

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6334396号
(P6334396)

(45) 発行日 平成30年5月30日 (2018.5.30)

(24) 登録日 平成30年5月11日 (2018.5.11)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 9/56 (2006.01)
 C 1 2 N 9/14 (2006.01)
 C 1 2 N 9/20 (2006.01)
 C 1 2 N 9/26 (2006.01)
 C 1 2 N 9/24 (2006.01)

C 1 2 N 9/56 Z N A
 C 1 2 N 9/14
 C 1 2 N 9/20
 C 1 2 N 9/26 A
 C 1 2 N 9/24

請求項の数 15 (全 25 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-517745 (P2014-517745)
 (86) (22) 出願日 平成24年6月29日 (2012.6.29)
 (65) 公表番号 特表2014-525739 (P2014-525739A)
 (43) 公表日 平成26年10月2日 (2014.10.2)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2012/062760
 (87) 国際公開番号 W02013/004636
 (87) 国際公開日 平成25年1月10日 (2013.1.10)
 審査請求日 平成27年6月10日 (2015.6.10)
 (31) 優先権主張番号 11172357.3
 (32) 優先日 平成23年7月1日 (2011.7.1)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 500586299
 ノボザイムス アクティーゼルスカプ
 デンマーク国, デーコー 2880 バグ
 スバエルト, クロシェイバイ 36
 (74) 代理人 100099759
 弁理士 青木 篤
 (74) 代理人 100077517
 弁理士 石田 敬
 (74) 代理人 100087871
 弁理士 福本 積
 (74) 代理人 100087413
 弁理士 古賀 哲次
 (74) 代理人 100117019
 弁理士 渡辺 陽一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 安定化スプチリシン組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

スプチリシンと、式 $X - B^1 - NH - CHR - CHOH - SO_3M$

(式中、

a) Mは、H (水素) またはアルカリ金属であり、

b) Rは、 $NH - CHR - CO$ をLまたはD - アミノ酸残基であるようにする基であり、c) B^1 は、Ala、Cys、Gly、Pro、Ser、Thr、Val、Nva、またはNleの残基であり、かつ

d) Xは、Z - B^2 またはZ - $B^3 - B^2$ であり、ここで、 B^2 および B^3 が、それぞれ、1個のアミノ酸残基を表し、かつZが、N末端保護基であり、 B^2 が、Val、Gly、Ala、Arg、Leu、Phe、またはThrの残基であり、そして B^3 が、Phe、Tyr、Trp、フェニルグリシン、Leu、Val、Nva、Nle、またはIleの残基である)

を有するペプチドアルデヒドヒドロ亜硫酸付加物と、を含む組成物。

【請求項 2】

Rが、 $NH - CHR - CO$ をTyr、m - チロシン、3,4 - ジヒドロキシフェニアラニン、Phe、Val、Met、Nva、Leu、Ile、またはNleのLまたはD - アミノ酸残基であるようにする基である、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

10

20

X が、Z - B² (式中、B²およびZ は、請求項 1 のように定義される) である、請求項 1 または 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

B²が、G l y、A r g、またはL e uの残基である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 5】

B³が、P h e、T y r、T r p、または、L e uの残基である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 6】

Z が、ベンジルオキシカルボニル (C b z)、p - メトキシベンジルカルボニル (M O Z)、ベンジル (B n)、ベンゾイル (B z)、p - メトキシベンジル (P M B)、p - メトキシフェニル (P M P)、ホルミル、アセチル (A c)、メチルオキシ、またはメチルオキシカルボニルである、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 7】

液体形態または顆粒形態である、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 8】

界面活性剤をさらに含む洗剤である、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 9】

第 2 の酵素、特定的には、リパーゼ、クチナーゼ、アミラーゼ、カルボヒドラーゼ、セルラーゼ、ペクチナーゼ、ペクチン酸リアーゼ、マンナーゼ、アラビナーゼ、ガラクトナーゼ、キシラナーゼ、オキシダーゼ、ラッカーゼ、またはペルオキシダーゼをさらに含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 10】

スブチリシンと、式 X - B¹ - NH - CHR - CHOH - SO₃M (式中、M、R、B¹、およびX は、請求項 1 のように定義される) を有するペプチドアルデヒドヒドロ亜硫酸付加物を含む水性溶液と、任意選択で界面活性剤と、を混合することを含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の組成物の調製方法。

【請求項 11】

式 X - B¹ - NH - CHR - CHOH - SO₃M (式中、MおよびX は、請求項 1 のように定義され、B¹は、A l a、C y s、G l y、S e r、T h r、V a l、N v a、またはN l eの残基であり、かつRは、NH - CHR - COをT y r、m - チロシン、3, 4 - ジヒドロキシフェニルアラニン、P h e、V a l、M e t、N v a、またはN l eのL またはD - アミノ酸残基であるようにする基である) を有するペプチドアルデヒドヒドロ亜硫酸付加物である、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の組成物で使用するための化合物。

【請求項 12】

C b z - R A - NHCH (CH₂C₆H₄OH) C (OH) (SO₃M) - H、A c - G A - NHCH (CH₂C₆H₄OH) C (OH) (SO₃M) - H、C b z - G A - NHCH (CH₂C₆H₄OH) C (OH) (SO₃M) - H、C b z - G G - NHCH (CH₂C₆H₄OH) C (OH) (SO₃M) - H、C b z - R V - NHCH (CH₂C₆H₄OH) C (OH) (SO₃M) - H、C b z - L V - NHCH (CH₂C₆H₄OH) C (OH) (SO₃M) - H、A c - L G A - NHCH (CH₂C₆H₄OH) C (OH) (SO₃M) - H、A c - F G A - NHCH (CH₂C₆H₄OH) C (OH) (SO₃M) - H、A c - Y G A - NHCH (CH₂C₆H₄OH) C (OH) (SO₃M) - H、A c - F G V - NHCH (CH₂C₆H₄OH) C (OH) (SO₃M) - HまたはA c - W L V - NHCH (CH₂C₆H₄OH) C (OH) (SO₃M) - H (ここで、A c は、アセチルであり、かつC b z は、ベンジルオキシカルボニルである) である、請求項 11 に記載の化合物。

【請求項 13】

C b z - G A - NHCH (CH₂CH (CH₃)₂) C (OH) (SO₃M) - H、C b z - V A - NHCH (CH₂CH (CH₃)₂) C (OH) (SO₃M) - H、C b z - G

10

20

30

40

50

A - NHCH(CH₂Ph)C(OH)(SO₃M) - H、Cbz - GA - NHCH(CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M) - H、Cbz - GG - NHCH(CH₂Ph)C(OH)(SO₃M) - H、Ac - FGA - NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M) - H、Ac - FGA - NHCH(CH₂Ph)C(OH)(SO₃M) - H、Ac - FGA - NHCH(CH₂CH₂SCH₃)(SO₃M) - H、MeO - CO - VA - NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M) - H、MeNCO - VA - NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M) - H、MeO - CO - FGA - NHCH(CH₂CH(CH₃)₂) - C(OH)(SO₃M) - H、MeO - CO - FGA - NHCH(CH₂Ph)C(OH)(SO₃M) - H、MeSO₂ - FGA - NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M) - H、MeSO₂ - VA - NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M) - H、PhCH₂O(OH)(O)P - VA - NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M) - H、EtSO₂ - FGA - NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M) - H、PhCH₂SO₂ - VA - NHCH(CH₂CH(CH₃)₂) - C(OH)(SO₃M) - H、PhCH₂O(OH)(O)P - LA - NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M) - H、PhCH₂O(OH)(O)P - FA - NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M) - H、およびMeO(OH)(O)P - LGA - NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M) - H(ここで、Acは、アセチルであり、かつCbzは、ベンジルオキシカルボニルである)である、請求項11に記載の化合物。

10

【請求項14】

20

式X - B¹ - NH - CHR - CHOH - SO₃M(式中、RおよびMは、請求項1のように定義され、B¹は、Ala、Cys、Gly、Ser、Thr、Val、Nva、またはNleの残基を表し、Xは、Z - B²、Z - B³ - B²であり、B³およびB²は、それぞれ、1個のアミノ酸残基を表し、Zは、N末端保護基であり、B³は、Phe、Tyr、Trp、フェニルグリシン、Leu、Val、Nva、Nle、またはIleであり、かつB²は、Gly、Thr、またはValである)を有するペプチダルデヒドヒドロ亜硫酸付加物である、請求項1～9のいずれか一項に記載の組成物で使用するための化合物。

【請求項15】

30

式X - B¹ - NH - CHR - CHOH - SO₃M(式中、RおよびMは、請求項1のように定義され、B¹は、Ala、Cys、Gly、Ser、Thr、Val、Nva、またはNleの残基を表し、Xは、Z - B³ - B²であり、B³およびB²は、それぞれ、1個のアミノ酸残基を表し、Zは、N末端保護基であり、B³は、Phe、Tyr、Trp、フェニルグリシン、Leu、Val、Nva、Nle、またはIleであり、かつB²は、Val、Gly、Ala、Arg、Leu、Phe、またはThrの残基である)を有するペプチダルデヒドヒドロ亜硫酸付加物である、請求項1～9のいずれか一項に記載の組成物で使用するための化合物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

40

配列リストの参照

本出願は、コンピューター可読形式の配列リストを包含する。

【0002】

本発明は、ペプチダルデヒド誘導体により安定化されたスブチリシンを含む組成物に関する。それはまた、この組成物の調製方法およびこの組成物で使用するための化合物に関する。

【背景技術】

【0003】

国際公開第98/13458号パンフレット、国際公開第94/04651号パンフレット、国際公開第98/13460号パンフレット、国際公開第95/25791号パン

50

フレット、および国際公開第2009/118375号パンフレットには、ペプチドアルデヒドにより安定されたスブチリシン型プロテアーゼを含む液体洗剤が開示されている。国際公開第2011/036153号パンフレットには、粒状スブチリシン含有洗剤へのペプチドアルデヒドの添加により洗浄力を向上させることが開示されている。

