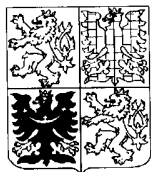


PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **25.03.1999**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **26.03.1998 02.06.1998**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/048174 1998/088912**

(33) Země priority: **US US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **14.02.2001**
(Věstník č. 2/2001)

(86) PCT číslo: **PCT/IB99/00511**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/48918**

(21) Číslo dokumentu:

2000 - 3396

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 07 K 14/195

C 07 K 17/06

C 07 K 17/08

C 07 K 19/00

(71) Přihlašovatel:

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

(72) Původce:

**Rubingh Donn Nelton, Cincinnati, OH, US;
Correa Paul Elliott, Cincinnati, OH, US;
Weisberger David John, Cincinnati, OH, US;**

(74) Zástupce:

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

(54) Název přihlášky vynálezu:

Proteázový konjugát a prostředek osobní hygieny

(57) Anotace:

Proteázové konjugáty obsahují proteázovou část a jednu nebo více přídatných částí, kde proteázová část má pozměněnou aminokyselinovou sekvenci mateřské aminokyselinové sekvence, mateřskou aminokyselinovou sekvenci obsahující první epitopovou oblast, druhou epitopovou oblast a třetí epitopovou oblast, kde pozměněná aminokyselinová sekvence obsahuje substituci substituující aminokyselinou na jedné nebo více pozicích v jedné nebo více epitopových oblastí a kde každá přídatná část je kovalentně připojena k jedné ze substituujících částí. Čistící prostředky a prostředky osobní hygieny, které takové proteázové konjugáty obsahují.

CZ 2000 - 3396 A3

Proteázový konjugát a prostředek osobní hygieny.

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká konjugátů subtilizinové proteázy a prostředků, obsahujících konjugáty, které mají sníženou imunogenicitu ve srovnání se svými odpovídajícími mateřskými proteázami.

Dosavadní stav techniky

Enzymy tvoří největší třídu přirozeně se vyskytujících proteinů. Jedna třída enzymů zahrnuje proteázy, které katalyzují hydrolýzu jiných proteinů. Tato schopnost hydrolyzovat proteiny byla využita začleněním přirozeně se vyskytujících nebo upravených proteáz do čistících prostředků, zvláště těch, které jsou vhodné pro použití v prádelnách.

V oboru čištění se z těchto proteáz nejčastěji používají serinové proteázy. Většina serinových proteáz je produkována bakteriálními organizmy a některé jsou vytvářeny organizmy jinými, jako jsou houby. Viz Siezen, Roland J. a kol., „Homology Modelling and Protein Engineering Strategy of Subtilases, the Family of Subtilisin-Like Serine Proteases“, Protein Engineering, sv. 4, č. 7, str. 719 až 737 (1991). Bohužel účinnost standardních serinových proteáz v jejich přirozeném prostředí se často nepřenáší do nepřirozeného prostředí čistících prostředků. Zvláště charakteristické vlastnosti proteáz, jako jsou například tepelná stabilita, pH stabilita, stabilita vůči oxidaci a substrátová specifita často nejsou optimalizované pro použití mimo přirozené prostředí proteázy.

Bylo použito několik přístupů jak změnit standardní aminokyselinovou sekvenci serinových proteáz s cílem zvýšit účinnost proteázy v nepřirozeném prostředí při praní. Tyto přístupy zahrnují genetické přebudování a/nebo chemickou modifikaci proteáz tak, aby se zvýšila tepelná stabilita a zlepšila stabilita vůči oxidaci ve zcela odlišných podmínkách.

Protože však takové geneticky upravené proteázy jsou pro savce cizí, jsou pro ně potenciálními antigeny. Jakožto antigeny, tyto proteázy způsobují imunologenní a/nebo alergenní odpovědi (zde společně popisované jako imunologické odpovědi) u

savců. Skutečně byla přecitlivělost na serinové proteázy pozorována v prostředích, kde jsou lidé proteázám pravidelně vystaveni. Taková prostředí jsou ve výrobních zařízeních, kde jsou zaměstnanci vystaveni proteázám prostřednictvím takových nosičů, jako je prach a aerosoly. Aerosoly mohou mít za následek zanesení proteázy do plic, což je takový způsob vystavení proteáze, který vyvolává nejnebezpečnější reakci. Přecitlivělost na proteázu může také nastat v obchodě, kde opakovaně používání proteázy obsahujících výrobků zákazníkem, u něho může způsobit vznik imunogenní odpovědi.

Kromě toho, zatímco genetické přebudování a/nebo chemická modifikace proteáz byly nejvýznamnější při pokračujícím hledání ještě účinnějších proteáz použitelných pro praní, takové proteázy byly minimálně použity v prostředcích určených pro osobní hygienu a slabé saponáty. Primárním důvodem nepřítomnosti upravených proteáz ve výrobcích, jako jsou například mýdla, gely, koupelnové prostředky a šampóny, je výše zmíněný problém lidské přecitlivělosti, vedoucí k nežádoucím imunogenním odpovědím. Bylo by tedy vysoce výhodné poskytnout prostředek pro osobní hygienu, který využije čistící schopnosti proteáz a přitom nebude vyvolávat imunogenní odpověď.

V současné době imunogenní odpovědi na proteázy mohou být minimalizovány navázáním na nosič, granulováním, potažením na podklad nebo rozpuštěním chemicky pozměněných proteáz proto, aby nebyly přenosné vzduchem. U těchto metod, které určují expozici spotřebitele ke vzduchem přenášeným proteázám, stále existuje riziko spojené s rozsáhlým kontaktem tkáně s výsledným prostředkem či expozicí pracovníka ve výrobě na prach nebo aerosol, které obsahují proteázy.

V lékařské oblasti byly předkládány návrhy jak zmenšit imunogenicitu enzymů ještě pomocí jiné metody. Tato metoda zahrnuje připojení polymerů k enzymům. Viz například patent US č. 4 179 337, Davis a kol., vydaný 18. prosince 1979 a PCT přihláška WO 96/17929, Olsen a kol., vydaná 13. června 1996.

Jeden přístup, jak snížení imunologické aktivity proteázy, je oslabení imunologických vlastností epitopů. Epitopy jsou takové aminokyselinové oblasti antigenu, které vyvolávají imunologickou odpověď vazbou protilátek nebo prezentací zpracovaných antigenů T buňkám prostřednictvím hlavního histokompatibilitního komplexu (MHC). Změny v epitopech mohou ovlivnit jejich účinnost jako antigenu. Viz Walsh, B. J. a M. E. H. Howden, „A Method for the Detection of IgE Binding Sequences

of Allergens Based on a Modification of Epitope Mapping", Journal of Immunological Methods, sv. 121, str. 275 až 280 (1989).

Nynější vynálezci zjistili, že ty serinové proteázy, obecně známé jako subtiliziny, včetně subtilizinu BPN', mají význačnou epitopovou oblast na aminokyselinových pozicích 70 až 84, 103 až 126 a 217 až 252, odpovídajících subtilizinu BPN'. Nynější vynálezci zde takové subtiliziny chemicky modifikovali v jedné nebo více těchto epitopových oblastí, aby se zmírnily imunologické vlastnosti proteázy.

Přitom je aktivní místo proteázy minimálně ovlivněno. Předkladatelé tohoto vynálezu tedy objevili subtilizinu podobné proteázy, které vyvolávají sníženou imunogenní odpověď a přitom si podržují svou aktivitu jako účinná a aktivní proteáza. Proto jsou proteázové konjugáty, které jsou předmětem tohoto vynálezu, vhodné pro použití v několika typech prostředků, jako jsou mimo jiné prostředky na praní, mytí nádobí, znečištěné povrchy, prostředky péče o kůži, prostředky péče o vlasy, zkrášlovací prostředky, prostředky ústní hygieny a prostředky pro ošetřování kontaktních čoček.

Podstata vynálezu

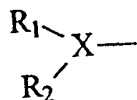
Předkládaný vynález se týká konjugátů serinové proteázy, který obsahuje proteázovou část a jednu nebo více částí přídatných, kde:

(a) proteázová část má pozměněnou aminokyselinovou sekvenci mateřské aminokyselinové sekvence, mateřskou aminokyselinovou sekvenci obsahující první epitopovou oblast, druhou epitopovou oblast a třetí epitopovou oblast, kde pozměněná aminokyselinová sekvence obsahuje substituci pomocí substituující aminokyseliny na jedné nebo více pozicích v jedné nebo více epitopových oblastí, přičemž:

- (i) pokud k substituci dojde v první epitopové oblasti, substituce nastává na jedné nebo více pozicích, odpovídajících pozicím 70 až 84 subtilizinu BPN';
- (ii) pokud k substituci dojde ve druhé epitopové oblasti, substituce nastává na jedné nebo více pozicích, odpovídajících pozicím 103 až 126 subtilizinu BPN'; a

(iii) pokud k substituci dojde ve třetí epitopové oblasti, substituce nastává na jedné nebo více pozicích, odpovídajících pozicím 217 až 252 subtilizinu BPN'; a

(b) kde každá z přídatných částí je kovalentně připojena k jedné ze substituujících aminokyselin, přítomných v proteázové části a má strukturu:



kde X je buď nic nebo vazebná část; R₁ je buď nic, první polypeptid a první polymer; a R₂ je buď nic, druhý polypeptid a druhý polymer; kde alespoň jeden se skupiny X, R₁ a R₂ není nulový. Předkládaný vynález se dále vztahuje na čisticí prostředky a prostředky osobní hygieny, které obsahují takovéto proteázové konjugáty.

Podstatné složky předkládaného vynálezu jsou popsány zde dále. Také jsou zahrnuty popisy různých možných a výhodných složek, užitečných při provedení předkládaného vynálezu.

Předkládaný vynález může obsahovat, sestávat z, nebo sestávat v podstatě z jakýchkoli požadovaných nebo volitelných složek a/nebo omezení zde popsaných.

Všechna procenta a poměry jsou počítána jako hmotnostní procenta, pokud není stanoveno jinak. Všechna procenta jsou vypočítána na základě celkového složení, pokud není stanoveno jinak.

Všechny složky nebo jejich úrovně se vztahují k aktivní úrovni dané složky nebo prostředku, a nejsou do nich započítávány nečistoty, například zbytky roztoků nebo vedlejších produktů, které mohou být přítomny v komerčně dostupných zdrojích.

Všechny dokumenty, na které je zde odkazováno, včetně všech patentů, patentových přihlášek a tištěných publikací, jsou zahrnuty jako odkaz ve své úplnosti.

Jsou zde používány odkazy na obchodní názvy používaných materiálů, mimo jiné enzymů. Autoři předkládaného vynálezu nemají v úmyslu být omezeni na materiály s určitými obchodními názvy. Analogické materiály (např. ty, které je možno získat od jiného zdroje pod jiným názvem nebo katalogovým (referenčním) číslem) k uváděným obchodním názvům mohou být zaměněny a použity ve zde uváděných proteázových konjugátech a prostředcích.

Pro popis aminokyselin zde budou používány zkratky. Tabulka I podává seznam všech zde používaných zkratk:

Tabulka I

<u>Aminokyselina</u>	<u>Třípísmenová zkratka</u>	<u>Jednopísmenová zkratka</u>
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Kysl. asparagová	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Kysl. glutamová	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Izoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lyzin	Lys	K
Metionin	Met	M
Fenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Treonin	Thr	T
Tryptofan	Trp	W
Tyrozín	Tyr	Y
Valin	Val	V

Definice

Zde používaný termín „mutace“ označuje změnu v genových sekvencích a v aminokyselinových sekvencích, produkovaných těmito genovými sekvencemi. Mutace zahrnují delece, substituce a adice aminokyselinových zbytků v standardní sekvenci proteinu.

