



SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(B) (11) KUULUTUSJULKAISU UTLAGGNINGSSKRIFT

80598

C (45) Patentti ja rekisteri
Patent mottaget 10 07 1990

(51) Kv.1k.5 - Int.cl.5

A 61K 37/54, C 11D 3/386, 7/42

(21) Patenttihakemus - Patentansökning	842555
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	25.06.84
(24) Alkupäivä - Löpdag	24.10.83
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	25.06.84
(44) Nähtäväsipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	30.03.90
(86) Kv. hakemus - Int. ansökan	SE83/00359
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	
25.10.82 SE 8206022	22.04.83 SE 8302268

(71) Hakija - Sökande

1. Hellgren, Lars Gustav Inge, Bronsgjutargatan 13, Västra Frölunda, Sverige, (SE)
2. Mohr, Viggo, St. Jorgensveita 6a, Trondheim, Norge, (NO)
3. Vincent, Jan Gustav, Linnegatan 31, Stockholm, Sverige, (SE)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Hellgren, Lars Gustav Inge, Bronsgjutargatan 13, Västra Frölunda, Sverige, (SE)
2. Mohr, Viggo, St. Jorgensveita 6a, Trondheim, Norge, (NO)
3. Vincent, Jan Gustav, Linnegatan 31, Stockholm, Sverige, (SE)

(74) Asiamies - Ombud: Papula Rein Lahtela Oy

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä entsyymivalmisteen valmistamiseksi
Förfarande för framställning av en enzymberedning

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

GB C 368888 (Cl. 2), GB C 377128 (Cl. 2), SE C 140568,
Journal of Food Biochemistry vol. 2 (1978) p. 349-366,
Journal of Food Biochemistry vol. 5 (1981) p. 63-68,
Agricultural and Biological Chemistry vol. 46 (1982) p. 691-696

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Entsyymikoostumus sisältäen tehollisen määrän entsyymivalmistetta, joka hajottaa biologista alkuperää olevia saasteita, käytettäväksi terapeuttisena ja/tai ei-terapeuttisena puhdistusaineena, menetelmä sen valmistamiseksi ja menetelmä elävän ja kuolleen aineen terapeuttiseksi ja ei-terapeuttiseksi puhdistamiseksi. Käytetty entsyymivalmiste on johdettu lahkoon Euphausiaceae kuuluvasta vesieläimestä tai kalasta. Kalojen kyseessä ollessa sukuun Mallotus kuuluvat ovat ensisijaisia.

En enzymsammansättning som innehåller en effektiv mängd av enzymfabrikat vilket upplöser avfall av biologiskt ursprung, för att användas som terapeutiskt och/eller oterapeutiskt putsmedel, ett förfarande för att tillverka den och ett förfarande för terapeutisk och oterapeutisk rening av levande och dött material. Enzymfabrikatet som används, härflyter från ett vattendjur eller en fisk i ordningen Euphausiacea. När det gäller fiskar, är fiskarna i arten Mallotus förnämsta.

MENETELMÄ ENTSYYMIVALMISTEEN VALMISTAMISEKSI

Keksintö koskee menetelmää entsyymivalmisteen
5 valmistamiseksi, kuten on määritelty patenttivaatimuksen
1 johdanto-osassa.

Patenttiselityksessä ja vaatimuksessa käytet-
tynä termi entsyymi tarkoittaa aktiivista entsyymiä,
mikäli toisin ei ole mainittu.

10 Ao valmiste on tarkoitettu sekä imettäväisten
terapeuttista puhdistusta että ei-terapeuttista puhdis-
tusta varten yleensä. Käsite puhdistus on tällöin käy-
tetty laveimmassa merkityksessään, so tarkoittaen kuol-
leen samaten kuin elävän aineen, kuten erityyppisten
15 tekstiilien, hiuksien, turkiksien, ihon, muovien, nahan,
kynsien, korvien, peilien, lasin, posliinin, hammaspro-
teesin, metallien, kivien, hampaiden, julkisivujen,
untuvien, taideteoksien kuten maalauksien jne. puhdis-
tusta. Puhdistus käsittää myös ihmisten ja eläimien
20 puhdistuksen poistaen sellaisia aineita, kuten märkää
(märkivä erite), fibriiniä, koaguloitunutta verta,
verirupia ja kuollutta kudosta. Tämä viimeinen puhdis-
tustyyppi on erityisen tärkeä haavojen, palovammojen ja
tulehtumien käsittelyssä esim. ns entsyymaattista hajo-
25 tusta varten, mutta voidaan toteuttaa myös muilla elävän
ruumiin alueilla, joissa saastumista voi esiintyä.
Virtsaputki ja virtsarakko ovat esimerkkejä tällaisista
muista alueista. Entsyymien normaali sulattava vaikutus
eläimissä, samaten kuin niiden autolyttinen toiminta
30 eläimissä post mortem, eivät sisälly termiin puhdistus.

Krillissä (joka kuuluu lahkoon Euphausiaceae)
esiintyy seos erilaisista entsyymeistä, kuten esim.
proteinaasit (hapan ja neutraali, alkalinen pH-optimi),
peptidaasit (ekso- ja endopeptidaasit), lipaasit, fos-
35 folipaasit, amylaasit ja muut hiilihydraattia hajottavat
entsyymit, fosfataasit, nukleaasit, nukleotidaasit ja
esteraasit (T.E. Ellingsen; Biokjemiske Studier over

Antarktisk Krill; tohtorinväitöskirja; Institutt for
Teknisk Biokjemi, Norjan teknillinen korkeakoulu, Trond-
heim (1982)). Krillin vesiuutoksessa esiintyvää proteo-
lyyttistä (trypsiinin kaltaista) aktiivisuutta on tut-
5 kittu ja kuvattu (C.-S. Chen et al; J. Food Biochem. 2
(1978) p. 349 - 66)). Erilaisia proteaasiaktiivisuuksia
villakuoreen vesiuutoksissa on kuvattu aiemmin (A.
Gildberg; Autolysis of Fish Tissue - General Aspects;
Thesis; Institute of Fisheries, Tromsø yliopisto, Norja
10 (1982)).