【0004】

アルデヒドが NaHSO_3 との可溶性付加物（重亜硫酸またはヒドロ亜硫酸の付加物）を形成しうることおよびペプチドアルデヒドが水に溶けにくい傾向があることは、周知である。

【0005】

国際公開第98/47523号パンフレットおよび米国特許第6,500,802号明細書には、ペプチジル-2-アミノ-1-ヒドロキシアルカンスルホン酸およびプロテアーゼ阻害剤としてのその使用が開示されている。米国特許第5,436,229号明細書には、L-アルギニンアルデヒド誘導体の重亜硫酸付加物およびトロンビン阻害剤としてのその使用が開示されている。

【0006】

米国特許第4,703,036号明細書、米国特許第4,478,745号明細書、および米国特許第5,578,574号明細書には、乾燥形態のペプチドアルデヒドの調製方法が開示されている。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

安定化スブチリシン組成物の大量生産では、安全性およびプロセス要件の両方のために、液体原料を取り扱うことがきわめて好ましい。ペプチドアルデヒドは、水に溶けにくい傾向があるので、濃厚水性溶液の調製が困難または不可能であり、液体配合物で使用するべく安定化スブチリシン溶液を作製する場合または顆粒組成物を製造すべく顆粒化する場合、乾燥生成物またはきわめて希薄な水性溶液のいずれかの使用が余儀なくされる。

【課題を解決するための手段】

【0008】

ペプチドアルデヒドからヒドロ亜硫酸付加物への変換を用いることにより、ペプチドアルデヒドの精製時、水溶性を増加させることが可能である。有利なことに、我々は、このヒドロ亜硫酸付加物が、それ自体、スブチリシンの阻害剤および安定化剤として効果的であるうえに、第2の（非スブチリシン）酵素（存在する場合）を安定化させることを見いだした。我々は、ヒドロ亜硫酸付加物がスブチリシン阻害剤として効果的であることを見いだすとともに、我々は、それが貯蔵時に液体洗剤中でその阻害効果および安定化効果を維持することを見いだした。したがって、ヒドロ亜硫酸付加物の使用により、元のペプチドアルデヒドに変換するコストおよび時間を回避することが可能であり、それに続くペプチドアルデヒドの乾燥を省くことが可能であるので、これにより、粉末形態でまたはきわめて希薄な水性溶液としてペプチドアルデヒドを取り扱う不便さを回避することが可能である。さらに、ペプチドアルデヒド重亜硫酸付加物の添加により、スブチリシン含有洗剤の洗浄力（洗浄／洗濯性能）を向上させることも可能である。

【0009】

したがって、本発明は、スブチリシンと式 $\text{X}-\text{B}^1-\text{NH}-\text{CHR}-\text{CHOH}-\text{SO}_3\text{M}$ を有するペプチドアルデヒドヒドロ亜硫酸付加物とを含む組成物を提供する。式中の基は、以下の意味を有する。すなわち

a) Mは、H（水素）またはアルカリ金属、好ましくはNaまたはKであり、

b) Rは、 $\text{NH}-\text{CHR}-\text{CO}$ をLまたはD-アミノ酸残基であるようにする基（以下では B^0 と記される）であり、

c) B^1 は、1個のアミノ酸残基であり、かつ

d) Xは、1個以上のアミノ酸残基（好ましくは1個または2個）で構成され、任意選択でN末端保護基を含んでいてもよい。

【0010】

本発明はさらに、この組成物の調製方法を提供する。この方法は、スブチリシンと、式 $X - B^1 - NH - CHR - CHOH - SO_3M$ (式中、M、R、 B^1 、およびXは、以上のように定義される) を有するペプチドアルデヒドヒドロ亜硫酸付加物を含む水性溶液と、任意選択で界面活性剤と、を混合することを含む。

【0011】

そのほかに、本発明は、この組成物で使用するための化合物を提供する。この化合物は、式 $X - B^1 - NH - CHR - CHOH - SO_3M$ を有するペプチドアルデヒドヒドロ亜硫酸付加物である。Rは、p-ヒドロキシ-ベンジルでありうる。また、M、 B^1 、およびXは、以上のように定義される。

10

【発明を実施するための形態】

【0012】

安定化スブチリシン組成物

本発明に係る組成物は、スブチリシンとペプチドアルデヒドヒドロ亜硫酸付加物とを含み、任意選択で第2の酵素を含んでもよい。この組成物は、液体形態または顆粒形態をとりうる。それは、界面活性剤をさらに含む洗剤組成物であってもよい。

【0013】

液体洗剤や顆粒洗剤などの組成物では、各酵素(スブチリシンおよび任意選択の第2の酵素)の量は、純粋な酵素タンパク質として計算して、典型的には $0.04 \sim 80 \mu M$ (またはマイクロモル/kg)、特定のには $0.2 \sim 30 \mu M$ 、より特定のには $0.4 \sim 20 \mu M$ (一般的には $1 \sim 2000 mg/l$ または mg/kg 、特定のには $5 \sim 750 mg/l$ 、より特定のには $10 \sim 500 mg/l$) であろう。酵素濃縮物などの組成物では、各酵素の量は、純粋な酵素タンパク質として計算して、典型的には $0.01 \sim 20 mM$ 、特定のには $0.04 \sim 10 mM$ 、より特定のには $0.1 \sim 5 mM$ (一般的には $0.3 \sim 500 g/l$ 、特定のには $1 \sim 300 g/l$ 、より特定のには $3 \sim 150 g/l$) であろう。

20

【0014】

本発明に係る酵素安定化剤または酵素阻害剤対スブチリシンのモル比は、少なくとも1:1または1.5:1であり、かつ1000:1未満、より好ましくは500:1未満である。さらにより好ましいのは、100:1~2:1または20:1~2:1であり、最も好ましいのは、モル比が10:1~3:1である。

30

【0015】

ペプチドアルデヒド

本方法で使用される重亜硫酸付加物は、式 $X - B^1 - B^0 - H$ を有するペプチドアルデヒドから誘導可能である。式中の基は、以上のように定義され、 B^0 は、式: $NH - CHR - CO$ を有するL配置またはD配置の単一のアミノ酸残基である。

【0016】

$NH - CHR - CO(B^0)$ は、LまたはD-アミノ酸残基である。ただし、Rは、脂肪族または芳香族の側鎖、たとえば、ベンジルなどのアラルキルであってもよく、Rは、任意選択で置換されていてもよい。より特定のには、 B^0 残基は、嵩高、中性、極性、疎水性、および/または芳香族であってもよく、任意選択で置換されていてもよい。例は、D形またはL形のTyr(p-チロシン)、m-チロシン、3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン、Phe、Val、Met、ノルバリン(Nva)、Leu、Ile、またはノルロイシン(Nle)、特定のには、Tyr、m-チロシン、3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン、Phe(Val)、Met、Nva、またはNleである。

40

【0017】

以上の式 $X - B^1 - B^0 - H$ 中、 B^1 残基は、特定のには、小型、脂肪族、疎水性、および/または中性であってもよい。例は、アラニン(Ala)、システイン(Cys)、グリシン(Gly)、プロリン(Pro)、セリン(Ser)、トレオニン(Thr)、バリン(Val)、ノルバリン(Nva)、およびノルロイシン(Nle)、特定のには、

50

Ala、Cys、Gly、Ser、Thr、Val、Nva、およびNleである。

【0018】

Xは、特定的には、任意選択のN末端保護基を有していてもよい1個または2個のアミノ酸残基でありうる（すなわち、この化合物は、保護基を有していても有していなくてもよいトリまたはテトラペプチドアルデヒドである）。したがって、Xは、 B^2 、 $B^3 - B^2$ 、 $Z - B^2$ 、 $Z - B^3 - B^2$ でありうる。ただし、 B^3 および B^2 は、それぞれ、1個のアミノ酸残基を表し、かつZは、N末端保護基である。

【0019】

B^2 残基は、特定的には、小型、脂肪族、および/または中性であってもよく、たとえば、Ala、Gly、Thr、Arg、Leu、Phe、またはVal、とくに、Gly、Thr、またはValである。

10

【0020】

B^3 残基は、特定的には、嵩高、疎水性、中性、および/または芳香族であってもよく、任意選択で置換されていてもよく、たとえば、Phe、Tyr、Trp、フェニルグリシン、Leu、Val、Nva、Nle、またはIleである。

【0021】

N末端保護基Z（存在する場合）は、ホルミル基、アセチル（Ac）基、ベンゾイル基、トリフルオロアセチル基、フルオロメトキシカルボニル基、メトキシスクシニル基、芳香族および脂肪族のウレタン保護基、ベンジルオキシカルボニル（Cbz）基、t-ブチルオキシカルボニル基、アダマンチルオキシカルボニル基、p-メトキシベンジルカルボニル（MOZ）基、ベンジル（Bn）基、p-メトキシベンジル（PMB）基もしくはp-メトキシフェニル（PMP）基、メトキシカルボニル（Moc）基、メトキシアセチル（Mac）基、メチルカルバメート基、またはメチルアミノカルボニル/メチルウレア基から選択されうる。保護基を有するテトラペプチドアルデヒド（すなわち $X = Z - B^3 - B^2$ ）の場合、Zは、好ましくは、小型の脂肪族基、たとえば、ホルミル基、アセチル基、フルオロメトキシカルボニル基、t-ブチルオキシカルボニル基、メトキシカルボニル（Moc）基、メトキシアセチル（Mac）基、メチルカルバメート基、またはメチルアミノカルボニル基/メチルウレア基である。保護基を有するトリペプチドアルデヒド（すなわち $X = Z - B^2$ ）の場合、Zは、好ましくは、嵩高い芳香族基、たとえば、ベンゾイル、ベンジルオキシカルボニル、p-メトキシベンジルカルボニル（MOZ）、ベンジル（Bn）、p-メトキシベンジル（PMB）、またはp-メトキシフェニル（PMP）である。

