



S U O M I - F I N L A N D

(FI)

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

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

G 02C 13/00, A 61L 2/18, C 11D 3/386

(21) Patenttihakemus - Patentansökning 863581

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag 05.09.86

(24) Alkupaivä - Löpdag 05.09.86

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig 10.03.87

(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. -
Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad 15.08.91

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

09.09.85 US 774193 P

(71) Hakija - Sökande

1. Allergan Pharmaceuticals, Inc., 2525 Dupont Drive, Irvine, Cal., USA, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Huth, Stanley W., 725 Baywood Drive, Newport Beach, Cal., USA, (US)

2. Lam, Sam W., 3 Shaddock, Irvine, Cal., USA, (US)

3. Kiral, Richard M., 14101 Klee, Irvine, Cal., USA, (US)

(74) Asiamies - Ombud: Berggren Oy Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

**Menetelmä piilolinssien samanaikaiseksi puhdistamiseksi ja desinfioimiseksi
Förfarande för samtidig rengöring och desinficering av kontaktlinns**

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

EP A 0140669 (G 02C 13/00), GB C 1500707 (A 61L 13/00), US A 4285738 (B 08B 3/08),
US A 4521375 (A 61L 2/18)

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Yksivaiheinen menetelmä piilolinssien
puhdistamiseksi ja desinfioimiseksi
on saatu aikaan upottamalla linssit
liuokseen, joka sisältää peroksidia
ja peroksidiaktiivista entsyymiä.

Ett ettstegsförfarande för rengöring
och desinfektering av kontaktlinser
har åstadkommits genom att nedsänka
linserna i en lösning som innehåller
peroxid och peroxidaktivt enzym.

Menetelmä piilolinssien samanaikaiseksi puhdistamiseksi ja desinfioimiseksi

Esillä olevan keksinnön kohteena on menetelmä piilolinssien puhdistamiseksi ja desinfioimiseksi. Tarkemmin eriteltynä keksinnön kohteena on piilolinssien samanaikainen puhdistaminen ja desinfiointi peroksidia ja peroksidiaktiiveja entsyymejä, etenkin proteiineja hajottavia entsyymejä, sisältävän liuoksen avulla.

Piilolinssien kehittyminen lasisista nykyisiin jatkuvakäyttöisiin, hydrofiilisiin materiaaleihin perustuviin linsseihin on tuonut mukanaan muuttuvan ja vaihtelevan uusien ja tehokkaampien puhdistus- ja desinfiointimenetelmien tarpeen, joiden avulla linssit säilyttävät optisen kirkkautensa, kulutuskestävyytensä ja jotka estävät infektoivien aineiden pääsyn silmään.

Lasiset ja aikaisemmat polymeeriset esim. polymetakrylaattilinssit (PMMA) voitiin niiden lujuudesta ja hydrofiilisistä ominaisuuksista johtuen helposti puhdistaa käsin käyttämällä pesuaineita. Koska tällaiset aineet jossain määrin tulevat kostutetuiksi luonnollisten silmässä olevien vesipitoisen kerroksen ja kyynelten avulla, ne ovat siinä määrin rasvahakuisia, että kaikki tahrat, lipidejä mahdollisesti lukuunottamatta, voidaan helposti poistaa puhdistusaineiden avulla. Hydrofiiliset aineet, etenkin polypeptidit ja entsyymit, kuten lysotsyymi, eivät sanottavasti takerru näihin materiaaleihin, jolloin ne voidaan helposti poistaa pinta-aktiivisilla pesu- ja puhdistusaineilla.

Lasiset ja PMMA-pohjaiset linssit voidaan myös helposti desinfioida puhdistusaineiden avulla. Mekaaninen puhdistusprosessi poistaa helposti linssiin takertuneet infektoivat

aineet. Lisäksi näiden materiaalien ei-huokoisten ominaisuuksien vuoksi voidaan kemialliset desinfiointiaineet säilyttää säilytys- ja puhdistusliuoksiin ilman, että desinfiointiaine imeytyy linssiin ja joutuu silmään linssin käytön aikana. Siten ei tarvitse lähes lainkaan huolehtia infektoivien aineiden fysikaalisesta poistamisesta ja steriiliyden säilyttämisestä kemiallisten aineiden avulla säilytyksen aikana sekä puhdistus-, kosteutus- ja säilytysliuoksissa.

Polymeeriteknologian edistyminen on merkittävästi lisännyt käyttömukavuutta ja silmänterveyttä, mutta se on myöskin tuonut mukanaan uusia, ko. materiaalien puhdistusta ja desinfiointia koskevia ongelmia.

Linssi on silmälle kaikkein mukavin silloin, kun sen pinta on kostutettavissa silmänesteellä ja kyynelliuksella. Kaikissa nykyään käytössä olevissa linssipolymeereissä, PMMA-linssejä lukuunottamatta, linssipinta on luonnostaan hydrofiilinen tai se on käsittelemällä saatu hydrofiiliseksi. Tämä saadaan aikaan monien varaukseltaan negatiivisten, esim. karboksylaattien, ja neutraalien ryhmien avulla, jotka tuottavat sarveiskalvoa peittävällä nestekerroksella helposti kostutettavan hydrofiilisen ympäristön. Tällaisia negatiivisesti varautuneita hydrofiilisiä pintoja ei ole ainoastaan hydrogeelilinsseissä vaan myös jäykemmissä, esim. organosiloksaani-metakrylaattilinsseissä (Polycon®) ja silikonielastomeeripohjaisissa linsseissä. Jälkimmäisen ryhmän, silikonielastomeerilinssien hydrofobinen pinta on päällystetty tai muutoin käsitelty hydrofiilisen pinnan aikaansaamiseksi.

Proteiinia sisältävät aineet imeytyvät hydrofiiliseen linssipintaan päivittäisen käytön aikana. Kaikkien muiden paitsi puhtaiden PMMA-linsien kohdalla imeytyminen on niin voima-

kasta, että edes jäykistä polysiloksaani/metyylimetakrylaattikopolymeerilinsseistä ei tätä lietettä voida käsin poistaa puhdistusaineiden avulla. Niin kutsutut hydrogeelilinssit, jotka on valmistettu hydroksietyylimetakrylaatista, hydroksietyylimetyylimetakrylaatista, vinyylipyrrolidonista ja glyserometakrylaattimonomeereistä ja metakryylihaposta tai happamista estereistä ja jotka imevät itseensä suuren määrän, ts. 35-80 % vettä, ovat niin hauraita, että mekaaniset puhdistusmenetelmät eivät ole käytännöllisiä poistettaessa tahroja, varsinkin voimakkaasti imeytyneitä proteiinipitoisia aineita.

Tuloksena on, että tällaisten materiaalien kerääntyminen voi ajan mittaan johtaa käyttöepämukavuuteen ja jopa häiritä linssien optisia ominaisuuksia, etenkin vähentää valon siirtoa ja lisätä valon taittumista. Lisäksi proteiinien kerääntyminen saa aikaan silmänärsytystä, visuaalisen terävyyden vähentymistä, linssivahinkoja ja voi jopa joissakin tapauksissa aiheuttaa papillaarista sidekalvontulehdusta.

Tutkimuksissa on saatu selville, että proteiinien kerääntymisen suurin syy on lysotsyymientsyymi. Lisäksi voivat lipoproteiinit ja mukopolysakkaridit imeytyä linssin pintaan, mutta proteiinit itsessään, etenkin lysotsyymiaineet ovat linssien proteiinilietteen suurin aiheuttaja. Nämä entsyymit yhdessä pienten samankaltaisten proteiinimäärien, lipoproteiinien ja mukopolysakkaridien kanssa kerääntyvät hydrofiilisten linssimateriaalien pinnalle.

Ainoa nykyisin tunnettu turvallinen ja tehokas lietteen poistotapa on sellaisten entsyymien käyttö, joiden hydrolyyttinen toiminta muuntaa proteiinipitoiset aineet pieniksi, vesiliukoisiksi alayksiköiksi. Erittäin käytännöllisiä ovat proteolyyttiset entsyymit, proteaasit, jotka hydrolysoivat amidisidokset hajottamaan proteiinit aminohapoiksi

ja hyvin pieniksi polypeptideiksi. Nämä proteiinikappaleet ovat yleensä vesiliukoisia ja siten ne liukenevat helposti ympäröivään vesipitoiseen ympäristöön. US-patentti 3 910 296 esittää proteaasien käytön piilolinssien puhdistuksessa. Katso myös US-patenttia 4 285 738. Entsyymejä, joilla on lipolyyttistä tai mukolyyttistä toimintaa, voidaan myös yhdessä proteolyyttisten entsyymien kanssa käyttää linssien puhdistukseen.

