(19) SUOMI - FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 960074 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS**
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE PUBLIC

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 960074

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
C11D 3/386
C12N 9/96

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **22.06.1994**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **08.01.1996**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **08.01.1996**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - Internationell ansökan - International application **22.06.1994 PCT/DK1994/000249**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

09.07.1993 DK 833/93 26.04.1994 DK 477/94

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • **Novo Nordisk A/S,** Novo Alle, 2880 Bagsvaerd, TANSKA, (DK)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • **Nielsen, Lone Kierstein,** Danmark, TANSKA, (DK)
2 • **Deane-Wray, Allison,** United Kingdom, ISO-BRITANNIA, (GB)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Berggren Oy Ab, Antinkatu 3 C, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention
Boronihappo- tai borinihappojohdannaiset entsyymien stabiloijina

Boronsyra- eller borinsyraderivat som enzymstabilisatorer

Boronihappo- tai borinihappojohdannaiset entsyymien stabiloijina - Boronsyra- eller borinsyraderivat som enzymstabilisatorer

Tämä keksintö koskee nestemäistä koostumusta, joka sisältää entsyymiä ja parannettua entsyymin stabiloijaa.

Entsyymiä tai entsyymejä sisältävien nesteiden varastointistabiiliusongelmat ovat hyvin tunnettuja. Varsinkin entsyymejä sisältävissä nestemäisissä pesuaineissa, erityisesti, jos pesuaine sisältää proteaasia, on vaikeata varmistaa entsyymin aktiivisuuden säilyminen ajan myötä.

Alalla on aiemmin työskennelty laajasti varastointistabiiliuden parantamiseksi, esimerkiksi lisäämällä proteaasin estäjää.

Boorihapon ja boronihappojen tiedetään estävän proteolyyttisiä entsyymejä palautuvasti. Siitä, kuinka boronihappo estää yhtä seriiniproteaasia, subtilisiiniä, kerrotaan lähteessä *Molecular & Cellular Biochemistry 51*, 1983, s. 5 - 32.

Boronihapoilla on hyvin vaihtelevat kyvyt subtilisiinin estäjinä. Boronihapot, jotka sisältävät vain alkyyliryhmiä, kuten metyyliä, butyyliä tai 2-sykloheksyylietyyliä, ovat huonoja estäjiä, joista metyyliboronihappo on huonoin estäjä, kun taas boronihapot, joissa on aromaattisia ryhmiä, kuten fenyyliä, 4-metoksifenyyliä tai 3,5-diklorofenyyliä, ovat erittäin hyviä estäjiä, joista 3,5-dikloorifenyyliboronihappo on erityisen tehokas (katso Keller et al, *Biochem. Biophys. Res. Com. 176*, 1991, s. 401 - 405).

Väitetään myös, että aryyliboronihapot, joissa on substituutio asemassa 3 boorin suhteen, ovat yllättävän hyviä estämään proteiineja palautuvasti. Erityisesti asetaminobent-

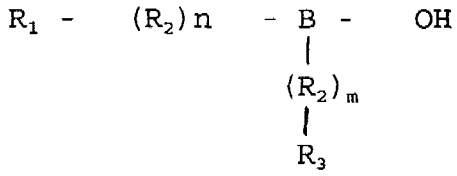
seeniboronihapon väitetään olevan muita parempi proteolyyttisten entsyymien estäjä (katso WO 92/19707).

Estovakiota (K_i) käytetään tavallisesti entsyymiaktiivisuuden estokyvyn mittana, siten, että jos K_i on pieni, estäjä on voimakas. Aiemmin on kuitenkin havaittu, että boronihappojen K_i-arvot eivät aina kerro, kuinka tehokkaita estäjiä boronihapot ovat (katso esim. WO 92/19707).

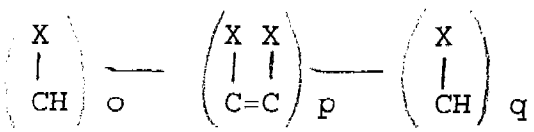
Keksinnön yhteenveto

Tässä keksinnössä havaitaan yllättävästi, että joillakin erityisillä boroni- ja borinihappojohdannaisilla on harvinaisen hyvä entsyymien estokyky.

Tämän mukaisesti tämä keksintö koskee nestemäistä koostumusta, joka sisältää entsyymiä ja entsyymin stabiloijana boronihappo- tai borinihappojohdannaista, jolla on kaava



missä R_1 on haluttaessa substituoitu kondensoitu aromaattinen rengasrakenne, joka sisältää 14 tai 18 hiiliatomia renkaassaan, tai haluttaessa substituoitu monosyklinen tai kondensoitu aromaattinen heterosyklinen rengasrakenne, joka sisältää enintään 17 hiiliatomia renkaassaan, tai haluttaessa substituoitu monosyklinen tai kondensoitu kinonoidirengasrakenne, joka sisältää enintään 18 hiiliatomia renkaassaan, ja R_2:lla on kaava



missä X:t ovat samoja tai erilaisia ja ne on valittu joukosta vety, C_1 - C_6 -alkyyli, substituoitu C_1 - C_6 -alkyyli, aryyli, substituoitu aryyli, hydroksi, hydroksyylijohdannainen, halogeeni, amiini, alkyloitu amiini, amiinijohdannainen, nitro, tioli, tiolijohdannainen, aldehydi, happo, hapan suola, esteri, sulfonaatti tai fosfonaatti, ja o, p ja q voivat olla samoja tai erilaisia, ja voivat kukin olla 0, 1 tai 2; m ja n voivat olla samat tai erilaiset, ja voivat olla joko 0 tai 1;

R_3 on sama tai erilainen kuin R_1 ja on valittu joukosta R_1, tai R_3 on hydroksyyliryhmä, tai R_1 ja R_3 ovat molemmat haluttaessa substituoituja monosyklisiä tai disyklisiä aromaattisia rengasrakenteita.