20

30

【0022】

好適なペプチドアルデヒドは、国際公開第94/04651号パンフレット、国際公開第95/25791号パンフレット、国際公開第98/13458号パンフレット、国際公開第98/13459号パンフレット、国際公開第98/13460号パンフレット、国際公開第98/13461号パンフレット、国際公開第98/13462号パンフレット、国際公開第2007/141736号パンフレット、国際公開第2007/145963号パンフレット、国際公開第2009/118375号パンフレット、国際公開第2010/055052号パンフレット、および国際公開第2011/036153号パンフレットに記載されている。より特定的には、ペプチドアルデヒドは、 $Z - RAY - H$ 、 $Ac - GAY - H$ 、 $Z - GAY - H$ 、 $Z - GAL - H$ 、 $Z - VAL - H$ 、 $Z - GAF - H$ 、 $Z - GAV - H$ 、 $Z - GGY - H$ 、 $Z - GGF - H$ 、 $Z - RVY - H$ 、 $Z - LVY - H$ 、 $Ac - LGAY - H$ 、 $Ac - FGAY - H$ 、 $Ac - YGAY - H$ 、 $Ac - FGAL - H$ 、 $Ac - FGAF - H$ 、 $Ac - FGVY - H$ 、 $Ac - FGAM - H$ 、 $Ac - WLKY - H$ 、 $MeO - CO - VAL - H$ 、 $MeNCO - VAL - H$ 、 $MeO - CO - FGAL - H$ 、 $MeO - CO - FGAF - H$ 、 $MeSO_2 - FGAL - H$ 、 $MeSO_2 - VAL - H$ 、 $PhCH_2O(OH)(O)P - VAL - H$ 、 $EtSO_2 - FGAL - H$ 、 $PhCH_2SO_2 - VAL - H$ 、 $PhCH_2O(OH)(O)P - LAL - H$ 、 $PhCH_2O(OH)(O)P - FAL - H$ 、または $MeO(OH)(O)$

40

50

) P - L G A L - Hでありうる。ここで、Zは、ベンジルオキシカルボニルであり、Meは、メチルであり、Etは、エチルであり、Acは、アセチルであり、Hは、水素であり、かつ他方文字は、標準的一文字表記(たとえば、F = P h e、Y = T y r、およびL = L e u)により記されたアミノ酸残基を表す。他の選択肢として、ペプチドアルデヒドは、国際公開第2010/055052号パンフレットに記載の式:



(式中、

Qは、水素、CH₃、CX₃、CHX₂、またはCH₂Xであり、ここで、Xは、ハロゲン原子であり、

1つのX'は、「ダブルNキャッピング基」CO、CO-CO、CS、CS-CS、またはCS-COであり、最も好ましいのはウリド(CO)であり、他のX'は、存在せず、

n = 1 ~ 10、好ましくは2 ~ 5、最も好ましくは2、

A_iおよびA_{n+1}のそれぞれは、構造:

X = -CO-の右側の残基に対しては-NH-CR-CO-、または

X = -CO-の左側の残基に対しては-CO-CR-NH-

を有するアミノ酸残基であり、

Rは、H-または任意選択で置換されていてもよいアルキル基もしくはアルキルアール基であり、任意選択でヘテロ原子を含んでいてもよく、任意選択でN原子に結合されていてもよく、かつ

Pは、水素または任意のC末端保護基である)

を有しうる。そのようなペプチドアルデヒドの例としては、-MAPI、-MAPI、F-尿素-RVY-H、F-尿素-GGY-H、F-尿素-GAF-H、F-尿素-GAY-H、F-尿素-GAL-H、F-尿素-GA-Nva-H、F-尿素-GA-Nle-H、Y-尿素-RVY-H、Y-尿素-GAY-H、F-CS-RVF-H、F-CS-RVY-H、F-CS-GAY-H、アンチパイン、GE20372A、GE20372B、キモスタチンA、キモスタチンB、およびキモスタチンCが挙げられる。

【0023】

ペプチドアルデヒドのさらなる例は、国際公開第2010/055052号パンフレットおよび国際公開第2009/118375号パンフレット、国際公開第94/04651号パンフレット、国際公開第98/13459号パンフレット、国際公開第98/13461号パンフレット、国際公開第98/13462号パンフレット、国際公開第2007/145963号パンフレット(P & G)に開示されている(参照により本明細書に組み込まれる)。

【0024】

ペプチドアルデヒドヒドロ亜硫酸付加物

ペプチドアルデヒドヒドロ亜硫酸付加物は、以上に記載のペプチドアルデヒドから誘導されうる。

【0025】

特定例は、Cbz-RA-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H、Ac-GA-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H、Cbz-GA-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H、Cbz-GA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H、Cbz-VA-NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H、Cbz-GA-NHCH(CH₂Ph)C(OH)(SO₃M)-H、Cbz-GA-NHCH(CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M)-H、Cbz-GG-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H、Cbz-GG-NHCH(CH₂Ph)C(OH)(SO₃M)-H、Cbz-RV-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H、Cbz-LV-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H、Ac-LGA-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H、Ac-FGA-NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M)-H、

(SO₃M) - H、Ac - YGA - NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M) - H、Ac - FGA - NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M) - H、Ac - FGA - NHCH(CH₂Ph)C(OH)(SO₃M) - H、Ac - FGV - NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M) - H、Ac - FGA - NHCH(CH₂CH₂SCH₃)(SO₃M) - H、Ac - WL V - NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M) - H、MeO - CO - VA - NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M) - H、MeNCO - VA - NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M) - H、MeO - CO - FGA - NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M) - H、MeO - CO - FGA - NHCH(CH₂Ph)C(OH)(SO₃M) - H、MeSO₂ - FGA - NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M) - H、MeSO₂ - VA - NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M) - H、PhCH₂O(OH)(O)P - VA - NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M) - H、EtSO₂ - FGA - NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M) - H、PhCH₂SO₂ - VA - NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M) - H、PhCH₂O(OH)(O)P - LA - NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M) - H、PhCH₂O(OH)(O)P - FA - NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M) - H、MeO(OH)(O)P - LGA - NHCH(CH₂CH(CH₃)₂)C(OH)(SO₃M) - H、および F - 尿素 - RV - NHCH(CH₂C₆H₄OH)C(OH)(SO₃M) - Hであり、ただし、M = 負電荷、H、Na、もしくはK、または他の対イオンである。

【0026】

スブチリシン

スブチリシンは、セリンプロテアーゼのサブグループである。セリンプロテアーゼは、ペプチド結合の加水分解を触媒するかつ活性部位に必須のセリン残基が存在する酵素である(White, Handler and Smith, 1973 "Principles of Biochemistry," Fifth Edition, McGraw-Hill Book Company, NY, pp. 271 - 272)。スブチリシンは、Siezen et al., Protein Engng. 4 (1991) 719 - 737およびSiezen et al., Protein Science 6 (1997) 501 - 523により定義されるI - S1およびI - S2サブグループを含み、好ましくはそれらで構成される。セリンプロテアーゼの活性部位の構造が高度に保存されるので、本発明に係るスブチリシンは、Siezen et al. (supra)により提案されたサブグループで表されるスブチラーゼと機能的に等価でありうる。

【0027】

スブチリシンは、化学修飾または遺伝子修飾された突然変異体(タンパク質工学操作された変異体)を含めて、動物起源、植物起源、または微生物起源でありうる。スブチリシンの例は、バチルス属(Bacillus)に由来するもの、たとえば、スブチリシンノボ、スブチリシンカールスバーグ、スブチリシンBPN'、スブチリシン309、スブチリシン147、およびスブチリシン168(国際公開第89/06279号パンフレットに記載)、ならびにプロテアーゼPD138(国際公開第93/18140号パンフレット)である。例は、国際公開第98/020115号パンフレット、国際公開第01/44452号パンフレット、国際公開第01/58275号パンフレット、国際公開第01/58276号パンフレット、国際公開第03/006602号パンフレット、および国際公開第04/099401号パンフレットに記載されている。他の例は、国際公開第92/19729号パンフレット、国際公開第98/20115号パンフレット、国際公開第98/20116号パンフレット、国際公開第98/34946号パンフレット、国際公開第2011/036263号パンフレットに記載の変異体およびプロテアーゼの混合物である。

【0028】

市販のスブチリシンの例としては、Kannase(商標)、Everlase(商標

10

20

30

40

50

)、Relase(商標)、Esperase(商標)、Alcalase(商標)、Durazym(商標)、Savinase(商標)、Ovozyme(商標)、Liquanase(商標)、Coronase(商標)、Polarzyme(商標)、Pyrase(商標)、Pancreatic Trypsin NOVO(PTN)、Bio-Feed(商標)ProおよびClear-Lens(商標)Pro、Blazeが挙げられる(すべてNovozymes A/S, Bagsvaerd, Denmarkから入手可能)。他の市販のスブチリシンとしては、Ronozyme(商標)Pro、Maxatase(商標)、Maxacal(商標)、Maxapem(商標)、Opticlean(商標)、Properase(商標)、Purafast(商標)、Purafect(商標)、Purafect Ox(商標)、Purafact Prime(商標)、Excellase(商標)、FN2(商標)、FN3(商標)、およびFN4(商標)が挙げられる(Genencor International Inc.、Gist-Brocades、BASF、またはDSMから入手可能)。他の例は、Primase(商標)およびDuralase(商標)である。Blap R、Blap S、およびBlap Xは、Henkelから入手可能である。

10

【0029】

第2の酵素

スブチリシンに加えて、洗剤組成物は、任意選択で、リパーゼ、クチナーゼ、アミラーゼ、カルボヒドラーゼ、セルラーゼ、ペクチナーゼ、ペクチン酸リアーゼ、マンナーゼ、アラビナーゼ、ガラクタナーゼ、キシラナーゼ、オキシダーゼ、ラッカーゼ、および/またはペルオキシダーゼなどの第2の酵素を含んでいてもよい。この組成物は、1種、2種、またはそれ以上の非スブチリシン酵素を含有していてもよい。