Niin aikaisin kuin 1913 ehdotettiin entsyymien
käyttöä pesuaineissa. Entsyymikokoomukset kuolleiden
aineiden puhdistusta varten, esim. pesuaineissa, on
aiemmin perustunut erilaisiin mikrobisiin proteaaseihin
15 suvusta Bacillus. Yksi tällainen yleisesti käytetty
proteaasi on subtilisin, joka on johdettu suvuista
Bacillus subtilis ja merkitty mm. nimillä Alcalase[®]
(Novo Industry, Kööpenhamina, Tanska). Erilaisia lipaa-
seja on myös käytetty puhdistusta varten, erityisesti
20 lipidien hajottamisen mahdollistamiseksi. Entsyymien
lisäksi tällaiset ainekokoomukset ovat sisältäneet myös
erilaisia anionisia, kationisia ja neutraaleja pesuai-
neita yhdessä valkaisuaineiden kuten perboraattien
kanssa. Tähän mennessä käytetyt entsyymit ovat olleet,
25 kuten entsyymit yleensä, suhteellisen epästabiileja.

Tärkeimmät markkinoilla olevat entsyymikokoo-
mukset yllä mainittujen komponenttien hajottamista
varten ovat ennen muuta streptokinaasi - streptodornaasi
(Varidase[®], Lederle Lab., American Cyanamid Company,
30 Wayne, New Jersey, USA), stabiloitu kiteinen trypsiini
(Trypure[®], Novo Industry, Kööpenhamina, Tanska) ja härän
fibrinolysiini yhdistettynä deoksiribonukleaasiin
(Elastase[®], Barke Davis & Company, Detroit, Michigan, USA).
Streptokinaasi vaikuttaa kuolleeseen aineeseen pääasias-
35 sa vaikutuksensa perusteella DNA:an ja streptodornaasil-
la on erityinen fibrinolyyttinen vaikutus. Trypsiini
vaikuttaa proteolyyttisesti, ja sitä uutetaan härän

haimasta. Fibrinolysiini - deoksiribonukleaasi on yhdistelmä kahdesta entsyymistä, yhdestä fibriiniä hajottavasta entsyymistä ja yhdestä deoksiribonukleiinihappoon vaikuttavasta, joka on tärkeä komponentti märässä.

5 Erästä spesifistä pepsiinin kaltaista, lajista Mallotus villosus (villakuore) saatavaa entsyymiä (pepsiini I) on ehdotettu käytettäväksi palovammojen lääkähoidossa (Gildberg (A.; mainittu yllä s. 89 - 90)). Yhden spesifisen entsyymin käytöllä, joka vaikuttaa
10 yhdentyypisiin substraatteihin, voidaan hajottaa haa-voissa olevia epäpuhtauksia. Kuitenkin tämän pepsiinin kaltaisen entsyymin yhdistelmää muiden entsyymien kanssa ei ole ehdotettu ihmisten terapeuttista puhdistusta varten.

15 Yllä mainituissa entsyymivalmisteissa on useita puutteita. Ne ovat kaikki suhteellisen epästabiileja, mikä johtaa niiden aktiivisuuden nopeaan vähenemiseen varastoinnin tai käytön aikana. Niiden aktiivisuudet ovat usein rajoittuneita tiettyyn pH-väliin, esim.
20 neutraali - kohtuullisen alkalinen pH. Niiden aktiivisuudet ovat useissa tapauksissa myös rajoittuneita tiettyihin lämpötilaväleihin. Lämpötilassa yli +50 °C havaitaan aktiivisuuden nopea lasku, ja huoneenlämpötilassa tai normaalissa ulkoilman lämpötilassa niiden
25 aktiivisuudet ovat alhaisia.

Tuotteiden Varidase[®], Trypure[®] ja Elase[®] vaikutus on suhteellisen heikko niiden käyttötarkoituksissa. Vain kohtuullinen hajotusvaikutus saavutetaan tavallisesti kolmen viikon pituisen käsittelyjakson jälkeen.

30 Esillä olevan keksinnön tarkoituksena on tuoda esiin menetelmä entsyymivalmisteen valmistamiseksi, jolla on kyky hajottaa biologisia epäpuhtauksia aiempia paremmin. Toisena tarkoituksena on tuoda esiin menetelmä paremman entsyymikokoomuksen valmistamiseksi käytet-
35 täväksi epäpuhtauksia sisältävien biologista alkuperää olevien aineiden tai tällaisten aineiden hajoamistuotteiden poistamiseksi, epäpuhtauksien sekä proteiineja

että lipidejä sisältävien saasteiden poistamiseksi. Edelleen keksinnön tarkoituksena on tuoda esiin uusi ja parannettu menetelmä entsyymivalmisteen valmistamiseksi erityisesti fibriinin, koaguloituneen veren ja kuolleen kudoksen poistamiseksi hajottamalla nämä osa-aineet ja edistään siten niiden poistamista lisäämättä huomattavasti niiden vesipitoisuutta.

Keksinnölle tunnusomaisten seikkojen osalta viitataan patenttivaatimuksiin.

10 Keksinnön mukaan valmistettava entsyymivalmiste on kykenevä liuottamaan biologista alkuperää olevia epäpuhtauksia ja on peräisin johdanto-osassa mainituista eläimistä. Entsyymiseoksia voidaan saada näistä eläimistä hyvällä saaliilla ja yksinkertaisella tavalla. Par-
15 haita ja hyödyllisimpiä lähteitä entsyymivalmisteille ovat eläimet, jotka kuuluvat lahkoon Euphausiaceae, esim. Antarktinen krilli (Euphausiaceae superba), Euphausiaceae crystallorophias, ja sukulaislajit sekä muut krillilajit käsittäen lajit Meganyctibhanes norvegica,
20 Tysanoessa inernis sekä muut sukulaislajit.

Tärkeimmät entsyymiaktiivisuudet keksintöä varten näyttävät olevan peräisin eläimien ruuansulatuskanavasta. Eläimistä saatavien erilaisten entsyymiaktiivisuuksien monimutkainen seos on todennäköisesti
25 selitys sille, miksi ainekokoomus aiheuttaa hämmästyttävän nopean biologisten epäpuhtauksien hajoamisen huolimatta niiden alkuperästä. Entsyymit ovat aktiivisia alkaalisessa, neutraalissa ja happamassa väliaineessa, ja niitä voidaan käyttää hyväksi puhdistusainekokoomuk-
30 sissa yhdessä erilaisten pinta-aktiivisten aineiden kanssa (tensidit ja emulgaattorit) ja/tai muiden komponenttien kanssa, kuten kantajat ja lisäaineet.