Tässä yhteydessä ilmaus "haluttaessa substituoidut rengasrakenteet" tarkoittaa, että rengasrakenteen substituentit on valittu vapaasti, mutta on edullista, jos ne on valittu ryhmästä typpi, C_1 - C_6 -alkyyli, substituoitu C_1 - C_6 -alkyyli, aryyli, substituoitu aryyli, hydroksi, hydroksyylijohdannainen, halogeeni, amiini, alkyloitu amiini, amiinijohdannainen, nitro, tioli, tiolijohdannainen, aldehydi, happo, hapan suola, esteri, sulfonaatti tai fosfonaatti.

<u>Keksinnön yksityiskohtainen kuvaus</u>

<u>Boroni- ja borinihappojohdannaisten valmistaminen</u>

Boroni- ja borinihappojohdannaisia voidaan valmistaa alan ammattilaisten hyvin tuntemilla menetelmillä, esimerkiksi jollakin seuraavista menetelmistä:

a) Tyydyttymättömien aineiden, s.o. alkeenien ja alkyynien, hydroboraatio käyttäen joko katekolboraania (1,3,2-bentsodioksaborolia) tai dikloroboraani-dimetyyli-sulfidikompleksia hydroboratoijana, katso H. C. Brown & S. K. Gupta, *JACS* 97, 1975, s. 5249 - 5255 ja H. C. Brown, N. Ravindran & S. U. Kuikarni, *J. Org. Chem.* 45, 1980, s. 384.

b) Grignardin reagentin reaktio joko tri-n-butyyliboraatin tai trimetyyliboraatin kanssa, jonka jälkeen näin muodostuneen boroniesterin hydrolyysi, katso F. R. Bean & J. R. Johnson, *Jacs* 54, 1932, s. 4415 - 4425 ja S. H. Dandegaonher & S. P. Ingleshwar, *Journal of Shivasi University* 6, 1932, s. 11 - 13. Bromo-aloitusmateriaalit, joita ei ole saatavissa kaupallisesti, voidaan valmistaa helposti kahdessa vaiheessa vastaavista karboksyylihapoista pelkistämällä $LiAlH_4$:llä ja käsittelemällä sen jälkeen CBr_4:llä.

c) Organolitiumreagentin reaktio butyyliboraatin kanssa, katso S. O. Lauesson, s. 387 - 395, *Thiophene Chemistry*, osa 7 ja D. Florentin & B. Roques, *C. R. Acad. Sc. Paris*, t.270 (11.5.1970), s. 1608 - 1610.

d) Borinihappojohdannaisia valmistetaan menetelmän b mukaisesti. Grignardin reagentin suhde käytettävään boraattiin on kuitenkin 2:1.

e) Mikä tahansa nukleaarisubstituutio tai toiminnallisten ryhmien suojaus saavutetaan käyttämällä alan ammattilaisten hyvin tuntemia standardimenetelmiä.

Stabiloijat

Keksinnön mukaisesti nestekoostumus voi sisältää enintään 500 mM stabiloijaa (boroni- tai borinihappojohdannaista), edullisesti nestekoostumus voi sisältää 0,001 - 250 mM stabiloijaa, edullisemmin nestekoostumus voi sisältää 0,005 - 100 mM stabiloijaa ja edullisimmin nestekoostumus voi sisältää 0,01 - 10 mM stabiloijaa.

Entsyymit

Keksinnön mukaisesti nestekoostumus sisältää vähintään yhtä entsyymiä. Entsyymi voi olla mikä tahansa kaupallisesti saatavilla oleva entsyymi, erityisesti entsyymi, joka on valittu ryhmästä, johon kuuluvat proteaasit, amylaasit, lipaasit, sellulaasit ja peroksidaasit tai mikä tahansa niiden seos.

Joukkoon kuuluvat myös saman luokan entsyymien (esim. lipaasien) seokset.

Koostumuksessa käytettävän entsyymin määrä vaihtelee entsyymin/entsyymien tyypin ja aiotun käyttötarkoituksen mukaan. Jos neste on pesunestettä, kunkin entsyymin määrä on tyypillisesti 0,2 - 40 μM, erityisesti 0,4 - 20 μM (yleensä 5 - 1000 mg/l, erityisesti 10 - 500 mg/l) laskettuna puhtaaksi entsyymiproteiiniksi.

Proteaasi: Voidaan käyttää mitä tahansa nestekoostumuksessa käytettäväksi sopivaa proteaasia. Sopiviin proteaaseihin kuuluu proteaaseja eläin-, kasvi- ja mikrobilähteistä. Mikrobilähteet ovat edullisia. Kemiallisesti tai geneettisesti muunnetut mutantit kuuluvat joukkoon. Proteaasi voi olla seriiniproteaasi, edullisesti emäksinen mikrobin proteaasi tai trypsiinin kaltainen proteaasi. Esimerkkejä emäksisistä proteaaseista ovat subtilisiinit, erityisesti *Bacilluksesta* saadut, esim. subtilisiini Novo, subtilisiini Carlsberg, subtilisiini 309, subtilisiini 147 ja subtilisiini 168 (kuvattu WO 89/06279:ssä). Esimerkkejä kaupallisista *Bacillus*-subtilisiineista ovat Novo Nordisk A/S:n tuotteet Alcalase®, Savinase®, Esperase® ja Durazym™. Esimerkkejä trypsiinin kaltaisista proteaaseista ovat trypsiini (esim. sika- tai nautalähteestä) ja *Fusarium*-proteaasi, joka on kuvattu WO 89/06270:ssa.