20

【0030】

リパーゼおよびクチナーゼ

好適なリパーゼおよびクチナーゼとしては、細菌起源または菌類起源のものが挙げられる。化学修飾またはタンパク質工学操作された突然変異体が包含される。例としては、サーモマイセス属(*Thermomyces*)由来のリパーゼ、たとえば、欧州特許第258068号明細書および欧州特許第305216号明細書に記載のT. ラヌギノサス(*T. lanuginosus*) (旧名フミコラ・ラヌギノサ(*Humicola lanuginosa*))由来のリパーゼ、フミコラ属(*Humicola*)由来のクチナーゼ、たとえば、国際公開第96/13580号パンフレットに記載のH. インソレンス(*H. insolens*)由来のクチナーゼ、シュードモナス属(*Pseudomonas*)のリパーゼ、たとえば、P. アルカリゲネス(*P. alcaligenes*)またはP. シュードアルカリゲネス(*P. pseudoalcaligenes*) (欧州特許第218272号明細書)、P. セパシア(*P. cepacia*) (欧州特許第331376号明細書)、P. スツツエリ(*P. stutzeri*) (英国特許第1,372,034号明細書)、P. フルオレッセンス(*P. fluorescens*)、シュードモナス属(*Pseudomonas*)の種の株SD705 (国際公開第95/06720号パンフレットおよび国際公開第96/27002号パンフレット)、P. ウィスコンシネンシス(*P. wisconsinensis*) (国際公開第96/12012号パンフレット)由来のリパーゼ、バチルス属(*Bacillus*)のリパーゼ、たとえば、B. サブチリス(*B. subtilis*) (Dartois et al., 1993, *Biochemica et Biophysica Acta*, 1131: 253-360)、B. ステアロサーモフィラス(*B. stearoothermophilus*) (特開昭64-744992号公報)、またはB. プミラス(*B. pumilus*) (国際公開第91/16422号パンフレット)由来のリパーゼが挙げられる。

30

40

【0031】

他の例は、リパーゼ変異体、たとえば、国際公開第92/05249号パンフレット、国際公開第94/01541号パンフレット、欧州特許第407225号明細書、欧州特許第260105号明細書、国際公開第95/35381号パンフレット、国際公開第9

50

6 / 0 0 2 9 2 号パンフレット、国際公開第 9 5 / 3 0 7 4 4 号パンフレット、国際公開第 9 4 / 2 5 5 7 8 号パンフレット、国際公開第 9 5 / 1 4 7 8 3 号パンフレット、国際公開第 9 5 / 2 2 6 1 5 号パンフレット、国際公開第 9 7 / 0 4 0 7 9 号パンフレット、国際公開第 9 7 / 0 7 2 0 2 号パンフレット、国際公開第 0 0 / 0 6 0 0 6 3 号パンフレット、国際公開第 2 0 0 7 / 0 8 7 5 0 8 号パンフレット、および国際公開第 2 0 0 9 / 1 0 9 5 0 0 号パンフレットに記載のものである。

【 0 0 3 2 】

好ましい市販のリパーゼ酵素としては、Lipolase (商標)、Lipolase Ultra (商標)、および Lipex (商標)、Lecitase (商標)、Lipolex (商標)、Lipoclean (商標)、Lipoprim (商標) (Novozymes A/S) が挙げられる。他の市販のリパーゼとしては、Lumafast (Genencor Int Inc)、Lipomax (Gist-Brocades / Genencor Int Inc)、および Solvay 製のバチルス属 (Bacillus) の種のリパーゼが挙げられる。

10

【 0 0 3 3 】

アミラーゼ

好適なアミラーゼ (および / または) としては、細菌起源または菌類起源のものが挙げられる。化学修飾またはタンパク質工学操作された突然変異体が包含される。アミラーゼとしては、たとえば、バチルス属 (Bacillus) から取得される - アミラーゼ、たとえば、より詳細には英国特許第 1 , 2 9 6 , 8 3 9 号明細書に記載されるバチルス・リケニフォルミス (Bacillus licheniformis) の特定の株から取得されるものが挙げられる。

20

【 0 0 3 4 】

有用なアミラーゼの例は、国際公開第 9 4 / 0 2 5 9 7 号パンフレット、国際公開第 9 4 / 1 8 3 1 4 号パンフレット、国際公開第 9 6 / 2 3 8 7 3 号パンフレット、および国際公開第 9 7 / 4 3 4 2 4 号パンフレットに記載の変異体、特定的には、次の位置、すなわち、1 5、2 3、1 0 5、1 0 6、1 2 4、1 2 8、1 3 3、1 5 4、1 5 6、1 8 1、1 8 8、1 9 0、1 9 7、2 0 2、2 0 8、2 0 9、2 4 3、2 6 4、3 0 4、3 0 5、3 9 1、4 0 8、および 4 4 4 の 1 つ以上に置換を有する変異体である。

【 0 0 3 5 】

30

市販のアミラーゼは、Stainzyme、Stainzyme Plus、Duramyl (商標)、Termamyl (商標)、Termamyl Ultra、Natalase、Fungamyl (商標)、および BAN (商標) (Novozymes A/S)、Rapidase (商標) および Purastar (商標) (Genencor International Inc. 製) である。

【 0 0 3 6 】

リアーゼ

ペクチン酸リアーゼは、バチルス属 (Bacillus) に由来する野生型酵素、特定的には、B . リケルニフォルミス (B . licheniformis) もしくは B . アガラドヘレンス (B . agaradhaerens) に由来するものまたはこれらのいずれかに由来する変異体、たとえば、米国特許第 6 , 1 2 4 , 1 2 7 号明細書、国際公開第 1 9 9 9 / 0 2 7 0 8 3 号パンフレット、国際公開第 1 9 9 9 / 0 2 7 0 8 4 号パンフレット、国際公開第 2 0 0 2 / 0 0 6 4 4 2 号パンフレット、国際公開第 2 0 0 2 / 0 9 2 7 4 1 号パンフレット、国際公開第 2 0 0 3 / 0 9 5 6 3 8 号パンフレットに記載のものであってもよい。市販のペクチン酸リアーゼは、X Pect、Pectawash、および Pectaway (Novozymes A/S) である。

40

【 0 0 3 7 】

マンナーゼ

マンナーゼは、ファミリー 5 または 2 6 のアルカリマンナーゼであってよい。それは、バチルス属 (Bacillus) またはフミコラ属 (Humicola) に由来す

50

る野生型、特定的には、B. アガラドヘレンス (B. agaradhaerens)、B. リケニフォルミス (B. licheniformis)、B. ハロデュランス (B. halodurans)、B. クラウシー (B. clausii)、または H. インソレンス (H. insolens) に由来するものであってもよい。好適なマンナーゼは、国際公開第 1999/064619 号パンフレットに記載されている。市販のマンナーゼは、Mannaway (Novozymes A/S) である。

【0038】

セルラーゼ

好適なセルラーゼとしては、細菌起源または菌類起源のものが挙げられる。化学修飾またはタンパク質工学操作された突然変異体が包含される。好適なセルラーゼとしては、バシラス (Bacillus) 属、シュードモナス属 (Pseudomonas)、フミコラ属 (Humicola)、フザリウム属 (Fusarium)、チセラピア属 (Thielavia)、アクレモニウム属 (Acromonium) に由来するセルラーゼ、たとえば、米国特許第 4,435,307 号明細書、米国特許第 5,648,263 号明細書、米国特許第 5,691,178 号明細書、米国特許第 5,776,757 号明細書、および国際公開第 89/09259 号パンフレットに開示されている、フミコラ・インソレンス (Humicola insolens)、マイセリオフトラ・サーモフィラ (Myceliophthora thermophila)、およびフザリウム・オキシスポラム (Fusarium oxysporum) から産生される菌類のセルラーゼが挙げられる。

【0039】

とくに好適なセルラーゼは、カラーケア効果を有するアルカリ性セルラーゼまたは中性セルラーゼである。そのようなセルラーゼの例は、欧州特許第 0495257 号明細書、欧州特許第 0531372 号明細書、国際公開第 96/11262 号パンフレット、国際公開第 96/29397 号パンフレット、国際公開第 98/08940 号パンフレットに記載のセルラーゼである。他の例は、セルラーゼ変異体、たとえば、国際公開第 94/07998 号パンフレット、欧州特許第 0531315 号明細書、米国特許第 5,457,046 号明細書、米国特許第 5,686,593 号明細書、米国特許第 5,763,254 号明細書、国際公開第 95/24471 号パンフレット、国際公開第 98/12307 号パンフレット、および国際公開第 99/01544 号パンフレットに記載のものである。

【0040】

市販のセルラーゼは、Celluzyme、Celluclean、Endloase、Carezyme、Renozyme、whitezyme (Novozymes A/S) である。

【0041】

ペプチドアルデヒドおよびヒドロ亜硫酸/重亜硫酸付加物の調製

ペプチドアルデヒドは、March, J. Advanced Organic Chemistry, fourth edition, Wiley-Interscience, US 1992, p 895 などの書籍に記載されるように、重亜硫酸ナトリウムとの反応により水溶性ヒドロ亜硫酸付加物に変換しうる。

【0042】

ヒドロ亜硫酸付加物への変換は、可逆的である (たとえば、J. Am. Chem. Soc. 1978, 100, 1228)。したがって、付加物は、液体洗剤中、液体スブチリン配合物中、または洗浄/洗濯水中で、部分的にまたは完全に逆戻りしてペプチドアルデヒドを放出しうる。

【0043】

対象のペプチドアルデヒドは、公知の方法により、たとえば、米国特許第 4,703,036 号明細書、米国特許第 4,478,745 号明細書、または米国特許第 5,578,574 号明細書に記載されるように、最終乾燥工程を省略して調製されうるか、または

J . P e p t . S c i . 2 0 0 7 ; 1 3 ; 1 - 1 5 にレビューされたもしくはS y n t h e s i s 1 9 8 3 , 6 7 6 に例示された方法のいずれかにより、調製されうる。ペプチドアルデヒドは、粗製でありうるか、または精製されて固体として単離されうるか、または有機溶媒により溶解状態を保持しうる。