Se tosiasia, että ainekokoomus sisältää entsyymiseoksen, tekee sen hyödylliseksi epäpuhtauksien poistossa, jotka sisältävät seoksia aineista, jotka on valittu ryhmästä lipidit, fosfolipidit, biologiset polymeerit kuten proteiinit, peptidit, nukleinihapot,

mukopolysakkaridit ja polysakkaridit, sekä tällaisten yhdisteiden hajoamistuotteet. Nämä yhdisteet ovat läsnä määrässä, veriruvessa ja kuolleissa kudoksissa.

Keksinnön mukaan erityisen hyviä tuloksia saavutetaan, jos ainekokoomuksessa on entsyymejä, joilla on molekyylipaino 15000 - 80000 Dalton tai tällaisten entsyymien aktiivisia aggregaatteja. Erityisesti entsyymejä, joiden molekyylipaino on noin 20000 - 40000 Dalton, pidetään parhaimpina. Nämä vaihteluvälit soveltuvat entsyymeille, jotka on saatu homogenisoitujen eläimien vesiuutoksella, so erityisesti uutoksen aikana vesiliu-
koisessa muodossa oleviin entsyymeihin.

Keksinnön eräs sovellutus koskee uutta ainekokoomusta entsyymipuhdistusta varten ja menetelmää sen valmistamiseksi. Menetelmälle on tunnusomaista se, että lahkon Euphausiacea eläimestä tai kalasta peräisin oleva entsyymivalmiste sekoitetaan, liuotetaan, sidotaan tai muulla tavoin yhdistetään yhteen tai useampaan veteen liukenemattomaan tai vesiliukoiseen vesipitoiseen tai ei-vettä sisältävään kantajaan, mikäli tarpeen, sopivien lisäaineiden kanssa. Uusi ainekokoomus voi olla ihovoiteen, ihojauheen, pastan, voiteen, sprayn, geelin, linimentin, siteen, öljyn, tabletin, siirapin, rakeisen tuotteen, kapselin jne muodossa.

Nykyisin parhaimpina pidetyssä sovellutuksessa valmisteessa käytettävät entsyymit ovat vesiliukoisia ja/tai niiden molekyylipainot ovat yllä mainituissa rajoissa.

Käytettäessä entsyymivalmistetta poistettava tai hajotettava epäpuhtaus saatetaan kosketuksiin keksinnön mukaan valmistetun entsyymikokoomuksen kanssa, joka sisältää tehollisen määrän entsyymejä, esim. proteolyyttisesti ja/tai lipolyyttisesti tehollisen määrän entsyymejä, jonka jälkeen ainekokoomus poistetaan mainitusta aineesta yhdessä hajonneiden ja liuenneiden epäpuhtauksien kanssa. Nykyisin parhaana pidetyssä sovellutuksessa käytetään entsyymejä (käsittäen niiden ak-

tiiviset aggregaatit), joiden molekyylipaino on noin 15000 - 80000 Dalton, tai tällaisten entsyymien aktiivisia aggregaatteja. Parhaimpina pidetään erityisesti entsyymejä, joiden molekyylipainot ovat noin 20000-
5 40000 Dalton. Hyvin suuria etuja saavutetaan kuolleen aineiden, kuten märän, verirupien ja kuolleen kudoksen sekä fibriinin tai koaguloituneen veren poistossa. Tämä pätee erityisesti silloin, kun aineet poistetaan elävästä kudoksesta.

10 Ajanjakso, joka tarvitaan hajottamaan ja/tai liuottamaan epäpuhtaudet, vaihtelee tapauksesta toiseen, mutta se on valittava riittävän pitkäksi mahdollistamaan hajottaminen ja/tai liuottaminen entsyymien vaikutuksesta. Käsittely voidaan myös toistaa, mikäli tarpeen.

15 On mahdollista käyttää ainekokoomuksia, joissa yksi tai useampi näistä entsyymeistä on poistettu sinänsä tunnetuin menetelmin, esim. lisäämällä yhdelle entsyymille spesifistä inhibiittoria tai poistamalla kyseinen entsyymi.

20 Proteolyyttinen aktiivisuus on optimilämpötilassa korkea pH-välillä 5 - 10. pH-optimi on välillä 7 - 9. Lämpötilaväli hyvää proteolyyttistä aktiivisuutta varten on 25 - 70 °C, ja optimilämpötila on välillä 30 - 55 °C. Aktiivisuus säilyy aina lämpötilaan 0 °C asti.

25 Yllä mainittuja lämpötila- ja pH-välejä voidaan kaikkia käyttää keksinnön eri sovellutuksissa, vaikka tietyissä potentiaalisissa sovellutuksissa voidaan käyttää myös muita liikkumavälejä.

Entsyymien valmistus eläimistä toteutetaan
30 tunnetuin menetelmin. Täten tuoreet tai tuoreina pakastetut eläimet homogenisoidaan ja uutetaan esim. vedellisellä väliaineella. Saatu uute voidaan lyofilisoida ja varastoida. Uutos voidaan edelleen puhdistaa esim. uuttamalla se lipidä liuottavalla liuottimella lipidien
35 uuttamiseksi; jos lisäpuhdistus on tarpeen, geeli-, ultra- tai membraanisuodatusta voidaan käyttää. Muut puhdistusvaiheet, jotka ovat potentiaalisesti hyödyll-

lisiä, ovat ionivaihto ja affiniteettikromatografia. Uuttaminen ja homogenisointi pitäisi toteuttaa kylmässä alle tai lähellä +5 °C.