Amylaasi: Voidaan käyttää mitä tahansa nestekoostumukseen sopivaa amylaasia. Sopiviin amylaaseihin kuuluu bakteeri- ja sieniperäisiä amylaaseja. Kemiallisesti tai geneettisesti muunnetut mutantit kuuluvat joukkoon. Amylaaseihin kuuluvat esimerkiksi alfa-amylaasit, joita saadaan erityisestä *B. licheniformis* -kannasta, jota on kuvattu yksityiskohtaisesti brittiläisessä patenttiselityksessä nro 1 296 839. Erityisen edullinen on Termamyl®, joka on saatavilla Novo Nordisk A/S:stä.

Lipaasi: Voidaan käyttää mitä tahansa nestekoostumukseen sopivaa lipaasia. Sopiviin lipaaseihin kuuluu bakteeri- ja sieniperäisiä lipaaseja. Kemiallisesti tai geneettisesti muunnetut mutantit kuuluvat joukkoon. Erityisen edullinen on lipaasi, jota on saatu kloonamalla *Humicola lanuginosan* geeniä ja ilmentämällä *Aspergillus oryzaen* geeniä, kuvattu EP 0 259 068:ssa ja saatavissa Novo Nordisk A/S:ltä tuotemerkillä Lipolase®.

Sellulaasi: Voidaan käyttää mitä tahansa nestekoostumuksessa käytettäväksi sopivaa sellulaasia. Sopiviin sellulaaseihin kuuluu bakteeri- ja sieniperäisiä sellulaaseja. Kemiallisesti tai geneettisesti muunnetut mutantit kuuluvat joukkoon. Sopivia sellulaaseja on kuvattu US 4 435 307:ssä. Erityisen edullinen on Novo Nordisk A/S:ltä saatava Cellyzyme™, jota tuottaa *Humicola insolens* -kanta.

Peroksidaasi: Voidaan käyttää mitä tahansa nestemäisessä pesuainekoostumuksessa käytettäväksi sopivaa peroksidaasia. Tähän sopiviin peroksidaaseihin kuuluu kasvi-, bakteeri- ja sieniperäisiä peroksidaaseja. Kemiallisesti tai geneettisesti muunnetut mutantit kuuluvat joukkoon. Esimerkkejä sopivista peroksidaaseista ovat ne, jotka ovat peräisin *Coprinus*-kannasta, esim. *C. cineriuksesta* tai *C. macrorhizuksesta*, tai *Bacillus*-kannasta, esim. *B. pumiluksesta*, erityisesti PCT/DK90/00260:n mukainen peroksidaasi.

Pesuaineet

Jos keksinnön mukainen nestekoostumus on pesuaine, se sisältää entsyymin/entsyymien ja stabiloijan lisäksi myös surfaktanttia.

Nestemäinen pesuaine voi olla vesipohjainen ja sisältää tyypillisesti enintään 70 % vettä ja 0 - 30 % orgaanista liuotinta, tai se voi olla vedetön.

Pesuainekoostumus sisältää yhtä tai useampia surfaktantteja, joista kukin voi olla anioninen, ei-ioniaktiivinen, kationinen tai amfoteerinen. Pesuaine sisältää yleensä 0 - 50 % anionista surfaktanttia, kuten lineaarista alkyylibentseenisulfonaattia (LAS), alfa-olefiinisulfonaattia (AOS), alkyylisulfaattia (rasvahapposulfaattia) (AS), alkoholietoksisulfaattia (AEOS tai AES), sekundaarisia alkaanisulfonaatteja (SAS), alfa-sulfo-rasvahappometyylieste-reitä, alkyyli- tai alkenyylisukkinaattia tai saippuaa. Se voi sisältää 0 - 40 % ei-ioniaktiivista surfaktanttia, kuten alkoholietoksylaattia (AEO tai AE), karboksyloituja alkoholietoksylaatteja, nonyylifenolietoksylaattia, alkyylipolyglykosidia, alkyylidimetyyliamiinioksidia, etoksyloitua rasvahappomonoetanoliamidia, rasvahappomonoetanoliamidia tai polyhydroksialkyylirasvahappoamidia (esim. WO 92/06154:ssä kuvattu).

Pesuaine voi sisältää 1 - 65 % pesuaineen täyteainetta (builder) tai kompleksinmuodostajaa, esimerkiksi zeoliittia, difosfaattia, trifosfaattia, fosfonaattia, sitraattia, nitrilotriasetaattia (NTA), eteenidiamiinitetra-asetaattia (EDTA), dieteenitriamiinipenta-asetaattia (DTMPA), alkyyli- tai alkenyylisukkinaattia, liukoisia silikaatteja tai kerroksellisia silikaatteja (esim. SKS-6 Hoechstilta). Pesuaine voi olla myös olennaisesti täyteaineita sisältämätön.

Pesuaine voi sisältää yhtä tai useampaa polymeeria. Esimerkkejä ovat karboksimetyyliselluloosa (CMC) polyvinyylipyrridoli (PVP), polyeteeniglykoli (PEG), polyvinyylialkoholi (PVA), polykarboksylaatit, kuten polyakrylaatit, maleiini/akryylihappokopolymeerit ja lauryylimetakrylaatti/akryylihappokopolymeerit.

Pesuaine voi sisältää valkaisujärjestelmän, joka voi käsittää H_2O_2-lähteen, kuten perboraatin tai perkarbonaatin, joka voi olla yhdistetty perhappoa muodostavaan valkaisuaineen aktivoijaan, kuten tetra-asetyylietyleenidiamiiniin (TAED) tai

nonayloksibentseenisulfonaattiin (NOBS). Vaihtoehtoisesti valkaisujärjestelmä voi käsittää peroksihappoja, esim. amidi-, imidi- tai sulfonityyppisiä.

