukamid	0,9 %	0,9 %	0,9 %	0,9 %
C ₁₂ ethoxy(1)sulfát	12 %	12 %	12 %	12 %
2-methylundekanová kyselina	4,5 %	4,5 %	4,5 %	4,5 %
C ₁₂ ethoxy(2)karboxylát	4,5 %	4,5 %	4,5 %	4,5 %
C ₁₂ alkoholethoxylát(4)	3 %	3 %	3 %	3 %
C ₁₂ aminoxid	3 %	3 %	3 %	3 %
natriumkumensulfonát	2 %	2 %	2 %	2 %
ethanol	4 %	4 %	4 %	4 %
Mg ²⁺ (jako MgCl ₂)	0,2 %	0,2 %	0,2 %	0,2 %
Ca ²⁺ (jako CaCl ₂)	0,4 %	0,4 %	0,4 %	0,4 %
voda	65,45 %	65 %	65,48 %	65,1 %

pH všech prostředků se upravilo na hodnotu 7.

Příklady 17 až 19: Kapalně prostředky vhodné pro čištění
textilií

	Příklad 17	Příklad 18	Příklad 19
Proteinázový konjugát	0,05 %	0,03 %	0,30 %
natriumC ₁₂ -C ₁₄ alkylsulfát	20 %	20 %	20 %
2-butyloktankyselina	5 %	5 %	5 %

citrát sodný	1 %	1 %	1 %
C ₁₀ alkoholethoxylát(3)	13 %	13 %	13 %
monoethanolamin	2,5 %	2,5 %	2,5 %
voda/propylenglykol/ethanol (100:1:1)	58,45 %	58,47 %	58,20 %

Prostředky určené pro osobní péče

Proteinázové konjugáty jsou zvláště vhodné pro použití v prostředcích osobní péče, jako jsou například kondicionéry, šampony, prostředky na ošetření akné, pleťová mléka a kondicionéry, a sprchové gely, mýdla, pěnicí a nepěnicí pleťové čistící prostředky, kosmetické prostředky, roztoky k ošetření rukou, obličeje a celého těla, zvlhčující činidla, náplasti a masky, pleťová zvlhčující činidla, kosmetické a čistící kapesníčky, prostředky vhodné pro péči ústní dutiny a prostředky vhodné k ošetření kontaktních čoček. Prostředky určené pro osobní péči zahrnují jeden nebo více proteinázových konjugátů.

Aby se prokázalo, že proteinázové konjugáty jsou vhodné pro začlenění do uvedených prostředků, uvádí se následující dokumenty: patent USA č. 5 641 479 (Linares et al., 24.6.1997, pleťové čistící činidlo), patent USA č. 5 599 549 (Wivell et al., 4.2.1997, pleťový čistící prostředek), patent USA č. 5 585 104 (Ha et al., 17.12.1996, pleťový čistící prostředek), patent USA č. 5 540 852 (Kefauver et al., 30.7.1996, pleťový čistící prostředek), patent USA č. 5 510 050, Dunbar et al., 23.4.1996 (pleťový čistící prostředek), patent USA č. 5 612 324 (Guang Lin et al., 18.3.1997, přípravek proti vzniku akné), patent USA č. 5 581 176, Warren et al., 24.12.1996 (přípravek proti akné), patent USA č. 5 549 888 (Venkateswaran, 27.8.1996, prostředky proti akné), patent USA č. 5 470 884 (Corless et al., 28.11.1995, prostředek proti akné), patent USA č. 5 650 384 (Gordon et al., 22.7.1997, sprchové gely), patent USA č. 5 607 678 (Moore et al., 4.3.1997), patent USA

