



SUOMI-FINLAND
(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(B) (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLAGGNINGSSKRIFT

87232

C (45) Patentti julkaisu
Patent publicat 10 10 1988

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

C 12N 9/20, A 61K 35/12, 37/54

(21) Patenttihakemus - Patentansökning	874038
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	16.09.87
(24) Alkupäivä - Löpdag	16.09.87
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	18.03.88
(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	31.08.92
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	
17.09.86 FR 8612996 P	

(71) Hakija - Sökande

1. Jouveinal S.A., Tour Maine Montparnasse, 33, Avenue du Maine, 75755 Paris Cedex 15,
France, (FR)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Moreau, Herve, 18, Traverse Jean-Andre, 13008 Marseille, France, (FR)
2. Verger, Robert, 230 Avenue Panouse, 13009 Marseille, France, (FR)
3. Lecat, Daniel, 65, rue du Javelot, 75013 Paris, France, (FR)
4. Junien, Jean-Louis, 36 Avenue Eiffel, 92310 Sevres, France, (FR)

(74) Asiamies - Ombud: Oy Kolster Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä lipaasiuutteiden ja lipaasin valmistamiseksi
Förfarande för framställning av lipasextrakt

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

FR B 6622 (A 61K // C 07G, Brevet special de medicament, p. 2, oik. palsta, p. 3 vaat.),
GB A 2142337 (C 12N 9/20), GB B 1139991 (A 61K 3/46), US A 3256150 (424-94),
WO A 86/01532 (C 12N 15/00),
Chemical Abstracts, vol. 97 (1982), 124832v

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö koskee ruoansulatuslipaasin valmistusmenetelmää. Kaniinien ja hevosten vatsalaukuille suoritetaan uuttaminen happamassa vesipitoisessa väliaineessa, lipaasiuute suolataan ulos lisäämällä vesiliukoista suolaa, minkä jälkeen suoritetaan suodatus molekyyliseulalla ja ioninvaihtokromatografinen erotus, talteen otetaan eluointifraktio, joka sisältää lipaasin.

Keksinnön mukaista tuotetta voidaan käyttää lääkeaineena rasva-aineiden huonoa absorptiota parantamaan.

Uppfinningen avser ett förfarande för framställning av gastriskt lipas. Magar av kaniner eller hästar underkastas extraktion medelst ett surt vattenmedium, lipasextraktet saltas ut genom tillsättning av vattenlösliga salt, varefter följer filtrering medelst en molekyylärsil och separation under användande av jonbytkromatografi och en eleuerad fraktion, vilken innehåller lipaset, uppsamlas.

Produkten enligt uppfinningen kan användas som läkemedel vid bekämpningen av otillfredsställande absorption av fettämnen.

Menetelmä lipaasiuutteiden ja lipaasin valmistamiseksi

Keksintö koskee menetelmää lipaasiuutteiden ja lipaasin valmistamiseksi, jotka ovan stabiileja, aktiivisia tuotteita väliaineissa, jotka ovat happamia tai lähes neutraaleja.

Lipaaseja, jotka ovat hydrolaaseihin liittyviä entsyymejä, esiintyy niinkin erilaisissa organismeissa kuten bakteereissa, sienissä, kasveissa ja eläimissä. Niiden merkitys elävän aineen toiminnoissa havaittiin noin vuonna 1900 tutkittaessa ruoansulatusilmiötä. Niiden toiminta on osoittautunut oleelliseksi assimiloitaessa rasva-aineita, jotka muodostavat tärkeän energialähteen ihmisten ja eläinten ruoassa. Tämän seurauksena niiden ominaisuuksia on käytetty hoidollisiin tarkoituksiin.

Lukuisia tutkimuksia on suoritettu ihmisellä ja yleisesti nisäkkäillä. Ne ovat osoittaneet näiden entsyymien oleellisen katalyyttisen toiminnan ruoansulatuksen aikana, jolloin ne erityisesti liittyvät emulgoitujen tai emulgoimattomien rasvojen hydrolysointiin. Viimeksi mainitut muodostuvat pääasiassa estereistä, jotka on muodostettu erilaisen molekyyllipainon omaavista rasvahapoista ja monofunktionaalisisista tai polyfunktionaalisisista alkoholeista kuten glyserolista, kun kyseessä ovat triglyseridit. Näiden entsyymaattisten systeemien puuttuminen tai epätäydellisyys on usein havaittu huonossa absorptiossa, jonka välillä vakavat seuraukset saattavat johtaa merkittäviin painon alentumisiin ja ilmeisiin ruokahaluttomuustiloihin. Ihmisellä nämä tilat, joita voi esiintyä sekä nuorilla lapsilla että aikuisilla, ovat antaneet aiheutta käyttä hoidossa ulkopuolisia entsyymaattisia systeemejä korvaamassa näillä potilailla luonnostaan esiintyvää lipaasivajetta. Käytettyjä koostumuksia varten tarvitaan niiden

uuttamista varten sellaisia eläinten elimiä, joiden lipaasieritys on havaittu ja jotka tavallisesti toimivat organismissa assimiloimassa rasvoja. Nämä elimet sijaitsevat erilaisilla tasoilla suu-vatsa-suoli -alueella, useimpien laajemmin tunnettujen ollessa peräisin suun ontelosta ja haimasta.

Nisäkkäiden suuontelon eritteet sisältävät siten entsyymejä, jotka voivat hydrolysoida rasvahappoestereitä. Nämä ovat vatsaa edeltäviä esteraaseja ja "suu"lipaaseja, jotka eroavat toisistaan vain niiden aktiivisuuden kapasiteetin suhteen hydrolysoitaville tai ei-hydrolysoitaville aineille. Nämä entsyymit ja niiden ominaisuudet muodostavat pääasiallisen kohteen lukuisissa töissä, jotka ovat koonneet yhteen J.H. Nelson et al. (Journal of Dairy Science, 1976, 60(3), sivut 327-362).

Niiden läsnäolo ja niiden käyttökelpoisuus on erityisesti osoitettu vieroittamattomilla nuorilla eläimillä. Seurauksena on suuresti lisääntynyt sellaisten vatsaa edeltävien esteraasien markkinointi, jotka on saatu vasikoista, kileistä ja karitsoista. Näitä tuotteita, jotka ensin olivat nestemäisten uutteen muodoissa ja sitten konsentroituna jauheina, käytetään yleisesti eläinlääketieteessä hoidettaessa vasikoiden ripulia ja myös ihmislääketieteessä kuten esitetään US-patentissa 3 256 150, jossa esitetään menetelmä, jolla hoidetaan huonon absorption oireyhtymä antamalla koostumusta jauhemaisessa muodossa suun kautta. Tämä koostumus sisältää osittain syötäviä kudoksia, jotka on otettu vieroittamattomien eläinten suuontelosta ja vielä erityisemmin vasikalta, kileiltä ja karitsoilta otettuja kieliä ja viereisiä kudoksia. Viimeksi esitetyllä käytöllä ei ole vaikuttanut olevan suurta menestystä mahdollisesti aiheutuen siitä, että on vaikea kerätä suuria määriä elimiä, jotka on otettu nuorten eläinten kustannuksella, jotka on tarkoitettu ruoaksi ja jotka eivät vielä ole kehittyneet taloudellisesti käyttökelpoiseen kokoon.

Jotta voitaisiin vapautua näistä käytännön ja taloudellisuuden aiheuttamista ongelmista, esitetään GB-patentissa 2 142 337 rotan tai ihmisen kielilipaasi lipaasin vajavuuden hoitamista varten. Nämä entsyymit on valmistettu geeniteknologian avulla.

Pohjukaissuolen tasolla on haimanesteen lipaaseilla myös hyvin merkittävä aktiivisuus sulatettaessa osittain hajotettua tai hajottamatonta rasva-ainetta. Siten haiman entsyymierityksen vajavuus voi johtaa huonoon absorptioon, joka rasva-aineiden kohdalla johtaa toisinaan poikkeamiin hajottamisessa ja tällaisten aineiden assimiloitumisessa. Ihmisellä suun kautta annosteltavia haiman korvaavia lääkaineita on markkinoitu koostumuksena, joka perustuu sellaisten eläinten haimoihin (joiden ruoka on samanlaista kuin ihmisellä), kuten sialla tai joilla on kasvissyöjätyyppinen ruoka kuten nautakarjalla. Kuitenkin tällaisten entsyymien ominaisuuksien tutkiminen, jota on suorittanut erityisesti Gunter Gordes 1973, on osoittanut tällaisten hoitojen arveluttavuuden. Näiden elinten entsyymaattiset systeemit nopeasti tuhoutuvat tai deaktivoituvat happamassa väliaineessa 37°C:ssa ja siten ne eivät voi taata niiden aktiivisuutta vatsaan siirtymisen jälkeen. On ehdotettu liuoksia näiden lääkeaineiden aktiivisuuden säilyttämistä varten. GB-patentti 1 139 991 esittää koostumuksen, jossa on haiman entsyymejä yhdessä suolojen kanssa, joilla on happamuutta estävää vaikutusta ja joiden tehtävänä on säilyttää entsyymien ominaisuuksia siirron aikana pienentämällä luonnollista vatsan happamuutta. Identtisen menetelmän ovat esittäneet Regan P.T. et al. (1978), Hubbard V.S. et al. (1980) ja Gon P. Bradbear et al. (1981), käyttäen H₂-reseptori-antagonistisia yhdisteitä kuten simetidiiniä.

Lisäksi on tehty yrityksiä säilyttää entsyymien aktiivisuus päällystämällä lääkeaineet vatsalaukkuja kestäväällä kalvolla, joka liukenee suolessa ja vapauttaa aktiiviset osat pohjukaissuolessa, tai vielä yleisemmin liittämällä ne mikrohiukkasiin, joiden halkaisija on noin 3 mm.

Nämä liuokset ovat vain lievittäviä ja ne aiheuttavat sivuvaikutusten riskin potilaalla tai ovat vaikutukseltaan epävarmoja.

Siten haimasairaudet vaativat usein pitkään kestävä hoitoa, jonka aikana aiheutettu vatsalaukun happamuu-

5 den alentaminen voi aiheuttaa paikallisen bakteerien vastustuskyvyn alenemisen ja niiden nopean lisääntymisen, kuten esittävät Weber A.M., 1982 ja jonka seuraukset ovat vakavia mikäli kyseessä on ruokamyrkytys.

10 Tuotteiden päällystämällä ei voida taata täyttäkäyttöturvallisuutta tietyissä tapauksissa kuten haiman vajaatoiminnassa, jossa epäsäännöllisiä pH-arvoja on havaittu vatsa-suoli-alueella ja jossa joskus on epätavallisia happotasoja, jotka eivät sovi yhteen vatsalta suoja-

15 van kalvon halutussa pisteessä tapahtuvan liuotuksen kanssa.

On tutkittu myös lipaasiaktiivisuuden läsnäoloa erilaisten eläinlajien vatsan sisällössä. Tämän aktiivisuuden alkuperä on kauan ollut kiistan alaisena ja sen on arveltu aiheutuvan joko suun eritteiden siirtymisestä syljen mukana

20 tai haimanesteiden pohjukaissuolipalautumisesta. Kuitenkin Fink C.S., et al. (Am. J. Physiol., 1985, 248, sivut 68-72) ovat esittäneet kaniinin ruoansulatusrauhasia hajottamalla lipaasiaktiivisuuden, jonka vaikutus on suurimmillaan pH:ssa 5,8-6,1. Chemical Abstracts, Vol. 97, no 15, 11.10.1982,

25 s. 477, no 1248320, Columbus, Ohio, USA, viittaa lipolyytiseen aktiivisuuteen vatsan tasolla vieroitettussa tai vieroittamattomassa nuoressa kaniinissa. Tämä aktiivisuus saavuttaa suurimman tehokkuutensa pH-arvolla 7. Patenttihakemus WO 86/01532 esittää sellaisen proteiinin valmistamisen geeniteknologialla, joka vastaa ihmisen vatsan li-

30 paasia ja on käyttökelpoinen hoidettaessa tapauksia, joissa on kyseisen entsyymin vajausta.

Tutkimus, joka on suoritettu lipaaseilla ja niiden käyttöyritykset osoittavat selvästi näihin entsyymeihin

35 liittyvän merkityksen ja vaikka niiden läsnäolo on esitetty tietyissä elimissä ja eritteissä nisäkkäillä ja vaikka

on havaittu niiden merkitys assimiloitaessa rasva-aineita organismissa, ei tähän mennessä ole esitetty lipaasia tai lipaasikoostumusta, joilla olisi teknisesti ja taloudellisesti käyttökelpoinen valmistusmenetelmä ja jotka vastikkeeksi takaisivat kyseisen rasva-aineen assimiloitumisen ja erityisesti triglyseridien assimiloitumisen suuvatsa-suoli-alueella.

Esillä oleva keksintö muuttaa tilanteen esittämällä lipaaseja ja lipaasiuutteita, joiden aktiivisuus ei muutu happamassa väliaineessa ja jotka tehokkaasti hydrolysoivat triglyseridejä väliaineessa, jonka pH on välillä 3-7, siis väliaineessa, jonka happamuus on verrattavissa happamuuteen, joka esiintyy suu-vatsa-suoli-alueella. Sitä verrattuna aikaisempiin tuotteisiin, on keksinnön mukaisesti valmistetuilla tuotteilla kieltämättä se etu, erityisesti hoidossa, että ne pystyvät luotettavasti takaamaan sulatuksen aikana triglyseridien hydrolyysin suunontelon ja pohjukaissuolen välillä samalla kun ne valmistetaan raaka-aineista, joita on helposti saatavissa suurina määrinä ja halvalla hinnalla.