【 0 0 4 4 】

重亜硫酸付加物の水性溶液は、公知の方法で、たとえば、国際公開第 9 8 / 4 7 5 2 3 号パンフレット、米国特許第 6 , 5 0 0 , 8 0 2 号明細書、米国特許第 5 , 4 3 6 , 2 2 9 号明細書、J . A m . C h e m . S o c . 1 9 7 8 , 1 0 0 , 1 2 2 8、O r g . S y n t h . , C o l l . V o l . 7 : 3 6 1 に記載の方法で、対応するペプチドアルデヒドと重亜硫酸ナトリウム（亜硫酸水素ナトリウム NaHSO_3 ）、重亜硫酸カリウム（ KHSO_3 ）の水性溶液との反応により調製されうる。

10

【 0 0 4 5 】

洗剤組成物

洗剤は、顆粒洗剤または液体洗剤でありうる。液体洗剤は、固体（またはガス）ではない物理形態をとり、それは、注加可能な液体、注加可能なゲル、または注加不能なゲルでありうる。それは、等方性または構造的のいずれか、好ましくは等方性でありうる。それは、自動洗浄／洗濯機による洗浄／洗濯または手による洗浄／洗濯に有用な配合物を含む。洗剤は、少なくとも 1 種の界面活性剤を含有する。洗剤はまた、ビルダーを含みうる。

【 0 0 4 6 】

粒状洗剤組成物は、顆粒もしくは粉末でありうるか、または錠剤、ブリケット剤の形にプレスされた粉末／顆粒でありうる。組成物は、錠剤、棒剤、または多区画パウチを含めてパウチの形態をとりうる。組成物は、粉末、たとえば、自由流動性粉末、集塊スプレー乾燥粉末など、カプセル化物、押出し物、針状物、ヌードル、フレーク、またはそれらの任意の組合せの形態をとりうる。

20

【 0 0 4 7 】

洗剤成分は、水溶性パウチ内または錠剤の異なる層内の区画により、互いに物理的に分離することが可能である（以下の単位用量を参照されたい）。それにより、成分間の貯蔵時有害相互作用を回避することが可能である。また、各区画の異なる溶解プロファイルにより、洗浄／洗濯溶液中の所定の成分の遅延溶解を引き起こすことが可能である。

【 0 0 4 8 】

パウチは、組成物の保持に好適な任意の形態、形状、および材料でありうる。たとえば、水に接触する前にパウチから組成物を放出させないものでありうる。パウチは、内部空間を取り囲む水溶性フィルムから作製される。前記内部空間は、パウチの区画に分割することが可能である。好ましいフィルムは、高分子材料、好ましくはフィルム状またはシート状に形成されたポリマーである。好ましいポリマー、コポリマー、またはそれらの誘導体は、所定のポリアクリレートおよび水溶性アクリレートコポリマー、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ナトリウムデキストリン、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、マルトデキストリン、ポリメタクリレート、最も好ましくはポリビニルアルコールコポリマーおよびヒドロキシプロピルメチルセルロース（HPMC）である。好ましくは、フィルム中のポリマーたとえば PVA のレベルは、少なくとも約 6 0 % である。好ましい平均分子量は、典型的には、約 2 0 , 0 0 0 ~ 約 1 5 0 , 0 0 0 であろう。フィルムはまた、グリセロール、エチレングリセロール、プロピレングリコール、ソルビトール、およびそれらの混合物のような可塑剤が加えられたポリアクリドおよびポリビニルアルコール（Chris Craft Inc. Prod. Of Gary, Ind., US により販売されている M 8 6 3 0 という商品名で知られる）などの加水分解性かつ水溶性のポリマーブレンドを含むブレンド組成物であってもよい。パウチは、水溶性フィルムにより分離された固体衣類クリーニング組成物もしくは部分成分および／または液体クリーニング組成物もしくは部分成分を含んでいてもよい。液体成分用の区画は、固体を含有する区画と組成が異なってもよい（たとえば、米国特許出願公開第 2 0 0 9 / 0 0 1 1 9 7 0 号明細書を参照されたい）。

30

40

50

【 0 0 4 9 】

洗剤成分の選択は、テキスタイルの保護のために、クリーニングされるテキスタイルのタイプ、汚れのタイプおよび／または程度、クリーニングが行われる温度、ならびに洗剤製品の配合を考慮することを含みうる。以下に挙げられた成分は、特定の機能に従って一般的な見出しにより分類されているが、これは、当業者であればわかるであろうが、成分が追加の機能を含みうるので、限定要件とみなすべきはでない。

【 0 0 5 0 】

一実施形態では、本発明に係る安定化スブチリシン組成物は、洗浄／洗濯液 1 リットルあたり、0 . 0 0 1 ~ 1 0 0 m g のタンパク質、たとえば 0 . 0 1 ~ 1 0 0 m g のタンパク質、好ましくは 0 . 0 0 5 ~ 5 0 m g のタンパク質、より好ましくは 0 . 0 1 ~ 2 5 m g のタンパク質、さらにより好ましくは 0 . 0 5 ~ 1 0 m g のタンパク質、最も好ましくは 0 . 0 5 ~ 5 m g のタンパク質、さらに最も好ましくは 0 . 0 1 ~ 1 m g のタンパク質に対応する量で洗剤組成物に添加されうる。

10

【 0 0 5 1 】

単位用量

単位用量製品は、再使用不能な容器中の単回用量のパッケージである。それは、衣類洗濯および食器洗浄用の洗剤でますます使用されるようになっている。洗剤単位用量製品は、1 回の洗浄／洗濯に使用される洗剤量のパッケージ（たとえば、水溶性フィルムから作製されたパウチの形態）である。

【 0 0 5 2 】

20

一態様では、洗剤組成物は、単位用量形態である。単位用量形態の洗剤製品は、錠剤、カプセル、サシェ、パウチなどを含む。ここで使用するために、一態様では、錠剤は、水溶性フィルムおよび水溶性パウチで包まれる。本発明に係る洗剤組成物の重量は、約 1 0 ~ 約 2 5 グラム、約 1 2 ~ 約 2 4 グラム、さらには 1 4 ~ 2 2 グラムである。これらの重量は、自動食器洗浄用洗剤製品のディスペンサーに適合させるのにきわめて便利である。洗剤組成物を包囲する水溶性材料を有する単位用量製品の場合、水溶性材料は、組成物の一部とみなされない。一態様では、単位用量形態は、水溶性パウチ（すなわち、洗剤組成物を包囲する水溶性フィルム）であり、一態様では、複数の区画を形成する複数のフィルムを有する多区画パウチである。この構成は、組成物の適応性および最適化に寄与する。それにより、さまざまな成分の分離および制御放出が可能なる。一態様では、1 つの区画は、固体形態の洗剤組成物を含有し、他の区画は、液体形態の洗剤組成物を含有する。

30

【 0 0 5 3 】

一態様では、多区画パウチの実施形態の 2 つの異なる区画は、2 つの異なるクリーニング剤を含有しうる。一態様では、これらの 2 つの区画のフィルムは、異なる溶解プロファイルを有して、異なる時間で同一のまたは異なる作用剤の放出を可能にする。たとえば、1 つの区画（第 1 の区画）からの作用剤は、汚れの除去に役立つように洗浄／洗濯プロセスの初期に送達可能であり、他の区画（第 2 の区画）からの第 2 の作用剤は、第 1 の区画からの作用剤の少なくとも 2 分後、さらには少なくとも 5 分後に送達可能である。

【 0 0 5 4 】

一態様では、他方の区画上に重畳された 2 つの並んだ区画を含み、少なくとも 2 つの異なる区画が 2 つの異なる洗剤組成物を含有する多区画パウチが、開示される。

40

【 0 0 5 5 】

多区画バックは、複数の区画を形成する複数の水溶性包囲材料により形成され、区画の 1 つは、洗剤組成物の一部または全部の成分を含有し、他の区画は、液体組成物を含有可能であり、液体組成物は、水性であり（すなわち、液体組成物の 1 0 重量パーセント超の水を含む）、区画は、温水に可溶な材料で作製可能である。一実施形態では、1 つの区画は、冷水に可溶な材料で作製される。それにより、さまざまな成分の分離および制御放出が可能なる。他の実施形態では、区画はすべて、温水に可溶な材料で作製される。

【 0 0 5 6 】

好適なバックは、他方の区画上に重畳された（すなわち上置された）少なくとも 2 つの

50

並んだ区画を含み、とくに好適なのは、パウチである。この配置は、パックのコンパクト性、ロバスト性、および強度に寄与し、それに加えて、必要とされる水溶性材料の量を最小限に抑える。それは、3つの区画を形成するために、3片の材料を必要とするにすぎない。パックのロバスト性はまた、パックの物理的完全性を損なうことなく、非常に薄いフィルムの使用を可能にする。パックはまた、一定の幾何形状の機械ディスペンサーで使用するために区画を折り曲げる必要がないので、使用するのが非常に簡単である。パックの区画の少なくとも2つは、2つの異なる洗剤組成物を含有する。「異なる組成物」とは、本明細書では、少なくとも1つの成分が異なる洗剤組成物を意味する。

【0057】

一態様では、区画の少なくとも1つは、固体洗剤組成物を含有し、他の区画は、水性液体洗剤組成物を含有し、組成物は、典型的には、約20:1~約1:20、約18:1~約2:1、または約15:1~約5:1の固体対液体重量比である。この種のパックは、広範にわたる固体:液体比の値を有する組成物を収容可能であるので、非常に汎用性がある。洗剤成分の多くは、固体形態で、一態様では粉末形態で使用するのにとくに好適であるので、パウチは、高い固体:液体比を有する。本明細書に定義される固体:液体比は、パック中のすべての固体組成物の重量とすべての液体組成物の重量との間の関係を意味する。

10

【0058】

好適な固体:液体重量比は、約2:1~約18:1または約5:1~約15:1である。これらの重量比は、洗剤の成分のほとんどが液体形態である場合に好適である。

20

【0059】

一態様では、2つの並んだ区画は、同一であっても異なってもよい液体洗剤組成物を含有し、他の区画は、固体洗剤組成物、たとえば粉末形態のもの、一態様では緻密化粉末を含有する。固体組成物は、パックの強度およびロバスト性に寄与する。