č. 5 624 666 (Coffindaffer et al., 29.4.1997, kondicionér na vlasy a/nebo vlasový šampon), patent USA č. 5 618 524 (Bolich et al., 8.4.1997, kondicionér na vlasy a/nebo vlasový šampon), patent USA č. 5 612 301 (Inman, 18.3.1997, kondicionér na vlasy a/nebo vlasový šampon), patent USA č. 5 573 709 (Wells, 12.11.1996, kondicionér na vlasy a/nebo vlasový šampon), patent USA č. 5 482 703 (Pings, 9.1.1996, kondicionér na vlasy a/nebo vlasový šampon), patent USA 12.4.1994, kondicionér na vlasy a/nebo vlasový šampon), patent USA č. 5 641 493 (Date et al., 24.6.1997, kosmetický přípravek), patent USA č. 5 605 894 (Blank et al., 25.2.1997, kosmetický přípravek), patent USA č. 5 585 090 (Yoshioka et al., 17.12.1996 (kosmetické přípravky), patent USA č. 4 939 179 (Cheney et al., 3.7.1990, roztok pro ošetření rukou, obličeje a/nebo celého těla), patent USA č. 5 607 980 McAtee et al., 4.3.1997, roztok pro ošetření rukou, obličeje a/nebo celého těla), patent USA č. 4 045 364 (Richter et al., 30.8.1977 (kosmetické a čistící tampony), přihláška evropského patentu EP 0 619 074 (Touchter et al., publikováno 12.10.1994, kosmetické a čistící ubrousky), patent USA č. 4 975 217 (Brown-Skrobot et al., 4.12.1990, kosmetické a čistící ubrousky), patent USA č. 5 096 700 (Seibel et al., 17.3.1992, prostředek pro čištění ústní dutiny), patent USA č. 5 028 414 (Sampathkumar, 2.7.1991, prostředek pro čištění ústní dutiny), patent USA č. 5 028 415 (Benedict et al., 2.7.1991, prostředek pro čištění ústní dutiny), patent USA č. 5 028 415 (Benedict et al., 2.7.1991, prostředek pro čištění ústní dutiny), patent USA č. 4 863 627 (Davies et al., 5.9.1989, roztok pro ošetření kontaktních čoček), patent USA č. Re. 32 672 (Huth et al., 24.5.1988, roztok pro ošetření kontaktních čoček), patent USA č. 4 609 493 (Schafer, 2.9.1986, roztok pro ošetření kontaktních čoček).

V případě prostředků pro ošetření ústní dutiny podle vynálezu farmaceuticky přijatelné množství jednoho nebo více

proteinázových konjugátů podle vynálezu zahrnuje odstranění proteinázových skvrn ze zubů nebo zubních protéz. Termín „prostředek pro čištění ústní dutiny“ zahrnuje ústní vodu, zubní pastu, zubní gely, zubní prášky, ústní spreje, ústní gely, žvýkáci gumy, pastilky, tablety, bioaktivní gely, profylaktické pasty, roztoky pro ošetření ústní dutiny a podobně. Prostředky pro ošetření ústní dutiny obsahují přibližně 0,0001 % až 20 % jednoho nebo více proteinázových konjugátů podle vynálezu, více se preferuje přibližně 0,001 % až 10 %, stále více se preferuje přibližně 0,01 % až 5 % (hmotnostní) prostředku, a farmaceuticky přijatelný nosič. Termín „farmaceuticky přijatelný“ znamená léky nebo inertní příměsi, které při kontaktu s lidskou nebo zvířecí tkání nepůsobí toxicky, jsou kompatibilní, vykazují stabilitu, nepůsobí podráždění, nepůsobí alergickou reakci a podobně. Úměrný by měl být také pozitivní účinek vůči faktoru nebezpečí.

V typickém případě farmaceuticky přijatelné orální čistící nosičové složky orálních čistících příměsí orálních čistících prostředků budou v obecném případě obsahovat přibližně 50 % až 99,99 %, přednostně 65 % až 99,9 %, více se upřednostňuje přibližně 65 % až 99 % (hmotnostní) prostředku.

Farmaceuticky přijatelné nosičové složky, které mohou být zahrnuty v ústních čistících prostředcích podle vynálezu jsou dobře známy v oboru. Různé typy prostředků, nosičových složek a složek, které jsou použitelné v ústních čistících prostředcích, se popisují v publikaci uvedené shora v textu.

V jiném provedení vynálezu čistící prostředky vhodné pro čištění zubních protéz mimo ústní dutinu obsahují jeden nebo více proteinázových konjugátů podle vynálezu. Takové čistící prostředky vhodné pro čištění zubních protéz obsahují účinné množství jednoho nebo více konjugátů, přičemž se upřednostňuje přibližně 0,0001 % až 50 %, více se upřednostňuje přibližně 0,001 % až 35 %, stále více se upřednostňuje přibližně 0,01 %

až 20 % (hmotnostních) prostředku. Různé prostředky pro čištění zubních protéz se připravují ve formě rozpustných tablet a jsou dobře známy v oboru (popisuje se například v dokumentech patent USA č. 5 055 305, Young) a jsou v obecném případě vhodné pro začlenění do jednoho nebo více proteinázových konjugátů, přičemž slouží k odstranění proteinových skvrn ze zubních protéz.

V jednom provedení podle vynálezu čistící prostředky vhodné pro kontaktní čočky obsahují jeden nebo více proteinázových konjugátů podle vynálezu. Takové čistící prostředky vhodné pro kontaktní čočky obsahují účinné množství jednoho nebo více proteinázových konjugátů, přednostně obsahují přibližně 0,01 % až 50 % jednoho nebo více proteinázových konjugátů, více se upřednostňuje přibližně 0,01 % až 20 %, stále více se upřednostňuje přibližně 1 % až 5 % (hmotnostní) prostředku. Různé čistící prostředky vhodné pro kontaktní čočky se připravují ve formě tablet, roztoku a podobně a jsou dobře známy v oboru a v obecném případě jsou vhodné pro začlenění jednoho nebo více proteinázových konjugátů podle vynálezu při odstranění proteinových skvrn z kontaktních čoček.