Keksinnön mukaiseen pesuainekoostumuksen entsyymit voidaan stabiloida tavanomaisilla stabiloijilla, esim. polyolilla, kuten propeeniglykolilla tai glyserolilla, sokerilla tai sokerialkoholilla, maitohapolla, boorihapolla tai boorihappojohdannaisella, kuten esim. aromaattisella boraattiesterillä, ja koostumus voidaan formuloida esim. WO 92/19709:ssä ja WO 92/19708:ssa kuvatulla tavalla.

Pesuaine voi myös sisältää muita tavanomaisia pesuaineen ainesosia, kuten esim. kankaan hoitoaineita (fabric conditioners), mukaan luettuna alumiinioksidit (clays), vaahtoamista lisääviä aineita (foam boosters), vaahdonestoaineita, korroosiota estäviä aineita, likaantumisen estäjiä, lian uudelleen tarttumista estäviä aineita, väriaineita, bakteereja tappavia aineita, optisia kirkasteita tai hajustetta.

pH (mitattuna vesiliuoksesta käyttöpitoisuudessa) on tavallisesti neutraali tai emäksinen, esim. 7 - 11.

Erityisiin keksinnön piiriin kuuluviin pesuainekoostumuksiin kuuluvat:

1) Nestemäinen vesipohjainen pesuainekoostumus, joka käsittää

- lineaarista alkyylibentseenisulfonaattia (hapoksi laskettuna)	15 - 21 %
- alkoholietoksylaattia (esim. C_{12-15}-alkoholi, 7 EO tai C_{12-15}-alkoholi, 5 EO)	12 - 18 %
- saippuaa rasvahappona (esim. oleaatti)	3 - 13 %
- alkenyylisukkinaattia (C_{12-14})	0 - 13 %
- aminoetanolia	8 - 18 %
- sitruunahappoa	2 - 8 %

- fosfonaattia	0 - 3 %
- polymeereja (esim. PVP, PEG)	0 - 3 %
- boraattia (B_4O_7:nä)	0 - 2 %
- etanolia	0 - 3 %
- propeeniglykolia	8 - 14 %
- entsyymejä	0 - 5 %
- vähäisiä ainesosia (esim. dispergoijia, vaahdonestoaineita, hajustetta, optista kirkastetta	0 - 5 %

2) Vesipohjainen, strukturoitu nestemäinen pesuainekoostumus, joka käsittää

- lineaarista alkyylibentseenisulfonaattia (hapoksi laskettuna)	15 - 21 %
- alkoholietoksylaattia (esim. C_{12-15}-alkoholia, 7 EO tai C_{12-15}-alkoholia, 5 EO)	3 - 9 %
- saippuaa rasvahappona (esim. oleaatti)	3 - 10 %
- zeoliittia ($NaAlSiO_4$:nä)	14 - 22 %
- kaliumsitraattia	9 - 18 %
- boraattia (B_4O_7:na)	0 - 2 %
- karboksimetyyliselluloosaa	0 - 2 %
- polymeereja (esim. PEG, PVP)	0 - 3 %
- ankkuroivia polymeereja, kuten esim. lauryylimetarylaatti/akryylihappokopolymeeria, moolisuhde 25:1, molekyylipaino 3800	0 - 3 %
- glyserolia	0 - 5 %
- entsyymejä	0 - 5 %

- vähäisiä ainesosia (esim. dispergoivia aineita, vaahdonestoaineita, hajustetta, optisia kirkasteita)	0 - 5 %

3) Vesipohjainen nestemäinen pesuainekoostumus, joka käsittää

- lineaarista alkyylibentseenisulfonaattia (hapoksi laskettuna)	15 - 23 %
- alkoholietoksisulfaattia (esim. C_{12-15}-alkoholia, 2 - 3 EO)	8 - 15 %
- alkoholietoksylaattia (esim. C_{12-15}-alkoholia, 7 EO tai C_{12-15}-alkoholia, 5 EO)	3 - 9 %
- saippuaa rasvahappona (esim. lauriinihappoa)	0 - 3 %
- aminoetanolia	1 - 5 %
- natriumsitraattia	5 - 10 %
- hydrotrooppia (esim. natriumtolueenisulfonaattia)	2 - 6 %
- boraattia (B_4O_7:nä)	0 - 2 %
- karbometyyliselluloosaa	0 - 1 %
- etanolia	1 - 3 %
- propyleeniglykolia	2 - 5 %
- entsyymejä	0 - 5 %
- vähäisiä ainesosia (esim. polymeereja, dispergoivia aineita, hajustetta, optisia kirkasteita)	0 - 5 %

4) Vesipohjainen nestemäinen pesuainekoostumus, joka käsittää

- lineaarista alkyylibentseenisulfonaattia (hapoksi laskettuna)	20 - 32 %

- alkoholietoksylaattia (esim. C_{12-15}-alkoholia, 7 EO tai C_{12-15}-alkoholia, 5 EO)	6 - 12 %
- aminoetanolia	2 - 6 %
- sitruunahappoa	8 - 14 %
- boraattia (B_4O_7:nä)	1 - 3 %
- polymeeria (esim. maleiini/akryylihappokopolymeeria, ankkuroivia polymeereja, kuten esim. lauryylimetakrylaatti/akryylihappokopolymeeria tai CMC:tä)	0 - 3 %
- glyserolia	3 - 8 %
- entsyymejä	0 - 5 %
- vähäisiä ainesosia (esim. hydrotrooppeja, dispergoivia aineita, hajustetta, optisia kirkasteita)	0 - 5 %

5) Kohdissa 1 - 4 kuvattujen kaltaiset pesuainekoostumukset, joissa lineaarinen alkyylibentseenisulfonaatti, tai osa siitä, on korvattu alkyylisulfaatilla (C_{12} - C_{18}).