Esillä oleva keksintö koskee menetelmää lipaasiuutteiden tai lipaasin valmistamiseksi. Menetelmälle on tunnusomaista, että

a) lipaasiuutteen saamiseksi saatetaan täysikavuisen hevosen tai kaniinin mahanpohjukoita kosketukseen happaman vesiväliainen kanssa, jonka pH on 1,5-5, määränä 10 tilavuusosaa hapanta väliainetta 1 pohjukan paino-osaa kohti lämpötilassa 4-30 °C 1 minuutista 15 tuntiin kestäväksi ajaksi, jolloin saadaan kiinteitä aineita ja vesipitoinen liuos, joka sisältää lipaasiosan,

erotetaan vesipitoinen liuos kiinteistä aineista, jolloin saadaan erillinen vesipitoinen liuos,

lisätään erilliseen vesipitoiseen liuokseen sopiva määrä vesiliukoista suolaa ja annetaan olla siinä sopiva aika, jotta halutusta lipaasiuutteesta muodostuu suola ja jotta saadaan pinnalla oleva liuos, ja

erotetaan haluttu lipaasiuute pinnalla olevasta liuoksesta ja otetaan se talteen;

b) suolasta vapautetun lipaasiuutteen saamiseksi liuotetaan lipaasiuute vesipitoiseen faasiin, suodatetaan vesipitoinen faasi käyttäen kalvoa, jonka läpäisyraja on 5 000-10 000 daltonia, jolloin saadaan suolasta vapautetun lipaasiuutteen liuos, ja lyofilisoidaan suolasta vapautettu lipaasiuute-liuos suolasta vapautetuksi lipaasiuutteenksi;

c) delipidoidun lipaasiuutteen saamiseksi suoritetaan delipidointitoimenpide jollekin kiinteistä osista, jotka sisältävät lipaasiuutteen, joka on saatu mahanpohjukasta, lipaasiuuttelelle ja suolasta vapautetulle lipaasiuuttelelle;

d) ei-delipidoidun, rikastetun lipaasiuutteen saamiseksi,

liuotetaan lipaasiuute puskuriin, jonka pH on 2-7, jolloin saadaan puskuroitu liuos,

kromatografoidaan puskuroitu liuos, jonka pH on 2-7, käyttäen molekyyliseulaa, jonka raja-arvo ylittää 1 000 000 daltonia, ja otetaan talteen poistettu lipaasi-fraktio, joka sisältää ei-delipidoidun, rikastetun lipaasiuutteen puskuroidussa liuoksessa,

suodatetaan poistettu eluointifraktio käyttäen kalvoa, jonka läpäisyraja on 10 000 daltonia, jolloin saadaan suolasta vapautettu fraktio, ja

lyofilisoidaan tämä suolasta vapautettu fraktio halutuksi, ei-delipidoiduksi, rikastetuksi lipaasiuutteenksi;

e) delipidoidun, rikastetun lipaasiuutteen saamiseksi,

e)1 liuotetaan lipaasiuute veteen, jolloin saadaan vesipitoinen liuos, joka sisältää lipaasiuutteen,

suodatetaan vesipitoinen liuos, joka sisältää lipaasiuutteen, käyttäen kalvoa, jonka läpäisyraja on 5 000-10 000 daltonia, jolloin saadaan liuos, joka ei sisällä suolaa,

adsorboidaan suolaa sisältämätön liuos ioninvaihtokantajalle,

desorboidaan kantaja eluointiaineella, jonka ionivahvuus kasvaa progressiivisesti ajan funktiona,

5 otetaan talteen eluointifraktio, jolla on lipaasiaktiivisuutta ja joka sisältää delipidoidun, rikastetun lipaasiuutteen,

suodatetaan eluointifraktio, jolla on lipaasiaktiivisuutta, käyttäen kalvoa, jonka läpäisyraja on 5 000-10 000 daltonia, jolloin saadaan suolasta vapautettu eluointifraktio ja

10 lyofilisoidaan eluointifraktio halutuksi, delipidoiduksi, rikastetuksi lipaasiuutteen tai

e)2 kromatografoidaan puskuroitu liuos, jonka pH on 2-7 ja joka on saatu kohdassa d), käyttäen molekyyliseulaa,

15 otetaan talteen pidätetty eluointifraktio, joka vastaa molekyylipainoja 30 000-55 000 daltonia ja joka sisältää delipidoidun, rikastetun lipaasiuutteen,

20 suodatetaan pidätetty eluointifraktio, joka vastaa molekyylipainoja 30 000-55 000 ja joka sisältää rikastetun lipaasiuutteen, käyttäen kalvoa, jonka läpäisyraja on 5 000-10 000 daltonia, jolloin saadaan suolatonta, delipidoitua, rikastettua lipaasiuuteliuosta, ja

lyofilisoidaan suolasta vapautettu, delipidoitu, rikastettu lipaasiuute;

25 f) lipaasin saamiseksi

f)1 käyttäen perustana eluointifraktiota, jolla on lipaasiaktiivisuutta ja joka sisältää delipidoidun, rikastetun lipaasiuutteen, joka on saatu edellä kohdassa e)1,

30 kromatografoidaan käyttäen molekyyliseulaa,

otetaan talteen pidätetty eluointifraktio, joka vastaa molekyylipainoja 45 000-50 000 daltonia ja joka sisältää lipaasin,

35 suodatetaan kyseinen eluointifraktio, joka sisältää lipaasin, käyttäen kalvoa, jonka läpäisyraja on 5 000-10 000 daltonia, jolloin saadaan suolasta vapautettu liuos, joka sisältää lipaasin, ja

lyofilisoidaan suolasta vapautettu liuos, joka sisältää lipaasin, tai

f)2 käyttäen perustana pidätettyä eluointifraktiota, joka vastaa molekyylipainoja 30 000-55 000 daltonia ja joka sisältää delipidoidun, rikastetun lipaasiuutteen, joka on saatu edellä kohdassa e)2,

adsorboidaan se ioninvaihtokantajalle,

desorboidaan kantaja eluointiaineella, jonka ioniväkevyys kasvaa progressiivisesti ajan funktiona,

otetaan talteen eluointifraktio, jolla on lipaasiaktiivisuutta ja joka sisältää lipaasin,

suodatetaan eluointifraktio, jolla on lipaasiaktiivisuutta ja joka sisältää lipaasin, käyttäen kalvoa, jonka läpäisyraja on 5 000-10 000 daltonia, jolloin saadaan suolasta vapautettu eluointifraktio, joka sisältää lipaasin, ja

lyofilisoidaan suolasta vapautettu eluointifraktio, joka sisältää lipaasin, jolloin saadaan haluttu lipaasi.

Esillä olevassa yhteydessä tarkoitetaan termillä "delipidoitu" tuotetta, joka sisältää lipaasin ilman lipidejä. Oleellisesti menetelmään kuuluu uutoksenmenetelmä A, joka tekee mahdolliseksi valmistaa uutteita, joilla on spesifinen lipaasiaktiivisuus välillä 1-100 yksikköä proteiini-milligrammaa kohti ja erotusmenetelmä B, joka edellä esitettyjen uutteen pohjalta tekee mahdolliseksi valmistaa rikastettuja lipaasifraktioita, joiden spesifinen aktiivisuus on suurempi kuin 100 yksikköä proteiini-milligrammaa kohti ja myös alkuperäisenä puhdistusvaiheena puhtaan lipaasin, jonka spesifinen aktiivisuus on lähellä 1000 yksikköä proteiinin mg kohti. Seuraavana esitetään menetelmät A ja B kuten myös valinnaiset valmistusvaiheet.

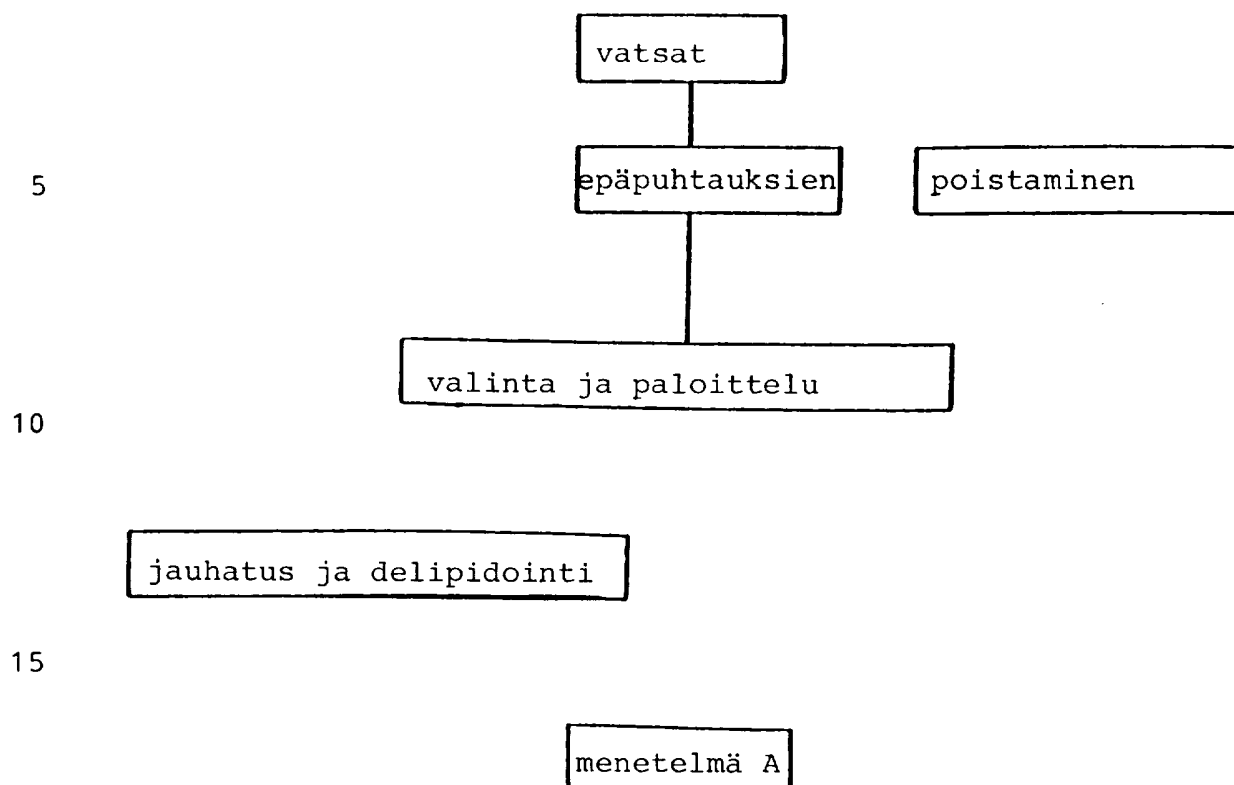
Keksinnön mukaisessa menetelmässä käytetään täysikasvuisia kaniineja, siis kaniineja, joiden ikä on vähin-

tään yksi kuukausi ja edullisesti vähintään kaksi kuukautta. Nämä täysikasvuisten kokoiset kaniinit on tarkoitettu ihmisravinnoksi ja niiden vatsan poistaminen ei vähennä niiden kaupallista arvoa. Keksinnössä ei käytetä vieroitettujen tai vieroittamattomien nuorten kaniinien vatsoja, joissa tiedetään olevan lipaasiaktiivisuutta, jonka pH-arvon maksimi poikkeaa keksinnön mukaisesta lipaasista ja joka johtaisi suuriin hintaongelmiin, jotka johtuvat sekä kaniinien vatsojen pienestä koosta ja siitä, että tapettuja kaniineja ei ole mahdollista myydä.

Samalla tavalla käytetään vain täysikasvuisten hevosten vatsoja, joiden ikä on erityisesti vähintään yksi vuosi ja edullisesti vähintään kolme vuotta.

On havaittu, että kaniinilla etsittyä lipaasia löydetään pääasiassa vatsan pohjukasta, joka on vatsan ylempi osa, joka jatkuu alemmassa osassa onteloita. On havaittu myös, että lipaasia tavataan vain pohjukan isokaarten ylemmässä osassa. Siten on mahdollista käsitellä kaniinin vatsa kokonaan tai mikä tahansa sen osa, joka sisältää ylemmän osan isokaarteesta. Samoin on asia hevosen kohdalla, lipaasin esiintyessä pääasiassa pohjukassa. Koska pohjukka on vatsan suojaava osa, se on helppo leikata erilleen jäljelle jäävästä osasta, joka on edullista talteenotolle, varastoinnille ja siirtämiselle.

Tämä elinten valmistaminen on valinnaista ja siihen voi kuulua vatsojen valmistaminen, kudosten valinta ja paloittelu ja delipidointi-toimenpiteet. Näiden käsittelyjen valinta tapahtuu käytettävissä olevien elinten luonteen ja tilan perusteella ja myös toivotun lipaasituotteen laadun ja erityisesti puhtauden perusteella. Esimerkiksi seuraava diagrammi esittää edullisen menetelmän ja valmis-
televien toimenpiteiden järjestyksen.