Toinen kaasuja suodattavia piilolinssijä, etenkin hydrogeeli- tai paljon vettä sisältäviä, HEMA-, VP- tai GMA-monomeereistä valmistettuja linssijä koskeva ongelma käsittelee linssien ja linssien säilytysliuoksen desinfiointia ja niiden steriiliyden säilyttämistä.

Linssien desinfioimiseksi on kehitetty monia eri menetelmiä, joissa käytetään hyväksi esim. korkeaa lämpötilaa, steriiliä fysiologista suolaliuosta ja kemikaaleja, esim. antimikrobisia lääkeaineita tai hapetusprosessia.

Lämpö on jossain määrin osoittautunut tehokkaaksi, mutta sen haittana on lisäpuhdistuksen vaikeutuminen, ts. proteiinien ja muiden sakkojen denaturoiminen ja jähmettyminen linsseihin.

Steriiliä suolaliuosta voidaan käyttää linssien puhdistamiseen ja liuottamiseen. Tällaiset liuokset eivät aina ole steriilejä, koska tietyt mikrobit voivat elää suolapitoisessa ympäristössä, ja koska steriili suolaliuos ei täysin pysty inaktivoimaan itiöitä.

Kemiallisissa menetelmissä nk. lääkeaineiden, raskasmetallipohjaisten antimikrobien, kuten timerisolin ja trialkyyliammoniumhalidin sekä yhdisteiden, esim. bentsyylialkoniumkloridin tai muiden vastaavien yhdisteiden käyttö saattaa

virheellisesti käytettynä saada aikaan käyttöepämukavuutta. Lääkeaineiden sellaiset ominaisuudet, jotka tekevät niistä hyviä mikrobiosideja, saattavat myös aiheuttaa silmänärsytystä. Tämä ilmiö koskee etenkin hydrogeelityyppisiä linssiaineita, koska lääkeaine kerääntyy linssiin ja pääsee sitä kautta tunkeutumaan silmään käytön aikana. Tällaiset lääkeaineet voivat joillekin ihmisille aiheuttaa niin suurta silmänärsytystä, että he alkavat etsiä vaihtoehtoisia linsien sterilointitapoja.

Vastauksena lääkeaineiden, lämmön ja suolaliuoksen avulla tapahtuvan steriiliyden säilyttämisen ongelmiin on hapettimien käyttö alkanut saavuttaa suurta mielenkiintoa. Piilolinssien desinfioimiseksi on kehitetty useita yksi- tai kaksivaiheisia peroksidiin perustuvia menetelmiä. Yksi menetelmä on kuvattu US-patentissa 3 912 451 ja toinen US-patentissa 4 473 550.

Keksinnön mukaisesti on nyt havaittu, että piilolinssijä voidaan samanaikaisesti puhdistaa ja desinfioida yhdistämällä yhteen ja samaan liuokseen peroksidi desinfiointia ja peroksidiaktiivinen proteolyyttinen entsyymi puhdistusta varten. Keksinnön oleelliset tunnusmerkit ilmenevät oheisista patenttivaatimuksista. Yllättävää kyllä kunkin yksittäisen aineosan tehokkuus kasvaa yhdisteenä käytettäessä. Toisin sanoen peroksidin avulla proteiinipitoisten aineiden poisto moninkertaistuu ja desinfiointi mahdollistuu peroksidiaktiivisen entsyymin avulla. Tuloksena on se, että piilolinssit voidaan nyt samanaikaisesti puhdistaa ja steriloida paljon tehokkaammin kuin käytettäessä kutakin aineosaa erikseen.

Peroksideja ja proteaaseja on yhdistetty pesuaineissa ja hammasproteesien puhdistusaineissa. Esim. US-patentti 3 732 170 käsittelee biologista puhdistusyhdistettä, joka sisältää entsyymin ja peroksidiosan, etenkin alkalimetalli-

sen monopersulfaattikolmoissuolan. Tämän keksinnön kohteena on "proteiinipitoisten" veritahrojen puhdistaminen materiaaleista eli se on pesuloille tarkoitettu apuväline. Yhdistelmä on suositeltavasti muodostettu niin, että mukana on anioninen puhdistusaine.

Toisena esimerkkinä US-patentti 4 155 868 esittelee vesiliukoisen, poreilevan hammasproteesien puhdistustabletin, joka sisältää entsyymin ja aktiivisen hapen yhdisteen. Tämän keksinnön ytimenä on tabletin muodostaminen niin, että oksidoivan aineen aikaansaama ennenaikainen, säilytyksen aikana tapahtuva entsyymin inaktivointi saadaan estetyksi.

Natriumperboraatti ja entsyymit ovat tunnettuja nykyaikaisten pesuaineiden aineosia. Tätä aihetta on käsitelty saksalaisessa, O. Oldenrothin julkaisussa Fette, Seifen, Anstrichmittel, 1970 (72 (7)), 582-7. Tämä artikkeli osoittaa, että denaturoidun munankeltuaisen poisto kankaasta saadaan aikaan bakteeriproteaasien avulla, mutta perboraattien mukana ollessa proteaasien tehokkuus vähentyi.

Mikään näistä esimerkeistä ei opeta tai ota lukuun yhdisteiden käyttöä piilolinssien puhdistamisessa ja desinfioinnissa eikä myöskään sitä tehokkuutta lisäävää vaikutusta, joka yhdellä aineosalla voi olla toiseen nähden.

Entsyymin ja peroksidin yhdistämistä yksivaiheisen desinfioinnin ja puhdistamisen aikaansaamiseksi voidaan soveltaa proteolyyttisiin, lipolyyttisiin tai mukolyyttisiin entsyymeihin, joko yksinään tai yhdisteinä.

Peroksidiaktiivinen entsyymin voi olla mikä tahansa entsyymin, jolla on mitattavissa oleva vaikutus 3-prosenttiseen (paino/tilavuus) vetyperoksidiin vesipitoisessa liuoksessa normaalilämpötilassa ja -paineessa, joka on määritetty kolorimet-

risillä kokeilla, kuten esim. Azocollin menetelmällä, Tomarelli, R.M; J. Lab. Clin. Med. 34, 422 (1949) tai dimetyyli-kaseiinimenetelmällä proteolyyttisen toiminnan määrittämiseksi, Yaun Lin, et al., J. Biol. Chem., 244 (4), 789-793 (1969).

Entsyymejä voidaan saada mistä tahansa kasvi- tai eläinlähteestä mikrobiset ja nisäkäslähteet mukaanlukien. Ne voivat olla neutraaleja, happamia tai alkalisia entsyymejä.

Proteolyttisellä entsyymillä on kyky joko osittain tai kokonaan hydrolysoida peptidiamidisidoksia. Tällaisilla entsyymeillä voi myös olla jonkinasteinen luontainen lipolyttinen ja/tai amylolyttinen toiminta yhdessä proteolyttisen toiminnan kanssa.

Suosittelavia proteolyyttisiä entsyymejä ovat sellaiset entsyymit, joilla ei oleellisesti esiinny sulfhydryyli- tai disulfididisidoksia ja jotka voivat reagoida aktiivisen hapen kanssa häiriten hapen toimintaa ja jotka voivat saada aikaan entsyymien ennenaikaisen inaktivoitumisen. Metalloproteaaseja, entsyymejä, jotka sisältävät kaksiarvoisia metalli-ioneja, esim. kalsiumia, magnesiumia tai sinkkiä proteiiniin sidottuna voidaan myös käyttää.

