

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910149227.1

[51] Int. Cl.

C12Q 1/37 (2006.01)

C12Q 1/02 (2006.01)

C12N 9/56 (2006.01)

C12N 9/54 (2006.01)

C12N 15/57 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

[43] 公开日 2009年11月11日

[11] 公开号 CN 101575635A

[51] Int. Cl. (续)

C12N 1/21 (2006.01)

A61K 8/66 (2006.01)

A61Q 11/00 (2006.01)

A61Q 11/02 (2006.01)

A61Q 19/00 (2006.01)

A61Q 19/10 (2006.01)

C11D 3/386 (2006.01)

C12R 1/125 (2006.01)

C12R 1/10 (2006.01)

C12R 1/11 (2006.01)

C12R 1/09 (2006.01)

C12R 1/07 (2006.01)

[22] 申请日 2003.2.26

[21] 申请号 200910149227.1

分案原申请号 03806962.8

[30] 优先权

[32] 2002. 2. 26 [33] US [31] 60/360,057

[32] 2002. 5. 30 [33] US [31] 60/384,777

[71] 申请人 金克克国际有限公司

地址 美国加利福尼亚

[72] 发明人 F·A·哈丁

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 罗菊华

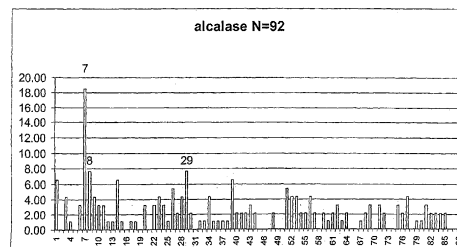
权利要求书4页 说明书115页 附图5页

[54] 发明名称

免疫原性减弱的枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 蛋白

[57] 摘要

本发明提供鉴定枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 蛋白中 CD4⁺ T-细胞表位的方法。本发明还旨在生产改变的肽，当其被整合进野生型枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 蛋白时则产生改变的免疫应答，优选在人体内为弱免疫应答。特别地，本发明提供手段，包括适于减弱 ALCALASE® 酶免疫原性的方法和组合物。



1.一种鉴定微生物枯草杆菌蛋白酶的至少一个 T-细胞表位的方法，其中所述枯草杆菌蛋白酶包括枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg，所述方法包括步骤：

(i) 从单一人血来源获得树突细胞溶液和原初 CD4+和/或 CD8+ T-细胞溶液；

(ii) 分化所述树突细胞以产生分化的树突细胞溶液；

(iii) 将所述分化的树突细胞溶液和所述原初 CD4+和/或 CD8+ T-细胞与所述枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 的肽片段混合；以及

(iv) 测定在所述步骤 (iii) 中的所述 T-细胞的增殖。

2.权利要求 1 的方法，其中所述微生物枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 衍生自芽孢杆菌属的成员。

3.权利要求 2 的方法，其中所述芽孢杆菌选自枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、迟缓芽孢杆菌、短芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、*B. alkalophilus*、解淀粉芽孢杆菌、*B. clausii*、*B. halodurans*、巨大芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌、环状芽孢杆菌、灿烂芽孢杆菌、和苏云金芽孢杆菌。

4.权利要求 1 的方法，其中所述微生物枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 包含 SEQ ID NO:1 中所示序列的至少一部分。

5.一种减弱微生物枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 的免疫原性的方法，包括步骤：

(a) 通过以下步骤鉴定所述蛋白质中的至少一个 T-细胞表位：

(i) 将粘着的从单核细胞衍生的树突细胞与至少一种包含所述 T-细胞表位的肽接触，其中所述树突细胞已经通过体外暴露于至少

一种细胞因子而分化了；和

(ii) 将所述树突细胞和所述肽与原初 T-细胞接触，其中所述原初 T-细胞与所述粘着的从单核细胞衍生的树突细胞获自同一来源，由此所述 T-细胞对所述肽应答而增殖；和

(b) 修饰所述枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 以中和所述 T-细胞表位从而产生变体蛋白质，这样所述变体蛋白诱导低于或基本上等于所述原初 T-细胞的基线增殖。

6. 权利要求 5 的方法，其中所述微生物枯草杆菌蛋白酶衍生自芽孢杆菌属的成员。

7. 权利要求 6 的方法，其中所述芽孢杆菌选自枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、迟缓芽孢杆菌、短芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、*B. alkalophilus*、解淀粉芽孢杆菌、*B. clausii*、*B. halodurans*、巨大芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌、环状芽孢杆菌、灿烂芽孢杆菌、和苏云金芽孢杆菌。

8. 权利要求 5 的方法，其中所述微生物枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 包含 SEQ ID NO:1 中所示序列的至少一部分。

9. 权利要求 5 的方法，所述微生物枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 的所述表位通过以下方式被修饰：(a) 用来自所述微生物枯草杆菌蛋白酶的同源物的相似序列置换所述 T-细胞表位的氨基酸序列，其中所述置换基本模拟 T-细胞表位的主要三级结构特征。

10. 权利要求 5 的方法，其中所述微生物枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 通过改变至少一个选自 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:90、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:30、和 SEQ ID NO:40 的表位而得到修饰。

11.权利要求 10 的方法，其中所述表位通过置换与至少一个所述表位对应的残基的氨基酸序列而得到修饰。

12.权利要求 10 的方法，其中所述表位通过删除与至少一个所述表位对应的残基的氨基酸序列而得到修饰。

13.权利要求 10 的方法，其中所述表位通过向至少一个所述表位添加氨基酸而得到修饰。

14.一种修饰的枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg，其中所述枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 在至少一个含有选自 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:90、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:30、和 SEQ ID NO:40 的氨基酸序列的表位中含有至少一个改变。

15.权利要求 14 的修饰的枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg，其中所述修饰的枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 在芽孢杆菌属的生物中表达。

16.权利要求 14 的修饰的枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg，其中由所述修饰的枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 产生的免疫应答弱于由野生型修饰的枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 产生的所述免疫应答。

17.权利要求 14 的修饰的枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg，其中由所述修饰的枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 产生的免疫应答强于由野生型修饰的枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 产生的所述免疫应答。

18.一种含有编码权利要求 14 的所述修饰的枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 的核酸的组合物。

19.一种含有权利要求 18 的核酸的表达载体。

20.一种用权利要求 19 的表达载体转化的宿主细胞。

21.一种包含权利要求 14 的修饰的枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 的组合物，选自清洁组合物、个人护理组合物、和健康护理组合物。

免疫原性减弱的枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 蛋白

本申请是申请日为 2003 年 2 月 26 日、申请号为 03806962.8、发明名称为“免疫原性减弱的枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 蛋白”的发明专利申请的分案申请。

发明领域

本发明提供鉴定枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 蛋白中 CD4⁺ T-细胞表位的方法。本发明还旨在生产改变的肽，当其被整合进野生型枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 蛋白时则产生改变的免疫应答，优选在人体内为弱免疫应答。特别地，本发明提供手段，包括适于减弱 ALCALASE® 酶免疫原性的方法和组合物。

发明背景

用于工业、药物和商业用途的蛋白质渐趋主导并越来越重要。然而，这使得大量个体对这些蛋白质致敏，导致对这些蛋白质的变态反应普遍发生。例如，在特定个体中一些蛋白酶与超敏反应相关联。因此，尽管蛋白酶在工业（例如，在洗衣洗涤剂、化妆品、织物处理，等中）上有用，并且在该领域中为了提供改进的蛋白酶（例如，在典型洗衣条件下能更有效去除污渍的枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 酶变体）已经做了广泛研究，蛋白酶在工业上的使用还是有问题的。

已经做了许多工作来缓解这些问题。已经开发的用于减弱蛋白酶应用免疫原性潜力的策略包括，通过控制和降低车间内携带有经空气传播的蛋白酶的粉尘颗粒和/或气溶胶的浓度来减少潜在接触的改良生产工艺，减少实际来自蛋白酶产品的粉尘或气溶胶的量的改良颗粒成型工艺，以及减少终产品中潜在的变应原性/免疫原性污染物水平的改良回收工艺。然而，相对来说降低蛋白酶自身变应原性/免疫原性的努力却不太成功。作为选择，已经努力尝试封闭蛋白酶上被超敏个体免疫球蛋白 E(IgE)识别的表位(参见, PCT 公开号 No. WO 92/10755; WO 94/10191; WO 96/17929; WO 99/49056; 和 WO 01/07578), 或通过问题蛋白酶上附加聚合物或肽/蛋白质来放大或改变抗原决定

簇的本性。

尽管一些研究已经提供了降低特定蛋白质变应原性/免疫原性的方法以及鉴定一些个体中引起变态反应的表位的方法，但是用于鉴定这些表位的检测方法通常涉及测定事先已经暴露于这些抗原的个体血清中的 IgE 和 IgG。然而，一旦已引发一种 Ig 反应，则致敏就已经产生。因此，需要鉴定产生增强免疫应答的蛋白质，还需要生产产生减弱免疫应答的蛋白质。

发明概述

本发明提供鉴定枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 蛋白中 CD4⁺ T-细胞表位的方法。本发明还旨在生产改变的肽，当其被整合进野生型枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 蛋白时则产生改变的免疫应答，优选在人体内为弱免疫应答。特别地，本发明提供手段，包括适于减弱 ALCALASE®酶的免疫原性的方法和组合物。本发明还旨在生产改变的肽，当其被整合进野生型枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 蛋白序列时再也不能引发 CD4⁺ T-细胞应答或者至少使变态应答减弱。特别地，本发明提供手段，包括适于减弱野生型枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 的免疫原性的方法和组合物。

在一种实施方式中，本发明提供 ALCALASE®酶的 T-细胞表位。这些表位提供在本文所列的各序列（参见，附图 2 和 3）中，包括但不限于第 5 号肽（SEQ ID NO:6）；第 26 号肽（SEQ ID NO:27）；第 37 号肽（SEQ ID NO:38）；第 50 号肽（SEQ ID NO:51）；第 51 号肽（SEQ ID NO:52）以及第 79 号肽（SEQ ID NO:80）。在另一种实施方式中，本发明提供适于置换入 ALCALASE®酶的已鉴定表位的改变序列。

在进一步的实施方式中，本发明提供鉴定 T-细胞表位和 T-细胞非-表位的检测系统，包括但不限于具有将分化的树突细胞与人 CD4⁺和/或 CD8⁺ T-细胞结合以及与目的肽（例如，衍生自 ALCALASE®酶的肽）结合的步骤的方法。更确切地，提供产生免疫应答减弱的目的肽，

其中 T-细胞表位通过以下步骤被识别：(a) 从单一血液来源获得树突细胞溶液和 CD4⁺和/或 CD8⁺ T-细胞溶液；(b) 促进树突细胞分化；(c) 将分化的树突细胞溶液、CD4⁺ T-细胞和/或 CD8⁺ T-细胞溶液与目的肽合并（例如，至少含有 ALCALASE®一部分的肽）；和 (d) 测定步骤 (c) 中 T-细胞的增殖。（参见例如，WO99/53038；和 Strickler 等人，*J. Immunother.*，23:654 - 660 [2000]）。

在发明的另一实施方式中，提供了一系列与 ALCALASE®酶全部或部分对应的肽寡聚体。例如，构建了一个覆盖 ALCALASE®酶相关部分或全部的肽文库。一方面，制备肽的方式是向肽文库中引入重叠，例如，制备与 ALCALASE®酶氨基酸序列第 1~15 位对应的第一个肽、与 ALCALASE®酶氨基酸序列第 4~18 位对应的第二个肽、与 ALCALASE®酶氨基酸序列第 7~21 位对应的第三个肽、与 ALCALASE®酶氨基酸序列第 10~24 位对应的第四个肽，直到产生与整个 ALCALASE®酶分子对应的代表性肽。通过在本文所提供的检测方法中分别分析各肽，有可能精确鉴定由 T-细胞识别的表位的位置。上述例子中，某一特定肽与其相邻肽相比反应更强使得在将表位锚定区限定至三个氨基酸变得容易。确定了这些表位的定位后，有可能在各表位内改变一或更多个氨基酸。之后可将经修饰的表位整合进野生型枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 蛋白主链。在特别优选的实施方式中，得到的修饰枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 蛋白产生不同的 T-细胞应答，优选为与野生型蛋白产生的 T-细胞应答相比减弱的 T-细胞应答。此外，本发明提供鉴定天然具有令人满意的低 T-细胞表位效力并能以天然产生形式进行利用的蛋白质的方法。

本领域已知的各种体外和体内检测方法可用于确定根据本发明获得的修饰蛋白质的减弱的免疫应答。体内检测包括但不限于 HLA II 类应答，更确切的是 HLA-DR3/DQ2 小鼠 T-细胞应答。适宜的体外检测包括但不限于人外周血单核细胞 (PBMC) 检测（参见例如，Herman 等人，*J. Immunol.*，163:6275-6282 [1999]；Sonderstrup 等人，*Immunol. Rev.*，172: 335-343 [1999]；Taneja 和 David，*Immunol.*

Rev., 169:67-79 [1999]; Taurog 等人, Immunol. Rev. 169:209 -223 [1999]; Cosgrove, 等人, Cell 66:1051-1066 [1991]; 和 Grusby 等人, Proc. Natl. Acad. Sci., 90:3913-3917 [1993])。

本发明进一步提供免疫原性减弱的修饰的枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 组合物。特别是, 本发明提供 ALCALASE®酶组合物, 其中含有如本文所述可以降低针对 ALCALASE®酶的免疫应答的表位。

本发明还提供鉴定微生物枯草杆菌蛋白酶的至少一个 T-细胞表位的方法, 包括步骤: (i) 从单一人血液来源获得树突细胞溶液和原初 CD4+和/或 CD8+ T-细胞溶液; (ii) 分化树突细胞以产生分化的树突细胞溶液; (iii) 将分化的树突细胞和原初 CD4+和/或 CD8+ T-细胞溶液与枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 肽片段合并; 和 (iv) 测定步骤 (iii) 中 T-细胞的增殖。在一些优选实施方式中, 微生物枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 来自芽孢杆菌 (*Bacillus*) 属的成员。在特别优选的实施方式中, 芽孢杆菌选自枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*)、地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*)、迟缓芽孢杆菌 (*B. lentus*)、短芽孢杆菌 (*B. brevis*)、嗜热脂肪芽孢杆菌 (*B. stearothermophilus*)、*B. alkalophilus*、解淀粉芽孢杆菌 (*B. amyloliquefaciens*)、*B. clausii*、*B. halodurans*、巨大芽孢杆菌 (*B. megaterium*)、凝结芽孢杆菌 (*B. coagulans*)、环状芽孢杆菌 (*B. circulans*)、灿烂芽孢杆菌 (*B. lautus*)、和苏云金芽孢杆菌 (*B. thuringiensis*)。在另一种可选择的优选实施方式中, 微生物枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 含有至少一部分 SEQ ID NO:1 所示序列。

本发明进一步提供减弱微生物枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 免疫原性的方法, 包括步骤: (a) 通过步骤(i)和(ii)来鉴定蛋白质中至少一个 T-细胞表位: (i) 将粘着的单核细胞衍生的树突细胞与含有 T-细胞表位的至少一种肽接触, 其中树突细胞已通过在外暴露于至少一种细胞因子而分化; 以及 (ii) 将树突细胞和肽与原初 T-细胞接触, 其中原初 T-细胞与粘着的单核细胞衍生的树突细胞获自同一来源, 且由此 T-细胞在对肽的应答中增殖; 和 (b) 修饰枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg

以中和 T-细胞表位从而产生变体蛋白，这样变体蛋白质诱导低于原初 T-细胞基线增殖或基本上与基线增殖相等的增殖。在一些优选实施方式中，微生物枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 衍生自芽孢杆菌属成员。在特别优选的实施方式中，芽孢杆菌选自枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、迟缓芽孢杆菌、短芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、*B. alkalophilus*、解淀粉芽孢杆菌、*B. clausii*、*B. halodurans*、巨大芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌、环状芽孢杆菌、灿烂芽孢杆菌、和苏云金芽孢杆菌。在另一种可选择的优选实施方式中，微生物枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 至少含有部分 SEQ ID NO:1 所示序列。在一些实施方式中，通过用来自微生物枯草杆菌蛋白酶同源物的相似序列置换 T-细胞表位的氨基酸序列来修饰微生物枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 表位，其中置换本质上模拟形成 T-细胞表位的三级结构。在另一可选的实施方式中，通过改变选自 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:90、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:30、和 SEQ ID NO:40 的至少一个表位来修饰微生物枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg。在更进一步的实施方式中，通过置换氨基酸序列中与表位中至少一个残基对应的残基来修饰表位。在另一附加实施方式中，通过删除氨基酸序列中与表位中至少一个残基对应的残基来修饰表位。在另一可选的实施方式中，通过向至少一个表位中添加氨基酸来修饰表位。

本发明还提供修饰的枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 酶（即，枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 酶变体）。在一些优选实施方式中，这些枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 酶变体在至少一个表位含有至少一个改变，这些表位含有选自 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:90、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:30、和 SEQ ID NO:40 的氨基酸序列。事实上，本发明提供无数枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 酶变体。在特别优选的实施方式中，这些变体酶与野生型枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 酶相比呈现减弱的免疫原性/变应原性。这些变体酶可用在从个人/消费者护理物品到工业生产和用途的大量产品和方法中。

附图简述

附图 1 提供在 ALCALASE® 酶中发现的枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 的成熟蛋白序列 (SEQ ID NO:1)。该附图中, 第 106 位的成熟多肽起点以加有下划线的残基表示 (AQTVP)。

附图 2 提供分别对应于 SEQ ID NO:2~89 的并且根据序列 SEQ ID NO:1 合成的第 1~88 号肽的氨基酸序列。

附图 3 提供附图 2 中所示肽的检测结果。

发明详述

本发明提供鉴定枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 蛋白中 CD4⁺ T-细胞表位的方法。本发明还旨在生产改变的肽, 当其被整合进野生型枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 蛋白时则产生改变的免疫应答, 优选在人体内为弱免疫应答。特别地, 本发明提供手段, 包括适于减弱 ALCALASE® 酶的免疫原性的方法和组合物。本发明还旨在生产改变的肽, 当其被整合进野生型枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 蛋白序列时再也不能引发 CD4⁺ T-细胞应答或者至少使变态应答减弱。特别地, 本发明提供手段, 包括适于减弱野生型枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 的免疫原性的方法和组合物。

定义

若本文中另有定义, 则本文中所使用的所有科技术语具有与本发明有关领域的普通技术人员通常所理解相同的含义。例如, Singleton 和 Sainsbury, *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology*, 第二版, John Wiley 和 Sons, NY (1994); 以及 Hale 和 Marham, *The Harper Collins Dictionary of Biology*, Harper Perennial, NY (1991) 向本领域技术人员提供了本发明所使用许多术语的一般字典。尽管任何与本发明所述类似或相同的方法和材料可用于本发明的实践, 本文描述了优选的方法和材料。因此, 以下马上要定义的术语通过参考整

个说明书将得到更充分的描述。同时，如本文中所使用的，单数“a”、“an”以及“the”包括复数含义，除非上下文中已经清楚的指明。

如本文所使用的，“芽孢杆菌属”包括本领域技术人员已知的所有成员，包括但不限于枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、迟缓芽孢杆菌、短芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、*B. alkalophilus*、解淀粉芽孢杆菌、*B. clausii*、*B. halodurans*、巨大芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌、环状芽孢杆菌、灿烂芽孢杆菌、和苏云金芽孢杆菌。已知芽孢杆菌属不断进行着分类学上的改编。因此，该属将可能包括重新分类的种，包括但不限于，例如嗜热脂肪芽孢杆菌这样的生物——其现在被命名“*Geobacillus stearothermophilus*”。在有氧条件下产生抗性内生孢子是芽孢杆菌属的定义特征，尽管该特征也被用于近来命名的脂环酸杆菌属(*Alicyclobacillus*)、双芽孢杆菌属(*Amphibacillus*)、*Aneurinibacillus*、*Anoxybacillus*、短芽孢杆菌属(*Brevibacillus*)、*Filobacillus*、*Gracilibacillus*、*Halobacillus*、*Paenibacillus*、*Salibacillus*、热杆菌属(*Thermobacillus*)、*Ureibacillus*、和 *Virgibacillus*。

本文所使用的术语“野生型枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg”包括：i) 熟知的枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 蛋白，例如可从 Novo 商业获得的 ALCALASE®酶 (SEQ ID NO:1)；可从 Genencor 商业获得的 MAXATASE®酶；和可从 Kali-Chemie 商业获得的 OPTIMASE®酶；ii) 具有与 ALCALASE®相似的催化活性、以及与 SEQ ID NO:1 至少大约 80%，85%，90%，95%，97%，98%或 99%氨基酸序列同一性的枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 蛋白，且优选具有与 SEQ ID NO:1 至少 90%的氨基酸同一性；和 iii) 枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 蛋白变体。

本文所使用的术语“ALCALASE®”是指丝氨酸蛋白酶，即源自 SwissProt 登记号为 P00780 的地衣芽孢杆菌的枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg。这个蛋白质具有 379 个氨基酸残基。前蛋白包括 105 个氨基酸残基，成熟蛋白包括 274 个氨基酸残基 (参见，附图 1, SEQ ID

NO:1; 以及参见, Jacobs 等人, *Nucleic Acids Res.*, 13: 8913–8926 [1985]; 及 Smith 等人, *J. Biol. Chem.*, 243: 2184–2191 [1968])。

如本文所使用的, 术语“修饰的野生型枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg”、“修饰的 ALCALASE®”和“修饰的变体”是指其中至少一个重要的野生型枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 和特别是 ALCALASE®的 T-细胞表位已被改变的蛋白质。

如本文所使用的, “野生型”和“天然”蛋白质是那些在自然界中发现的蛋白质。术语“野生型序列”和“野生型基因”在本文中可互换使用, 指天然的或在宿主细胞中自然产生的序列。在一些实施方式中, 野生型序列是指作为蛋白质工程计划起点的目的序列。可通过本领域技术人员公知的技术获得编码天然出现(即, 前体)蛋白质的基因。这些方法通常包括合成具有目的蛋白质编码区推定序列的标记探针, 从表达该蛋白质的生物制备基因组文库, 和通过探针杂交从文库中筛选目的基因。之后对阳性杂交克隆进行作图和测序。

“重组体”、“重组枯草杆菌蛋白酶”和“重组蛋白酶”是指这样一种蛋白质、枯草杆菌蛋白酶或蛋白酶, 其中编码蛋白质、枯草杆菌蛋白酶或蛋白酶的 DNA 序列被修饰以产生在天然产生的氨基酸序列中编码取代、缺失或插入一或多个氨基酸的 DNA 序列变体(或突变体)。适宜的可以产生如此修饰、并可与本文中公开的那些方法组合的方法, 包括但不限于那些公开于 US 专利 4 760 025 (US RE 34 606)、US 专利 5 204 015 和 US 专利 5 185 258 的方法, 所有这些专利引入本文作为参考。

“非-人枯草杆菌蛋白酶”以及编码它们的 DNA 序列获自许多原核和真核生物。适宜的原核生物例子包括革兰氏阴性生物(例如, 大肠杆菌 (*E. coli*) 和假单胞菌属物种 (*Pseudomonas sp.*)), 以及革兰氏阳性细菌(例如, 微球菌 (*Micrococcus sp.*) 和芽孢杆菌 (*Bacillus sp.*))。可以从中获得枯草杆菌蛋白酶及其基因的真核生物例子包括真菌, 例如啤酒糖酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 和曲霉属物种 (*Aspergillus sp.*)。

本文所使用的术语“样品”以其最宽泛的含义使用。然而，在优选实施方式中，该术语用作指含有用于分析、鉴定、修饰、和/或其它肽进行比较的肽（例如，肽组（pepset）中的含有目的蛋白质序列的肽）的样品（例如，等分样品）。因此，在大多数情况下，该术语用于指包括目的蛋白质或肽的材料。

如本文所使用的，“背景水平”和“背景应答”指任一测试蛋白质数据组中针对任一给定肽的应答者的平均百分数。通过对该组中所有肽的应答者的百分数取平均值来测定该值。例如，3%的背景应答表示，当对 100 名供体进行测试时，对一个数据组中的任一肽而言平均将有 3 名阳性（SI 大于 2.95）应答。

如本文所使用的，“抗原呈递细胞”（“APC”）指免疫系统中在其表面呈递抗原的细胞，由此抗原可被 T-细胞表面的受体识别。抗原呈递细胞包括但不限于树突细胞、交错突细胞、激活的 B-细胞和巨噬细胞。

如本文所使用的，术语“T 淋巴细胞”和“T-细胞”，包括 T 淋巴细胞系中从 T-细胞前体（包括未发生 T 细胞受体基因重排的 Thy1 阳性细胞）到成熟 T 细胞（即，对 CD4 或 CD8 呈现单一阳性，表面 TCR 阳性细胞）的任何细胞。

如本文所使用的，“CD4⁺ T-细胞”和“CD4 T-细胞”指辅助 T-细胞，而“CD8⁺ T-细胞”和“CD8 T-细胞”指细胞毒性 T-细胞。

本文所使用的“T-细胞增殖”指在有或无抗原存在下、与抗原呈递细胞共培养期间产生的 T-细胞数量。

本文所使用的“基线 T-细胞增殖”，指在无肽或蛋白质抗原存在时在个体中正常观测到的对抗原呈递细胞的应答中 T-细胞增殖的程度。为了本文的目的，基线 T-细胞增殖水平以各个体每样品为基础定为在无抗原存在时对抗原呈递细胞产生的应答中 T-细胞的增殖。

如本文所使用的，“T-细胞表位”是指，在引发对含有该抗原（即，免疫原）的肽的免疫原性应答中被 T-细胞受体识别的肽或蛋白质特征。尽管无意将本发明限制于任何特定的机制，通常相信 T-细胞对 T-细胞

表位的识别是通过这样一种机制：其中 T-细胞识别抗原的肽片段，所述肽片段结合于由抗原呈递细胞表达的 I 类或 II 类 MHC (即, HLA) 分子 (参见例如, Moeller, Immunol. Rev. , 98:187 [1987])。

如本文所使用的, “改变的 T-细胞表位”指氨基酸序列不同于前体肽或目的肽的表位, 这样变体目的肽在人或另一动物中产生不同的免疫应答。预期改变的免疫应答包括改变的免疫原性和/或变应原性(即, 抑或增强抑或减弱的整体免疫原性应答)。在一些实施方式中, 改变的 T-细胞表位含有氨基酸的取代和/或缺失, 该氨基酸选自已鉴定的表位中的那些残基。在另一可选的实施方式中, 改变的 T-细胞表位在表位中含有一或多个残基的添加。

如本文所使用的, “弱显著的 T-细胞表位”指这样的表位, 其中在所测试的供体库中其应答率大于背景应答率, 但低于三倍的背景应答率。

如本文所使用的, 术语“B 淋巴细胞”和“B-细胞”包括 B-细胞系中从 B-细胞前体, 例如前 B-细胞 (已开始重排 Ig 重链基因的 B220⁺细胞), 到成熟 B-细胞和浆细胞的任何细胞。