20 Valmistaviin toimenpiteisiin kuuluu ensinnäkin teurastamolla erotettujen vatsojen puhdistaminen mahdollisista epäpuhtauksista ja kontaminaatioista kuten myös osista viereisiä elimiä (ruokatorvi, suolet, perna) ja sitten valinnaisesti erotetaan ja puhdistetaan ontelo. Kudokset voidaan valinnaisesti jäädyttää ja pitää -20°C :ssa ennen paloittelua. Viimeksi mainittu voi tapahtua käsin tai laitteiston avulla, jonka avulla on mahdollista saada epäsäännöllisiä palasia, joiden suurin koko on 5 cm tai vähemmän.

30 Delipidointivaiheeseen kuuluu kudosten tai keksinnön aikana saatujen kiinteiden utteiden homogenisointi jauhamalla tai uuttamalla hydrofiilisen liuottimen avulla, jolla on alhainen kiehumispiste kuten pienen molekyylipainon omaavilla ketoneilla ja alkoholeilla. Tietyissä tapauksissa yleisimmin käytetty liuotin on asetoni ja sillä voidaan suorittaa mahdollinen kuivaus ja käsitellyn tuotteen osittainen delipidointi.

Homogenointitoimenpiteet ja kaikki tuotteiden valmistuksen aikana suoritettut toimenpiteet suoritetaan lämpötilassa, joka on alle 25°C ja edullisesti alle 10°C , jotta estettäisiin aktiivisten aineosien denaturoituminen mahdollisimman hyvin. Nämä palautumattomat denaturoitumiset voivat olla luonteeltaan kemiallisia tai fysikokemiallisia ja ne ovat seurausta uutto-olosuhteista ja käytetyn liuottimen luonteesta.

Tavallisesti elinten homogenoimiseksi jauhamalla käytetään 1-10 osaa liuotinta 1 paino-osaa kohti käsiteltävää tuotetta. Jauhaminen tapahtuu lämpötilassa, joka on alle 25°C , tehokkaassa laitteistossa, joka on tyyppiä "Warring blender", jotta saadaan aikaiseksi 2 mm pienempien kudospartikkelien dispersio. Käyttämällä tätä laitteistoa saavutetaan tämä tulos jauhamalla 30 sekunnista 5 minuuttiin nopeudella 10 000-30 000 kpm.

Liukenematon aineosa erotetaan dekantoinnalla, suodattamalla tai sentrifugoimalla. Tavallisesti käytetään suodatusta teollisuustyhjössä, joka on noin 50 millibaria. Tässä tapauksessa saatu jauhomainen liukenematon aine delipidoituu ja sillä on homogeeninen koostumus ja sitä voidaan joko suoraan käyttää uuttomenetelmässä A tai jäljellä olevan jäännösliuottimen poistamisen jälkeen, noin 20 millibarin tyhjössä ja lämpötilassa 25°C , sitä voidaan käyttää merkittävimmissä delipidointimenetelmissä tai voidaan valinnaisesti käyttää osittain delipidoituna lipaasiuutteena, joka saadaan keksinnön menetelmällä.

Näihin menetelmiin kuuluu tuotteiden valmistaminen halutulle delipidointiasteelle käsittelemällä liuottimilla, jotka pystyvät liuottamaan rasva-aineen, kuten hiilivedyillä, eettereillä, ketoneilla, alkoholeilla tai hiilihalideilla, joita voidaan käyttää yksin tai seoksina. Näiden liuottimien pitää olla helposti poistettavia ja niiden kiehumispiste on noin 80°C tai sen alapuolella. Niitä ovat esimerkiksi pentaani, heksaani, petrolieetterit, dietyylieetteri, tetrahydrofuraani, kloroformi, metyleenikloridi, hiilitetrakloridi ja dikloorietaani.

Delipidointitoimenpiteet voivat sisältää samaa käsittelyä varten lukuisia peräkkäisiä uuttoja samalla tai eri liuottimilla, kunnes saadaan sopivasti delipidoitu tuote.

5 Keksinnön mukaisesti valmistettujen tuotteiden kiinteiden lipaasiuutteiden lipidipitoisuus määritetään erilaisilla edellä mainituilla menetelmillä. Kun tuotetta on kuivattu 100-105°C:ssa 6 tuntia, uutetaan lipidit metanoli:kloroformi-seoksella (25:75 til/til) 3 tuntia huoneen-
10 lämpötilassa. Liukenematon aine suodatetaan ja liuottimet poistetaan haihduttamalla. Lipidipitoisuus on mahdollista määrittää vertaamalla alkuperäistä näytteen painoa ja haihdutusjäännöksen painoa ja pitoisuus on tavallisesti alle 1 % delipidoituista tuotteista.

15 Tämä delipidointitaso määritetään lopputuotteen muotojen mukaisesti, tuotteet voivat olla esimerkiksi tabletoituja tai jauhemaisia ja keksinnön mukaisia tuotteita voidaan valmistaa siten, että niillä on erilaisia organoleptisiä ominaisuuksia. Delipidointitaso voidaan arvioida
20 määrittämällä esikokeella kaikki kuumana uutettavissa olevat rasva-aineet ja sitten määrittämällä kylmänä kullekin delipidointikäsittelylle se määrä, joka uuttuu nestefaasin kyseiseen osaan.

Menetelmässä sekoitetaan sopivassa laitteistossa
25 1 paino-osa käsiteltävää tuotetta ja 5-100 paino-osaa valittua delipidointiliuotinta 15 sekunnista 15 minuuttiin lämpötilassa, joka on alle 25°C. Delipidoitu tuote erotetaan liuottimesta suodattamalla tai sentrifugoimalla ja se voidaan käsitellä uudelleen samalla tavalla niin monta kertaa kuin tarvitaan, jotta saadaan haluttu delipidointiaste.
30

Siten yksityiskohtaisemmin ja käyttäen edullisia liuottimia, joita ovat asetoni, eetteri, kloroformi ja niiden seokset, lisätään 1 paino-osaa käsiteltävää tuotetta 5-25 tilavuusosaa liuotinta, jonka jälkeen sekoitetaan voimakkaasti 30 sekunnista 10 minuuttiin lämpötilassa 0-10°C. Delipidoitu tai osittain delipidoitu liukene-
35

maton aine erotetaan vakuumissa suodattamalla. Kun kyseessä on epätäydellinen delipidointi, käsitellään liukenematon aine uudelleen samalla tavalla. Jotta saavutetaan toivottu delipidointiaste, voidaan toimenpide toistaa 2-5
5 kerta.

Kuten edellä on esitetty, on erotusvaihe A oleellinen valmistettaessa keksinnön mukaisia tuotteita, joiden spesifinen lipaasiaktiivisuus on välillä 1-100 yksikköä/mg proteiinia. Tämä menetelmä A sisältää käsittelyn happovesiliuoksella vatsoille joko sellaisenaan tai jotka on
10 käsitelty edellä esitettyjen menetelmien mukaisesti. Siten on mahdollista käyttää kokonaisia vatsoja tai niiden valittuja osia tai jopa jauhemaista ainetta, joka saadaan homogenoinnin jälkeen, joka on suoritettu jauhamalla liuottimessa kuten asetonissa, tai käyttää samaa ainetta delipidoidussa muodossa. Toisessa vaiheessa muodostetaan suoloja
15 lipaasituotteista lisäämällä vesiliukoisia suoloja.

Vielä tarkemmin uuttovaiheessa happamassa vesipitoisessa väliaineessa sekoitetaan hyvin voimakkaasti aineita yhdessä sopivien happoliuosten kanssa ja sitten erotetaan
20 nestefaasi, joka sisältää aktiiviset aineosat, suodattamalla, sentrifugoimalla tai valinnaisesti dekantoimalla. Siten tavallisesti yhtä valmistettua aineen grammaa kohti käytetään 1-100 millilitraa happoliuosta, jonka pH-arvo
25 on välillä 2-4.

Vesiliuoksen happamuus on säädetty sopivan vahvuisilla hapoilla, jotta saadaan haluttuja pH-arvoja. Tavallisesti käytetään vahvoja mineraalihappoja tai orgaanisia
30 happoja, joiden pKa on pienempi kuin 5. Näitä ovat pääasiassa oksaali-, viini-, omena-, sitruuna-, maleiini-, muurahais-, maito- ja etikkahapot ja myös rikki-, fosfori- ja kloorivetyhapot, joita käytetään eniten.

Tapauksissa, joissa tämä toimenpide suoritetaan kudokappaleille, voi proteaasien kuten esimerkiksi pesi-
35 nien lisääminen parantaa lipaasin uuttumista happamassa väliaineessa.

Toimintaolosuhteet valitaan siten, että estetään palautumaton herkkien aktiivisten aineosien denaturoituminen, erityisesti lämpötiloissa yli 25°C. Tavallisesti uuttamiset suoritetaan sekoittamalla aineosia voimakkaasti 1 minuutista 15 tuntiin sekoittimen tehon mukaisesti ja lämpötilassa välillä 0-20°C.

Edullisesti käsiteltäessä 1 g ainetta käytetään 3-60 millilitraa kloorivetyhappoliuosta, jonka pH on säädetty arvoon 2-4+0,1; kyseiset liuokset saadaan esimerkiksi pH-arvolla 2 lisäämällä 2,0 ml 37 % kloorivetyhappoa 2 litrassa vettä.

Näin saatu liuos homogenoidaan voimakkaasti sekoittaen 5-60 minuuttia ja lämpötilassa 0-20°C. Tämän jälkeen vesifaasi erotetaan suodattamalla, dekantoimalla tai sentrifugoimalla. Viimeksi mainitussa tapauksessa sopivimmat olosuhteet saavutetaan suorittamalla sentrifugointi 15 minuutin ja 1 tunnin aikana nopeudella 3 000-12 000 kpm lämpötilan ollessa 4-20°C. Erottaminen voi tapahtua myös suodattamalla ja tässä tapauksessa toimenpide suoritetaan edullisesti nopeuttaen käyttämällä tyhjää tai painetta suodatussysteemissä.

Siten seos voidaan väkevöidä ultrasuodatuksella, jäädyttää ja lyofilisoida, jotta saadaan uute kiinteässä muodossa, jolloin se voidaan valinnaisesti delipidoida edellä esitettyjen menetelmien mukaisesti.

Tässä tapauksessa seos ensin jäädytetään jäädyttämällä -20 - -70°C:seen, kyseinen lämpötila saadaan vesiglykoliseoksilla tai kiinteillä hiilidioksidi-asetoniseoksilla matalimpia lämpötiloja varten. Nämä toimenpiteet suoritetaan säiliöissä, joihin on liitetty seuraava lyofilisointimenetelmälaitteisto. Lyofilisointi suoritetaan tyhjiössä, joka on alle 10⁻¹ millibaria. Sublimoimalla poistettu vesi kondensoidaan trappeihin lämpötilan ollessa alle -50°C ja erityisesti -80°C, jäädytettynä ammoniakilla tai freonilla. Saatu amorfinen dehydrattu tuote jauhe-
taan sitten kylmänä kuten esimerkiksi kryojauhamalla läm-

pötilassa, joka on alle 0°C ennen delipidointia ja uute-
taan sitten menetelmän A mukaisesti. Kaikki keksinnön mu-
kaiset lyofilisointitoimenpiteet suoritetaan samalla ta-
valla.

- 5 Toinen menetelmän A toimenpide sisältää saostuksen
lipaasiaktiivisille aineille, jotka sisältyvät happamiin
happovesiliuoksiin, jotka saadaan edellisen toimenpiteen
aikana. Tämä saostaminen suoritetaan muodostamalla suola,
joka syntyy lisäämällä liuokseen vesiliukoisia suoloja.
10 Kationeina nämä suolat sisältävät magnesiumia, kaliumia,
natriumia, ammoniumia ja anioneina asetaattia, sitraattia,
fosfaattia ja sulfaattia. Kuitenkin edulliset suolat ovat
yhdistelmiä, joissa on moniarvoisia anioneja ja erityisesti
fosfaattia ja sulfaattia. Maa-alkalikationit kuten kalsium
15 ja barium, jotka aiheuttavat palautumattomia proteiinien
denaturoitumisia, eivät sovi käytettäviksi. Edullinen suola
on ammoniumsulfaatti.

- Tässä tapauksessa 1 litraan käsiteltävää hapanta
liuosta, joka on valmistettu sekoittamalla lämpötilassa
20 $0-20^{\circ}\text{C}$, lisätään 80-700 g kiteistä ammoniumsulfaattia. Se-
koittamista jatketaan kunnes suola on pääosin kokonaan
liuennut. Tämän jälkeen liuos jätetään lämpötilaan $0-20^{\circ}\text{C}$,
jotta saavutetaan mahdollisimman suuri aktiivisten ainei-
den suolan muodostuminen, joka tapahtuu 15 minuutin ja
25 20 tunnin välisenä aikana. Tämä liuos poistetaan sitten
tavallisilla menetelmillä kuten dekantoimalla, suodattamal-
la tai sentrifugoimalla.