Suosittelavampi proteolyyttisten entsyymien ryhmä ovat seriiniproteaasit, etenkin sellaiset, joita saadaan *Bacillus*- ja *Streptomyces*- bakteereista ja *Aspergillus*-homeista. Suositeltavimpia ovat tästä ryhmästä *Bacillus*-bakteereista saadut alkaliset proteaasit, joita yleisesti kutsutaan subtilisiineiksi. Viitteenä mainitaan Keay, L.; Moser, P.W. ja Wildi, B.S. "Proteases of the Genus *Bacillus*. II alkaline Proteases" *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. XII, ss 213-249 (1970) ja Keay, L. ja Moser, P.W., "Differentiation of Alkaline Proteases from *Bacillus* Species", *Biochemical*

and Bioreserch Comm., Vol. 34, No. 5, ss 600-604, (1969).

Subtilisiinientsyymit jaetaan kahteen alaluokkaan, subtilisiin A:han ja subtilisiin B:hen. Subtilisiin A -ryhmässä ovat entsyymit, joita saadaan esim. lajeista B. subtilis, B. licheniformis ja B. pumilis. Tämän alaluokan organismit tuottavat vain vähän tai ei lainkaan neutraalia proteaasia tai amylaasia. Subtilisiin B -luokka muodostuu entsyymeistä, joita saadaan B. subtilis, B. subtilis var. amylosacchariticus, B. amyloliquefaciens ja B. subtilis NRRL B 3411. Nämä organismit tuottavat alkalisten proteaasien tuotantoon verrattavissa olevan määrän neutraaleja proteaaseja ja amylaaseja.

Muita suositeltavia entsyymejä ovat lisäksi esim. pankreatiini, trypsiini, kollaginaasi, keratinaasi, karboksylaasi, aminopeptidaasi, elastaasi, aspergillopeptidaasi A ja B, pronaasi E (S. griseus) ja dispaasi (Bacillus polymyxa).

Entsyymien tunnistus, erotus ja puhdistus on vanha taito. Monet tunnistus- ja eristystekniikat ovat löydettävissä entsyymien eristystä käsittelevästä tieteellisestä kirjallisuudesta koskien myös entsyymejä, joilla on proteolyyttistä sekä yhdistettyä proteolyyttistä/amylolyyttistä tai proteolyyttistä/lipolyyttistä toimintaa. Tässä keksinnössä tarkastellut peroksidivakaat entsyymit saadaan helposti tunnettujen tekniikkojen avulla kasvi-, eläin- tai mikrobi-lähteistä.

Rekombinantti DNA -tekniikkojen saapumisen myötä voidaan ennakoida, että pian löydetään uusia peroksidivakaiden proteolyyttisten entsyymien lähteitä ja tyyppejä. Nämä entsyymit pitäisi katsoa kuuluvaksi tämän keksinnön piiriin, mikäli ne täyttävät hakemuksessa mainitut stabiilisuuden ja aktiivisuuden vaatimukset. Katso nähtäväksi asetettua JP-

hakemusta J6 0030-685 esimerkkinä rekombinantti DNA:n avulla *Bacillus subtilis* -organismista tuotetuista proteaaseista.

Keksintöä sovellettaessa on käytettävä tehokasta entsyymimäärää. Tehokas määrä on sellainen, joka saa kohtalaisessa ajassa (esim. yhdessä yössä) aikaan oleellisesti kaikkien normaalikäytössä linssiin kertyneiden proteiinipitoisten kerrostumien poiston. Tämä tavoite on asetettu ajatellen piilolinssien käyttäjiä, joilla proteiinilietteen kertyminen on määrältään normaalia, ei sitä hyvin pientä ryhmää ajatellen, joilla saattaa joskus esiintyä merkittävästi suurempaa proteiinien kertymistä niin, että puhdistus suositellaan tehtäväksi joka toinen tai kolmas päivä.

Vaadittava entsyymimäärä tehokkaan puhdistusaineen aikaansaamiseksi riippuu monista tekijöistä; entsyymin luontainen aktiivisuus ja sen tehokas vuorovaikutus peroksidin kanssa ovat asianmukaisia huomioon otettavia seikkoja.

Perusmittapuuna voidaan pitää sitä, että työliuoksen pitäisi sisältää riittävästi entsyymiä tuottamaan noin 0,0001 - 0,5 Anson-yksikön suuruinen aktiivisuus liuoksen millilitraa kohti, suositeltavasti 0,0003 - 0,05 Anson-yksikköä kutakin linssikäsittelyä kohti. Korkeampia tai matalampiakin määriä voidaan käyttää. Tässä mainittua alhaisemmat entsyymipitoisuudet voivat puhdistaa linssin, mutta puhdistus kestää niin kauan, ettei se enää ole käytännössä hyödyllistä. Korkeampia entsyymipitoisuuksia sisältävien liuosten pitäisi saada nopeampi puhdistuminen, mutta ne voivat sisältää materiaaleja, jotka ovat kooltaan liian suuria käytännöllisesti käsiteltäviksi.

Koska entsyymiyhdiste harvoin on puhdas, on paino/tilavuus -astetta tarkasteltaessa odotettavissa, että entsyymilähdeä käytetään n. 0,003 - 15 % koko liuoksen määrästä.

Tarkka määrä vaihtelee entsyymin puhtaudesta riippuen, ja se on lopulta määriteltävä erikseen jokaista erää varten.

Entsyymitoiminta riippuu pH:sta, joten jokaisella entsyymillä on oma pH-asteikkonsa, jossa se toimii parhaiten. Asteikonmääritys voidaan helposti tehdä tunnetuilla tekniikoilla. On suositeltavaa käsitellä työliuos annetun entsyymin parhaaseen pH-arvoon, mutta tämä ei ole ehdoton edellytys.

Peroksidilähde voi olla mikä tahansa yksi tai useampi yhdiste, joka antaa liuokseen aktiivista happea. Esimerkkinä yhdisteistä voidaan mainita vetyperoksidi ja sen alkaliset metallisuolat, perboraattisuolat, etenkin monohydraatit ja tetrahydraatit, persulfaattisuolat, karbonaattiperoksidisuolat, diperisofthaalihappo, peroksididifosfaattisuolat ja alumiiniaminohydroperoksisuolat. Vetyperoksidi ja perboraattien ja persulfaattien alkaliset metallisuolat, etenkin natrium- ja kaliumsuolat ovat suositeltavimpia.

Desinfioiva peroksidimäärä on sellainen, joka vähentää mikrobikuormitusta yhdellä logaritmilla kolmessa tunnissa. Suositeltavammin mikrobikuormitusta vähennetään yhdellä logaritmilla tunnissa. Suositeltavimpia ovat sellaiset peroksidipitoisuudet, jotka vähentävät mikrobikuormitusta yhdellä logaritmilla 10 minuutissa tai sitä lyhyemmässä ajassa.

Yhtä ja samaa peroksidipitoisuutta ei voida soveltaa kaikkiin peroksidiin, koska aktiivisen hapen määrä vaihtelee oleellisesti eri peroksidien välillä.

Vetyperoksidi täyttää alhaisemmassa 0,5 % painon/tilavuuden mukaan useimmissa oloissa ensimmäisen edeltävässä kappaleessa mainitun vaatimuksen. On suositeltavaa käyttää 1,0 - 2,0 % peroksidia, sillä nämä pitoisuudet vähentävät desinfioin-

ti- ja puhdistusaikaa 0,5-prosenttiseen peroksidiliuokseen verrattuna. Suositeltavinta on käyttää 3-prosenttista vetyperoksidiliuosta, vaikka 10 % voidaan käyttää. Keksinnössä käytettävän vetyperoksidin ylärajaa ei ole määriteltä lukuunottamatta sitä, että entsyymien on säilytettävä proteolyyttinen toimintansa.

Muiden peroksidien kohdalla ainoa niiden pitoisuudelle asetettu rajoitus on se, että ne annetussa pitoisuudessa osoittavat tehostavaa toimintaa yhdessä peroksidivakaan entsyymien kanssa puhdistusta ja desinfiointia ajatellen. Esimerkiksi on havaittu, että 0,02 % paino/tilavuuspitoisuudessa natriumperboraatti tekee mahdolliseksi proteiinien entsyymaattisen poiston piilolinsseistä. Minkä tahansa peroksidin sopiva pitoisuus voidaan helposti määrittää tavanomaisilla kokeilla.