Zde používaný termín „mateřský“ označuje enzym, standardní typ nebo variantu.

Zde používaný termín „standardní“ označuje protein, například proteázu nebo jiný enzym, produkované nemutovaným organismem.

Zde používaný termín „varianta“ označuje protein, která má aminokyselinovou sekvenci, lišící se od odpovídajícího standardního enzymu buď z důvodu genetické mutace v nukleotidových sekvencích, kódujících tento enzym, nebo kvůli mutaci standardního enzymu samotného.

Všechny zde používané molekulární hmotnosti polymerů jsou vyjádřeny jako průměrné molekulární hmotnosti.

Jak je zde uvedeno, třebaže konjugáty v předkládaném vynálezu nejsou omezeny pouze na ty, které obsahují subtilizin BPN' a jeho varianty, veškeré číslování aminokyselin je provedeno s ohledem na aminokyselinovou sekvenci subtilizinu BPN', která je uvedena v SEQ ID NO: 1. Aminokyselinová sekvence subtilizinu BPN' je dále popsána v práci Wells a kol., *Nucleic Acids Research*, sv. II, str. 7911 až 7925 (1983).

Proteázové konjugáty předkládaného vynálezu.

Proteázové konjugáty předkládaného vynálezu jsou sloučeniny, které obsahují proteázovou část a jednu nebo více částí přídatných, kde proteázová část a přídatné části jsou spojeny pomocí kovalentní vazby.

Proteázové části.

Proteázové části zde uváděné mají pozměněnou aminokyselinovou sekvenci mateřské aminokyselinové sekvence. Mateřské aminokyselinové sekvence zde uváděné jsou serinové proteázy, buď standardní nebo jejich varianty. Zde používaný termín „serinová proteáza“ znamená proteázu, která má alespoň 50% a výhodně 80% aminokyselinovou sekvenci shodu se sekvencemi jedné nebo více serinových proteáz subtilizinového typu. Standardní serinové proteázy subtilizinového typu jsou produkovány například mikroorganismy *Bacillus alcalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus amylosaccharicus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus* a *Bacillus subtilis*. Diskuse týkající se subtilizinového typu serinových proteáz a jejich homologů lze nalézt v Siezen a kol., „Homology Modelling and Protein Engineering Strategy of Subtilases, the Family of Subtilisin-Like Serine Proteases“, *Protein Engineering*, sv. 4, č. 7, str. 719 až 737 (1991).

Výhodné mateřské aminokyselinové sekvence pro použití, které je předmětem tohoto vynálezu, zahrnují například ty, které jsou získány z *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis* a *Bacillus subtilis*, subtilizin BPN, subtilizin BPN', subtilizin Carlsberg, subtilizin DY, subtilizin 309, proteinazu K a thermitázu, včetně A/S Alcalase® (komerčně dostupné od Novo Industries, Kodaň, Dánsko), Esperase® (Novo Industries), Savinase® (Novo Industries), Maxatase® (komerčně dostupné od Gist-Brocades, Delft, Holandsko), Maxacal® (Gist-Brocades), Maxapem 15® (Gist-Brocades) a varianty výše uvedených. Zvláště výhodné proteázy pro použití, které je předmětem tohoto vynálezu, jsou ty, které jsou získávány z *Bacillus amyloliquefaciens* a

jejich varianty. Nejvýhodnější proteázy pro použití jako proteázové části v rámci předloženého vynálezu jsou subtilizin BPN' a jeho varianty.

Zvláště výhodné varianty subtilizinu BPN' vhodné pro použití zde jako mateřské aminokyselinové sekvence, dále zde označované jako „Proteáza A“, jsou popsány v patentu US č. 5 030 378, Venegas, vydaný 9. července 1991, a charakterizované aminokyselinovou sekvencí subtilizinu BPN' s následujícími mutacemi:

- (a) Gly v pozici 166 je substituován aminokyselinovým zbytkem, vybraným z Asn, Ser, Lys, Arg, His, Gln, Ala a Glu; Gly v pozici 169 je substituován Ser a Met v pozici 222 je substituován aminokyselinovým zbytkem, vybraným z Gln, Phe, His, Asn, Glu, Ala a Thr; nebo
- (b) Gly v pozici 160 je substituován Ala a Met v pozici 222 je substituován Ala.

Další výhodné varianty subtilizinu BPN' vhodné pro použití zde jako mateřské aminokyselinové sekvence, dále zde označované jako „Proteáza B“, jsou popsány v EP-B-251 446, postoupeném Genencor International, Inc., publikovaném 7. ledna 1988, převedený 28. prosince 1994, které jsou charakterizovány standardní aminokyselinovou sekvencí subtilizinu BPN' s mutacemi na jedné nebo více následujících pozicích: 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 na dvou nebo více pozicích uvedených výše a kombinovaných s jednou nebo více mutacemi na pozicích, vybraných z Asp32, Ser33, Tyr104, Ala152, Asn155, Glu156, Gly166, Gly169, Phe189, Tyr217 a Met222.

Jiné výhodné varianty subtilizinu BPN' vhodné pro použití zde jako mateřské aminokyselinové sekvence, dále zde označované jako „Proteáza C“, jsou popsány v WO 95/10615, postoupeném Genencor International, Inc., publikovaném 20. dubna 1995, které jsou charakterizovány standardní aminokyselinovou sekvencí subtilizinu BPN' s mutací na pozici Asn76 v kombinaci s mutacemi na jedné nebo více pozicích, vybraných z: Asp99, Ser101, Gly102, 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 výhodné varianty subtilizinu BPN' vhodné pro použití zde jako mateřské aminokyselinové sekvence, dále zde označované jako „Proteáza D“, jsou popsány v patentu US č. US 4 760 025, Estell a kol., které jsou charakterizovány standardní

aminokyselinovou sekvencí subtilizinu BPN' s mutací na jedné nebo více pozicích, vybraných z Asp32, Ser33, His64, Tyr104, Asn155, Glu156, Gly166, Gly169, Phe189, Tyr217 a Met222.

Výhodnější proteázy, vhodné pro použití zde jako mateřské aminokyselinové sekvence jsou vybrány ze skupiny skládající se z Alcalase®, subtilizinu BPN', Proteázy A, Proteázy B, Proteázy C a ProteázyD, přičemž Proteáza D je nejvýhodnější.

Podle předkládaného vynálezu, je mateřská aminokyselinová sekvence substituována na jednom nebo více aminokyselinových zbytcích substituující aminokyselinou a je tak vytvořena proteázová část (prekurzor), vhodná pro připojení jedné nebo více předložených přídatných částí. Substituce by měla být provedena v jedné nebo více epitopových oblastech, které byly objeveny autory předkládaného vynálezu. Autoři předkládaného vynálezu objevili tři epitopové oblasti, jedna se nachází na pozicích 70 až 84, odpovídajících subtilizinu BPN' (první epitopová oblast), jedna se nachází na pozicích 103 až 126, odpovídajících subtilizinu BPN' (druhá epitopová oblast) a jedna se nachází na pozicích 217 až 252, odpovídajících subtilizinu BPN' (třetí epitopová oblast). V jiném provedení vynálezu obsahuje proteázová část substituci na jedné nebo více pozicích v jedné nebo více epitopových oblastech (tj. jednu nebo více substitucí, které se vyskytují v každé ze dvou nebo všech třech epitopových oblastech). V ještě jiném provedení vynálezu obsahuje proteáza substituci na jedné nebo více pozicích v každé ze tří epitopových oblastech (tj. jednu nebo více substitucí, které se vyskytují ve všech třech epitopových oblastech). Nejvýhodnější je, když je mateřská aminokyselinová sekvence substituována na jednom nebo více aminokyselinových zbytcích, kdy se alespoň jedna ze substitucí nachází v první epitopové oblasti.

Když substituce nastane v první epitopové oblasti, substituce nastane na jedné nebo více z pozic 70 až 84, výhodněji na jedné nebo více z pozic 73 až 81 a nejvýhodněji na pozici 78. Když substituce nastane v druhé epitopové oblasti, substituce nastane na jedné nebo více z pozic 106 až 126, výhodněji na jedné nebo více z pozic 106 až 120 a nejvýhodněji na pozici 116. Když substituce nastane v třetí epitopové oblasti, substituce nastane na jedné nebo více z pozic 217 až 254, výhodněji na jedné nebo více z pozic 236 až 254 a nejvýhodněji na pozici 240.

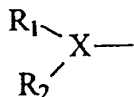
Aby bylo co nejlépe dosaženo selektivního spojení (např. selektivní spojení v jedné nebo více epitopových oblastech) s jednou nebo více přídatnými částmi, které

jsou předmětem tohoto vynálezu, k proteázové části, substituce by měla být provedena substituováním aminokyselinou, která se nevyskytuje (je jedinečná) v mateřské aminokyselinové sekvenci. Z tohoto hlediska může být použita jakákoli aminokyselina, která je v mateřské sekvenci jedinečná. Například protože se cysteinový zbytek v standardní aminokyselinové sekvenci subtilizinu BPN' nevyskytuje, z hlediska předkládaného vynálezu je vhodná substituce subtilizinu BPN' jedním nebo více cysteinovými zbytky v jedné nebo více epitopových oblastech. Pokud se nachází cysteinový zbytek mimo epitopové oblasti mateřské aminokyselinové sekvence, je výhodné substituovat jiný aminokyselinový zbytek v každé z těchto pozic, aby se umožnilo selektivní spojení s jednou nebo více přídatnými částmi v epitopové oblasti (epitopových oblastech). Cystein je nejvýhodnější substituující aminokyselina pro substituci v jedné nebo více epitopových oblastech.

Jiné výhodné substituující aminokyseliny zahrnují lyzin. Pokud substituující aminokyselinou je lyzin, je výhodné mutovat lyzinové zbytky, vyskytující se mimo epitopové oblasti mateřské aminokyselinové sekvence na jiný aminokyselinový zbytek, takže funkce jednoho nebo více lyzinových zbytků v epitopových oblastech je selektivní. Například lyzinový zbytek se nachází v subtilizinu BPN' na pozici 237, což je ve třetí epitopové oblasti. Může být provedena místně selektivní mutace všech jiných lyzinových zbytků, nacházejících se v sekvenci subtilizinu BPN' a pak následuje selektivní přidělení funkce lyzinovému zbytku ve třetí epitopové oblasti pomocí přídatné částmi. Jinou možností je mutovat pozice v epitopových oblastech na lyzin a poté následuje selektivní přidělení funkce na těchto pozicích pomocí polymerové části.

Přídatné části.

Proteázové konjugáty, které jsou předmětem tohoto vynálezu, dále obsahují jednu nebo více přídatných částí, kde každá z přídatných částí je kovalentně připojena k jedné ze substituujících aminokyselin, přítomných v jedné z epitopových oblastí a má strukturu:



kde X je buď nic nebo vazebná část; R_1 je buď nic, první polypeptid a první polymer; a R_2 je buď nic, druhý polypeptid a druhý polymer; kde alespoň jeden se skupiny X, R_1 a R_2 není nulový.

S výhodou proteázový konjugát obsahuje od 1 do 15, výhodněji od 2 do 10 a nejvýhodněji od 1 do 5 přídatných částí.

Pokud R_1 a R_2 jsou nezávisle na sobě polypeptidové části nebo polymerové části, R_1 a R_2 mohou být stejné nebo odlišné. Je výhodné, když R_1 je polypeptidová část, je R_2 buď nic nebo polypeptidová část, a nejvýhodněji nic. Nejvýhodnější je, když R_1 je polypeptidová část, tak R_2 je buď nic nebo odpovídající polypeptidová část, a nejvýhodněji nic. Je výhodné, když R_1 je polymerová část, je R_2 buď nic nebo polymerová část. Nejvýhodnější je, když R_1 je polymerová část, tak R_2 je buď nic nebo odpovídající polymerová část. Pokud alespoň jeden z R_1 a R_2 první a druhý polymer, potom X je s výhodou nulové.