6) Kohdissa 1 - 5 kuvattujen kaltaiset pesuainekoostumukset, jotka sisältävät stabiloitua tai kapseloitua perhappoa joko lisäainesosana tai korvaamassa jo erikseen mainittuja valkaisujärjestelmiä.

7) Pesuainekoostumus, joka on formuloitu vedettömäksi nestemäiseksi pesuaineeksi, joka käsittää nestemäistä ei-ioniaktiivista surfaktanttia, kuten esim. lineaarista alkoksyloitua primäärialkoholia, täyteainejärjestelmän (esim. fosfaatti), entsyymiä ja emästä. Pesuaine voi sisältää myös anionista surfaktanttia ja/tai valkaisujärjestelmän.

<u>Stabiloijatestejä</u>

Keksinnön mukaisesti kunkin stabiloijan tehokkuutta voidaan testata yhdellä tai useammalla seuraavista kolmesta testistä:

a) Varastointistabiiliustesti nestemäisessä pesuaineessa: Entsyymi/entsyymit ja stabiloija lisätään nestemäiseen pesuainekoostumukseen ja varastoidaan tarkoin määrätyissä olosuhteissa. Kunkin entsyymin entsyymiaktiivisuus määritetään ajan funktiona, esim. 0:n, 3:n, 7:n ja 14:n vuorokauden kuluttua.

Estotehokkuuden laskemiseksi varastointistabiiliustiedoista ehdotetaan reaktiomekanismia. Seuraavista reaktioista saadaan suhteellisen yksinkertainen, mutta silti luotettava mekanismi nestemäiselle pesuaineelle, joka sisältää proteaasia (P), lipaasia (L) ja estäjää (I):

I) Proteaasin itsehajotus:

$P + P \rightarrow D_P + P$

II) Proteaasin denaturoituminen:

$P \rightarrow D_P$

III) Proteaasin esto:

$P + I \leftrightarrows PI$

IV) Estetyn entsyymin proteaasihajotus:

$P + PI \rightarrow P + D_P + I$

V) Estetyn entsyymin denaturoituminen:

$PI \rightarrow D_P + I$

VI) Lipaasin proteaasihajotus:

$P + L \rightarrow P + D_L$

VII) Lipaasin denaturoituminen:

$L \rightarrow D_L$

missä D_P ja D_L ovat denaturoitunut (eli epäaktiivinen) proteaasi ja denaturoitunut lipaasi.

Näistä reaktioista johdetaan kolme differentiaaliyhtälöparia (three coupled differential equations), jotka kuvaavat P:n, L:n ja PI:n deaktivoitumista. Reaktionopeusvakiot saadaan varastointistabiiliustiedoista käyttämällä parametrinestimoinimenetelmää (Gauss - Newton Levenbergin modifioimana). Varastointistabiiliuostiedoista saadaan (P + PI):n ja L:n pitoisuudet ajan funktioina.

Reaktio III on paljon nopeampi kuin toiset reaktiot, ja laskelmissa oletetaan tasapaino. Reaktio IV jätetään järjestelmässä huomiotta parametrien määrän pienentämiseksi, jolloin estetyn entsyymin stabiiliutta kuvataan vain yhdellä reaktionopeusvakiolla (yhtälöstä V).

Kaikissa kokeissa on suuri ylimäärä estäjämolekyylejä verrattuna proteaasimolekyyleihin, eli estäjän vakiopitoisuus (joka vastaa lisättyä estäjämäärää) on järkevä oletus.

Reaktionopeusvakioiden spesifiset arvot ovat jossakin määrin herkkiä pienille vaihteluille tiedoissa, mutta herkkyys vähenee merkitsevästi, kun tulokset annetaan suhteessa boorihapon arvoon. Näin johdetaan parantumistekijä:

$IF_I = K_I(\text{boorihappo}):K_I(\text{estäjä})$

IF_I mittaa reaktion III estovakioiden K_I osoittamaa estotehokkuutta.

b) "Maitotesti": Tässä testissä testattavaa stabiloijaa verrataan verrokkiestäjään (boorihappoon). Testi kuvataan yksityiskohtaisesti seuraavassa:

"Estäjämaidon" valmistus: 0,075 g $CaCl_2$:a (kuivattua hienorakeista puhdasta, Merck), 0,16 g 3,3-diemetyyliglutaraattia (SIGMA) ja 2,5 mmol stabiloija/estäjää punnitaan ja liuotetaan 50 ml:aan demineralisoitua vettä. pH säädetään noin

6,0:ksi NaOH:lla. 6,0 g kuorittua maitojauhetta (kuivattua, DIFCO Lab.) punnitaan 100 ml:n dekantteriin, ja lisätään suola+puskuri+stabiloija/estäjä -liuos. Seosta sekoitetaan voimakkaasti muutamia minuutteja sen varmistamiseksi, että kaikki mahdolliset kokkareet hajoavat. Sen jälkeen seosta sekoitetaan 30 minuuttia. pH säädetään 6,50:ksi NaOH:lla. Jauheen sijasta voidaan käyttää kuorittua maitoa pullosta. Käytä saman pullon maitoa kaikille stabiloijille/estäjille yhdessä kokeessa.

Entsyymin valmistaminen: valmista liuos, jossa on Savinasea® (saatavilla Novo Nordisk A/S:ltä) noin 30 KNPU/litra boorihappopuskurissa (katso jäljempää). Savinaasiaktiivisuus määritetään suhteessa entsyymistandardiin. Novo Nordisk A/S:ltä, Tanska, on pyynnöstä saatavana kansio AF 220/1-GB, joka kuvaa analyysimenetelmän savinaasiaktiivisuuden määrittämiseksi. Kansio liitetään täten tähän viittaamalla.