Peroksidi/entsyymiliuosten pH-arvon nostamisen on havaittu vaikuttavan liuosten desinfiointiominaisuuksiin. pH:n ollessa 5,22 3 % vetyperoksidiliuoksen D-arvo *A. niger*:iin verrattuna oli 8,04, 3,7 pH:n ollessa 7,32 ja 1,79 pH:n ollessa 8,22 ja 9,23. Suositeltavin pH on näillä liuoksilla 6 - 10, etenkin 7,5 - 9,0. Vastaavasti on suositeltavaa käyttää peroksidivakaita entsyymejä, jotka ovat aktiivisia pH:n ollessa neutraali tai alkalinen.

Entsyymi ja/tai peroksidiaineeksiin voidaan tableteissa tai nestemäisissä liuoksissa lisätä lisäaineita. Esimerkkeinä voidaan mainita jänneysaineet, poreaineet, stabilointiaineet, sidosaineet, puskurointiaineet, entsyymien rinnakkaisaineet, disulfididoksia vähentävät aineet, esim. vesiliuokoinen merkaptani ja ditioniitti jne, jäännösperoksidi inaktivoivat aineet jne.

Peroksidin ja entsyymien yhdiste voi vaatia stabilointiai-

neita aineosien ennen aikaisen inaktivoinnin estämiseksi. Liuoksiin voi olla tarkoituksenmukaista lisätä aineita stabiloimaan peroksidia etenkin metalli-indusoitua katalyytista hajoamista vastaan. Liuoksiin voi myös olla tarkoituksenmukaista lisätä puskurointiaineita pH:n säilyttämiseksi tietyllä annetulla tasolla. Suoloja tai muita aineita, kuten polyalkoholeja tai muita vastaavia aineita voidaan lisätä liuosten jänteisyyden muuntamiseksi.

Tabletteissa tai jauheissa samat seikat voivat aiheuttaa suolojen, puskurointiaineiden tai stabilointiaineiden lisäämisen niin, että tabletteja liuotettaessa tarkoituksenmukaisesti pH ja jäntevyysarvo säilyvät. Tabletteihin ja jauheisiin voi myös olla tarkoituksenmukaista lisätä poreilua aiheuttavia aineosia. Lisäksi sidosaineita, voiteluaineita tabletointitarkoituksiin ja muita normaalisti jauheita tuotettaessa käytettäviä aineita voidaan sisällyttää yhdisteisiin. Indikaattoreita, väriaineita, jotka osoittavat peroksidien läsnäolon tai puuttumisen, voidaan myös sisällyttää näihin koostumuksiin.

Keksinnön toteuttamiseksi valmistetaan peroksidia ja entsyymiä sisältävä liuos, ja linssit asetetaan kosketuksiin liuoksen kanssa suositeltavasti upottamalla ne liuokseen. Linssit jätetään kosketuksiin liuoksen kanssa tarpeeksi pitkäksi ajaksi niin että oleellisesti kaikki proteiini saadaan poistetuksi linssien pinnalta ja että linssit desinfioituvat.

Menetelmä tai järjestys, jossa aineosat kootaan liuokseksi, voi vaihdella käytetyn aineosan fysikaalisista ominaisuuksista riippuen, mutta lisäysjärjestys ei ole keksinnön soveltamiselle oleellista. Esimerkiksi käytettäessä vetyperoksidia ei ole järkevää muodostaa tablettia tai jauhetta kaikista aineosista. Peroksidilähteen ollessa vetyperoksidi

on välttämätöntä sekoittaa entsyymi ja muut kuivat aineosat vesipitoiseen peroksidiin. Kaikkein kätevintä on tehdä entsyymistä ja muista kuivista aineosista jauhetta tai tabletti, sitten liuottaa saatu yhdiste peroksidiliuokseen ja laittaa sitten linssit näin saatuun liuokseen. Linssit voisivat jo olla valmiina peroksidiliuoksessa entsyymiä lisättäessä, mutta käytännön näkökohdista johtuen ensiksi mainittu menetelmä on suositeltavampi.

Aineiden valmistamiseen ei ole mitään erityisesti suositeltavaa kaavaa. Kaksi oleellista aineosaa voivat olla erillisiä aineksia joko kuivassa tai vesipitoisessa muodossa. Ne voidaan yhdistää yhdeksi tabletiksi tai jauheeksi, tai toinen aineosa voi olla kuivassa muodossa kun taas toinen valmistetaan vesipitoiseksi liuokseksi.

Lopullinen muoto riippuu osaksi koostumuksessa käytetystä peroksidista. On ennakoitu, että keksinnön mukainen jauhe tai tabletti voisi myös olla poremaista tabletin hajoamisen edistämiseksi ja aineosien liukenevuuden lisäämiseksi. Mikäli käytetään rakeista peroksidia, on mahdollista valmistaa jauheita ja/tai tabletteja useista tämän keksinnön mukaisista aineosista. Mikäli peroksidi on liuoksen muodossa, voi olla välttämätöntä käyttää toisesta lähteestä saatua entsyymiä sen pitkäaikaisen hajoamisen estämiseksi.

Toisenlaista energiapanosta voidaan käyttää liuoksen puhdistus- ja desinfiointitehon mahdollistamiseksi. Esimerkiksi ultraäänilaitteiden tiedetään lisäävän sitä nopeutta, jolla proteaasit toimivat esim. piilolinssejä puhdistettaessa. Lämmöllä voi myös määrästä ja ajasta riippuen olla tehostava vaikutus puhdistus- ja desinfiointitehoon.

Lämpötila ei luo rajoituksia esillä olevan keksinnön soveltamiselle lukuunottamatta niitä lämpötilan ääriarvoja, jotka

oleellisesti inaktivoisivat käytettyjen entsyymien proteolyyttistä toimintaa ennen kuin hyödyllinen proteiinilietteen hydrolyysi olisi saatu aikaan. Entsymaattinen toiminta on lämpötilan funktio joidenkin entsyymien ollessa huomattavasti epävakaampia kuin toiset lämpötilan ääriarvojen, etenkin lämmön nousun suhteen. Toiset entsyymit kestävät kuumuutta ja pysyvät merkittävän aktiivisina jopa 70°C tai sitä korkeammassakin lämpötilassa. Toiset entsyymit säilyttävät oleellisen aktiivisuutensa veden jäätymislämpötilassa tai juuri sen yläpuolella. Kun keksinnön soveltamisen suositeltava lämpötila-asteikko on $20 - 37^{\circ}\text{C}$, etenkin $22 - 25^{\circ}\text{C}$, voi kuitenkin olla mahdollista soveltaa keksintöä joidenkin peroksidiaktiivien entsyymien ollessa kyseessä $5 - 100^{\circ}\text{C}$ lämpötilassa.

Keksinnön yksi sovellutus on valmistaa entsyymistä ja peroksidista huoneenlämpöinen liuos, asettaa liuos ja piilolinssit linssien kuumadesinfiointiyksikköön ja antaa yksikön kulkea tavanomaisen kuumennuskierroksensa lävitse. Tämä on vain yksi esimerkki keksinnön eri lämpötiloja kestävästä luonteesta.

On myös tutkittu, että tietyt aineosat voivat valmistaa erikseen aineosan ajoitetun vapautumisen aikaansaamiseksi tai komponentin 1 ja komponentin 2 vuorovaikutuksen estämiseksi tabletti- ja jauhevalmistuksen ja myöhemmän säilytyksen aikana. Esimerkiksi voi joissakin tapauksissa olla tarkoituksenmukaista valmistaa erikseen peroksidi ja entsyymi siten, että niiden vuorovaikutus tabletointi- ja sitä seuraavassa säilytysvaiheessa saadaan vähennetyksi tai kokonaan estetyksi.