Vesiuutoksella saatavia entsyymivalmisteita
5 voidaan käyttää suoraan, tai mikäli tarpeen, lisäpuhdistuksen jälkeen. Useimmissa tapauksissa on edullista lyofilisoida valmiste, josta lipidit on uutettu. Tällaisissa tapauksissa saatava jauhe voidaan varastoida pitkäksi aikaa. Jokainen käyttöalue edellyttää tiettyjä
10 ainekokoomuksia tai näiden muotoja. Tällaiset muodot ovat sinänsä tunnettuja. Täten keksintö koskee erilaisissa fysikaalisissa muodoissa olevia entsyymikokoomuksia, kuten lyofilisoituja entsyymejä, homogeenisia vedellisiä liuoksia tai yllä mainittuja ja uusina esitettyjä entsyymikokoomuksia. Kussakin ainekokoomuksessa
15 olevien entsyymien tarkka määrä vaihtelee tapauksesta toiseen - puhtaasta lyofilisoidusta uutoksesta hyvin monimutkaisiin pesuainekokoomuksiin. Entsyymimäärän pitäisi olla riittävä hajottamaan ja/tai liuottamaan
20 aiotut saasteet aiheuttamatta tarpeettomia vastakkaisvaikutuksia aineeseen, josta epäpuhtaudet on tarkoitus poistaa. Muut komponentit uudessa puhdistusainekokoomuksessa pitäisi valita niin, että ne eivät vaikuta siihen vastakkaisesti olosuhteissa, joissa sitä käytetään.

25 Lopullisessa ainekokoomuksessa läsnäolevan entsyymivalmisteen määrä voi vaihdella välillä 0,0001-100 p-%. Proteaasiaktiivisuuden suhteen lopullinen ainekokoomus voi sisältää 0,0001 - 0,1 entsyymiyksikköä/mg. Riippuen käytettävän entsyymivalmisteen puhtaudesta, myös muita pitoisuusrajoja voidaan soveltaa.
30 Yllä mainitut entsyymiyksiköt on annettu μ -mooleina tyrosiiniekvivalenttia/min kaseiinisubstraattina.

Keksinnön mukaan valmistettavien entsyymikokoomuksien yhteydessä voidaan käyttää erilaisia lisäaineita
35 ja kantajia. Sopivia kantajia voivat olla steriilit, vedelliset ja fysiologisesti hyväksyttävät suolaliuokset, orgaaniset ja epäorgaaniset geeliä muodostavat

aineet, esim. polymeerit, silikoniöljyt ja muut aineet ja näiden seokset, jotka aiheuttavat ainekokoomuksen halutut fysikaaliset ominaisuudet. Lisäaineiden joukossa voidaan mainita antimikrobiset aineet, hajusteet, erilaiset anioniset, kationiset, amfoteeriset ioniset ja neutraalit pinta-aktiiviset aineet (tensidit ja emulgaattorit). Tällaiset komponentit ovat jo sinänsä tunnettuja muiden entsyymikokoomuksien yhteydestä pesulakäyttöä ja entsyymaattista hajotusta varten, tunnetaan esim. julkaisuista DE 2 130 833, GB 1 280 497, GB 1 29 6901, GB 1 573 964, US 3 627 688, US 3 855 142, US 4 212 761, US 4 243 546, US 4 242 219, US 4 287 082, US 4 305 837 ja US 4 307 081.

Vahingoittuneiden kudoksien käsittelemiseksi on edullista käyttää ainekokoomusta, joka sisältää fysiologisesti ja farmaseuttisesti hyväksyttävän kantajan tai ei kantajaa ollenkaan. Tällainen ainekokoomus voi olla steriili. Sterilisointi voidaan toteuttaa esim. steriilillä suodatuksella silloin, kun ainekokoomus on liuos. Steriilit ainekokoomukset voidaan myös muodostaa sekoittamalla steriilejä komponentteja aseptisissä olosuhteissa.

Keksinnön erilaiset sovellutukset ilmenevät tarkemmin selitykseen liitettyistä patenttivaatimuksista. Alla keksintöä havainnollistetaan erilaisilla ei-rajoitavilla esimerkeillä.

Esimerkki 1

A. Krilliuutoksen valmistus

Krilli, *Euphausia superba*, pyydystetty Antarktiksien kesän aikana ja jäädytetty välittömästi sekä varastoitu noin 2 vuotta lämpötilassa noin -80°C , tuodaan huoneeseen, lämpötila noin $+5^{\circ}\text{C}$. Kun krilli on melkein sulanut, 25 g krilli sekoitetaan 50 ml ionivaihdetun veden kanssa, jonka lämpötila on 0°C . Seos homogenisoidaan ja sentrifugoidaan sitten kylmässä (noin 0°C) noin puolen tunnin ajan, 12500 g. Punainen pinnalla oleva neste dekantoidaan ja otetaan talteen, pohjalle

laskeutunut jäännös suspendoidaan uudelleen 50 ml ionivaihdettuun veteen ja sentrifugoidaan kuten yllä. Uusi pinnalla oleva neste dekantoidaan ja yhdistetään ensimmäisestä uutoksesta saatuun pinnalla olevaan nesteeseen.

- 5 Lipidien poistamiseksi uutoksesta 20 ml CCl_4 lisätään yhdistettyyn pinnalla olevaan nesteeseen ja homogenisoidaan kylmässä (0°C). Seos sentrifugoidaan kylmässä 10 min ajan, 2500 g. Vesifaasi poistetaan ja uutetaan vielä kerran CCl_4 :lla ja sentrifugoidaan, kuten
10 on kuvattu yllä. Vesifaasi käytetään kohdan 1B mukaisesti, jossa sitä on nimitetty vesiuutokseksi.

B. Jatkopuhdistus geelikromatografialla

- 20 ml kohdasta A saatua vesiuutosta johdetaan kromatografiin, Sephadex^R-G-100 (dekstraani liittynyt
15 ristisidoksilla epikloorihydriniin, Pharmacia Fine Chemical AB, Uppsala, Ruotsi) kolonnissa, halkaisija 3,1 cm ja korkeus 69 cm. Kolonni saatetaan tasapainoon ja eluoidaan (30 ml/h) puskurilla Tris-HCl (0,05 M, pH 7,5) lämpötilassa $+5^\circ\text{C}$. Fraktiot kerätään talteen.
20 Eluointiprofiilia tarkkaillaan spektrofotometrisesti mittaamalla UV-adsorptio aallonpituudella 280 nm ja proteolyyttinen aktiivisuus fraktioista määrätään erikseen. Entsymaattisesti aktiiviset fraktiot yhdistetään ja dialysoidaan ionivaihdettua vettä vasten. Lopuksi
25 yhdistetyt fraktiot lyofilisoidaan ja käytetään keksinnön mukaan.

