



SUOMI—FINLAND

(FI)

**Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen**

[B] (11) **KUULUTUSJULKAISU
UTLÄGGNINGSSKRIFT** 71432

C (45) Patentti myönnetty
Patent beviljat 10 10 1986

(51) Kv.lk./Int.Cl.⁴ G 01 N 33/53, C 07 H 3/00

(21) Patenttihakemus — Patentansökning	814230
(22) Hakemispäivä — Ansökningsdag	31.12.81
(23) Alkupäivä — Giltighetsdag	05.03.81
(41) Tullut julkiseksi — Blivit offentlig	31.12.81
(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. — Ansökan utlagd och utskriften publicerad	09.09.86
(86) Kv. hakemus — Int. ansökan	PCT/SE81/00065
(32)(33)(31) Pyydetty etuoikeus — Begärd prioritet	05.03.80

Ruotsi-Sverige(SE) 8001748-6

- (71) Svenska Sockerfabriks AB, Box 17050, Malmö, Ruotsi-Sverige(SE)
- (72) Gunilla Pettersson Källenius, Enskede, Karl Arne Lundblad, Uppsala, Nils Roland Möllby, Gustavsberg, Stefan Birger Svensson, Stockholm, Jan Winberg, Stockholm, Ruotsi-Sverige(SE)
- (74) Berggren Oy Ab
- (54) Diagnostisia kompositioita ja niiden käyttö bakteeri-infektioiden yhteydessä - Diagnostiska kompositioner och deras användning i samband med bakterieinfektioner

(57) Tiivistelmä

Bakteeri-infektioihin liittyvään terapeuttiseen tai diagnostiseen käyttöön sopivia kompositioita, jotka sisältävät vaikuttavana osana, mielellään pääteasemassa rakenneosan α -D-Galp-(1-4)-D-Gal.

Nisäkkäiden, ihminen mukaanluettuna, terapeuttinen hoitomenetelmä, jossa nisäkkäälle annetaan vaikuttava määrä tällaista kompositiota. Menetelmä, jolla voidaan indentifioida tai kvantifioida kyseinen rakenneosa nisäkkään, ihminen mukaanluettuna, synnynnäisestä biologisesta materiaalista siten, että käytetään vasta-aineita, joiden syntyminen on pantu alulle tällaisen komposition avulla. Menetelmä, jolla voidaan tällaisia kompositioita käyttämällä indentifioida sellaiset bakteerien akseptorirakenteet (pili, syn. fimbriae), jotka tunnistavat kyseisen rakenneosan. Bakteerien akseptorirakenteiden puhdistusmenetelmä, jossa käytetään hyväksi tällaisen rakenneosan ja bakteerin vastaavan akseptorin välistä affiniteettia. Menetelmä, jolla voidaan diagnostisoida nisäkkäiden, ihminen mukaanluettuna, taipumus bakteeri-infektioon, johon liittyy tällainen rakenneosa, synnyttämällä kyseisen reseptorirakenteen vasta-aineita ja tutkimalla mainittujen vasta-aineiden ja solujen välinen reaktio nisäkkästä.

(57) Sammandrag

Kompositioner lämpliga för terapeutiskt eller diagnostiskt bruk vid bakterieinfektioner innehållande som aktiv ingrediens, fördelaktigen i ändställningen ett strukturelement α -D-Galp-(1-4)-D-Gal.

Förfarande för terapeutisk behandling av däggdjur, inklusive människa, varvid en effektiv dos av denna komposition administreras till däggdjuret. Förfarandet för identifiering och kvantifiering av ifrågavarande strukturelement i nativt biologiskt material från däggdjur, inklusive människa, sålunda att man använder antikroppar vars uppkomst har initierats med en dylik komposition. Förfarande med vars hjälp man med användning av dylika kompositioner kan identifiera bakterieacceptorstrukturerna (pili, syn. fimbriae), som identifierar ifrågavarande strukturelement. Förfarande för rening av bakterieacceptorstrukturer med utnyttjande av affiniteten mellan ett dylikt strukturelement och respektive acceptor hos bakterien. Förfarande för diagnostisering av däggdjurs, inklusive människas, bakterieinfektionsbenägenhet vari ett dylikt strukturelement ingår, genom att åstadkomma antikroppar mot nämnda receptorstruktur och undersöka reaktionen mellan nämnda antikroppar och celler från däggdjuret.

Diagnostisia kompositioita ja niiden käyttö bakteeri-infektioiden yhteydessä

Tämä keksintö koskee kompositioita, jotka ovat hyödyllisiä virtsatieinfektioiden diagnostiikassa.

Useimmat bakteeri-infektiot saavat alkunsa siitä, että bakteerit hyökkäävät limakalvojen kimppuun. Tällaisten infektioiden vallallepääsyssä on oleellista se, että bakteereilla on alunperin kyky kiinnittyä epiteelipintoihin. Niinpä gramnegatiivisten bakteerien (esim. *Escherichia coli*) infektointikyky on välittömästi yhteydessä bakteerin epiteelisoluihin kiinnittymiskyvyn kanssa (Ref. 1). *E. coli*-bakteerit kiinnittyvät helpommin emättimen epiteelisoluihin sellaisilla naisilla, joilla on taipumusta virtsatieinfektioihin, verrattuna terveiden naisten emättimen epiteelisoluihin (Ref. 2). Tämän kanssa yhtäpitävästi ovat sekä in vivo- että in vitro-kokeet virtsatieinfektioon taipuvaisilla tytöillä osoittaneet, että suurempi määrä bakteereja kiinnittyy virtsaputken ympäryksen epiteelisoluihin heillä verrattuna terveiden verrokkien vastaaviin soluihin (Ref. 3).

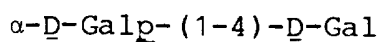
Solun pintojen hiilihydraattirakenteiden merkitys biologisessa tunnistamisessa (so. reseptorit) ovat viime aikoina olleet voimakkaan huomion kohteena. Tähän liittyy myös bakteerin kyky tunnistaa nisäkkään solut (so. kiinnittyminen) (Ref. 1). Tutkimukset ovat osoittaneet, että useiden uropatogeenisten *E. coli*-kantojen liittyminen virtsaputken ympäryksen soluihin liittyy kykyyn spesifisesti agglutinoida vain ihmisen erytrosyyttejä (Ref. 4). Tästä voidaan vetää se johtopäätös, että jokin aine, luonteeltaan mahdollisesti hiilihydraatti, on läsnä ihmisen erytrosyyttien pinnassa ja toimii reseptorina, jonka virtsateille patogeeniset bakteerit tunnistavat.

Tämän keksinnön tarkoitus on tarjota kompositio tai aine, jota voidaan käyttää diagnostisesti.

Vielä eräs tämän keksinnön tarkoitus on tarjota kompositio jolla voidaan identifioida tai kvantifioida reseptorirakenteet luonnollisesta biologisesta materiaalista, joka on peräisin nisäkkäistä, ihminen mukaanluettuna. Keksintö liittyy myös bakteerien akseptorirakenteiden puhdistusmenetelmään.

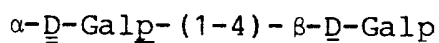
Keksintö koskee varsinkin uropatogeenisten E. coli-kantojen reseptorirakenteita.