如本文所使用的, “B-细胞增殖”是指在有或无抗原存在下, 与抗原呈递细胞培养期间产生的 B-细胞的数量。

如本文所使用的, “基线 B-细胞增殖”, 指在无肽或蛋白质抗原存在时在个体中正常观测到的对抗原呈递细胞的应答中 B-细胞增殖的程度。为了本文的目的, 基线 B-细胞增殖水平以各个体每样品为基础定为在无抗原存在时 B-细胞的增殖。

如本文所使用的, “B-细胞表位”是指, 在对含有该抗原 (即, 免疫原) 的肽的免疫原性应答中被 B-细胞受体识别的肽或蛋白质特征。

如本文所使用的, “改变的 B-细胞表位”指与前体肽或目的肽不同的表位氨基酸序列, 这样变体目的肽在人或另一动物中产生不同的 (即, 改变的) 免疫原性应答。预期改变的免疫原性应答包括改变的免疫原性和/或变应原性 (即, 抑或增强抑或减弱的整体免疫原性应答)。在一些实施方式中, 改变的 B-细胞表位含有氨基酸的取代和/

或缺失，该氨基酸选自已鉴定的表位中的那些残基。在另一可选的实施方式中，改变的 B-细胞表位在表位中含有一或更多个残基的添加。

如本文所使用的，术语“显著表位”是指这样的表位（即，T-细胞或 B-细胞表位），其中所测试个体库中的应答率等于或大于约三倍的背景应答率。

本文所使用的“改变的免疫原性应答”是指增强或减弱的免疫原性应答。当蛋白质和肽引起比亲体（例如，前体）蛋白质或肽（例如，目的蛋白质）更强的 T-细胞和/或 B-细胞应答时，它们表现“增强的免疫原性应答”。这一增强应答的最终结果是增强的针对变体蛋白或肽的抗体应答。当蛋白质和肽引起比亲体（例如，前体）蛋白质或肽更弱的 T-细胞和/或 B-细胞应答时，它们表现“减弱的免疫原性应答”。在优选实施方式中，这一降低的应答的最终结果是减弱针对变体蛋白质或肽的抗体应答。在一些优选实施方式中，亲体蛋白质是野生型蛋白质或肽。

如本文所使用的，“体内免疫原性减弱”是指通过检测判定的至少部分在活体生物内进行的（例如，要求使用活动物）免疫应答的减弱。典型的“体内”检测包括在小鼠模型中测定改变的免疫原性应答。

如本文所使用的，“体外免疫原性减弱”是指通过在活体生物外的人工环境下进行的（即，不需要使用活动物）检测判定的免疫原性应答的减弱。典型的体外测试包括人外周血单核细胞对目的肽的增殖应答。

如本文所使用的，“目的蛋白质”是指将用于分析、鉴定和/或修饰的蛋白质（例如，蛋白酶）。天然存在的，以及重组蛋白质可用于本发明。当然，任何想要表征和/或调节人（或其它动物）对其的免疫应答的蛋白质可用于本发明。在一些实施方式中，包括激素、细胞因子、抗体、酶、结构蛋白和结合蛋白的蛋白质可用于本发明。在一些实施方式中，激素，包括但不限于胰岛素、促红细胞生成素（EPO）、血小板生成素（TPO）和黄体生成素（LH）可用于本发明。在进一步的实施方式中，细胞因子，包括但不限于干扰素（例如，IFN- α 和 IFN- β ）、

白介素(例如, IL-1 ~ IL-15)、肿瘤坏死因子(例如, TNF- α 和 TNF- β)、和 GM-CSF 可用于本发明。在其它的实施方式中, 抗体(即, 免疫球蛋白), 包括但不限于任何类别的人和人源化抗体、抗体片段(例如, 单链抗体)可用于本发明。仍在其它实施方式中, 结构蛋白质, 包括但不限于食物变应原(例如, Ber e 1 [巴西坚果变应原]和 Ara H 1 [花生变应原])可用于本发明。在另外的实施方式中, 蛋白质是工业和/或药物酶。在一些实施方式中, 优选的酶类别包括但不限于蛋白酶、纤维素酶、脂酶、酯酶、淀粉酶、苯酚氧化酶、氧化酶、通透酶、支链淀粉酶、异构酶、激酶、磷酸酶、内酰胺酶和还原酶。

如本文所使用的, “蛋白质”是指任何含有氨基酸并被本领域技术人员认作蛋白质的组合物。术语“蛋白质”、“肽”和“多肽”在本文中可互换使用。氨基酸可以用它们的全名(例如, 丙氨酸)或公认的单字母(例如, A)、或三字母(例如, ala)缩写指代。其中肽是蛋白质的一部分, 本领域技术人员理解该术语在上下文中的使用。术语“蛋白质”包括成熟形式的蛋白质, 以及相关蛋白质的-原(pro)和前-原(prepro)形式。蛋白质的前-原形式包括具有可操作性连接于蛋白质氨基末端的原序列(prosequence)、和可操作性连接于原序列氨基末端的“前-”或“信号”序列的蛋白质成熟形式。在优选实施方式中, 蛋白质是蛋白酶。在一些特定的优选实施方式中, 该蛋白酶是枯草杆菌蛋白酶, 而在另一可选的优选实施方式, 该蛋白酶是枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg。

如本文所使用的, “野生型”和“天然”蛋白质是那些在自然界中发现的蛋白质。术语“野生型序列”和“野生型基因”在本文中可互换使用, 指天然的或在宿主细胞中自然产生的序列。在一些实施方式中, 野生型序列是指作为蛋白质工程计划起点的目的序列。

如本文所使用的, “蛋白酶”指天然存在的蛋白酶, 以及重组蛋白酶。蛋白酶是羧基水解酶, 其一般切割蛋白质或肽的肽键。天然存在的蛋白酶包括但不限于, 如 α -氨基肽水解酶、肽基氨基酸水解酶、酰胺基水解酶、丝氨酸羧肽酶、金属羧肽酶、巯基蛋白酶、羧基蛋白

酶和金属蛋白酶这样的例子。也包括丝氨酸、金属、巯基和酸蛋白酶，以及内切和外切-蛋白酶。当然，在一些优选实施方式中，可以使用丝氨酸蛋白酶例如胰凝乳蛋白酶和枯草杆菌蛋白酶。这两个丝氨酸蛋白酶都具有一个包括天冬氨酸、组氨酸和丝氨酸的催化三联体。在枯草杆菌蛋白酶中，这些氨基酸从羧基端读起的相对顺序是天冬氨酸-组氨酸-丝氨酸，而在胰凝乳蛋白酶中，这些氨基酸从羧基端读起的相对顺序是组氨酸-天冬氨酸-丝氨酸。尽管枯草杆菌蛋白酶典型源自细菌、真菌或酵母，本文所使用的“枯草杆菌蛋白酶”是指具有如上述所定义的枯草杆菌蛋白酶催化三联体的丝氨酸蛋白酶。此外，人枯草杆菌蛋白酶是具有枯草杆菌蛋白酶催化活性的人源蛋白质，例如人源蛋白酶的 kexin 家族。枯草杆菌蛋白酶是本领域技术人员熟知的，例如，解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶 (BPN')、迟缓芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶、枯草杆菌枯草杆菌蛋白酶、地衣芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶(参见例如, US 专利 No. 4 760 025 (RE 34 606)、US 专利 No. 5 204 015、US 专利 No. 5 185 258、欧洲专利 No. 0 328 299、和 WO89/06279)。在本发明的一些优选实施方式中，该术语用于指枯草杆菌蛋白酶，而在特别优选的实施方式中，该术语是指 ALCALASE®酶。

如本文所使用的，“蛋白质”是指任何含有氨基酸并被本领域技术人员认作蛋白质的组合物。术语“蛋白质”、“肽”和“多肽”在本文中可互换使用。其中肽是蛋白质的一部分，本领域技术人员理解该术语在上下文中的使用。术语“蛋白质”包括成熟形式的蛋白质，以及相关蛋白质的-原和前-原形式。蛋白质的前-原形式包括具有可操作性连接于蛋白质氨基末端的原序列、和可操作性连接于原序列氨基末端的“前-”或“信号”序列的蛋白质成熟形式。如本文所使用的，功能相似的蛋白质被视作“相关的蛋白质”。在一些实施方式中，这些蛋白质衍生自不同的属和/或种(例如，枯草芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶和迟缓芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶)，包括生物类别间的差异(例如，细菌枯草杆菌蛋白酶和真菌枯草杆菌蛋白酶)。在另外的实施方式中，相关蛋白质得自同一个种。当然，本发明无意限制任何来源的相关蛋白质。

如本文所使用的，术语“衍生物”指通过同时在 C-和 N-末端或两者之一添加一或更多个氨基酸、在氨基酸序列中一或更多个不同位点取代一或更多个氨基酸、和/或在蛋白质的两个或一个末端或在氨基酸序列中的一或更多个位点缺失一或更多个氨基酸、和/或在氨基酸序列中的一或更多个位点插入一或更多个氨基酸而衍生自前体蛋白质（例如，天然蛋白酶）的蛋白质（例如，蛋白酶）。优选通过修饰编码天然蛋白质的 DNA 序列、将该 DNA 序列转化入宿主细胞、并表达修饰的 DNA 序列以形成衍生的蛋白酶来制备蛋白酶衍生物。

一种相关（及衍生的）蛋白质类型为“变体蛋白质”。在优选实施方式中，变体蛋白与亲体蛋白质以及变体蛋白相互之间的区别仅在于少数几个氨基酸残基。差异氨基酸的数量可以是一个或更多，优选 1、2、3、4、5、10、15、20、30、40、50、或更多个氨基酸残基。在一种优选实施方式中，变体间的差异氨基酸数量介于 1 至 10 之间。在特别优选的实施方式中，相关蛋白质和特定的变体蛋白包含至少 50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、或 99% 的氨基酸序列同一性。此外，本文所使用的相关蛋白质和变体蛋白是指，在突出区域（prominent region）的数量上区别于另一相关蛋白质或亲体蛋白质的蛋白质。例如，在一些实施方式中，变体蛋白具有区别于亲体蛋白质的 1、2、3、4、5、或 10 个相应突出区域。在一种实施方式中，变体的突出相应区域仅产生背景水平的免疫原性应答。

如本文所使用的，“相应”是指在蛋白质或肽中计数位置的残基，或与另一蛋白质或肽中计数位置的残基类似、同源或等同的残基。

如本文所使用的，“相应区域”通常是指在相关蛋白质或亲体蛋白质中的类似位置。

如本文所使用的，术语“类似序列”指蛋白质中提供与目的蛋白质相似功能、三级结构和/或保守残基的序列。在特别优选的实施方式中，类似序列涉及位于表位或其附近的序列。例如，在包含 α 螺旋或 β 折叠结构的表位区域，在类似序列中的氨基酸取代优选保持相同的特定

结构。该术语也指核苷酸序列，以及氨基酸序列。

如本文所使用的，“同源蛋白质”指与目的蛋白质（即，蛋白酶）具有相似催化活性、结构、抗原性、和/或免疫原性应答的蛋白质（例如，蛋白酶）。同源物或目的蛋白质（例如，蛋白酶）不必是进化上相关联的。因此，该术语包括获自不同种的功能相同的蛋白质。在一些优选实施方式中，令人满意的是对与目的蛋白质具有相似三级和/或一级结构的同源物进行鉴定，因为用同源物中的类似部分取代目的蛋白质中的表位不会导致由于该变化而带来的蛋白质破坏。因此，在大多数情况下，非常同源的蛋白质为表位置换提供了最理想的来源。作为选择，寻找给定蛋白质的人类似物是比较有利的。

在优选实施方式中，本文所使用的“同源物”意指与 **ALCALASE®** 酶有相似催化活性、结构和/或用途的酶。在一些优选实施方式中，本发明的 **ALCALASE®** 酶同源物具有与野生型 **ALCALASE®** 酶基本上相似的三级和/或一级结构。显著的 **ALCALASE®** 酶表位可以用来自同源酶的类似片段进行取代。这种类型的取代能减弱由亲体枯草杆菌蛋白酶中的变化所引起的破坏。在大多数情况下，非常同源的蛋白质提供最令人满意的表位置换来源。

如本文所使用的，“同源基因”是指至少一对来自不同、但通常相关物种的基因，它们彼此对应且彼此一致或非常相似。该术语包括通过物种形成（即，新物种的发展）而分离的基因（例如，直向同源基因），以及由遗传复制而分离的基因（例如，平行进化同源基因）。

如本文所使用的，“直向同源物”和“直向同源基因”指不同物种中通过物种形成从共同的祖先基因（即，同源基因）进化而来的基因。典型地，直向同源物在进化过程中保持相同的功能。直向同源物的鉴定可用于在新测序基因组中对基因功能的可靠预测。

如本文所使用的，“平行进化同源物”和“平行进化同源基因”指基因组中通过复制相关联的基因。尽管直向同源物在进化过程中保持相同的功能，平行进化同源物却进化出新功能，尽管一些功能常与最初的功能相关联。平行进化同源基因的例子包括但不限于，编码胰蛋白

酶、胰凝乳蛋白酶、弹性蛋白酶和凝血酶的基因，它们都是丝氨酸蛋白酶并一起出现在同一物种中。

序列间的同源程度可通过本领域公知的适宜方法进行测定（参见例如，Smith 和 Waterman, *Adv. Appl. Math.* , 2:482 [1981]; Needleman 和 Wunsch, *J. Mol. Biol.* , 48:443 [1970]; Pearson 和 Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444 [1988]; programs such as GAP, BESTFIT, FASTA, and TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package (Genetics Computer Group, Madison, WI); 和 Devereux 等人, *Nucl. Acid Res.* , 12:387-395 [1984])。

例如，PILEUP 是一个测定序列同源性水平的有用程序。PILEUP 通过渐进的、成对比对从一组相关序列生成多重序列比对。它还能绘制用于生成该比对的聚类关系 (clustering relationship) 的树形图。PILEUP 使用了 Feng 和 Doolittle 的渐进比对方法的简化形式 (Feng 和 Doolittle, *J. Mol. Evol.* , 35:351-360 [1987])。该方法与 Higgins 和 Sharp 所描述的相似 (Higgins 和 Sharp, *CABIOS* 5:151-153 [1989])。有用的 PILEUP 参数包括默认缺口权重 3.00，默认缺口长度权重 0.10，和加权末端缺口。另一个有用的算法例子是由 Altschul 等人描述的 BLAST 算法 (Altschul 等人, *J. Mol. Biol.* , 215:403-410, [1990]; 和 Karlin 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5787 [1993])。一个特别有用的 BLAST 程序是 WU-BLAST-2 程序 (参见, Altschul 等人, *Meth. Enzymol.* , 266:460-480 [1996])。参数“W”、“T”、和“X”决定比对的敏感度和速度。BLAST 程序默认使用字长 (wordlength, W) 为 11、BLOSUM62 记分阵列 (scoring matrix) (参见, Henikoff 和 Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915 [1989]) 比对 (B) 为 50、期望值 (E) 为 10、M²5、N²-4、和两条链的比较。

如本文所使用的，“核酸序列同一性百分数 (%)”定义为候选序列中与序列中核苷酸残基一致的核苷酸残基百分数。

如本领域已知，本文所使用的术语“杂交”指一条核酸链通过碱基

配对与互补链结合的过程。

如本文所使用的，“最大严谨度”指典型发生于约 $T_m-5^\circ\text{C}$ （比探针 T_m 低 5°C ）时的杂交水平；“高严谨度”指约在 T_m 下 5°C 至 10°C ；“中等严谨度”约在 T_m 下 10°C 至 20°C ；以及“低严谨度”约在 T_m 下 20°C 至 25°C 。正如本领域技术人员所理解的，最大严谨度杂交可用于鉴定或探测相同的多核苷酸序列，而中等或低严谨度杂交可用于鉴定或探测多核苷酸序列同源物。

在上下文中涉及两条核酸或多肽的短语“基本上相似”和“基本上相同”意指含有与参照（即，野生型）序列具有至少 75% 的序列同一性、优选至少 80%、更优选至少 90%、进一步优选 95%、最优选 97%、有时高达 98% 和 99% 的序列同一性的序列的多核苷酸或多肽。可用公知的程序例如 BLAST, ALIGN, 和 CLUSTAL 以及标准参数来测定序列同一性。（参见例如，Altschul, 等人, J. Mol. Biol. 215:403-410 [1990]; Henikoff 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 [1989]; Karin 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873 [1993]; 和 Higgins 等人, Gene 73:237 - 244 [1988]）。执行 BLAST 分析的软件可通过 National Center for Biotechnology Information 公开获得。也可以用 FASTA 搜索数据库（Pearson 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444-2448 [1988]）。

在一些实施方式中，通过测定已用 x-射线结晶学测定了三级结构的前体蛋白质（即，目的蛋白质）在三级结构上的同源水平来定义“等价残基”。等价残基定义为前体蛋白质与另一蛋白质进行比对后其中特定氨基酸残基上的两个或更多个主链原子的原子坐标在 0.13nm 以内且优选在 0.1nm 以内的那些残基。在定向并定位了最佳模型以使得蛋白质中的非氢蛋白质原子的原子坐标发生最大重叠后进行比对。在大多数实施方式中，最佳模型是在可以达到的最高分辨率下给出最低 R 因子试验衍射数据的晶体学模型。

在一些实施方式中，优选修饰是对编码前体酶氨基酸序列的“前体 DNA 序列”进行的，但是也可以通过对前体蛋白质的操纵而进行。在

残基不保守的情况下，对一或更多个氨基酸的取代限于产生变体的置换，该变体具有与自然界中发现的氨基酸序列不对应的氨基酸序列。在残基保守的情况下，这样的取代不应产生天然存在的序列。本发明提供的衍生物进一步包括改变蛋白酶特征的化学修饰。

在一些优选实施方式中，蛋白质基因连接进适宜的表达质粒。之后将克隆的蛋白质基因转化或转染宿主细胞以表达蛋白质基因。质粒可以在宿主中复制，只要它含有质粒复制所必需的公知元件或该质粒被设计成可以整合进宿主染色体中。必需元件是为有效的基因表达提供的（例如，与目的基因可操作性相连的启动子）。在一些实施方式中，这些必需元件可以是基因自己的同源启动子——如果它可以被识别的话（即，被宿主转录）、外源或由蛋白质基因的内源终止子区域提供的转录终止子（真核宿主细胞的多聚腺苷酸化区域）。在一些实施方式中，还包括选择基因，例如抗生素抗性基因，它能使被质粒感染的宿主细胞在含有抗菌剂的培养基中持续培养。

本发明包括具有改变的免疫原性的蛋白酶，其与衍生自所述及的特定微生物菌株的蛋白酶等价。作为“等价”意指，该蛋白酶是由在中等或高严谨条件下能够与具有附图1所示任一序列的多核苷酸杂交的多核苷酸编码的，并仍然保持对人T-细胞的改变的免疫原性应答。作为“等价”意指，该蛋白酶与表位序列和具有该表位的蛋白酶变体（例如，具有修饰的氨基酸序列）具有至少55%、至少65%，至少70%，至少75%，至少80%，至少85%，至少90%，至少95%，至少97%或至少99%的同一性。

如本文所使用的，术语“杂合蛋白酶”和“融合蛋白酶”指从至少两种不同或“亲体”蛋白质工程化而得的蛋白质。在优选实施方式中，这些亲体蛋白质彼此为同源物。例如，在一些实施方式中，优选的杂合蛋白酶或融合蛋白酶包含一种蛋白质的N-末端和该蛋白质的同源物的C-末端。在一些优选实施方式中，两个末端结合以对应于全长的活性蛋白。在另一种可选择的优选实施方式中，同源物基本上相似但不具有相同的T-细胞表位。因此，在一种实施方式中，本发明提供在

C-末端具有一个或更多个 T-细胞表位的目的蛋白酶,但是用在 C-末端具有更弱的 T-细胞表位、或更少或无 T-细胞表位的同源物的 C-末端取代其 C-末端。因而,熟练技术人员理解,通过得以在同源物中鉴定 T-细胞表位,可以形成大量产生不同免疫原性应答的变体。此外,可以理解内部区域以及多于一个同源物可用于产生本发明的变体。

本发明的变体包括蛋白质变体的成熟形式,以及这些蛋白质变体的-原和前-原形式。前-原形式是优选的结构,因为这有利于蛋白质变体的表达、分泌和成熟。

如本文所使用的,“原序列”指结合于蛋白质成熟形式氨基末端部分的氨基酸序列,当将其去除后导致蛋白质“成熟”形式的出现。自然界中发现了许多蛋白水解酶作为翻译后的酶原(proenzyme)产物,并且它们在没有翻译后加工的情况下以这种方式表达。一种产生蛋白质变体例如蛋白酶变体的优选原序列是推定的地衣芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 原序列,尽管其它原序列可用于本发明。

如本文所使用的,“信号序列”和“前导序列”指任何结合于蛋白质 N-末端部分、或蛋白质原 N-末端部分并可能参与蛋白质成熟或原形式的分泌的氨基酸序列。该信号序列的定义是功能性的,意欲包括所有由蛋白质基因 N-末端部分编码、在天然条件下参与蛋白质分泌的完成的氨基酸序列。本发明利用这样的序列来实现本文所述的蛋白质变体的分泌。

如本文所使用的,蛋白质变体的“前-原”形式由以下组成:具有与蛋白质氨基末端可操作性相连的原序列、以及与原序列氨基末端可操作性相连的“前导”或“信号”序列的蛋白质成熟形式。

本文所使用的术语“调控元件”指控制核酸序列表达的某些方面的遗传元件。例如,启动子是促进一段可操作性连接的编码区域转录的调控元件。其它的调控元件包括剪接信号、多聚腺苷酸化信号和终止信号。

如本文所使用的,“表达载体”指含有与能够实现 DNA 在适宜宿主中表达的适宜控制序列可操作性相连的 DNA 序列的 DNA 构建体。

这样的控制序列包括实现转录的启动子、可选的控制如此转录的操纵子序列、编码适宜的 mRNA 核糖体结合位点的序列和控制转录及翻译终止的序列。载体可以是质粒、噬菌体颗粒、或仅仅是潜在的基因组插入物。一旦转化进入适宜的宿主，载体即可独立于宿主基因组进行复制和发挥功能，或在一些例子中可以自己整合进基因组。本说明书中，“质粒”和“载体”有时可以互换使用，因为质粒是当前最常用的载体形式。然而，本发明意图包括已知或将被本领域所知的具有等价功能的其它表达载体形式。

如本文所使用的，“宿主细胞”通常为已用本领域公知的方法（参见例如，US 专利 4 760 025 (RE 34 606)）操作过以使它们不能分泌具有酶促活性的内源蛋白酶的原核或真核宿主。一种表达蛋白质的优选宿主细胞为芽孢杆菌菌株 BG2036，该菌株为具酶促活性的中性蛋白质和碱性蛋白酶（枯草杆菌蛋白酶）缺陷型。菌株 BG2036 的构建详细描述于 US 专利 5 264 366。其它表达蛋白质的宿主细胞包括枯草芽孢杆菌 I168（也描述于 US 专利 4 760 025 (RE 34 606) 和 US 专利 5 264 366），以及任何适宜的芽孢杆菌菌株，包括地衣芽孢杆菌、迟缓芽孢杆菌、和其它芽孢杆菌等种内的菌株。

将用本领域已知的重组 DNA 技术构建的载体转化或转染进宿主细胞。转化的宿主细胞能够复制编码变体蛋白质的载体或者表达想要的蛋白质变体。若载体编码蛋白质变体的前-或前-原形式，则这样的变体被表达时通常从宿主细胞分泌到宿主细胞培养基中。

上下文中涉及将核酸序列插入细胞的术语“被导入”意指，转化、转导或转染。转化方法包括原生质体转化、氯化钙沉淀、电穿孔、裸露 DNA 和类似的本领域已知方法。（参见，Chang 和 Cohen (1979) *Mol. Gen. Genet.* 168:111 - 115; Smith 等人, (1986) *Appl. and Env. Microbiol.* 51:634; 以及 Ferrari 等人的综述文章, (1989) *Genetics*, pages 57 - 72 in *Bacillus* ed. C. Harwood, Plenum Publishing Corporation)。

在涉及蛋白酶的实施方式中，可以通过检测蛋白酶与各种商业底

物，包括但不限于酪蛋白、角蛋白、弹性蛋白和胶原蛋白，的相互作用来测定蛋白酶变体的活性并与目的蛋白酶相比较。当然，可用本领域已知的任何适宜方法测定蛋白酶活性。测定蛋白酶活性的典型检测方法包括但不限于琥珀酰-Ala-Ala-Pro-Phe-对硝基苯胺(SAAPFPNA) (引用)检测;和 2,4,6-三硝基苯磺酸钠盐(TNBS)检测。在 SAAPFPNA 检测中，蛋白酶切割肽与对硝基苯胺间的键从而产生在 405nm 处吸收的可见黄色。在 TNBS 颜色反应方法中，检测使底物成为带有自由氨基基团的多肽的酶水解。这些氨基基团与 TNBS 反应形成黄色复合物。这样，反应的颜色越深，测定的活性越强。可以用本领域公知的各种分析仪或分光光度计测定该黄颜色。

可用本领域技术人员公知的方法测定蛋白酶变体的其它特征。代表性特征包括但不限于温度稳定性、碱稳定性、和特定蛋白酶在不同的底物或缓冲液或产品剂型中的稳定性。

结合本文中公开的酶稳定性检测程序，可以鉴定经随机突变获得的突变体，它们体现出在保持酶促活性的同时或者增强或者降低的碱或温度稳定性。

可用已知方法或本文描述的方法测定碱稳定性。根据与前体蛋白质相比突变体酶促活性半衰期至少约 5%或更大的增强或降低（在大多数实施方式中，优选为增强）来证明碱稳定性的显著改变。

可用已知方法或本文描述的方法测定温度稳定性。根据与前体蛋白质相比当暴露于相对高温和中性 pH 时突变体催化活性半衰期至少约 5%或更大的增强或降低（在大多数实施方式中，优选为增强）来证明碱稳定性的显著改变。

如本文所使用的，“个人护理产品”意指用于清洁毛发、皮肤、头皮、牙齿的产品，包括但不限于洗发水、护肤液、淋浴胶(shower gels)、局部保湿物(topical moisturizers)、牙膏、和/或其它局部清洁剂。在一些特定的优选实施方式中，这些产品用于人类，尽管在其它实施方式中，这些产品也可用于非人动物（例如，兽医用途）。

如本文所使用的，“护肤组合物”意指局部应用以清洁和/或保湿皮

肤的产品。这样的组合物包括但不限于保湿沐浴液、淋浴胶、护肤液、保湿面霜、卸妆品（make up-removers）和洗液。

如本文所使用的，“清洁组合物”是可用于从基质，例如织物、器皿、隐形眼镜、其它固体基质、毛发（洗发水）、皮肤（肥皂和面霜）、牙齿（漱口水、牙膏）等，上去除不想要的化合物的组合物。