Polypeptidové části.

Zde popsané polypeptidové části zahrnují ty, které obsahují dva nebo více aminokyselinové zbytky. Výhodné polypeptidové části jsou vybírány z proteinů, včetně enzymů. Výhodné enzymy zahrnují proteázy, celulózy, lipázy, amylázy, peroxidázy, mikroperoxidázy, hemicelulózy, xylanázy, fosfolipázy, esterázy, kutinázy, pektinázy, keratinázy, reduktázy (včetně například NADH reduktázy), oxidázy, fenoloxidázy, lipoxxygenázy, ligninázy, „pullulanases“, tanázy, pentozanázy, malanázy, β -glukanázy, arabinozidázy, hyaluronidázy, chondroitinázy, „laccases“, transferázy, izomerázy (včetně například glukózoizomerázy a xylózoizomerázy), lyázy, ligázy, syntetázy a enzymy pocházející z ovoce (včetně například papainu). Výhodnější enzymy, vhodné pro použití jako polypeptidové části, zahrnují proteázy, celulózy, amylázy, lipázy a enzymy pocházející z ovoce, přičemž proteázy jsou z nich nejvýhodnější.

Příklady lipáz, vhodných pro použití jako polypeptidová část, zahrnují ty, které pocházejí z následujících mikroorganismů: *Humicola*, *Pseudomonas*, *Fusarium*, *Mucor*, *Chromobacterium*, *Aspergillus*, *Candida*, *Geotricum*, *Penicillium*, *Rhizopus* a *Bacillus*.

Příklady komerčně dostupných lipáz zahrnují Lipolase®, Lipolase Ultra®, Lipozyme®, Palatase®, Novozym435® a Lecitase® (všechny z nich jsou komerčně dostupné od Novo Nordisk A/S, Kodaň, Dánsko), Lumafast® (komerčně dostupný od Genencor, Int., Rochester, NY) a Lipomax® (Genencor, Int.)

Příklady proteáz, vhodných pro použití jako polypeptidová část, zahrnují serinové proteázy, chymotrypsin a enzymy typu elastázy. Nejvýhodnější proteázy, vhodné pro použití jako polypeptidová část, zahrnují serinové proteázy, které byly zde výše definovány v diskusi o proteázových částech.

Je nejvýhodnější, když polypeptidová část je serinová proteáza, tak polypeptidová část odpovídá výše uvedené definici proteázové části, tj. polypeptidová část má pozměněnou aminokyselinovou sekvenci mateřské aminokyselinové sekvence v jedné nebo více epitopových oblastech, jak zde bylo výše popsáno (tato mateřská aminokyselinová sekvence může být označena jako „druhá“ mateřská aminokyselinová sekvence). V tomto případě, jedna ze spojících částí (kde spojící část není nulová) nebo proteázová část (kde spojící část není nulová) je kovalentně připojena k polypeptidové části pomocí jedné substituující aminokyseliny, přítomné v jedné z epitopových oblastí polypeptidové části. Když polypeptidová část je serinová proteáza, lze uplatnit totéž výhodné, výhodnější a nejvýhodnější spojení, jak zde bylo výše popsáno pro proteázové části a jejich odpovídající mateřské aminokyselinové sekvence.

Nejvýhodnější je, když polypeptidová část je serinová proteáza, tak polypeptidová část a proteázová část jsou ekvivalentní části. V tomto případě polypeptidová část a proteázová část jsou s výhodou spojeny pomocí disulfidického můstku, přičemž X není přítomno a nejvýhodněji také R_2 není přítomno.

Polymerové části.

Zde uváděné přídatné části mohou obsahovat části polymerů. Příklady vhodných polymerových částí zahrnují polyalkylenoxidy, polyalkoholy, polyvinylalkoholy, polykarboxyláty, polyvinylpyrolidony, polyaminokyseliny, celulózy, dextrany, škroby, glykogen, agarózy, guarovou gumu, „pullulane“, inulin, xanthanovou gumu, karagénan, pektin, biopolymery, hydrolyzáty alginové kyseliny a hydrolyzáty chitosanu. Výhodné polyalkylenoxidy zahrnují polyethylenglykoly, methoxypolyethylenglykoly a polypropylenglykoly. Výhodné dextrany zahrnují karboxymethyldextrany. Výhodné celulózy zahrnují methylcelulózu, karboxymethylcelulózu, ethylcelulózu, hydroxyethyl celulózu, karboxyethylcelulózu a hydroxypropylcelulózu. Výhodnými škroby jsou hydroxyethylové deriváty škrobů a hydroxypropylové deriváty škrobů. Výhodnějšími polymery jsou polyalkylenoxidy. Nejvýhodnější polymerovou částí je polyethylenglykol.

Pokud R_1 a R_2 jsou nezávisle na sobě polymerové části, je výhodné, když R_1 a R_2 mají společnou molekulovou hmotnost (tj. molekulová hmotnost R_1 plus molekulová hmotnost R_2) od 0,5 kD (kilodaltonů) do 40 kD, výhodněji od 0,5 kD do 20 kD a nejvýhodněji od 1 kD do 10 kD.

Pokud R_1 a R_2 jsou polymerové části, je výhodné když R_1 a R_2 mají každý, nezávisle na sobě molekulovou hmotnost od 0,25 kD do 20 kD, výhodněji od 0,5 kD do 10 kD a nejvýhodněji od 0,5 kD do 5 kD.

Pokud R_1 a R_2 jsou polymerové části, je výhodné když je poměr molekulových hmotností R_1 a R_2 v rozmezí od 1:10 do 10:1, výhodněji od 1:5 do 5:1 a nejvýhodněji od 1:3 do 3:1.

Pokud R_1 je polymerová část a R_2 je nulový, je výhodné když R_1 má molekulovou hmotnost od 0,5 kD do 40 kD, výhodněji od 0,5 kD do 20 kD a nejvýhodněji od 1 kD do 10 kD.

Vazebné části.

Zde používané X může být (nic nebo) vazebná část, která je kovalentně připojena k polypeptidové části nebo polymerové části a je též kovalentně připojena k jedné substituující aminokyselině přítomné v jedné epitopové oblasti proteázové části. Vazebná část je jakákoli malá molekula, například molekula o molekulové hmotnosti menší než 800, výhodně menší než 400 a ještě výhodněji menší než 300. Nejvýhodnější vazebné části zahrnují takové, které jsou schopné se kovalentně vázat k cysteinovému zbytku nebo lyzinovému zbytku, nejvýhodněji k cysteinovému zbytku. Příklady vazebných částí a příslušná chemie jsou popsány v patentu US č. 5 446 090, Harris, vydaném 29. srpna 1995; patentu US č. 5 171 264, Merrill, vydaném 15. prosince 1992; patentu US č. 5 162 430, Rhee a kol., vydaném 10. listopadu 1992; patentu US č. 5 153 265, Shadle a kol., vydaném 8. října 1992; patentu US č. 5 122 614, Zalipsky, vydaném 16. června 1992; Goodson a kol., „Site-Directed Pegylation of Recombinant Interleukin-2 at its Glycosylation Site“, Biotechnology, sv. 8, č. 4, str. 343 až 346 (1990); Kogan, „The Synthesis of Substituted Methoxy-Poly(ethylene glycol) Derivatives Suitable for Selective Protein Modification“, Synthetic Communications, sv. 22, str. 2417 až 2424 (1992) a Ishii a kol., „Effects of the State of the Succinimido-Ring on the Fluorescence and Structural Properties of Pyrene Maleimide-Labeled $\alpha\alpha$ -Tropomyosin“, Biophysical Journal, sv. 50, str. 75 až 80 (1986). Nejvýhodnější vazebná část je substituovaný (např. alkyl) nebo nesubstituovaný sukcinimid.

Způsoby přípravy.

Proteázové části jsou připraveny pomocí mutování nukleotidových sekvencí, které kódují mateřskou aminokyselinovou sekvenci. Takové metody jsou v oboru dobře známé, jedna taková metoda je uvedena dále:

Fágemid (pSS-5), obsahující gen pro standardní subtilizin BPN⁺ (Mitchison, C. a J.A. Wells, „Protein Engineering of Disulfide Bonds in Subtilisin BPN⁺“, *Biochemistry*, sv. 28, str. 4807 až 4815 (1989) je transformován do kmene CJ236 *Escherichia coli* dutung- a jednovláknová DNA matrice obsahující uracil je vytvořena pomocí VCSM13 helper fága (Kunkel a kol., „Rapid and Efficient Site-Specific Mutagenesis Without Phenotypic Selection“, *Methods in Enzymology*, sv. 154, str. 367 až 82 (1987), postupem modifikovaným podle Yuckenberg a kol., „Site-Directed *in vitro* Mutagenesis Using Uracil-Containing DNA and Phagemid Vectors“, *Directed Mutagenesis - A Practical Approach*, McPherson, M. J. ed., str. 27 až 48 (1991). Místně cílená mutageneze pomocí primerů, odvozená z metody Zoller a Smith (Zoller, M. J. a M. Smith, „Oligonucleotide - Directed Mutagenesis Using M13 – Derived Vectors: An Efficient and General Procedure of Point Mutations in any Fragment of DNA“, *Nucleic Acids Research*, sv. 10, str. 6487 až 6500 (1982), je použita pro přípravu všech mutant (v podstatě jak je uvedeno v Yuckenberg a kol., „Site-Directed *in vitro* Mutagenesis Using Uracil-Containing DNA and Phagemid Vectors“, *Directed Mutagenesis - A Practical approach*, McPherson, M. J. ed., str. 27 až 48 (1991)).

Oligonukleotidy jsou připraveny pomocí DNA syntetizátoru 380B (Applied Biosystems Inc.). Produkty mutačních reakcí jsou transformovány do *Escherichia coli* kmene MM294 (Americká sbírka typových kultur E. coli 33625). Všechny mutace jsou potvrzeny pomocí sekvenování DNA a izolovaná DNA je transformována do expresního kmene PG632 *Bacillus subtilis* (Saunders a kol., „Optimization of the Signal-Sequence Cleavage Site for Secretion from *Bacillus subtilis* of a 34-amino acid Fragment of Human Parathyroid Hormone“, *Gene*, sv. 102, str. 277 až 282 (1991) a Yang a kol., „Cloning of the Neutral Protease Gene of *Bacillus subtilis* and the Use of the Cloned Gene to Create an *in vitro* – Derived Deletion Mutation“, *Journal of Bacteriology*, sv. 160, str. 15 až 21 (1984).

Fermentace je následující. Buňky *Bacillus subtilis* (PG632), obsahující studovanou proteázu rostou do střední logaritmické fáze v jednom litru LB bujónu, obsahujícího glukózu 10 g/litr, naočkovány do fermentoru Biostat C (Braun Biotech, Inc., Allentown, PA) v celkovém objemu 9 litrů. Fermentační médium obsahuje kvasničný výtažek, kaseinový hydrolyzát, rozpustný - částečně hydrolyzovaný škrob (Maltrin M-250), činidla zamezující tvorbě pěny, pufrý a stopové minerály (viz „Biology of Bacilli: Application to Industry“, Doi, R. H. a M. McGloughin, ed. (1992)). Bujón je

udržován během fermentačního cyklu při konstantním pH 7,5. Pro antibiotikovou selekci mutovaných plazmidů je přidán kanamycin (50 µg/ml). Buňky jsou pěstovány po dobu 18 hodin při teplotě 37 °C do A_{600} asi 60 a výtěžek je potom odebrán.