- Erityisen edullisesti tämä suolan muodostamisen toi-
menpide suoritetaan lisäämällä lämpötilassa $0-10^{\circ}\text{C}$, 100-
30 600 g ammoniumsulfaattia kutakin käsiteltävää happoliuos-
litraa kohti. Kun liuos jätetään noin 10°C :seen 30-60 minu-
utiksi, saadaan saostumaan optimaalinen määrä liukenematonta
ainetta, jolla on lipaasiaktiivisuutta ja joka erotetaan
suodattamalla tyhjössä noin 50 millibarissa tai sentrifu-
35 goimalla 10-45 minuuttia nopeudella 3 000-10 000 kpm ja
lämpötilassa $4-10^{\circ}\text{C}$. Näin saatu tuote sisältää aktiiviset

aineet, muut biologiset aineet ja erilaisia mineraalisuoloja mukaan luettuina käsittelyjen aikana lisätyt suolat.

Tällaisenaan voidaan menetelmää käyttää teollista valmistusta varten. Kuitenkin farmaseuttisia toimenpiteitä varten on tarpeellista poistaa parasiittiset suolat ja tämä suoritetaan membraanisuodatuksessa (dialyysi tai ultra-suodatus), viimeksi mainitun ollessa erityisemmin käytetty. Liukenemattoman aineen veteen liuottamisen jälkeen ultra-suodatetaan liuos samalla kun tuote pidetään tilavuudeltaan vakiollisena lisäämällä vettä kalvolle, jonka rakenne läpäisee pienen molekyylipainon omaavia molekyylejä ja pidättää tuotteet ja erityisesti suuremman molekyylipainon omaavia entsyymejä.

Siten liukenematon aine, joka on saatu muodostamalla suolaa, liuotetaan veteen, liuoksen pH säädetään välille 2-7 lisäämällä laimeaa kloorivetyhappoa ja hapan liuos ultrasuodatetaan tangentiaalista kierrätystä käyttäen kalvolla, jonka leikkausraja-arvo on tavallisesti 5 000-10 000 suolan poistamistarkoituksia varten. Kaikki suolan poistamiset tapahtuvat samalla tavalla keksinnön mukaisessa menetelmässä.

Suodatuksen aikana pidetään vakiollinen virtausnopeus niin suurena kuin mahdollista ja tämä suoritetaan käyttäen peristalttista pumppua. Kuitenkin nesteen painetta kalvolla kontrolloidaan ja se ei saa ylittää 1 baria, jottei tapahtuisi tukkeutumista. Näissä olosuhteissa on 200 cm²:n kalvolla mahdollista käsitellä 2-3 litraa suodosta tunnissa.

Suodattamisen jälkeen saatu pidätetty aine, joka sisältää aineet, joilla on suurempi molekyylipaino kuin kalvon selektiivisyyden leikkausraja-arvo, väkevöidään 2-5-kertaisesti ultrasuodatuksella edellä esitettyä laitteistoa käyttäen ennen jäädyttämistä ja lyofilisointia suurtyhjössä, joka on noin 10² millibaria, jo aikaisemmin määriteltujen menetelmien mukaisesti ja esitetyissä toimintaolosuhteissa.

Näiden toimenpiteiden avulla on mahdollista saada keksinnön mukaisia tuotteita, uutteita, joiden lipaasi-aktiivisuus on karakterisoitu spesifisellä aktiivisuudella, joka on 1-100 yksikköä/proteiini mg.

5 Käyttäen menetelmää B, on näiden uutteen avulla mahdollista saada sopivia menetelmiä käyttäen rikastettuja uutteita ja puhdasta lipaasifraktiota, jotka myös ovat keksinnön mukaisia tuotteita.

10 Tähän menetelmään voi kuulua kaksi puhdistusmenetelmää, jotka ovat ioninvaihtokromatografia, joka käyttää orgaanisten yhdisteiden tiettyjen funktioiden ionisointikapasiteettia, ja geelisuodatus, joka sopivan kantajan avulla tekee mahdolliseksi erottaa yhdisteitä, joilla on erilaiset molekyylipainot ja koot. Sellaisissa tapauksissa, 15 joissa edellä esitetyt toiminnot eivät kuulu delipidointivaiheeseen, on geelisuodatus edullinen.

Kun lipaasiuute on delipidoitu edellisessä vaiheessa, toinen näistä menetelmistä tekee mahdolliseksi valmistaa rikastettuja lipaasiuutteita ja tällaisessa tapauksessa on ioninvaihtokromatografia edullinen. 20

Lipaasin valmistaminen vaatii molempien menetelmien peräkkäisen esiintymisen, tällöin ne voivat olla missä järjestyksessä tahansa.

25 Seuraavana esitetään yhteenvedot näistä puhdistusmenetelmistä. Ioninvaihtokromatografia liittyy vesiliukoisten aineiden puhdistamiseen, joihin liittyy ionisoitavia funktioita, jotka sopivassa väliaineessa voivat sisältää positiivisen tai negatiivisen varauksen, joka mahdollistaa sen liittymisen vastakkaismerkkiseen väliaineeseen. Kanta- 30 jaan liittyneiden tuotteiden eluointi tapahtuu edullisesti niiden sidosvoiman funktiona ja siten tietyissä tapauksissa on mahdollista erottaa tuotteita seoksista.

Siten entsyymeillä, joilla on proteiinirakenteet, on sekä aminofunktioita että karboksyylifunktioita yhdessä 35 nollavarauksena molekyylin isoelektrisessä pH:ssa. Liuesten tekeminen happamaksi kyseisen pH-arvon alapuolelle

vaikuttaa karboksyylifunktioihin ja tekee entsyymille positiivisen varauksen, kun taas emäksiseksi tekeminen vaikuttaa aminofunktioihin ja antaa tuotteelle negatiivisen varauksen.

5 Tämä proteiinien amfoteerinen ominaisuus tekee mahdolliseksi niiden puhdistamisen kationi- tai anioninvaihtokromatografia-menetelmillä.

Tällaisissa menetelmissä käytetyt kantaja-aineet ovat aineita, jotka ovat liukenemattomia eluointiväliaineeseen ja joissa on ionisoitavia funktioita.

10 Kantaja-aineiden päätyyppejä ovat hartsit, kolmi-dimensionaaliset styreeni- ja polyvinyylibentseenisysteemit, substituoidut selluloosat, dekstraanijohdannaiset ja agaroosijohdannaiset. Viimeksi mainittujen joukossa tarjoaa 15 Pharmacia voimakkaasti ristisidoksellista agaroosipolymerikantajaa, jolla saavutetaan erityisen nopeita erotuksia (Fast Flow kauppanimi).

Näillä erilaisilla kantaja-aineilla on rakenteessaan ionisoitavia funktioita kuten rikki-, karboksyyli-, 20 fosfori- ja arseenifunktioita kationinvaihtoa varten ja primaarisia, sekundaarisia tai tertiäarisia amiinifunktioita anioninvaihtoja varten.

Edullisesti keksinnön mukaiset tuotteet on puhdistettu kationinvaihtokromatografialla käyttäen pylväitä, 25 jotka ovat tyyppiä Fast Flow S ja Sepharose tyyppisiä (Pharmacia), joiden halkaisija on 2,6 mm ja korkeus 30 cm, joiden kantaja-aineessa on sulfopropyyli- ja radikaaleja ja jotka ovat siten kationinvaihtajia, tai pylväitä, joissa on identtinen kantaja-aine, mutta joilla on pienempi kapasiteetti 30 (1 ml) Fast Flow mono S tyyppiä (Pharmacia).

Puhdistettavat uutteen on liuotettu puskureihin, joiden pH-arvo on välillä 3-5 ja erityisesti 4. Seuraavana annetaan esimerkkejä puskureista.

- | | | |
|---|---------------------|----------------|
| | a) Natriumasetaatti | 20 mmol/litra |
| | Natriumkloridi | 100 mmol/litra |
| | Etikkahappoa kunnes | pH 4 |
| | b) Natriumasetaatti | 20 mmol/litra |
| 5 | Etikkahappoa kunnes | pH 4 |

10 Uutteiden liuokset saostetaan geeleihin, jotka on etukäteen tasapainotettu puskurilla, jota käytetään puhdistamiseen. Jälkimmäinen poikkeaa funktioltaan käytetyn pylvään tyyppistä.

15 Käytettäessä "mono S" tyyppistä pylvästä uute liuotetaan puskuriin b). Tuotteet puhdistetaan samalla puskurilla, joka on progressiivisesti rikastettu toista tyyppiä olevalla puskurilla, mutta joka sisältää 500 mmol natriumkloridia litraa kohti, jotta saadaan eluointigradi-
20 entti, jonka pH on 4 ja joka progressiivisesti sisältää 0-500 mmol natriumkloridia litraa kohti. Ionivahvuuden progressiivinen muuntaminen tekee mahdolliseksi erottaa, konsentraation ollessa noin 250 mmol natriumkloridin litraa kohti, frak-
25 tio, joka sisältää rikastetun lipaasiuutteen.

25 Käytettäessä "S Sepharose" tyyppistä pylvästä puhdistettava tuote liuotetaan puskuriin a) ja saostetaan pylvääseen. Eluointi tapahtuu samalla puskurilla ja sitten liuoksella, jossa on 20 mmol/litra natriumasetaattia ja
30 200 mmol/litra natriumkloridia, jolloin on mahdollista eluoida lipaasifraktio rikastettuna halutulla uutteella.

30 Kun käytetään tätä puhdistusmenetelmää uutteeseen, joka saadaan menetelmällä a) ja poistamalla suola, on mahdollista saada fraktioita, jotka sisältävät rikastettua
35 lipaasiuutetta, jonka spesifinen aktiivisuus on välillä 100-500 yksikköä proteiinin milligrammaa kohti.

35 Näissä puhdistuksissa saadut vesifraktiot voidaan joko käyttää täydentävissä puhdistusmenetelmissä, jolloin saadaan lipaasia, tai ne voidaan puhdistaa suolasta dialyysillä tai ultrasuodatuksella, jäädyttää sen jälkeen ja lyofilisoida jo aikaisemmin kuvatuilla menetelmillä,

jolloin saadaan rikastettua lipaasiuutetta amorfisessa kiinteässä muodossa.

Suodattamalla "molekyylliseula" tyyppisellä geelillä voidaan erottaa molekyylit niiden koon funktiona, siis
5 joko tilavuuden tai dimensioiden mukaan. Käytetyt liukene-
mattomat geelit muodostetaan erilaisista 3-dimensionaali-
sista systeemeistä, joilla saadaan sopiva molekyylikoko.

Siten eri kokoisia molekyylejä sisältävästä seokses-
ta vain ne tuotteet, joilla on geelisysteemiin sopiva koko,
10 pidättyvät systeemiin, kun taas molekyylit, joilla on suu-
rempi koko, eivät pidäty ja ne eluoituvat nopeasti. Gee-
liin jääneiden molekyyliden pidätysaika vaihtelee myös nii-
den koon mukaan ja näiden tuotteiden eluoituminen tapah-
tuu verrannollisena siihen, siten että pienempiä moleky-
15 lejä pidatetaan kauemmin.

Seuraavilla geeleillä on nämä erotusominaisuudet:

- Sephadex G, muodostettu dekstraaneista, joissa sillat epikloorihydriinin kanssa,
- Biogels P, ovat polyakryyliamidiketjuja, joissa on sillat
20 N,N'-metyleenibisakryyliamidin kanssa,
- Ultrogeelit ja Sephacryls, joissa yhdistetään sekoitettu polyakryyliamidi ja agaroosihila.

Esillä olevan keksinnön tuotteet käsitellään edulli-
sesti Sephakryyli-tyyppisillä polyakryyliamidigeeleillä.

25 Ei-delipidoidut uutteen käsitellään seulalla, jonka poistoraja on suurempi kuin 1 000 000 daltonia.

Siten puhdistettavien tuotteiden vesiliuokset kaa-
detaan pylvääseen, jonka korkeus on noin 1 metri ja joka
sisältää 1-7 litraa geeliä.

30 Tämän jälkeen eluointi suoritetaan pH-arvossa 6 ole-
valla liuoksella, jossa on 100-500 mmol natriumkloridia ja
10-30 mmol dinatriumfosfaattia. Eluaatti otetaan talteen
fraktioina ja lipaasiaktiivisuus tutkitaan näistä fraktiois-
ta. Siten aktiivisuutta sisältävät fraktiot vapautetaan
35 suolasta dialyysillä tai ultrasuodatuksella, jonka jälkeen
jäädytetään ja lyofilisoidaan, jotta saadaan etsittyjä ri-
kastettuja lipaasiuutteita kiinteässä muodossa.

Delipidoidut lipaasiuutteet käsitellään seulalla, jonka avulla on mahdollista erottaa aineet, joiden molekyylipaino on välillä 30 000-50 000 daltonia ja erityisesti 45 000-55 000 daltonia. Siten puhdistettavien tuotteiden vesiliuokset kaadetaan pylvääseen, jonka korkeus on noin 1 metri ja jossa on noin 400-500 ml geeliä.

Tämän jälkeen eluointi suoritetaan liuoksella, jonka pH-arvo on 6 ja joka sisältää 200 mmol/litra natriumkloridia. Eluaatti otetaan talteen fraktioina ja lipaasiaktiivisuus tutkitaan näistä fraktioista.

Tällä tavalla havaitut lipaasiaktiivisuutta sisältävät fraktiot voidaan käyttää joko seuraavassa puhdistusvaiheessa, jolloin saadaan lipaasia, tai siitä voidaan poistaa suola dialyysillä tai ultrasuodatuksella, jäädyttää ja lyofilisoida, jolloin saadaan rikastettu lipaasiuute kiinteässä muodossa ja joka tietyissä tapauksissa voidaan delipidoida.