Tähän keksintöön johtavissa tutkimuksissa ja kokeissa on havaittu, että uropatogeenisille bakteereille alttiina olevat ihmisen erytrosyyttien pinnan reseptorit sisältävät kemiallisena rakenneosana vähintään seuraavan:



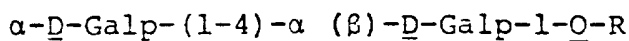
(Ref .12)

Erittäin edullisen rakenneosan kaava on:



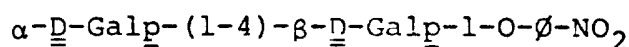
Niinpä keksinnön mukaisen komposition vaikuttava aineosa sisältää mielellään seuraavan kaavan mukaisen vaikuttavan

rakenneosan:

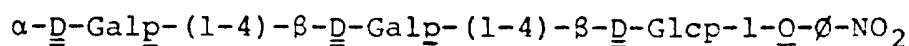


Tässä kaavassa symboli R tarkoittaa orgaanista ryhmää, joka on liittynyt joko α - tai β -konfiguraatiossa, ja joka voidaan valita mielivaltaisesti siten, että se ei kuitenkaan haittaa seoksen käyttöolosuhteita.

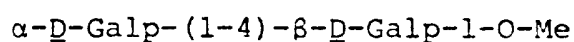
Tämän määritelmän sisällä ovat seuraavat yhdisteet erityisen mielenkiintoisia:



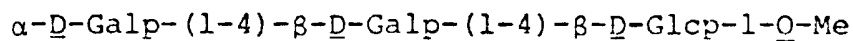
(p-nitrofenyyli 4-O- α - $\underline{\underline{D}}$ -galaktopyranosyyli- β - $\underline{\underline{D}}$ -galaktopyranosidi);



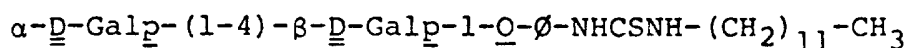
(p-nitrofenyyli 4-O-(4-O- α - $\underline{\underline{D}}$ -galaktopyranosyyli)- β - $\underline{\underline{D}}$ -galaktopyranosyyli- β - $\underline{\underline{D}}$ -glukopyranosidi);



(metyyli 4-O- α - $\underline{\underline{D}}$ -galaktopyranosyyli- β - $\underline{\underline{D}}$ -galaktopyranosidi);



(metyyli 4-O-(4-O- α - $\underline{\underline{D}}$ -galaktopyranosyyli)- β - $\underline{\underline{D}}$ -galaktopyranosyyli- β - $\underline{\underline{D}}$ -glukopyranosidi); ja



(4-($\underline{\underline{N}}$ '-dodekyylitioureido)-fenyyli 4-O- α - $\underline{\underline{D}}$ -galaktopyranosyyli- β - $\underline{\underline{D}}$ -galaktopyranosidi).

Kyseisen edelläkuvatun minimikaavan mukaisen rakenneosan tulisi mielellään sijaita pääteasemassa eli vasemmassa päässä edellä olevan kaavan mukaisesti vapaasti alttiissa tilassa.

Muut edulliset rakenneosat ilmenevät liitteenä olevista patenttivaatimuksista 1-2.

Edelleen keksintö tarjoaa seoksen, joka sisältää edellä mainitun rakenneosan ja farmaseuttisesti hyväksyttävän kantaja-aineen tai laimentimen.

Edelleen keksintö tarjoaa komposition, jota voidaan käyttää esim. kyseessä olevan luonnollisen biologisen materiaalin sisältämien reseptorirakenteiden tunnistamiseen ja kvantifiointiin tai bakteerien sisältämien akseptorirakenteiden tunnistamiseen ja puhdistamiseen. Tässä yhteydessä keksinnön mukaisesti käytettävät kompositiot sisältävät yhden tai useampia edellä mainittuja tai patenttivaatimusten mukaisia rakenneosia vähintään kaksivalenssisessä tilassa tai kovalenttisessa liitoksessa. Keksinnön mukaisen seoksen edullisen toteutustavan mukaan mainittu rakenneosa on liitetty kovalenttisesti makromolekyylliseen kantaja-aineeseen, mahdollisesti kytkentävarren välityksellä. Tällaisina makromolekyyllisinä kantaja-aineina voidaan käyttää synteettisiä tai luonnollisia polypeptidejä, polysakkarideja tai muita polymeerejä.

Rakenneosan ja makromolekyyllisen kantaja-aineen väliseksi kytkentävarreksi sopii mikä tahansa seuraavista:

rakenneosa - $1 - O - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{NHCSNH}$ - makromolekyylinen kantaja-aine,

rakenneosa - $1 - O - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{NN}$ - makromolekyylinen kantaja-aine,

rakenneosa - $\text{NH} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{NHCSNH}$ - makromolekyylinen kantaja-aine,

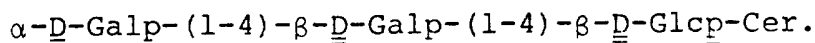
rakenneosa - $\text{NH} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{NN}$ - makromolekyylinen kantaja-aine,

rakenneosa aldoni happo - $\overset{\text{O}}{\parallel} \text{C} - \text{NH}$ - makromolekyylinen kantaja-aine,

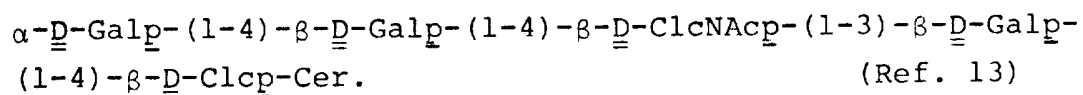
rakenneosia - $\text{NH}(\text{CH}_2)_n - \text{CO} - \text{NH}$ - makromolekyylinen kantaja-aine, jossa n voi olla välillä 1-20.

Edullisia mainituntyyppisten, keksinnön mukaisten kompositioiden rakenneosia on lueteltu liitteenä olevissa patenttivaatimuksissa 1-2 ja 9.

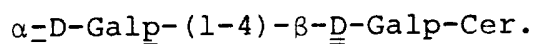
Uropatogeenisten bakteerien aiheuttama ihmisen erytrosyyttien hemagglutinaatioreaktio johtuu bakteerien pinnan akseptorirakenteiden (so. pili, syn. fimbriae, jotka ovat rihamaisia jäykkiä ulkonemia ja luonteeltaan proteiineja) ja edellä mainitun rakenneosan sisältävien erytrosyyttien pinnan reseptorien välisestä vuorovaikutuksesta. Tämä rakenneosa on läsnä ennen kaikkea ihmisen erytrosyyttien pinnassa ja kuuluu osana triheksosyyli-seramidi-glykosfingolipidiin, jonka kaava on seuraava:



vastaten veriryhmäantigeeniä p^k . Samanlainen rakenneosa on myös läsnä ihmisen erytrosyyteissä glykosfingolipidin osana, joka vastaa veriryhmäantigeeniä P_1 :



Edellä mainittuja ihmisen erytrosyyteistä löytyviä glykosfingolipidejä tavataan myös monien muiden solujen pinnasta, epiteelisolut mukaanluettuina. Erittäin mielenkiintoinen seikka tässä yhteydessä on se, että seuraavan kaavan mukaista biosyyli-seramidiglykosfingolipidiä

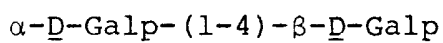


joka sisältää edellä mainitun rakenneosan, tavataan runsaasti normaalista ihmisen munuaiskudoksesta.

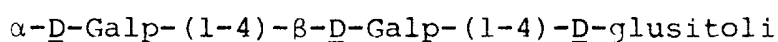
Se seikka, että virtsateille patogeeniset *E. coli*-bakteerit kiinnittyvät paljon pienemmässä määrin $\bar{\text{p}}$ -fenotyyppiä edus-

tavien ihmisten (so. yksilöiden, joilta puuttuvat glykos-fingolipidit P , P_1 ja P^k) virtsateihin ilmentää voimakkaasti sitä, että tämän keksinnön mukaisilla seoksilla on vaikutusta mainittujen bakteerien kykyyn kiinnittyä virtsateihin.