Aby byla získána čistá proteáza, je fermentační bujón je zpracován pomocí následujících kroků. Bujón je zbaven buněk *Bacillus subtilis* průchodem přes 0,16 µm membránu. Bezbuňkový bujón je potom koncentrován ultrafiltrací přes membránu, která zadržuje molekuly s molekulovou hmotností 8000. pH je upraveno na 5,5 pomocí koncentrovaného pufru MES (2-(N-morfolin)ethanolsulfonová kyselina). Proteáza je dále čištěna pomocí iontoměničové chromatografie (výměna kationtů) na S-sepharose a elucí pomocí gradientů NaCl. (Viz Scopes, R. K., „Protein Purification Principles and Practice“, Springer-Verlag, New York (1984).

Pro určení koncentrace aktivní proteázy ve frakcích sebraných v průběhu gradientové eluce je použit test pNA (DeIMar a kol., *Analytical Biochemistry*, sv. 99, str. 316 až 320 (1979)). Tento test měří rychlost s jakou je uvolňován p-nitroanilin, když proteáza hydrolyzuje rozpustný syntetický substrát, sukcinyl-alanin-alanin-prolin-fenylalanin-p-nitroanilin (sAAPF-pNA). Rychlost s jakou hydrolyzační reakce vytváří žlutou barvu je měřena při 410 nm na spektrofotometru a je úměrná koncentraci aktivní proteázové části. Dále je použito měření absorbance při 280 nm pro určení celkové koncentrace proteinů. Poměr aktivní proteáza/celkový protein udává čistotu proteázy a je používán pro určování frakcí, které budou spojeny pro přípravu zásobního roztoku.

Aby bylo zabráněno autolýze proteázy během skladování, je ke spojeným frakcím, získaným z chromatografického sloupce, přidána stejná hmotnost propylenglykolu. Po skončení purifikačního postupu je čistota zásobního roztoku varianty kontrolována SDS-PAGE (polyakrylamidová elektroforéza v přítomnosti sodium dodecylsulfátu) a absolutní koncentrace enzymu je určována pomocí metody titrace aktivního místa za použití trypsinového inhibitoru typu II-T: krocaní bílek (Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri).

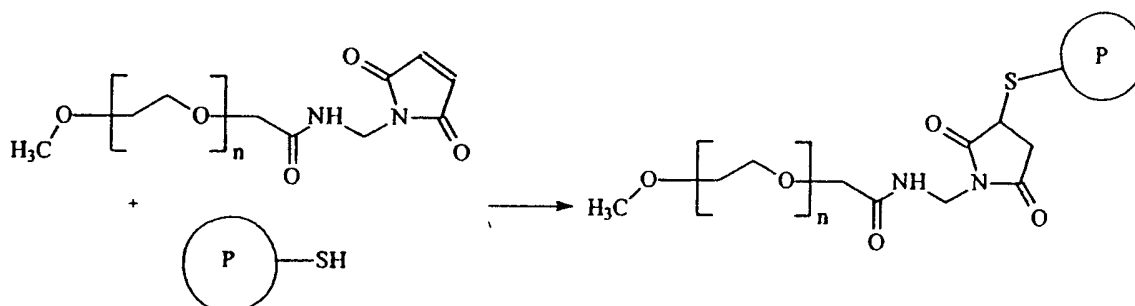
Při přípravě pro použití je zásobní roztok proteázy vyčištěn na sloupci Sephadex-G25 (Pharmacia, Piscataway, New Jersey), aby byl odstraněn propylenglykol a vyměněn pufr. Pufr MES, přítomný v zásobním roztoku enzymu je zaměněn za roztok 0,01 M KH_2PO_4 , pH 5,5.

Připravená proteáza může být použita pro vytvoření proteázového konjugátu s jednou nebo více přídatnými částmi. Prekurzor přídatné části (prekurzor přídatné

části reaguje s prekurzorem proteázové části a vytvoří tak proteázový konjugát, který sestává z přídatné části a proteázové části) je s výhodou aktivován tak, že zvyšuje reaktivitu prekurzoru s proteázovou částí. Taková aktivace je v oboru dobře známá. Některé příklady metod přípravy proteázového konjugátu jsou uvedeny dále.

Příklady provedení vynálezu

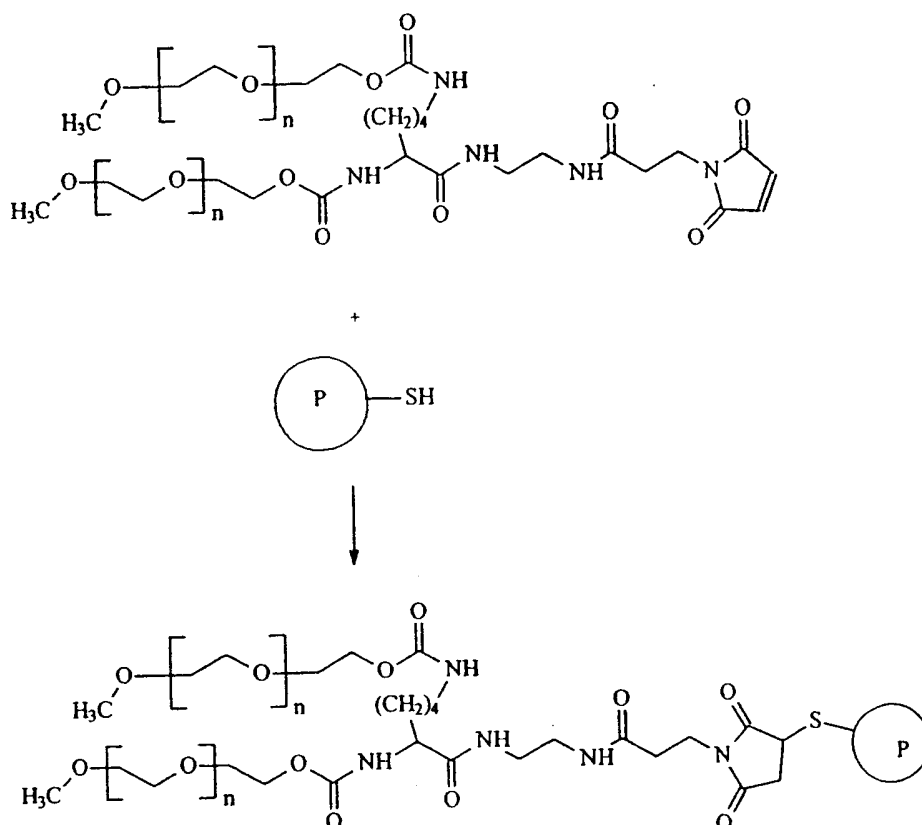
Příklad 1



Proteáza obsahující cysteinový zbytek v jedné z epitopových oblastí je spojena s polymerovou částí podle výše uvedeného schématu pomocí následující metody (příčemž „P“ představuje proteázovou část bez thiolové skupiny, která pochází ze substituce cysteinu a n je počet opakujících se jednotek monomeru v polyethylenglykolu (například $n = 77$)).

Je připravena varianta subtilizinu BPN', obsahujícího substituci leucinu za tyrozin na pozici 217 a substituci cysteinu za serin na pozici 78. Je dosažena koncentrace varianty asi 2 mg/ml ve fosfátovém pufru (pH 5,5). Potom je pH zvýšeno na 7,5 pomocí zředěného hydroxidu sodného. Varianta je smíchána s monomethyl polyethylenglykol maleimidem v poměru 25 : 1 aktivovaného polymeru k přebytku varianty. Po 1 hodině míchání při teplotě místnosti bylo pH směsi upraveno na 5,5 pomocí zředěné kyseliny fosforečné a filtrováno skrz ultrafiltr, který zadržuje molekuly od určité molekulové hmotnosti, aby byl odstraněn přebytek polymeru. Koncentrát obsahuje čištěný proteázový konjugát.

Příklad 2

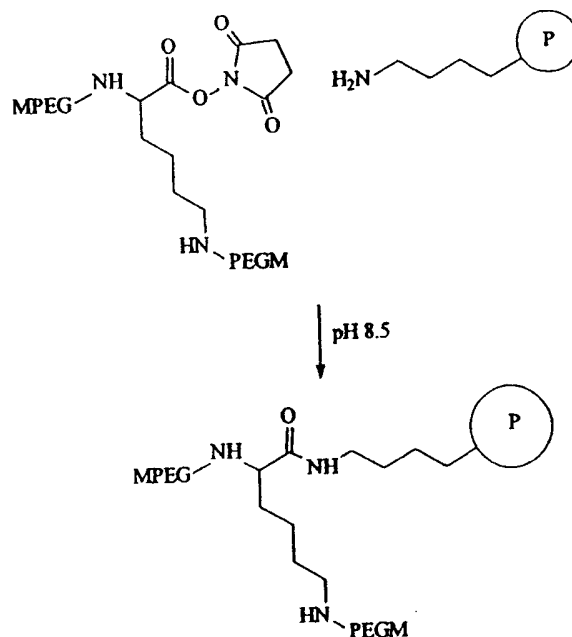


Proteázová část obsahující cysteinový zbytek v jedné z epitopových oblastí je spojena s polymerovou částí podle výše uvedeného schématu pomocí následující metody (přičemž „P“ představuje proteázovou část bez thiolové skupiny, která pochází ze substituce cysteinu a n je počet opakujících se jednotek monomeru v polyethylenglykolu (například $n = 77$)).

Je připravena varianta subtilizinu BPN', obsahujícího substituci leucinu za tyrozin na pozici 217 a substituci cysteinu za serin na pozici 78. Je dosažena koncentrace varianty asi 2 mg/ml ve fosfátovém pufru (pH 5,5). Potom je pH zvýšeno na 7,5 pomocí zředěného hydroxidu sodného. Varianta je smíchána s dimethyl polyethylenglykol maleinimidem v poměru 25 : 1 aktivovaného polymeru k přebytku varianty. Po 1 hodině míchání při teplotě místnosti bylo pH směsi upraveno na 5,5 pomocí zředěné kyseliny fosforečné a filtrováno přes ultrafiltr, který zadržuje molekuly od určité molekulové hmotnosti, aby byl odstraněn přebytek polymeru. Koncentrát obsahuje čištěný proteázový konjugát.