Keksinnön mukaista menetelmää on käytetty vasikoiden, lampaiden, sikojen, siipikarjan, kaniinien ja hevosten vatsoille. Kuitenkin yllättävästi ja toisin kuin esimerkiksi mitä havaitaan lähdetessä liikkeelle sianvatsoista, on lipaasiaineilla ja lipaaseilla, jotka saadaan kaniinien ja hevosten vatsoista, suurin lipaasiaktiivisuus pH-arvolla 4-5 ja erityisesti 4,5, kun tämä arvo on sialla 6-7 ja siten se ei ole kovin aktiivinen vatsan nesteissä.

Lisäksi on yllättäen havaittu, että toisin kuin sian vatsoista saaduissa uutteissa, säilyttivät kaniinin ja hevosen vatsauutteet lipaasiaktiivisuutensa happamassa väliaineessa tapahtuneen inkuboinnin jälkeen. Kaksi tuntia kestäneen 37°C:ssa ja pH-arvossa 2 tapahtuneen inkuboinnin jälkeen eivät nämä aktiivisuudet muuttuneet, kun taas samalla tavalla käsiteltyt sikojen vatsat eivät kestäneet pH-arvoa alle 4.

Lisäksi hevosen ja sian vatsojen uutteen aktiivisuuksia on tutkittu pH-alueella 3-9. Kun pH-arvo oli välillä 3-7, oli uutteen lipaasiaktiivisuus sama tai suurempi

kuin 50 % niiden suurimmasta aktiivisuudesta, joka esiintyy noin pH-arvolla 4,5. Kokeiden suorittaminen esitetään seuraavassa selostuksessa.

Siten kaniinin ja hevosen vatsauutteiden lipaasien merkittävä kestävyys happaman väliaineen aiheuttamaa denaturoitumista vastaan ja niiden laaja aktiivisuusalue tekevät niiden käytön oikeutetuksi lääkeainemuodossa lipaasiaktiivisuuden lisääjinä erilaisissa ihmisten ja eläinten sairaalloisissa puutostiloissa.

Keksinnön mukaisesti saadaan lipaasia, jonka molekyypipaino on Laemmlin menetelmän mukaisesti 49 000 daltonia, jossa 9 000 vastaa sokeria ja 40 000 proteiinia, aminohappotyyppien lukumäärän ollessa seuraavia: Asp. Asn : 45 : Thr : 19 : Ser : 28 : Glx : 30 : Pro : 29 : Gly : 25 : Ala : 28 : Val : 27 : Met : 8 : Ile : 18 : Leu : 26 : Tyr : 16 : Phe : 18 : Lys : 17 : His : 7 : Arg : 10 : Cys : 9 ja Trp : 6, jonka N-päätteinen osa on: Lys-Ser-Ala-Pro-Thr-Asn-Pro-Glu-Val-Asn-Met-X-Ile-Ser-Glu-Met-Ile-Ser-Tyr-Trp-Gly-Tyr-Pro-Ser-Glu-Lys-Tyr-Glu-Val-Val, jossa X tarkoittaa määrittämätöntä aminohappoa, jonka spesifinen lipaasiaktiivisuus Gargouri-menetelmän mukaisesti on suurempi kuin 1 000 U/mg proteiinia, jonka suurin aktiivisuus havaitaan pH-arvolla noin 4,5, jonka aktiivisuus pH-arvoilla 3 ja 7 on vähintään puolet suurimmasta aktiivisuudesta ja jonka aktiivisuus säilyy 2 tunnin kestävän 37°C:ssa tapahtuvan inkuboinnin jälkeen pH-arvossa 2 ja jonka aminohappo, joka tarvitaan lipolyyttiseen aktiivisuuteen, on kysteiini, joka pystyy kestävänsä pepsiiniä ja jota huonontavat kymotrypsiini ja trypsiini, joiden isoelektrinen pH on välillä 5,7 ja 7,1 ja joka voidaan valmistaa keksinnön mukaisella menetelmällä käyttäen kaniinin vatsanpohjukkaa.

Keksinnön mukaisesti saadaan myös lipaasia, jonka spesifinen lipaasiaktiivisuus Gargouri-menetelmän mukaisesti on suurempi kuin 1000 U/proteiinin mg ja jonka suurin aktiivisuus havaitaan pH-arvolla noin 4,5 ja jonka aktiivisuus pH-arvoilla 3 ja 7 on vähintään yhtä suuri kuin puolet

suurimmasta aktiivisuusarvosta ja jonka aktiivisuus säilyy inkuboitessa 2 tuntia 37°C:ssa ja pH-arvossa 2 ja joka voidaan valmistaa keksinnön mukaisella menetelmällä hevo-

- 5 Lisäksi keksinnön mukaisesti voidaan valmistaa delipidoituja tai ei-delipidoituja rikastettuja lipaasiuutteita valinnaisesti vesiliuoksena, jonka spesifinen lipaasiaktiivisuus on Gargouri- menetelmän mukaisesti välillä 100 ja 1000 U/proteiini mg ja jonka suurin aktiivisuus havaitaan pH-arvolla
- 10 noin 4,5 ja jonka aktiivisuus pH-arvoilla 3 ja 7 on vähintään puolet suurimmasta aktiivisuudesta ja jonka aktiivisuus säilyy inkuboitessa 2 tuntia 37°C:ssa ja pH-arvossa 2 ja joka voidaan valmistaa keksinnön mukaisella menetelmällä.

- Keksinnön mukaisesti voidaan myös valmistaa delipidoitua tai ei-delipidoitua lipaasiuutetta, jolla on lipaasiaktiivisuus Gargouri-menetelmän mukaisesti välillä 1 ja 100 U/proteiini mg ja jonka suurin aktiivisuus havaitaan pH-arvolla noin
- 15 4,5 ja jonka aktiivisuus pH-arvoilla 3 ja 7 on vähintään yhtä suuri kuin puolet suurimmasta aktiivisuusarvosta ja jonka aktiivisuus säilyy inkuboitessa 2 tuntia 37°C:ssa ja pH-
- 20 arvossa 2 ja joka voidaan valmistaa keksinnön mukaisella menetelmällä.

- Näitä pepsiiniä kestäviä uutteita huonontavat trypsiinit ja niissä on kysteiiniä aminohappona, joka tarvitaan lipolyyttistä aktiivisuutta varten.
- 25

 Näillä tuotteilla on tyypillisesti ominaisuudet, jotka tavallisesti määritetään entsyymeille ja entsyymipitoisille utteille, nimittäin:

- a - spesifinen aktiivisuus,
- 30 b - aktiivisuus pH:n funktiona,
- c - lipaasiaktiivisuuden kestävyys happamassa väliaineessa tapahtuneen inkuboinnin jälkeen,
- d - näennäisen ominaispainon määrittäminen,
- e - aktiivisuus triglyseridejä vastaan,
- 35 f - isoelektrisen pH:n määrittäminen,
- g - lipolyyttiseen aktiivisuuteen tarvittavan oleellisen aminohapon läsnäolon määrittäminen,

- h - proteaasien kestävyuden määrittäminen,
- i - sokerien läsnäolon määrittäminen.

Tämän jälkeen on koottu yhteen menetelmät näitä määrittäyksiä varten.

- 5 a. Spesifinen aktiivisuus määritetään entsymaattisen aktiivisuuden ja näytteessä olevien proteiinien milligrammoina esitetyn määrän suhteena. Lipaasiaktiivisuus määritetään titrimetrisesti Y. Gargouri-menetelmällä (Aix-Marseille University PhD thesis, 1985), jossa käytetty
- 10 substraatti on tributyyriini. Annosteluun kuuluu lipaasin vaikutuksesta vapautuvan voihapsen neutralointi 0,1N soodaliuoksella vakiona pysyvässä pH-arvossa 6 ja lämpötilassa 37°C. Näissä koeolosuhteissa vastaa entsymaattinen aktiivisuus hapon mikromoolien lukumäärää, joka on vapautunut
- 15 yhdessä minuutissa tutkittavan tuotteen vaikutuksesta.

- Käytännössä kokeessa johdetaan titrausastiaan, joka on lämpötilaltaan säädetty 37°C:seen, 0,50 ml tributyyriiniä ja 14,50 ml natriumtaurodesoksikolaattia ja karjaseerumialbumiinin isotonista liuosta (koostumus: 100 mg karjaseerumialbumiinia, 2 mmol natriumtaurodesoksikolaattia,
- 20 9 % NaCl isotonista liuosta 1 litraan asti).

- Sähkömagneettisella sekoittamisella tai sekoituksella ja käyttäen automaattista titraajaa säädetään liuoksen pH-arvo arvoon 6 lisäämällä 0,1 N soodaa. Kun pH stabiiloituu tähän arvoon, lisätään tarkasti mitattuna 0,5-1 ml annosteltavan entsymaattisen yhdisteen vesiliuosta. Näissä olosuhteissa on mahdollista laskea käyttäen 0,1 N soodaliuoksen määrää, joka tarvitaan pitämään pH arvossa 6 2 minuuttia, lipaasiaktiivisuus kuten määritellään tässä edellä.
- 25

- 30 Proteiinit määritetään Folin Ciocalteu reagenssin läsnäollessa. Kun läsnä on kupri-ioneja emäksisessä väliaineessa ja kyseisen fosfo-molybdo-volframi(6) reagenssin läsnäollessa, muodostuu värillinen kompleksi, jonka intensiteetti on verrannollinen proteiinin määrään (Lowry et al, 1951). Värjäytymistä verrataan standardialueeseen, joka on
- 35 valmistettu tunnetuilla karjaseerumialbuminimäärillä,

joten näin voidaan määrittää tutkittavan näytteen proteiinipitoisuus.

5 b. Aktiivisuus pH:n funktiona määritetään pH-alueella 3-9 käyttäen liitososaa edellä esitetyssä annostelumenetelmässä. Siten titrausliuos säädetään valittuun pH-arvoon tutkimista varten joko lisäämällä 0,1 N soodaliuosta tai lisäämällä 0,1 N kloorivetyhappoa. Lisätään entsymaattinen liuos ja pH pidetään tässä arvossa 2 tuntia.

10 Voihapon dissosiaatiovakio ($pK_a = 4,75$) tekee mahdolliseksi annostelun pH-arvolla 6, annostelut korjaustekijän kanssa pH-arvoon 5 asti ja niin kutsutut "palautus"annostelut tämän pH-arvon alapuolelle.

15 c. Lipaasiaktiivisuuden säilymisen määrittäminen happamassa väliaineessa tapahtuneen inkuboinnin jälkeen

Tähän kokeeseen kuuluu lipaasiaktiivisuuden määrittäminen sen jälkeen, kun koetuotteelle on suoritettu korkeintaan 2 tunnin inkubointi 37°C :ssa vesiliuoksessa pH-arvoissa 3-9.

20 Tutkittavan entsymaattisen uutteen vesiliuoksen pH-arvoja säädetään eri arvoihin lisäämällä 0,1 N kloorivetyhappoa tai soodaliuosta. Nämä liuokset sijoitetaan hauteeseen, jonka lämpötila on termostoitettu 37°C :een. Näytteitä otetaan 0, 30 minuutin, 1 tunnin ja 2 tunnin kuluttua ja ne sisältävät tributyyriiniä substraattina. Säädetään pH nopeasti arvoon 6, jonka jälkeen lipaasiaktiivisuuden annostelu suoritetaan 2 minuutin aikana lisäten 0,1 N soodaliuosta, jotta pH-arvo pysyy arvossa 6. Näin saatua lipaasiaktiivisuutta verrataan saman tuotteen vertailunäytteenseen, jota ei ole inkuboitu ja joka on suoraan titrattu pH:ssa 6 (siis näyte hetkellä $t = 0$), jolloin on mahdollista saada lipaasiaktiivisuus prosentteina inkuboinnin jälkeen koeolosuhteissa.

35 d. Näennäinen molekyylipaino määritetään elektroforeesilla Laemmlin menetelmän mukaisesti (Nature, 1970, 227, sivut 680-685), johon kuuluu näytteen käsitleminen

natriumdodekyylisulfaatilla ja näytteen siirtyminen polyakryyliamidigeeliin, jossa on peräkkäin 5 % geeliä ja 12,5 % geeliä (paino/til.). Identtisesti käsitellään proteiineja, joiden tunnetut molekyylipainot ovat välillä 14 000-94 000 daltonia. Seuraavana proteiinit tehdään näkyviksi Coomassie-sinisellä, määritetään näytteen näennäinen molekyylipaino vertaamalla sen siirtymistä vertailuproteiinien siirtymiseen. Tämän menetelmän avulla on mahdollista havaita molekyylipainoja, jotka ovat 48 000 daltonia puhdistetulle lipaasille, joka on saatu lähtemällä kaniinin vatsoista (esimerkki 6).

e. Lipaasin tai lipaasiuutteiden aktiivisuudet on tutkittu 3 substraattityypille, nimittäin triglycerideille, joilla on lyhyt ketju: tributyriini (C_4) ja keskipitkät ketju: LIPROCILE (C_8C_{10}) ja pitkä ketju: INTRALIPIDI, 30 % soijaöljy.