Vielä eräs todiste sille, että rakenneos



muodostaa merkittävän osa ihmisen solupintojen reseptoreissa, on yhdisteen



kyky inhiboida P -fenotyyppiä (so. P_1 , O_2 , P_1^k tai P_2^k -fenotyyppi) edustavien ihmisten erytrosyyttien agglutinoitumista.

Esimerkit

Keksintöä valaistaan seuraavilla esimerkeillä, joita ei ole tarkoitettu keksintöä rajoittaviksi.

Kokeissa käytetyt bakteerikannat on lueteltu liitteessä olevassa taulukossa 1, ja kaikki luetellut pyelonefriittikannat, paitsi kanta T1, on esitetty lapsista, joilla on akuutti pyelonefriitti. Kyseiset 20 *E. coli*-ulostekantaa saatiin 20 terveestä yksilöstä ja kanta H10407 saatiin D.J. Evansilta (Evans, D.G., Evans, J.D.J. ja Tjoa, W. (1977) *Infect Immun.* 18, 330-337).

Erytrosyytit saatiin naudoista, marsuista, aikuisista ihmisistä ja napanuoravedestä. $\bar{p}$ -, Vel(-)- ja Kp(b)-fenotyyppiä edustavien yksilöiden erytrosyytit saatiin Uumajan yliopistollisesta sairaalasta ja P_1^k -luovuttajien erytrosyytit saatiin Tr. H. Nevanlinnalta (Helsingin Punaisen Ristin Veripalvelu).

Verinäytteet kerättiin 1 % (paino/tilavuus) natriumsitraattiin tai happamaan sitraattidekstroosiin (ACD), pestiin neljä kertaa fosfaattipuskurisuolaliuokseen (PBS), pH 7,2, ja erytrosyytit suspendoitiin PBS:ään 3 % pitoisuuteen ja käytettiin samana päivänä. Hemaglutinaatiokokeet suoritettiin tavalliseen tapaan (Källenius, G. ja Möllby, R. (1979)

FEMS Microbiol. Lett. 5, 295-299).

Lyhyesti sanottuna bakteereja kasvatettiin yön yli CFA-agarilla (Evans, D.G., Evans, J.D.J. ja Tjoa, W. (1977) Infect. Immun. 18, 330-337) ja ne suspendoitiin PBS:ään pitoisuuteen 5×10^9 bakteeria per ml. Sarjalaimennukset suoritettiin PBS:ään käyttämällä 50 μ l laimenninta mikrotiitterilevyillä (Linbro Sc. Comp. Inc., Hamden, Connecticut). Sitten jokaiseen koloon lisättiin 50 μ l PBS ja 50 μ l tutkittavaa erytrosyyttisuspensiota. Inkuboitiin 1 tunti 4° C:ssa ja hemagglutinaatiotiitteri määritettiin sen suurimman laimennuksen käänteisarvoksi, jossa ilmeni erytrosyyttien näkyvä agglutinoituminen. Kaikissa kokeissa suoritettiin rinnakkaiskokeet käyttämällä 40 mM D-mannoosia.

Näiden hemagglutinaatiokokeiden tulokset on esitetty liitteenä olevassa taulukossa 1, joista ilmenee selvästi, että kaikki ~~pyelonefrit~~efriittiset E. coli-kannat aiheuttivat ihmisen erytrosyyttien hemagglutinoitumisen. Vastakohtana tälle vain vähän tai ei lainkaan agglutinoitumista havaittiin, kun käytettiin ulostekantoja (taulukko 1).

Hemagglutinoitumisen inhiboitumiskokeet suoritettiin siten, että käytettiin relevanttia inhibiittoria (vaikuttava aineosa) (50 μ l koloa kohti) sarjalaimennuksina ja sellainen määrä laimennettua bakteerisuspensiota, että saatiin aikaan matalin hemagglutinoiva konsentraatio kaksinkertaisena. Sekoitettiin 30 sek ja jokaiseen koloon lisättiin tasan jaolliset määrät (50 μ l) koe-erytrosyyttejä ja inhiboiva vaikutus tutkittiin.

Esimerkki 1

Sellaisten oligosakkaridien valmistus, jotka sisältävät rakenneosan α -D-Galp-(1-4)-D-Gal

A. α -D-Galp-(1-4)- β -D-Galp-(1-4)-D-glusitoli

Veriryhmiin A, B, AB ja O kuuluvan poisheitetyn veren erytrosyytit hajotettiin ja kalvot erotettiin sentrifugoimalla. Tällä tavalla saatiin 1 litrasta verta noin 10 g kalvoja. Kalvot esikäsiteltiin menetelmällä Dodge, J.T., Mitchell, C., ja Hanahan, D.J. (1963), Arch. Biochem. Biophys. 100, 119-130, eli homogenoitiin, suspendoitiin veteen ja lyofilisoitiin.

50 grammaan lyofilisoitua materiaalia lisättiin trifluorietikkahappoanhydridiä (1,25 l) ja trifluorietikkahappoa (1,25 l) ja saatua reaktioseosta kuumennettiin noin 48 tuntia noin 100°C:ssa haponkestävässä ruostumattomassa teräsputkessa noin 4 at ylipaineessa.

Kun reaktioseos tämän käsittelyn jälkeen jäähdytettiin ja haihdutettiin kuiviin, saatiin lähes musta jäännös. Tähän jäännökseen lisättiin metanolia (700 ml) ja seos haihdutettiin kuiviin. Sitten jäännös laimennettiin etikkahapon 50 % vesiliuoksella (1000 ml) ja annettiin seisoa huoneen lämpötilassa noin 18 tuntia. Reaktioseos suodatettiin lasisuotimella ja haihdutettiin kuiviin.

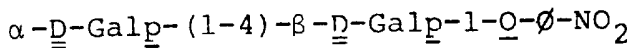
Saatu jäännös jaettiin veden ja etyyylieetterin välille. Eetterifaasi pestiin 4 kertaa vedellä ja yhdistetyt vesipesu-liuokset pestiin 4 kertaa dietyylieetterillä. Saatu vesiliuos on keltainen ja sisältää vapautuneet oligosakkaridit.

Oligosakkaridit puhdistetaan ensin geelikromatograafisesti ja sen jälkeen preparatiivisella paperikromatografialla ja puhdistusprosessia seurataan kaasukromatografialla ja suoralla massaspektrometrillä.

Edellä kuvatun oligosakkaridin on havaittu hemagglutinoitumisen inhiboitumiskokeissa inhiboivan tehokkaasti pyelonefritogeenisten E. coli-kantojen aiheuttamaa hemagglutinoitumista. Tämä seikka osoittaa, että oligosakkaridi estää bak-

teerien ja ihmisen erytrosyyttien reseptorien välistä vuorovaikutusta.

B. Kohdan A mukainen inhibiointikoe toistettiin käyttämällä seuraavan kaavan mukaista disakkaridijohdannaista:

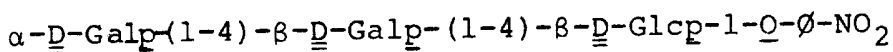


Yhdiste syntetisoitiin seuraavalla tavalla:

4-O- α - $\underline{\text{D}}$ -Galp- α, β - $\underline{\text{D}}$ -Galp:n okta-asetaatte (Ref. 14) käsiteltiin bromivedyllä jääetikassa. Muodostunut asetobromidisakkaridijohdannainen käsiteltiin natrium-p-nitrofenoksidilla (Ref. 15). Kun oli puhdistettu silikageelillä tuote de-O-asetyloitiin natriummetoksidilla metanolissa ja saatiin yhdiste.