Esimerkki: Punnitaan 1,0 g 16 KNPU/g nestemäistä Savinasea ja lisätään 50 ml boorihappopuskuria. Seosta sekoitetaan 15 minuuttia. 10 ml tästä liuoksesta pannaan 100 ml dekantteriin ja lisätään boorihappopuskuria 100 ml:aan. Sen jälkeen seosta sekoitetaan 15 minuuttia. Boorihappopuskuri: 2,5 g boorihappoa (Merck) liuotetaan 500 ml:aan demineralisoitua vettä. pH säädetään 9,0:ksi NaOH:lla.

Koaguloiminen (curdling): 10,0 ml stabiloijaa/estäjää lisätään koeputkeen. Valmistetaan 3 koeputkea kustakin stabiloijasta/estäjästä, ja ne asetetaan 30 °C:iseen vesihauteeseen. Koeputket jätetään vesihauteeseen tunniksi. 1,00 ml Savinaseliuosta lisätään koeputkeen ja käynnistetään ajanottokello. Koeputkea sekoitetaan 10 sekuntia sekoittajalla ("vibrator") ja koeputki asetetaan sitten vesihauteeseen. Kun koaguloituminen alkaa, ajanottokello pysäytetään. Kolmen koeputken koaguloitumisaikojen poikkeama ei saisi olla enempää kuin noin 10 sekuntia. Se, miten ja milloin koaguloituminen alkaa, on opittava käytännössä, ja saman henkilön tulisi koaguloida

kaikki näytteet. Verrokkiestäjällä (boorihappo) koaguloimisajan pitäisi olla noin 3 - 4 minuuttia (jos koaguloimisaika on pitempi, pitäisi käyttää voimakkaampaa proteaasiliuosta). Koaguloimisaika on suunnilleen lineaarinen suhteessa proteaasiaktiivisuuden käänteislukuun. Tulos voidaan ilmoittaa parantumistekijänä IF, jonka määrittää: (koagulointiaika, stabiloija)/(koagulointiaika, verrokki).

c) K_i:n määritys: Estovakio K_i voidaan määrittää käyttäen standardimenetelmiä, katso Keller et al, *Biochem. Biophys. Res. Com.* 176, 1991, s. 401 - 405; J. Bieth teoksessa *Bayer-Symposium "Proteinase Inhibitors"*, s. 463 - 469, Springer-Verlag, 1974, ja Lone Kierstein Hansen julkaisussa *"Determination of Specific Activities of Selected Detergent Proteases using Protease Activity, Molecular Weights, Kinetic Parameters and Inhibition Kinetics*, PhD-report, Novo Nordisk A/S ja University of Copenhagen, 1991.

Keksintöä kuvataan edelleen seuraavissa esimerkeissä, joiden ei tarkoiteta rajoittavan millään tavalla keksinnön piiriä, johon patenttivaatimukset kohdistuvat.

Esimerkki 1

3-tiofeeniboronihapon valmistus

3-bromotiofeenia (0,043 m) natriumkuivatussa eetterissä (100 ml) jäähdytettiin -60 °C:seen. Butyylilitiumia (30 ml, 1 M) lisättiin nopeasti. Seosta sekoitettiin sitten 3 minuuttia, minkä jälkeen lisättiin tri-n-butyyliboraattia (0,043 m) tai trimetyyliboraattia (0,043 m) natriumkuivatussa eetterissä (25 ml). Seosta sekoitettiin 4 tuntia ja annettiin sen lämmetä huoneenlämpöiseksi. Sen jälkeen reaktioseosta käsiteltiin suolahapolla (1 M) ja eetterikerros otettiin erilleen. Vesiliuoskerrosta uutettiin eetterillä (2 kertaa 25 ml). Yhdistettyjä eetterikerroksia uutettiin natriumhydroksidilla (1 M). Emäksinen liuos tehtiin sitten happamaksi suolahapolla (10 %) ja siten sakkautettiin haluttu boronihappo. Boronihap-

po eristettiin ja kiteytettiin sitten uudelleen vesi/etanolista ja annettiin kuivua ilmassa.
$C_4H_5BO_2S$, sulamispiste 163 - 164 °C.

Difenyyliborinihapon valmistaminen

Tämä happo valmistettiin edellä kuvatulla menetelmällä. Grignardin reagentti valmistettiin bromobentseenin ja magnesiumin avulla (from bromobenzene and Magnesium turnings). Käytettiin kuitenkin kaksi moolia Grignardin reagenttia yhtä tri-n-butyyliboraattimoolia kohden. Näin muodostettu borinihappo eristettiin reaktiolla etanoliamiinin kanssa, jolloin saatiin difenyyliborinihappo-etanoliamiinikompleksi $(C_6H_5)_2BO\bullet CH_2CH_2NH_2$, jota on helpompi käsitellä. Sulamispiste 192 - 194 °C.

Esimerkki 2

K_i:n määrittäminen

Estovakiot K_i alkalaasin (Alcalase) ja savinaasin (Savinase) (kummankin erikseen) estämiselle määritettiin käyttäen standardimenetelmiä seuraavissa olosuhteissa:

Substraatti: sukkinyyli-alaniini-alaniini-proliini-fenyylialaniini-paranitroanilidi = SAAPFpNA (Sigma S-7388).

Puskuri: 0,1 M Tris-HCl pH 8,6; 25 °C.