Käytännössä 2 yksikköä lisätään 0,5 ml tributyriiniä tai 0,5 ml:aan LIPROCILE:a tai 5 ml:aan 30 % INTRALIPIDI-liuosta ja 10 yksikköä lipaasiaktiivisuutta inkuboidaan 9 % NaCl-puskurissa, $CaCl_2$:n 150 nmol:ssa ja nautta-albumiiniseerumissa.

Aktiivisuuden tutkiminen pH:n funktiona osoittaa, että lipaasin aktiivisuus on suurimmillaan noin pH:ssa 5 tributyriinille, pH:ssa noin 6 LIPROCILE:lle ja pH:ssa 4 INTRALIPIDI:lle.

Lipaasituotteiden havaittu aktiivisuus määritetään pH:ssa 5 edellä luetelluille substraateille. LIPROCILE:lle ja INTRALIPIDI:lle havaitut aktiivisuudet ovat vastaavasti välillä 50-75 % ja 25-40 % tributyriinille havaitusta aktiivisuudesta.

f. Isoelektrisen pH-arvon määrittäminen

Proteiinit, jotka on sijoitettu sähkökenttään ja amfolyyttien muodostamaan pH-gradienttiin, siirtyvät kohti niiden isoelektristä pH:ta. Gradientti muodostuu polyelektrolyyttien seoksesta, jonka molekyylipaino on 1 000 tai sen alle ja joka koostuu polykarboksyyli- ja

polyaminoalifaattisista hapoista, joiden isoelektriset pisteet ovat välillä 2-11.

2-5,ug lipaasiuutetta kaadetaan etukäteen valmistettuun horisontaaliseen geeliin ja proteiinit, joihin kohdistetaan sähkökenttä, saavat siirtyä noin 1 tunnin ajan. Vyöhykkeiden esiintyminen tehdään näkyväksi hopeanitraattireagenssilla. Lipaasin pH on välillä 5,7-7,1. Useiden vyöhykkeiden esiintyminen tällä pH-kentällä aiheutuu proteiiniin sitoutuneiden sokeriketjujen heterogeenisyydestä.

10 g. Lipolyttisessä aktiivisuudessa olevien oleellisten aminohappojen määrittäminen

Tässä kokeessa lisätään lipaasiin tai lipaasiuuteeseen reagenssi, joka pystyy sulkemaan entsyymin aktiivisuuden. Käytetyt reagenssit ovat DNTB (5,5'-ditiobis-2-nitrobentsoehappo) ja 4 PDS (4,4'-ditiopyridiini), jotka tietyissä olosuhteissa kiinnittyvät proteiinin vapaisiin sulfhydrisiin ryhmiin. Sitoutumisen seurauksena näistä reagensseista vapautuu seuraavat värilliset ryhmät:

20 DNTB vapauttaa 5-tio-3-nitrobentsoehapon, joka voidaan mitata aallonpituudella 420 nm;

4 PDS vapauttaa 4-tiopyridoniryhmän, joka voidaan havaita ja jonka määrä voidaan määrittää aallonpituudella 324 nm.

Siten 1 millilitran spektrofotometrikyvetissä inkuboidaan tris HCl 0,25 mol puskurissa jonka pH on 8, hapan lipaasi ja reagenssiylimäärä. Eri aikoina mitataan vapautuneen aineosan absorptio ja konsentraatio lasketaan molaa-

(E 1_{cm}, M = 13 600 aallonpituudella 420 nm)

(E 1_{cm}, M = 19 800 aallonpituudella 324 nm)

30 samanaikaisesti otetaan näyte ja siten on mahdollista mitata jäljellä oleva lipolyttinen aktiivisuus a-kohdassa esitetyllä menetelmällä. Puhdistetun lipaasin lipaasiaktiivisuus estyy kokonaan näiden reagenssien vaikutuksesta.

35 Lisäksi laskujen avulla on mahdollista määrittää, että yksi tietty vapaa sulfhydryyliryhmä ottaa osaa lipolyttiseen aktiivisuuteen ja kysäinen ryhmä kuuluu aminohapolle kyste-

iini. Lipaasiuutteet, jotka käsitellään samoissa olosuhteissa, estyvät samalla tavalla.

h. Proteaasien kestävyuden määrittäminen

5 Tämä tutkimus suoritettiin sian pepsiinillä, joka erittyy vatsassa, sian kymotrypsiinillä ja trypsiinillä, joita erittyy haiman vaikutuksesta pohjukaissuolessa.

Lipaasiuutteita ja lipaasia inkuboidaan 2 tuntia pH:ssa 7,5 kymotrypsiinille ja trypsiinille ja pH:ssa 2 pepsiinille 37°C:ssa. Näytteitä otetaan säännöllisesti 15 minuutin välein ja jäljellä oleva lipaasiaktiivisuus määritetään kohdassa a. esitetyllä menetelmällä.

Siten 2 mg pepsiiniä sekoitetaan 3 mg lipaasia tai lipaasiuutetta puskurissa, jonka pH-arvo on 2. Samalla tavalla sekoitetaan 2 mg trypsiiniä tai kymotrypsiiniä 15 3 mg:aan lipaasia tai lipaasiuutteita, jonka pH-arvo on 7. Vertailuna käytetty aktiivisuus määritettiin kohdassa c.

Pepsiiniä käytettäessä pysyy alkuperäinen aktiivisuus muuttumattomana 2 tuntia. Kahden tunnin lopussa pienee aktiivisuus kymotrypsiinin läsnäollessa 50 %:lla ja 20 trypsiini tuhoaa lipaasin aktiivisuuden kokonaan 2 tunnissa.

i. Sokerien läsnäolon määrittäminen

Tähän tutkimukseen kuuluu proteiiniin sitoutuneiden sokeriketjujen hydrolysointi spesifisellä endoglykosidiasilla, ENDOF, entsyymillä, joka on liittynyt kahteen N-asetyyli-glukosamiiniin.

Menetelmässä määritetään näennäinen molekyylipaino tuotteelle, joka on saatu tällä entsyymillä käsitelystä lipaasista. Hydrolyysin ja menetelmässä d. esitetyn menetelmän mukaisen käsittelyn jälkeen esiintyy pääasiallinen intensiteettivyö, joka vastaa molekyylipainoa, joka on pienempi kuin alkuperäiselle entsyymille havaittu ja joka on noin 40 000 daltonia. Lisäksi aminohappokoostumus tekee mahdolliseksi määrittää kunkin aminohapon painon perusteella proteiinin painoksi noin 40 000 daltonia. Ero Laemmlin 35 menetelmällä määritettyyn painoon on noin 9 000 daltonia ja vastaa entsyymin sokeriosaa.

Puhdistettu lipaasi on tehnyt mahdolliseksi määrittää lipaasin biokemialliset ominaisuudet, nimittäin sen aminohappokoostumus ja N-päätteinen osa.

5 Aminohappokoostumus määritettiin proteiinin hydrolyysin jälkeen, joka suoritettiin kloorivetyhapolla, 24, 38 ja 72 tunnin ajanhetkillä. Tämän jälkeen hydrolysaatit analysoitiin menetelmällä, jonka ovat esittäneet D.H. Spackmann, W.H. Stein ja S. Moore (Anal. Chem., 1957, 228, s. 999) automaattisella aminohappoanalysaattorilla (Spinco-
10 Beckman), analyttiset tulokset käsiteltiin sitten menetelmällä, jonka on esittänyt M. Delaage, (Biochem. Biophys. Acta, 1968, 168, s. 573).

Kysteiinijäännökset määritetään performiaattihapetuksella ja tryptofaanit hydrolyysillä merkaptotaanisulfonihapon läsnäollessa menetelmän mukaisesti, jonka ovat
15 esittäneet B. Penke, R. Ferenzi ja K. Fouacs (Analytical Biochemistry, 1974, 60, sivut 45-50).

Erilaisten määritettyjen aminohappotyyppien lukumäärät olivat seuraavat: Asp. Asn-45; Thr-19; Ser-28;
20 Glx-30; Pro-29; Gly-25; Ala-28; Val-27; Met-8; Ile-18; Leu-26; Tyr-16; Phe-18; Lys-17; His-7; Arg-10; Cys-9; Trp-6.

Proteiinin N-päätteinen osa määritettiin menetelmän mukaisesti, jonka on esittänyt Fred.S. Esch (Anal. Biochem., 1984, 136, sivut 39-47). 30 aminohapon muodostama päätösosa on seuraava: Lys-Ser-Ala-Pro-Thr-Asn-Pro-Glu-Val-Asn-Met-X-Ile-Ser-Glu-Met-Ile-Ser-Tyr-Trp-Gly-Tyr-Pro-Ser-Glu-Lys-Tyr-Glu-Val-Val.
25 (X = määrittämätön).

30 Seuraavat esimerkit valaisevat kyseistä keksintöä.

Esimerkki 1

Ei-delipidoituja lipaasiuutteita, jotka on valmistettu menetelmän A mukaisesti

2-3 kuukautta vanhojen kaniinien vatsoja kerätään teurastamosta. Ylin kolmannes pohjukasta avataan ja sen sisältö tyhjennetään. Kudokset jäädytetään -20°C :seen ja paloittelallaan sitten osiin, jotka ovat pienempiä kuin 2 cm.

Homogenointi ja uuttaminen happamassa väliaineessa menetelmän A mukaisesti

160 g paloitteluja kudoksia lisätään 600 ml:aan kloorivetyhappoliuosta pH:ssa 2,5, lämpötilassa $10-12^{\circ}\text{C}$ ja sisältäen 0,06 % p/p pepsiiniä. Homogenointi suoritetaan lämpötilassa, joka on lähellä 20°C sekoittaen seosta 45 minuuttia noin 900 kierrosta minuutissa käyttäen ruuvisekoitinta.

Liukenematon aine erotetaan sentrifugoimalla 500 kpm 30 minuuttia. Vaalean keltainen, pinnalla oleva happofaasi erotetaan:

- tilavuus: 540 ml
- spesifinen aktiivisuus:
- kokonaisaktiivisuus: 175 000 yksikköä

Ammoniumsulfaattisaostus

Sekoittaen lämpötilassa 12°C lisätään hitaasti 147 g ammoniumsulfaattia happamaan liuokseen, joka on saatu edellä esitetyn menetelmän aikana. Lisäyksen jälkeen liuos jätetään 15 minuutiksi 15°C :seen. Suolakseen muutettu saostuma erotetaan sentrifugoimalla 3500 kpm 20 minuuttia.

Pohjalla oleva tuote, joka sisältää entsyymifraktion, liuotetaan 175 ml:aan fosfaattipuskuria pH:ssa 6. Näin saadaan vaalean keltainen, kirkas liuos, jossa on vähän mekaanisia epäpuhtauksia.

- tilavuus: 175 ml
- spesifinen aktiivisuus:
- kokonaisaktiivisuus: 124 250 yksikköä

Esimerkki 2

Ei-delipidoitu, rikastettu lipaasiuute, joka on valmistettu menetelmän B mukaisesti

5 Edellä esitetty liuos suodatetaan suodattimilla, joiden huokoisuus on 5,un.

Näin saatu liuos puhdistetaan kromatografoimalla Sepharyl S 300 geelillä, jota toimittaa Pharmacia (korkeus 1 metri, tilavuus 7,5 litraa), eluoiden jo aikaisemmin esitetyllä puskurilla pH:ssa 6 ja virtausnopeudella 115
10 ml/h. Etsityn lipaasiaktiivisuuden havaitaan esiintyvän ensimmäiseksi kerätyissä fraktioissa. Nämä fraktiot otetaan talteen, jolloin saadaan homogeeninen fraktio.

- tilavuus: 830 ml

- spesifinen lipaasiaktiivisuus:

15 - kokonaislipaasiaktiivisuus: 100 642 yksikköä

Tämän konsentroidun, suolasta vapautetun liuoksen avulla on mahdollista saada 317 g vaalean keltaista, amorfista jauhetta ei-delipidoidusta uutteesta, jonka entsyymiaktiivisuus on 98 000 yksikköä ja spesifinen aktiivisuus
20 31 yksikköä jauheen mg kohti.

Erilaisten pH-arvojen aktiivisuus

pH 3: 4 503 yksikköä

pH 5: 8 750 yksikköä

pH 7: 4 412 yksikköä

25 Happamien pH-arvojen kestävyys

pH ajanhetkellä: 0 8 300 yksikköä

: 2 tuntia 8 000 yksikköä

Aktiivisuus triglyserideille, joilla on seuraavat ketjut:

30 lyhyt: 8 750 yksikköä

keskipitkä: 6 829 yksikköä

pitkä: 3 233 yksikköä

Aktiivisuuden estyminen kysteiinien spesifisillä reagensseilla

35 Lipaasiaktiivisuus estyy täysin pH:ssa 8 reagenssilla DNTB.

Proteaasin vaikutus

Huonontuminen

- nolla pepsiinillä,
 - 40-50 % kymotrypsiinillä,
 - 5 - täydellinen estyminen trypsiinillä edellä esite-
- tyissä olosuhteissa.

LipiditasoEsimerkki 3

10 Delipidoitu lipaasiuute, joka on valmistettu mene-
telmän A mukaisesti

a. Valmistaminen

Teurastamolta otetaan talteen syötävät sisälmysten
osat kaniineilta, jotka ovat Janny-lajia tai maatiaislajia
ja joiden ikä on 2-3 kuukautta. Vatsat käsitellään poistaen
15 kaikki epäpuhtaudet kuten myös ruokatorven, suolen ja per-
nan osat.