【0060】

ディスペンサーに適合させるために、とくに自動食器洗浄機では、この場合の単位用量形態の製品は、正方形または長方形の底面および約1~約5cmまたは約1~約4cmの高さを有する。一態様では、固体組成物の重量は、約5~約20グラムまたは約10~約15グラムであり、液体組成物の重量は、約0.5~約4グラムまたは約0.8~約3グラムである。一態様では、異なる区画を形成するフィルムの少なくとも2つは、同一条件下で異なる溶解性を有する。これにより、部分的にまたは完全に包囲された組成物を異なる時間で放出することが可能なる。

30

【0061】

多区画パウチの成分の制御放出は、フィルムの厚さおよび/またはフィルム材料の溶解性を変化させることにより達成可能である。国際公開第2002/102955号パンフレットに記載されるように、たとえばフィルムを架橋することにより、フィルム材料の溶解を遅らせることが可能である。濯ぎ液中への放出のために設計された他の水溶性フィルムは、米国特許第4,765,916号明細書および米国特許第4,972,017号明細書に記載されている。フィルムのワックス被覆(米国特許第5,453,216号明細書を参照されたい)は、濯ぎ液中への放出に役立ちうる。pH制御放出手段、特定的には、選択的アセチル化度を有するアミノアセチル化ポリサッカリドは、米国特許第5,453,216号明細書に記載されている。

40

【0062】

異なる溶解性を有するフィルムで区画が作製された異なる区画を有する多区画パウチにより遅延放出を得る他の手段は、米国特許第6,727,215号明細書に教示されている。

【0063】

界面活性剤

洗剤組成物は、アニオン性および/またはカチオン性および/または非イオン性および/または半極性および/または双性イオン性またはそれらの混合物であってもよい1種以

50

上の界面活性剤を含みうる。特定の実施形態では、洗剤組成物は、１種以上の非イオン性界面活性剤と１種以上のアニオン性界面活性剤との混合物を含むが、個別に使用することも可能である。

【 0 0 6 4 】

界面活性剤は、典型的には、約 0 . 1 重量 % ~ 6 0 重量 %、たとえば、約 1 % ~ 約 4 0 % または約 3 % ~ 約 2 0 % または約 3 % ~ 約 1 0 % のレベルで存在する。界面活性剤は、所望のクリーニング用途に基づいて選択され、当技術分野で公知の任意の従来型の界面活性剤を含む。洗剤で使用することが当技術分野で公知の任意の界面活性剤を利用しうる。

【 0 0 6 5 】

アニオン性界面活性剤の例としては、スルフェートおよびスルホネート、特定的には、線状アルキルベンゼンスルホネート (L A S)、L A S の異性体、分岐状アルキルベンゼンスルホネート (B A B S)、フェニルアルカンスルホネート、 - オレフィンスルホネート (A O S)、オレフィンスルホネート、アルケンスルホネート、アルカン - 2 , 3 - ジイルピス (スルフェート)、ヒドロキシアルカンスルホネートおよびジスルホネート、アルキルスルフェート (A S)、たとえば、ナトリウムドデシルスルフェート (S D S)、脂肪アルコールスルフェート (F A S)、第一級アルコールスルフェート (P A S)、ナトリウムラウリルエーテルスルフェート (S L E S) を含むアルコールエーテルスルフェート (A E S または A E O S または F E S、アルコールエトキシスルフェートまたは脂肪アルコールエーテルスルフェートとしても知られる)、石鹸または脂肪酸、第二級アルカンスルホネート (S A S)、パラフィンスルホネート (P S)、エステルスルホネート、スルホン化脂肪酸グリセロールエステル、メチルエステルスルホネート (M E S) を含む - スルホ脂肪酸メチルエステル (- S F M e または S E S)、アルキルまたはアルケニルコハク酸、ドデセニル / テトラデセニルコハク酸 (D T S A)、アミノ酸の脂肪酸誘導体、スルホコハク酸またはスルホ石鹸のジエステルおよびモノエステル、ならびにそれらの組合せが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【 0 0 6 6 】

洗剤は、その中に含む場合、通常、約 1 重量 % ~ 約 4 0 重量 %、たとえば、約 5 % ~ 約 3 0 %、たとえば、約 5 % ~ 約 1 5 % または約 2 0 % ~ 約 2 5 % のアニオン性界面活性剤を含有するであろう。

【 0 0 6 7 】

非イオン性界面活性剤の例としては、アルコールエトキシレート (A E または A E O)、アルコールプロポキシレート、プロポキシ化脂肪アルコール (P F A)、アルコキシ化脂肪酸アルキルエステル、たとえば、エトキシ化および / またはプロポキシ化脂肪酸アルキルエステル、アルキルフェノールエトキシレート (A P E)、ノニルフェノールエトキシレート (N P E)、アルキルポリグリコシド (A P G)、アルコキシ化アミン、脂肪酸モノエタノールアミド (F A M)、脂肪酸ジエタノールアミド (F A D A)、エトキシ化脂肪酸モノエタノールアミド (E F A M)、プロポキシ化脂肪酸モノエタノールアミド (P F A M)、ポリヒドロキシアルキル脂肪酸アミド、またはグルコサミン N - アシル N - アルキル誘導体 (グルカミド G A または脂肪酸グルカミド F A G A)、さらには S P A N および T W E E N という商品名で入手可能な製品、ならびにそれらの組合せが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【 0 0 6 8 】

洗剤は、その中に含む場合、通常、約 0 . 2 重量 % ~ 約 4 0 重量 %、たとえば、約 0 . 5 % ~ 約 3 0 %、特定的には、約 1 % ~ 約 2 0 %、約 3 % ~ 約 1 0 %、たとえば、約 3 % ~ 約 5 % または約 8 % ~ 約 1 2 % の非イオン性界面活性剤を含有するであろう。

【 0 0 6 9 】

ビルダー

洗剤組成物は、約 0 ~ 6 5 重量 % の洗剤ビルダーもしくはコビルダーまたはそれらの混合物を含有しうる。食器洗浄洗剤では、ビルダーのレベルは、典型的には 4 0 ~ 6 5 %、特定的には 5 0 ~ 6 5 % である。ビルダーおよび / またはコビルダーは、特定的には C a

10

20

30

40

50

およびMgとの水溶性錯体を形成するキレート化剤でありうる。衣類洗剤で利用することが当技術分野で公知の任意のビルダーおよび/またはコビルダーを利用しうる。ビルダーの例としては、ゼオライト、ジホスフェート（ピロホスフェート）、トリホスフェートたとえば三リン酸ナトリウム（STPまたはSTPP）、ニトリロ三酢酸、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）、ジエチレントリアミン五酢酸、アルキルまたはアルケニルコハク酸、カーボネート、たとえば、炭酸ナトリウム、可溶性シリケート、たとえば、メタケイ酸ナトリウム、層状シリケート類（たとえば、Hoechst製のSKS-6）、エタノールアミン、たとえば、2-アミノエタン-1-オール（MEA）、イミノジエタノール（DEA）および2, 2', 2''-ニトリロトリエタノール（TEA）、およびカルボキシメチルイヌリン（CMI）、ならびにそれらの組合せが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

10

【0070】

ビルダーは、強いビルダー、たとえば、メチルグリシンジ酢酸（「MGDA」）またはN, N-ジカルボキシメチルグルタミン酸テトラナトリウム塩（GLDA）であってもよく、中程度のビルダー、たとえば、ナトリウム-トリ-ポリホスフェート（STPP）であってもよく、弱いビルダー、たとえば、クエン酸ナトリウムであってもよい。

【0071】

漂白系

洗剤組成物は、0～50重量%の漂白系を含有しうる。衣類洗剤で利用することが当技術分野で公知の任意の漂白系を利用しうる。好適な漂白系成分としては、漂白触媒、光漂白剤、漂白活性化剤、過酸化水素源たとえば過炭酸ナトリウムおよび過ホウ酸ナトリウム、前形成過酸、およびそれらの混合物が挙げられる。好適な前形成過酸としては、ペルオキシカルボン酸および塩、過炭酸および塩、過イミド酸および塩、ペルオキシ硫酸および塩、たとえばOxone（R）、ならびにそれらの混合物が挙げられるが、これらに限定されるものではない。漂白系の例としては、たとえば、過ホウ酸のナトリウム塩（通常、一水和物または四水和物）などのアルカリ金属塩、過炭酸塩、過硫酸塩、過リン酸塩、過ケイ酸塩をはじめとする無機塩を、過酸形成漂白活性化剤と組み合わせて含む、過酸化物に基づく漂白系が挙げられるが、これに限定されるものではない。漂白活性化剤とは、本明細書では、過酸化水素のような過酸素漂白剤と反応して過酸を形成する化合物を意味する。こうして形成された過酸は、活性化漂白剤を構成する。ここで使用するのに好適な漂白活性化剤としては、エステル、アミド、イミド、またはアンヒドリドのクラスに属するものが挙げられる。好適な例は、テトラセチルアチレンジアミン（TAED）、ナトリウム3, 5, 5-トリメチルヘキサノイルオキシベンゼンスルホネート、ジベルオキシドデカン酸、4-（ドデカノイルオキシ）ベンゼンスルホネート（LOBSS）、4-（デカノイルオキシ）ベンゼンスルホネート、4-（デカノイルオキシ）ベンゾエート（DOBSS）、4-（3, 5, 5-トリメチルヘキサノイルオキシ）ベンゼンスルホネート（ISONOBSS）、テトラアセチルエチレンジアミン（TAED）、および4-（ノナノイルオキシ）ベンゼンスルホネート（NOBSS）、ならびに/または国際公開第98/17767号パンフレットに開示されるものである。対象の漂白活性化剤の特定のファミリーは、欧州特許第624154号明細書に開示されており、そのファミリーでとくに好ましいのは、アセチルトリエチルシトレート（ATC）である。ATCまたはTriacinaのような短鎖トリグリセリドは、最終的にクエン酸およびアルコールに分解するので環境にやさしいという利点を有する。さらに、アセチルトリエチルシトレートおよびトリアセチンは、貯蔵時、製品中で良好な加水分解安定性を有し、効率的な漂白活性化剤である。最後に、ATCは、洗濯添加剤に良好なビルダー能を提供する。他の選択肢として、漂白系は、たとえば、アミド型、イミド型、またはスルホン型のペルオキシ酸を含む。漂白系はまた、6-（フタロイルアミノ）過カプロン酸（PAP）などの過酸を含む。漂白系はまた、漂白触媒を含む。