- Proteolyyttinen aktiivisuus fraktioissa ja lyofilisoidussa valmisteessa määrätään käyttäen hemoglobiinia ja/tai kaseiinia substraatteina (Rick, W.I.;
30 Methods of Enzymatic Analysis; Ed Bergmeyer, H.U.; Vol 2, s. 1013 - 23 (1974); Academic Press, New York). Suoritettaessa geelikromatografia entsyymiaktiivisuus havaitaan pääasiassa fraktioissa vastaten molekyylipainoja 20000 - 40000 Dalton.

- 35 Esimerkki 2

Villakuoreuutoksen valmistus

Villakuore (Mallotus villosus), pyydystetty

Finnmarkin (Norja) rannikon ulkopuolella syyskuussa, pakastettiin ja varastoitiin lämpötilassa -20°C vuoden ajan. Pakastettu villakuore pantiin sitten lämpötilaan 5°C . 24 h kuluttua sisälmykset käsittäen ruuansulatus-
5 kanavan poistettiin osittain sulaneesta villakuoreesta. 25 g sisälmyksiä sekoitettiin 50 ml ionivaihdetun veden kanssa ja homogenisoitiin lämpötilassa 0°C . Seos sentrifugoitiin sen jälkeen puolen tunnin ajan, 12500 g. Osittain sakkainen pinnalla oleva neste dekantoitiin ja
10 otettiin talteen. Pohjalle painunut kerros suspendoitiin uudelleen 50 ml ionivaihdettuun veteen ja sentrifugoitiiin kuten yllä. Uusi pinnalla oleva neste dekantoitiin ja yhdistettiin ensimmäisestä uutoksesta saatuun pinnalla olevaan nesteeseen.

15 Lipidien poistamiseksi uutoksesta 20 ml CCl_4 lisättiin yhdistettyyn pinnalla olevaan nesteeseen ja homogenisoitiin kylmässä 0°C . Seos sentrifugoitiin 15 min ajan kylmässä, 2500 g. Vesifaasi poistettiin ja uutettiin vielä kerran hiilitetrakloridilla ja sentrifugoitiin, kuten on kuvattu yllä. Vesifaasi lyofilisoitiin
20 lopuksi.

Esimerkki 3

Ainekokoomukset sisältäen entsyymejä Mallotus villosus'sta

25 A. 10 mg villakuoreesta (esimerkin 2 mukaisesti) lyofilisoitua entsyymivalmistetta sekoitettiin 0,4 mg kalsiumasetaatin kanssa ja amylum resorb.(tärk.) lisättiin 1 g asti (Biosorb[®]; Arbrook, Kirkton Campus, Livingston, Skotlanti).

30 Homogeeninen saatu jauhe sekoitettiin 10 g fysiologisen natriumkloridiliuoksen (salive) kanssa käytettäväksi kosteisiin siteisiin.

B. 10 mg lyofilisoitua villakuorevalmistetta (esimerkistä 2) sekoitetaan polyetyleeniglykoligeelin
35 kanssa (sisältäen yhtä suuret osat Macrogol 600 ja Macrogol 800, Hoechst, Länsi-Saksan Liittotasavalta) 1 g saakka. Saadaan A 1 % entsyymikokoomusta, jolla on

puolikiinteä, homogeeninen konsistenssi.

Esimerkki 4

Ainekokoomus sisältäen krillientsyymejä liuok-
sessä

- 5 10 mg lyofilisoitua entsyymivalmistetta (esimerkistä 1 B) sekoitetaan 0,4 mg kalsiumasetaatin kanssa ja amyllum resorb. lisätään 1 g saakka. Näin saatu homogeeninen jauhe sekoitetaan ravistamalla 10 g suolaliuoksen kanssa ja saatu ainekokoomus käytetään steriiliin
- 10 hauteen imeyttämiseksi, jolla on koko 3 x 3 cm ja joka sisältää 4 kerrosta harsokangasta. Kosteata haudetta käytetään kuollutta kudosta sisältävään haavaan. Harsokangas kääritään kahdesti hauteen ympärille sen kiinnittämiseksi. Tämä side kiinnitetään sitten liimalaastarilla. Haude imeytetään joka neljäs tunti ainekokoomuksella. Käytön rajoittamiseksi ainoastaan siihen osaan haudetta, joka peittää haavan, seosta lisätään käyttäen injektioneulaa, jossa on suuri aukko. Kerran päivässä koko side poistetaan ja korvataan uudella siteellä.
- 15 20 Tämän operaation aikana hajonneet ja hajaantuneet kuolleet osat on poistettava mekaanisesti. Toteutetussa käsittelyssä haava puhdistui 1 viikon kuluttua.

Esimerkki 5

Krillientsyymien vaikutus kuolleisiin aineisiin

- 25 Krillientsyymien vaikutuksen tutkimiseksi ihmisten ihossa oleviin kuolleisiin komponentteihin toteutettiin seuraava koe. Kuollutta kudosta levitettiin kahden ihmisen oikean käden yläpuolen vahingoittumattomalle iholle. Kuollut kudoksesta oli peräisin jalan haavasta. Aine muodostui hajonneesta kollageenikudoksesta,
- 30 koaguloituneesta verestä, fibriinistä, märästä ja ruvista. Kuhunkin ihmiseen annosteltu määrä oli 0,5 g.

- Kuollut kudoksesta peitettiin kussakin ihmisessä hauteella (pinta-ala 10 cm²), mikä oli imeytetty esimerkiksi 4 mukaan valmistetulla krillientsyymikokoomuksella.
- 35 Jokainen haude peitettiin harsokankaalla. Neljän tunnin jälkeen molemmat hauteet olivat lähes täysin kuivia, ja

sen vuoksi täytyi lisätä lisää entsyymikokoomusta. 12 tunnin kuluttua haude poistettiin ja kumpaankin käteen jäänyt kuollut kudokse punnittiin erillisesti. Aine osoitti hajoamisen merkkejä, ja niiden paino oli vähentynyt
 5 noin 20 %. Iho, joka oli kosketuksissa kuolioisen aineen kanssa kokeen aikana, oli vahingoittumaton. Mitään negatiivista symptomia ei todettu koehenkilöissä.