Lisäksi liuokset tai jauheet voivat sisältää aineosia jäännösperoksidin myrkyn ja lopulta jäännösperoksidin poistamiseksi osana kokonaispuhdistusta ja desinfiointia. Ent-

syymit, jotka katalysoivat peroksidien muuttumisen hapeksi ja vedeksi voidaan sisällyttää näihin koostumuksiin jäännösperoksidin poistamiseksi ennen kuin linssi laitetaan takaisin silmään. Esimerkiksi katalaaseja, orgaanisia entsyymejä, jotka katalysoivat peroksidien hajoamista, voidaan yhdistää tabletteihin ja jauheisiin, etenkin ajoitetusti vapautuvassa muodossa. Lisäksi voidaan metalleja, esim. raskasmetallisia siirtymäaineita, jotka katalysoivat peroksidin muuttumisen hapeksi ja vedeksi, sisällyttää jauhe- tai tablettikoostumukseen suositeltavasti jälleen hieman viivästyvässä vapautumismuodossa sellaisen menetelmän tuottamiseksi, joka alentaa liuoksessa tietyn ajanjakson jälkeen yhä olevan jäännösperoksidin myrkyttömälle tasolle. Siirtymämetallikatalyyttien käyttö peroksidien hajottamiseksi piilolinssien desinfiointiliuoksessa on esitetty US-patentissa 3 912 451, jonka tiedot ja tekniikka on sisällytetty viitteenomaisesti tähän hakemukseen aivan kuten se olisi kokonaan julkaistu hakemuksessa.

Seuraavat esimerkit on tarkoitettu kuvaamaan, mutta ei rajoittamaan, esillä olevan keksinnön mahdollisuuksia.

Esimerkki 1

Puhdistustehojen vertailu

Kaksikymmentä Hydrocurve® II, 55 % vesilinssiä (Barnes-Hind, Inc., Sunnyvale, California, USA) päällystettiin kuumadenturoidulla lysotsyymillä asettamalla linssit fosfaattipuskuroituun suolaliuokseen, johon sitten lisättiin riittävästi lysotsyymiä painon mukaan 0,1 % liuoksen aikaansaamiseksi; lysotsyymi oli peräisin munanvalkuaisesta. Yksittäisiin ampulleihin laitettiin kuhunkin 5 ml lysotsyymiliuosta ja yksi täysin hydratoitunut linssi. Ampulleja kuumennettiin sitten noin 30 minuutin ajan 95 asteessa C. Tämän jälkeen linssi poistettiin ja jäähtymisen jälkeen se huuhdottiin

tislatulla vedellä, jonka jälkeen sitä tarkasteltiin lysot-syymilietteen määrittämiseksi.

Kerrostumaluokittelu: Ensin linssi kostutettiin normaalilla suolaliuoksella, sitten sitä hangattiin peukalolla ja sormella, jonka jälkeen siihen tartuttiin reunoista muoviatuloilla ja se huuhdottiin jälleen suolaliuoksella. Linssin etummaista (kuperaa) pintaa tarkasteltiin mikroskoopilla 100-kertaisena suurennoksena. Näissä olosuhteissa havaittu kalvo tai kerrostuma luokiteltiin sen mukaan, kuinka suuri pinnan alue oli kalvon peittämä (%).

Ensimmäisessä kappaleessa kuvatun käsittelyn jälkeen kaikkien linssien etummaisen pinnan havaittiin olevan 100-prosenttisesti ohuen proteiinisakkakalvon peittämä.

Tämän jälkeen linssejä käsiteltiin peroksidia ja seuraavia entsyymikoostumuksia sisältävällä liuoksella:

Papaiinitabletti

<u>Aineosa</u>	<u>Prosentti (paino/paino)</u>
Natriumboraatti, dihydraatti	13,03 %
Natriumkarbonaatti	21,25 %
Polyetyleeniglykoli 3350	2,74 %
Papaiini	6,28 %
Viinihappo	13,71 %
L-kysteiini HCL	6,86 %
EDTA	5,04 %
Natriumkloridi	30,64 %

Subtilisiini A -tabletti

<u>Aineosa</u>	<u>Prosentti (paino/paino)</u>
Sorbitoli	29,99 %
N-asetyylikysteiini	22,49 %
Natriumkarbonaatti	38,98 %
Polyetyleeniglykoli 3350	3,00 %
Subtilisiini A	0,30 %
Viinihappo	5,24 %

Subtilisiini A oli saatu Novo Industries of Denmarkilta.

Linssit jaetaan neljään viiden linssin ryhmään. Ensimmäistä ryhmää käsiteltiin 3 % vetyperoksidilla. Toinen ryhmä käsiteltiin subtilisiini A:lla, joka sisälsi koostumuksen (133,4 mg, 0,4 mg subtilisiini A) 10 ml:ssa kaupallista suolaliuosta (Lensrins®, Allergan Pharmaceuticals Inc.:in valmistama ja myymä). Kolmas ryhmä käsiteltiin subtilisiini A -tabletille, joka liuotettiin 10 millilitraan 3 % vetyperoksidia, ja neljäs ryhmä käsiteltiin 3 % vetyperoksidilla (10 ml), joka sisälsi yhden papaiinitabletin (146,8 mg).

Linssien annettiin liota 3,5 tunnin ajan. Sitten kukin linssiryhmä käsiteltiin tarkoituksenmukaisesti koeliuoksen poistamiseksi, ja ryhmää tarkasteltiin mikroskoopilla proteiinipoiston suuruuden määrittämiseksi. Puhdistunut pinta vastasi prosenttimäärältään pintaa, joka ei 100-kertaisessa suurennoksessa ollut proteiinikalvon peitossa. Tulokset ovat nähtävissä jäljempänä.

Tulokset olivat seuraavat:

3 % vetyperoksidi ^{*)}

<u>Linssi</u>	<u>Puhdistunut pinta (%)</u>
A1	0
A2	1
A3	0
A4	0
A5	1

Subtilisiini A/suolaliuos Subtilisiini A/3 % H₂O₂ ^{*)}

<u>Linssi</u>	<u>Puhd.pinta (%)</u>	<u>Linssi</u>	<u>Puhd.pinta (%)</u>
B1	30	C1	50
B2	20	C2	60
B3	25	C3	70
B4	15	C4	60
B5	30	C5	50

Papaiini/3 % H₂O₂ ^{*)}

<u>Linssi</u>	<u>Puhdistunut pinta (%)</u>
E1	0
E2	0
E3	0
E4	0
E5	0

*) Oxysept® - 3 % vetyperoksidiliuos (markkinoi Allergan Pharmaceuticals, Inc.)

Vetyperoksidin ja papaiini/vetyperoksidin puhdistusteho oli miltei olematon; subtilisiini A yhdessä 3 % vetyperoksidin kanssa puhdisti 50 - 70 % piilolinssien pinnasta. Subtilisiini A ilman peroksidia puhdisti 15 - 30 % linssien pinnasta kun taas subtilisiini A yhdessä 3 % vetyperoksidin kanssa puhdisti 50 - 70 % linssipinnasta. Subtilisiini A ja peroksidi olivat yhdistelmänä puhdistusominaisuuksiltaan noin kaksi kertaa tehokkaampia kuin subtilisiini yksinään ilman peroksidia.

Esimerkki 2

Peroksidi/entsyymiaktiivisuus

15 Hydrocurve II® -linssiä (Barnes-Hind) asetettiin lysotsoymin alaiseksi, ja IV-tyyppisen proteiinin lietteen esiintyminen todettiin esimerkin 1 mukaisesti.

Viittä linssiä liotettiin kutakin 8 tuntia seuraavissa liuoksissa: 3 % vetyperoksidi (Oxysept 1, Allergan Pharmaceuticals Inc.); kaupallisesti saatavilla oleva pankreatiinia sisältävä entsyymitabletti (Opti-Zyme® -tabletit liotettiin 10 ml:aan suolaliuosta (Boil-'n-Soak®, tavallinen Alconin tuottama suolaliuos); ja pankreatiinientsyymiliuos (Opti-Zyme®), 2 tablettia 10 ml:ssa 3 % vetyperoksidia (Oxysept® 1).

8 tunnin liotuksen jälkeen linssejä käsiteltiin jäljellä olevan liotusliuoksen poistamiseksi, ja proteiinin poistomäärä (%) määriteltiin kuten esimerkissä 1. Tulokset olivat seuraavat:

3 % vetyperoksidiLinssi Puhdistunut pinta (%)

A1	0
A2	0
A3	0
A4	0
A5	0

Pankreatiini/peroksidiliuosPankreatiini/tavallinen
suolaliuosLinssi Puhd.pinta (%)Linssi Puhd.pinta (%)

B1	90
B2	85
B3	85
B4	90
B5	80

C1	0
C2	0
C3	0
C4	0
C5	0

Pankreatiinia sisältävän entsyymitabletin ja 3 % peroksidin yhdiste sai aikaan oleellisen puhdistumisen, kun taas peroksidilla yksinään ja entsyymillä yksinään ei ollut havaittavaa proteiinia poistavaa vaikutusta kokeessa käytettynä 8 tunnin liotusaikana.