本文所使用的术语“清洁组合物材料”指，根据想要的特定清洁组合物类型以及产品形式（例如，液体、颗粒、喷剂组合物）所选择的任何液体、固体或气体材料，该材料与组合物中所用的蛋白酶相容。考虑所要清洁的表面、物件或织物、以及根据使用过程中（例如，洗涤去污剂使用过程中）的清洁条件而想要的组合物形式，很容易对清洁组合物材料作出特定的选择。

本文所使用的术语“硬质表面清洁组合物”指用于清洁固体表面例如地板、墙壁、浴室瓷砖、以及类似物品的去污剂组合物。这样的组合物可以任何形式提供，包括但不限于固体、液体、乳状液，等。

如本文所使用的，“餐具洗涤组合物”指用于清洁餐具的所有形式的组合物，包括但不限于，颗粒和液体形式。

如本文所使用的，“织物清洁组合物”指用于清洁织物的所有形式的去污剂组合物，包括但不限于颗粒、液体和条状形式。如本文所使用的，“织物”指任何纺织材料。

如本文所使用的，术语“相容”意指，清洁组合物材料不会减弱蛋白酶的蛋白水解酶活性以至于蛋白酶在通常的使用状况下失效。特定的清洁组合物材料在下文中举例说明。

如本文所使用的，“有效量的蛋白酶”指达到特定用途（例如，个人护理产品、清洁组合物，等）中所必需的酶活性所必需的蛋白酶（例如，枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg）的量。这样的有效量是本领域普通技术人员易于确定的，并且基于许多因素，例如所使用的特定的酶、清洁用途、清洁组合物的特定组成、以及是否需要液体或干（例如，颗粒、条状）组合物，及类似因素。

如本文所使用的，“非织物清洁组合物”包括固体表面清洁组合物、餐具洗涤组合物、口腔清洁组合物、假牙清洁组合物、和个人清洁组合物。

如本文所使用的，“口腔清洁组合物”指洁齿剂（dentifrices）、牙膏、牙胶、牙粉、漱口水、口腔喷雾剂、口胶、口香糖、糖锭、小袋、药片、生物胶、预防药膏、牙科处理液，及其类似物。

如本文所使用的，“药学上可接受的”意指该术语描述的药品、药剂和/或惰性组分适于与人或其它动物组织接触使用而不产生过多毒性、不相容、不稳定、刺激、变态反应及其类似，并且具有相称的合理利益/风险比率。

本发明的许多蛋白质变体能用于配制各种去污剂组合物。许多已知化合物是适宜在含有本发明蛋白质突变体的组合物中使用的表面活性剂。这些化合物包括非离子、阴离子、阳离子、阴离子或两性离子去污剂（参见例如，US 专利 No 4 404 128 和 US 专利 No. 4 261 868）。一种适宜的去污剂配方描述于 US 专利 5 204 015。本领域人员熟悉可用于清洁组合物的不同剂型。除典型的清洁组合物之外，易于理解本发明的蛋白质变体可用于天然或野生型蛋白质所使用的任何目的中。因此，这些变体可用于，例如，条状或液体肥皂用途、器皿护理配方、表面清洁用途、隐形眼镜清洁液或产品、肽水解、废物处理、纺织用途，用作蛋白质生产中的融合-切割酶，等。当然，本发明的变体无意限制于任何特定的用途。例如，除降低的变应原性/免疫原性外，本发明的变体可包括在去污剂组合物中的增强的性能（与前体相比而言）。如本文所使用的，在去污剂中增强的性能定义为，在标准洗涤循环后用通常的评估所测定的，使对特定酶敏感的污渍（例如，草汁或血液）更强力的清除。

蛋白质，尤其是本发明的蛋白酶可配制成 pH 介于 6.5 和 12.0 之间、重量含量约为 0.01 至 5%（优选 0.1%-0.5%）的粉末或液体去污剂。在一些实施方式中，这些去污剂清洁组合物进一步包括其它酶，例如蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶、脂酶或内切糖苷酶、以及助洗剂和稳定

剂。

向常规的清洁组合物添加蛋白质并不会造成特别的用途限制。换句话说，任何适于去污剂的温度和 pH 也适于本发明组合物，只要该 pH 在上述范围内，和温度低于所述的蛋白质变性温度。此外，本发明的蛋白质可以用于不含去污剂的清洁组合物，也可以抑或单独抑或与助洗剂和稳定剂组合使用。

在一种实施方式中，本发明提供包括本发明变体蛋白的处理纺织品的组合物。该组合物可用于处理例如丝或毛织品（参见例如，US 再公开专利 No. 216 034；欧洲专利 No. 134 267；US 专利 No. 4 533 359；和欧洲专利 No. 344 259）。可为这些应用通过本领域熟知的方法根据蛋白水解活性和它们的稳定性筛选这些变体。

如上所示，本发明的蛋白质与由它们的前体 DNA 编码的天然蛋白质相比表现修饰的免疫原性应答（例如，抗原性和/或免疫原性）。在一些优选实施方式中，蛋白质（例如，蛋白酶）表现减弱的变应原性/免疫原性。本领域技术人员易于认识到，本发明蛋白酶的用途大部分可根据蛋白质的免疫特性决定。例如，表现减弱的免疫原性应答的蛋白酶可用于清洁组合物中。有效量的本文所述一或更多种蛋白酶变体可用在用于清洁需要去除蛋白质污渍的大量表面的组合物中。这样的清洁组合物包括用于清洁硬质表面的去污剂组合物、用于清洁织物的去污剂组合物、器皿洗涤组合物、口腔清洁组合物、和假牙清洁组合物。

根据本发明方法分级的一或更多种变应原性/免疫原性减弱的有效量的相关和/或变体蛋白可用于各种应用于角质材料例如指甲和毛发的组合物，包括但不限于那些用作毛发喷雾组合物、洗发水和/或调理组合物、应用于毛发生长调节目的的组合物、和用于头发和头皮以治疗皮脂溢、皮炎和/或头皮屑的组合物。

本文描述的有效量的一或更多种蛋白酶变体可用于适于局部应用于皮肤和毛发的组合物中。这些组合物可以是霜剂、洗液、胶体及其类似，也可以配制成水性组合物或可配制成连续水相中的一或更多种

油相的乳液。

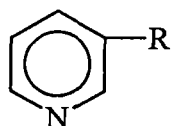
此外，变应原性/免疫原性减弱的相关和/或变体蛋白可用于其它用途，包括药物用途、药物递送用途，以及其它健康护理应用。

护肤活性剂

在一些实施方式中，本发明提供的组合物包括护肤活性剂，其水平为约 0.1% 至约 20% 重量比，优选约 1% 至约 10% 重量比，更优选约 2% 至约 8% 重量比。本文中适于使用的护肤活性剂的非限制性实施例包括维生素 B₃ 成分、泛酰醇、维生素 E、醋酸维生素 E、视黄醇、丙酸视黄酯、棕榈酸视黄酯、视黄酸、维生素 C、可可碱、 α -羟酸、法尼醇、植三醇 (phytatriol)、水杨酸、palmityl peptide-3 及其混合物。

B3 化合物

如本文所使用的，“维生素 B₃ 化合物”意指具有以下分子式的化合物：



其中 R 为 -CONH₂ (即, 烟酰胺)、-COOH (即, 烟酸) 或 -CH₂OH (即, 烟酰醇 (nicotinyl alcohol)); 及其衍生物; 以及前述任一的盐。前述维生素 B₃ 化合物衍生物的示范性例子包括烟酸酯, 包括非血管扩张性的烟酸酯、烟酰氨基酸、羧酸的烟酰醇酯、烟酸 N-氧化物和烟酰胺 N-氧化物。

适宜的烟酸酯包括 C₁ - C₂₂ 醇, 优选 C₁ - C₁₆ 醇, 更优选 C₁ - C₆ 醇的烟酸酯。醇类为适宜的直链或支链的、环形或非环形的、饱和或不饱和的 (包括芳香族)、以及取代或非取代的。酯类优选为非血管扩张性的。如本文所使用的, “非血管扩张性的”意指该酯类在目标组合物中被应用于皮肤后通常不出现明显的发红反应 (即, 一般群体中的大多数不会出现明显的发红反应, 尽管这样的化合物可能会导致肉眼不可见的血管扩张)。非血管扩张性的烟酸酯包括生育酚烟酸酯

(tocopherol nicotinate) 和肌醇六烟酸酯 (inositol hexanicotinate); 优选为生育酚烟酸酯。WO 98/22085 中给出了更加完整的对维生素 B₃ 化合物的说明。优选的维生素 B₃ 化合物是烟酰胺和生育酚烟酸酯。

类视黄醇

另一种适宜的护肤活性剂是类视黄醇。如本文所使用的,“类视黄醇”包括所有在皮肤中具有维生素 A 生物活性的自然的和/或合成的维生素 A 类似物或类似视黄醇的化合物、以及这些化合物的几何异构体和立体异构体。当本文的组合物中包括类视黄醇时,它典型含有约 0.005% 至约 2%、更优选 0.01% 至约 2% 类视黄醇。视黄醇的优选使用量为约 0.01% 至约 0.15%; 视黄醇酯的优选使用量为自约 0.01% 至约 2% (例如, 约 1%)。

类视黄醇优选为视黄醇、视黄醇酯 (例如, 视黄醇的 C₂-C₂₂ 烷基酯, 包括棕榈酸视黄酯、乙酸视黄酯、丙酸视黄酯)、视黄醛、和/或视黄酸 (包括所有反式视黄酸和/或 13-顺式-视黄酸), 更优选为除视黄醇酸以外的类视黄醇。这些化合物是本领域熟知的, 而且可从许多商业途径获得 (例如, Sigma Chemical Company (St.Louis, MO), 和 Boehringer Mannheim (Indianapolis, IN))。优选的类视黄醇包括视黄醇、棕榈酸视黄酯、乙酸视黄酯、丙酸视黄酯、视黄醛、视黄酸, 及其组合。更优选的类视黄醇包括视黄醇、丙酸视黄酯、视黄酸和棕榈酸视黄酯。类视黄醇可以是基本纯化的材料、或从自然 (例如, 植物) 来源经适宜的物理和/或化学方法获得的提取物。

载体

进一步预期本发明的组合物能以安全而有效的剂量用于皮肤病学可接受的、适于局部应用于皮肤和/或毛发的载体中, 主要材料和可选的其它材料在载体中混合以使主要材料和可选的其它材料能以合适的浓度运送至皮肤或毛发。这样, 载体作为主要材料的稀释剂、分散剂、溶剂等以确保主要材料能够以适宜浓度均匀地应用并分布于所选择的靶物上。

本发明所使用的载体类型依赖于对该组合物所希望的产物形式。本发明无意将载体限制于任何特定的形式，尽管其最常见为固体、半固体或液体。适宜的载体是液体、半固体，例如霜、洗剂、胶、棒、软膏、糊剂和泡沫（mousses）。优选载体形式为洗剂、霜或胶，更优选为具有足以阻止颗粒沉淀的稠度或流动点的载体。载体本身可以是惰性的，或其自身可以是皮肤病学上有益的。载体可以直接应用于皮肤和/或毛发，或其可通过纺织或非纺织条或布应用。它也可以是贴剂（patch）、面膜（mask）、或包装带（wrap）形式。它也可以烟雾状或别的形式喷至皮肤和/或毛发。载体还应当是与本文所述主要成分可物理和化学相容的，且不当过度损害与本发明组合物相关的稳定性、效力或其它用途益处。

优选的载体包含皮肤病学可接受的亲水稀释剂。适宜的亲水稀释剂包括水、有机亲水稀释剂例如 $C_1 - C_4$ 一元醇以及低分子量的二元醇和多元醇，包括丙二醇、聚乙二醇（例如 MW 200-600）、聚丙二醇（例如 MW 425-2025）、丙三醇、丁二醇、1,2,4-丁三醇、山梨醇酯、1,2,6-hexametriol、乙醇、异丙醇、山梨醇酯、乙氧基醚、丙氧基醚及其组合。优选稀释剂为液体。水是优选的稀释剂。优选组合物含有至少约 20% 的亲水稀释剂。

适宜的载体还包括含有亲水相和疏水相（例如，脂、油或含油物质）的乳状液，亲水相优选为水相。正如本领域技术人员所熟知的，根据组合物成分，亲水相分散于疏水相中或反之，以各自形成亲水或疏水的分散和连续相。在乳状液技术中，熟知的术语“分散相”意指以小颗粒或小滴悬浮于连续相中或被连续相包围的形式存在的相。分散相也叫内部相或非连续相。乳状液可以是或者包括（例如，在三相或其它多相乳状液中）水包油乳状液或油包水乳状液例如硅氧烷包水乳状液。水包油乳状液典型地含有约 1% 至约 60%（优选约 1% 至约 30%）的分散疏水相和约 1% 至约 99%（优选约 40% 至约 90%）的连续亲水相；油包水乳状液典型地含有约 1% 至约 98%（优选约 40% 至约 90%）

的分散亲水相和约 1%至约 50% (优选约 1%至约 30%) 的连续疏水相。

湿润剂

在一些实施方式中, 本发明的组合物含有优选以约 0.01%至约 20%, 更优选约 0.1%至约 15%和特别是约 0.5%至约 10%水平存在的湿润剂。优选的湿润剂包括但不限于选自多元醇、尿素、D 或 DL 泛酰醇、泛酸钙、蜂王胶、panthetine、pantotheine、泛酰基乙基醚、潘氨酸、吡哆素、泛酰乳糖维生素 B 复合物、己烷-1,2,6,-三元醇、胍或其衍生物, 及其混合物。

此处适于使用的多元醇包括聚烷撑二醇且更优选为烷撑多元醇及其衍生物, 包括丙二醇、二丙二醇、聚丙二醇、聚乙二醇及其衍生物, 山梨醇、羟丙基山梨醇、赤藓醇、苏糖醇、季戊四醇、木糖醇、葡萄糖醇、甘露醇、己二醇、丁二醇 (例如, 1,3-丁二醇)、己三醇 (例如, 1,2,6-己三醇)、三羟甲基丙烷、新戊二醇、丙三醇、乙氧基丙三醇、丙烷-1,3 二醇、丙氧基丙三醇及其混合物。上述任一多元醇的烷氧基衍生物也适于此处使用。本发明优选多元醇选自丙三醇、丁二醇、丙二醇、二丙二醇、聚乙二醇、己三醇、乙氧基丙三醇和丙氧基丙三醇, 及其混合物。

此处适用的有用的湿润剂是 2-吡咯烷酮-5-羧酸钠 (NaPCA)、胍; 乙醇酸和乙醇酸盐 (例如 铵和四烷基铵); 乳酸和乳酸盐 (例如 铵和四烷基铵); 任一品种形式的真性芦荟 (例如, 真性芦荟胶); 透明质酸及其衍生物 (例如, 盐衍生物, 例如透明质酸钠); 乳酰胺单乙醇胺; 乙酰胺单乙醇胺; 尿素; 泛酰醇及其衍生物; 及其混合物。

至少部分 (高至约 5%组合物重量比) 湿润剂可以整合为与微粒化交联疏水丙烯酸盐或甲基丙烯酸盐共聚物的混合物的形式, 其自身存在的量优选为约 0.1%至约 10%, 它可被加入或者水相或者分散相中。该共聚物在辅助提供有效的保湿有益效果时对于降低光泽和控油尤其有价值, 其在 WO96/03964 中得以进一步描述, 该文在此引作参

考。

润肤剂

在一些实施方式中，本发明的水包油乳状液实施方式包括约 1% 至约 20%，优选约 1.5% 至约 15%，更优选约 0.1% 至约 8%，和甚至更优选约 0.5% 至约 5% 的皮肤病学可接受的润肤剂。润肤剂可润滑皮肤、增强光滑和柔软、防止或减弱干燥、和/或保护皮肤。润肤剂典型为水不相容的、油性的或蜡质材料，且高分子量的润肤剂可使局部施用组合物具有粘性。已知有大量的适宜润肤剂，并可在此处使用。例如，Sagarin, Cosmetics, Science and Technology, 第二版, Vol. 1, 第 32-43 页 (1972), 包含了许多适宜用作润肤剂的材料例子。此外，在申请 WO 00/24372 中讨论的所有例子也应当视为适于在本发明中使用，尽管下面进一步列出了优选的例子：

i) 具有约 7 至约 40 个碳原子的直链和支链碳氢化合物，例如十二烷、角鲨烷、胆固醇、氢化聚异丁烯、异十六烷、异二十烷、isooctahexacontane、isohexapentacontahectane、和 C₇-C₄₀ 异链烷烃，其为 C₇-C₄₀ 支链碳氢化合物。适于此处使用的支链碳氢化合物选自 isopentacontaoctactane、凡士林、及其混合物。适于此处使用的是以商标名 Permethyl (RTM) 销售的支链脂肪族碳氢化合物，可从 Presperse Inc., South Plainfield, N. J. 商业获得。

ii) C₁-C₃₀ 羧酸、C₁₂₋₁₅ 烷基苯甲酸、和 C₂-C₃₀ 二羧酸的 C₁-C₃₀ 醇酯，例如，异壬基异壬酸酯、异硬脂基新戊酸酯、异癸基辛酸酯、异癸基异壬酸酯、十三烷基异壬酸酯、十四烷基辛酸酯、辛基壬酸酯、辛基异壬酸酯、十四烷基十四烷酸酯、十四烷基新戊酸酯、十四烷基辛酸酯、异丙基十四烷酸酯、十四烷基丙酸酯、异丙基硬脂酸酯、异丙基异硬脂酸酯、甲基异硬脂酸酯、二十二烷基山嵛酸酯、二辛基马来酸酯、二异丙基己二酸酯、和二异丙基二亚油酸酯及其混合物。

iii) 糖类的 C₁-C₃₀ 单和聚酯及相关材料。这些酯衍生自糖类或多元醇部分和一或更多个羧酸部分。根据组成的酸和糖，这些酯在室温

下可以是液体或固体形式。例子包括，葡萄糖四油酸酯、半乳糖四油酸酯、山梨醇四油酸酯、蔗糖四油酸酯、蔗糖五油酸酯、蔗糖六油酸酯、蔗糖七油酸酯、蔗糖八油酸酯、山梨醇己酯——其中羧酸酯部分是摩尔比率为1:2的棕榈油酸和花生酸，和蔗糖辛酯——其中酯化羧酸部分是摩尔比率为1:3:4的月桂酸、亚油酸和山萘酸。其它材料包括蔗糖棉籽油或大豆油脂肪酸酯。这种材料的其它例子描述于WO 96/16636。一种特别优选的材料是一种已知称作INCI的 sucrose polycottonseedate。

iv) 植物油和氢化植物油。植物油和氢化植物油的例子包括，红花油、椰子油、棉籽油、鲑鱼油、棕榈仁油、棕榈油、花生油、大豆油、葡萄籽油、亚麻子油、稻糠油、松油、芝麻油、葵花子油、来自上述来源的部分或完全氢化的油、及其混合物。

v) 可溶或胶状可溶保湿剂。例子包括，透明质酸和淀粉接枝聚丙烯酸钠，例如描述于US专利NO 4 076 663的可从Celanese Superabsorbent Materials, Portsmouth, VA获得的Sanwet (RTM) IM-1000, IM-1500和IM-2500。

优选此处使用的润肤剂为异十六烷、isooctaconthane、凡士林、异壬基异壬酸酯、异癸基辛酸酯、异癸基异壬酸酯、十三烷基异壬酸酯、十四烷基辛酸酯、辛基异壬酸酯、十四烷基十四烷酸酯、甲基异硬脂酸酯、异丙基硬脂酸酯、C₁₂₋₁₅烷基苯甲酸酯及其混合物。特别优选此处使用的润肤剂为异十六烷、异壬基异壬酸酯、甲基异硬脂酸酯、异丙基异硬脂酸酯、凡士林、或其混合物。

乳化剂/表面活性剂

在一些实施方式中，本发明的组合物含有乳化剂和/或表面活性剂，通常辅助分散相在连续水相中分散和悬浮。如果产品是用于皮肤清洁时，表面活性剂也有用。下文中为方便起见，乳化剂包括在术语“表面活性剂”中。因此，“表面活性剂”指无论用作乳化剂或其它表面活性目的例如皮肤清洁的表面活性试剂。只要所选择的试剂是与组合物必

需成分化学和物理相容的，则已知的或常规的表面活性剂可用于本发明的组合物并提供令人满意的特性。适宜的表面活性剂包括非硅氧烷衍生的物质，及其混合物。申请 WO 00/24372 中讨论的所有表面活性剂被视为适于在本发明中使用。

在一些实施方式中，本发明的组合物包括约 0.05% 至约 15% 的表面活性剂或表面活性剂混合物。所选择的确切的表面活性剂或表面活性剂混合物依赖于组合物及其它存在成分的 pH。

此处有用的非离子表面活性剂是那些可被宽泛定义为长链醇（例如 C8-30 醇）与糖类或淀粉聚合物（即，糖苷）的缩合产物的表面活性剂。其它有用的非离子表面活性剂包括脂肪酸与烯化氧的缩合产物（即，脂肪酸的环氧烷酯）。这些原料具有通式 $\text{RCO}(\text{X})_n\text{OH}$ ，其中 R 为 C₁₀₋₃₀ 烷基基团，X 为 $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$ （即，衍生自乙二醇或氧化物）或 $-\text{OCH}_2\text{CHCH}_3-$ （即，衍生自丙二醇或氧化物），且 n 为自约 6 至约 200 的整数。其它的非离子表面活性剂是 2 摩尔脂肪酸与烯化氧的缩合产物（即，脂肪酸的环氧烷二酯）。这些原料具有通式 $\text{RCO}(\text{X})_n\text{OOCR}$ ，其中 R 为 C₁₀₋₃₀ 烷基基团，X 为 $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$ （即，衍生自乙二醇或氧化物）或 $-\text{OCH}_2\text{CHCH}_3-$ （即，衍生自丙二醇或氧化物），且 n 为自约 6 至约 100 的整数。此处使用的乳化剂最优选为基于脱水山梨醇脂肪酸酯和蔗糖脂肪酸酯的脂肪酸酯混合物，尤其是脱水山梨醇硬脂酸酯和蔗糖可可酯（sucrose cocoate）。这可从 ICI 商业获得，商标名为 Arlatone 2121。甚至更适宜的例子包括十六醇（cetearyl alcohols）、十六烷基葡糖苷（cetearyl glucosides）的混合物，例如来自 Seppic 的商标名为 Montanov 68 的、来自 Henkel 的商标名为 Emulgade PL68/50 的那些。

在一些实施方式中，此处有用的替代性或附加的亲水表面活性剂包括如本领域已知的广泛的任意一种阳离子、阴离子、两性离子、和兼性表面活性剂（参见例如，US 专利 No. 5 011 681、US 专利 No. 4 421 769、和 US 专利 No. 3 755 560）。大量的阴离子表面活性剂可用于本发明的组合物（参见例如，US 专利 No. 3 929 678）。典型的阴离子表

面活性剂包括烷氧基羟乙基磺酸酯(例如, C₁₂-C₃₀), 烷基和烷基醚硫酸酯及其盐、烷基和烷基醚磷酸酯及其盐、烷基甲基牛磺酸酯(例如, C₁₂-C₃₀), 和脂肪酸的皂化物(例如, 碱金属盐, 例如钠或钾盐)。

两性和兼性表面活性剂也可用于本发明的组合物。可用于本发明组合物的两性和兼性表面活性剂的例子是被宽泛描述为脂肪族仲胺或叔胺的那些表面活性剂, 其中的脂肪族基团可以是直链或支链的, 且一个脂肪族取代基含有约 8 至约 22 个碳原子(优选 C₈-C₁₈)且一个含有阴离子水溶性基团(例如, 羧基、磺酸、硫酸盐、磷酸或膦酸)。例子包括烷基亚氨基醋酸酯、亚氨基二链烷酸盐和氨基链烷酸盐、咪唑啉鎓盐和铵衍生物。其它合适的两性和兼性表面活性剂包括那些选自甜菜碱、磺基甜菜碱、羟基磺基甜菜碱、以及支链和非支链烷酰基肌氨酸酯, 及其混合物。

在一些实施方式中, 本发明的乳状液进一步包括含有硅氧烷的乳化剂或表面活性剂。大量硅氧烷乳化剂可用于本发明。这些硅氧烷乳化剂是典型的经有机修饰的有机多分子硅醚, 本领域技术人员也已知为硅氧烷表面活性剂。有用的硅氧烷乳化剂包括聚二甲基硅氧烷共聚醇。这些原料是已经经过修饰以包括聚醚侧链例如聚环氧乙烷侧链、聚环氧丙烷侧链、这些侧链的混合物、以及含有衍生自环氧乙烷和环氧丙烷二者的部分的聚醚侧链的聚二甲基硅氧烷。其它例子包括烷基修饰的聚二甲基硅氧烷共聚醇(即, 含有 C₂-C₃₀ 侧链的化合物)。其它有用的聚二甲基硅氧烷共聚醇还包括带有各种阳离子、阴离子、两性离子、和兼性侧链部分的原料。

聚合增稠剂

在一些实施方式中, 本发明的组合物含有至少一种聚合增稠剂。此处有用的聚合增稠剂优选其数均分子量大于 20 000, 更优选大于 50 000 且特别是大于 100 000。在一些实施方式中, 本发明的组合物含有占组合物重量约 0.01%至约 10%、优选约 0.1%至约 8%和最优选约 0.5%至约 5%的聚合增稠剂或其混合物。

此处使用的优选聚合增稠剂包括非离子增稠剂和阴离子增稠剂或其混合物。适宜的非离子增稠剂包括聚丙烯酰胺聚合物、交联聚(N-乙烯吡咯烷酮)、多糖、天然或合成胶、聚乙烯吡咯烷酮、和聚乙烯醇。适宜的阴离子增稠剂包括丙烯酸/乙基丙烯酸酯共聚物、羧基乙烯基聚合物和烷基乙烯基醚与马来酸酐的交联共聚物。此处使用的特别优选的增稠剂是非离子聚丙烯酰胺聚合物，例如聚丙烯酰胺和异链烷烃和 laureth-7，可获自 Seppic Corporation，商标名为 Sepigel 305，以及由 B. F. Goodrich 公司出售的、商标为 CARBOPOL™树脂的丙烯酸/乙基丙烯酸酯共聚物和羧基乙烯基聚合物，或其混合物。在一些实施方式中，适宜的 CARBOPOL™树脂是经过疏水修饰的。其它适宜的树脂描述于 WO98/22085。预计这些树脂的混合物也可用于本发明。

硅油

在一些实施方式中，本发明组合物含有至少一个硅油相。硅油相通常占组合物的约 0.1% 至约 20%、优选约 0.5% 至约 10%、更优选约 0.5% 至约 5%。该或各硅油相优选含有一或更多种硅氧烷组分。