Esimerkki 6

In vivo koe pienen kuoliohaavan omaavalla
 10 henkilöllä A

Henkilö, jolla oli pieni kuolioista ainetta sisältävä mätähaava oikeassa etusormessaan, käsitteli itsensä 5 päivän ajanjakson ajan päivittäin käyttäen 1 % krillientsyymiliuosta (valmistettu esimerkin 4 mu-
 15 kaan). Vahingoittunut alue kesti entsyymikokoonpanon hyvin ja osoitti merkittävää pyrkimystä puhdistua ja kasvaa epiteeliä. Mitään vastakkaisia vaikutuksia ei havaittu.

Esimerkki 7

20 Puhdistusvaikutus lipidirikkaassa talivuotoi
sessä ihossa krillientsyymien vaikutuksesta yhdistet-
tynä amfoteeriseen tensidiin

Käytettiin tavanomaista pesuainetta sisältäen 18,00 p-% alkyyli-imidatsolinia, 1,90 p-% lauryylipoly-
 25 peptidin kondensaattia, 1,7 p-% undekylenyylipolypeptidin kondensaattia, 28,00 p-% muunneltua alkyylieterisulfaattia puskuroituna rasva-aineilla (lanoliini), 1,4 p-% kookospähkinäamiinisarkosinaattia, 1,9 p-% undekyleenihappoa, 2,00 p-% undekyleenimonoetanoliamidin
 30 sulfosuggenaattia, maitohappoa q.s. pH 6,4 ja vettä loput 100 % saakka.

Lyofilisoitua krillientsyymivalmistetta (esimerkistä 1 B) lisättiin pesuaineeseen antaen 1 p-% entsyymi-pesuainekokoomuksen. 10 cm² ala ihosta alueella
 35 regio sternalis kahdessa ihmisessä, joilla oli ilmeinen seborrhoea oleosa tällä alueella, valittiin kokeeseen. Nämä alueet pestiin kahdesti päivässä 5 päivän ajan

entsyymi-pesuainekokoomuksella. Näytteet samasta alueesta otettiin sekä ennen pesua että pesun jälkeen. Näytteet kerättiin ja analysoitiin fotometrisesti Schaeffer H. ja Kuhn-Bussius H. mukaan (Arch. Klin. u. exper. Dermatol. 238 (1970) s. 429).

Tulos osoitti merkittävää ihottuman vähenemistä kummallakin kahdesta tutkitusta henkilöstä. Täten tämä indikoi ihon lipidin hajoamista käytetyn entsyymikokoomuksen vaikutuksesta. Suhteellisesti hyvin pieni vaikutus havaittiin silloin, kun mainitut kaksi henkilöä käyttivät vain pesuainetta ilman entsyymejä.

Esimerkki 8

Vertailevat pesukokeet tekstiilillä. A vertailu E. superba'n (krilli) entsyymien, alka lase'n R ja tislattun veden kesken

Homogeenisestä kangaspalasta leikattiin samantyyppiset kappaleet (5 x 5 cm). Kangas oli kaksinkertaista ja toinen puoli oli silkkiä ja toinen puoli kuitukudosta koostuen puuvillan ja synteettisten kuitujen seoksesta.

Kuusi palaa tahrattiin verellä, kuusi maidolla ja kuusi indian-musteella. Kuuteen erlenmeyer-pulloon lisättiin 100 ml lyofilisoidun krillientsyymien vesiliuosta (0,5 p/til.-%). Lyofilisoitu krillientsyymi oli saatu esimerkiksi 1 B. Kuuteen muuhun erlenmeyer-pulloon lisättiin 100 ml 0,5 p/til.-% Alcalase^R-liuosta (Novo Industri, Kööpenhamina, Tanska) tislatussa vedessä. 100 ml tislattua vettä lisättiin 6 muuhun erlenmeyer-pulloon. Jokaiseen kahdesta pullosta sisältäen krillientsyymiliuosta, jokaiseen kahdesta pullosta sisältäen Alcalase^R-liuosta ja jokaiseen kahdesta pullosta sisältäen tislattua vettä lisättiin 1 veren tahraama kangaskappale. Analogisesti muut tahratut kappaleet lisättiin jäljellä oleviin pulloihin niin, että vain yksi kappale oli kussakin pullossa. Täten jokaisen ainekokoomuksista annettiin vaikuttaa kahteen verellä, maidolla ja indian-musteella tahrattuun kankaaseen. Tämän jälkeen pulloja sekoitettiin ravistellen vesikylvyssä 1 tunnin ajan lämpötilassa +45 °C.

Tämän käsittelyn jälkeen pesuneste dekantoitiin ja 100 ml tislattua vettä lisättiin kuhunkin pulloon. Sitten pullot suljettiin kumitulpalla ja sekoitettiin voimakkaasti yhden minuutin ajan. Tämän jälkeen kangaspalat
 5 kerättiin ja pestiin hitaasti virtaavan vesihanan alla 10 minuuttia. Kappaleet käärittiin puhtaisiin valkeisiin pyyheliinoihin ja niiden annettiin kuivua.

Pesun vaikutus so. vaatteiden kirkkaus määrät-
 tiin sitten kaksoissokkotestillä, so. tutkija ei tiennyt
 10 sitä, millä pesuainekokoomuksella kukin kappale oli käsitelty. Pesuvaikutus, so kankaan kirkkaus ja puhtaus arvioitiin silmämäärin käyttäen arvosteluasteikkoa: 0 = täysin puhdas kangas; 1 = merkityksettömiä määriä likaa jäljellä; 2 = kohtuullinen määrä likaa jäljellä; 3 =
 15 huomattavia määriä likaa jäljellä. Tulokset pesuista on esitetty taulukossa 1.

Taulukko 1

0,5 p/til.-% krillientsyymin; 0,5 p/til.-%
 20 Alcalase[®]'n tislatussa vedessä; ja tislatus veden ilman entsyymilisäystä pesuvaikutus.