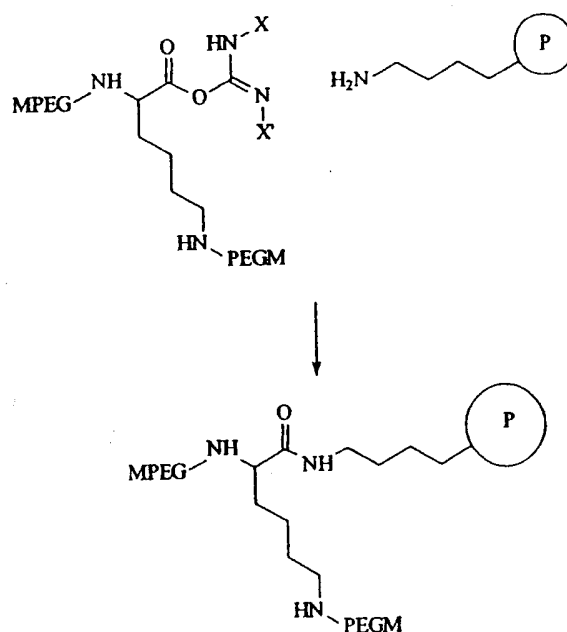
Příklad 3

Polymer chráněný sukcinimidem je selektivně připojen k lyzinu v jedné nebo více epitopových eblastech (přičemž „MPEG“ a „PEGM“ jsou ekvivalenty a označují monomethylpolyethylenglykoly a „P“ představuje proteázovou část bez zobrazené lyzinové aminoskupiny):

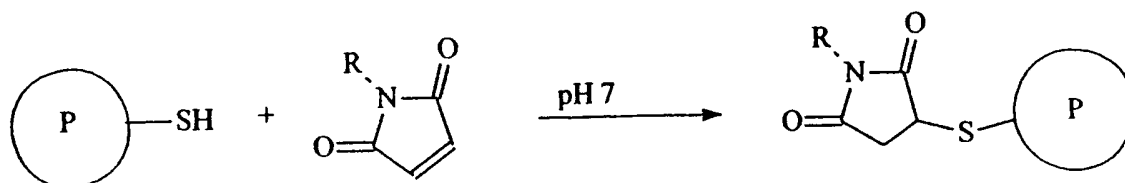


Příklad 4

Polymer chráněný karbodiimidem je selektivně připojen k lyzinu v jedné nebo více epitopových eblastech (přičemž „MPEG“ a „PEGM“ jsou ekvivalenty a označují monomethylpolyethylenglykoly a „P“ představuje proteázovou část bez zobrazené lyzinové aminoskupiny a X a X' jsou postranní řetězce, obsahující karbodiimidovou část, například alkyly):



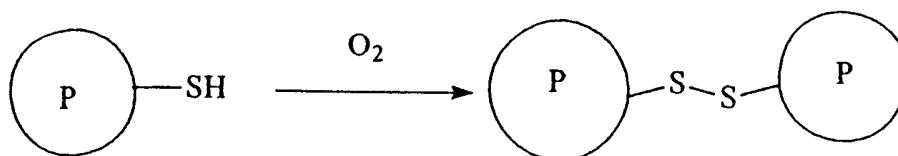
Příklad 5



Proteázová část obsahující cysteinový zbytek v jedné z epitopových oblastí je spojena s alkylmaleinimidem pomocí následující metody (přičemž „P“ představuje proteázovou část bez thiolové skupiny, která pochází ze substituce cysteinu a „R“ je alkylová skupina). V tomto příkladu jsou R₁ a R₂ nulové a spojující část je odvozena z alkylmaleinimidu.

Je připravena varianta subtilizinu BPN', obsahujícího substituci leucinu za tyrozin na pozici 217 a substituci cysteinu za serin na pozici 78. Je připraveno 20 ml roztoku varianty o koncentraci přibližně 1 mg/ml v 0,01 M KH₂PO₄ pufru (pH 7). K tomuto roztoku je přidáno 1,5 ekvivalentu alkylmaleinimidu (například methylmaleinimidu). Roztok je jemně míchán při teplotě místnosti po dobu 1 hodiny. Výsledný proteázový konjugát je z roztoku získán standardními postupy.

Příklad 6



Proteázová část obsahující cysteinový zbytek v jedné z epitopových oblastí vytváří dimer pomocí následující metody (přičemž „P“ představuje proteázovou část bez thiolové skupiny, která pochází ze substituce cysteinu). V tomto příkladu je proteázová část a polypeptidová část ekvivalentní (a X je nulové).

Je připravena varianta subtilizinu BPN', obsahujícího substituci leucinu za tyrozin na pozici 217 a substituci cysteinu za serin na pozici 78. Je připraveno 20 ml roztoku varianty o koncentraci přibližně 1 mg/ml v 0,01 M KH_2PO_4 pufru (pH 8,6). Tento roztok je jemně probubláván kyslíkem při teplotě místnosti po dobu 1 hodiny, aby se vytvořil požadovaný dimerní proteázový konjugát. Výsledný proteázový konjugát je z roztoku získán standardními postupy.

Analytické metody.

U proteázových konjugátů, které jsou předmětem tohoto vynálezu, může být pomocí následujících metod testována jejich enzymatická aktivita a imunogenní odpověď, obě jsou známy osobám se zkušenostmi v oboru. Popřípadě mohou být použity jiné, v oboru dobře známé metody.

Proteázová aktivita proteázového konjugátu, který je předmětem tohoto vynálezu, může být testována pomocí metod, které jsou v oboru dobře známé. Dvě takové metody jsou představeny dále:

Aktivita měřená na šupinkách kůže.

Pomocí pásky Scotch® #3750, jsou opakovaně z nohou subjektu sloupávány šupinky kůže tak dlouho, dokud není páska od těchto šupinek dosti matná. Páska je potom rozstříhána na čtverce o rozměrech 1 palec na 1 palec a uložena. Do petriho misky o rozměrech 10 mm krát 35 mm je v pufru 0,01 M KH_2PO_4 pH 5,5 přidáno 0,75 mg/ml kontrolního enzymu (například subtilizin BPN') nebo proteázový konjugát, který bude testován. K tomuto roztoku je přidán 1 ml 2,5% laurátu sodného pH 8,6. Roztok je mírně míchán na deskovém míchadle. Předem připravený čtverec pásky je ponechán nasát v tomto roztoku (stranou s šupinkami kůže nahoru) po dobu 10 min. za

pokračujícího mírného míchání. Čtverec pásky je potom opláchnut vodovodní vodou po dobu 15 s. Do čisté petriho misky jsou napipetovány 3 ml modré barvy Stevenel Blue (3ml, komerčně dostupná od Sigma Chemical Company, St. Louis, MO). Opláchnutý čtverec pásky je umístěn na tři minuty do barvy (stranou s šupinkami kůže nahoru) za mírného míchání. Čtverec pásky je z barvy vyjmut a postupně opláchnut ve dvou 300 ml kádinkách s destilovanou vodou, každé opláchnutí trvalo 15 sekund. Poté byl čtverec pásky ponechán na vzduchu uschnout. Intenzita barvy čtverce pásky, získaná v kontrolním enzymu a intenzita barvy čtverce pásky, získaná v proteázovém konjugátu, jsou porovnány vizuálně nebo pomocí chromometru. Čtverec pásky z proteázového konjugátu s menší intenzitou barvy vzhledem ke čtverci pásky z kontrolního enzymu, prokazuje proteázový konjugát, který má vyšší aktivitu.

Aktivita měřená pomocí zbarvení kolagenu.

K 50 ml 0,1 M tris pufru (tris(hydroxymethylaminomethan)), obsahujícího 0,01 M CaCl_2 s pH 8,6 je přidáno 0,5 g azocoll (kolagen napuštěný azobarvivem, komerčně dostupný od Sigma Chemical Company, St. Louis, MO). Směs je inkubována při 25 °C za mírného míchání na deskové míchačce. Dva mililitry této směsi je přefiltrováno přes injekční filtr 0,2 mikronu a změřena jeho absorbance při 520 nm a na tuto hodnotu je nastavena nula spektrofotometru. Pak je ke zbývajícím 48 ml směsi tris/azocoll přidána 1 ppm kontrolního enzymu (například subtilizin BPN') nebo testovaného proteázového konjugátu. Každé 2 min. jsou přefiltrovány 2 ml roztoku, obsahujícího kontrolu či proteázový konjugát, přes injekční filtr 0,2 mikronu, po celkovou dobu 10 minut. U každého filtrovaného vzorku je ihned změřena jeho absorbance při 520 nm a výsledky jsou vyneseny v závislosti na čase. Sklony křivek kontroly a testovaného konjugátu jsou známkou relativních aktivit vzorků. Vyšší sklon křivky je známkou vyšší aktivity. Test aktivity proteázového konjugátu (sklon) může být vyjádřen v procentech aktivity kontroly (sklonu).

Test množení T-buněk.

Imunogenní potenciál proteázových konjugátů, které jsou předmětem tohoto vynálezu, může být určen pomocí metod v oboru známých nebo pomocí testu množení T-buněk, který je zde dále uvedený. Tento test je variantou testu popsaného v Bungy Poor Fard a kol., „T Cell Epitopes og the Major Fraction of Rye Grass *Lolium perenne* (*Lol p I*) Defined Usibg Overlpping Peptides in vitro and in vivo“, Clinical Experimental Immunology, sv. 94, str. 111 až 116 (1993).

V tomto testu jsou použity krve osob alergických k subtilizinu BPN' (pozitivní kožní test) a osob kontrolních (negativní kožní test). Od každé osoby je odebráno asi 60 ml krve, ze které jsou pomocí ficoll-hypaque (který může být získán od Pharmacia, Piscataway, New Jersey), získány mononukleární buňky. Buňky jsou promyty dvakrát v RPMI 1640 (které může být získáno od Gibco, Grand Island, New York) a potom resuspendovány v kompletním médiu RPMI 1640, doplněném 10 % lidského AB séra, 2 mM L-glutaminu a 25 µg/ml gentamycinu (který může být získán od Gibco, Grand Island, New York). Buňky jsou pěstovány při koncentraci 2×10^5 buněk na jamku v 0,2 ml kompletního média v 96jamkových mikrotitračních destičkách se dnem ve tvaru „U“. Potenciální antigen, který má být testován (buď inaktivovaný BPN' jako pozitivní kontrola nebo proteázový konjugát, který je předmětem tohoto vynálezu) je přidán v konečné koncentraci 40 µg/ml. Kultury jsou inkubovány při 37 °C v atmosféře 5% CO₂. Po pětidenní inkubaci je přidána 1 µCi/jamku methyl-³H-thymidinu a po 18 hodinách jsou buňky odebrány. Za míru množení T-buněk je považováno množství ³H-thymidinu zabudovaného buňkou, které je zjišťováno pomocí měření v kapalném scintilátoru.

Prostředky, které jsou předmětem tohoto vynálezu.

Zde uvedené proteázové konjugáty mohou být použity v jakékoli aplikaci, která je vhodná pro příslušnou standardní proteázu. Jedním takovým příkladem jsou čisticí prostředky. Protože proteázové konjugáty, které jsou předmětem tohoto vynálezu, mají žádoucím způsobem snížené imunogenní vlastnosti, tyto proteázové konjugáty mohou být dále používány v aplikacích, které dosud měly z použití proteáz minimální prospěch. Příklady takových aplikací zahrnují ty, v nichž proteázový konjugát nezbytně přichází do těsného styku s kůží savčí (zvláště lidskou kůží), jako při použití prostředků osobní hygieny.

Čisticí prostředky.

Proteázové konjugáty mohou být použity v čisticích prostředcích, mimo jiné v pracích prostředcích, prostředcích pro čištění pevných povrchů, prostředcích na mytí nádobí a detergentových prostředcích pro automatické myčky.

Zde uvedené čisticí prostředky obsahují účinné množství jedné nebo více variant, které jsou předmětem tohoto vynálezu, a nosič čisticího prostředku.

Zde používaný termín „účinné množství proteázového konjugátu“ nebo podobně, označuje množství proteázového konjugátu nezbytné pro dosažení proteolytické

aktivity, potřebné v určitých druzích čisticích prostředků. Taková účinná množství jsou snadno zjistitelná pro osoby s běžnou zkušeností v oboru a je to založeno na mnoha faktorech, jako je určitý použitý proteázový konjugát, čisticí aplikace, specifické složení čisticího prostředku a zda je požadován vlhký nebo suchý (např. ve formě granulí, tyčinky) prostředek a podobně. S výhodou obsahují čisticí prostředky od 0,0001 % do 10 %, výhodněji od 0,001 % do 1 % a nejvýhodněji od 0,01 % do 0,1 % jednoho nebo více proteázových konjugátů, které jsou předmětem tohoto vynálezu. Několik příkladů různých čisticích prostředků, kde mohou být proteázové konjugáty použity, je dále diskutováno detailně.