Esimerkki 3Peroksidipitoisuuden vaikutus

Hydrocurve® -linssit päällystettiin lysotsyymillä kuten esimerkissä 1. Tässä kokeessa käytetty subtilisiinitabletti on koostumukseltaan samanlainen kuin esimerkissä 1 lukuunottamatta sitä, että N-asetyylikysteiniini poistettiin.

Kokeessa käytettiin viittä eri peroksidiarvoa alkaen 0,5 % paino/tilavuus-pitoisuudesta. Vertailukohtana oli tabletti, joka ei sisältänyt peroksidia ja jonka jänteveysarvo oli sovitettu vastaamaan suunnilleen 0,5 % natriumkloridia sisältävän peroksidi/entsyymiliuoksen jänteveysarvoa. pH sovitettiin 9,0 ja 9,03 välille jokaisessa suolahappoa sisältävässä liuoksessa. Viittä linssiä pidettiin huoneenlämmössä 10 ml:ssa kutakin liuosta kolmen tunnin ajan. Poistuneen proteiinin määrä (prosentteina) linssin pinnalta on nähtävissä taulukossa I.

Taulukko I

Peroksidipitoisuuden vaikutus puhdistustehokkuuteen

	Entsyymi- pitoisuus	pH	Jänteys	% Peroksidi paino/tilav.	% Linssi puhd.
A	0,04 mg/ml	9,025	318 mOsm/kg	0	9,0 (5,5)
B	0,04 mg/ml	9,086	330 mOsm/kg	0,5 %	44,0 (8,9)
C	0,04 mg/ml	9,016	390 mOsm/kg	1,0 %	78,0 (2,7)
D	0,04 mg/ml	9,022	643 mOsm/kg	1,5 %	87,0 (2,7)
E	0,04 mg/ml	9,023	796 mOsm/kg	2,0 %	94,0 (4,2)
F	0,04 mg/ml	9,016	932 mOsm/kg	2,5 %	97,0 (2,7)

Esimerkki 4

3 % vetyperoksidissa olevan subtilisiinin antimikrobisen toiminnan arviointi

Subtilisiini A:ta (esim. 1) sisältävän tabletoidun koostumuksen vaikutus vetyperoksidin antimikrobiseen toimintaan liuotettaessa subtilisiinia A 3 % vetyperoksidissa (Lensan A, Allergan Pharmaceuticals, Inc.) määriteltiin kokeellisesti USA:n elintarvike- ja lääkeaineministeriön vaatimalla

mikro-organismialustalla piilolinssiliuosten desinfiointi-
tehokkuuden arvioimiseksi. Kokeessa käytettiin vakio-
viljely-, tulostus- ja kvantitatiivista mikrobiologista
analyysitekniikka. Käytetyt organismit olivat:

S. marcescens, ATCC 14756 tai 14041; *S. aureus*, ATCC 6538;
P. aeruginosa, ATCC 9027 tai 15442; *E. coli*, ATCC 8739,
C. albicans, ATCC 10231 ja *A. niger*, ATCC 16404. 133,4 mg
subtilisiini A -tabletin esimerkin 1 mukaista koostumusta
(0,4 mg subtilisiinia/tabletti) käytettiin kokeessa.

Kokeen tulokset ovat nähtävissä taulukossa I.

Taulukko I

Ekstrapoloitujen D arvojen ^{*)} vertailu minuutissa

Organismit	<u>Koe I</u>		<u>Koe II</u>	
	3 % H_2O_2	3 % H_2O_2 + sub. A	3 % H_2O_2	3 % H_2O_2 + sub. A
<i>S. marcescens</i>	2,5	1,7	3,5	1,3
<i>S. aureus</i>	4,0	3,0	4,0	2,0
<i>P. aeruginosa</i>	0,3	0,5	0,3	0,1
<i>E. coli</i>	2,5	0,9	1,7	0,2
<i>C. albicans</i>	36,5	13,0	15,0	9,0
<i>A. niger</i>	9,5	11,6	6,0	6,0

^{*)} D-arvo on se aika, joka tarvitaan mikrobisen kuorman
 5×10^5 organismia/ml vähentämiseen 90 % tai 1
logaritmillä.

Vertailukohta, suolaliuoksessa oleva entsyymitabletti ei osoittanut minkäänlaista antimikrobista toimintaa 24 tunnin jakson aikana.

Suoritettiin toinen, ensimmäisen kaltainen koe. Tulokset ovat myös nähtävissä taulukossa I.

Taulukossa II ovat nähtävissä taulukon I aineille lasketut keskiarvoiset bakteerien tuhoamisarvot.

Taulukko II

Huoneenlämmössä minuutissa tapahtuvien tuhoutumisarvojen (D-arvojen) keskiarvo

Organismit	3 % H_2O_2	3 % H_2O_2 /sub. A
S. marcescens	3,0	1,5
E. coli	2,1	0,6
P. aeruginosa	0,3	0,3
S. aureus	4,0	2,5
C. albicans	26,0	11,0
A. niger	8,0	9,0

Mitä alhaisempi D-arvo, sitä tehokkaampi antimikrobinen toiminta on. Kukin näistä kokeista osoittaa, että 3 % vetyperoksidi ja subtilisiini A yhdessä ovat oleellisesti tehokkaampi desinfiointikoostumus kuin jos kumpikin aine toimisi erikseen.

Esimerkki 5Suojatehokkuuden määrittely

Kolmea organismialustaa käytettiin määrittämään ero 3 % vetyperoksidin (Oxysept I, Allergan Pharmaceuticals, Inc.) ja subtilisiini A:ta sisältävän 3 % vetyperoksidin ekstrapoloitujen D-arvojen välillä. Ensimmäinen organismialusta perustuu USP XXI-levyyn, toinen sisältää FDA:n vaatimia tuotteita piilolinssien desinfiointiaineiden antimikrobisen tehokkuuden määrittämiseksi ja kolmas levy on valikoituja organismeja sisältävä levy; näitä organismeja pidetään joko ihmisruumiin tai ympäristön luonnolliseen kasvistoon kuuluvina ja niitä voidaan laskea piilolinssisiin tai ruiskuttaa piilolinssiliuoksiin. Kokeessa käytetyt organismit ovat nähtävissä liitteenä olevissa taulukoissa.

Mikro-organismit valmistettiin normaaleilla mikrobiologisilla tekniikoilla. Jokainen näyte tutkittiin kahdesti. Kokeen ensimmäisessä vaiheessa 10 ml 3 % vetyperoksidia laitettiin pipetillä kierrekorkkisiin koeputkiin. Valikoituihin putkiin lisättiin 1 subtilisiini A -tabletti, jonka koostumus on sama kuin esimerkissä 1. Subtilisiinia sisältäviä putkia ravistettiin noin 2 minuutin ajan subtilisiini-tabletin liuottamiseksi. Heti tämän jälkeen vastaorganismi lisättiin koeputkeen. Ennalta määritetyn ajanjakson jälkeen yhä elossa oleva proteiini määriteltiin CFU/ml:aa kohti.

D-arvo laskettiin ekstrapoloinnin avulla tuhoutumiskäyristä käyttämällä aerobista alustalaskumenetelmää. Tämä menetelmä toimii oleellisesti seuraavasti: puolet testiliuoksesta poistettiin välittömästi ennalta määritellyn ajanjakson jälkeen, jaettiin kahtia ja jaettiin sen jälkeen kahteen neutralisoivaa ainetta sisältävään koeputkeen. Neutralisoivan aineen kymmenkertaisia laimennoksia valmistettiin siten, että ne tasapainottivat odotetun tulostason. Alhai-

sessä tulosasteessa pieni määrä liuosta siirrettiin suoraan neutralisoivalle agar-agar-alustalle. Kolmen seuraavan laimennosputken kohdalla sama näytemäärä asetettiin neutralisoivalle agar-agar -alustalle. Kaikkia alustoja pidettiin lämpökaapissa 35 - 37 asteessa C 2 - 7 päivää tai tarvittaessa pidempään. Bakteerirykelmät määriteltiin tämän jälkeen ja D-arvot laskettiin seuraavasti: kunkin aikavälin alustalaskelmista otettiin keskiarvo. Keskiarvotieto esitettiin graafisesti puolilogaritmipaperilla, jossa eloonjääneet bakteerit kuvattiin Y-akselille ja kosketuksissa oloaika X-akselille. Alkupiste (inoculum-taso) yhdistettiin suoralla viivalla pisteeseen, jossa oli vähemmän kuin 10 organismia millilitraa kohden. Käyrän jyrkkyys ekstrapoloituna nolnaan ilmaisee D-arvon. Tätä voidaan myös kutsua "päätepisteanalyysiksi".