Homogenointi, dehydraus ja delipidointi

225 g kudosta jauhetaan 5°C:ssa 2 250 ml:ssa aseto-
nia liekin/räjähdyksen kestävässä astiassa 30 sekuntia
20 30 000 kpm. Liukenematon aine suodatetaan tyhjössä Büchner-
suodattimella ja pestään 100 ml:lla kylmää asetonia. Liu-
kenematon aine otetaan talteen ja menetelmä toistetaan sa-
moissa olosuhteissa peräkkäin seuraavilla delipidointiliuot-
timilla: asetonilla (3 kertaa), kloroformi (3 kertaa) ja
25 dietyylieetteri (3 kertaa).

Lopuksi jauhe kuivataan vakuumissa eksikkaattorissa
vakiopainoon: paino 45 g.

b. Menetelmä AUuttaminen happamassa vesiliuoksessa

30 Delipidoitu jauhe lisätään 1 125 ml:aan kloorivety-
liuosta, jonka pH on 2,5 ja joka etukäteen on jäädytetty
5°C:seen. Seosta sekoitetaan 4°C:ssa 30 minuuttia ja sitten
liukenematon fraktio erotetaan sentrifugoimalla 10 000
kpm 30 minuuttia. Vesifaasi erotetaan.

- 35
- tilavuus: 1 125 ml
 - spesifinen lipaasiaktiivisuus: 7 U/proteiini mg
 - kokonaislipaasiaktiivisuus 75 000 U

Aktiivisuus säilyi muuttumattomana sen jälkeen kun oli inkuboitu 2 tuntia 37°C:ssa ja pH:ssa 2.

Ammoniumsulfaattisaostus

5 Sekoittaen lämpötilassa 4°C lisätään vähitellen 352 g ammoniumsulfaattia happamaan liuokseen, joka saatiin edellisen menetelmän aikana. Lisäämisen jälkeen seos jätetään 30 minuutiksi samaan lämpötilaan ja sentrifugoidaan sitten 10 000 kpm 30 minuuttia.

10 Pinnalla oleva aine dekantoidaan ja sentrifugoinnissa pohjalla oleva aine, joka sisältää entsyymifraktion, liuotetaan 300 ml:aan vettä. Liuoksen entsymaattiset ominaisuudet määritetään:

- spesifinen lipaasiaktiivisuus: 73 U/proteiini mg
- kokonaislipaasiaktiivisuus: 37 500 U

15 Tämä liuos käytetään suoraan puhdistukseen menetelmän B mukaisesti kuten esitetään esimerkissä 4, kun sille ensin suoritetaan seuraava käsittely. Liuoksessa oleva ammoniumsulfaatti poistetaan dialysoimalla 4°C:ssa ja siihen lisätään sekoittaen 15 litraa puskuriliuosta pH:ssa 4 (20 mmol/l natriumasetaattia, 100 mmol/l natriumkloridia ja etikkahappoa kunnes pH on 4). Tunnin kuluttua poistetaan puskuri ja menetelmä toistetaan kahdesti, siten että puskuri välillä uudistetaan. Lopuksi saadaan 300 ml lipaasiaktiivista liuosta, josta ammoniumsulfaatti on poistettu.

20 Tämä liuos puhdistetaan kuten esitetään seuraavassa esimerkissä.

Esimerkki 4

Rikastettu lipaasiuute, joka on valmistettu menetelmän B mukaisesti:

30 Ioninvaihtokromatografia

Puhdistaminen suoritetaan Fast Flow Sepharose pylväällä (toimittaa Pharmacia), jossa on 60 ml geeliä ja jonka halkaisija on 26 mm.

35 Pylväs on tasapainoitettu pH 4:n puskurilla valmiiksi käytettäväksi dialyysiä varten, virtausnopeudella 100 ml/h. Tämän jälkeen sisään lasketaan 300 ml liuosta ja

eluointia jatketaan samoissa olosuhteissa pH 4:n liuoksella ja sen jälkeen toisella liuoksella, jossa on 20 mmol/l natriumasetaattia ja 200 mmol/l natriumkloridia pH-arvossa 6,5.

5 Eluoidaan 480 ml, jonka jälkeen otetaan talteen 40 ml eluaattia, joka sisältää lipaasiaktiivisuuden, jolla on seuraavat ominaisuudet:

- spesifinen aktiivisuus: 350 U/proteiini mg
- kokonaislipaasiaktiivisuus: 28 000 U

10 Liuoksen avulla, joka on jäädytetty ja sitten lyofilisoitu, on mahdollista saada 2,8 g rikastettua uutetta, jonka rikastettu lipaasiaktiivisuus on 10 000 U/g tuotetta.

Esimerkki 5

Lipaasiuute, joka on valmistettu menetelmällä A

15 a. Valmistus

50 g tuotetta, joka on identtistä esimerkin 2 tuotteen kanssa, homogenisoidaan ja dehydrataan ja osittain delipidoidaan asetonilla esimerkissä 2 annetun menetelmän mukaisesti. Jäännösvesi ja asetoni poistetaan vakuuissa 20 40 millibarissa ja 25°C:ssa, jonka jälkeen saadaan 10 g tuotetta, joka käsitellään menetelmän A mukaisesti.

b. Menetelmä A

Käytetään myös esimerkin 2 mukaisesti

Uuttaminen happamassa vesiliuoksessa

25 - havaittu tilavuus: 222 ml
- spesifinen lipaasiaktiivisuus: 2,6 U/mg proteiinia
- kokonaislipaasiaktiivisuus: 8 850 U

Ammoniumsulfaattisaostus

30 Sentrifugoinnin jälkeen otetaan pohjalla oleva aine 19 ml:aan puskuriliuosta (150 mmol/l natriumkloridia, pH säädetty arvoon 3 etikkahapolla):

- spesifinen lipaasiaktiivisuus: 17 U/mg proteiinia
- kokonaislipaasiaktiivisuus: 6 550 U

35 Liuos käytetään sellaisenaan esimerkissä 6 esitetyssä menetelmässä.

Esimerkki 6

Puhdas lipaasi, joka on valmistettu menetelmällä B
Suodatus molekyyliseulalla

Edellisessä esimerkissä saatu liuos puhdistetaan

- 5 Sephacryl S 200 geeliliuoksella (toimittaa Pharmacia), jonka halkaisija on 26 cm ja korkeus 1 m, käyttäen eluoi-
seen puskuria, jonka pH on 3 ja joka on aikaisemmin esitet-
ty, käyttäen virtausnopeutta 16 ml/h. 300 ml:n eluaatin
jälkeen saadaan 50 ml:n liuos, joka sisältää puhdistetun
10 lipaasiaktiivisuuden:

- spesifinen lipaasiaktiivisuus: 257 U/mg proteiinia
- kokonaislipaasiaktiivisuus: 4 550 U

Ioninvaihtokromatografia

Menetelmä suoritetaan käyttäen mono S Fast Flow

- 15 pylvästä (toimittaa Pharmacia) tilavuuden ollessa 0,98 ml.
Aikaisemmin saatu 50 ml:n liuos lisätään pylvääseen, suori-
tetaan eluointi nopeudella 1 ml/min käyttäen pH 4:n pusku-
riliuosta (20 mmol/litra natriumasettaattia, jossa on lineaa-
rinen natriumkloridigradientti välillä 0-500 mmol/litra).
20 Lipaasi eluoidaan konsentraatiolla 250 mmol/litra natrium-
kloridia tilavuuden ollessa 20 ml. Saadulla tuotteella on
seuraavat ominaisuudet:

- kokonaisproteiinipaino: 3,4 mg
- spesifinen lipaasiaktiivisuus: 1 067 U/mg proteiinia
- 25 - kokonaislipaasiaktiivisuus: 3 630 U
- näennäinen molekyylipaino: 48 000

(Laemmlin menetelmä)

Aktiivisuus erilaisilla pH-arvoilla

- 30 pH 3: 100 yksikköä
pH 5: 170 yksikköä
pH 7: 85 yksikköä

Kestävyys happamia pH-arvoja vastaan

pH 2 ajanhetkellä: 0 150 yksikköä
2 h 145 yksikköä

35 Molekyylipaino

Molekyylipainovyöhyke on 49 000:ssa.

Aktiivisuus triglyserideille, joilla on seuraavat ketjut:

lyhyt: 1 200 yksikköä

keskipitkä: 760 yksikköä

pitkä: 300 yksikköä

Isoelektrisen pH:n määrittäminen

12 vyöhykettä välillä 5,7-7,1.

Aktiivisuuden estyminen kysteiinien spesifisillä reagensseilla

DNTB: estyminen 240 minuutissa ja yksi molekyyli DNTB:ta ehkäisee yhtä moolia lipaasia.

4PDS: estyminen 60 minuutissa ja yksi molekyyli 4PDS:aa estää yhtä moolia lipaasia.

Proteaasin vaikutus

Huonontuminen

- nolla pepsiinillä

- välillä 40-50 % kymotrypsiinillä

- täydellinen estyminen trypsiinillä edellä esitetyissä menetelmäolosuhteissa.

Sokerien läsnäolon määrittäminen

Alkuperäisen elektroforeettiselle geelille lisätyn lipaasin molekyyllipainovyö on 49 000. Kun inkuboidaan endo F:llä erilaisia aikoja, saadaan vyö, jonka intensiteetti kasvaa ajan mukana ja vastaten molekyyllipainoa 40 000 daltonia.

Esimerkki 7

Lipaasiuute, joka on valmistettu menetelmän A mukaisesti

Valmistaminen suoritetaan käyttäen hevosen syötäviä limakalvoja käyttäen suoraan menetelmää A.

Uuttaminen happamassa vesiliuoksessa

228 g syötäviä hevosen limakalvojen kappaleita pienennettyinä noin 1 cm² kappaleisiin, lisätään 910 ml:aan vettä, joka on jäähdytetty 4°C:seen, seoksen pH säädetään arvoon 2,5 ± 0,1 lisäämällä 37 % konsentroitua kloorivetyhappoa (p/til). Jauhetaan 4°C:ssa 30 000 kpm 30 sekuntia

ja 2 minuutin väliajoin. Jauhettua ainetta sekoitetaan sähkömagneettisella sekoittimella 40 minuuttia ja sitten happoliuos erotetaan sentrifugoimalla 10 000 kpm 30 minuuttia.

- 5 892 ml happoliuosta sisältää lipaasiaktiivisia aineita määränä 15,5 spesifistä yksikköä liuoksen millilitraa kohti tai 0,74 spesifistä yksikköä proteiinin mg kohti. Kokonaisspesifinen lipaasiaktiivisuus 13 800 U.

Ammoniumsulfaattisaostus

- 10 Sekoittaen sähkömagneettisesti 4^oC:ssa lisätään 500 g ammoniumsulfaattia edellä esitettyyn happoliuokseen. Sekoittamista jatketaan 30 minuuttia tässä lämpötilassa ja sitten liukenematon aine erotetaan sentrifugoimalla 10 000 kpm 30 minuuttia. Pohjalla oleva aine otetaan talteen 50 ml:aan 9 % natriumkloridiliuosta ja seos sentrifugoidaan jälleen samoissa olosuhteissa.
- 15

Pinnalla oleva aine sisältää rikastetun lipaasiaktiivisuuden:

- tilavuus: 51 ml
- spesifinen lipaasiaktiivisuus: 192 U/ml-5,6 U/mg proteiinia
- 20 - kokonaislipaasiaktiivisuus: 9 800 U

Tämä liuos voidaan käsitellä jo aikaisemmin esitetyn menetelmän mukaisesti, jolloin saadaan kiinteä tuote.

Esimerkki 8

- 25 Käytetään kaniinin vatsoja kuten käytetään esimerkiksi 1. Ontelo (osa A) erotetaan pohjukasta (osa B). Pohjukka itse segmentoidaan neljään yhtä suureen osaan leikaten elimen leveyssuuntaan (B₁, B₂, B₃, B₄ luokiteltuna ontelosta). Nämä erilaiset kudokset käsitellään samoin kuin esimerkiksi 1. Kussakin happouutteessa havaitut lipaasi-
- 30 aktiivisuudet määritetään Gargouri-menetelmällä ja näin saadaan seuraavat tulokset:

- A = 0
- B₁ = 0
- B₂ = 0
- 35 B₃ = 0
- B₄ = 6 000 yksikköä

Lipaasiaktiivisuus sijaitsee pohjukan ylimmässä osassa.

Eläinten myrkyttömyyden takia on keksinnön tuotteilla edullisia vaikutuksia ihmisen ruoansulatuksen sairaal-

5 loisiin tiloihin.

Myrkyllisyystutkimus suoritettiin 7-8 viikkoa vanhoilla Wistar-rotilla, joille suun kautta annosteltiin vesiliuosta, joka oli kyllästetty lipaasiuutteella, jota oli saatu kaniinien vatsoista, määränä 1 ml, jossa on 50

10 lipaasiyksikköä eläimen 100 g:n painoa kohti ja tätä annostelua jatkettiin 4 viikkoa.

Käsittelyn lopuksi suoritettiin seuraavat OCDE:n suosittamat tutkimukset: elävän eläimen hematologiset tutkimukset, biokemialliset tutkimukset, veri- ja virtsatut-

15 kimukset ja kuolleelle eläimelle kudospatologiset tutkimukset.