20

30

40

【0072】

当技術分野でいずれも周知の洗剤組成物の他の成分としては、ヒドロトロブ剤、布染

50

色剤、消泡剤、防汚性ポリマー、再付着防止剤などが挙げられる。

【0073】

方法および組成物

第1の態様では、本発明は、スブチリシンと式 $X - B^1 - NH - CHR - CHOH - SO_3M$ を有するペプチドアルデヒドヒドロ亜硫酸付加物とを含む組成物を提供する。式中

a) Mは、H(水素)またはアルカリ金属であり、

b) Rは、 $NH - CHR - CO$ をLまたはD-アミノ酸残基であるようにする基であり、

c) B^1 は、1個のアミノ酸残基であり、かつ

d) Xは、1個以上のアミノ酸残基で構成され、任意選択でN末端保護基を含んでいてもよい。

10

【0074】

一実施形態では、Rは、 $NH - CHR - CO$ をTyr、m-チロシン、3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン、Phe、Val、Met、Nva、Leu、Ile、またはNleのLまたはD-アミノ酸残基であるようにする基である。

【0075】

一実施形態では、 B^1 は、Ala、Cys、Gly、Pro、Ser、Thr、Val、Nva、またはNleの残基である。

【0076】

一実施形態では、Xは、 B^2 、 $B^3 - B^2$ 、Z - B^2 、またはZ - $B^3 - B^2$ である。ただし、 B^2 および B^3 は、それぞれ、1個のアミノ酸残基を表し、かつZは、N末端保護基である。好ましくは、 B^2 は、Val、Gly、Ala、Arg、Leu、Phe、またはThrの残基である。好ましくは、 B^3 は、Phe、Tyr、Trp、フェニルグリシン、Leu、Val、Nva、Nle、またはIleの残基である。

20

【0077】

一実施形態では、Zは、ベンジルオキシカルボニル(Cbz)、p-メトキシベンジルカルボニル(MOZ)、ベンジル(Bn)、ベンゾイル(Bz)、p-メトキシベンジル(PMB)、p-メトキシフェニル(PMP)、ホルミル、アセチル(Ac)、メチルオキシ、またはメチルオキシカルボニルである。

30

【0078】

一実施形態では、組成物は、液体形態または顆粒形態である。好ましくは、組成物は、界面活性剤をさらに含む洗剤である。

【0079】

一実施形態では、組成物は、第2の酵素、特定的には、リパーゼ、クチナーゼ、アミラーゼ、カルボヒドラーゼ、セルラーゼ、ペクチナーゼ、ペクチン酸リアーゼ、マンナーゼ、アラビナーゼ、ガラクタナーゼ、キシラナーゼ、オキシダーゼ、ラッカーゼ、またはペルオキシダーゼをさらに含む。

【0080】

他の態様では、本発明は、以上に記載の本発明に係る組成物の調製方法を提供する。この方法は、スブチリシンと、以上に記載の式 $X - B^1 - NH - CHR - CHOH - SO_3M$ を有するペプチドアルデヒドヒドロ亜硫酸付加物を含む水性溶液と、任意選択で界面活性剤と、を混合することを含む。

40

【0081】

さらに他の態様では、本発明は、本発明に係る組成物で使用するための化合物を提供する。この化合物は、式 $X - B^1 - NH - CHR - CHOH - SO_3M$ を有するペプチドアルデヒドヒドロ亜硫酸付加物である。式中、MおよびXは、以上に記載されるように定義され、 B^1 は、プロリン(Pro)とは異なるアミノ酸残基、かつRは、 $NH - CHR - CO$ をTyr、m-チロシン、3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン、Phe、Val、Met、Nva、またはNleのLまたはD-アミノ酸残基であるようにする基である。

50

【0082】

一実施形態では、この化合物は、 $Cbz - RA - NHCH(CH_2C_6H_4OH)C(OH)(SO_3M) - H$ 、 $Ac - GA - NHCH(CH_2C_6H_4OH)C(OH)(SO_3M) - H$ 、 $Cbz - GA - NHCH(CH_2C_6H_4OH)C(OH)(SO_3M) - H$ 、 $Cbz - GG - NHCH(CH_2C_6H_4OH)C(OH)(SO_3M) - H$ 、 $Cbz - RV - NHCH(CH_2C_6H_4OH)C(OH)(SO_3M) - H$ 、 $Cbz - LV - NHCH(CH_2C_6H_4OH)C(OH)(SO_3M) - H$ 、 $Ac - LGA - NHCH(CH_2C_6H_4OH)C(OH)(SO_3M) - H$ 、 $Ac - FGA - NHCH(CH_2C_6H_4OH)C(OH)(SO_3M) - H$ 、 $Ac - YGA - NHCH(CH_2C_6H_4OH)C(OH)(SO_3M) - H$ 、 $Ac - FGV - NHCH(CH_2C_6H_4OH)C(OH)(SO_3M) - H$ または $Ac - WL V - NHCH(CH_2C_6H_4OH)C(OH)(SO_3M) - H$ である。ここで、 Ac は、アセチルであり、かつ Cbz は、ベンジルオキシカルボニルである。

10

【0083】

さらに他の態様では、本発明は、本発明に係る組成物で使用するための化合物を提供する。この化合物は、式 $X - B^1 - NH - CHR - CHOH - SO_3M$ を有するペプチドアルデヒドヒドロ硫酸付加物である。式中、 M 、 R 、および X は、以上に記載されるように定義され、 B^1 は、アラニン(Ala)、システイン(Cys)、グリシン(Gly)、セリン(Ser)、トレオニン(Thr)、バリン(Val)、ノルバリン(Nva)、およびノルロイシン(Nle)のアミノ酸残基である。

【0084】

20

一実施形態では、この化合物は、 $Cbz - GA - NHCH(CH_2CH(CH_3)_2)C(OH)(SO_3M) - H$ 、 $Cbz - VA - NHCH(CH_2CH(CH_3)_2)C(OH)(SO_3M) - H$ 、 $Cbz - GA - NHCH(CH_2Ph)C(OH)(SO_3M) - H$ 、 $Cbz - GA - NHCH(CH(CH_3)_2)C(OH)(SO_3M) - H$ 、 $Cbz - GG - NHCH(CH_2Ph)C(OH)(SO_3M) - H$ 、 $Ac - FGA - NHCH(CH_2CH(CH_3)_2)C(OH)(SO_3M) - H$ 、 $Ac - FGA - NHCH(CH_2Ph)C(OH)(SO_3M) - H$ 、 $Ac - FGA - NHCH(CH_2CH_2SCH_3)(SO_3M) - H$ 、 $MeO - CO - VA - NHCH(CH_2CH(CH_3)_2)C(OH)(SO_3M) - H$ 、 $MeNCO - VA - NHCH(CH_2CH(CH_3)_2)C(OH)(SO_3M) - H$ 、 $MeO - CO - FGA - NHCH(CH_2CH(CH_3)_2) - C(OH)(SO_3M) - H$ 、 $MeSO_2 - FGA - NHCH(CH_2CH(CH_3)_2)C(OH)(SO_3M) - H$ 、 $MeSO_2 - VA - NHCH(CH_2CH(CH_3)_2)C(OH)(SO_3M) - H$ 、 $PhCH_2O(OH)(O)P - VA - NHCH(CH_2CH(CH_3)_2)C(OH)(SO_3M) - H$ 、 $EtSO_2 - FGA - NHCH(CH_2CH(CH_3)_2)C(OH)(SO_3M) - H$ 、 $PhCH_2SO_2 - VA - NHCH(CH_2CH(CH_3)_2) - C(OH)(SO_3M) - H$ 、 $PhCH_2O(OH)(O)P - LA - NHCH(CH_2CH(CH_3)_2)C(OH)(SO_3M) - H$ 、 $PhCH_2O(OH)(O)P - FA - NHCH(CH_2CH(CH_3)_2)C(OH)(SO_3M) - H$ 、および $MeO(OH)(O)P - LGA - NHCH(CH_2CH(CH_3)_2)C(OH)(SO_3M) - H$ である。ここで、 Ac は、アセチルであり、かつ Cbz は、ベンジルオキシカルボニルである。

30

40

【0085】

さらに他の態様では、本発明は、本発明に係る組成物で使用するための化合物を提供する。この化合物は、式 $X - B^1 - NH - CHR - CHOH - SO_3M$ を有するペプチドアルデヒドヒドロ硫酸付加物である。式中、 R および M は、以上に記載されるように定義され、 B^1 は、プロリン(Pro)とは異なる1個のアミノ酸残基を表し、 X は、 B^2 、 $B^3 - B^2$ 、 $Z - B^2$ 、 $Z - B^3 - B^2$ であり、ただし、 B^3 および B^2 は、それぞれ、1個のアミノ酸残基を表し、かつ Z は、 N 末端保護基であり、 B^2 は、 Gly 、 Thr 、または Val である。

【0086】

50

さらに他の態様では、本発明は、本発明に係る組成物で使用するための化合物を提供する。この化合物は、式 $X - B^1 - NH - CHR - CHOH - SO_3M$ を有するペプチドアルデヒドヒドロ亜硫酸付加物である。式中、R および M は、以上に記載されるように定義され、 B^1 は、プロリン (Pro) とは異なる 1 個のアミノ酸残基を表し、X は、 $B^3 - B^2$ 、 $Z - B^3 - B^2$ であり、ここで、 B^3 および B^2 は、それぞれ、1 個のアミノ酸残基を表し、かつ Z は、N 末端保護基であり、 B^3 は、Phe、Tyr、Trp、フェニルグリシン、Leu、Val、Nva、Nle、または Ile である。