在一些实施方式中，硅氧烷组分是流体，包括直链、支链和环状硅氧烷。此处有用的适宜硅氧烷流体包括包含聚烷基硅氧烷流体、聚芳香硅氧烷流体、环形或线形聚烷基硅氧烷、聚烷氧基化的硅氧烷、氨基和季铵化修饰的硅氧烷、聚烷基芳基硅氧烷和聚醚硅氧烷共聚物及其混合物。硅氧烷流体可以是挥发性的或非挥发性的。硅氧烷流体通常具有小于约 200 000 的重均分子量。适宜的硅氧烷流体分子量约为 100 000 或更低，优选约 50 000 或更低，最优选约 10 000 或更低。优选硅氧烷流体选自重均分子量范围在约 100 至约 50 000 且优选约 200 至约 40 000 之间的硅氧烷流体。有代表性的，在 25°C 下硅氧烷流体的粘度范围是自约 0.65 至约 600 000 $\text{mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ，优选自约 0.65 至约 10 000 $\text{mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ 。可根据 Dow Corning Corporate Test Method CTM0004 所述的用玻璃毛细粘度计测定粘度。可用于本发明的适宜的聚二甲基硅氧烷包括例如可从 General Electric Company 获得的 SF

和 Viscasil (RTM) 系列以及从 Dow Corning 获得的 Dow Corning 200 系列。基本上是非挥发性的聚烷基芳基硅氧烷 (例如, 聚甲基苯基硅氧烷) 也是有用的, 其粘度在 25°C 下为约 0.65 至 30 000 $\text{mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ 。这些硅氧烷是可获得的, 例如, 获自 General Electric 公司的 SF 1075 甲基苯基流体或获自 Dow Corning 的 556 化妆品级流体。此处适宜使用的环状聚二甲基硅氧烷具有一个整合了约 3 至约 7 个 $(\text{CH}_3)_2\text{SiO}$ 部分的环结构。

硅橡胶纯胶料也可用于本发明。本文中术语“硅橡胶纯胶料”意指重均分子量超过约 200 000 且优选约 200 000 至约 4 000 000 的高分子量硅氧烷。本发明包括非挥发性聚烷基以及聚芳香基硅氧烷胶。在优选实施方式中, 硅油相含有硅橡胶纯胶料或包括硅橡胶纯胶料的硅氧烷混合物。典型地, 硅橡胶纯胶料在 25°C 下的粘度超过约 1 000 000 $\text{mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ 。硅橡胶纯胶料包括本领域已知的聚二甲基硅氧烷 (参见例如, US 专利 No. 4 152 416), 以及描述于 General Electric Silicone Rubber Product Data Sheets SE 30、SE 33、SE 54 和 SE 76 的硅橡胶纯胶料。硅橡胶纯胶料的特定例子包括聚二甲基硅氧烷、(聚二甲基硅氧烷) - (甲基乙烯基硅氧烷) 共聚物、聚(二甲基硅氧烷)(二苯)(甲基乙烯基硅氧烷) 共聚物及其混合物。此处可用的优选硅橡胶纯胶料是选自聚二甲基硅氧烷醇、聚二甲基硅氧烷共聚醇、聚二甲基硅氧烷及其混合物的分子量为约 200 000 至约 4 000 000 的硅橡胶纯胶料。

优选此处的硅氧烷相含有作为硅橡胶纯胶料-流体混合物一部分整合进组合物的硅橡胶纯胶料。当该硅橡胶纯胶料作为硅橡胶纯胶料-流体混合物的一部分整合时, 该硅橡胶纯胶料优选占硅橡胶纯胶料-流体混合物重量的约 5% 至约 40%、特别是约 10% 至 20%。此处适宜的硅橡胶纯胶料-流体混合物是主要由下列物质组成的混合物:

i) 选自聚二甲基硅氧烷醇、氧代硅氧烷和聚二甲基硅氧烷、及其混合物的硅氧烷, 分子量为约 200 000 至约 4 000 000; 和

(ii) 为硅氧烷流体的载体, 载体粘度为约 0.65 $\text{mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ 至约 100 $\text{mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$,

其中 i) 和 ii) 的比率为约 10:90 至约 20:80, 以及其中基于硅橡胶纯胶料的成分的终粘度为约 $100 \text{ mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ 至约 $100\,000 \text{ mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, 优选自 $500 \text{ mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ 至约 $10\,000 \text{ mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ 。

适宜在此处的硅油相中使用的其它硅氧烷组分是交联聚有机硅氧烷聚合物, 任意分散于液体载体中。一般, 交联聚有机硅氧烷聚合物, 与其载体(如果有的话)一起占组合物的 0.1% 至约 20%, 优选约 0.5% 至约 10%, 更优选约 0.5% 至约 5%。这样的聚合物含有与交联剂交联的聚有机硅氧烷聚合物。适宜交联剂包括 WO98/22085 中描述的那些。此处可用的适宜的交联聚有机硅氧烷聚合物的例子包括甲基乙烯基聚二甲基硅氧烷, 甲基乙烯基二苯聚二甲基硅氧烷, 和甲基乙烯基苯基甲基二苯聚二甲基硅氧烷。

适于在此处的硅油相中使用的另一类硅氧烷组分包括含有至少一个聚二有机硅氧烷部分和一个聚氧化亚烷基部分的聚二有机硅氧烷-聚氧化亚烷基共聚物。适宜的聚二有机硅氧烷部分及其共聚物包括描述于 WO98/22085 中的那些。可以从 Wacker-Chemie GmbH, Munich 获得商标为 Belsil (RTM)、以及从 Th. Goldschmidt Ltd., England 获得商标为 Abil (RTM) 的适宜的聚二有机硅氧烷-聚亚烷基共聚物, 例如 Belsil (RTM) 6031 和 Abil (RTM) B88183。一种用于此处的特别优选的共聚物流体混合物包括 Dow Corning DC3225C, 它的 CTFA 命名为聚二甲基硅氧烷/聚二甲基硅氧烷共聚醇。

防晒剂

在更进一步的实施方式中, 本发明提供包含有机防晒剂的组合物。在一些实施方式中, 适宜的防晒剂包括 UVA 吸收特性和/或 UVB 吸收特性。防晒剂活性的确切量根据想要的组合物防晒系数 (Sun Protection Factor, 即“SPF”)、以及想要的 UV 保护水平而变化。本发明的组合物优选包含至少为 10, 优选至少为 15 的 SPF。通常将 SPF 用作预防红斑的防晒剂的光保护度量。SPF 定义为, 在被保护的皮肤上产生最小量红斑与在同一个体的未保护皮肤上产生相同最小量红斑

所需紫外线能量的比率(参见, Fed. Reg. , 43, No 166, 第 38206-38269 页, 8月25日, 1978年)。使用的防晒剂的量典型地是约2%至约20%, 更典型的是约4%至约14%。适宜的防晒剂包括但不限于, 出现在 Wenninger 和 McEwen (eds.), CTFA International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook, 第七版, 第2卷, 第1672 (The Cosmetic, Toiletry, 和 Fragrance Association, Inc., Washington, D. C , 1997) 页中的那些。

在一些实施方式中, 本发明的组合物包含吸收 UVA 的防晒剂活性物质, 它吸收波长从约 320nm 至约 400nm 的 UV 射线。适宜的吸收 UVA 的防晒剂活性物质选自二苯甲酰甲烷衍生物、邻氨基苯甲酸盐衍生物, 例如甲基邻氨基苯甲酸盐和高甲基、1-N-乙酰邻氨基苯甲酸, 及其混合物。二苯甲酰甲烷防晒剂活性物质描述于 US 专利 No 4 387 089, 以及 Lowe 和 Shaath(eds), Sunscreens: Development, Evaluation, and Regulatory Aspects, Marcel Dekker, Inc (1990) 中。优选吸收 UVA 的防晒剂活性物质以能够提供宽光谱的 UVA 保护的量存在, 或者独立存在, 或者与可以存在的其它 UV 保护性活性物质组合。

适宜的 UVA 防晒剂活性物质是二苯甲酰甲烷防晒剂活性物质及其衍生物。它们包括但不限于, 2-甲基二苯甲酰甲烷、4-甲基二苯甲酰甲烷、4-异丙基二苯甲酰甲烷、4-叔丁基二苯甲酰甲烷、2,4-二甲基二苯甲酰甲烷、2,5-二甲基二苯甲酰甲烷、4,4'-二异丙基苯甲酰甲烷、4-(1,1-二甲基乙基)-4'-甲氧二苯甲酰甲烷、2-甲基-5-异丙基-4'-甲氧二苯甲酰甲烷、2-甲基-5-叔丁基-4'-甲氧二苯甲酰甲烷、2,4-二甲基-4'-甲氧二苯甲酰-甲烷、2,6-二甲基-4'-叔丁基-4'甲氧二苯甲酰甲烷、及其混合物。优选的二苯甲酰防晒剂活性物质包括 4-(1,1-二甲基乙基)-4'-甲氧二苯甲酰甲烷、4-异丙基二苯甲酰甲烷、及其混合物。一种优选的防晒剂活性物质是 4-(1,1-二甲基乙基)-4'-甲氧二苯甲酰甲烷。

防晒剂活性物质 4-(1,1-二甲基乙基)-4'-甲氧二苯甲酰甲烷, 也已知称作丁基甲氧二苯甲酰甲烷或 Avobenzon, 其可从 Givaudan Roure (International) S. A. (Basel, Switzerland) 商业获得, 商标

为 PARSOL® 1789, 以及可从 Merck & Co., Inc (Whitehouse Station, NJ) 商业获得, 商标为 EUSOLEX® 9020。防晒剂 4-异丙基二苯甲酰甲烷, 也已知为异丙基二苯甲酰甲烷, 可从 Merck 商业获得, 商标为 EUSOLEX® 8020。

在进一步的实施方式中, 本发明的组合物包含吸收 UVB 的防晒剂活性物质, 它吸收波长从约 290nm 至约 320nm 的 UV 射线。组合物含有安全、且能独立或者与可存在于组合物中的其它 UV 保护性活性物质组合而有效提供 UVB 保护的 UVB 防晒剂活性物质化合物量。在一些实施方式中, 组合物含有重量比为约 0.1% 至约 16%, 更优选约 0.1% 至约 12%, 和最优选约 0.5% 至约 8% 的 UVB 吸收有机防晒剂。

大量 UVB 防晒剂活性物质适宜在此处使用。这样的有机防晒剂活性物质的非限制性例子包括在 US 专利 No. 5 087 372、US 专利 No. 5 073 371、US 专利 No. 5 073 372、和 Segarin 等人, Cosmetics Science and Technology, 第 VIII 章, pages 189 et seq 中所描述的那些。另外的有用防晒剂包括那些在 US 专利 No. 4 937 370 和 US 专利 No. 4 999 186 中所描述的。优选的 UVB 防晒剂活性物质选自 2-乙基己基-2-氰基-3,2-乙基己基 N,N-二甲基-对-氨基苯甲酸酯、对-氨基苯甲酸、羟苯甲酮 (oxybenzone)、高薄荷基水杨酸酯、辛基水杨酸酯、4,4'-甲氧-叔-丁基二苯甲酰甲烷、4-异丙基二苯甲酰甲烷、3-亚苄基樟脑、3-(4-甲基亚苄基)樟脑、3-二苯基丙烯酸酯(指, 氰双苯丙烯酸辛酯)、2-苯基-苯并咪唑-5-磺酸 (PBSA)、肉桂酸酯及其衍生物例如 2-乙基己基-对-甲氧肉桂酸酯和辛基-对-甲氧肉桂酸酯、TEA 水杨酸酯、辛基二甲基 PABA、樟脑衍生物及其衍生物、及其混合物。优选的有机防晒剂活性物质是 2-乙基己基-2-氰基-3,3-二苯基丙烯酸酯(指, 氰双苯丙烯酸辛酯)、2-苯基-苯并咪唑-5-磺酸 (PBSA)、辛基-对-甲氧肉桂酸酯、及其混合物。酸性防晒剂的盐和酸中和形式在此也是有用的。

在本发明的一些实施方式中, 组合物进一步包括对稳定 UVA 防晒剂有效以防止 UVA 防晒剂在暴露于 UV 射线时光降解从而保持其 UVA 保护效力的物质。已经列举了大量可以提供这些稳定特性的化合

物。预计选择这些化合物以在整体上同时补充 UVA 防晒剂和组合物。适宜的稳定剂包括但不限于,描述于 US 专利 Nos 5 972 316; 5 968 485; 5 935 556; 5 827 508 和 WO 00/06110 中的那些。用于本发明的优选稳定剂例子包括 2-乙基己基-2-氰基-3,3-二苯基丙烯酸酯(指, 氰双苯丙烯酸辛酯)、乙基-2-氰基-3,3-二苯基丙烯酸酯、2-乙基己基-3,3-二苯基丙烯酸酯、乙基-3,3-二(4-甲氧苯基)丙烯酸酯、及其混合物。2-乙基己基-2-氰基-3,3-二苯基丙烯酸酯是最优选的。

在一些实施方式中, 向本发明有用的任一组合物中加入一种物质以改善皮肤, 特别是那些可增强被水洗脱或者擦掉的抗性的组合物。提供该益处的优选物质是乙烯和丙烯酸的共聚物(参见例如, US 专利 No. 4 663 157)。

除有机防晒剂外, 在一些实施方式中, 本发明的组合物还含有无机物理阳光阻挡物质。适宜的物理阳光阻挡物质的非限制性例子描述于 CTFA International Cosmetic Ingredient Dictionary, 第六版, 1995, 第 1026-28 和 1103 页; 和 Sayre 等人, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 41:103-109 (1990)。优选的无机物理阳光阻挡物质包括氧化锌和二氧化钛, 及其混合物。

使用时, 物理阳光阻挡物质存在的量使本发明组合物在皮肤上是透明的(即, 非增白的), 优选小于或等于约 5%。若使用二氧化钛, 它可以具有锐钛矿、金红石或无定形结构。物理阳光阻挡物质颗粒(例如, 二氧化钛和氧化锌), 可以是未包被的或用各种物质包被的, 这些物质包括但不限于氨基酸、铝化合物例如氧化铝、硬脂酸铝、月桂酸铝及类似; 羧酸及其盐、卵硬脂酸及其盐; 磷脂类例如卵磷脂; 有机硅氧烷化合物; 无机硅氧烷化合物例如二氧化硅和硅酸盐; 及其混合物。优选的二氧化钛可从 Tayca(日本)商业获得, 它由 Tri-K Industries (Emerson, NJ) 以 MT 微离子化系列(例如, MT 100SAS)销售。在一些实施方式中, 本发明的组合物含有重量百分比为约 0.1% 至约 10%, 更优选约 0.1% 至约 4%, 和最优选约 0.5% 至约 2.5% 的无机防晒剂。

抗微生物和抗真菌活性物质

在一些实施方式中,本发明的组合物含有抗微生物和/或抗真菌活性物质。此处有用的抗微生物和抗真菌活性物质的非限制性例子包括但不限于β-内酰胺类药物、喹诺酮类药物、环丙沙星、诺氟沙星、四环素、红霉素、丁胺卡那霉素、2,4,4'-三氯-2'-羟基二苯基醚、3,4,4'-三氯酰苯胺(banilide)、苯氧基乙醇、苯氧基丙醇、苯氧基异丙醇、强力霉素、卷曲霉素、氯己定、氯四环素、土霉素、克林霉素、乙胺丁醇、扑痛酮羧乙基磺酸盐、甲硝唑、戊双脒、庆大霉素、卡那霉素、lineomycin、甲烯土霉素、乌洛托品、米诺环素、新霉素、乙基紫苏霉素、巴龙霉素、链霉素、妥布霉素、咪康唑、四环素盐酸盐、红霉素、锌红霉素、红霉素丙酸酯十二烷硫酸盐、硬脂酸红霉素、丁胺卡那霉素硫酸盐、强力霉素盐酸盐、卷曲霉素硫酸盐、氯己定葡萄糖酸盐、氯己定盐酸盐、氯四环素盐酸盐、土霉素盐酸盐、克林霉素盐酸盐、乙胺丁醇盐酸盐、甲硝唑盐酸盐、戊双脒盐酸盐、庆大霉素硫酸盐、卡那霉素硫酸盐、lineomycin 盐酸盐、甲烯土霉素盐酸盐、乌洛托品马尿酸盐、乌洛托品杏仁酸盐、米诺环素盐酸盐、新霉素硫酸盐、乙基紫苏霉素硫酸盐、巴龙霉素硫酸盐、链霉素硫酸盐、妥布霉素硫酸盐、咪康唑盐酸盐、amanfadine 盐酸盐、amanfadine 硫酸盐、octopirox、对氯间二钾苯酚、制霉菌素、托萘酯、克霉唑、西吡氯铵(CPC)、吡罗克酮乙醇胺、二硫化硒、酮康唑、三氯卡班、三氯生、吡硫锌、伊曲康唑、亚细亚酸、扁柏酚、mipirocin、clinacycin 盐酸盐、苯甲酰过氧化物、苜基过氧化物、二甲胺四环素、苯氧基异丙醇、及其混合物,以及欧洲专利 No. 0 680 745 中所述的那些。

其它任选的成分

在另外一些实施例中,许多任选的成分,例如中和试剂、香料和调色剂可用于本发明的组合物中。优选的任一附加成分都增强产品对皮肤的柔软/光滑效果。此外,优选的是,这样的成分不会对产品的美

学特性产生负面影响。因此，在本发明有用的组合物中高水平的蛋白质例如胶原蛋白和弹性蛋白通常为不优选的。

在一些实施方式中，本发明的组合物还包含自约 0.01% 至约 10%，优选约 0.1% 至约 5% 的泛醇保湿剂。在优选实施方式中，泛醇保湿剂选自 D-泛醇 ([R]-2, 4-二羟基-N-[3-羟基丙基]) -3,3-二甲基丁酰胺)、DL-泛醇、泛酸钙、蜂王胶、panthetine、pantotheine、panthenyl 乙醚、潘氨酸、维生素 B₆、和泛酰基乳糖。

适宜在中和亲水凝胶试剂中的酸性基团时使用的中和剂此处包括氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化胺、单乙醇胺、三乙醇胺、氨基甲基丙醇、tris-缓冲液和三乙醇胺。

其它的任选物质包括角质层分离剂；水溶性或可溶防腐剂，优选约 0.1% 至约 5%，例如 Germall 115，羟基苯甲酸的甲基、乙基、丙基和丁基酯，苯甲醇，可从 Lonza 获得的商标为 Glydant Plus 的 DMDM 乙内酰脲碘丙基丁基碳酸盐，EDTA，Euxyl (RTM) K400，Bromopol (2-溴-2-硝基丙烷-1,3-二醇) 和苯氧基丙醇；抗菌物例如 Irgasan (RTM) 和苯氧基乙醇 (优选 0.1% 至约 5%)；可溶或胶溶的保湿剂，例如透明质酸和淀粉接枝聚丙烯酸钠，例如描述于 US 专利 No. 4 076 663、可从 Celanese Superabsorbent Materials, Portsmouth, VA 获得的 Sanwet (RTM) IM-1000、IM-1500 和 IM-2500；维生素例如维生素 A、维生素 C、维生素 E 及其衍生物，及其前体 (building blocks) 例如植烷三醇和维生素 K，及其组分例如脂肪醇十二碳三烯醇； α -和 β -羟酸；真性芦荟；鞘氨醇和植物鞘氨醇、胆固醇；皮肤增白剂；N-乙酰半胱氨酸；调色剂；抗菌剂，例如 TCC/TCS，也已知为三氯生和三氯卡班；香料和香料增溶剂。 α -羟酸的例子包括乙醇酸、乳酸、苹果酸、柠檬酸、与羟乙酸铵连接的乙醇酸、 α -羟基乙酸、 α -羟基辛酸、 α -羟基己酸、羟基己酸、混合果酸、三- α -羟基果酸、三联果酸、甘蔗提取物、 α -羟基和植物材料，例如那些在交联的脂肪酸 α -nutrium 中含有 1- α -羧酸和 glycomer 的。 α -羧酸的优选例子是乙醇酸和乳酸。优选 α -羧酸的使用水平高达 10%。

在一些实施方式中，向本发明的组合物中加入安全和有效量的抗炎剂，优选占组合物的约 0.1% 至约 5%，更优选自约 0.1% 至约 2%。抗炎剂增强本发明的皮肤外观益处（例如，这样的试剂可以促使皮肤张力或色彩更加一致）。组合物中使用的抗炎剂的确切量依赖于所使用的特定抗炎剂，因为这样的试剂在效力上差别很大。

在进一步的实施方式中，本发明的组合物进一步包括抗氧化剂/自由基清除剂。抗氧化剂/自由基清除剂对于提供抵御 UV 射线的保护以及抵御其它能导致皮肤损伤的环境因素尤其有用，UV 射线能增强角质层的鳞片状或细纹变化。适宜的量占组合物的约 0.1% 至约 10%，更优选约 1% 至约 5%。抗氧化剂/自由基清除剂包括化合物，例如抗坏血酸（维生素 C）及其盐。

在本发明的一些实施方式中螯合剂的加入，对于提供抵御 UV 射线的保护以及抵御其它能导致皮肤损伤的环境因素尤其有用，UV 射会导致角质层的过度鳞片化或皮肤细纹改变。适宜的量占组合物约 0.01% 至约 1%，更优选约 0.05% 至约 0.5%。此处有用的典型螯合剂为描述于 US 专利 No. 5 487 884 中的那些。在本发明主题组合物中有用的螯合剂优选包括乙二胺四乙酸（EDTA），糠偶酰二脲，及其衍生物。

在更进一步的实施方式中，本发明的组合物还含有皮肤亮泽剂（skin lightening agent）。使用时，优选组合物中含有约 0.1% 至约 10%，更优选约 0.2% 至约 5%，还优选自约 0.5% 至约 2% 的皮肤亮泽剂。适宜的皮肤亮泽剂包括那些在本领域已知的皮肤亮泽剂，包括曲酸、熊果苷、抗坏血酸及其衍生物（例如，抗坏血酸镁磷酸酯）。适宜此处使用的其它皮肤亮泽剂包括 WO 95/34280 和 WO 95/23780 中描述的那些；各自引入本文作为参考。

其它的任选物质包括水溶性或可溶防腐剂，优选约 0.1% 至约 5%，例如 Germall 115，羟基苯甲酸的甲基、乙基、丙基和丁基酯，苯甲醇，商标为 Glydant Plus (Lonza) 的 DMDM 乙内酰脲碘丙基丁基碳酸酯，EDTA，Euxyl (RTM) K400，Bromopol (2-溴-2-硝基丙烷-1,3-二醇)

和苯氧基丙醇；抗菌物例如 Irgasan (RTM) 和苯氧基乙醇 (优选 0.1% 至约 5%)。抗菌剂也可用于本发明的组合物，例如 TCC/TCS，也已知为三氯生和三氯卡班。

此处其它任选的原料包括色素，当其为水溶性时促进并被包含在油相成分的总水平内。适宜在本发明的组合物中使用的色素可以是有机和/或无机的。还包括在术语“色素”中的原料是具有低色彩或光泽的原料例如消光剂 (matter finishing agent)，还包括散光剂。优选，本发明的组合物含有反射指数为约 1.3 至约 1.7 的颗粒原料，该颗粒原料分散在组合物中并且具有自约 2 至约 30 μm 的粒径中值。优选此处有用的颗粒具有相对较窄的分布，这是指 50% 以上的颗粒落在各自中值某一侧 3 μm 内。还优选的超过 50%，优选超过 60%，且甚至更优选超过 70% 的颗粒落在所规定的各自中值大小范围内。适宜的颗粒化原料包括有机物或有机硅氧烷，且优选有机硅氧烷聚合物。优选颗粒是自由流动的固体原料。“固体”意指颗粒不是空的。空颗粒中心的空洞会对反射指数带来不利效果，及由此对皮肤或者组合物的视觉效果产生不利效果。适宜的有机颗粒化原料包括由上述聚甲基 silsesquioxane，参见上述，聚酰胺、聚乙烯、聚丙烯腈、聚丙烯酸、聚甲基丙烯酸、聚苯乙烯、聚四氟乙烯 (PTFE) 和聚 (氯亚乙烯) 制成。也可以使用衍生自前述原料的单体的共聚物。无机原料包括二氧化硅和氮化硼。在此处有用的颗粒化原料的可商业获得代表性例子是 Tospearl® 145，其中值颗粒大小约为 4.5 μm ；和 Kobo 的 EA-209®，它是乙烯/丙烯酸共聚物，中值颗粒大小为约 10 μm ；以及 Elf Atochem, France 的商标为 Orgasol 2002 的 Nylon-12；或其混合物。

适宜色素的进一步例子包括二氧化钛，来自 Kobo 的预分散的二氧化钛 (例如，Kobo GWL75CAP)、氧化铁、酰基谷氨酸盐 (acylglutamate) 氧化铁、群青色、D&C 染料、胭脂红，及其混合物。根据组合物的类型，常常可以使用色素混合物。从保湿、皮肤感觉、皮肤外观以及乳化相容性的角度来看，此处优选使用的色素是经过处理的色素。色素可以用化合物例如氨基酸、硅氧烷、卵磷脂和酯油处

理。

适当的，此处组合物 pH 范围是从约 6.1 至约 10.0，其中根据需要用酸、碱或缓冲盐调节最终组合物的 pH。

组合物的制备

用本领域技术人员熟知的标准技术来制备本发明的组合物。通常，以任意顺序添加相似的相分离原料来分别制备水相和/或油相。如果终产品是乳状液，那么通过剧烈搅拌将两相混合。如果可行的话，配方中任何高挥发性成分、或在高温下易水解的成分可以在制备末期乳化作用之后通过温和搅拌加入。

变应原性/免疫原性减弱的蛋白酶也可以用于纺织品处理。“纺织品处理”包括这样一个过程，其中纺织品和可以纺织、粘制、编结成纺织品或服装的独立的纱线或纤维经过处理产生所想要的特性。这样的所想要的特性的例子有“砂洗 (stone-washing)”、de pilling、脱毛、脱浆、软化、和其它本领域技术人员熟知的纺织品处理步骤。

在本发明的一种实施方式中，此处所鉴定的表位用于引起免疫应答（例如，当想要产生针对某一蛋白酶的抗体时，其中该蛋白酶包括一个或两个这种表位。这样的抗体可用于筛选其它包括一个或这两个区域、或与之高度同源区域的蛋白酶。因此，本发明提供一种包括以下一个序列或同时包括以下两个序列的蛋白酶：*解淀粉芽孢杆菌*枯草杆菌蛋白酶的 (i) 残基 70~84 和/或 (ii) 残基 109~123。本发明可以利用分离的天然表位、重组蛋白质、或呈现特异表位区域的合成肽在免疫检测中实施以评价个人对包括这些或与之高度同源区域的蛋白质的敏感性。

在另一实施方式中，表位片段此处用于检测具有能够结合并展示这些片段的 MHC 分子的抗原呈递细胞。例如，表位片段可以包括可检测标记（例如，放射标记）。然后将标记片段与目的细胞孵育，之后结合（或展示）了标记片段的细胞得以检测。