Tämän disakkaridijohdannaisen on havaittu inhiboivan hemagglutinoitumisreaktiota samalla tavalla kuin edellä kohdassa A tapahtui.

C. Kohdan A mukainen inhibiitiokoe toistetaan käyttämällä inhibiittorina seuraavan kaavan mukaista sakkaridijohdannaista:

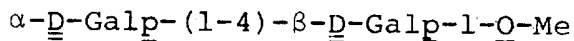


Tämä yhdiste syntetisoitiin seuraavalla tavalla:

4-O- α - $\underline{\text{D}}$ -Galp- β - $\underline{\text{D}}$ -Galp- α, β - $\underline{\text{D}}$ -Glc:n undeka-asetaatte (Ref. 16) käsiteltiin bromivedyllä jääetikassa. Saatua asetobromitrisakkaridijohdannainen käsiteltiin natrium-p-nitrofenoksidilla (Ref. 15). Puhdistettiin silikageelillä ja tuote de-O-asetyloitiin natriummetoksidilla metanolissa ja saatiin haluttu yhdiste.

Myös tämän sakkaridijohdannaisen havaittiin inhiboivan hemagglutinaatioreaktiota.

D. Edellä kuvattu inhibointikoe toistettiin käyttämällä seuraavan kaavan mukaista disakkaridijohdannaista:

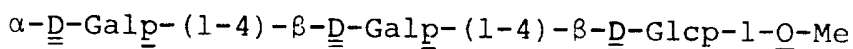


Tämä yhdiste syntetisoitiin seuraavalla tavalla:

Kun asetobromidisakkaridijohdannainen (kuvattu edellä kohdassa B) käsiteltiin hopeaoksidilla metanolissa, saatiin β -metyyliglykosidi (Ref. 17). Kun puhdistettiin silikageelillä ja tuote de-O-asetyloitiin natriummetoksidilla metanolissa, saatiin haluttu yhdiste.

Sakkaridijohdannaisten havaittiin inhiboivan hemagglutinaatioreaktiota edellä kuvatulla tavalla.

E. Edellä kuvattu inhibointikoe toistettiin käyttämällä seuraavan kaavan mukaista sakkaridijohdannaista:



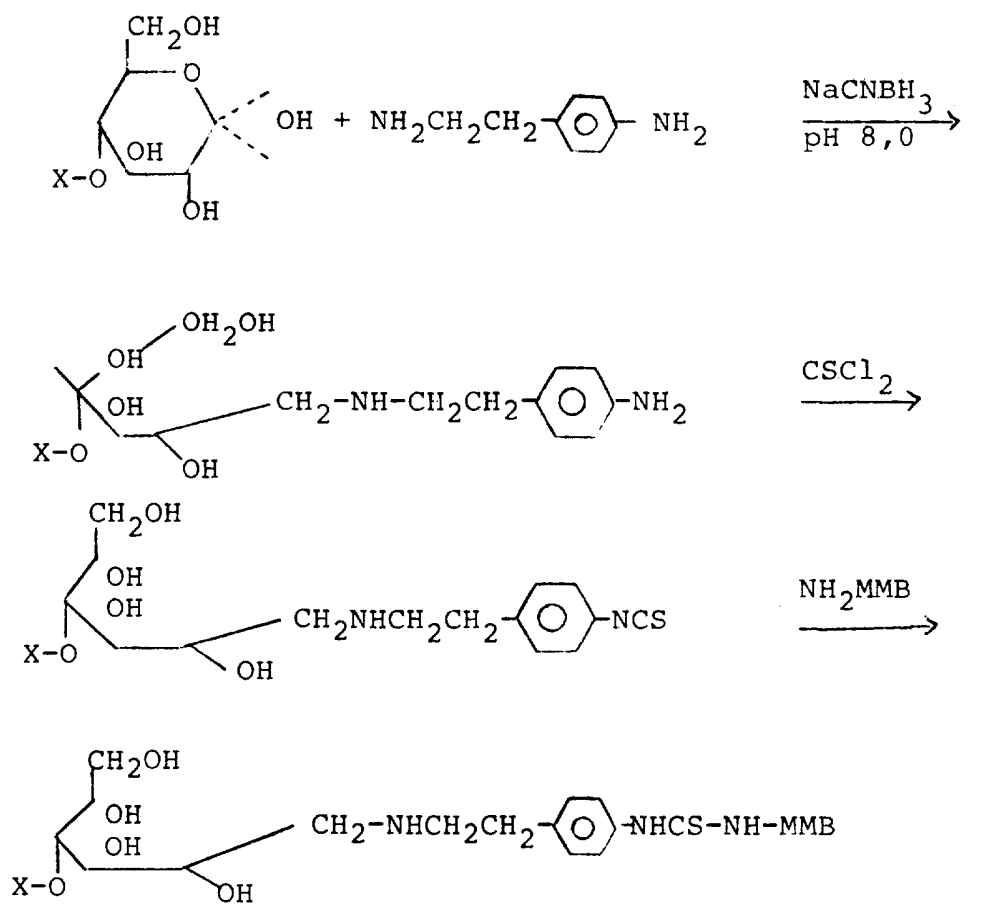
Tämä yhdiste syntetisoitiin ref. 16 mukaan ja sen havaittiin inhiboivan hemagglutinaatioreaktiota.

Esimerkki 2

Valmistetaan kompositioita, jotka sisältävät rakenneosan vähintään kaksivalenssisessä tilassa kiinnittyneenä makromolekyylliseen kantaja-aineeseen