Entsyymikonsentraatio määrityksessä:
Alkalaasi: 1×10^{-10} - 3×10^{-10} M
Savinaasi: 1×10^{-10} - 3×10^{-10} M

Substraatin hydrolyysin alkunopeus määritettiin yhdeksässä substraattikonsentraatiossa alueella 0,01 - 2 mM käyttäen Cobas Faran automatisoitua spektrofotometriä. Kineettiset parametrit V_{max} ja K_m määritettiin käyttäen ENZFITTER-ohjelmaa (epälineaarisen regression data-analyysiohjelma). k_{cat} laskettiin yhtälöstä $V_{max} = k_{cat} \times [E_0]$. Aktiivisen entsyymin konsentraatio $[E_0]$ määritettiin aktiivisen kohdan titrauksella

käyttäen tiukasti sitoutuvia proteinaasinestäjäproteiineja. Estovakio K_i laskettiin K_m/k_{cat}-pistediagrammeista estäjän konsentraation funktiona. Estäjien oletettiin olevan 100-%:sen puhtaita ja moolikonsentraatiot määritettiin käyttäen painotuslukuja ja molekyylipainoja.

Tulokset testattujen boroni- ja borinihappojohdannais -entsyyminstabiloijien estovakioiksi K_i on lueteltu seuraavassa.

Taulukko 1

Estovakiot alkalaasin ja savinaasin estämisessä erilaisilla boroni- ja borinihappojohdannaisilla, boorihapon tulokset ovat mukana vertailun vuoksi

Estäjä	K_i alkalaasi	K_i savinaasi
boorihappo	30 mM	20 mM
tiofeeni-3-boronihappo	2 mM	2 mM
tiofeeni-2-boronihappo	2 mM	2 mM
4-metyylitiofeeni-2-boronihappo	1,8 mM	3 mM
5-etyylitiofeeni-2-boronihappo	0,7 mM	0,9 mM
5-metyylitiofeeni-2-boronihappo	2 mM	3 mM
5-bromotiofeeni-2-boronihappo	0,4 mM	0,2 mM
5-klorotiofeeni-2-boronihappo	0,3 mM	0,2 mM
dibentsotiofeeni-1-boronihappo	0,9 mM	1,5 mM
dibentsofuraani-1-boronihappo	1,1 mM	1,5 mM
dibentsofuraani-4-boronihappo	0,9 mM	1,1 mM
pikoliini-2-boronihappo	3 mM	4 mM
difenyyliborinihappo (etananoliamiinikompleksi)	2 mM	4 mM
5-metoksitiofeeni-2-boronihappo	2 mM	1 mM
tionaftreeni-1-boronihappo	2 mM	3 mM

furaani-2-boronihappo	3 mM	4 mM
furaani-3-boronihappo	10 mM	7 mM
2,5-dimetyylitiofeeni-3-boronihappo	3 mM	6 mM
bentsofuraani-1-boronihappo	1 mM	0,8 mM
3-metoksitiofeeni-2-boronihappo	3 mM	1,2 mM
5-n-propyyli-tiofeeni-2-boronihappo	1,5 mM	3 mM
5-metoksifuraani-2-boronihappo	2 mM	3 mM
3-bromotiofeeni-2-boronihappo	2 mM	2 mM
5-etyylifuraani-2-boronihappo	2 mM	3 mM
4-karbatsolietyyliboronihappo	1 mM	2 mM

Esimerkki 3

Varastointistabiilius nestemäisessä pesuaineessa

Erilaisia boroni- ja borinihappojohdannais -entsyyminstabiloijia testattiin myös varastointistabiiliuskokeilla nestemäisissä pesuaineissa käyttäen aiemmin kuvattua menetelmää, seuraavissa olosuhteissa:

Pesuainepohja (USA:laistyyppinen)

	paino-% (puhtaina ainesosina)
Nansa 1169/p	10,3 (lineaarinen alkyylibentseenisulfonaatti, LAS)
Berol 452	3,5 (alkyylieetterisulfaatti, AES)
Oleaatti	0,5
Kookosrasvahappo	0,5
Dobanol 25-7	6,4 (alkoholietoksylaatti, AEO)

Natriumksyleenisulfonaatti	5,1
Etanoli	0,7
MPG	2,7 (monopropyleeniglykoli)
Glyseroli	0,5
Natriumsulfaatti	0,4
Natriumkarbonaatti	2,7
Natriumsitraatti	4,4
Sitruunahappo	1,5
Vesi	60,8
Entsyymiannos:	1 % w/w Savinasea (14 KNPU/g) + 1 % w/w Lipolasea (100 KLU/g)
Entsyyminstabiloija-annos:	5 mmol/kg (boorihapolla 160 mmol/kg)
Varastointi:	0, 3, 7 ja 14 vrk 30 °C:ssa

Tulokset boronihappo- ja borinihappojohdannais -entsyyminstabiloijien estotehokkuuksiksi IF_I on lueteltu seuraavassa.

Taulukko 2
Erilaisia boroni- ja borinihappojohdannais -entsyyminstabiloijia ja vastaavat IF_I:t. Boorihappo on mukana vertailun vuoksi.

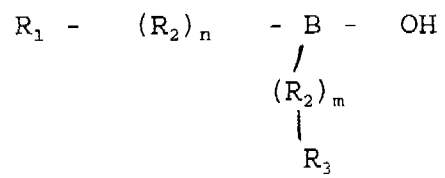
Estäjä	Parantumistekijä IF_I
boorihappo	1
tiofeeni-2-boronihappo	72
tiofeeni-3-boronihappo	63
4-metyylifiofeeni-2-boronihappo	4
5-etyylitiofeeni-2-boronihappo	66

5-bromotiofeeni-2-boronihappo	124
5-klorotiofeeni-2-boronihappo	123
dibentsotiofeeni-1-boronihappo	12
dibentsofuraani-1-boronihappo	9
5-metyylitiofeeni-2-boronihappo	12
5-metoksitiofeeni-2-boronihappo	14
furaani-2-boronihappo	13
dimetyylitiofeeni-3-boronihappo	7
furaani-3-boronihappo	32
3-metoksitiofeeni-2-boronihappo	8
bentsofuraani-2-boronihappo	190
tionaftreeni-1-boronihappo	20
dibentsofuraani-4-boronihappo	19

Verrattaessa taulukon 1 tuloksia taulukon 2 tuloksiin näyttää siltä, että boroni- tai borinihappostabiloijan vaikutus pesuaineeseen voidaan ennustaa puskurijärjestelmissä saaduista tuloksista ja päinvastoin.