发明详述

本发明提供鉴定枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 蛋白中 CD4⁺ T-细胞表位的方法。本发明还旨在生产改变的肽，当其被整合进野生型枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 蛋白时则产生改变的免疫应答，优选在人体内存为弱免疫应答。特别地，本发明提供手段，包括适于减弱 ALCALASE®酶的免疫原性的方法和组合物。本发明还旨在生产改变的肽，当其被整合进野生型枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 蛋白序列时再也不能引发 CD4⁺ T-细胞应答或者至少使变态应答减弱。特别地，本发明提供手段，包括适于减弱野生型枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 的免疫原性的方法和组合物。

在一种实施方式中，本发明提供 ALCALASE®酶的 T-细胞表位。这些表位提供在本文给出的各种序列（参见，附图 2 和 3）中，包括但不限于第 1 号肽（SEQ ID NO:2）；第 7 号肽（SEQ ID NO:8）；第 14 号肽（SEQ ID NO:15）；第 29 号肽（SEQ ID NO:30）；第 39 号肽（SEQ ID NO:40）。在另一实施方式中，本发明提供所鉴定表位的改变序列，其适于置换进 ALCALASE®酶。

本发明提供鉴定野生型枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 蛋白中 CD4⁺ T-细胞表位的方法。本发明进一步提供不再能够引发 CD4⁺ T-细胞应答的肽的生产。特别地，本发明提供手段，包括适于减弱 ALCALASE®酶的免疫原性的方法和组合物。

发展针对某蛋白质的抗体需要一系列事件，这些事件起始于衍生自呈递于激活的抗原呈递细胞（APC）表面的蛋白质的肽片段。该肽结合于抗原呈递细胞表面的特定蛋白质，即主要组织相容性复合物（MHC）（对于人类，MHC 是指“人白细胞抗原”（HLA）系统）中的蛋白质。该结合的肽能与第二个细胞类型——T-细胞相互作用。确切的说，这一亚型的 T-细胞通过其表面 CD4 蛋白的表达被识别（即，CD4⁺ T-细胞）。如果该相互作用成功，则特异的 CD4⁺ T-细胞生长分裂（即，增殖）并变得能与产生抗体的细胞（即，B-细胞）相互作用。

如果该相互作用成功，则 B-细胞增殖并成为特异针对最初蛋白质的抗体的生产中心。因此，最终的抗体生产依赖于对特异于某单肽序列（即，表位）的 CD4⁺ T-细胞的初始激活。利用本文所述的组合物和方法，有可能预测靶蛋白质，例如野生型枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 蛋白，中能引起特异性 CD4⁺ T-细胞的初始激活的肽。

在本发明的一些优选实施方式中，枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 蛋白包括：i) ALCALASE®酶（SEQ ID NO:1）；ii）与 ALCALASE®酶具有相似催化活性、并与 SEQ ID NO:1 具有至少约 80%、85%、90%、95%、97%、98%或 99%氨基酸序列同一性的枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 蛋白，且优选与 SEQ ID NO:1 具有至少 90%、至少 95%或至少 97%氨基酸序列同一性；和 iii）枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 蛋白的变体。

枯草杆菌蛋白酶是通常切割肽键的丝氨酸蛋白酶（典型地为细菌或真菌的）。尽管枯草杆菌蛋白酶的氨基酸序列并非完全同源，但枯草杆菌蛋白酶表现相同或相似的蛋白水解活性并且具有有限定催化三联体的共有氨基酸序列使它们区别于胰凝乳蛋白酶这一相关的丝氨酸蛋白酶类别。催化三联体从氨基到羧基末端为，天冬氨酸-组氨酸-丝氨酸。野生型枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 蛋白以及本文中经修饰的蛋白质具有该催化三联体。

与 P00780 及附图 1（SEQ ID NO:1）所示的 ALCALASE®酶具有相似的催化活性的枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 蛋白，包括那些可从地衣芽孢杆菌获得的枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 蛋白，例如但不限于具有 EMBL Accession code X91262、EMBL Accession code X91261、和 EMBL Accession code X91260 的枯草杆菌蛋白酶。这些枯草杆菌蛋白酶的催化结构域与 ALCALASE®酶具有大于 90%的氨基酸序列同一性。在一种优选实施方式中，这些野生型枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 蛋白具有至少一个并优选 1 至 6 个与 SEQ ID NO:1 中已经鉴定的 ALCALASE®酶显著表位相同的显著表位。

在本发明的一些实施方式中，枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 蛋白的变体是天然存在的（例如，获自地衣芽孢杆菌菌株的），而在其它的实施方式中，它们是经遗传工程得到的变体（即，重组蛋白质）。这些变体包括带有一个或更多个氨基酸残基改变的重组蛋白质，其中改变的氨基酸残基处在不同于显著表位的位置。例如，在一些实施方式中，变体包括一个或更多个处在与 SEQ ID NO:1 第 1-15、19-33、40-54、85-99、和 115-129 位对应位置的氨基酸残基的改变。在其它的实施方式中，变体包括两个或更多个与 SEQ ID NO:1 第 1-15、19-33、40-54、85-99、和 115-129 位对应位置的氨基酸改变。在更进一步的实施方式中，变体包括 2 到 10 个或 2 到 6 个处在与 SEQ ID NO:1 第 1-15、19-33、40-54、85-99、和 115-129 位对应位置的氨基酸残基的改变。在一些实施方式中，改变包括氨基酸或氨基酸序列的置换、缺失和/或插入，其中该改变导致酶的表型改变。例如，在一些实施方式中，改变导致产生增强的稳定性、增强的酶活性、增强的温度稳定性、提高的碱稳定性和/或其它想要的特性。

导致产生包括修饰的 ALCALASE 或修饰的变体枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 在内的修饰的野生型枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 蛋白的对一个或更多个显著表位的改变或修饰，可以包括 a) 通过对表位中一个或更多个氨基酸的置换、缺失或插入对表位产生的修饰或 b) 通过用同源蛋白质的相似序列进行置换而产生的对表位的修饰，其中该相似序列比亲体野生型枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 产生更弱的由 T-细胞识别引起的免疫应答。

在本发明的一些实施方式中，通过在表位中置换、缺失和/或插入至少一、二、三、四、五、六、七以及多至十五个氨基酸残基来修饰显著表位。例如，在一种优选实施方式中，改变了对应于 SEQ ID NO:1 第 115 - 129 位氨基酸残基的第 39 号肽 (SEQ ID NO:40)。这一改变的氨基酸序列含有在 115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、和/或 129 位中一个或更多个位置的置换。在其它实施方式中，改变的肽含有 115 - 129 中两个或更多个位

置的置换。在其它的优选实施方式中，改变了第 7 号肽 (SEQ ID NO:8; 对应于 SEQ ID NO:1 第 19 - 33 位氨基酸残基)。在这些实施方式中，改变的氨基酸序列含有 19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、和/或 33 中一个或多个位置的置换 (例如，第 19 - 33 位)。通过用不同的氨基酸取代野生型氨基酸残基进行置换。在一些优选实施方式中，优选天然 L-氨基酸 (即，Ala、Asn、Asp、Cys、Glu、Gly、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Gln、Ser、Thr、Trp、Tyr 和 Val) 之一进行取代。在进一步的实施方式中，改变的肽是第 7 号肽，它含有相应于 SEQ ID NO:1 第 19 - 33 位的一个或多个氨基酸残基的缺失。在更进一步的实施方式中，改变的肽对应于肽 7 和 8，其序列为 QGFKGANVKVAVLDTGIQ (SEQ ID NO:90)。因此，提供了在目的表位中的各种修饰，这为变体枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 蛋白提供减弱的免疫原性。

在本发明进一步的实施方式中，修饰的野生型枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 蛋白包括用同源蛋白酶的相似表位部分进行的置换，其中相似表位部分与在野生型亲本中已经被置换掉的表位相比产生减弱的免疫应答 (例如，减弱的 T-细胞应答)。例如 在一些实施方式中，用来自另一同源枯草杆菌蛋白酶例如来自解淀粉芽孢杆菌的枯草杆菌蛋白酶 BPN' 或来自枯草杆菌的枯草杆菌蛋白酶 168 的相似部分取代第 7 号肽 (即，对应于 SEQ ID NO:1 的 19-33 位)，其中该相似部分不是显著表位。在一些实施方式中，同源蛋白酶获自原核生物，而在其它实施方式中，它获自真核生物。适宜的原核生物例子包括但不限于例如大肠杆菌和假单胞菌这样的革兰氏阴性生物以及微球菌和枯草杆菌这样的革兰氏阳性微生物。

在一些实施方式中，用本领域熟知的方法修饰野生型枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 蛋白表位。(参见例如，Zoller 等人，Nucl. Acids Res. , 10:6487-6500 [1982]; 和 Yuckenberg 等人，(1991)，in McPherson (ed.)， Directed Mutagenesis: A Practical Approach， [1991]， 第 27 - 48 页)。如上所述，这些修饰包括氨基酸残基的缺失、置换、和/

或插入。例如通过位点特异性氨基酸置换修饰一个或更多个氨基酸残基。实际上，可商业获得的诱变试剂盒可用于产生这些变体蛋白。

在一些实施方式中，为置换、插入和/或缺失鉴定的氨基酸残基是保守残基，而在其它实施方式中它们不是。在涉及残基不保守的优选实施方式中，一个或更多个氨基酸的取代限于产生修饰的肽的置换，其中该修饰的肽具有不对应自然界可发现的氨基酸序列的氨基酸序列。在残基保守的情况下，这样的取代不产生天然存在的序列。

盒式诱变技术也可用于本发明中以利于构建本发明的修饰蛋白质。根据该方法，获得天然存在的编码蛋白质的基因并对其进行完全或部分测序。之后，扫描序列以得到想要在所编码蛋白质中制造一个或更多个氨基酸突变（例如，缺失、插入或置换）的点。评定该点的侧翼序列中限制位点的存在，以用寡核苷酸库取代该基因中的短片段，这样表达时将编码各种不同的突变体。优选这样的限制位点是该蛋白质基因中唯一的位点以便于基因片段的取代。然而，只要由限制性消化产生的基因片段能以正确的顺序重装，任何在该蛋白质基因中不是过度出现的方便限制位点都可用于本发明。如果在所选择的点附近方便的距离（例如，10到15个核苷酸）内没有限制性位点，那么通过在基因内置换核苷酸产生这样的位点，而最终结构中的阅读框和所编码的氨基酸都不改变。在一些实施方式中，根据本领域已知的方法通过M13引物延伸来完成为将其序列改变成需要的序列的基因突变。利用遗传密码简并、基因的限制酶图谱和大量不同的限制酶，使得定位适宜的侧翼区域、以及评估形成两个方便的限制位点序列所需的改变成为常规的任务。注意，如果可以得到一个方便的侧翼限制位点，上述方法只需要对不含限制位点的侧翼区域来使用。然而，无意于将本发明限制于这些方法，因为本领域人员已知的其它适宜方法也可用于本发明。

在一些实施方式中，一旦克隆了DNA（天然存在的或重组的），就用相关限制酶消化欲突变位置侧翼的限制位点，并将大量的末端互补寡核苷酸盒连入该基因。通过该方法使得诱变得以简化，因为可以

合成所有的寡核苷酸以使其具有相同的限制位点，且不需要合成接头来生产限制位点。

在本发明的检测方法中分析含有改变的表位的肽时，优选改变的肽比含有野生型枯草杆菌蛋白酶的肽产生更低的 T-细胞增殖。更优选地，改变后，样品中表位产生的 T-细胞增殖比基线 T-细胞增殖弱三倍，优选比基线 T-细胞增殖弱两倍，和最优选 弱于或基本等于基线 T-细胞增殖。

在一些实施方式中，根据本领域熟知的方法筛选野生型枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 蛋白及其修饰的蛋白质的蛋白水解活性。这样的方法包括但不限于 pNA 检测和二甲基酪蛋白 (DMC) 检测法 (Rothgeb 等人, J.Am Oil Chem.Soc., 65:806 [1988])。

重组 DNA 技术的应用通过改变编码目的蛋白质或肽 (即, 目的蛋白质或肽) 的 DNA 序列使得对蛋白质或肽序列的快速操作变得容易。将这一策略应用于编码修饰的枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 蛋白例如修饰的 ALCALASE®酶的基因使得改变表位序列变得容易, 这样表位不再能够激活 CD4⁺ T-细胞。在优选实施方式中, 这些改变减弱了枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 在人体中产生抗体结合抗体 (Bab) 和/或中和抗体 (Nab) 的应答的倾向。因此, 在特别优选的实施方式中, 本发明提供鉴定 ALCALASE®酶蛋白质序列中 CD4⁺ T-细胞表位的组合物和方法以及提供不再能够引发 CD4⁺ T-细胞应答的肽的生产, 当这些肽经重组 DNA 技术被整合进 ALCALASE®酶时, 预计它们将减弱 ALCALASE®酶引发抗体产生的能力。

因此, 在特定实施方式中, 编码修饰的野生型枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg (特别是 修饰的 ALCALASE®酶) 的 DNA 序列经由能够在宿主细胞中复制的表达载体导入宿主细胞。本领域技术人员很清楚用于宿主细胞例如枯草杆菌宿主细胞中的适宜载体 (参见例如 Harwood 和 Cutting (eds.), Molecular Biological Methods for Bacillus, John Wiley & Sons, (1990), 第 92 页)。转化技术进一步描述于 Chang 和 Cohen, Mol. Gen. Genet. , 168: 11 - 115 [1979]; 以

及 Smith 等人, *Appl. and Env. Microbiol.*, 51:634 [1986]). 在一些实施方式中, 不需要插入表达载体而直接将 DNA 序列导入宿主细胞。这样的方法是本领域熟知的, 包括但不限于氯化钙沉淀、电穿孔、裸 DNA 法, 等。

在一些实施方式中, 本发明修饰的野生型枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 蛋白进一步被分离和/或纯化。这用本领域公知的分离技术来完成, 包括但不限于, 离子交换层析、亲和层析、疏水分离、沉淀、过滤、微滤、凝胶电泳、以及任何其它适宜的方法。在附加的实施方式中, 一旦蛋白质被分离和/或纯化, 则向修饰的蛋白质添加进一步的组分以提供目的组合物。

枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 蛋白, 包括 ALCALASE®酶, 有大量的应用, 包括但不限于液体和粉状去污剂、织物处理配方、常规的清洁组合物和个人护理组合物。容易理解的是, 本发明的含有修饰表位的枯草杆菌蛋白酶可以用于任何 ALCALASE®酶可以使用的用途。

实验

以下实施例用于阐述本发明的特定优选实施方式和方面, 而不应解释为限制本发明的范围。

在以下的实施公开中, 使用以下缩写: eq (当量); M (摩尔/升); μM (微摩尔/升); N (Normal); mol (摩尔); mmol (毫摩尔); μmol (微摩尔); nmol (纳摩尔); g (克); mg (毫克); kg (千克); μg (微克); L (升); ml (毫升); μl (微升); cm (厘米); mm (毫米); μm (微米); nm (纳米); $^{\circ}\text{C}$ (摄氏度); h (小时); min (分钟); sec (秒); msec (毫秒); xg (重力倍数); Ci (居里); OD (光密度); Dulbecco's 磷酸缓冲液 (DPBS); HEPES (N-[2-羟乙基]哌嗪-N-[2-乙磺酸]); HBS (HEPES 缓冲盐水); SDS (十二烷基硫酸钠); Tris-HCl (三[羟甲基]氨基甲烷-盐酸); Klenow (DNA 聚合酶 I 大 (Klenow) 片段); rpm (转/分); EGTA (乙二醇双 (β -氨基乙基醚) -N, N,

N', N'-四乙酸); EDTA (乙二胺四乙酸); ATCC (美国典型培养物保藏中心, Rockville, MD); Cedar Lane (Cedar Lane 实验室, 安大略省, 加拿大); Gibco/Life Technologies (Gibco/Life Technologies, Grand Island, NY); Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO); Pharmacia (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ); Procter & Gamble (Procter and Gamble, Cincinnati, OH); Genencor (Genencor International, Palo Alto, CA); Endogen (Endogen, Woburn, MA); Cedarlane (Cedarlane, Toronto, Canada); Dynal (Dynal, Norway); Novo (Novo Industries A/S, Copenhagen, Denmark); Biosynthesis (Biosynthesis, Louisville, TX); TriLux Beta, (TriLux Beta, Wallac, Finland); DuPont/NEN (DuPont/NEN Research Products, Boston, MA); TomTec (Hamden, CT); 以及 Stratagene (Stratagene, La Jolla, CA)。

实施例 1

用人 T-细胞制备用于 ALCALASE®T-细胞表位肽鉴定检测系统的细胞

从 92 名对 ALCALASE®酶暴露状态未知的个体收集新鲜外周血细胞。如实施例 3 所述, 对这些细胞进行检测以确定 ALCALASE®中的抗原表位。

如下所述制备要用的外周单核血细胞 (室温保存, 不超过 24 小时): 向约 30 ml 获自一单位全血的棕黄层溶液中加入 Dulbecco's 磷酸缓冲液 (DPBS) 至 50 ml, 并分装入两个试管。用 12.5 ml 室温下的淋巴细胞制备密度分离培养基 (Lymphoprep density separation media (Nycomed; 密度 1.077 g/ml)) 承载 (underlaid) 样品。将试管于 600 x 重力 (g) 下离心 30 分钟。收集并混合 (pooled) 两相的界面, 并于 DPBS 中洗涤。如本领域已知, 用血细胞计数器测定所获溶液的细胞密度。如本领域已知, 用台盼蓝染色法 (trypan blue exclusion) 测定细胞活力。

如下所述，从所获溶液制备分化的树突细胞培养物，该培养物源自密度为 10^8 个细胞每 75ml 培养瓶溶液的外周血单核细胞样品：

(1) 向 50 ml 无血清 AIM V 培养基 (Gibco/BRL) 中加入以 1:100 稀释的 β -巯基乙醇 (Gibco/BRL)。将培养瓶于 37°C 下 5% CO_2 中平置两小时以允许单核细胞粘着于瓶壁；

(2) 按照下述完成单核细胞向树突细胞的分化：去除未粘着细胞，并将粘着细胞（单核细胞）与 30 ml AIM V、800 单位/ml GM-CSF (Endogen) 和 500 单位/ml IL-4 (Endogen) 混合；将获得的混合物于 37°C 下、5% CO_2 中培养 5 天。培养 5 天后，添加细胞因子 $\text{TNF}\alpha$ (Endogen) 至 0.2 单位/ml，以及添加细胞因子 IL- 1α (Endogen) 至终浓度为 50 单位/ml，将混合物在 37°C 下、5% CO_2 中再培养 2 天。

(3) 第七天，加入溶于 100 mM、含 EDTA 的磷酸缓冲液 (PBS) 中的丝裂霉素 C 至浓度 50 微克/ml，以终止已分化的树突细胞培养物的生长。于 37°C 下、5% CO_2 中孵育溶液 60 分钟。轻轻拍打培养瓶以从塑料表面驱下树突细胞。之后以 $600 \times g$ 离心树突细胞 5 分钟、于 DPBS 中洗涤树突细胞并如上所述进行计数。

(4) 将制备的树突细胞置于 96 孔圆底板中，浓度为 2×10^4 细胞/孔，每孔含总量为 100 微升的 AIM V 培养基。

用 Dynal CD4^+ T-细胞富集试剂盒 (Dynal) 提供的试剂从用于制备树突细胞的冷冻的等分量的外周血细胞制备了 CD4^+ T 细胞。将得到的 CD4^+ 细胞溶液离心、悬浮于 AIM V 培养基中，并用本领域已知的方法测定细胞密度。随后将 CD4^+ T-细胞悬浮液重悬于 AIM V 培养基中至计数为 2×10^6 个细胞/ml 以便于对 96 孔板的有效操作。

实施例 2

鉴定用于检测系统的 ALCALASE® 中的肽 T-细胞表位

根据 ALCALASE® 酶的全长氨基酸序列 (SEQ ID NO:1) 制备用于实施例 3 所描述的检测系统中的肽，合成制备了包括 ALCALASE®

整个序列的 15 聚体 (15mers)。连续的肽之间有 12 个氨基酸重叠。共生成 88 个肽 (SEQ ID NO:S: 2-89)，其序列示于附图 2。

肽抗原于 DMSO 中制成 2 mg/ml 的贮存液。首先，将 0.5 微升贮存液置于预先放置有分化的树突细胞的 96 孔板的各孔中。然后，将 100 微升如上制备的稀释的 CD4⁺T-细胞溶液添加至各孔。有用的对照包括稀释的 DMSO 空白对照，和破伤风类毒素阳性对照。

各孔中 20 微升总量下的终浓度如下：

2×10^4 CD4⁺ T-细胞

2×10^5 树突细胞 (R:S 为 10:1)

5 μ M 肽

实施例 3

用人 T-细胞对 ALCALASE®酶中的 T-细胞表位肽鉴定的检测

一旦制备好检测试剂 (即, 细胞、肽, 等) 并将其加入 96 孔板后, 即进行检测。对照包括树突细胞加上单独 CD4⁺ T-细胞 (带 DMSO 载体) 以及加上约 5 Lf/mL 破伤风类毒素 (Wyeth-Ayerst, Philadelphia, PA)。

将培养物在 37°C 下 5% CO₂ 中孵育 5 天。每孔中加入 0.5 微居里的氚标记的胸腺嘧啶 (NEN)。第二天收集培养物并用 Wallac TriBeta 闪烁探测系统评估掺入情况。

所有的测试至少重复一次。报告的所有测试都显示出对抗原破伤风类毒素的强烈阳性对照应答。应答取各试验内的平均值, 之后针对基线应答进行标准化。若应答为基线应答的至少 2.95 倍则记录为阳性事件 (即, 增殖应答)。

记录了所有 92 名供体对源自 ALCALASE®酶的肽的免疫应答 (即, T-细胞增殖), 并示于附图 3。鉴定了六个显著表位。被鉴定为特别感兴趣的肽包括肽 1、7 和 8、14、29 和 39, 如附图 2 和 3 所示。这些肽对应以下序列:

肽编号	序列	SEQ ID NO:
1	AQTVPYGIPLIKADK	2
7-8	QGFKGANVKVAVLDTGIQ	90
14	PDLNVVGGASFVAGE	15
29	PSVSLYAVKVLNSSG	30
39	TNGMDVINMSLGGPS	40

对于所测试供体,对该肽组的整个背景应答率为 $2.35 \pm 2.56\%$ 。上表中,肽 7-8 是一个 18 个氨基酸(肽#7,肽#8 加 3 个独特的氨基酸)的连续序列。之所以将肽 7 和 8 组合是由于对这两个肽都观察到了良好的应答。

实施例 4

检测变体肽

选择第 7 号和第 29 号肽作进一步分析。根据第 7 号肽和第 29 号肽的序列构建改变肽的组,其中氨基酸残基从亲本序列修饰而来。这可由商家完成,例如 Mimostopes (San Diego)。对各肽进行了丙氨酸扫描(参见例如, Harris, 等人, Immunol., 84:555-561 [1995]; 和 Maillere 等人, Mol.Immunol., 32:1073-1080 [1995])。如实施例 3 所述用改变的肽对一组供体样品进行了检测。比较增殖应答。

在一种实施方式中,如果满足了以下至少一个标准且优选满足以下全部三个标准,则某一改变的肽被认为是对产生低变应原性的蛋白质分子(即,根据本发明的修饰的枯草杆菌蛋白酶蛋白质)有用的:

(1) 对亲体肽应答的刺激指数(SI)约大于 2.95 的所有供体对改变肽的应答的 SI 约为 1.0 或更低;(2) 对亲体肽产生弱应答(SI 大于约 1.0 但小于约 2.95)的所有供体对改变肽的应答的 SI 约为 1.0 或更低;和(3) 对亲体肽不应答的所有供体对改变的肽也不应答。SI 是与对照肽相比对某肽的 T-细胞增殖应答指标。计算各肽对各供体的 SI。

实施例 5

HLA 与表位肽号的相关性

利用可商业获得的基于 PCR 的 HLA 分型试剂盒 (Bio-Synthesis) 评估所有经上述两轮检测测试的供体的 HLA-DR 和 DQ 的表达。在一些实施方式中,以自由度为 1 的 X^2 检测测试了针对某号肽的应答者和非应答者中单个 HLA-DR 和 -DQ 抗原的表型频率。无论所研究的 HLA 抗原存在于应答和非应答个体样品这两者中的何处都计算了与对应于所述肽号的表位发生反应的增强或减弱的可能性,且相应的表位被认为是与 HLA 相关的表位。

还可以分析表达表位相关 HLA 等位基因的应答者和非应答者中对单个肽的增殖应答的数量级。“对肽的个体应答者”根据刺激指数大于 2.95 来定义。预期,表达与 HLA 等位基因相关的表位的供体中的增殖应答将比不表达该相关等位基因的肽应答者中的要高。

由上可见,显然本发明提供鉴定野生型枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg, 例如 ALCALASE®, 中的 T-细胞表位的方法和组合物。一旦抗原表位得以鉴定,即根据意愿修饰表位,并且将经修饰表位的肽序列整合进野生型枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg, 这样修饰的序列不再能够引发 $CD4^+$ T-细胞应答或与野生型亲本相比 $CD4^+$ T-细胞应答显著降低。尤其是,本发明提供手段,包括适于降低 ALCALASE® 免疫原性的方法和组合物。

实施例 6

突变型变体枯草杆菌蛋白酶对二甲基酪蛋白 (“DMC”) 的水解

分析了根据本文所述方法分离纯化的突变型变体枯草杆菌蛋白酶水解商业合成底物二甲基酪蛋白 (Sigma C-9801) 的能力。在适当的缓冲液中准备 5 mg/ml DMC 底物溶液 (5 mg/ml DMC, 0.005% (w/w) Tween 80® (聚氧乙烯脱水山梨醇单油酸酯, Sigma P-1754))。制备了适当的 DMC 底物缓冲液 (例如, 50 mM 醋酸钠, pH 5.5; 50 mM N-

三(羟甲基)甲基-2-氨基乙基磺酸("TES"), pH 6.5; 50 mM 哌嗪-N-N'-二-2-乙基磺酸("PIPES"), pH 7.5; 和 50 mM Tris, pH 8.5)。开始检测时, 先将 200 μ l pH 适宜的底物加入微量滴定板板孔(例如, 96 孔板), 并在加酶之前在 37°C 下预孵育 20 分钟。用 2,4,6-三硝基苯磺酸盐("TNBS")显色反应法和 Spectra Max 250 分光光度计测定活性。该检测法测量了将 DMC 转变成带自由氨基基团的肽的酶水解。这些氨基基团与 2,4,6-三硝基苯磺酸反应形成一种黄色复合物。