25 0,5 % krilli- 0,5 % Alcalase[®] tisl. Tisl.
 entsyymi, se[®] tisl. vesi
 tisl. vesi vesi

	Epäpuht.	Kangas		Kangas		Kangas	
		1	2	1	2	1	2
	Veri	1	1	2	2	2	3
30	Maito	1	1	2	1	2	2
	Indian- muste	2	2	2	2	3	3

Taulukosta 1 voidaan nähdä, että krillistä
 35 saatava entsyymikokoomus on tehokkaampaa kuin Alcalase[®] tai tislattu vesi. Vastaavia kokeita voidaan suorittaa analogisella ainekokoomuksella sisältäen villakuore-

Esimerkki 9

Fibriinin, kuolleen kudoksen ja koaguloituneen veren hajoaminen

A. Fibriini

- 5 Fibriini leikeltiin palasiksi, jotka vaihtelivat painoltaan 0,2 - 0,3, g. Kutakin käytettyä entsyymikokoomusta varten numeroitiin 20 koeputkea ja jokaiseen näistä pantiin etukäteen punnittu pala fibriiniä. Kahteenkymmeneen koeputkeen, sisältäen vast. jokaisen
- 10 ainekokoomuksen, lisättiin yhtä suuret määrät entsyymikokoomusta. Varidase[®]'a käytettiin laimennuksessa 1:20 (p/til.-%) perustuen kaupalliseen valmisteeseen) tislatussa vedessä. Trypure[®]'a käytettiin konsentraatiossa 1:15 (p/til.-% perustuen kaupalliseen valmisteeseen)
- 15 suolaliuoksessa. Muiden entsyymien valmisteita käytettiin laimennettuina suolaliuokseen ja näin saadut ainekokoomuksen konsentraatiot on esitetty taulukossa 2. Käytetyt krillientsyymit ja villakuore-entsyymit olivat lyofilisoituja tuotteita, jotka oli saatu esimerkkien 1
- 20 B ja vast. 2 mukaan. Tutkimus suoritettiin lämpötilassa +33 °C, joka oli sama kuin haavojen lämpötila. 12 h ja vast. 24 h jälkeen reaktiot pysäytettiin ja jäljellä oleva fibriini kerättiin ja säilytettiin kostealla suodatinpaperilla 60 s sekä punnittiin. Papain, Ficin
- 25 ja Pankreatin saatiin E. Merck'lta, Darmstadt, Saksan Liittotasavalta.

Taulukko 2

- Erilaisten entsyymivalmisteiden vaikutus fibriinin, konsentraatiot on annettu p/til.-%.

-	tarkoittaa	0 - 25 %	painohäviö
--	tarkoittaa	26 - 50 %	painohäviö
---	tarkoittaa	51 - 75 %	painohäviö
----	tarkoittaa	76 - 100 %	painohäviö

		Luenta kuluttua	
Entsyymi		12 h	24h
Trypure ^R		----	ei mitään jäljellä
5	Varidase ^R	--	--
	Ficin 1 %	-	-
	Papain 1 %	--	--
	Pankreatin ^R 1 %	---	---
	Krillientsyymit 1 %	----	ei mitään jäljellä
10	Villakuore- entsyymit 1 %	----	ei mitään jäljellä

15 Fibriini liukeni lyhyimmässä ajassa ainekokoomukseen, joka sisälsi krillientsyymejä, villakuore-entsyymejä ja Trypure^R'a annetussa järjestyksessä. Varidase^R ja Alcalase^R olivat samanlaisia kuin Ficin, ja Papain'lla oli heikoin vaikutus.

B. Kuolleen kudoksen hajotus

20 Kuoliokudokset leikeltiin palasiksi 0,2 - 0,3 g. Kutakin käytettyä entsyymikokoomusta varten numeroitiin 20 koeputkea, ja jokaiseen näistä koeputkista pantiin etukäteen punnittu määrä kuollutta kudosta. Kuhunkin 20 koeputkeen lisättiin kutakin liuosta ja
 25 yhtä suuret määrät kutakin entsyymikokoomusta. Käytetyt ainekokoomukset on annettu taulukossa 3, ja niiden konsentraatiot on annettu p/til.-% suolaliuoksessa. Varidase^R ja Trypure^R laimennettiin esimerkin 8 A mukaisesti. 12, 24, 36 ja 72 h aikavälien jälkeen hajotus
 30 pysäytettiin ja kuolleet kudokset kerättiin sekä punnittiin; tulokset taulukossa 3.

Ilmeisesti Alcalase^R, krillientsyymit ja villakuore-entsyymit ovat todella kykeneviä liuottamaan kuolleita kudoksia eivätkä lisää niiden vesipitoisuutta
 35 kuten Varidase^R, Trypure^R ja suolaliuos. Kuitenkin, tarkasteltaessa niiden vaikutusta kuoliokudoksiin, Papain^R ja Pankreatin^R osoittavat samat tendenssit kuin

markkinoilla olevat ainekokoomukset, so painon lisäys seurauksena vesipitoisuuden lisäyksestä. Ficin'lla on samanlainen vaikutus mutta heikompi kuin Alcalase[®]lla, krillientsyymeillä ja villakuore-entsyymeillä.

5 C. Koaguloituneen veren hajoaminen

Koaguloitunutta verta leikeltiin palasiksi ja annosteltiin koeputkiin, jotka järjestettiin samoin kuin esimerkissä 9A ja B. Käytetyt entsyymivalmisteet oli liuotettu suolaliuokseen, ja ainekokoomuksien konsentraatiot (p/til.-%) on esitetty taulukossa 4. Aikavälien 12 ja vast. 24 h kuluttua hajotus pysäytettiin, ja verisaostumat kerättiin sekä punnittiin. Tulokset on esitetty taulukossa 4.