Příklad 20 až 23: Čistící roztok pro kontaktní čočky

	Příklad 20	Příklad 21	Příklad 22	Příklad 23
Proteinázový konjugát popsáný v příkladu 5	0,01%	0,5 %	0,1 %	2 %
glukóza	50 %	50 %	50 %	50 %
neionogenní povrchově aktivní čínidlo (polyoxyethylenpolyoxypro- pylenkopolymer)	2 %	2 %	2 %	2 %
anionogenní povrchově aktivní čínidlo (polyoxyethylenalkylfenyl- ethernatriumsulficester)	1 %	1 %	1 %	1 %

chlorid sodný	1 %	1 %	1 %	1 %
borax	0,3 %	0,3 %	0,3 %	0,3 %
voda	45,69 %	45,2 %	45,6 %	43,7 %

Příklady 24 až 27: Produkty vhodné pro mytí celého těla

	Příklad 24	Příklad 25	Příklad 26	Příklad 27
voda	62,62 %	65,72 %	57,72 %	60,72 %
dinatrium EDTA	0,2 %	0,2 %	0,2 %	0,2 %
glycerin	3 %	3 %	3 %	3 %
polyquaternium 10	0,4 %	0,4 %	0,4 %	0,4 %
natriumlaurethsulfát	12 %	12 %	12 %	12 %
kokamid MEA	2,8 %	2,8 %	2,8 %	2,8 %
laurafoacetát sodný	6,0 %	6,0 %	6,0 %	6,0 %
kyselina myristová	1,6 %	1,6 %	1,6 %	1,6 %
heptahydrát síranu hořečnatého	0,3 %	0,3 %	0,3 %	0,3 %
trihydroxystearin	0,5 %	0,5 %	0,5 %	0,5 %
PEG-6 kapryltriglyceridy/PEG-6 kaprinaltriglyceridy	3 %			
polyestery sacharózy a mastných kyselin bavlníku	3 %			
polyestery sacharózy a behenanu mastných kyselin	3 %		4 %	
vazelína		4 %	8 %	
minerální olej				6 %
DMDM hydantoin	0,08 %	0,08 %	0,08 %	0,08 %
proteinázový konjugát	0,1 %	2 %	2 %	5 %
kyselina citrinová	1,4 %	1,4 %	1,4 %	1,4 %

Příklad 28 až 31: Produkty vhodné pro čištění obličeje

	Příklad 28	Příklad 29	Příklad 30	Příklad 31

voda	66,52 %	65,17 %	68,47 %	68,72%
dinatrium EDTA	0,1 %	0,1 %	0,1 %	0,1 %
kyselina citronová			1,4 %	1,4 %
natriumlaureth-3-sulfát	3 %	3,5 %		
natriumlaureth-4-karboxylát	3 %	3,5 %		
laureth-12	1 %	1,2 %		
polyquaternium 10			0,4 %	0,4 %
polyquaternium 25	0,3 %	0,3 %		
glycerin	3 %	3 %	3 %	3 %
lauroamfoacetát sodný			6 %	6 %
kyselina laurová	6 %	6 %	3 %	3 %
kyselina myristová			3 %	3 %
heptahydrát síranu hořečnatého	2,3 %	2 %	2 %	2 %
triethanolamin	4 %	4 %	4 %	4 %
trihydroxystearin	0,5 %	0,5 %	0,5 %	0,5 %
polyestery sacharózy a mastných kyselin bavlníku	3 %	2 %		
polyestery sacharózy a behenanu mastných kyselin	2 %	2 %		
vazelína			4 %	
minerální olej				2 %
PEG-6 kapryl triglyceridy/PEG-6 kaprinal triglyceridy				2 %
konamidopropylbetain	2 %	3 %	1,8 %	1,8 %
lauryldimethylaminoxid	1 %	1,2 %	1,2 %	1,2 %
Dex Panthenol	1 %	0,25%	0,25%	
DMDM hydantoin	0,08%	0,08%	0,08%	0,08%
proteínázový konjugát popsáný v příkladu 2	1 %	2 %	0,5 %	0,5 %
vonná látka	0,2 %	0,2 %	0,2 %	0,2 %