因此, 反应颜色越深, 测得的活性越强。TNBS 检测法可以在在 37°C 下孵育 2 小时后的上清液中实施。在含有 2.4 g NaOH、45.4 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (加热溶解于 1000ml 中)的溶液中制备 1 mg/ml TNBS 溶液。取该溶液等量加入 96 孔板微量滴定板, 每孔 60 μ l。之后, 向各孔加入 10 μ l 上述孵育的酶溶液, 并于室温下混合 20 分钟。然后, 各孔中混入 20 μ l NaH_2PO_4 溶液(2000 ml 中含 70.4 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 和 1.2 g Na_2SO_3) 1 分钟以终止反应, 用 SpectraMax 250 分光光度计测定 405 nm 处的吸收。还制备并测定了空白对照(相同的 TNBS 溶液, 但是不加酶)。在不同的酶浓度下(0、2.5、5、7.5、和 10 ppm)用以下公式计算水解:

$$\text{吸收}_{405}(\text{酶溶液}) - \text{吸收}_{405}(\text{无酶})$$

可以用这种方法测定突变型变体相对来自已知突变型变体的枯草杆菌蛋白酶(例如已表征的突变型枯草杆菌蛋白酶)水解这样的底物的相对能力。

实施例 7

变体枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 酶对胶原蛋白、弹性蛋白和角蛋白的水解

常分析根据上述方法分离纯化的突变型枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 酶变体水解商业底物的能力, 例如牛胶原蛋白(Sigma C-9879)、牛弹性蛋白(Sigma E-1625)、和/或牛角蛋白(ICN Biomedical 902111)。制备 5 mg/ml 底物溶液(于 0.005% Tween 80®中)。以本领

域已知的适宜 pH 制备各底物（例如，pH 5.5、6.5、7.5、和 8.5）。为进行检测，于 37°C 下将 1.5 ml 各底物转入 24 孔 Costar 板。加酶前将板在 37°C 下孵育 20 分钟。在 37°C 下孵育 2 小时后在上清液中实施 TNBS 检测。

预期，这些检测方法可用于证明突变型变体相对来自已知突变型变体的枯草杆菌蛋白酶而言水解这样的底物的相对能力。在大部分情况下，预计在不同 pH 和不同酶浓度下，突变酶之间相比以及与野生型酶相比，突变酶将通常显示对胶原蛋白、弹性蛋白和角蛋白底物的显著水解。

实施例 8

蛋白质变体在哌嗪-N-N'-二-2-乙基磺酸（“PIPES”）缓冲液中的热稳定性

在这些试验中测定了 PIPES 中的蛋白质（例如，枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg）变体的热稳定性。通常用 Stratagene Robocycler 型 PCR 热循环仪实施这些测定。在每个温度下测试了 5.0 ppm 酶（例如，目的突变体和对照突变酶）在 pH6.5 下、5 个时间点（例如，5、10、20、40、和 60 分钟）的稳定性。例如，在 PCR 热循环仪梯度中 42°C ~ 56°C 范围内每两度一次、以及在 42°C ~ 56°C 范围内每隔一度一次对样品进行测试。在这些试验中，制备 50mM PIPES 缓冲液（50 mM PIPES, 0.005% Tween 80®）。典型地，将 pH 调至 6.5。然而，无意将本发明限制于特定的方法，因为本领域中已知测定酶温度稳定性的各种不同方法。

pH 6.5 和 25 °C 下，用标准琥珀酰-丙氨酸-丙氨酸-脯氨酸-苯丙氨酸-对硝基苯胺（"SAAPFpNA"）检测法测试样品（参见例如，Delmar, Anal. Biochem., 94:316-320 [1979]; 和 Achtstetter, Arch. Biochem. Biophys., 207:445-54 [1981]）。将样品稀释至约 300 毫 OD/分钟。温度稳定性典型的表示为酶半衰期（分钟），根据以下计算：

$H.L. = \ln 2 / \text{斜率}$ ，其中斜率为各温度下速率-时间曲线的斜率。

用这些方法可以容易的比较突变型变体相对于对照突变型酶和/或野生型酶的稳定性。

实施例 9

枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 变体在 N-三(羟甲基)甲基-2-氨基乙基磺酸 (“TES”) 中的温度稳定性

在这些试验中测定了变体在 TES 中的温度稳定性。如上所述, 在每个温度下检测了 5.0 ppm 酶 (例如, 目的突变体和对照) 在 pH6.5 下、5 个时间点 (例如, 5、10、20、40、和 60 分钟) 的稳定性。例如, 在 PCR 热循环仪梯度中 42°C ~ 56°C 范围内每两度一次、以及在 42°C ~ 56°C 范围内每隔一度一次对样品进行测试。将 50mM TES (Sigma T 1375) 与 0.005% Tween 80® 混合制备 TES 缓冲液。典型地, 将 pH 调至 6.5。

变体的温度稳定性可以测定为, 在 pH6.5 和 25°C 下, 采用本领域已知的琥珀酰-丙氨酸-丙氨酸-脯氨酸-苯丙氨酸-对硝基苯胺 (“AAPFPNA”) 检测法用例如 Sigma no. S-7388 (摩尔分子量 624.6 g/mole) 的试剂测定的残留变体活性 (参见例如, Delmar 等人, Anal. Biochem. , 94:316-320 [1979]; 和 Achtstetter, Arch. Biochem. Biophys. , 207:445-454 [1981])。将样品稀释至约 300 mOD/min, 用 SpectraMax 250 分光光度计在 410nm 处分光光度测定反应中形成的对硝基苯胺 (pNA): $\epsilon_M = 8480 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, ()。温度稳定性表达为上述的酶半衰期 (分钟)。如上所示, 这些试验提供了比较变体酶制剂与对照突变型酶和/或野生型酶之间的稳定性的方法。

实施例 10

枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 变体在沐浴液和其它个人护理产品中的稳定性

用以下程序测定了各种枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 变体的稳定性。

测定溶液稳定性的方法

在这些试验中，至少在两项研究中测试了枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 和突变型变体，第一项研究在 45°C 下测试 30 分钟，第二项在 50°C 下测试 30 分钟。为进行这些测试，将可商业获得的沐浴露（例如，销售商标为 ZEST® 的 Procter & Gamble 的沐浴露）与去离子水混合制备 50/50 (w/w) 沐浴露溶液。缓冲混合物的 pH 约为 6.8。

稀释要测试的酶，以使得用 SAAPFpNA 检测端点法检测 10 μ l 酶/沐浴露溶液时酶在 50 w/w % 沐浴露：去离子水溶液中的终浓度导致 OD₄₀₅ 由 0.5 变为 1.0。一旦确定了稀释的量，即可将 200 μ l 稀释了的混合物置于 96 孔微量滴定板板孔中。将板密封，置于 40°C 水浴中进行一项研究，以及置于 50°C 水浴中进行另一项研究。经过想要的时间长度（例如，30 或 45 分钟）后将板从水浴中取出，取 10 μ l 样品用端点法检测。残余活力的百分数计为终活力除以初始活力所得值的 100 倍。

在一些试验中，带有在前述实施例中确定的特异残基的变体显示出残余酶活性量增加因而比对照具有更宽的温度稳定性。例如，在 50°C 下，一些变体化合物有更大的残余活性百分数，而不带有稳定残基变体的对照突变酶和/或野生型酶具有较低的残余活性百分数。在一些试验中，所有的酶在 50°C 下在沐浴露中具有增强的稳定性，而带有不同稳定性变体的对照突变酶-[表位变体]具有更好的稳定性。

确切的说，本发明的具有减弱的免疫原性的枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 酶变体可以用于许多用途。除了去污剂和其它的清洁制剂外，免疫原性减弱的枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 酶变体还可用于个人护理产品。下列表格提供了适于在测试中使用的各种产品的组合物。这些表格中，术语“微量成分”包括 pH 调节剂、防腐剂、粘度调节剂和香料。除非特别指明，这些表格中的量代表近似重量百分比（制造商所提供的）并且无意指明有效数（significant digit）。

保湿沐浴露		pH=7
原料	量	
去离子水	QS	
甘油	4.0	
PEG-6 辛酸/癸酸甘油酯	4.0	
棕榈仁脂肪酸	3.0	
Sodium Laureth-3 Sulphate	45.0	
Cocamide MEA	3.0	
Sodium Lauroamphoacetate	25.0	
大豆油	10.0	
Polyquaternium-10 (JR30M)	0.70	
蛋白酶	1000ppm	

沐浴露	pH 6.5	pH 7	pH 8.5
原料	量	量	量
去离子水	QS	QS	QS
Sodium Laureth Sulphate	12	15	8
Cocamidopropyl 甜菜碱	8	10	15
APG 糖苷 (Plantacare 2000 ¹)	0	2	1
Polyquaternium-10 (JR30M)	0.25	0	0
Polyquaternium-7 (Mackam 55)	0	0	0.7
蛋白酶	250ppm	500ppm	1000ppm

1 - Cognis

护肤露	pH 7	pH 7	pH 7.5	pH 7
原料	量	量	量	量
去离子水	QS	QS	QS	QS
甘油	8	8	10	12
异十六烷	3	3	3	6
尼克酰胺	0	3	5	6
异丙基异硬脂酸酯	3	3	3	3
聚丙烯酰胺、异链烷烃、Laureth-7 (Sepigel 305 ²)	3	3	3	3
凡士林	4	4	4	2
尼龙 12	2	2	2.5	2.5
聚二甲基硅氧烷 (DC1403 ⁴)	2	2	2.5	2.5
蔗糖聚棉籽油	1.5	1.5	1.5	1.5
十八烷醇 97%	1	1	1	1
D 泛酰醇	1	1	1	1
DL- α 生育酚乙酸酯	1	1	1	1
十六烷醇 95%	0.5	0.5	0.5	1
BEHYNYL ALCOHOL	1	1	1	0.5
EMULGADE PL 68/50	0.4	0.4	0.5	0.5
硬脂酸	0.15	0.15	0.15	0.15
Peg-100-硬脂酸盐 (MYRJ 59 ¹)	0.15	0.15	0.15	0.15
蛋白酶	50ppm	50ppm	250ppm	1000ppm

1 - Uniqema

2 - Seppic

4 - Dow Corning

超高保湿面霜/洗面液	pH 7	pH 7
原料	量	量
去离子水	QS	QS
甘油	12	5
PEG 400 ⁶	0	10
尼克酰胺	5	7
异十六烷	5	5
聚二甲基硅氧烷 (DC1403 ³)	3	2
聚丙烯酰胺、异链烷烃、 Laureth-7 (Sepigel 305 ¹)	3	3
异丙基异硬脂酸酯	2	2
Poly methyl silsesquioxane	2	2
十六烷醇 95%	1	1
蔗糖聚棉籽油	1	1
D-泛酰醇	1	1
维生素 E (生育酚乙酸酯)	1	1
十八烷醇 95%	0.5	0.5
Cetearyl Glucoside	0.5	0.5
二氧化钛	0.3	0.3
硬脂酸	0.15	0.15
PEG-100-硬脂酸盐 (Myrj 59 ⁴)	0.15	0.15
蛋白酶	500ppm	500ppm

1 - Seppic

3 - Dow Corning

4 - Uniqema

5 - Scher Chemicals

6 - Dow Chemicals

保湿面霜	pH 7	pH 7	pH 7.5
原料	量	量	量
去离子水	QS	QS	QS
甘油	3	5	10
凡士林	3	3	0
十六烷醇 95%	1.5	1.5	1
聚二甲基硅氧烷共聚醇 (DC 3225C ⁴)	2	2	2
异丙基棕榈酸酯	1	1	0.5
Carbomer 954 ²	0.7	0.7	0.7
聚二甲基硅氧烷 (DC 200/350cs ⁴)	1	1	1
十八烷醇 97%	0.5	0.5	1
硬脂酸	0.1	0.1	0.1
Peg-100-硬脂酸盐 (MYRJ 59 ¹)	0.1	0.1	0.1
二氧化钛	0.3	0.3	0.3
蛋白酶	50ppm	250ppm	1000ppm

1 - Uniqema

2 - BF Goodrich

4 - Dow Corning

实施例 11

清洁组合物

除上述组合物外，本发明还提供开发具有特定特性的清洁组合物的方法。确切的说，本发明提供包含修饰蛋白酶（例如，枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg）的各种清洁组合物。在特别优选的实施方式中，可用于清洁大量需要蛋白酶去污处理的表面的组合物中包括了有效量的上

述一种或更多种蛋白酶。这样的清洁组合物包括用于清洁硬质表面的去污剂组合物；清洁织物的去污剂组合物；餐具清洁组合物；口腔清洁组合物；以及假牙清洁组合物。意图根据特定的目的用途来提供任何适宜形式的这些组合物。优选，本发明的清洁组合物含有约 0.0001% 至约 10% 的一种或更多种蛋白酶，更优选约 0.001% 至约 1%，和更优选约 0.001% 至约 0.1%。以下进一步讨论几个可以使用蛋白酶的各种清洁组合物的例子。除非特别指明，本文中的所有份数、百分数和比率都是按重量计的。

A. 用于硬质表面、餐具和织物的清洁组合物

本发明的蛋白酶（例如，枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 酶变体）可用于任何要求泡沫丰富和/或良好的不溶性底物去除效果的去污剂组合物。因此，本发明的蛋白酶可以与各种常规成分一起使用以提供完全配方的硬质表面清洁物、餐具清洁组合物、织物洗涤组合物，以及类似。这些组合物适于根据特定用途以任何可接受的形式（例如，液体、颗粒、条状，等）使用。此外，这些组合物还适于在可以商业获得的“浓缩”去污剂中使用，该去污剂中含有 30%-60% 重量比的表面活性剂。

在一些实施方式中，该清洁组合物包含各种阴离子、非离子、两性离子等表面活性剂。这样的表面活性剂的存在水平典型为占组合物约 0.1% 至约 60%，优选约 1% 至约 35%。适宜的表面活性剂包括但不限于，常规的 $C_{11}-C_{18}$ 烷基苯磺酸酯和伯烷基硫酸酯和任意烷基硫酸酯；分子式为 $CH_3(CH_2)_x(CHOSO_3)_{sup.- M.sup.+}CH_3$ 和 $CH_3(CH_2)_y(CHOSO_3)_{sup.- M.sup.+}CH_2CH_3$ 的 $C_{10}-C_{18}$ 仲(2,3)烷基硫酸酯，其中 x 和 $(y+1)$ 是至少约 7、优选至少约 9 的整数， M 为水溶性阳离子，特别是钠； $C_{10}-C_{18}$ 烷基烷氧基硫酸酯（特别是 EO 1-7 乙氧基硫酸酯）； $C_{10}-C_{18}$ 烷基烷氧基羧酸酯（特别是 EO 1-7 乙氧基羧酸酯）； $C_{10}-C_{18}$ 烷基聚苷，及其相应的硫酸化聚苷； $C_{12}-C_{18}$ α -磺化脂肪酸酯； $C_{12}-C_{18}$ 烷基和烷基苯酚烷氧基化物（特别是乙氧化物

和混合乙氧基/丙氧基); C_{12} - C_{18} 甜菜碱和磺基甜菜碱 (“磺基甜菜碱”); C_{10} - C_{18} 胺氧化物; C_8 - C_{24} 肌氨酸盐 (特别是油酰肌氨酸盐), 及类似。此处优选烷基烷氧基硫酸酯 (AES) 和烷基烷氧基羧酸酯 (AEC)。此外, 还优选根据想要的剂型将这样的表面活性剂与前述胺氧化物和/或甜菜碱或磺基甜菜碱表面活性剂一起使用。其它的常规有用的表面活性剂是本领域技术人员公知的, 包括但不限于特别有用的表面活性剂例如 C_{10} - C_{18} N-甲基葡糖酰胺 (参见, US 专利 No. 5 194 639)。

在一些实施方式中, 本发明的组合物包括非离子表面活性剂类别的成员, 该非离子表面活性剂是环氧乙烷与疏水部分的缩合物以形成平均亲水-亲脂平衡 (HLB) 为 5 至 17、优选 6 至 14、更优选 7 至 12 的表面活性剂。疏水 (亲脂) 部分可以是天然的脂肪族或芳香族基团, 可以容易的调节与任一特定疏水基团缩合的聚环氧乙烷的长度以产生具有所要的亲水及疏水元素平衡程度的水溶性化合物。特别优选的是每摩尔醇含 3-8 摩尔环氧乙烷的 C_9 - C_{15} 伯醇乙氧化物 (或混合乙氧基/丙氧基) 特别是每摩尔醇含 6-8 摩尔环氧乙烷的 C_{14} - C_{15} 伯醇, 每摩尔醇含 35 摩尔环氧乙烷的 C_{12} - C_{15} 伯醇, 及其混合物。

大量的其它在去污剂清洁组合物中有用的成分可用于本文的组合物, 包括其它活性成分、载体、水溶助长剂、操作助剂、染料或色素、用于液体配剂的溶剂, 等。为另外增加泡沫, 在组合物中可以加入增泡剂例如 C_{10} - C_{16} alkalamides, 典型水平为约 1% 至约 10%。 C_{10} - C_{14} 单乙醇和二乙醇酰胺代表了这种增泡剂的典型类别。将这种增泡剂与上面提到的泡沫丰富的附加表面活性剂例如胺氧化物、甜菜碱和磺基甜菜碱一起使用也是有利的。如果想要的话, 还可以加入典型为约 0.1% 至约 2% 的可溶性镁盐例如 $MgCl_2$, $MgSO_4$ 等以提供更多的泡沫。

本文的液体去污剂组合物典型地含有水和其它溶剂作为载体。低分子量的伯醇或仲醇 (例如, 甲醇, 乙醇, 丙醇, 和异丙醇) 是适宜的。一元醇对于增溶表面活性剂是优选的, 但是多元醇例如那些含有约 2 至约 6 个碳原子和约 2 至约 6 个羟基基团的多元醇 (例如, 1,3-

丙二醇、乙二醇、丙三醇、和 1,2-丙二醇)也可用于本发明的去污剂。在一些实施方式中,组合物含有约 90%,或如下约 10%至约 50%这样的载体。

此处的去污剂组合物优选配制成如下,即在水性清洁操作使用过程中,洗涤水的 pH 在约 6.8 和约 11.0 之间。因此,终产物典型的配制在这个范围内。将 pH 控制在推荐使用水平的技术包括使用缓冲剂、碱、酸等,而且是本领域技术人员熟知的。

当配制本发明的硬质表面清洁组合物和织物清洁组合物时,配制人员可能想加入重量比为约 5%至约 50%的各种增效助剂。典型的增效助剂包括 1-10 微米沸石,聚羧酸例如柠檬酸和氧联丁二酸氢(oxydisuccinate)、多层硅酸盐、磷酸,以及类似。其它常规的增效助剂是本领域已知的且适于包含在本发明的组合物中。

同样,配制人员或许想在这样的组合物中加入各种附加的酶,例如纤维素酶、脂酶、淀粉酶、过氧化物酶和蛋白酶,典型水平为约 0.001%至约 1%重量比。各种去污酶和织物护理酶是洗衣去污剂领域中熟知的并适于包含在本发明组合物中。

各种漂白化合物,例如过碳酸盐、过硼酸盐及类似,也可用于本发明组合物中。这些漂白化合物典型以约 1%至约 15%重量比水平存在。如果想要的话,这样的组合物也可以包含漂白激活剂例如四乙酰乙二胺,壬酰羟苯磺酸盐,及类似,它们也是本领域公知的。这样的化合物的使用水平典型为约 1%至约 10%重量比。

各种污垢释放剂(soil release agent),尤其是阴离子酯类低聚物型的,各种螯合剂,尤其是氨基膦酸盐和乙二胺丁二酸氢盐,各种土块去除剂(clay soil removal agent),尤其是乙氧基化的四亚乙基戊胺,各种分散剂,尤其是聚丙烯酸酯和聚天冬氨酸,各种增亮剂,尤其是阴离子增亮剂,各种染料转移抑制剂,例如聚乙烯基吡咯烷酮,各种抑泡剂,尤其是硅氧烷和仲醇,各种织物柔软剂,尤其是绿土块和污垢絮凝(clay flocculating)聚合物(例如,聚(环氧乙烷)),及类似,都可用于本发明组合物中,最典型的水平是自约 1%至约 35%重量比。

酶稳定剂也可用于本发明的清洁组合物。这样的酶稳定剂包括但不限于丙二醇（优选自约 1% 至约 10%）、甲酸钠（优选自约 0.1% 至约 1%）和甲酸钙（优选自约 0.1% 至约 1%）。

1. 硬质表面清洁组合物

在优选实施方式中，本发明的硬质表面清洁组合物含有有效量的一种或更多种蛋白酶（例如，枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 酶变体），活性蛋白酶占组合物重量比优选自约 0.0001% 至约 10%，更优选自约 0.001% 至约 5%，还更优选自约 0.001% 至约 1%。除了含有一种或更多种蛋白酶，这样的硬质表面清洁组合物还典型地含有表面活性剂和水溶性螯合助剂。然而，在特定的专业产品例如喷涂窗户清洁剂中，有时候不使用表面活性剂因为它们可能在玻璃表面产生薄膜/条纹状残留物。

如果存在表面活性剂组分，其含量可以低至占本文组合物的 0.1%，但是典型地组合物将含有约 0.25% 至约 10%、更优选自约 1% 至约 5% 的表面活性剂。

典型地，组合物包含约 0.5% 至约 50% 的去污助剂，优选自约 1% 至约 10%。优选，pH 应当在约 8 至 12 之间。如果需要调节的话，可以用常规的 pH 调节剂例如氢氧化钠、碳酸钠或盐酸。

在一些实施方式中，组合物中包括至少一种溶剂。有用的溶剂包括但不限于，乙二醇醚，例如二乙基乙二醇单己基醚，二乙基乙二醇单丁基醚，乙二醇单丁基醚，乙二醇单己基醚，丙二醇单丁基醚，二丙二醇单丁基醚，和二醇例如 2,2,4-三甲基-1,3 戊二醇和 2-乙基-1,3-己二醇。使用时，这样的溶剂典型地以自约 0.5% 至约 15%，优选自约 3% 至约 11% 的水平存在。

此外，高挥发性溶剂例如异丙醇或乙醇可用于本发明的组合物，以使得当在表面上应用了“全强度（full strength）”的组合物后不对表面进行清洗时利于组合物从表面更快地蒸发。使用时，挥发性溶剂典型的存在水平为占组合物约 2% 至约 12%。

用以下非限制性例子举例说明本发明的硬质表面清洁组合物实施方式。在以下例子中，例子中提及的“蛋白酶 #”是指在本发明组合物中有用的变体，该组合物中免疫应答减弱的蛋白酶变体百分比为 0.10、0.20、0.10、0.05、0.03、和 0.02。

硬质表面液体清洁组合物						
组分	例子编号					
	1	2	3	4	5	6
EDTA**			2.90	2.90		
柠檬酸钠					2.90	2.90
NaC ₁₂ 烷基-苯	1.95		1.95		1.95	
NaC ₁₂ 烷基硫酸酯		2.20		2.20		2.20
NaC ₁₂ (乙氧基) ***		2.20		2.20		2.20
C ₁₂ 二甲胺		0.50		0.50		0.50
异丙基苯磺酸钠	1.30		1.30		1.30	
己基卡必醇***	6.30	6.30	6.30	6.30	6.30	6.30
水****	平衡至 100%					

**Na₄ 乙二胺二乙酸

***二乙二醇单己基醚

****所有配剂调至 pH 7。

在上述例子的一些实施方式中，用在本发明中有用的另外的蛋白酶（例如，枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 酶变体）替换得到了基本相似的结果。此外，在上述例子的一些实施方式中，在上述配方中，用在本发明中有用的、免疫原性减弱的蛋白酶的任意组合（例如，枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 酶变体）替换得到了基本相似的结果。

下表提供了适于清洁硬质表面和除霉的样品组合物。产物组合物的典

型 pH 约为 7。

用于清洁硬质表面和去除家庭霉菌的喷剂组合物						
组分	例子编号					
	7	8	9	10	11	12
蛋白酶 #	0.20	0.05	0.10	0.30	0.20	0.30
蛋白酶 #+14					0.30	0.10
辛基磺酸钠	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
十二烷基硫酸钠	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
NaOH	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80
硅酸盐 (Na)	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
香料	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35
水	平衡至 100 %					

在这些例子中，用在本发明中有用的蛋白酶（例如，枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 酶变体）的任意组合替换得到了基本相似的结果。

2. 餐具洗涤组合物

在本发明另外的实施方式中，提供了一种或更多种蛋白酶（例如，突变型枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 酶）的餐具洗涤组合物。以下举例说明了本发明优选的餐具洗涤组合物实施方式。其中的蛋白酶百分含量为 0.5、0.4、0.1、0.05、0.03、和 0.02。这些组合物中，将产物的 pH 调至 7。

餐具洗涤组合物						
组分	例子编号					
	13	14	15	16	17	18
C ₁₂ -C ₁₄ N-甲基-	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90
C ₁₂ 乙氧基 (1) 硫酸酯	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0
2-甲基十一烷酸	4.50	4.50		4.50	4.50	
C ₁₂ 乙氧基 (2) 羧酸酯	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50
C ₁₂ 醇乙氧化物 (4)	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
C ₁₂ 胺氧化物	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
异丙基苯磺酸钠	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
乙醇	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
Mg Supp ⁺⁺ (MgCl ₂)	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Ca Supp ⁺⁺ (CaCl ₂)	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40
水	平衡至 100%					

在上述紧接的例子的一些实施方式中，用在本发明中有用的蛋白酶（例如，枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 酶变体）替换得到了基本相似的结果。此外，在上述紧接的例子的一些实施方式中，用在本发明中有用的蛋白酶（例如，枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 酶变体）的任意组合在上述配方中替换得到了基本相似的结果。

颗粒状自动餐具洗涤组合物			
组分	例子		
	A	B	C
柠檬酸	15.0		
柠檬酸盐	4.0	29.0	15.0
丙烯酸/甲基丙烯酸共聚物	6.0		6.0
丙烯酸马来酸共聚物		3.7	
干加的碳酸盐	9.0		20.0
碱金属硅酸盐	8.5	17.0	9.0
石蜡		0.5	
苯并三唑		0.3	
Termamyl 60T	1.5	1.5	1.0
蛋白酶 #4 (4.6%金属小球)	1.6	1.6	1.6
过碳酸盐 (AvO)	1.5		
过硼酸盐单水合物		0.3	1.5
过硼酸盐四水合物		0.9	
四乙酰乙二胺	3.8	4.4	
二乙基三胺五甲基磷酸 (Mg 盐)	0.13	0.13	0.13
3x 乙氧基化的烷基乙氧基硫酸酯	3.0		
烷基乙氧基丙氧基非离子 表面活性剂			
抑泡剂	2.0		
Olin SLF18 非离子 表面活性剂			
硫酸盐			

在上述配方中,用在本发明中有用的、免疫原性减弱的蛋白酶(例如,枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 酶变体)替换得到了基本相似的结果。还是在上述紧接着的配方中,可以以基本相似的结果将本文所述的、在本发明中有用的蛋白酶(例如,枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 酶变体)的任意组合替换进去。