Taulukko III

3 % vetyperoksidin (Oxysept I) ekstrapoloidut bakteerien tuhoamisarvot

D-arvot ilman subtilisiinia ja sen kanssa

Organismi ja tunnusnumero	Ilman subtilisiinia	Subtilisiinin kanssa
(1) USP XXI -alusta		
Serratia marcescens, ATCC 14756	1,4 min.	1,0 min.
Staphylococcus aureus, ATCC 6538	3,4 min. 3,2 min.	2,1 min. 2,6 min.
Pseudomonas aeruginosa, ATCC 9027	0,2 min.	0,2 min.

Escherichia coli,		
ATCC 8739	1,0 min.	0,3 min.
Candida albicans,		
ATCC 10231	20,0 min.	13,0 min.
Aspergillus niger,		
ATCC 16404	10,0 min.	8,0 min.

(2) "Pehmeä linssi" -alusta (FDA)

Serratia marcescens,		
ATCC 14041	1,7 min.	1,5 min.
Staphylococcus epidermidis,		
ATCC 17917	0,8 min.	1,5 min.
	0,4 min.	1,0 min.
Pseudomonas aeruginosa,		
ATCC 15442	0,6 min.	0,3 min.
Aspergillus fumigatus,		
ATCC 10894	13,5 min.	2,5 min.
Candida albicans,		
ATCC 10231	20,0 min.	13,0 min.

(3) Eri organismeja

Klebsiella pneumoniae,		
ATCC 13883	1,1 min.	0,6 min.
Pseudomonas cepacia,		
ATCC 17765	0,4 min.	0,2 min.
Proteus mirabilis		
CSULB/VA	1,2 min.	1,0 min.
	1,3 min.	0,9 min.
Proteus vulgaris,		
ATCC 17313	0,4 min.	0,3 min.
Candida parapsilosis,		
PM 4064	63,0 min.	55,0 min.
Penicillium sp.,		
(AquaTar isolate II)	2,5 min.	2,1 min.

Esimerkki 6Peroksidin ja peroksidia sisältävän entsyymin tehokkuuden lisääntymisen vertailu

Eri 3 % vetyperoksidiliuosten subtilisiinientsyymin lisäämisestä johtuva antimikrobisen bakteerien tuhoamistoiminnan lisäys. Taulukon IV luvut edustavat prosentteina sellaisten eri peroksidiliuosten D-arvon laskua, joihin oli lisätty esimerkin 1 mukainen subtilisiinitabletti verrattuna pelkän peroksidiliuoksen käyttöön. AO-Septin kohdalla käytettiin raskasmetallikatalyyttia (platinalla päällystettyä levyä) ampulleissa alentamassa peroksidia kuten US-patentissa 3 912 451.

Taulukko IV

Organismi	Lensan A (taulukon II tiedot)	Oxysept I (taulukon III tiedot)	AO-Sept
<i>Serratia marcescens</i>	50 %	29 %	88 %
<i>Escherichia coli</i>	71 %	70 %	90 %
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0 %	0 %	20 %
<i>Staphylococcus aureus</i>	38 %	28 %	60 %
<i>Candida albicans</i>	58 %	35 %	33 %
<i>Aspergillus niger</i>	0 %	20 %	32 %

Luvut osoittavat, että kukin 3 % vetyperoksidiliuos on paljon tehokkaampi desinfiointiaine silloin, kun subtilisiini A on mukana yhdisteessä. Vaikutus on etenkin huomattavissa AO-Septin kohdalla.

Esimerkki 7Peroksidipitoisuuden vaikutus entsyymitoimintaan

Esimerkissä 1 kuvatus subtilisiini A -tabletin ja trypsiinin entsyymaattinen toiminta määritettiin eri vetyperoksidi-pitoisuuksissa käyttämällä muunneltua Azocollin menetelmää (Sigma Catalog). Kokeessa käytettiin Baker Chemical Companyn 3 % vetyperoksidia. Tarkoituksenmukaiset laimennokset tehtiin 0,02 M boraattipuskurointiaineella pH:n ollessa n. 8,4. Azocollin substraatti ja trypsiini saatiin Sigma Corporationilta.

Peroksidi laimennettiin ensin puskurointiaineen avulla tarkoituksenmukaisiin pitoisuuksiin. Yksi subtilisiini-entsyymitabletti liuotettiin 10 ml:aan puskuriainetta, johon oli lisätty 50 mg Azocoll-substraattia. 1 ml tätä liuosta lisättiin sitten kuhunkin peroksidipitoisuuteen entsyymi/substraattipuskuriaineen toimiessa vertailukohtana. Sekoittamisen jälkeen reaktion annettiin tapahtua huoneenlämmössä 2 minuutin ajan, jonka jälkeen liuos jäähdytettiin 2 ml:lla entsyymin saostavaa 10 % trikloorietikkahappoa. Jäljelle jääneet värimittaukset suoritettiin 520 nm:stä. Subtilisiinitulokset ovat nähtävissä taulukossa IV, trypsiinitulokset taulukossa V.

Taulukko IVVetyperoksidin subtilisiinitoiminta

$\frac{\% \text{ H}_2\text{O}_2}{2}$	OD 520
0	0,27
1	0,39
2	0,57
3	0,56

4	0,66
4,5	0,56
5	0,68
6	0,68
8	0,90
30	0,91

Taulukko V

*) Trypsiinin toiminta vetyperoksidissa

% H ₂ O ₂	OD 520
---------------------------------	--------

03	0,5
30	0,6

*) 10 mg trypsiinijauhetta lisättiin H₂O₂:een.

Taulukko IV osoittaa, että subtilisiini A on aktiivinen Azocollin kokeessa monissa eri peroksidipitoisuuksissa. Toiminta 30 % vetyperoksidissa oli suunnilleen sama kuin 8 % pitoisuudessa. Subtilisiini A:n entsyymitoiminta näyttää saturoituneen 2 - 6 % vetyperoksidipitoisuuksissa. Taulukko V osoittaa, että trypsiini on aktiivinen vetyperoksidissa.

Esimerkki 7

Perboraattien vaikutus entsyymitoimintaan

Hydrocurve II® -linssit päällystettiin kuumadenaturoidulla lysotsyymillä kuten esimerkissä 1. Seuraavat subtilisiini A:han (Novo Industries, Tanska) ja natriumperboraattiin perustuvat liuokset valmistettiin peroksidin lähteenä

toimivan perboraatin yhdistetyn vaikutuksen toteamiseksi subtilisiini A:n proteolyyttiseen toimintaan. Liuos A - 0,04 mg/ml subtilisiini A:ta, bikarbonaattipuskuriainetta pH:n sovittamiseksi 8,307:ään; liuos B - 0,02 % (paino/tilavuus) natriumperboraattia, bikarbonaattipuskuriainetta, pH 8,533; ja liuos C - 0,04 mg/ml subtilisiini A:ta , 0,02 % (paino/tilavuus) natriumperboraattia, bikarbonaattipuskuriainetta, pH 8,532. Jokainen käsittely oli tilavuudeltaan 10 ml.

Viittä proteiinillä päällystettyä linssiä liotettiin kussakin liuoksessa (10 ml) 3 tunnin ajan huoneenlämmössä. Tämän jälkeen kaikki linssit huuhdottiin ja jäljelle jääneen proteiinin määrä määritettiin. Taulukko VI osoittaa puhdistuneen pinnan keskiarvon käsittelyn jälkeen.