Taulukko 3

15 Eri entsyymikokoomuksien vaikutus kuolleen kudokseen, konsentraatiot on esitetty p/til.-%.

	----	painohäviö	76 - 100 %
	---	painohäviö	51 - 75 %
	--	painohäviö	26 - 50 %
20	-	painohäviö	1 - 25 %
	0	status quo	0 %
	+	painolisäys	1 - 25 %
	++	painolisäys	26 - 50 %
	+++	painolisäys	51 - 75 %
25	++++	painolisäys	76 - 100 %

	Entsyymi- kokoomus	konsent.	Luenta			
			12 h	24 h	36 h	72 h
	Varidase [®]	1:20(p/til.)	+++	+++		
30	Trypure [®]	1:15(p/til.)	++	++		
	Ficin	0,5 %	0	0	0	-
		1,0 %	+	0	--	---
		2,0 %	+	-	-	--
	Papain	0,5 %	0	+		+
35		1,0 %	0	+		+
		2,0 %	+	+	+	+
	Alcalase [®]	0,5 %	0	-	0	-

		18		80598	
		1,0 %	-	-	-- --
		2,0 %	-	-	- -
	Krilllient-				
	syymit	0,5 %	-	--	-- --
5		1,0 %	--	---	---
		2,0 %	-	---	----
	Villakuore-				
	entsyymit	0,5 %	--	--	---
		2,0 %	-	--	---
10	Pankreatin ^R	0,5 %	0	++	++ ++
		1,0 %	+	+++	+++ +++
		2,0 %	++	++++	+++ +++

Taulukko 4

15 Eri entsyymikokoomuksien vaikutus koaguloituneeseen vereen.

-	painohäviö	0 - 25 %
--	painohäviö	26 - 50 %
---	painohäviö	51 - 75 %
----	painohäviö	76 - 100 %

	Entsyymikokoomus	konsent.	Luenta jälkeen	
			12 h	25h
	Varidase ^R	1:20 (p/til.)	-	--
25	Saliini	0,9 %	-	-
	Ficin	1,0 %	-	--
	Papain	1,0 %	-	-
	Alcalase ^R	1 %	-	-
	Pankreatin ^R	1,0 %	--	--
30	Krilllient-			
	syymit	1,0 %	---	----
	Villakuore-			
	entsyymit	1,0 %	---	---

35 Taulukosta 4 nähdään, että koaguloituneen veren osalta krillientsyymit olivat ylivoimaisia villakuore-entsyymeihin nähden, jotka molemmat osoittivat

entsyymeihin nähden, jotka molemmat osoittivat ylivoimaista vaikutusta muihin tutkittuihin entsyymikokoomuksiin nähden.

Esimerkki 10

5

Tutkimukset eri entsyymikokoomuksien vaikutuksesta terveeseen ihoon

Erilaisia entsyymien Ficin, Papain, Alcalase[®] ja Pankreatin[®] sekä krillientsyymien ja villakuorentsyymien liuoksien - kaikki konsentraatiossa 1 p/til.-
10 % - levitettiin (0,3 ml) kahden koehenkilön terveelle iholle ja peitettiin ohuella siteellä. Mitään merkkiä tulehduksesta ei havaittu iholle 12 h jälkeen. Sama havainto tehtiin käytettäessä entsyymejä Varidase[®] ja Trypure[®]. Täten entsyymit eivät ilmeisesti vaikuta
15 kuolleisiin kudoksiin kokeissa käytetyissä konsentraatioissa.

PATENTTIVAATIMUKSET

1. Menetelmä entsyymivalmisteen valmistamiseksi, jolla on kyky liuottaa biologisia epäpuhtauksia, 5 erityisesti peptidejä ja lipidejä sisältäviä epäpuhtauksia, t u n n e t t u siitä, että lahkoon Euphausiacea kuuluvia eläimiä homogenisoidaan ja homogenaatista erotetaan ekstrahoimalla liuotinaineen avulla entsyymivalmiste, joka sisältää entsyymiseoksen, jossa on endo- 10 ja eksopeptidaaseja.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että homogenaatista erotetaan lipidejä.
3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että entsyymivalmiste 15 sterilisoidaan.
4. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että ekstraktio suoritetaan vedellä tai vesipitoisella liuotinaineella.
- 20 5. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että entsyymivalmisteen teesta poistetaan lipidejä ja se lyofilisoidaan.
6. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 5 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että menetelmässä 25 erotetaan entsyymejä, joiden molekyylipaino on 15.000-80.000 Dalton tai jotka ovat tällaisten entsyymien aktiivisia aggregaatteja.
7. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että eristettyyn 30 entsyymiseokseen kuuluu entsyymejä, jotka ovat kykeneviä liuottamaan ja poistamaan epäpuhtauksia, jotka kuuluvat aineryhmään: fosfolipidit, proteiinit, peptidit, nukleinihapot, polysakkaridit, mukopolysakkaridit ja näiden hajoamistuotteet.

PATENTKRAV

1. Förfarande för framställning av en enzym-
beredning, som har förmåga att avlägsna biologiska
5 föroreningar, särskilt föroreningar innehållande både
peptider och lipider, k ä n n e t e c k n a t av att
man homogeniserar djur av ordningen Euphausiacea och
genom extraktion med ett lösningsmedel isolerar en
enzymberedning innehållande en blandning av enzymer,
10 vari ingår såväl endo- som exopeptidaser.

2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n
n e t e c k n a t av att från homogenisatet eventuellt
avlägsnar eventuella lipider.

3. Förfarande enligt patentkravet 1 eller 2,
15 k ä n n e t e c k n a t av att enzymberedningen steri-
liseras.

4. Förfarande enligt något av patentkraven 1-
3, k ä n n e t e c k n a t av att extraktionen utförs
med vatten eller ett vattenhaltigt lösningsmedel.

20 5. Förfarande enligt något av patentkraven 1-
4, k ä n n e t e c k n a t av att man avlägsnar lipi-
der från enzymberedningen och lyofiliserar denna.

6. Förfarande enligt något av patentkraven 1-
5, k ä n n e t e c k n a t av att man isolerar en-
25 zymer, som har en molekylvikt från ca 15.000 till ca
80.000 Dalton eller är aktiva aggregat av sådana en-
zymer.

7. Förfarande enligt något av patentkraven 1-
6, k ä n n e t e c k n a t av att i den isolerade
30 enzymblandningen ingår enzymer, som är kapabla att
upplösa och avlägsna föroreningar innehållande blandnin-
gar av ämnen valda bland lipider, fosfolipider, prote-
iner, peptider, nukleinsyror, polysackarider, mucopoly-
sackarider och nedbrytningsprodukter av dessa ämnen.