3. 织物清洁组合物

本发明进一步提供含有一种或更多种蛋白酶的织物清洁组合物

(例如, 枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 酶变体)。

a. 颗粒织物清洁

本发明的颗粒状织物清洁组合物包含有效量的一种或更多种蛋白酶(例如, 枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 酶变体), 活性蛋白酶与组合物的重量比优选为自约 0.001% 至约 10%, 更优选自约 0.005% 至约 5%, 更优选自约 0.01% 至约 1%。除一种或更多种蛋白酶外, 该颗粒织物清洁组合物还典型含有至少一种表面活性剂, 一种或更多种增效助剂, 在有些情况中还含有漂白剂。通过以下例子举例说明本发明的颗粒状织物清洁组合物实施方式。

颗粒状织物清洁组合物				
组分	例子编号			
	20	21	22	23
蛋白酶 (4% Prill)	0.10	0.20	0.03	0.05
蛋白酶 (4% Prill)			0.02	0.05
C ₁₃ 线性烷基苯磺酸酯	22.0	22.0	22.0	22.0
磷酸盐 (如, 三聚磷酸钠)	23.0	23.0	23.0	23.0
碳酸钠	23.0	23.0	23.0	23.0
硅酸钠	12.0	14.0	14.0	14.0
沸石	8.20	8.20	8.20	8.20
螯合剂(二乙基三胺五乙酸)	0.40	0.40	0.40	0.40
硫酸钠	5.50	5.50	5.50	5.50
水	平衡至 100%			

在上述配方中, 用在本发明中有用的、免疫原性减弱的蛋白酶(例如, 枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 酶变体) 替换得到了基本相似的结果。还是在上述紧接着的配方中, 可以以基本相似的结果将本文所述的、

在本发明中有用的蛋白酶（例如，枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 酶变体）的任意组合替换进去。

颗粒状织物清洁组合物				
组分	例子编号			
	24	25	26	27
蛋白酶 # (4% Prill)	0.10	0.20	0.03	0.05
蛋白酶 # +1 (4% Prill)			0.02	0.05
C ₁₂ 烷基苯磺酸酯	12.0	12.0	12.0	12.0
Zeolite A (1-10 μm)	26.0	26.0	26.0	26.0
2-丁基辛酸	4.0	4.0	4.0	4.0
C ₁₂ -C ₁₄ secondary (2, 3)	5.0	5.0	5.0	5.0
柠檬酸钠	5.0	5.0	5.0	5.0
光学增亮剂	0.10	0.10	0.10	0.10
硫酸钠	17.0	17.0	17.0	17.0
填料, 水, 微量成分	平衡至 100 %			

在上述配方中，用在本发明中有用的、免疫原性减弱的蛋白酶（例如，枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 酶变体）替换得到了基本相似的结果。还是在上述配方中，可以以基本相似的结果将本文所述的、在本发明中有用的蛋白酶（例如，枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 酶变体）的任意组合替换进去。

颗粒状织物清洁组合物		
组分	例子编号	
	28	29
线性烷基苯磺酸酯	11.4	10.7
牛油烷基硫酸酯	1.8	2.4
C ₁₄₋₁₅ 烷基硫酸酯	3.0	3.10
7 倍乙氧基化的 C ₁₄₋₁₅ 醇	4.0	4.0
11 倍乙氧基化的牛油醇	1.8	1.8
分散剂	0.07	0.1
硅氧烷流体	0.80	0.80
柠檬酸三钠	14.0	15.0
柠檬酸	3.0	2.5
沸石	32.5	32.1
马来酸丙烯酸共聚物	5.0	5.9
二乙基三胺五亚甲基	1.0	0.20
蛋白酶 # (4% Prill)	0.30	0.30
脂酶	0.36	0.40
淀粉酶	0.30	0.30
硅酸钠	2.0	2.5
硫酸钠	3.5	5.2
聚乙烯吡咯烷酮	0.3	0.5
过硼酸盐	0.5	1
苯酚磺酸盐	0.1	0.2
过氧化物酶	0.1	0.1
微量成分	加至 100	

颗粒状织物清洁组合物

组分	例子编号	
	30	31
线性 C ₁₂ 烷基苯磺酸钠	6.5	8.0
硫酸钠	15.0	18.0
沸石	26.0	22.0
次氨基三乙酸钠	5.0	5.0
聚乙烯吡咯烷酮	0.5	0.7
四乙酰乙二胺	3.0	3.0
硼酸	4.0	
过硼酸盐	0.5	1
苯酚硫酸盐	0.1	0.2
蛋白酶 #4 (4% Prill)	0.4	0.4
填料 (例如, 硅酸盐, 碳酸盐, 香料)	加至 100	

在另外的实施方式中, 提供了致密的颗粒状织物清洁组合物, 例如下述。所提供的成分以重量百分数计。组合物 1: 烷基硫酸酯 (8.0)、烷基乙氧基硫酸酯 (2.0)、3 和 7 倍乙氧基化的 C₂₅ 和 C₄₅ 醇的混合物 (6.0)、多羟基脂肪酸酰胺 (2.5)、沸石 (17.0)、多层硅酸盐/柠檬酸盐 (16.0)、碳酸盐 (7.0)、马来酸丙烯酸共聚物 (5.0)、污垢释放聚合物 (0.4)、羧甲基纤维素 (0.4)、聚(4-乙烯吡啶)-N-氧化物 (0.1)、乙烯基咪唑和乙烯基吡咯烷酮的共聚物 (0.1)、PEG-2000 (0.2)、蛋白酶 # (4% Prill) (0.5)、脂酶 (0.2)、纤维素酶 (0.2)、四乙酰乙二胺 (6.0)、过碳酸盐 (22.0)、乙二胺 二琥珀酸 (0.3)、抑泡剂 (3.5)、二钠-4,4'-二(2-吗啉代-4-苯氨基-s-三嗪-6-基氨基) 芪-2, 2'-二硫酸盐 (0.25)、二钠-4,4'-二(2-sulfostyryl) 二苯基 (0.05), 以及水、香料和微量成分 (加至 100) 的组合。

在另一个作为选择的颗粒状织物清洁组合物中, 提供了以下成分。

所提供的成分以重量百分数计。组合物 2: 线性烷基苯磺酸酯 (7.6)、C₁₆-C₁₈ 烷基硫酸酯 (1.3)、7 倍乙氧基化的 C₁₄₋₁₅ 醇 (4.0)、椰油-烷基-二甲基羟基乙基氯化铵 (1.4)、分散剂 (0.07)、硅氧烷流体 (0.8)、柠檬酸三钠 (5.0)、沸石 4A (15.0)、马来酸丙烯酸共聚物 (4.0)、二乙基三胺五亚甲基膦酸 (0.4)、过硼酸盐 (15.0)、四乙酰乙二胺 (5.0)、绿土块 (10.0)、聚(环氧乙烷)(MW 300 000) (0.3)、蛋白酶 # (4% Prill) (0.4)、脂酶 (0.2)、淀粉酶 (0.3)、纤维素酶 (0.2)、硅酸钠 (3.0)、碳酸钠 (10.0)、羧甲基纤维素 (0.2)、增亮剂 (0.2), 以及水、香料和微量成分 (加至 100) 的组合。

在又一作为选择的颗粒状织物清洁组合物中, 提供了以下成分。所提供的成分以重量百分数计。组合物 2: 线性烷基苯 (6.92)、牛油烷基硫酸酯 (2.05)、7 倍乙氧基化的 C₁₄₋₁₅ 醇 (4.4)、C₁₂₋₁₅ 烷基乙氧基硫酸酯 - 3 倍乙氧基化的 (0.16)、沸石 (20.2)、柠檬酸盐 (5.5)、碳酸盐 (15.4)、硅酸盐 (3.0)、马来酸丙烯酸共聚物 (4.0)、羧甲基纤维素酶 (0.31)、污垢释放聚合物 (0.30)、蛋白酶 # (4% Prill) (0.2)、脂酶 (0.36)、纤维素酶 (0.13)、过硼酸盐四水合物 (11.64)、过硼酸盐单水合物 (8.7)、四乙酰乙二胺 (5.0)、二乙基三胺五亚甲基膦酸 (0.38)、硫酸镁 (0.40)、增亮剂 (0.19), 香料、硅氧烷和抑泡剂的混合物 (0.85), 以及微量成分 (加至 100)。

在上述配方中, 用在本发明中有用的、免疫原性减弱的蛋白酶 (例如, 枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 酶变体) 替换得到了基本相似的结果。还是在上述配方中, 可以以基本相似的结果将在本发明中有用的蛋白酶 (例如, 枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 酶变体) 的任意组合替换进去。

b. 液体织物清洁组合物

本发明的液体织物清洁组合物含有有效量的一种或更多种蛋白酶 (例如, 枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 酶变体), 活性蛋白酶与组合物的重量比优选为自约 0.0001% 至约 10%, 更优选自约 0.001% 至约 1%, 和最优选自约 0.001% 至约 0.1%。这样的液体织物清洁组合物一般还

含有阴离子表面活性剂、脂肪酸、水溶性去污增效助剂和水。通过以下例子举例说明本发明的液体织物清洁组合物实施方式。

液体织物清洁组合物					
组分	例子编号				
	35	36	37	38	39
蛋白酶 #	0.05	0.03	0.30	0.03	0.10
蛋白酶 # +1				0.01	0.20
C ₁₂ -C ₁₄ 烷基硫酸盐, Na	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
2-丁基辛酸	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
柠檬酸钠	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
C ₁₀ 醇乙氧化物 (3)	13.0	13.0	13.0	13.0	13.0
单乙醇胺	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
水/丙二醇/乙醇	平衡至 100% (100:1:1)				

在上述配方中,用在本发明中有用的、免疫原性减弱的蛋白酶(例如,枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 酶变体)替换得到了基本相似的结果。还是在上述配方中,可以以基本相似的结果将在本发明中有用的蛋白酶(例如,枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 酶变体)的任意组合替换进去。

液体织物清洁组合物		
组分	例子编号	
	40	41
C ₁₂₋₁₄ 烷基琥珀酸	3.0	8.0
柠檬酸单水合物	10.0	15.0
C ₁₂₋₁₅ 烷基硫酸钠	8.0	8.0
2 倍乙氧基化的 C ₁₂₋₁₅ 醇硫酸钠		3.0
7 倍乙氧基化的 C ₁₂₋₁₅ 醇		8.0
5 倍乙氧基化的 C ₁₂₋₁₅ 醇	8.0	
二乙基三胺五 (亚甲基膦酸)	0.2	
油酸	1.8	
乙醇	4.0	4.0
丙二醇	2.0	2.0
蛋白酶 #	0.2	0.2
聚乙烯吡咯烷酮	1.0	2.0
抑泡剂	0.15	0.15
NaOH	至 pH 7.5	
过硼酸盐	0.5	1.0
苯酚磺酸盐	0.1	0.2
过氧化物酶	0.4	0.1
水和微量成分	加至 100	

在上述配方中, 用在本发明中有用的、免疫原性减弱的蛋白酶(例如, 枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 酶变体) 替换得到了基本相似的结果。还是在上述紧接着的配方中, 可以以基本相似的结果将在本发明中有用的蛋白酶(例如, 枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 酶变体) 的任意组合替换进去。

c. 条状织物清洁组合物

适宜手洗受污织物的本发明的条状织物清洁组合物包含有效量的一种或更多种蛋白酶(例如, 枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 酶变体), 优选占组合物重量约 0.001% 至约 10%, 更优选自约 0.01% 至约 1%。通过以下例子对本发明的条状织物清洁组合物的实施方式进行举例说

明。

条状织物清洁组合物				
组分	例子编号			
	42	43	44	45
蛋白酶 #	0.3		0.1	0.02
蛋白酶 # +1			0.4	0.03
C ₁₂ -C ₁₆ 烷基硫酸盐, Na	20.0	20.0	20.0	20.0
C ₁₂ -C ₁₄ -N-甲基葡糖胺	5.0	5.0	5.0	5.0
C ₁₁ -C ₁₃ 烷基苯磺酸盐, Na	10.0	10.0	10.0	10.0
碳酸钠	25.0	25.0	25.0	25.0
焦磷酸钠	7.0	7.0	7.0	7.0
三缩聚磷酸钠	7.0	7.0	7.0	7.0
沸石 A (0.1-10 μm)	5.0	5.0	5.0	5.0
羧甲基纤维素	0.2	0.2	0.2	0.2
聚丙烯酸盐 (MW 1400)	0.2	0.2	0.2	0.2
椰油单乙醇酰胺	5.0	5.0	5.0	5.0
增亮剂, 香料	0.2	0.2	0.2	0.2
CaSO ₄	1.0	1.0	1.0	1.0
MgSO ₄	1.0	1.0	1.0	1.0
水	4.0	4.0	4.0	4.0
填料 (例如, CaCO ₃ , 滑石粉, 白土 (clay), 硅酸盐, 等)	平衡至 100%			

在上述配方中, 用在本发明中有用的、免疫原性减弱的蛋白酶 (例如, 枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 酶变体) 替换得到了基本相似的结果。还是在上述配方中, 可以以基本相似的结果将在本发明中有用的蛋白酶 (例如, 枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 酶变体) 的任意组合替换进去。

B. 另外的清洁组合物

除上述讨论的硬质表面清洁、餐具洗涤和织物清洁组合物之外，一种或更多种蛋白酶（例如，枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 酶变体）可用作各种其它想要对不溶性底物进行水解的清洁组合物的组分。所述其它清洁组合物包括但不限于口腔清洁组合物、假牙清洁组合物、和隐形眼镜清洁组合物，以及其它个人护理清洁组合物。

1. 口腔清洁组合物

在本发明的补充实施方式中，对从牙齿或假牙上清除蛋白质污渍有用的组合物中含有药学上可接受量的一种或更多种蛋白酶（例如，枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 酶变体）。优选地，本发明的口腔清洁组合物含有占组合物重量约 0.0001% 至约 20%，更优选自约 0.001% 至约 10%，还更优选自约 0.01% 至约 5% 的一种或更多种蛋白酶，以及药学上可接受的载体。典型地，口腔清洁组合物中的药学上可接受的口腔清洁载体组分一般占组合物重量约 50% 至约 99.99%，优选自约 65% 至约 99.99%，更优选自约 65% 至约 99%。

在本发明的口腔清洁组合物中可以含有的药学上可接受的载体组分以及任选组分是本领域技术人员公知的。US 专利 No. 5 096 700；US 专利 No. 5 028 414；和 US 专利 No. 5 028 415 公开了大量在口腔清洁组合物中有用的组合物类型、载体组分和任选组分，将它们引入本文作为参考。用以下例子举例说明本发明口腔清洁组合物的实施方式。

口腔洁齿清洁组合物				
组分	例子编号			
	46	47	48	49
蛋白酶 #	2.0	3.5	1.5	2.0
山梨醇 (70% 水溶液)	35.0	35.0	35.0	35.0
PEG-6*	1.0	1.0	1.0	1.0
二氧化硅牙齿摩擦剂**	20.0	20.0	20.0	20.0
氟化钠	0.243	0.243	0.243	0.243
氧化钛	0.5	0.5	0.5	0.5
糖精钠	0.286	0.286	0.286	0.286
烷基硫酸钠 (27.9%)	4.0	4.0	4.0	4.0
香料	1.04	1.04	1.04	1.04
羧乙烯聚合物***	0.30	0.30	0.30	0.30
角叉菜聚糖****	0.8	0.8	0.8	0.8
水	平衡至 100 %			

*PEG-6—聚乙二醇，MW 为 600。

**称为 Zeodent 119 (J.M.Huber) 的沉淀二氧化硅。

***Carbopol (B.F.Goodrich Chemical Co.)。

****Iota carrageenan (Hercules Chemical Co.)。

在上述配方中，用在本发明中有用的、免疫原性减弱的蛋白酶(例如，枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 酶变体)替换得到了基本相似的结果。还是在上述配方中，可以以基本相似的结果将在本发明中有用的蛋白酶(例如，枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 酶变体)的任意组合替换进去。

漱口组合物				
组分	例子编号			
	50	51	52	53
蛋白酶 #	3.0	7.5	1.0	5.0
SDA 40 醇	8.0	8.0	8.0	8.0
香料	0.08	0.08	0.08	0.08
乳化剂	0.08	0.08	0.08	0.08
氟化钠	0.05	0.05	0.05	0.05
甘油	10.0	10.0	10.0	10.0
增甜剂	0.02	0.02	0.02	0.02
苯甲酸	0.05	0.05	0.05	0.05
NaOH	0.20	0.20	0.20	0.20
染料	0.04	0.04	0.04	0.04
水	平衡至 100 %			

在上述配方中，用在本发明中有用的、免疫原性减弱的蛋白酶（例如，枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 酶变体）替换得到了基本相似的结果。还是在上述配方中，可以以基本相似的结果将在本发明中有用的蛋白酶（例如，枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 酶变体）的任意组合替换进去。

锭剂组合物				
组分	例子编号			
	54	55	56	57
蛋白酶 #	0.01	0.03	0.10	0.02
山梨醇	17.50	17.50	17.50	17.50
甘露醇	17.50	17.50	17.50	17.50
淀粉	13.60	13.60	13.60	13.60
甜味剂	1.20	1.20	1.20	1.20
香料	11.7	11.7	11.7	11.7
颜料	0.10	0.10	0.10	0.10
玉米糖浆	平衡至 100 %			

在上述配方中，用在本发明中有用的、免疫原性减弱的蛋白酶（例如，枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 酶变体）替换得到了基本相似的结果。

还是在上述配方中，可以以基本相似的结果将在本发明中有用的蛋白酶（例如，枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 酶变体）的任意组合替换进去。

口香糖组合物				
组分	例子编号			
	58	59	60	61
蛋白酶 #	0.03	0.02	0.10	0.05
山梨醇晶体	38.44	38.4	38.4	38.4
Paloja-T 胶基质*	20.0	20.0	20.0	20.0
山梨醇(70% 水溶液)	22.0	22.0	22.0	22.0
甘露醇	10.0	10.0	10.0	10.0
甘油	7.56	7.56	7.56	7.56
香料	1.0	1.0	1.0	1.0
玉米糖浆	平衡至 100%			

*由 L.A.Dreyfus Co.提供。

在上述配方中，用在本发明中有用的、免疫原性减弱的蛋白酶（例如，枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 酶变体）替换得到了基本相似的结果。还是在上述配方中，可以以基本相似的结果将在本发明中有用的蛋白酶（例如，枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 酶变体）的任意组合替换进去。

2.假牙清洁组合物

还是在补充实施方式中，本发明提供各种用于在口腔外清洁假牙的假牙清洁组合物，它含有一种或更多种蛋白酶（例如，枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 酶变体）。这样的假牙清洁组合物含有有效量的一种或更多种蛋白酶（例如，枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 酶变体），所述一种或更多种蛋白酶与组合物的重量比优选为约 0.0001%至约 50%，更优选自约 0.001%至约 35%，更优选自约 0.01%至约 20%，所述组合物还含有假牙清洁载体。各种假牙清洁组合物形式例如泡腾片等是本领

域熟知的(参见例如, US 专利 No. 5 055 305, 引入本文作为参考), 而且通常适于加入用于从假牙去除蛋白质污渍的一种或更多种蛋白酶。

通过以下例子举例说明本发明假牙清洁组合物的实施方式。

假牙清洁双层泡腾片组合物				
组分	例子编号			
	62	63	64	65
酸性层:				
蛋白酶 #	1.0	1.5	0.01	0.05
酒石酸	24.0	24.0	24.0	24.0
碳酸钠	4.0	4.0	4.0	4.0
氨基磺酸	10.0	10.0	10.0	10.0
PEG 20 000	4.0	4.0	4.0	4.0
碳酸氢钠	24.5	24.5	24.5	24.5
过硫酸钾	15.0	15.0	15.0	15.0
焦磷酸钠	7.0	7.0	7.0	7.0
氧化硅	2.0	2.0	2.0	2.0
四乙酰乙二胺	7.0	7.0	7.0	7.0
蓖麻醇磺基琥珀酸酯	0.5	0.5	0.5	0.5
香料	1.0	1.0	1.0	1.0
碱性层:				
过硼酸钠单水合物	32.0	32.0	32.0	32.0
碳酸氢钠	19.0	19.0	19.0	19.0
EDTA	3.0	3.0	3.0	3.0
三聚缩磷酸钠	12.0	12.0	12.0	12.0
PEG 20 000	2.0	2.0	2.0	2.0
过硫酸钾	26.0	26.0	26.0	26.0
碳酸钠	2.0	2.0	2.0	2.0
氧化硅	2.0	2.0	2.0	2.0
染料/香料	2.0	2.0	2.0	2.0

在上述配方中, 用在本发明中有用的、免疫原性减弱的蛋白酶(例如, 枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 酶变体) 替换得到了基本相似的结果。

还是在上述配方中，可以以基本相似的结果将在本发明中有用的蛋白酶（例如，枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 酶变体）的任意组合替换进去。

3.个人清洁组合物

在本发明的补充实施方式中，用于清洁皮肤的个人清洁组合物含有一种或多种蛋白酶（例如，枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 酶变体）。这样的组合物典型地含有占组合物重量比为自约 0.001% 至约 5% 的蛋白酶（例如，枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 酶变体），优选自约 0.005% 至约 2%，和最优选自约 0.01% 至约 0.8%。其中可以包括本文所述蛋白酶的优选个人清洁组合物包括但不限于在 US 专利申请系列号 08/121 623 和 08/121 624 中所描述的那些。尽管本发明预期可以使用各种组合物，一种含有皂组分的液体个人清洁组合物含有（重量%）：皂（K 或 Na）（15.00）、30% 月桂酸盐、30% 肉豆蔻酸盐、25% 棕榈酸盐、15% 硬脂酸盐、脂肪酸（上述比率）（4.50）、月桂肌氨酸钠（6.00）、laureth-3 硫酸钠（0.66）、cocamido propylbetaine（1.33）、丙三醇（15.00）、丙二醇（9.00）、polyquaternium 10（0.80）、乙二醇二硬脂酸（EDTA）（1.50）、对羟基苯甲酸丙酯（0.10）、羟苯甲酯（0.20）、蛋白酶 #（0.10）、KOH 或 NaOH（如果需要调节 pH）、硫酸钙（3）、乙酸（3），以及水（平衡至 100）。

在另一实施方式中，本发明还提供了个人清洁条状物。尽管本发明预期了各种组合物，一种含有皂成分的条状个人清洁组合物包括（重量比）：椰油羟乙基磺酸钠（47.20）、cetearyl 磺酸钠（9.14）、石蜡（9.05）、钠皂（原位）（3.67）、羟乙基磺酸钠（5.51）、氯化钠（0.45）、二氧化钛（0.4）、EDTA 三钠（0.1）、羟乙磷酸三钠（0.1）、香料（1.20）、Na₂SO₄（0.87）、蛋白酶 #（0.10），以及水和微量成分的混合物（平衡至 100）。

在上述配方中，用在本发明中有用的、免疫原性减弱的蛋白酶（例如，枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 酶变体）替换得到了基本相似的结果。还是在上述配方中，可以以基本相似的结果将在本发明中有用的蛋白

酶（例如，枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 酶变体）的任意组合替换进去。

实施例 12

洗涤性能测试

可以用本领域公知的任何适宜方法来评估在本发明组合物中有用的变体的洗涤性能。本实施例中描述了一种测定从 EMPA 116（棉底质上的血渍/奶渍/碳黑）布样（Testfabrics, Inc., Middlesex, N. J. 07030）上去除污渍的适宜方法。

将六块切成 3×4 1/2 英寸、带红边的 EMPA 116 布放在各个 Model 7243S Terg-O-Tometer（United States Testing Co., Inc., Hoboken, N. J.）罐子里，该 Model 7243S Terg-O-Tometer 含有 1000 ml 硬度为 15gpg（Ca⁺⁺:Mg⁺⁺:3:1:w:w）的水、7 g 去污剂以及适量酶。基础去污剂是 wfk--Testgewebe GmbH,（Krefeld, Germany）的 WFK1 去污剂，它具有以下组分（%最终配方）：沸石 A（25%）、硫酸钠（25%）、苏打灰（10%）、线性烷基苯磺酸酯（8.8%）、醇乙氧化物（7-8 EO）（4.5%）、钠皂（3%）、和硅酸钠（SiO₂:Na₂O:: 3.3:1）（3%）。

向该基础去污剂中再加入以下物质（%最终配方）：过硼酸钠单水合物（13%）、共聚物（Sokalan CP5）（4%）、TAED（Mykon ATC Green）（3%）、酶（0.5%），和增白剂（Tinopal AMS-GX）（0.2%）。

过硼酸钠单水合物可从各种商业途径获得，包括 Degussa Corporation, Ridgefield-Park. Sokalan CP5 获自 BASF Corporation, Parsippany, N. J.. Mykon ATC Green（TAED，四乙酰乙二胺）可从 Warwick International, Limited, England 获得。Tinopal AMS GX 可从 Ciba-Geigy Corporation, Greensboro, N. C. 得到。

在一种适宜的测试方法中，将六块 EMPA 116 布在含酶的去污剂中 60℃ 洗涤 30 分钟，在 1000 ml 水中漂洗两次各 5 分钟。以 0.05 至 1 ppm 的终浓度加入酶制定标准曲线，以 0.25 ppm 作常规分析。将布烘干、压平，用 Minolta Chroma Meter, Model CR-200（Minolta Corporation, Ramsey, NJ.）L*a*b*标度的 L 值来测定布的反射度。

在一些实施方式中，测试酶的性能以解淀粉芽孢杆菌 (BPN') 蛋白酶性能的百分数表示，并且通过用解淀粉芽孢杆菌 (BPN') 蛋白酶的量除以去除相同污渍所需的蛋白酶变体 (例如，枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 酶变体) 量再乘以 100 来计算。

实施例 13

变体枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 在液体去污剂配剂中的稳定性

本实施例提供一种比较蛋白酶 (例如，枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 酶变体) 与解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶及其变体酶在液体去污剂中对抗失活的稳定性的方法。由于其它方法可用于本发明，因此无意于将本发明限制于该方法。

本方法中，用于研究的去污剂配剂是可以商业获得的洗衣去污剂 (例如，Tide® Ultra 液体洗衣去污剂 (Proctor & Gamble))。在一些实施方式中，需要对去污剂配剂进行热处理以使原来的蛋白酶失活。这通过将去污剂在 96°C 下孵育 4.5 小时来完成。之后将 20 克酶/升范围内的欲检测解淀粉芽孢杆菌枯草杆菌蛋白酶及变体 (例如，枯草杆菌蛋白酶 Carlsberg 酶变体) 浓缩制剂加入经热处理的去污剂，室温下在去污剂配剂中的终浓度为 0.3 克酶/升。之后将添加了蛋白酶的热处理去污剂在 50°C 水浴中孵育。以 0、24、46、76、和 112 小时的间隔从孵育试管中取出等分试样，并将其加入 1 cm 的比色杯中检测酶活性，该比色杯中含有 1.2 mM 溶于 0.1M Tris-HCL 缓冲液中的合成肽底物 suc-Ala-Ala-Pro-phe-对硝基苯胺，pH 8.6，25°C。通过监控反应产物对硝基苯胺在 410nm 处的吸收与时间的函数用分光光度法跟踪初始线性反应速率。在优选实施方式中观察到，优选的变体比天然解淀粉芽孢杆菌酶具有显著更强的对抗失活的稳定性。在特定测试条件下检测了这两种酶在洗衣去污剂配剂中的估算的失活半衰期。