【実施例】

【0087】

緩衝剤および基質として使用される化学品は、少なくとも試薬グレードの市販品であった。

【0088】

実施例 1

ペプチドアルデヒドのヒドロ亜硫酸付加物の調製

以上に記載の式 $X - B^1 - B^0 - H$ を有するペプチドアルデヒドを、対応する重亜硫酸付加物に変換する。周囲温度の 8 ml のエチルアセテート中の 1 mmol の $X - B^1 - B^0 - H$ の攪拌懸濁液に、6 ml の水中の 1.06 mmol の重亜硫酸ナトリウム (114 mg) を滴下し、次いで、反応系を 2 時間攪拌する。水性相を単離し、有機層を 2×2 ml の水で洗浄する。合わせた水性相を凍結乾燥させて、白色粉末として $X - B^1 - NH - CHR - CHOH - SO_3Na$ (予測収率 66%) を与える。

【0089】

実施例 2

ペプチドアルデヒドヒドロ亜硫酸付加物の液体配合物の調製。

4 mmol の固体 $X - B^1 - NH - CHR - CHOH - SO_3Na$ を 6 g の脱塩水中に溶解させ、35 で 30 分間攪拌し、続いて、冷却し、 $X - B^1 - NH - CHR - CHOH - SO_3Na$ の 25% 水性溶液を与える。他の選択肢として、以上の合成からの水性相は、後続の工程で酵素安定化に供すべく容易に使用可能であり、この溶液は、約 3% (w/w) である。

【0090】

実施例 3

スブチリシンとペプチドアルデヒドヒドロ亜硫酸付加物とを含む安定化スブチリシン配合物の調製。

3.6% の以上の 25% 水性溶液を用いて、市販の Savinase 16 L (商標) (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Denmark) に、0.9% の $X - B^1 - NH - CHR - CHOH - SO_3Na$ を添加する。

【0091】

実施例 4

ヒドロ亜硫酸付加物によるスブチリシンの安定化

スブチリシン (Savinase 16 L) およびリパーゼ (Lipex 100 L) を含み、 $X - B^1 - NH - CHR - CHOH - SO_3Na$ を含むまたは含まない洗剤 (スブチリシンを含有する洗剤にペプチドアルデヒドヒドロ亜硫酸付加物を個別に添加することが可能である) を -18、35、および 40 で密閉ガラス容器中に配置し、さまざまな時間の後、標準的分析方法を用いてプロテアーゼおよびリパーゼの残存活性を測定する (プロテアーゼは、40、pH 8.3 で N, N - ジメチルカゼインの加水分解により、およびリパーゼは、40、pH 7.7 で pNp - パレレート加水分解により)。好適量のペプチドアルデヒドヒドロ亜硫酸付加物をすでに含有する洗剤にスブチリシンを添加することにより、類似の試験を行うことが可能である。すべての記載のペプチドアルデヒド重亜硫酸付加物で、類似の結果を得ることが可能である。

【0092】

安定化スブチリシン配合物を含む洗剤組成物の一例として、表 1 に記載の組成物を作製

した。

【 0 0 9 3 】

【 表 1 】

表 1. 洗剤組成物

成分	% (w/w)
ナトリウムアルキルエトキシスルフェート (C9-15, 2EO)	6.0
ナトリウムドデシルベンゼンスルホネート	3.0
ナトリウムトルエンスルホネート	3.0
オレイン酸	2.0
第一級アルコールエトキシレート (C12-15, 7EO)	3.0
第一級アルコールエトキシレート (C12-15, 3EO)	2.5
エタノール	0.5
モノプロピレングリコール	2.0
クエン酸トリナトリウム 2H ₂ O	4.0
トリエタノールアミン	0.4
NaOH で pH を 8.5 に調整	
X-B ¹ -NH-CHR-CHOH-SO ₃ Na を含む安定化 Savinase 配合物; または 比較用 Savinase 16L	0.5
Lipex 100L TM (Novozymes A/S から入手可能)	0.5
水	100%までの残量

【 0 0 9 4 】

表 2 に示されているのは、 $X = \text{C b z} - \text{G l y}$ 、 $B^1 = \text{A l a}$ 、 $R = -\text{C H}_2\text{p}(\text{C}_6\text{H}_4)$
 $)-\text{O H}$ を用いて得られた結果であり、表 1 に記載の洗剤で 4 0 1 週間のインキュベ
 ション後に測定した安定性である。

【 0 0 9 5 】

【表 2】

表 2. 表 1 に記載の洗剤での 40℃ 1 週間のインキュベーション後の残存プロテアーゼ活性

洗剤に添加された阻害剤の量	プロテアーゼの安定性 (残存活性)
なし	12%
7 ppm	52%
14 ppm	77%
18 ppm	80%

10

【0096】

ペプチドアルデヒドのヒドロ亜硫酸付加物の添加によるスブチリシンの安定化が、結果から実証される。

【0097】

20

実施例 5

スブチリシンおよびリパーゼの安定化

安定化スブチリシン配合物を含む洗剤組成物の一例として、表 3 に記載の組成物を作製した。

【0098】

【表 3】

表 3. 洗剤組成物

成分	% (w/w)
ナトリウムドデシルベンゼンスルホネート	6.0
NaOH	1.4
ダイズ脂肪酸 (Edenor SJ)	3.0
ヤシ脂肪酸 (Radiacid 0631)	2.5
第一級アルコールエトキシレート (C13, 8EO)	5.0
エタノール	5.0
モノプロピレングリコール	5.0
クエン酸トリナトリウム 2H ₂ O	0.5
トリエタノールアミン	2.0
ホスホネート - Dequest 2066 C2	3.0
必要に応じて追加の NaOH で pH を 8.4 に調整する	
スブチリシン: Savinase, X-B ¹ -NH-CHR-CHOH-SO ₃ Na を用いて安定化したとき; または 4-ホルミルフェニルボロン酸を用いたとき; または 比較用として安定化剤を用いないとき	0.75
リパーゼ: Lipex 100L TM (Novozymes A/S から入手可能)	0.15
水	100%までの残量

【0099】

表 4 に示されているのは、表 3 に記載の洗剤で 3 5 2 週間のインキュベーション後に測定された結果である。

【0100】

【表 4】

表 4. 表 3 に記載の洗剤での 35°C 2 週間のインキュベーション後のスブチリシン(プロテアーゼ)およびリパーゼの残存活性

阻害剤	洗剤中の阻害剤	スブチリシン	リパーゼ
なし	-	2%	1%
4-ホルミルフェニルボロン酸 (先行技術)	128 ppm	8%	2%
X = Cbz-Gly; B ¹ = Ala; R = -CH ₂ -p(C ₆ H ₄)-OH	21 ppm	63%	18%

10

【0101】

ペプチドアルデヒドのヒドロ亜硫酸付加物の添加によりスブチリシンおよび第 2 の酵素(リパーゼ)を安定化させることが可能であり、しかも先行技術の安定化剤よりも効果的であることが、結果から実証される。

20

【0102】

実施例 6

スブチリシンおよびリパーゼの安定化

安定化スブチリシン配合物を含む洗剤のさらに他の例として、表 5 に記載の組成物を作製した。

【0103】

【表 5】

表 5. 洗剤組成物

30

成分	% (w/w)
市販の非酵素洗剤、Liquid EU 2x 用量 UK で購入、2009 年	98.2
スブチリシン	1.4
リパーゼ: Lipoclean 2000L (Novozymes A/S から入手可能)	0.4

【0104】

40

表 6 に示されているのは、表 5 に記載の洗剤で 3 7 4 週間のインキュベーション後および 3 0 8 週間のインキュベーション後に測定された結果である。

【0105】

【表 6】

表 6. 表 5 に記載の洗剤での 37℃ 4 週間のインキュベーション後または 30℃ 8 週間のインキュベーション後のスブチリシン(プロテアーゼ)およびリパーゼの残存活性

阻害剤	スブチリシン	洗剤に 添加された 阻害剤の量	スブチリシン	リパーゼ
			37℃ 4 週間	30℃ 8 週間
なし	Coronase 48L	0	69%	28%
X = Cbz-Gly; B ¹ = Ala; R = -CH ₂ -p(C ₆ H ₄)-OH	Coronase 48L	59 ppm	80%	61%
なし	Liquanase 2.5L	0	43%	0%
X = Cbz-Gly; B ¹ = Ala; R = -CH ₂ -p(C ₆ H ₄)-OH	Liquanase 2.5L	34 ppm	83%	27%

10

【 0 1 0 6 】

20

ペプチドアルデヒドのヒドロ亜硫酸付加物の添加によりスブチリシンおよび種々のスブチリシンに対する第 2 の酵素（リパーゼ）を安定化させることが可能であることが、結果から確認される。

【配列表】

0006334396000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
C 1 2 N	9/18	(2006.01)	C 1 2 N	9/18	
C 1 2 N	9/04	(2006.01)	C 1 2 N	9/04	Z
C 1 2 N	9/08	(2006.01)	C 1 2 N	9/08	
C 1 1 D	3/386	(2006.01)	C 1 1 D	3/386	
C 1 1 D	3/26	(2006.01)	C 1 1 D	3/26	
C 1 1 D	3/34	(2006.01)	C 1 1 D	3/34	
C 1 2 N	9/42	(2006.01)	C 1 2 N	9/42	
C 0 7 K	5/06	(2006.01)	C 0 7 K	5/06	

(74)代理人 100141977

弁理士 中島 勝

(74)代理人 100138210

弁理士 池田 達則

(72)発明者 リセ ムンク ミケルセン

デンマーク国, デーコー - 2 6 1 0 レズオウア, リスプロバイ 3 4

(72)発明者 フランチェスコ ボンツィーニ

イタリア国, イ - 2 0 0 9 4 コルシコ(ミラノ), フォスコロ 3 6

(72)発明者 ロベルト ビザッチャ

イタリア国, イ - 2 4 0 3 9 ソット イル モンテ ジョバンニ ヴェンティトレージモ(ベルガモ), ピア モナステロロ 3

(72)発明者 レナト カネボッティ

イタリア国, イ - 2 0 8 6 3 コンコレッツォ(モンツァ・エ・ブリアンツァ)ピア アッダ 1 3

審査官 濱田 光浩

(56)参考文献 特表2011-515449(JP, A)

特開平07-278095(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 9 / 0 0

C 0 7 K 5 / 0 6

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

WPIDS(STN)