Příklad 32 až 33: Prostředek zvlhčující pleť, který se neoplachuje

	Příklad 32	Příklad 33
glycerin	5 %	
kyselina stearová	3 %	
C ₁₁₋₁₃ isoparafín	2 %	
glykolstearát	1,5 %	
propylenglykol		3 %
minerální olej	1 %	10 %
sezamový olej		7 %
vazelína		1,8 %
triethanolamin	0,7 %	
cetylacetát	0,65 %	
glycerylstearát	0,48 %	2 %
TEA stearát		2,5 %
cetylalkohol	0,47 %	
alkoholy lanolinu		1,8 %
DEA-cetylfosfát	0,25 %	
methylnparaben	0,2 %	0,2 %
propylparaben	0,12 %	0,1 %
Carbomer 934	0,11 %	
dinatrium EDTA	0,1 %	
proteinázový konjugát popsany v příkladu 4	0,1 %	0,5 %
voda	84,32 %	71,1 %

Příklad 34: Prostředek vhodný pro čisticí kapesníčky

propylenglykol	1 %
amoniumlaurylsulfát	0,6 %
kyselina jantarová	4 %
sukcinát sodný	3,2
Triclosan®	0,15 %
proteinázový konjugát popsany v příkladu 1	0,05 %
voda	91 %

Shora uvedené látky se napustí do tkaného absorbujícího kapesníčku, který obsahuje celulózu a/nebo polyester v množství 250 % hmotnosti absorbujícího kapesníčku.

27.00.00

PI 2002 - 171

15/849

Seznam sekvenci

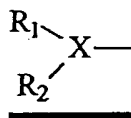
<210> 1
 <211> 275
 <212> protein
 <213> Bacillus amyloliquefaciens

<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

[illegible]

1. Proteinázový konjugát, který obsahuje proteinázovou část a jednu nebo více adičních částí, kde každá adiční část je kovalentně zachycena na aminokyselině proteinázové části v chránící poloze hydrolytického místa vybrané ze skupiny zahrnující 13, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 84, 85, 88, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 170, 186, 191, 192, 193, 194, 196, 259, 260, 261, 262 a 274 odpovídající subtilizinu BPN'.
2. Proteinázový konjugát podle nároku 1, kde každá adiční část nezávisle na sobě má obecný vzorec



kde symbol X se vybral ze skupiny zahrnující žádnou část nebo spojovací část, symbol R_1 se vybral ze skupiny zahrnující žádnou část, první polyamid a první polymer a symbol R_2 se vybral ze skupiny zahrnující žádnou část, druhý polypeptid a druhý polymer, kde alespoň jeden ze symbolů X, R_1 a R_2 nepředstavuje žádnou část.

3. Proteinázový konjugát podle nároku 2, kde proteinázová část má upravenou aminokyselinovou sekvenci základní aminokyselinové sekvence, kde upravená aminokyselinová sekvence obsahuje substituci substituční aminokyselinou v jedné nebo více chránících poloh hydrolytického místa vybraného ze skupiny zahrnující 13, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 84, 85, 88, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 170, 186, 191, 192, 193, 194, 196, 259, 260, 261, 261 a 274 odpovídající subtilizinu BPN'a kde každá adiční část je kovalentně zachycena na jedné ze substitučních aminokyselin.

4. Proteinázový konjugát podle nároku 3, kde substituční aminokyselina je cystein.
5. Proteinázový konjugát podle libovolného z předchozích nároků, kde základní aminokyselinová sekvence se vybrala ze skupiny obsahující subtilizin BPN', subtilizin Carlsberg, subtilizin DY, subtilizin 309, proteinázu K, termitázu, proteinázu A, proteinázu B, proteinázu C a proteinázu D a jejich varianty.
6. Proteinázový konjugát podle libovolného z předchozích nároků, kde každý symbol R_1 a R_2 nepředstavuje žádnou část.
7. Proteinázový konjugát podle libovolného z předchozích nároků, kde symbol R_1 je první polypeptid.
8. Proteinázový konjugát podle nároku 7, kde první polypeptid se vybral ze skupiny obsahující subtilizin BPN', subtilizin Carlsberg, subtilizin DY, subtilizin 309, proteinázu K, termitázu, proteinázu A, proteinázu B, proteinázu C a proteinázu D a jejich varianty.
9. Proteinázový konjugát podle nároku 8, kde symbol X nepředstavuje žádnou část a kde proteinázová část a první polypeptid jsou kovalentně zachyceny přes disulfidový můstek.
10. Proteinázový konjugát podle nároku 2, kde symbol R_1 je první polymer a symbol R_2 se vybral ze skupiny zahrnující žádnou část a druhý polymer.
11. Proteinázový konjugát podle nároku 10, kde symbol R_2 nepředstavuje žádnou část a první polymer je polyethylenglykol.
12. Čistící prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje proteinázový konjugát podle nároku 1 a nosič čistícího prostředku.
13. Prostředek osobní péče, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje proteinázový konjugát podle nároku 1 a nosič vhodný pro prostředek osobní péče.