所有在以上说明书中提及的公开出版物和专利都引入本文作为参考。不背离本发明的范围和精神的对本发明所述方法和系统的各种修

饰和变化对于本领域技术人员来说将是显而易见的。尽管本发明已经结合特定优选实施方式进行了描述，也仍应当理解不应当将本发明过度得限制于这样的特定实施方式。事实上，那些对分子生物学、免疫学、配剂学、和/或相关领域的技术人员来说显而易见的、对实施本发明的所述模式的各种修改也意图包括在本发明范围之内。

115	120	125	
Ala Asn Val Lys Val Ala Val Leu Asp Thr Gly Ile Gln Ala Ser His			
130	135	140	
Pro Asp Leu Asn Val Val Gly Gly Ala Ser Phe Val Ala Gly Glu Ala			
145	150	155	160
Tyr Asn Thr Asp Gly Asn Gly His Gly Thr His Val Ala Gly Thr Val			
165	170		175
Ala Ala Leu Asp Asn Thr Thr Gly Val Leu Gly Val Ala Pro Ser Val			
180	185		190
Ser Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Asn Ser Ser Gly Ser Gly Thr Tyr			
195	200	205	
Ser Gly Ile Val Ser Gly Ile Glu Trp Ala Thr Thr Asn Gly Met Asp			
210	215	220	
Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly Pro Ser Gly Ser Thr Ala Met Lys			
225	230	235	240
Gln Ala Val Asp Asn Ala Tyr Ala Arg Gly Val Val Val Ala Ala			
245	250		255
Ala Gly Asn Ser Gly Ser Ser Gly Asn Thr Asn Thr Ile Gly Tyr Pro			
260	265		270
Ala Lys Tyr Asp Ser Val Ile Ala Val Gly Ala Val Asp Ser Asn Ser			
275	280	285	
Asn Arg Ala Ser Phe Ser Ser Val Gly Ala Glu Leu Glu Val Met Ala			
290	295	300	
Pro Gly Ala Gly Val Tyr Ser Thr Tyr Pro Thr Ser Thr Tyr Ala Thr			
305	310	315	320
Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Ser Pro His Val Ala Gly Ala Ala Ala			
325	330		335
Leu Ile Leu Ser Lys His Pro Asn Leu Ser Ala Ser Gln Val Arg Asn			
340	345		350
Arg Leu Ser Ser Thr Ala Thr Tyr Leu Gly Ser Ser Phe Tyr Tyr Gly			
355	360	365	
Lys Gly Leu Ile Asn Val Glu Ala Ala Ala Gln			
370	375		

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 T 细胞表位

<400> 2

Ala Gln Thr Val Pro Tyr Gly Ile Pro Leu Ile Lys Ala Asp Lys

1	5	10	15
<p><210> 3 <211> 15 <212> PRT <213> 人工序列</p>			
<p><220> <223> 合成的 T 细胞表位</p>			
<p><400> 3 Val Pro Tyr Gly Ile Pro Leu Ile Lys Ala Asp Lys Val Gln Ala</p>			
1	5	10	15
<p><210> 4 <211> 15 <212> PRT <213> 人工序列</p>			
<p><220> <223> 合成的 T 细胞表位</p>			
<p><400> 4 Gly Ile Pro Leu Ile Lys Ala Asp Lys Val Gln Ala Gln Gly Phe</p>			
1	5	10	15
<p><210> 5 <211> 15 <212> PRT <213> 人工序列</p>			
<p><220> <223> 合成的 T 细胞表位</p>			
<p><400> 5 Leu Ile Lys Ala Asp Lys Val Gln Ala Gln Gly Phe Lys Gly Ala</p>			
1	5	10	15
<p><210> 6 <211> 15 <212> PRT <213> 人工序列</p>			
<p><220></p>			

<223> 合成的 T 细胞表位

<400> 6

Ala Asp Lys Val Gln Ala Gln Gly Phe Lys Gly Ala Asn Val Lys

1 5 10 15

<210> 7

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 T 细胞表位

<400> 7

Val Gln Ala Gln Gly Phe Lys Gly Ala Asn Val Lys Val Ala Val

1 5 10 15

<210> 8

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 T 细胞表位

<400> 8

Gln Gly Phe Lys Gly Ala Asn Val Lys Val Ala Val Leu Asp Thr

1 5 10 15

<210> 9

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 T 细胞表位

<400> 9

Lys Gly Ala Asn Val Lys Val Ala Val Leu Asp Thr Gly Ile Gln

1 5 10 15

<210> 10

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 T 细胞表位

<400> 10

Asn Val Lys Val Ala Val Leu Asp Thr Gly Ile Gln Ala Ser His

1

5

10

15

<210> 11

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 T 细胞表位

<400> 11

Val Ala Val Leu Asp Thr Gly Ile Gln Ala Ser His Pro Asp Leu

1

5

10

15

<210> 12

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 T 细胞表位

<400> 12

Leu Asp Thr Gly Ile Gln Ala Ser His Pro Asp Leu Asn Val Val

1

5

10

15

<210> 13

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 T 细胞表位

<400> 13

Gly Ile Gln Ala Ser His Pro Asp Leu Asn Val Val Gly Gly Ala

<223> 合成的 T 细胞表位

<400> 17

Gly Gly Ala Ser Phe Val Ala Gly Glu Ala Tyr Asn Thr Asp Gly

1 5 10 15

<210> 18

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 T 细胞表位

<400> 18

Ser Phe Val Ala Gly Glu Ala Tyr Asn Thr Asp Gly Asn Gly His

1 5 10 15

<210> 19

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 T 细胞表位

<400> 19

Ala Gly Glu Ala Tyr Asn Thr Asp Gly Asn Gly His Gly Thr His

1 5 10 15

<210> 20

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 T 细胞表位

<400> 20

Ala Tyr Asn Thr Asp Gly Asn Gly His Gly Thr His Val Ala Gly

1 5 10 15

<210> 21

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 T 细胞表位

<400> 21

Thr Asp Gly Asn Gly His Gly Thr His Val Ala Gly Thr Val Ala

1

5

10

15

<210> 22

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 T 细胞表位

<400> 22

Asn Gly His Gly Thr His Val Ala Gly Thr Val Ala Ala Leu Asp

1

5

10

15

<210> 23

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 T 细胞表位

<400> 23

Gly Thr His Val Ala Gly Thr Val Ala Ala Leu Asp Asn Thr Thr

1

5

10

15

<210> 24

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 T 细胞表位

<400> 24

Val Ala Gly Thr Val Ala Ala Leu Asp Asn Thr Thr Gly Val Leu

1	5	10	15
<210> 25			
<211> 15			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成的 T 细胞表位			
<400> 25			
Thr Val Ala Ala Leu Asp Asn Thr Thr Gly Val Leu Gly Val Ala			
1	5	10	15
<210> 26			
<211> 15			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成的 T 细胞表位			
<400> 26			
Ala Leu Asp Asn Thr Thr Gly Val Leu Gly Val Ala Pro Ser Val			
1	5	10	15
<210> 27			
<211> 15			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成的 T 细胞表位			
<400> 27			
Asn Thr Thr Gly Val Leu Gly Val Ala Pro Ser Val Ser Leu Tyr			
1	5	10	15
<210> 28			
<211> 15			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			

<223> 合成的 T 细胞表位

<400> 28

Gly Val Leu Gly Val Ala Pro Ser Val Ser Leu Tyr Ala Val Lys

1 5 10 15

<210> 29

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 T 细胞表位

<400> 29

Gly Val Ala Pro Ser Val Ser Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Asn

1 5 10 15

<210> 30

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 T 细胞表位

<400> 30

Pro Ser Val Ser Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Asn Ser Ser Gly

1 5 10 15

<210> 31

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 T 细胞表位

<400> 31

Ser Leu Tyr Ala Val Lys Val Leu Asn Ser Ser Gly Ser Gly Thr

1 5 10 15

<210> 32

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 T 细胞表位

<400> 32

Ala Val Lys Val Leu Asn Ser Ser Gly Ser Gly Thr Tyr Ser Gly

1

5

10

15

<210> 33

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 T 细胞表位

<400> 33

Val Leu Asn Ser Ser Gly Ser Gly Thr Tyr Ser Gly Ile Val Ser

1

5

10

15

<210> 34

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 T 细胞表位

<400> 34

Ser Ser Gly Ser Gly Thr Tyr Ser Gly Ile Val Ser Gly Ile Glu

1

5

10

15

<210> 35

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 T 细胞表位

<400> 35

Ser Gly Thr Tyr Ser Gly Ile Val Ser Gly Ile Glu Trp Ala Thr

<223> 合成的 T 细胞表位

<400> 39

Trp Ala Thr Thr Asn Gly Met Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly
1 5 10 15

<210> 40

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 T 细胞表位

<400> 40

Thr Asn Gly Met Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly Pro Ser
1 5 10 15

<210> 41

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 T 细胞表位

<400> 41

Met Asp Val Ile Asn Met Ser Leu Gly Gly Pro Ser Gly Ser Thr
1 5 10 15

<210> 42

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 T 细胞表位

<400> 42

Asn Met Ser Leu Gly Gly Pro Ser Gly Ser Thr Ala Met Lys
1 5 10

<210> 43

<211> 15

1	5	10	15
<210> 47 <211> 15 <212> PRT <213> 人工序列			
<220> <223> 合成的 T 细胞表位			
<400> 47 Gln Ala Val Asp Asn Ala Tyr Ala Arg Gly Val Val Val Val Ala			
1	5	10	15
<210> 48 <211> 15 <212> PRT <213> 人工序列			
<220> <223> 合成的 T 细胞表位			
<400> 48 Asp Asn Ala Tyr Ala Arg Gly Val Val Val Val Ala Ala Ala Gly			
1	5	10	15
<210> 49 <211> 15 <212> PRT <213> 人工序列			
<220> <223> 合成的 T 细胞表位			
<400> 49 Tyr Ala Arg Gly Val Val Val Val Ala Ala Ala Gly Asn Ser Gly			
1	5	10	15
<210> 50 <211> 15 <212> PRT <213> 人工序列			
<220>			

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 T 细胞表位

<400> 54

Ser Ser Gly Asn Thr Asn Thr Ile Gly Tyr Pro Ala Lys Tyr Asp

1

5

10

15

<210> 55

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 T 细胞表位

<400> 55

Asn Thr Asn Thr Ile Gly Tyr Pro Ala Lys Tyr Asp Ser Val Ile

1

5

10

15

<210> 56

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 T 细胞表位

<400> 56

Thr Ile Gly Tyr Pro Ala Lys Tyr Asp Ser Val Ile Ala Val Gly

1

5

10

15

<210> 57

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 T 细胞表位

<400> 57

Pro Ala Lys Tyr Asp Ser Val Ile Ala Val Gly Ala Val Asp

1	5	10	
<210> 58			
<211> 15			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成的 T 细胞表位			
<400> 58			
Lys Tyr Asp Ser Val Ile Ala Val Gly Ala Val Asp Ser Asn Ser			
1	5	10	15
<210> 59			
<211> 15			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成的 T 细胞表位			
<400> 59			
Ser Val Ile Ala Val Gly Ala Val Asp Ser Asn Ser Asn Arg Ala			
1	5	10	15
<210> 60			
<211> 15			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成的 T 细胞表位			
<400> 60			
Ala Val Gly Ala Val Asp Ser Asn Ser Asn Arg Ala Ser Phe Ser			
1	5	10	15
<210> 61			
<211> 15			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			

<223> 合成的 T 细胞表位

<400> 61

Ala Val Asp Ser Asn Ser Asn Arg Ala Ser Phe Ser Ser Val Gly

1 5 10 15

<210> 62

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 T 细胞表位

<400> 62

Ser Asn Ser Asn Arg Ala Ser Phe Ser Ser Val Gly Ala Glu Leu

1 5 10 15

<210> 63

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 T 细胞表位

<400> 63

Asn Arg Ala Ser Phe Ser Ser Val Gly Ala Glu Leu Glu Val Met

1 5 10 15

<210> 64

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 T 细胞表位

<400> 64

Ser Phe Ser Ser Val Gly Ala Glu Leu Glu Val Met Ala Pro Gly

1 5 10 15

<210> 65

<211> 15

1	5	10	15
<p><210> 69 <211> 15 <212> PRT <213> 人工序列</p>			
<p><220> <223> 合成的 T 细胞表位</p>			
<p><400> 69 Ala Gly Val Tyr Ser Thr Tyr Pro Thr Ser Thr Tyr Ala Thr Leu</p>			
1	5	10	15
<p><210> 70 <211> 15 <212> PRT <213> 人工序列</p>			
<p><220> <223> 合成的 T 细胞表位</p>			
<p><400> 70 Tyr Ser Thr Tyr Pro Thr Ser Thr Tyr Ala Thr Leu Asn Gly Thr</p>			
1	5	10	15
<p><210> 71 <211> 15 <212> PRT <213> 人工序列</p>			
<p><220> <223> 合成的 T 细胞表位</p>			
<p><400> 71 Tyr Pro Thr Ser Thr Tyr Ala Thr Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala</p>			
1	5	10	15
<p><210> 72 <211> 15 <212> PRT <213> 人工序列</p>			
<p><220></p>			

<223> 合成的 T 细胞表位

<400> 72

Ser Thr Tyr Ala Thr Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Ser Pro His

1 5 10 15

<210> 73

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 T 细胞表位

<400> 73

Ala Thr Leu Asn Gly Thr Ser Met Ala Ser Pro His Val Ala Gly

1 5 10 15

<210> 74

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 T 细胞表位

<400> 74

Asn Gly Thr Ser Met Ala Ser Pro His Val Ala Gly Ala Ala Ala

1 5 10 15

<210> 75

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 T 细胞表位

<400> 75

Ser Met Ala Ser Pro His Val Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ile Leu

1 5 10 15

<210> 76

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 T 细胞表位

<400> 76

Ser Pro His Val Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lys His

1

5

10

15

<210> 77

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 T 细胞表位

<400> 77

Val Ala Gly Ala Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lys His Pro Asn Leu

1

5

10

15

<210> 78

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 T 细胞表位

<400> 78

Ala Ala Ala Leu Ile Leu Ser Lys His Pro Asn Leu Ser Ala Ser

1

5

10

15

<210> 79

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 T 细胞表位

<400> 79

Leu Ile Leu Ser Lys His Pro Asn Leu Ser Ala Ser Gln Val Arg

1	5	10	15
<210> 80			
<211> 15			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成的 T 细胞表位			
<400> 80			
Ser Lys His Pro Asn Leu Ser Ala Ser Gln Val Arg Asn Arg Leu			
1	5	10	15
<210> 81			
<211> 15			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成的 T 细胞表位			
<400> 81			
Pro Asn Leu Ser Ala Ser Gln Val Arg Asn Arg Leu Ser Ser Thr			
1	5	10	15
<210> 82			
<211> 15			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成的 T 细胞表位			
<400> 82			
Ser Ala Ser Gln Val Arg Asn Arg Leu Ser Ser Thr Ala Thr Tyr			
1	5	10	15
<210> 83			
<211> 15			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			

<223> 合成的 T 细胞表位

<400> 83

Gln Val Arg Asn Arg Leu Ser Ser Thr Ala Thr Tyr Leu Gly Ser
1 5 10 15

<210> 84

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 T 细胞表位

<400> 84

Asn Arg Leu Ser Ser Thr Ala Thr Tyr Leu Gly Ser Ser Phe Tyr
1 5 10 15

<210> 85

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 T 细胞表位

<400> 85

Ser Ser Thr Ala Thr Tyr Leu Gly Ser Ser Phe Tyr Tyr Gly Lys
1 5 10 15

<210> 86

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 T 细胞表位

<400> 86

Ala Thr Tyr Leu Gly Ser Ser Phe Tyr Tyr Gly Lys Gly Leu Ile
1 5 10 15

<210> 87

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 T 细胞表位

<400> 87

Leu Gly Ser Ser Phe Tyr Tyr Gly Lys Gly Leu Ile Asn Val Glu

1

5

10

15

<210> 88

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 T 细胞表位

<400> 88

Ser Phe Tyr Tyr Gly Lys Gly Leu Ile Asn Val Glu Ala Ala Ala

1

5

10

15

<210> 89

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 T 细胞表位

<400> 89

Phe Tyr Tyr Gly Lys Gly Leu Ile Asn Val Glu Ala Ala Gln

1

5

10

<210> 90

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的 T 细胞表位

<400> 90

Gln Gly Phe Lys Gly Ala Asn Val Lys Val Ala Val Leu Asp Thr Gly

1	5	10	15
Ile Gln			

<210> 91
<211> 5
<212> PRT
<213> 地衣芽孢杆菌

<400> 91
Ala Gln Thr Val Pro
1 5

<210> 92
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 检测肽

<400> 92
Ala Ala Pro Phe
1

图1

1 mmrkksfwlg mltafmlvft mafsdsasaa qpaknvekdy ivgfksgvkt asvkkdiike
61 sggkvdkqfr iinaakakld kealkevknv pdvayveedh vahalagtyv ygiplikadk
121 vqaqgfkgn vkvavldtgi qashpdlvv ggasfvagea yntdgnght hvagtvaald
181 nttglgvap svlyavkvl nssgsgtysg ivsgiewatt ngmdvinmsl ggpsgstamk
241 qavdnayarg vvvvaaagns gssgntntig ypakydsvia vgavdsnsr
asfssvgael
301 evmapgagvy styptstyat lngtmasph vagaaalils khpnlsasqv rnrilstaty
361 lgssfyykg linveaaaq (SEQ ID NO:1)

图 2A

基于图1序列 (SEQ ID NO: 1) 的88个肽，其中氨基末端
位于左边

肽编号	序列	SEQ ID NO:
1	AQTVPYGIPLIKADK	2
2	VPYGIPLIKADKVQA	3
3	GIPLIKADKVQAQGF	4
4	LIKADKVQAQGFKGA	5
5	ADKVQAQGFKGANVK	6
6	VQAQGFKGANVKVAV	7
7	QGFKGANVKVAVLDT	8
8	KGANVKVAVLDTGIQ	9
9	NVKVAVLDTGIQASH	10
10	VAVLDTGIQASHPDL	11
11	LDTGIQASHPDLNVV	12
12	GIQASHPDLNVVGG	13
13	ASHPDLNVVGGASFV	14
14	PDLNVVGGASFVAGE	15
15	NVVGGASFVAGEAYN	16
16	GGASFVAGEAYNTDG	17
17	SFVAGEAYNTDGNGH	18
18	AGEAYNTDGNGHGHGTH	19
19	AYNTDGNGHGHGTHVAG	20
20	TDGNGHGHGTHVAGTVA	21
21	NGHGHGTHVAGTVAALD	22
22	GTHVAGTVAALDNTT	23
23	VAGTVAALDNTTGVL	24
24	TVAALDNTTGVLGVA	25
25	ALDNTTGVLGVAPSV	26
26	NTTGVLGVAPSVSLY	27
27	GVLGVAPSVSLYAVK	28
28	GVAPSVSLYAVKVLN	29
29	PSVSLYAVKVLNSSG	30
30	SLYAVKVLNSSGSGT	31
31	AVKVLNSSGSGTYSG	32
32	VLNSSGSGTYSGIVS	33
33	SSGSGTYSGIVSGIE	34
34	SGTYSGIVSGIEWAT	35
35	YSGIVSGIEWATTNG	36
36	IVSGIEWATTNGMDV	37

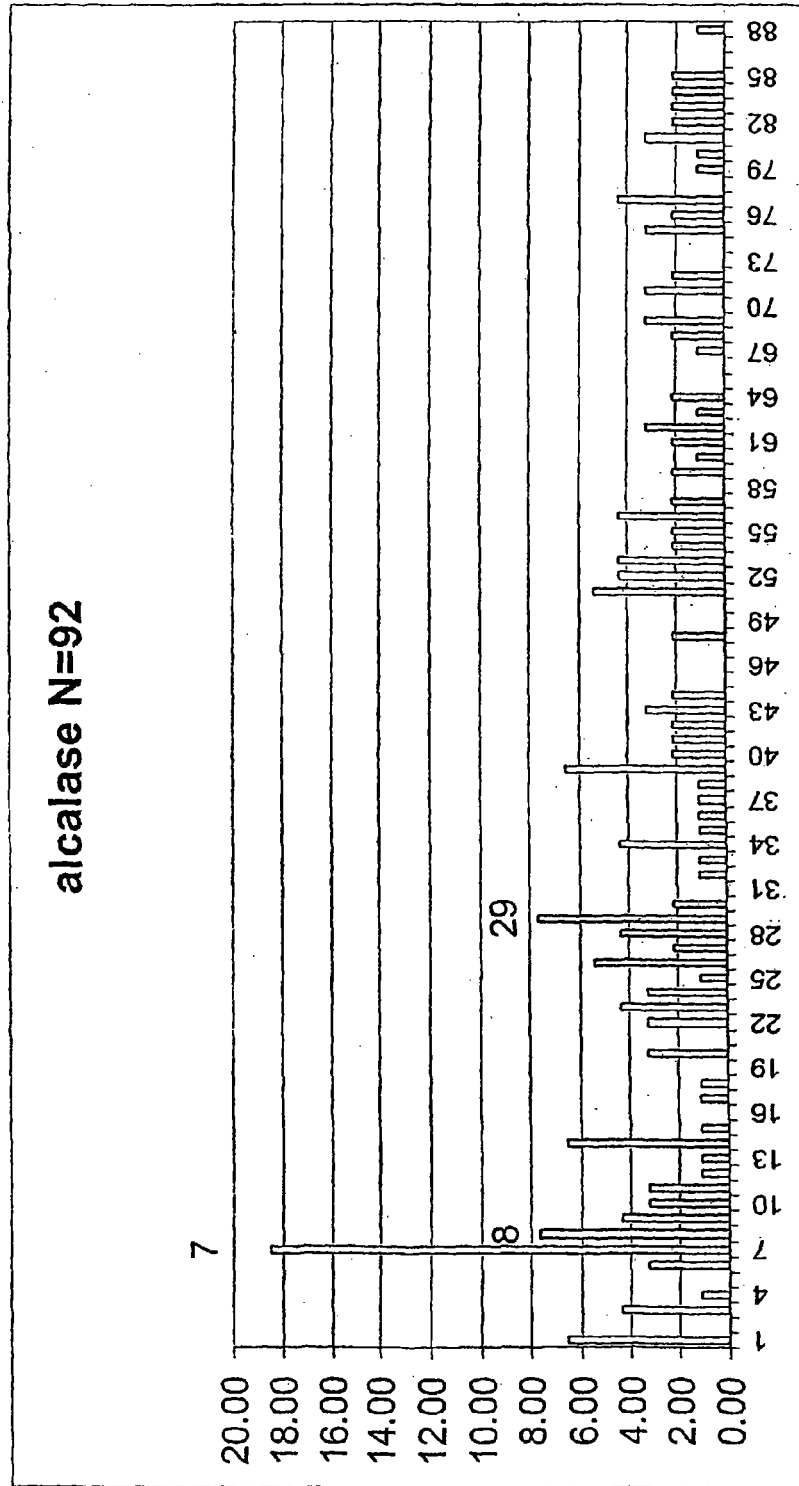
图 2B

37	GIEWATTNGMDVINM	38
38	WATTNGMDVINMSLG	39
39	TNGMDVINMSLGGPS	40
40	MDVINMSLGGPSGST	41
41	NMSLGGPSGSTAMK	42
42	SLGGPSGSTAMKQAV	43
43	GPSGSTAMKQAVDNA	44
44	GSTAMKQAVDNAYAR	45
45	AMKQAVDNAYARGVV	46
46	QAVDNAYARGVVVVA	47
47	DNAYARGVVVVAAG	48
48	YARGVVVVAAGNSG	49
49	GVVVVAAAGNSGSSG	50
50	VVAAAGNSGSSGNTN	51
51	AAGNSGSSGNTNTIG	52
52	NSGSSGNTNTIGYPA	53
53	SSGNTNTIGYPAKYD	54
54	NTNTIGYPAKYDSVI	55
55	TIGYPAKYDSVIAVG	56
56	PAKYDSVIAVGAVD	57
57	KYDSVIAVGAVDSNS	58
58	SVIAVGAVDSNSNRA	59
59	AVGAVDSNSNRASFS	60
60	AVDSNSNRASFSSVG	61
61	SNSNRASFSSVGAEL	62
62	NRASFSSVGAEEVM	63
63	SFSSVGAEEVMAPG	64
64	SVGAELEVMAPGAGV	65
65	AELEVMAPGAGVYST	66
66	EVMAPGAGVYSTYPT	67
67	APGAGVYSTYPTSTY	68
68	AGVYSTYPTSTYATL	69
69	YSTYPTSTYATLNGT	70
70	YPTSTYATLNGTSM	71
71	STYATLNGTSMASPH	72
72	ATLNGTSMASPHVAG	73
73	NGTSMASPHVAGAAA	74
74	SMASPHVAGAAALIL	75
75	SPHVAGAAALILSKH	76
76	VAGAAALILSKHPNL	77
77	AAALILSKHPNLSAS	78
78	LILSKHPNLSASQVR	79
79	SKHPNLSASQVRNRL	80

图 2C

80	PNLSASQVRNRLSST	81
81	SASQVRNRLSSTATY	82
82	QVRNRLSSTATYLG	83
83	NRLSSTATYLGSSFY	84
84	SSTATYLGSSFYYGK	85
85	ATYLGSSFYYGKGLI	86
86	LGSSFYYGKGLINVE	87
87	SFYYGKGLINVEAAA	88
88	FYYGKGLINVEAAQ	89

图 3



专利名称(译)	免疫原性减弱的枯草杆菌蛋白酶Carlsberg蛋白		
公开(公告)号	CN101575635A	公开(公告)日	2009-11-11
申请号	CN200910149227.1	申请日	2003-02-26
[标]申请(专利权)人(译)	金克克国际有限公司		
申请(专利权)人(译)	金克克国际有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	金克克国际有限公司		
[标]发明人	FA哈丁		
发明人	F·A·哈丁		
IPC分类号	C12Q1/37 C12Q1/02 C12N9/56 C12N9/54 C12N15/57 C12N15/63 C12N1/21 A61K8/66 A61Q11/00 A61Q11/02 A61Q19/00 A61Q19/10 C11D3/386 C12R1/125 C12R1/10 C12R1/11 C12R1/09 C12R1/07 G01N33/53 G01N33/50 G01N33/566 G01N33/567		
CPC分类号	G01N2333/96433 G01N33/505 C12N9/54		
优先权	60/384777 2002-05-30 US 60/360057 2002-02-26 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供鉴定枯草杆菌蛋白酶Carlsberg蛋白中CD4+ T - 细胞表位的方法。本发明还旨在生产改变的肽，当其被整合进野生型枯草杆菌蛋白酶Carlsberg蛋白时则产生改变的免疫应答，优选在人体内为弱免疫应答。特别地，本发明提供手段，包括适于减弱ALCALASE酶免疫原性的方法和组合物。