Navíc k proteázovým konjugátům, které jsou předmětem tohoto vynálezu, předkládané čisticí prostředky obsahují dále nosiče čisticích prostředků, obsahující jeden nebo více materiálů čisticího prostředku, které jsou s proteázovým konjugátem slučitelné. Zde používaný termín „materiál čisticího prostředku“ znamená jakýkoli materiál, vybraný pro určitý typ požadovaného čisticího prostředku a formy tohoto výrobku (např. tekutina, granule, tyčinka, sprej, tyčka, pasta, gel), přičemž tyto materiály jsou také slučitelné s proteázovým konjugátem, použitým v prostředku. Specifický výběr materiálů pro čisticí prostředky je snadno proveditelný, když se vezme v úvahu povrchový materiál, který bude čištěn a požadovaná forma prostředku pro podmínky, za kterých bude čištění probíhat (např. kvůli použití smáčedla). Zde používaný termín „slučitelný“ znamená materiály v čisticím prostředku, které nesnižují proteolytickou aktivitu proteázového konjugátu v takovém rozsahu, že by proteáza neměla při použití za normální situace požadovanou účinnost. Specifické materiály čisticích prostředků jsou zde dále detailně uvedeny.

Proteázové konjugáty, které jsou předmětem tohoto vynálezu, mohou být použity v různých detergentových prostředcích, kde je vyžadována vysoká pěnicí a dobrá čisticí aktivita. Proteázové konjugáty tedy mohou být použity spolu s různými běžnými složkami, aby bylo dosaženo přesně definovaných prostředků na čištění pevných povrchů, prostředků na mytí nádobí, prostředků na praní tkanin a podobně. Takové prostředky mohou být ve formě tekutin, granulí, tyčinek a podobně. Tyto prostředky mohou také být připraveny jako „koncentrované“ detergenty, které obsahují mezi 30 až 60 hmotnostními procenty smáčedel.

Čisticí prostředky zde uvádění mohou popřípadě, a výhodně, obsahovat různá smáčedla (např. aniontová, kationtová smáčedla a smáčedla obsahující oba druhy

nabitých skupin). Taková smáčedla jsou typicky v prostředku přítomna v množstvích od 5 do 35 %.

Jako příklady zde užitečných smáčedel lze mimo jiné uvést běžné C_{11} - C_{18} alkyl benzensulfonáty a primární a náhodné alkylsulfáty, C_{10} - C_{18} sekundární (2,3) alkyl sulfáty obecných vzorců $CH_3(CH_2)_x(CHOSO_3^+M^-)CH_3$ a $CH_3(CH_2)_y(CHOSO_3^+M^-)CH_2CH_3$, kde x a $(y+1)$ jsou celá čísla o velikosti alespoň 7, výhodně alespoň 9 a 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} alkylpolyglykozidy a jejich odpovídající sulfátované polyglykozidy, C_{12} - C_{18} α -sulfátované estery mastných kyselin, C_{12} - C_{18} alkyl a alkylfenolalkoxyláty (zvláště ethoxyláty a smíšené ethoxy/propoxyláty), C_{12} - C_{18} betainy a sulfobetainy („sultainy“), C_{10} - C_{18} aminoxidy a podobně. Zde je dávana přednost alkylalkoxysulfátům (AES) a alkylalkoxykarboxylátům (AEC). Použití takových smáčedel v kombinaci s aminoxidem a/nebo betainovými nebo sultainovými smáčedly je také výhodné, záleží však na požadavku toho, kdo prostředek sestavuje. Jiná běžně používaná smáčedla jsou uvedena v běžných textech z tohoto oboru. Obzvláště vhodná smáčedla zahrnují C_{12} - C_{18} N-methylglukamidy, popsané v patentu US č. 5 194 639, Connor a kol., vydaný 16. března 1993.

Ve zde obsažených detergentových čistících prostředcích se může vyskytovat množství rozmanitých jiných příměsí, například jiné aktivní příměsi, nosiče, činidla udržující vlhkost, barvy nebo pigmenty a u tekutých přípravků rozpouštědla. Jestliže je požadován další zvýšení pěnivosti, mohou být do prostředku přidány zesilovače pěnivosti, jako jsou C_{10} - C_{16} alkolamidy, typicky v množství 1 až 10 %. C_{10} - C_{14} monoethanol a diethanolamidy jsou příkladem typické skupiny takových zesilovačů pěnivosti. Výhodné je také použití těchto zesilovačů pěnivosti spolu s vysoce pěnicími pomocnými smáčedly, jako jsou výše uvedené aminoxidy, betainy a sultainy. Pokud je to žádoucí, mohou být přidány rozpustné hořečnaté soli, jako jsou $MgCl_2$, $MgSO_4$ a podobně, v typických množstvích od 0,1 do 2 %, aby se dále podpořila pěnivost.

Tekuté detergentové prostředky, zde uvedené, mohou obsahovat jako nosiče vodu a jiná rozpouštědla. Vhodné jsou nízkomolekulární primární a sekundární alkoholy, jako jsou methanol, ethanol, propanol a izopropanol. Pro rozpouštění smáčedel jsou výhodné jednoduché alkoholy, ale mohou být také použity polyalkoholy, které obsahují 2 až 6 uhlíkových atomů a 2 až 6 hydroxylových skupin (např. 1,3-

propandiol, ethylenglykol, glycerin a 1,2-propandiol). Prostředky mohou obsahovat 5 až 90 %, typicky však od 10 do 50 % takových nosičů.

S výhodou budou zde uvedené detergentové prostředky sestaveny tak, že během používání pro čištění ve vodném prostředí, bude mít mycí voda pH mezi 6,8 a 11. Leštící prostředky jsou typicky takto sestaveny. Techniky pro kontrolu pH při doporučených způsobech použití, zahrnují použití například pufrů, zásad a kyselin. Tyto techniky jsou dobře známy osobám se zkušenostmi v tomto oboru.

Při sestavování prostředků pro čištění pevných povrchů a prostředků pro čištění tkanin, které jsou předmětem tohoto vynálezu, si pracovník může přát použít různé komponenty ve váhovém množství od 5 do 50 %. Typické komponenty zahrnují 1 až 10 mikronové zeolity, polykarboxyláty jako je citronan a oxydisukcináty, vrstevnaté silikáty, fosfáty a podobně. Ostatní běžné komponenty jsou uvedeny v běžných receptech.

Pracovník si může rovněž přát použít v těchto prostředcích různé další enzymy, jako jsou celulózy, lipázy a proteázy, typicky v množstvích od 0,001 do 1 %. Rozličné čistící enzymy a enzymy vhodné pro péči o tkaniny jsou dobře známy v oboru pracích detergentů.

V těchto prostředcích mohou být použity rozličné bělicí sloučeniny, jako jsou peroxouhličitany, peroxoboritany a podobně, typicky v množstvích 1 až 15 hmotnostních procent. Pokud je to žádoucí, tyto prostředky mohou také obsahovat aktivátory bělidel, jako jsou tetraacetylethylendiamin, nonanoyloxybenzen sulfonát a podobně, které jsou také v oboru známy. Používají se typicky v množstvích od 1 do 10 hmotnostních procent.

V těchto prostředcích mohou být také použita činidla pro uvolnění špíny, zvláště typu aniontových oligoesterů, chelatační činidla, zvláště aminofosfonáty a ethylen diaminodisukcináty, činidla pro uvolnění zeminy, zvláště ethoxylovaný tetraethylenpentamin, dispergující činidla, zvláště polyakryláty a polyaspartáty, leštidla, zvláště aniontová leštidla, činidla potlačující pěnivost, zvláště silikony a sekundární alkoholy, změkčovače tkanin, zvláště valchářské hlíny a podobné, všechny mohou být použity v těchto prostředcích v množstvích od 1 do 35 hmotnostních procent. Standardní popisy složení a publikované patenty obsahují mnohé podrobné popisy těchto běžných materiálů.

V čistících prostředcích mohou být také použity stabilizátory enzymů. Tyto enzymové stabilizátory zahrnují propylenglykol (výhodně v koncentraci od 1 do 10 %), mravenčan sodný (výhodně v koncentraci od 0,1 do 1,0 %) a mravenčan vápenatý (výhodně v koncentraci od 0,1 do 1 %).

Varianty, které jsou předmětem tohoto vynálezu, jsou vhodné pro použití v čistících prostředcích na pevné povrchy. Zde používaný termín „čistící prostředky na pevné povrchy“ označuje tekuté a granulární detergentové prostředky pro čištění pevných povrchů, jako jsou podlahy, stěny, koupelnové kachlíky a podobně. Prostředky pro čištění pevných povrchů, které jsou předmětem tohoto vynálezu, obsahují účinné množství jednoho nebo více proteázových konjugátů, které jsou předmětem tohoto vynálezu, s výhodou v koncentraci od 0,001 do 10 hmotnostních procent, výhodněji v koncentraci od 0,01 do 5 hmotnostních procent, ještě výhodněji v koncentraci od 0,05 do 1 hmotnostního procenta proteázového konjugátu v prostředku. Vedle toho, že obsahují jeden nebo více proteázových konjugátů, typicky tyto čistící prostředky na pevné povrchy obsahují smáčedla a ve vodě rozpustné odlučovací komponenty. V určitých specializovaných produktech, jako jsou sprejové čističe oken, však někdy nejsou smáčedla používána, protože mohou vytvářet filmy a/nebo zbytkové skvrny na skleněném povrchu.

Složka smáčedla, pokud je přítomna, může představovat pouze 0,1 % zde uvedených prostředků, ale typicky budou prostředky obsahovat od 0,25 do 10 %, výhodněji od 1 do 5 % smáčedla.

Prostředky budou typicky obsahovat od 0,5 do 50 % detergentových komponent, s výhodou od 1 do 10 % detergentových komponent.

S výhodou by mělo být pH v oblasti od 7 do 12. Pokud je to nezbytné, je možno pro úpravu pH použít běžná činidla, jako jsou hydroxid sodný, uhličitan sodný nebo kyselina chlorovodíková.

V prostředcích mohou být obsažena rozpouštědla. Vhodná rozpouštědla zahrnují mimo jiné glykolové étery, jako jsou diethylenglykol monohexyl éter, diethylenglykol monobutyl éter, ethylenglykol monobutyl éter, ethylenglykol monohexyl éter, propylenglykol monobutyl éter, dipropylenglykol monobutyl éter a dioly, jako jsou 2,2,4-trimethyl-1,3-pentandiol a 2-ethyl-1,3-hexandiol. Pokud jsou použita, jsou tato rozpouštědla přítomná v množstvích od 0,5 do 15 %, s výhodou 3 do 11 %.

Dále mohou být použita v prostředcích, které jsou předmětem tohoto vynálezu, vysoce těkavá rozpouštědla, jako jsou izopropanol nebo ethanol, aby se urychlilo odpařování prostředku z povrchů, když povrchy nejsou po použití prostředku opláchnuty. Pokud jsou použita, jsou tato těkavá rozpouštědla přítomná v množstvích od 2 do 12 %.

Příklady 7 až 12

Tekuté prostředky na čištění pevných povrchů

	Př. 7	Př. 8	Př. 9	Př. 10	Př. 11	Př. 12
proteázový konjugát z příkladu 3	0,05 %	0,50 %	0,02 %	0,03 %	0,30 %	0,05 %
EDTA	-	-	2,90 %	2,90 %	-	-
citronan sodný	-	-	-	-	2,90 %	2,90 %
NaC ₁₂ alkylbenzensulfonát	1,95 %	-	1,95 %	-	1,95 %	-
NaC ₁₂ alkylsulfát	-	2,20 %	-	2,20 %	-	2,20 %
NaC ₁₂ (ethoxy)sulfát	-	2,20 %	-	2,20 %	-	2,20 %
C ₁₂ dimethylaminoxid	-	0,50 %	-	0,50 %	-	0,50 %
Na kumensulfonát	1,30 %	-	1,30 %	-	1,30 %	-
hexylkarbitol	6,30 %	6,30 %	6,30 %	6,30 %	6,30 %	6,30 %
voda	90,4 %	88,3 %	87,53 %	85,87 %	87,25 %	85,85 %

Všechny předpisy jsou upraveny na pH 7.