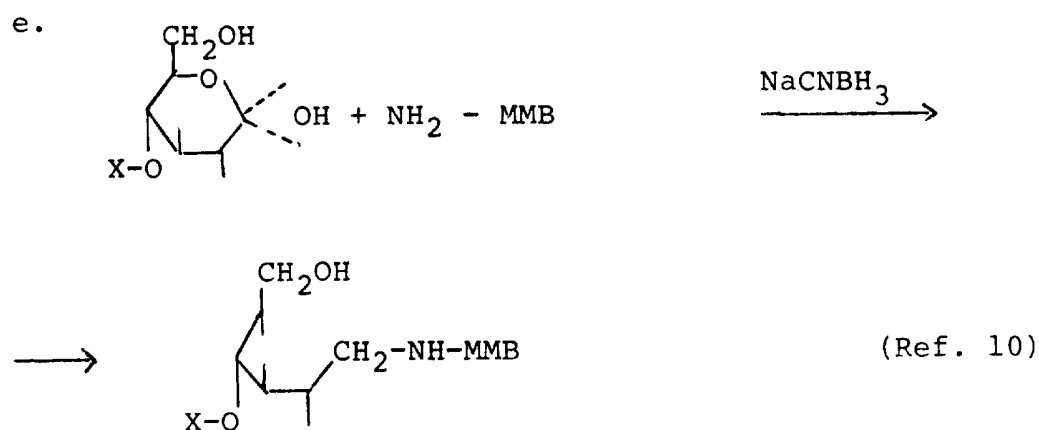
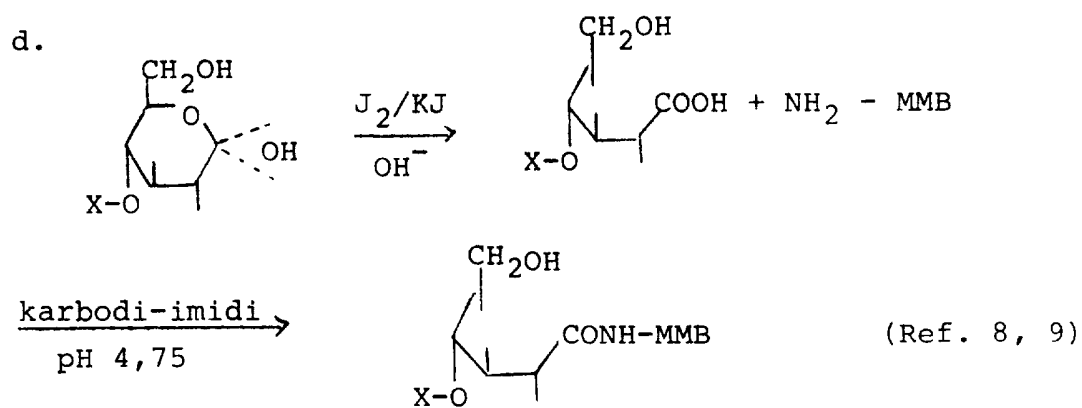
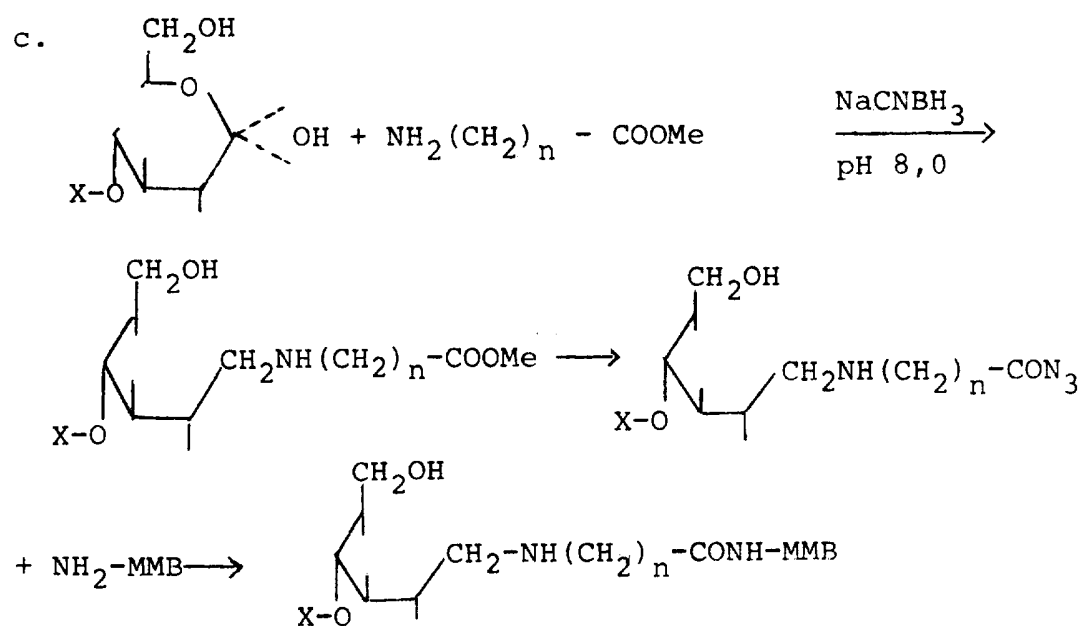
I. Seos valmistetaan lähtemällä luonnollisista oligosakkarideista, jotka sisältävät vapaan pääteasemassa olevan pelkistävän sokeritähteen. Seuraavissa reaktiokaavioissa tarkoittaa X keksinnön mukaista rakenneosaa ja MMB makromolekyylistä kantaja-ainetta.

a. Seuraava reaktiokaavio esittää keksinnön mukaisen komposition valmistusta, jossa vaikuttava rakenneosa on kovalenttisesti sidottu kytkentävarren välityksellä makromolekyylliseen kantaja-aineeseen.



(Ref. 5).

b. Reaktiot suoritettiin kohdan Ia mukaisesti, mutta p-aminofenetyyliaminiyhdistettä ei muunnettu vastaavaksi fenyyli-isotiosyanaattiyhdisteeksi vaan diatsotoitiin, ja diatsoniumyhdiste saatettiin sitten reagoimaan makromolekyyllisen kantajan vapaiden primääristen alifaattisten amiinien kanssa (Ref. 5, 6).



f. Kompositiot, jotka sisältävät määritellyn vaikuttavan osan, voitaisiin myös valmistaa sisällyttämällä synteettiset glykolipidit liposomeihin tai erytrosyytteihin tai muihin lipofiilisiin kantaja-aineisiin.

Esimerkki 3

a. MRHA_{hum}:n reseptorin karakterisointi

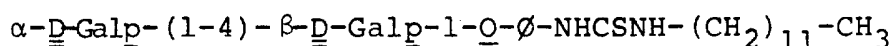
Tässä yhteydessä MRHA_{hum} tarkoittaa "mannoosille resistiivistä ihmisen erytrosyyttien hemagglutinaatiota".

Kun ihmisen erytrosyytit käsitellään α -galaktosidaasilla, vähenee niiden hemagglutinointuminen. Tämä ilmentää sitä, että pääteasemassa olevat α -D-galaktopyranosidiryhmät ovat erittäin tärkeitä reseptorirakenteessa.

Di- ja trisakkaridien, so. esimerkkien 1B, 1C, 1D ja 1E mukaisen yhdisteiden, para-nitrojohdannaisten ja metyylijohdannaisten havaittiin tehokkaasti inhiboivan MRHA_{hum}:ta, kun kyseessä olivat E. colin erilaiset pyelonefritogeeniset kannat ja eri luovuttajilta saatu veri. Tämä ilmentää sitä, että glukoosimolekyylillä on vähemmän merkitystä, di- ja trisakkarideilla ei inhibointikyvyn suhteen havaittu eroja.

Marsujen ja $\bar{p}$ -yksilöiden erytrosyytit, jotka normaalisti eivät reagoi P-säikeiden kanssa, päällystettiin puhdistetulla triheksosyyliseramidilla (THC). Tällöin nämä erytrosyytit reagoivat MRHA_{hum}-tavalla, kun kyseessä olivat P-säikeitä sisältävä E. coli. Näin ollen THC toimii reseptorina hemagglutinointumiselle. Tämä koe suoritettiin sekä kaupallisella THC:llä (Supelco, USA) että sellaisella THC:llä, jonka A. Lundblad ja S. Svensson, Lund, Ruotsi, olivat valmistaneet sian sisäelimistä.

Synteettinen disakkaridi muunnettiin vastaavaksi p-isotiosyanatofenyylisäilytysaineksi ja saatettiin reagoimaan dodekyyliamiinin kanssa niin, että saatiin seuraavan kaavan mukainen synteettinen glykolipidi:



Yhdiste syntetisoitiin seuraavalla tavalla: Edellä olevan esimerkin 1B yhdiste hydrattiin käyttämällä Adamin katalyyttiä (PtO_2). Muodostunut p-amonifenyylyglykosidi muunnettiin vastaavaksi p-isotiosyanatofenyylyglykosidiksi tiofosgeenikäsittelyllä, oleellisilta osin noudattamalla Ref. 18 kuvattua menetelmää. Sitten tämä glykosidi saatettiin reagoimaan dodekyyli-l-amiinin kanssa ja muodostunut yhdiste puhdistettiin silikageelillä. Kun tätä synteettistä glykolipidiä käytettiin vastaavassa päällystyskokeessa, saatiin positiivinen tulos. Tämä koe osoittaa, että edellä biologisella materiaalilla saatuihin koetuloksiin eivät läsnä olevat epäpuhtaudet vaikuttaneet.