Taulukko VI

Entsyymien puhdistustehon vertailu peroksidin kanssa ja ilman peroksidia

Keskiarvo %	
Liuos	Puhdistettu pinta
A	9,0 $\pm$ 5,6
B	0
C	30,0 $\pm$ 12,2

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä piilolinssien samanaikaiseksi puhdistamiseksi ja desinfioimiseksi, t u n n e t t u siitä, että menetelmään kuuluu piilolinssien saattaminen kosketuksiin liuoksen kanssa, joka sisältää oleellisesti desinfioivan määrän peroksidia ja tehokkaan määrän peroksidiaktiivista proteolyyttistä entsyymiä riittävän pitkäksi ajaksi niin, että oleellisesti kaikki proteiiniliete saadaan poistetuksi ja linssit desinfioituiksi.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että entsyymiä on liuoksessa 0,0001 - 0,5 Anson-yksikköä millilitraa kohti ja että peroksidi on vetyperoksidia, jota on liuoksessa 0,05 - 10 % paino/tilavuuden mukaan.
3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että liuos on puskuroitu 6 - 10 pH-arvon välille.
4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että proteolyyttinen entsyymi on subtilisiini, pankreatiini tai trypsiini ja että sitä on liuoksessa 0,0003 - 0,05 Anson-yksikköä millilitraa kohti.
5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että liuoksessa on 3 % vetyperoksidia ja 0,0012 Anson-yksikköä subtilisiini A:ta millilitraa kohti.
6. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että peroksidi on perboraatin, persulfaatin tai perkarbonaatin suola, diperisoftaalihappo, peroksidifosfaatti tai alumiiniaminohydroperoksidisuola.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, t u n n e t -
t u siitä, että entsyymiä on liuoksessa 0,0001 - 0,5 Anson-
yksikköä millilitraa kohti ja että peroksidia on 0,02 %
paino/tilavuuden mukaan tai enemmän.

8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen menetelmä, t u n n e t -
t u siitä, että liuos on puskuroitu 6 - 10 väliseen pH-
arvoon.

9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen menetelmä, t u n n e t -
t u siitä, että proteolyttinen entsyymi on subtilisiini,
pankreatiini tai trypsiini ja että sitä on liuoksessa
0,0003 - 0,05 Anson-yksikköä millilitraa kohti.

10. Patenttivaatimuksen 9 mukainen menetelmä, t u n n e t -
t u siitä, että peroksidi on natriumperboraatti, kalium-
persulfaatti, natriumperkarbonaatti, diperisofthaalihappo,
peroksidifosfaattisuola tai natriumalumiiniaminohydro-
peroksidi ja että entsyymi on subtilisiini A, jota on
liuoksessa 0,0012 Anson-yksikköä millilitraa kohti.

11. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t -
t u siitä, että liuos on valmistettu yhdistämällä entsyymi
ja peroksidi silloin kun linssit ovat kosketuksissa liuoksen
kanssa.

12. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, t u n n e t -
t u siitä, että liuos on valmistettu liuottamalla kuiva
peroksidi ja kuiva entsyymi vesipitoiseen liuokseen.

13. Patenttivaatimuksen 12 mukainen menetelmä, t u n -
n e t t u siitä, että entsyymi ja peroksidi on yhdistetty
jauheen tai tabletin muotoon.

14. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t -
t u siitä, että piilolinsseillä on hydrofiilinen pinta.

15. Patenttivaatimuksen 14 mukainen menetelmä, t u n -
n e t t u siitä, että peroksidiaktiivinen proteolyyttinen
entsyymi on subtilisiini.

16. Patenttivaatimuksen 15 mukainen menetelmä, t u n -
n e t t u siitä, että entsyymi on subtilisiini A.

17. Patenttivaatimuksen 14 mukainen menetelmä, t u n -
n e t t u siitä, että peroksidi on vetyperoksidi, jonka
määrä on 0,02-10 % painon/tilavuuden mukaan.

18. Patenttivaatimuksen 17 mukainen menetelmä, t u n -
n e t t u siitä, että vetyperoksidin määrä on noin 3 %
painon/tilavuuden mukaan.

19. Patenttivaatimuksen 14 mukainen menetelmä, t u n -
n e t t u siitä, että peroksidiaktiivinen proteolyyttinen
entsyymi on subtilisiini A ja että peroksidi on vetyperok-
sidi.

Patentkrav

1. Förfarande för samtidig rengöring och desinficering av kontaktlinser, **kännetecknat** av att förfarandet innefattar att man för kontaktlinserna i kontakt med en lösning innefattande en väsentligt desinficerande mängd peroxid och en verksam mängd peroxidaktivt proteolytiskt enzym under tillräcklig tid för att avlägsna väsentligen alla proteinavlagringar och för att desinficera linserna.

2. Förfarande enligt patentkravet 1, **kännetecknat** av att enzymet är närvarande i lösningen i en mängd mellan 0,0001 och 0,5 Anson-enheter per ml och att peroxiden är väteperoxid, som är närvarande i lösningen i en mängd mellan 0,05 och 10 vikt/volym-%.

3. Förfarande enligt patentkravet 2, **kännetecknat** av att lösningen har buffrats till ett pH mellan 6 och 10.

4. Förfarande enligt patentkravet 3, **kännetecknat** av att det proteolytiska enzymet är subtilisin, pankreatin eller trypsin och att det är närvarande i lösningen i en mängd mellan 0,0003 och 0,05 Anson-enheter per ml.

5. Förfarande enligt patentkravet 4, **kännetecknat** av att lösningen innefattar 3 % väteperoxid och 0,0012 Anson-enheter per ml subtilisin A.

6. Förfarande enligt patentkravet 1, **kännetecknat** av att peroxiden är saltet av ett perborat, persulfat eller perkarbonat, diperisoftalsyra, peroxidifosfat eller ett aluminiumaminohydroperoxidsalt.

7. Förfarande enligt patentkravet 6, **kännetecknat** av att enzymet är närvarande i lösningen i en mängd mellan 0,0001 och 0,5 Anson-enheter per ml och att peroxiden är närvarande i en mängd av 0,02 vikt/volym-% eller mer.

8. Förfarande enligt patentkravet 7, **kännetecknat** av att lösningen har buffrats till ett pH mellan 6 och 10.
9. Förfarande enligt patentkravet 8, **kännetecknat** av att det proteolytiska enzymet är subtilisin, pankreatin eller trypsin och att det är närvarande i lösningen i en mängd mellan 0,0003 och 0,05 Anson-enheter per ml.
10. Förfarande enligt patentkravet 9, **kännetecknat** av att peroxiden är natriumperborat, kaliumpersulfat, natriumperkarbonat, diperisoftalsyra, peroxidifosfatsalt eller natriumaluminiumaminohydroperoxid och att enzymet är subtilisin A som är närvarande i lösningen i en mängd av 0,0012 Anson-enheter per ml.
11. Förfarande enligt patentkravet 1, **kännetecknat** av att lösningen har framställts genom att förena enzymet och peroxiden vid den tidpunkt då linserna är i kontakt med lösningen.
12. Förfarande enligt patentkravet 6, **kännetecknat** av att lösningen har framställts genom att upplösa en torr peroxid och ett torrt enzym i en vattenhaltig lösning.
13. Förfarande enligt patentkravet 12, **kännetecknat** av att enzymet och peroxiden har förenats i form av ett pulver eller en tablett.
14. Förfarande enligt patentkravet 1, **kännetecknat** av att kontaktlinserna har en hydrofil yta.
15. Förfarande enligt patentkravet 14, **kännetecknat** av att det peroxidaktiva proteolytiska enzymet är subtilisin.
16. Förfarande enligt patentkravet 15, **kännetecknat** av att enzymet är subtilisin A.

17. Förfarande enligt patentkravet 14, kännetecknat av att peroxiden är väteperoxid som är närvarande i en mängd av 0,02-10 vikt/volym-%.

18. Förfarande enligt patentkravet 17, kännetecknat av att väteperoxiden är närvarande i en mängd av cirka 3 vikt/volym-%.

19. Förfarande enligt patentkravet 14, kännetecknat av att det peroxidaktiva proteolytiska enzymet är subtilisin A och att peroxiden är väteperoxid.