V jiném provedení předloženého vynálezu obsahují prostředky na mytí nádobí jednu nebo více variant, které jsou předmětem tohoto vynálezu. Zde používaný termín „prostředky na mytí nádobí“ označuje všechny formy prostředků na mytí nádobí, mimo jiné v granulárních a tekutých formách.

Příklady 13 až 16

Tekuté detergenty na mytí nádobí

	Př. 13	Př. 14	Př. 15	Př. 16
proteázový konjugát z příkladu 1	0,05 %	0,50 %	0,02 %	0,40 %
C ₁₂ - C ₁₄ N-methylglukamid	0,90 %	0,90 %	0,90 %	0,90 %
C ₁₂ ethoxy (1) sulfát	12,0 %	12,0 %	12,0 %	12,0 %
2-methylundekanová kyselina	4,50 %	4,50 %	4,50 %	4,50 %
C ₁₂ ethoxy (2) karboxylát	4,50 %	4,50 %	4,50 %	4,50 %
C ₁₂ alkohol ethoxylát (4)	3,00 %	3,00 %	3,00 %	3,00 %

C ₁₂ aminoxid	3,00 %	3,00 %	3,00 %	3,00 %
Na kumensulfonát	2,00 %	2,00 %	2,00 %	2,00 %
ethanol	4,00 %	4,00 %	4,00 %	4,00 %
Mg ²⁺ (jako MgCl ₂)	0,20 %	0,20 %	0,20 %	0,20 %
Ca ²⁺ (jako CaCl ₂)	0,40 %	0,40 %	0,40 %	0,40 %
voda	65,45 %	65 %	65,48 %	65,1 %

Všechny předpisy jsou upraveny na pH 7.

Příklady 17 až 19

Tekuté prostředky pro čištění tkanin

	Př. 17	Př. 18	Př. 19
proteázový konjugát z příkladu 4	0,05 %	0,03 %	0,30 %
C ₁₂ - C ₁₄ alkylsulfát sodný	20,0 %	20,0 %	20,0 %
2-butyl oktanová kyselina	5,0 %	5,0 %	5,0 %
citronan sodný	1,0 %	1,0 %	1,0 %
C ₁₂ alkohol ethoxylát (3)	13,0 %	13,0 %	13,0 %
monoethanolamin	2,50 %	2,50 %	2,50 %
voda/propylenglykol/ethanol (100:1:1)	58,45 %	58,47 %	58,20 %

Prostředky pro osobní hygienu.

Předložené proteázové konjugáty jsou obzvláště vhodné pro použití v prostředcích pro osobní hygienu, jako jsou například vlasové kondicionéry, šampóny, prostředky proti akné, pleťová mléka a kondicionéry, sprchové gely, mýdla, pěňivé a nepěňivé prostředky pro čištění pleti, kosmetika, pleťová mléka a zvlhčovače na ruce, obličej a tělo, kosmetické a čistící kapesníky, prostředky ústní hygieny a prostředky pro péči o kontaktní čočky. Prostředky pro osobní hygienu, které jsou předmětem tohoto vynálezu, obsahují jeden nebo více předkládaných proteázových konjugátů a nosič pro prostředky pro osobní hygienu.

Pro ilustraci, proteázové konjugáty, které jsou předmětem tohoto vynálezu, jsou vhodné pro zahrnutí do prostředků, popsanych v následujících odkazech: patent US č. 5 641 479, Linares a kol., vydaný 24. června 1997 (prostředky pro čištění pleti); patent US č. 5 599 549, Wivell a kol., vydaný 4. února 1997 (prostředky pro čištění pleti); patent US č. 5 585 104, Ha a kol., vydaný 7. prosince 1996 (prostředky pro čištění pleti); patent US č. 5 540 852, Kefauver a kol., vydaný 30. července 1996 (prostředky

pro čištění pleti); patent US č. 5 510 050, Dunbar a kol., vydaný 23. dubna 1996 (prostředky pro čištění pleti); patent US č. 5 612 324, Guang Lin a kol., vydaný 18. března 1997 (prostředky proti akné); patent US č. 5 587 176, Warren a kol., vydaný 24. prosince 1996 (prostředky proti akné); patent US č. 5 549 888, Venkateswaran, vydaný 27. srpna 1996 (prostředky proti akné); patent US č. 5 470 884, Corless a kol., vydaný 28. listopadu 1995 (prostředky proti akné); patent US č. 5 650 384, Gordon a kol., vydaný 22. července 1997 (sprchové gely); patent US č. 5 607 678, Moore a kol., vydaný 4. března 1997 (sprchové gely); patent US č. 5 624 666, Coffindaffer a kol., vydaný 29. dubna 1997 (vlasové kondicionéry a/nebo šampóny); patent US č. 5 618 524, Bolich a kol., vydaný 8. dubna 1997 (vlasové kondicionéry a/nebo šampóny); patent US č. 5 612 301, vydaný Inman, 18. března 1997 (vlasové kondicionéry a/nebo šampóny); patent US č. 5 573 709, Wells, vydaný 12. listopadu 1996 (vlasové kondicionéry a/nebo šampóny); patent US č. 5 482 703, Pings, vydaný 9. ledna 1996 (vlasové kondicionéry a/nebo šampóny); patent US č. Re. 34 584, Grota a kol., znovu vydaný 12. dubna 1994 (vlasové kondicionéry a/nebo šampóny); patent US č. 5 641 493, Date a kol., vydaný 24. června 1997 (kosmetika); patent US č. 5 605 894, Blank a kol., vydaný 25. února 1997 (kosmetika); patent US č. 5 585 090, Yoshioka a kol., vydaný 17. prosince 1996 (kosmetika); patent US č. 4 939 179, Cheney a kol., vydaný 3. července 1990 (pleťová mléka na ruce, obličej a/nebo tělo); patent US č. 5 607 980, McAtee a kol., vydaný 4. března 1997 (pleťová mléka na ruce, obličej a/nebo tělo); patent US č. 4 045 364, Richter a kol., vydaný 30. srpna 1977 (kosmetické a čistící kapesníky); žádost o evropský patent EP 0 619 074, Touchet a kol., publikovaný 12. října 1994 (kosmetické a čistící kapesníky); patent US č. 4 975 217, Brown-Skrobot a kol., vydaný 4. prosince 1990 (kosmetické a čistící kapesníky); patent US č. 5 096 700, Seibel, vydaný 17. března 1992 (prostředky ústní hygieny); patent US č. 5 028 414, Sampathkumar, vydaný 2. července 1991 (prostředky ústní hygieny); patent US č. 5 028 415, Benedict a kol., vydaný 2. července 1991 (prostředky ústní hygieny); patent US č. 5 028 415, Benedict a kol., vydaný 2. července 1991 (prostředky ústní hygieny); patent US č. 4 863 627, Davies a kol., 5. září 1989 (prostředky pro péči o kontaktní čočky); patent US č. Re. 32 672, Huth a kol., znovu vydaný 24. května 1988 (prostředky pro péči o kontaktní čočky) a patent US č. 4 609 794, Schafer, vydaný 2. září 1986 (prostředky pro péči o kontaktní čočky).

Pro další ilustraci prostředků ústní hygieny, které jsou předmětem tohoto vynálezu, je farmaceuticky přijatelné množství jednoho nebo více proteázových konjugátů, které jsou předmětem tohoto vynálezu, obsaženo v prostředcích vhodných pro odstraňování proteinových skvrn ze zubů nebo umělého chrupu. Zde používaný termín „prostředky ústní hygieny“ označuje prostředky na čištění zubů, zubní pasty, zubní gely, zubní prášky, ústní vody, ústní spreje, ústní gely, žvýkačky, zdravotní pastilky, ústní parfémy, tablety, biogely, pasty pro prevenci, zubní léčebné roztoky a podobně. S výhodou obsahují prostředky ústní hygieny od 0,0001 do 20 hmotnostních procent jedné nebo více variant, které jsou předmětem tohoto vynálezu, výhodněji od 0,01 do 10 hmotnostních procent, ještě výhodněji od 0,01 do 5 hmotnostních procent prostředku a farmaceuticky přijatelný nosič. Zde používaný termín „farmaceuticky přijatelný“ znamená, že látky, léky nebo inertní složky, které termín popisuje, jsou vhodné použít ke styku s tkáněmi lidí a nižších živočichů bez nepřiměřené toxicity, neslučivosti, nestability, podráždění, alergické odpovědi a podobně, přiměřeně s rozumným poměrem zisk/riziko.

V typickém případě budou farmaceuticky přijatelné složky nosiče pro složky pro ústní čištění v prostředcích ústní hygieny tvořit od 50 do 99,99 hmotnostních procent, výhodněji od 65 do 99,99 hmotnostních procent a ještě výhodněji od 65 do 99 hmotnostních procent prostředku.

Farmaceuticky přijatelné složky nosiče a volitelné složky, které mohou být zahrnuty v prostředcích ústní hygieny, které jsou předmětem tohoto vynálezu, jsou dobře známé osobám se zkušeností v tomto oboru. Velká rozmanitost typů prostředků, nosičových složek a volitelných složek, vhodných pro prostředky ústní hygieny, jsou popsány v odkazech, které zde byly výše citovány.

V jiném provedení předloženého vynálezu, prostředky pro čištění zubních protéz, používané pro čištění zubních protéz mimo dutinu ústní, obsahují jednu nebo více variant, které jsou předmětem tohoto vynálezu. Tyto prostředky pro čištění zubních protéz obsahují účinné množství jedné nebo více variant, s výhodou v množství od 0,0001 do 50 hmotnostních procent jedné nebo více variant, výhodněji od 0,001 do 35 hmotnostních procent, ještě výhodněji od 0,01 do 20 hmotnostních procent prostředku a nosič, vhodný pro čištění zubních protéz. Různé formáty prostředků pro čištění zubních protéz, jako jsou šumící tablety a podobně jsou v oboru dobře známé (viz např.

patent US č. 5 055 305, Young) a obecně jsou vhodné pro zabudování jednoho nebo více proteázových konjugátů pro odstranění proteinových skvrn z umělého chrupu.

V jiném provedení předloženého vynálezu, prostředky pro péči o kontaktní čočky obsahují jeden nebo více proteázových konjugátů, které jsou předmětem tohoto vynálezu. Tyto prostředky pro péči o kontaktní čočky obsahují účinné množství jednoho nebo více proteázových konjugátů, s výhodou v množství od 0,01 do 50 hmotnostních procent jednoho nebo více proteázových konjugátů, výhodněji od 0,01 do 20 hmotnostních procent, ještě výhodněji od 1 do 5 hmotnostních procent prostředku a nosič, vhodný pro péči o kontaktní čočky. Různé formáty prostředků pro péči o kontaktní čočky, jako jsou tablety, kapaliny a podobně jsou rovněž v oboru dobře známé a obecně jsou vhodné pro zabudování jednoho nebo více proteázových konjugátů, které jsou předmětem tohoto vynálezu, pro odstranění proteinových skvrn z kontaktních čoček.