Kiinnittymiskokeet uroepiteelisoluilla

Kolmen P-säikeitä sisältävän pyelonefritogeenisen E. coli-kannan kykyä kiinnittyä $\bar{p}$ -fenotyyppiä edustavien yksilöiden aamuvirtsasta saatuihin uroepiteelisoluihin verrattiin rinnakkaiskokeissa kykyyn kiinnittyä P-yksilöiden soluihin. Samoin kuin erytrosyytit sitoivat myös $\bar{p}$ -solut huomattavasti pienempiä bakteerimääriä ($p < 0,02$). Näiltä yksilöiltä puuttuu reseptorirakenne epiteelisoluista ja tämä todistaa sen, että kyseinen rakenne toimii reseptorina myös virtsaepiteeliin kiinnittymisessä.

Synteettinen disakkaridijohdannainen (edellä olevan esimerkin 1D yhdiste) inhiboi tehokkaasti pyelonefriittisten E. coli-kantojen kiinnittymistä uroepiteelisoluihin (P-tyyppi). Tämä osoittaa, että disakkaridirakenne on reseptorirakenne, joka toimii epiteelisoluihinkiinnittymisessä.

Samoihin soluihin kiinnittyminen kasvoi noin kolminkertaiseksi, kun lisättiin disakkaridin para-nitrofenyylijohdannainen (edellä olevan esimerkin 1C yhdiste), sillä lipofiilinen para-nitrofenyyli-ryhmä liittyi solun lipofiiliseen kalvoon niin, että muodostui päällyste. Tämä osoittaa, että epiteelisoluihin kiinnittyminen saavutetaan myös päällys-

tämällä solut synteettisellä reseptoriaineella.

Esimerkki 4

Sellaisten vasta-aineiden valmistus, jotka ovat spesifisiä kyseessä olevan rakenneosan suhteen

a. Monokloonisten vasta-aineiden valmistus hybridomamenetelmällä

I. Balb/c-hiiret immunisoidaan esimerkin 2 tai 3 mukaisella kompositiolla. Hyperimmunisoiduilta eläimiltä otetaan pernataltteen ja valmistetaan solususpensio jauhamalla kudos hienoksi mekaanisesti. Valmistetaan puhdas soluvalmiste gradienttisentrifugoinnilla ja sen jälkeen solut liitetään tunnetulla menetelmällä polyetyleeniglykolin avulla (PEG:n keskimääräinen molekyylipaino 1500) Balb/c-hiirien hyvin kasvaviin B-myelomasolulinjoihin. Kun haluttua vasta-ainetta muodostavat hybridomasolut on kloonattu, soluja viljellään suuressa mittakaavassa, viljelyaineesta erotetaan emäliuos ja vasta-aineet puhdistetaan tavalliseen tapaan. Vasta-ainetta muodostavien kloonien tunnistamisessa käytetään ns. enzyme linked immunosorbent-määrittystä (ELISA) (Ref. 11).

II. Nisäkkäät immunisoidaan esimerkin 2 tai 3 mukaisella oligosakkaridi- tai proteiini- tai polymeerikompositiolla. Vasta-aineet erotetaan nisäkkään hyperimmuunista seerumista ja puhdistetaan tavallisella menetelmällä.

Esimerkki 5

Sellaisten bakteerien identifiointi, joilla on kyseiselle rakenneosalle spesifinen akseptorirakenne

a. Bakteereja inkuboidaan P-fenotyyppiä edustavien ihmisten erytrosyyttien kanssa. Negatiivisina vertailusoluina käytetään $\bar{p}$ -fenotyyppiä edustavia ihmisen erytrosyyttejä. Se, että P-erytrosyytit hemagglutinoituvat ja $\bar{p}$ -erytrosyytit eivät hemagglutinoidu, osoittaa, että kyseisessä bakteerissa on akseptorirakenne. Koe suoritetaan noudattamalla edellä kuvattua hemagglutinoitimenetelmää.

b. *E. coli*-bakteereja inkuboidaan sellaisen komposition kanssa, jossa kyseinen rakenneosa on sidottu kovalenttisesti tai muulla tavalla multivalenttisessa muodossa erityiseen matriisiin esimerkin 2 tai 3 mukaisesti. Inkubointi suoritetaan levyillä noin 15 minuutin aikana ja sen jälkeen valmistetta tutkitaan valomikroskoopilla. Positiivisessa reaktiossa on havaittavissa, että hiukkaset ovat täysin peittyneet bakteereilla, jotka ovat kiinnittyneet hiukkasten akseptorirakenteisiin. Negatiivisessa reaktiossa ne ovat täysin vapaita kiinnittyneistä bakteereista.

c. *E. coli*-bakteereja sekoitetaan välittömästi levyillä esimerkin 2 tai 3 mukaisen komposition kanssa ja tällöin positiivinen reaktio johtaa paljaalla silmällä nähtävään agglutinoitumiseen. Tässä selostuksessa kuvatut reseptorirakenteet johtavat positiiviseen reaktioon.

Esimerkki 6

Bakteerien akseptorirakenteiden (pili, syn. fimbriae) puhdistus

Esimerkin 2 tai 3 mukainen kompositio laitetaan pylvään muotoon. *E. coli*-bakteerit käsitellään mekaanisesti niin, että säiemäiset ulkonemat (pili) irtoavat. Sitten irrotettujen säikeiden suspensio lasketaan pylvään läpi, jolloin akseptorirakenteet pysyvät pylväässä pylvään reseptorirakenteiden kanssa tapahtuvan vuorovaikutuksen ansiosta. Pylväs huuhdotaan ja siinä pysyneet akseptorirakenteet voidaan sen jälkeen eluoida ja saada talteen puhtaassa muodossa lisäämällä disakkaridijohdannainen (kuvattu kohdassa 1D). Puhdistettuja säikeitä (pili) voidaan käyttää rokotteenä tai vasta-aineiden analysointiin esim. kehon nesteistä, kuten virtsasta tai äidinmaidosta.

Tässä selostuksessa rakennekaavojen yhteydessä käytetyt lyhenteet tarkoittavat seuraavaa:

Galp	= galaktopyranosyyli
Glc _p	= glukopyranosyyli
GlcNAc _p	= 2-asetamido-2-deoksi-glukopyranosyyli
Cer.	= seramidi

On selvää, ettei keksintöä haluta rajoittaa edellä kuvatuilla esimerkeillä, ja useat muunnokset ovat mahdollisia liitteenä olevien patenttivaatimusten puitteissa.

Taulukko 1. Hemagglutinaatio pyelonefriittisillä ja ulosteperäisillä *E. coli*-kannoilla ^{a)}

Pyelonefriittinen kanta	Erytrosyyttilaji			Uloste-kanta	Erytrosyyttilaji		
	ihminen ^{b)}	marsu	nauta		ihminen	marsu	nauta
TI	16 ^{c)}	-	-	SBL393	-	-	-
NK1	32	-	-	SBL405	-	-	-
ER2	16	-	-	SBL410	16	-	-
KS14	8	1	-	SBL418	-	-	-
KS52	256	-	-	SBL419	4	4	4
KS65	8	2	-	SBL423	-	-	-
KS69	64	-	-	SBL489	-	-	-
KS70	8	-	-	SBL490	-	-	-
KS71	64	-	-	SBL493	2	2	2
KS73	128	-	-	SBL498	-	-	-
KS75	8	1	-	SBL634	-	-	-
KS91	256	-	-	SBL635	-	-	-
KS109	16	-	-	SBL648	8	8	8
				SBL666	2	2	2
				SBL668	8	8	8
				SBL680	-	-	-
				SBL691	-	-	-
				SBL692	-	-	-
				SBL698	2	4	2
				SBL705	-	-	-
				H10407	2	-	2

a) Vastaeristetyt bakteerit, joita on kasvatettu 16 h CFA-agarilla.

b) Erytrosyytit yksilöistä, joilla on veriryhmä A (Rh+).

c) Hemagglutinaatiotiitteri D-mannoosin (40 mM) läsnäollessa tai poissaollessa.