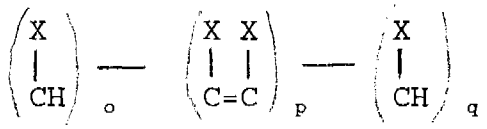
Patenttivaatimukset

1. Nestemäinen koostumus, joka käsittää entsyymiä ja boronihappo- tai borinihappojohdannais -entsyyminstabiloijaa, jolla on seuraava kaava:



missä R_1 on haluttaessa substituoitu, kondensoitu aromaattinen rengasrakenne, joka sisältää 14 tai 18 hiiliatomia renkaassaan, tai haluttaessa substituoitu monosyklinen tai kondensoitu aromaattinen heterosyklinen rengasrakenne, joka sisältää enintää 17 hiiliatomia renkaassaan, tai haluttaessa substituoitu monosyklinen tai kondensoitu kinonoidirengasrakenne, joka sisältää enintään 18 hiiliatomia renkaassaan;

R_2:lla on kaava



missä X:t ovat samoja tai erilaisia, ja valitut joukosta vety, C_1 - C_6 -alkyyli, substituoitu C_1 - C_6 -alkyyli, aryyli, substituoitu aryyli, hydroksi, hydroksyylijohdannainen, halogeeni, amiini, alkyloitu amiini, amiinijohdannainen, nitro, tioli, tiolijohdannainen, aldehydi, happo, hapan suola, esteri, sulfonaatti tai fosfonaatti, ja o, p ja q voivat olla keskenään samoja tai erilaisia, ja niistä kukin voi olla 0, 1 tai 2; n ja m voivat olla samat tai erilaiset kuin R_1 ja valitut samasta joukosta kuin R_1, tai R_3 on hydroksyyliryhmä, tai R_1 ja R_3 ovat kumpikin haluttaessa substituoituja monosyklisiä tai disyklisiä aromaattisia rengasrakenteita.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen nestemäinen koostumus, jossa n = 0, m = 0, R_3 on hydroksyyliryhmä ja R_1 on substituoitu tai substituoimaton tiofeeniryhmä.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen nestemäinen koostumus, jossa entsyyminstabiloija on tiofeeni-2-boronihappo tai tiofeeni-3-boronihappo.

4. Patenttivaatimuksen 2 mukainen nestemäinen koostumus, jossa tiofeeniryhmä on substituoitu C_1 - C_6 -alkyylillä ja/tai halogeenilla.

5. Patenttivaatimuksen 5 mukainen nestemäinen koostumus, jossa tiofeeniryhmä on substituoitu bromilla tai kloorilla.

6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen nestemäinen koostumus, jossa entsyyminstabiloija on 5-bromo-tiofeeni-2-boronihappo tai 5-kloro-tiofeeni-2-boronihappo.

7. Patenttivaatimuksen 4 mukainen nestemäinen koostumus, jossa tiofeeniryhmä on substituoitu metyylillä tai etyylillä.

8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen nestemäinen koostumus, jossa entsyyminstabiloija on 4-metyyli-tiofeeni-2-boronihappo, 5-metyyli-tiofeeni-2-boronihappo tai 5-etyyli-tiofeeni-2-boronihappo.

9. Patenttivaatimuksen 1 mukainen nestemäinen koostumus, jossa n = 0, m = 0, R_3 on hydroksyyliryhmä ja R_1 on substituoitu tai substituoimaton dibentsotiofeeniryhmä.

10. Patenttivaatimuksen 9 mukainen nestemäinen koostumus, jossa entsyyminstabiloija on dibentsotiofeeni-1-boronihappo.

11. Patenttivaatimuksen 1 mukainen nestemäinen koostumus, jossa n = 0, m = 0, R_3 on hydroksyyliryhmä ja R_1 on substituoitu tai substituoimaton dibentsofuraaniryhmä.

12. Patenttivaatimuksen 11 mukainen nestemäinen koostumus, jossa entsyyminstabiloija on dibentsofuraani-1-boronihappo tai dibentsofuraani-4-boronihappo.

13. Patenttivaatimuksen 1 mukainen nestemäinen koostumus, jossa n = 0, m = 0, R_3 on hydroksyyliryhmä ja R_1 on substituoitu tai substituoimaton bentsofuraaniryhmä.

14. Patenttivaatimuksen 13 mukainen nestemäinen koostumus, jossa entsyyminstabiloija on bentsofuraani-2-boronihappo.

15. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 1 - 14 mukainen nestemäinen koostumus, jossa mainittu koostumus on pesuainekoostumus.

16. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 1 - 15 mukainen nestemäinen koostumus, jossa entsyymi on proteaasi.

17. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 1 - 16 mukainen nestemäinen koostumus, joka lisäksi käsittää pesuaineeseen sopivaa toista entsyymiä, erityisesti amylaasia, lipaasia, sellulaasia tai peroksidaasia tai mitä tahansa niiden seosta.

18. Patenttivaatimuksen 17 mukainen nestemäinen koostumus, jossa entsyymi on lipaasi.

19. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 1 - 18 mukainen nestemäinen koostumus, jossa mainittu boronihappo- tai borinihappojohdannais -entsyyminstabiloija on boronihappo- tai borihappojohdannaisen alkalimetallisuola.

20. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 1 - 19 mukainen nestemäinen koostumus, mihin mainittua boroni- tai borinihappojohdannaista on lisätty enintään 500 mM, edullisesti 0,001 - 250 mM, edullisemmin 0,005 - 100 mM, edullisimmin 0,01 - 10 mM.