Příklady 20 až 23

Roztoky pro čištění kontaktních čoček

	Př. 20	Př. 21	Př. 22	Př. 23
proteázový konjugát z příkladu 5	0,01 %	0,5 %	0,1 %	2,0 %
glukóza	50,0 %	50,0 %	50,0 %	50,0 %
neiontové smáčedlo (kopolymer polyoxyethylenu a polyoxypropylenu)	2,0 %	2,0 %	2,0 %	2,0 %
aniontové smáčedlo (polyoxyethylen – Na alkylfenyléter sulfricester)	1,0 %	1,0 %	1,0 %	1,0 %
chlorid sodný	1,0 %	1,0 %	1,0 %	1,0 %
borax	0,30 %	0,30 %	0,30 %	0,30 %
voda	45,69 %	45,20 %	45,60 %	43,70 %

Příklady 24 až 27

Výrobky pro mytí těla

	Př. 24	Př. 25	Př. 26	Př. 27
voda	62,62 %	65,75 %	57,72 %	60,72 %
Na ₂ EDTA	0,2 %	0,2 %	0,2 %	0,2 %
glycerin	3,0 %	3,0 %	3,0 %	3,0 %
Polyquaternium 10	0,4 %	0,4 %	0,4 %	0,4 %

Na laureth sulfát	12,0 %	12,0 %	12,0 %	12,0 %
cocamide MEA	2,8 %	2,8 %	2,8 %	2,8 %
Na „lauraphoacetate“	6,0 %	6,0 %	6,0 %	6,0 %
kyselina myristilová	1,6 %	1,6 %	1,6 %	1,6 %
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,3 %	0,3 %	0,3 %	0,3 %
trihydroxystearin	0,5 %	0,5 %	0,5 %	0,5 %
PEG-6 triglyceridy kyselin kaprylové/kaprové	3,0 %	-	-	-
sacharózové polyestery „cottonate“ mastné kyseliny	3,0 %	-	-	-
sacharózové polyestery „behenate“ mastné kyseliny	3,0 %	-	4,0 %	-
vazelína z ropy	-	4,0 %	8,0 %	-
minerální olej	-	-	-	6,0 %
DMDM hydantoin	0,08 %	0,08 %	0,08 %	0,08 %
proteázový konjugát z příkladu 6	0,1 %	2,0 %	2,0 %	5,0 %
kyselina citrónová	1,40 %	1,40 %	1,40 %	1,40 %

Příklady 28 až 31

Výrobky pro ošetřování pleti na obličeji

	Př. 28	Př. 29	Př. 30	Př. 31
voda	66,52 %	65,15 %	68,47 %	68,72 %
Na ₂ EDTA	0,1 %	0,1 %	0,2 %	0,2 %
kyselina citrónová	-	-	1,4 %	1,4 %
Na laureth-3 sulfát	3,0 %	3,5 %	-	-
Na laureth-4 karboxylát	3,0 %	3,5 %	-	-
Polyquaternium 10	-	-	0,4 %	0,4 %
Polyquaternium 25	0,3 %	0,3 %	-	-
glycerin	3,0 %	3,0 %	3,0 %	3,0 %
Na „lauraphoacetate“	-	-	6,0 %	6,0 %
kyselina laurová	6,0 %	6,0 %	3,0 %	3,0 %
kyselina myristilová	-	-	3,0 %	3,0 %

MgSO ₄ · 7H ₂ O	2,3 %	2,0 %	2,0 %	2,0 %
triethanolamin	4,0 %	4,0 %	4,0 %	4,0 %
trihydroxystearin	0,5 %	0,5 %	0,5 %	0,5 %
sacharóзовé polyestery „behenate“ mastné kyseliny	2,0 %	2,0 %	-	-
sacharóзовé polyestery „cottonate“ mastné kyseliny	3,0 %	2,0 %	-	-
PEG-6 triglyceridy kyselin kaprylové/kaprové	-	-	-	2,0 %
vazelína z ropy	-	-	4,0 %	-
minerální olej	-	-	-	2,0 %
kokamidopropyl betain	2,0 %	3,0 %	1,8 %	1,8 %
lauryldimethylaminoxid	1,0 %	1,2 %	1,2 %	1,2 %
dex panthenol	1,0 %	0,25 %	0,25 %	-
DMDM hydantoin	0,08 %	0,08 %	0,08 %	0,08 %
proteázový konjugát z příkladu 2	1,0 %	2,0 %	2,0 %	0,5 %
vůně	0,2 %	0,2 %	0,2 %	0,2 %

Příklady 32 až 33

Výrobky pro zvlhčování pleti

	příklad 32	příklad 33
glycerin	5,0 %	-
kyselina stearová	3,0 %	-
C ₁₁₋₁₃ izoparafin	2,0 %	-
glykolstearát	1,5 %	-
propylenglykol	-	3,0 %
minerální olej	1,0 %	10,0 %
sezamový olej	-	7,0 %
vazelína z ropy	-	1,8 %
triethanolamin	0,7 %	-
cetylactan	0,65 %	-
glycerinstearát	0,48 %	2,0 %

TEA stearát	-	2,5 %
cetylalkohol	0,47 %	-
lanolinalkohol	-	1,8 %
DEA cetylfosforečnan	0,25 %	-
methylnparaben	0,2 %	0,2 %
propylparaben	0,12 %	0,1 %
carbomer 934	0,11 %	-
Na ₂ EDTA	0,1 %	-
proteázový konjugát z příkladu 4	0,1 %	0,5 %
voda	84,32 %	71,1 %

Příklad 34

Prostředek, používaný v čistících kapesnicích

propylenglykol	1,0 %
laurylsíran amonný	0,6 %
kyselina jantarová	0,4 %
jantaran sodný	3,2 %
Triclosan®	0,15 %
proteázový konjugát z příkladu 4	0,05 %
voda	91,0 %

Výše uvedeným prostředkem je napuštěn arch tkaniny, složený z celulózy a/nebo polyesteru v množství 250 % váhy absorbujícího archu.

SEZNAM SEKVENCÍ

(1) OBECNÉ INFORMACE

- (i) PŘIHLAŠOVATEL: WEISGERBER, D. a kol.
 (ii) NÁZEV VYNÁLEZU: Proteázový konjugát a prostředek osobní hygieny.

(iii) POČET SEKVENCÍ: 1

(iv) ADRESA PRO KORESPONDENCI:

- (A) ADRESÁT: THE PROCTER & GAMBLE COMPANY
 (B) ULICE: 11810 EAST MIAMI RIVER ROAD
 (C) MĚSTO: ROSS
 (D) STÁT: OH
 (E) ZEMĚ: USA
 (F) ZIP: 45061

(v) POČÍTAČOVÉ VYBAVENÍ:

- (A) TYP MÉDIA: Disketa
 (B) POČÍTAČ: IBM PC kompatibilní
 (C) OPERAČNÍ SYSTÉM: PC-DOS/MS-DOS
 (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30

(vi) ÚDAJE O PŘIHLÁŠCE:

- (A) ČÍSLO PŘIHLÁŠKY:
 (B) DATUM PODÁNÍ:
 (C) KLASIFIKACE:

(viii) ÚDAJE O PRÁVNÍM ZÁSTUPCI:

- (A) JMÉNO: HERSKO, Bart S.
 (B) REGISTRAČNÍ ČÍSLO: 32,572
 (C) REFERENČNÍ ČÍSLO:

(ix) INFORMACE O SPOJENÍ:

- (A) TELEFON: 513-627-0633
 (B) TELEFAX: 513-627-0260

(2) INFORMACE K SEKVENCI č.1:

(i) CHARACTERISTIKY SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 275 aminokyselin
 (B) TYP: aminokyselina
 (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(xi) POPIS SEKVENCE: Sekvence č.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

35
2

[illegible]

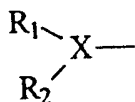
PATENTOVÉ NÁROKY

1. Proteázový konjugát, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje proteázovou část a jednu nebo více částí přídatných, kde:

(a) proteázová část má pozměněnou aminokyselinovou sekvenci mateřské aminokyselinové sekvence, mateřskou aminokyselinovou sekvenci obsahující první epitopovou oblast, druhou epitopovou oblast a třetí epitopovou oblast, kde pozměněná aminokyselinová sekvence obsahuje substituci pomocí substituující aminokyseliny na jedné nebo více pozicích v jedné nebo více epitopových oblastí, přičemž:

- (i) pokud k substituci dojde v první epitopové oblasti, substituce nastává na jedné nebo více pozicích, odpovídajících pozicím 70 až 84 subtilizinu BPN';
- (ii) pokud k substituci dojde ve druhé epitopové oblasti, substituce nastává na jedné nebo více pozicích, odpovídajících pozicím 103 až 126 subtilizinu BPN'; a
- (iii) pokud k substituci dojde ve třetí epitopové oblasti, substituce nastává na jedné nebo více pozicích, odpovídajících pozicím 217 až 252 subtilizinu BPN'; a

(b) kde každá z přídatných částí je kovalentně připojena k jedné ze substituujících aminokyselin, přítomných v proteázové části a má strukturu:



kde X je buď nic nebo vazebná část; R_1 je buď nepřítomen, první polypeptid a první polymer; a R_2 je buď nepřítomen, druhý polypeptid a druhý polymer; kde alespoň jeden se skupiny X, R_1 a R_2 není nepřítomen.

2. Proteázový konjugát podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že substituující aminokyselina je cystein.

3. Proteázový konjugát podle kteréhokoli z předcházejících nároků, v y z n a č u j í c í s e t í m, že mateřská aminokyselinová je vybrána ze skupiny, obsahující subtilizin BPN', subtilizin Carlsberg, subtilizin DY, subtilizin 309, proteinazu K, thermitázu, Proteázu A, Proteázu B, Proteázu C, Proteázu D a jejich varianty.

4. Proteázový konjugát podle kteréhokoli z předcházejících nároků, v y z n a č u j í c í s e t í m, že R_1 je nepřítomen.
5. Proteázový konjugát podle kteréhokoli z nároků 1, 2 nebo 3, v y z n a č u j í c í s e t í m, že R_1 je první polypeptid.
6. Proteázový konjugát podle kteréhokoli z nároků 1, 2, 3 nebo 5, v y z n a č u j í c í s e t í m, že první polypeptid má pozměněnou aminokyselinovou sekvenci druhé mateřské aminokyselinové sekvence, druhá mateřská aminokyselinová sekvence obsahující první epitopovou oblast, druhou epitopovou oblast a třetí epitopovou oblast, kde pozměněná aminokyselinová sekvence druhé mateřské aminokyselinové sekvence obsahuje substituci substituující aminokyselinou na jedné nebo více pozicích epitopových oblastí druhé mateřské aminokyselinové sekvence, kde:
- (i) pokud k substituci dojde v první epitopové oblasti, substituce nastává na jedné nebo více pozicích, odpovídajících pozicím 70 až 84 subtilizinu BPN';
 - (ii) pokud k substituci dojde ve druhé epitopové oblasti, substituce nastává na jedné nebo více pozicích, odpovídajících pozicím 103 až 126 subtilizinu BPN'; a
 - (iii) pokud k substituci dojde ve třetí epitopové oblasti, substituce nastává na jedné nebo více pozicích, odpovídajících pozicím 217 až 252 subtilizinu BPN'; a
- kde vazebná část nebo proteázová část je kovalentně připojena k prvnímu polypeptidu pomocí jedné ze substituujících aminokyselin, přítomných v prvním polypeptidu.
7. Proteázový konjugát podle kteréhokoli z nároků 1, 2, 3, 5 nebo 6, v y z n a č u j í c í s e t í m, že X je nulové a že proteázová část a první polypeptid jsou kovalentně spojeny pomocí disulfidického můstku.
8. Proteázový konjugát podle kteréhokoli z nároků 1, 2 nebo 3, v y z n a č u j í c í s e t í m, že R_1 je první polymer a R_2 je buď nepřítomen anebo druhý polymer.

9. Proteázový konjugát podle kteréhokoli z předcházejících nároků, v y z n a č u j í c í s e t í m, že R_2 je nepřítomen.
10. Prostředek osobní hygieny, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje proteázový konjugát podle kteréhokoli z předcházejících nároků a nosič vhodný pro prostředek osobní hygieny.