References.

1. Jones, G.W. (1977) in Microbial Interactions (Reisaig, K.L. ed.), Receptors and Recognition. Series B, Volume 3, pp. 139-176, Chapman and Hall, London.
2. Fowler, J.E. & Stamey, T. (1977). J.Urol. 1, 472-476.
3. Källenius, G. & Winberg, J. (1978). Lancet. ii, 540-543.
4. Källenius, G. & Möllby, R. (1979). FEMS Microbiol. Lett. 5, 295-299.
5. Svenson, S.B. and A.A. Lindberg (1979) J. Immunol. Meth. 25, 323.
6. Zopf, D. et al (1978) Immunol.Meth.enzymol. L, part C, 163.
7. Lemieux et al (1975) JACS 97:14, 4076.
8. Lönngren, J. et al (1976) Arch.Biochem. Biophys. 175, 661.
9. Svenson, S.B. and A.A. Lindberg (1978) J. Immunol. 120, 1750.
10. Gray, G.R. (1978). In Meth.enzymol. L, part C, 155.
11. Svenson S.B. and K Larsen (1977), J.Immunol.Meth. 17, 249.
12. J.K.N. Jonen and W.W. Reid, J.Chem.Soc.(1955) 1890.
13. D.M. Marcus, N. Naiki and S.K. Kundu. Proc.Nat. Acad.Sci. USA 73 (1976) 3263-3267.
14. Cox, D.D., Metzner, E.K., Reist, E.J. A new synthesis of 4-O- α -D-galactopyranosyl-D-galactopyranose. Carbohydrate Research 62, 245-252 (1978).
15. Sham, R., Bahl, O. Reaction of tetraacetyl α -D-hexopyranoside bromides with sodium nitrophenoxide in DNF. Formation of p-nitrophenyl hexopyranosides... Carbohydrate Research 74, 105-116 (1979).
16. Cox, D.D., Metzner, K., Reist, E.J. The synthesis of methyl 4-O-(4-O- α -D-galactopyranosyl- β -D-

- galactopyranosyl)- β -D-glycopyranoside: The methyl β -glycoside of the trisaccharide related to Fabry's disease. Carbohydrate Research 63, 139-147 (1978).
17. Koenigs, W., Knorr, E.
Berichte 34, 957- (1901).
 18. McBroom, C.R., Samanen, C.H., Goldstein, I.J.
In: Methods in Enzymology, Vol. 28B, ed.
V. Ginsburg, p. 212. Academic Press, New York
(1972).

Patenttivaatimukset

1. Uropatogeenisiin Escherichia coli-bakteeri-infektioihin liittyvään diagnostiseen käyttöön soveltuva kompositio, t u n n e t t u siitä, että se sisältää vaikuttavana osana, mielellään pääteasemassa, rakenneosan α -D-galaktopyranosyyli-(1-4)-D-galaktoosi.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen kompositio, t u n n e t t u siitä, että mainitun rakenneosan kaava on α -D-galaktopyranosyyli-(1-4)- β -D-galaktopyranosidi.
3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen kompositio, t u n n e t t u siitä, että mainitun rakenneosan kaava on α -D-galaktopyranosyyli-(1-4)- α -D-galaktopyranosidi.
4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen kompositio, t u n n e t t u siitä, että mainitun rakenneosan kaava on α -D-galaktopyranosyyli-(1-4)- α (β)-D-galaktopyranosidi-1-O-R, jossa R on orgaaninen ryhmä, joka on liittynyt joko α - tai β -konfiguraatiossa.
5. Patenttivaatimuksen 1, 2 tai 4 mukainen kompositio, t u n n e t t u siitä, että mainitun rakenneosan kaava on α -D-galaktopyranosyyli-(1-4)- β -D-galaktopyranosyyli-(1-4)-D-glukoosi.
6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen kompositio, t u n n e t t u siitä, että mainitun rakenneosan kaava on α -D-galaktopyranosyyli-(1-4)- β -D-galaktopyranosyyli-(1-4)- β -D-glukoosi.
7. Patenttivaatimuksen 5 mukainen kompositio, t u n n e t t u siitä, että mainitun rakenneosan kaava on α -D-galaktopyranosyyli-(1-4)- β -D-galaktopyranosyyli-(1-4)- α -D-glukoosi.

8. Patenttivaatimuksen 5 mukainen kompositio, t u n n e t t u siitä, että mainitun rakenneosan kaava on α -D-galaktopyranosyyli-(1-4)- β -D-galaktopyranosyyli-(1-4)- α (β)-D-glukopyranosidi-1-O-R, jossa R on orgaaninen ryhmä, joka on liittynyt joko α - tai β -konfiguraatiossa.
9. Patenttivaatimuksen 1, 4 tai 5 mukainen kompositio, t u n n e t t u siitä, että se sisältää rakenneosan α -D-galaktopyranosyyli-(1-4)- β -D-galaktopyranosyyli-(1-4)-D-glusitoli.
10. Patenttivaatimuksen 8 mukainen kompositio, t u n n e t t u siitä, että se sisältää rakenneosan α -D-galaktopyranosyyli-(1-4)- β -D-galaktopyranosyyli-(1-4)- α -D-glukopyranosidi-1-O-Me, tai α -D-galaktopyranosyyli-(1-4)- β -D-galaktopyranosyyli-(1-4)- β -D-glukopyranosidi-1-O-Me.
11. Patenttivaatimuksen 1, 4 tai 5 mukainen kompositio, t u n n e t t u siitä, että se sisältää rakenneosan α -D-galaktopyranosyyli-(1-4)- β -D-galaktopyranosyyli- β -D-2-aset-amido-2-deoksiglukopyranosyyli-(1-3)- β -D-galaktopyranosyyli-(1-4)-D-glukoosi.
12. Uropatogeenisiin Escherichia coli-bakteeri-infektioihin liittyvään diagnostiseen käyttöön soveltuva kompositio, t u n n e t t u siitä, että se sisältää minkä tahansa patenttivaatimuksen 1-11 mukaisen rakenneosan vähintään kaksivalenssisessä tilassa tai kovalenttisesti liittyneenä.
13. Patenttivaatimuksen 12 mukainen kompositio, t u n n e t t u siitä, että se sisältää mainitun rakenneosan kovalenttisesti liittyneenä makromolekyylliseen kantaja-aineeseen.
14. Patenttivaatimuksen 12 mukainen kompositio, t u n n e t t u siitä, että mainittu rakenneosa on kovalenttisesti kytkentävarren välityksellä liittynyt makromolekyylliseen kantaja-aineeseen.

15. Patenttivaatimuksen 13 tai 14 mukainen kompositio, t u n -
n e t t u siitä, että makromolekyylinen kantaja-aine on syn-
teettinen tai luonnollinen polypeptidi, polysakkaridi tai muu
polymeeri.

16. Jonkin patenttivaatimuksen 13-15 mukainen kompositio,
t u n n e t t u siitä, että rakenneosan ja makromolekyyllisen
kantaja-aineen välinen kytkentävarsi on

rakenneosa-1-O--NHCSNH-makromolekyylinen kantaja-aine,

rakenneosa-1-O--NN-makromolekyylinen kantaja-aine,

rakenneosa-NH-CH₂-CH₂--NHCSNH-makromolekyylinen kantaja-aine,

rakenneosa-NH-CH₂-CH₂--NN-makromolekyylinen kantaja-

aine, rakenneosa aldonihappo--NH-makromolekyylinen kantaja-aine,
tai

rakenneosa-NH-(CH₂)_n CO NH-makromolekyylinen kantaja-aine,
jossa n voi olla välillä 1-20.

17. Uropatogeenisiin Escherichia coli-bakteeri-infektioihin
liittyvään diagnostiseen käyttöön soveltuva kompositio, t u n -
n e t t u siitä, että se sisältää minkä tahansa patenttivaatimuk-
sen 1-11 mukaisen rakenneosan vähintään kaksivalenssisessä tilassa.

18. Patenttivaatimuksen 17 mukainen kompositio, t u n n e t t u
siitä, että se sisältää rakenneosan
 α -D-galaktopyranosyyli-(1-4)- β -D-galaktopyranosyyli-(1-4)- β -D-
glukopyranosyyli-1-O-seramidi.

19. Patenttivaatimuksen 17 mukainen kompositio, t u n n e t t u
siitä, että se sisältää rakenneosan
 α -D-galaktopyranosyyli-(1-4)- β -D-galaktopyranosyyli-(1-4)- β -D-
2-asetamido-2-deoksiglukopyranosyyli-(1-3)- β -D- β -D-galaktopyrano-
syyli-(1-4)- β -D-glukopyranosyyli-1-O-seramidi.

20. Patenttivaatimuksen 17 mukainen kompositio, t u n n e t t u
siitä, että se sisältää rakenneosan
 α -D-galaktopyranosyyli-(1-4)- β -D-galaktopyranosyyli-1-O-seramidi.

Patentkrav

1. Komposition lämplig för diagnostiskt bruk vid uropatogena *Escherichia coli* bakterieinfektioner, k ä n n e t e c k n a d av att den innehåller som aktiv ingrediens, fördelaktigen i ändställningen, ett strukturelement α -D-galaktopyranosyl-(1-4)-D-galaktos.
2. Komposition enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a d av att formeln av det nämnda strukturelementet är α -D-galaktopyranosyl-(1-4)- β -D-galaktopyranosid.
3. Komposition enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a d av att formeln av det nämnda strukturelementet är α -D-galaktopyranosyl-(1-4)- α -D-galaktopyranosid.
4. Komposition enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a d av att formeln av det nämnda strukturelementet är α -D-galaktopyranosyl-(1-4)- α -D-galaktopyranosid-1-O-R, i vilken R är en organisk grupp, som är förbundna varken i α - eller i β -konfiguration.
5. Komposition enligt patentkravet 1, 2 eller 4, k ä n n e t e c k n a d av att formeln av det nämnda strukturelementet är α -D-galaktopyranosyl-(1-4)- β -D-galaktopyranosyl-(1-4)-D-glukos.
6. Komposition enligt patentkravet 5, k ä n n e t e c k n a d av att formeln av det nämnda strukturelementet är α -D-galaktopyranosyl-(1-4)- β -D-galaktopyranosyl-(1-4)- β -D-glukos.
7. Komposition enligt patentkravet 5, k ä n n e t e c k n a d av att formeln av det nämnda strukturelementet är α -D-galaktopyranosyl-(1-4)- β -D-galaktopyranosyl-(1-4)- α -D-glukos.
8. Komposition enligt patentkravet 5, k ä n n e t e c k n a d av att formeln av det nämnda strukturelementet är α -D-galaktopyranosyl-(1-4)- β -D-galaktopyranosyl-(1-4)- α (β)-D-glukopyranosid-1-O-R, i vilken R är en organisk grupp, som är förbundna varken i α - eller i β -konfiguration.

9. Komposition enligt patentkravet 1, 4 eller 5, k ä n n e -
t e c k n a d av att den innehåller ett strukturelement α -D-
galaktopyranosyl-(1-4)- β -D-galaktopyranosyl-(1-4)-D-glusitol.

10. Komposition enligt patentkravet 8, k ä n n e t e c k n a d
av att den innehåller ett strukturelement α -D-galaktopyranosyl-
(1-4)- β -D-galaktopyranosyl-(1-4)- α -D-glukopyranosid-1-O-Me eller
 α -D-galaktopyranosyl-(1-4)- β -D-galaktopyranosyl-(1-4)- β -D-gluko-
pyranosid-1-O-Me.

11. Komposition enligt patentkravet 1, 4 eller 5, k ä n n e -
t e c k n a d av att den innehåller ett strukturelement α -D-
galaktopyranosyl-(1-4)- β -D-galaktopyranosyl- β -D-2-acetamido-2-
deoxiglukopyranosyl-(1-3)- β -D-galaktopyranosyl-(1-4)-D-glukos.

12. Komposition lämplig för diagnostiskt bruk vid uropatogena
Escherichia coli bakterieinfektioner, k ä n n e t e c k n a d
av att den innehåller ett strukturelement enligt vilket som
helst patentkravet 1-11 i minst tvåvalenssiskt tillstånd eller
kovalentiskt kopplat.

13. Komposition enligt patentkravet 12, k ä n n e t e c k n a d
av att den innehåller det nämnda strukturelementet kovalentiskt
kopplat i en makromolekyliskt bärarämne.

14. Komposition enligt patentkravet 12, k ä n n e t e c k n a d
av att det nämnda strukturelementet är kopplat genom koppling-
skaft förmedling i ett makromolekyliskt bärarämne.

15. Komposition enligt patentkravet 13 eller 14, k ä n n e -
t e c k n a d av att det makromolekyliska bärarämnet är en
syntetisk eller naturlig polypeptid, polysackarid eller någon
annan polymer.

16. Komposition enligt något av patentkraven 13-15, k ä n n e -
t e c k n a d av att kopplingskaftet mellan strukturelementet
och det makromolekyliska bärarämnet är

strukturelement-1-O--NHCSNH-makromolekyliskt bärarämne,
 strukturelement-1-O--NN-makromolekyliskt bärarämne,
 strukturelement-NH-CH₂-CH₂--NHCSNH-makromolekyliskt bärarämne,
 strukturelement-NH-CH₂-CH₂--NN-makromolekyliskt bärarämne,
 strukturelement-aldotsyra-["]C-NH-makromolekyliskt bärarämne,
 eller
 strukturelement-NH-(CH₂)_n CO NH-makromolekyliskt bärarämne,
 i vilket n kan vara mellan 1-20.

17. Komposition lämplig för diagnostiskt bruk vid uropatogena *Escherichia coli* bakterieinfektioner, k ä n n e t e c k n a d av att den innehåller ett strukturelement enligt vilket som helst patentkravet 1-11 i minst tvåvalenssiskt tillstånd.

18. Komposition enligt patentkravet 17, k ä n n e t e c k n a d av att den innehåller ett strukturelement
 α -D-galaktopyranosyl-(1-4)- β -D-galaktopyranosyl-(1-4)- β -D-glukopyranosyl-1-O-seramid.

19. Komposition enligt patentkravet 17, k ä n n e t e c k n a d av att den innehåller ett strukturelement
 α -D-galaktopyranosyl-(1-4)- β -D-galaktopyranosyl-(1-4)- β -D-2-acetamido-2-deoxi-glukopyranosyl-(1-3)- β -D-galaktopyranosyl-(1-4)- β -D-glukopyranosyl-1-O-seramid.

20. Komposition enligt patentkravet 17, k ä n n e t e c k n a d av att den innehåller ett strukturelement
 α -D-galaktopyranosyl-(1-4)- β -D-galaktopyranosyl-1-O-seramid.

Viitejulkaisuja-Anförda publikationer

Eur. J. Biochem. vol 104, nro 2, 03.03.1980, p.323-330.
 Proc. Natl. Acad. Sci vol 73 nro 9, p. 3263-3267.
 Chemical Abstracts vol 84 (1976) Abstr. nro:t 1532w ja 15602f.