Verrattuina käsittelemättömiin vertailueläimiin, ei havaittu mitään poikkeamia eläimillä, jotka olivat saaneet lipaasiuutetta. Nämä tutkimukset ja eläinten täydellisen sietokyky hoidon aikana osoittavat, ettei tuote ole

20 myrkyllinen tai haitallinen.

Tutkittiin myös keksinnön mukaisten tuotteiden tehokkuutta ihmisen ruoansulatustauksissa joko yksin tai liittyneinä muihin entsyymeihin.

Tuotteita annetaan joko jauheena tai kapsleina määränä 300-6000 lipaasiyksikköä päivässä potilaan tilan mukaisesti potilaille, joiden iät olivat välillä 18-75 vuotta ja jotka kärsivät alkoholiperäisestä kroonisesta haimatulehduksesta. Potilaat, joilla ennen hoitoa oli

25 rasvaripuli, joka oli yhtä suuri tai suurempi kuin 10g/24 tuntia, saivat tuotteet aterioiden aikana tai sekoitettuna ruokaan 6 kuukauden aikana.

30

Useimmissa tapauksissa havaittiin rasvaripulin vähenemistä ja vastaava vaikutus ulosteiden tiheydessä ja painossa. Samalla tavalla vähenivät epämiellyttävät oireet kuten vatsakivut ja turpoaminen. Vastaavasti havaittiin

35

painon lisääntymistä. Intoleranssia ei havaittu tämän tutkimuksen aikana, ja se tuo esille tutkittavien tuotteiden tehokkuutta ja tilanne oli sama myös verrattaessa muihin entsyymeihin kuten pankreatiineihin, joilla ei saavutettu tällaista merkittävää parantavaa vaikutusta potilaiden yleistilassa.

Lisäksi pieniä lapsia, jotka kärsivät sitkeälimais-eritetaudista ja joiden rasvanabsorptiokerroin oli alle 90 %, käsiteltiin 14 päivää tuotteella annosten ollessa verrattavissa edellä esitettyyn kokeeseen. Tämän tutkimuksen aikana ulosteiden lipiditaso, niiden paino ja päivittäinen lukumäärä mitattiin ja arvioitiin kipuja ja vatsan turpoamista. Havaittiin merkittävää paranemista rasvaripulissa ja yleisessä tilassa. Jälleen olivat keksinnön mukaiset tuotteet tehokkaampia kuin pankreatiini.

Keksinnön tuotteita annosteltiin lääkeaineen muodossa, niiden muodon vaihdellessa hoidettavan sairauden luonteen ja vakavuuden mukaisesti. Siten käytettiin tabletteja, gelatiinipäällysteisiä pillereitä, pehmeitä kapseleita, rakeita, mikrorakeita tai osittain nestemäisiä muotoja kuten siirappeja, suspensioita ja geelejä.

Lipaasiuutteita voidaan lisätä erilaisiin aineisiin, joiden aktiivisuus liittyy oireisiin, jotka liittyvät ruoan absorption oireistoon. Siten on mahdollista käyttää ruoansulatusta suojaavia aineita, vatsahaavaa vastustavia aineita, närästystä vastustavia aineita ja muita ruoansulatuksessa aktiivisia entsyymejä.

Edellä esitetyt lääkeaineiden muodot valmistetaan tavallisten menetelmien mukaisesti ja käyttäen farmaseutissa käytännössä tavallisesti käytettyjä lisäaineita kuten neutraaleja aineita, joiden avulla voidaan sopivasti laimentaa aktiiviset aineosat, kuten laktoosi, sakkaroosi, sorbitoli, mannitoli, tärkkelys, selluloosa tai suolat kuten fosfaatit. Voidaan käyttää myös hajottavia, sitovia tai liukastavia aineita. Valinnaisesti voivat valmistetut muodot olla sokerilla päällystettyjä tabletteja tai ne

voidaan päällystää vesiliukoisella kalvolla. Näiden päällysteiden tehtävänä on peittää valmisteen mahdollinen epämiellyttävä maku.

5 Edellä esitetyissä nestemuodoissa, jotka ovat erityisen käyttökelpoisia lapsilla ja vanhuksilla, sisältävät edullisesti makuaineita ja väriaineita, jotta niille saadaan miellyttävät organoleptiset ominaisuudet.

10 Erilaisten valmistesten stabiilisuus voidaan varmistaa lisäämällä antioksidantteja tai säilöntäaineita kuten tokoferoli, askorbiinihappo, sorbiinihappo, sen suolat, jne.

Seuraavat tabletit ja jauheet esitetään, jotta voitaisiin paremmin kuvailla lääkeaineita, jotka sisältävät keksinnön tuotteita.

15 Tabletit

Muoto, jossa yhteen 180 mg tablettiin on lisätty 1000 lipaasiyksikköä.

Esimerkin 3 tuote, jossa on 73 U/mg proteiinia.

Määrä, joka riittää 1000 yksiköksi, siis 100 mg:

20	- maissitärkkelys	22 mg
	- dikalsiumfosfaatti	30 mg
	- mikrokiteinen selluloosa	15 mg
	- piidioksidi	12 mg
	- magnesiumstearaatti	1 mg

25 Valmistaminen

Lukuunottamatta magnesiumstearaattia sekoitetaan tabletit huolellisesti, tuote puristetaan yhteen ja kalibroidaan sitten seulan läpi, jonka mesh-koko on 1 mm.

30 Saadut rakeet voidellaan lisäämällä magnesiumstearaattia ja puristetaan sitten pyörivällä koneella 180 mg käsittäviksi yksiköiksi.

Jauhe

Muoto 1 g:n jauheelle, johon on lisätty 400 lipaasiyksikköä grammaa kohti.

35 Tuote esimerkistä 5, jossa on 17 U/mg proteiinia:

- 400 yksikköön riittävä määrä siis 0,8215 g
- askorbiinihappo 0,0025 g
- laktoosi 0,0760 g
- luonnon appelsiiniaromi jauheena 0,1000 g

5 Valmistaminen

Aineosat lisätään peräkkäin sopivaan ruostumatto-
masta teräksestä valmistettuun sekoittimeen. Homogenoidaan
ja sitten seos jaetaan ruskeisiin lasipulloihin, jotka
suljetaan hermeettisesti.

10 Lääkeaine sisältää siten 56-82 p-% aktiivista
aineosaa ja 44-18 p-% lisäainetta.

Kuten tässä on esitetty, on keksinnön mukaisten
tuotteiden myrkyllisyys merkityksetöntä, joten on mahdol-
lista erityisen tapauksen vaikeuden takia annostella 300
15 yksiköstä alkaen enemmän kuin 6000 yksikköä lipaasia päi-
vässä.

Tämä annoksen suuruus riippuu potilaan iästä ja
yleisemmin päivittäinen annos on 600-4000 lipaasiyksikköä,
jotka tavallisesti annostellaan kolme kertaa päivittäin
20 ruokien yhteydessä.

Farmaseuttiset koostumukset, jotka sisältävät kek-
sinnön mukaisesti valmistettuja tuotteita sopivat erityi-
sesti hoidettaessa häiriötiloja, jotka liittyvät rasva-ainei-
den huonoon absorptioon, erityisesti eri tyyppisissä haima-
25 tulehduksissa kuten alkoholiperäisessä, perinnöllisessä,
hyperkalsemiassa liikakalsiumverisyyden aiheuttamassa tai
trooppisessa haimatulehduksessa.

Niitä käytetään tavallisesti parannusvaiheena leik-
kauksen jälkeen kuten vatsanpoistossa ja haiman täydelli-
30 sessä poistamisessa, joka voi johtaa rasvaripuliin.

Ne soveltuvat myös sitkeälimaiseresairauteen ja
lipaasiin, kolipaasiin ja suolen liikkeen vajavuuteen.

Näihin sairauksiin liittyviä oireita ovat tavalli-
sesti rasvaripuli, ripuli, vatsakivut ja vajaaravitsemus-
35 tilat. Nämä oireet vähenevät hoidettaessa keksinnön mukai-

sesti valmistetuilla tuotteilla käyttäen sopivia annoksia ja annosteltuna riittävän kauan.

5 Yleisesti kyseiset koostumukset ovat käyttökelpoisia ja suositeltavia liittyneinä ruoansulatuksen rasva-aineiden assimiloitumiseen. Lisäksi näitä tuotteita voidaan antaa tavallisille ihmisille säätelemään ja/tai täydentämään rasvahappojen luonnollista assimiloitumista ja siten sää-
tämään ja/tai lisäämään henkilöiden energian tarpeita.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä lipaasiuutteiden tai lipaasin valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että

- 5 a) lipaasiuutteen saamiseksi saatetaan täysikavuisen hevosen tai kaniinin mahanpohjukoita kosketukseen happaman vesiväliäinen kanssa, jonka pH on 1,5-5, määränä 10 tilavuusosaa hapanta väliainetta 1 pohjukan paino-osaa kohti lämpötilassa 4-30 °C 1 minuutista 15 tuntiin kestäväksi ajaksi, jolloin saadaan kiinteitä aineita ja vesipitoinen liuos, joka sisältää lipaasiosan,
- 10 erotetaan vesipitoinen liuos kiinteistä aineista, jolloin saadaan erillinen vesipitoinen liuos,
- lisätään erilliseen vesipitoiseen liuokseen sopiva määrä vesiliukoista suolaa ja annetaan olla siinä sopiva aika, jotta halutusta lipaasiuutteesta muodostuu suola ja jotta saadaan pinnalla oleva liuos, ja
- 15 erotetaan haluttu lipaasiuute pinnalla olevasta liuoksesta ja otetaan se talteen;
- 20 b) suolasta vapautetun lipaasiuutteen saamiseksi liuotetaan lipaasiuute vesipitoiseen faasiin, suodatetaan vesipitoinen faasi käyttäen kalvoa, jonka läpäisyraja on 5 000-10 000 daltonia, jolloin saadaan suolasta vapautetun lipaasiuutteen liuos, ja
- 25 lyofilisoidaan suolasta vapautettu lipaasiuute-liuos suolasta vapautetuksi lipaasiuutteeksi;
- c) delipidoidun lipaasiuutteen saamiseksi suoritetaan delipidointitoimenpide jollekin kiinteistä osista, jotka sisältävät lipaasiuutteen, joka on
- 30 saatu mahanpohjukasta, lipaasiuutteelle ja suolasta vapautetulle lipaasiuutteelle;
- d) ei-delipidoidun, rikastetun lipaasiuutteen saamiseksi,
- liuotetaan lipaasiuute puskuriin, jonka pH on
- 35 2-7, jolloin saadaan puskuroitu liuos,

kromatografoidaan puskuroitu liuos, jonka pH on 2-7, käyttäen molekyyliseulaa, jonka raja-arvo ylittää 1 000 000 daltonia, ja otetaan talteen poistettu lipaasi-fraktio, joka sisältää ei-delipidoidun, rikastetun lipaasiuutteen puskuroidussa liuoksessa,

suodatetaan poistettu eluointifraktio käyttäen kalvoa, jonka läpäisyraja on 10 000 daltonia, jolloin saadaan suolasta vapautettu fraktio, ja

lyofilisoidaan tämä suolasta vapautettu fraktio halutuksi, ei-delipidoiduksi, rikastetuksi lipaasiuutteenksi;

e) delipidoidun, rikastetun lipaasiuutteen saamiseksi,

e)1 liuotetaan lipaasiuute veteen, jolloin saadaan vesipitoinen liuos, joka sisältää lipaasiuutteen,

suodatetaan vesipitoinen liuos, joka sisältää lipaasiuutteen, käyttäen kalvoa, jonka läpäisyraja on 5 000-10 000 daltonia, jolloin saadaan liuos, joka ei sisällä suolaa,

adsorboidaan suolaa sisältämätön liuos ioninvaihtokantajalle,

desorboidaan kantaja eluointiaineella, jonka ionivahvuus kasvaa progressiivisesti ajan funktiona,

otetaan talteen eluointifraktio, jolla on lipaasiaktiivisuutta ja joka sisältää delipidoidun, rikastetun lipaasiuutteen,

suodatetaan eluointifraktio, jolla on lipaasiaktiivisuutta, käyttäen kalvoa, jonka läpäisyraja on 5 000-10 000 daltonia, jolloin saadaan suolasta vapautettu eluointifraktio ja

lyofilisoidaan eluointifraktio halutuksi, delipidoiduksi, rikastetuksi lipaasiuutteenksi tai

e)2 kromatografoidaan puskuroitu liuos, jonka pH on 2-7 ja joka on saatu kohdassa d), käyttäen molekyyliseulaa,

otetaan talteen pidätetty eluointifraktio, joka vastaa molekyylipainoja 30 000-55 000 daltonia ja joka sisältää delipidoidun, rikastetun lipaasiuutteen,

5 suodatetaan pidätetty eluointifraktio, joka vastaa molekyylipainoja 30 000-55 000 ja joka sisältää rikastetun lipaasiuutteen, käyttäen kalvoa, jonka läpäisyraja on 5 000-10 000 daltonia, jolloin saadaan suolatonta, delipidoitua, rikastettua lipaasiuuteliuosta, ja

10 lyofilisoidaan suolasta vapautettu, delipidoitu, rikastettu lipaasiuute;

f) lipaasin saamiseksi

f)1 käyttäen perustana eluointifraktiota, jolla on lipaasiaktiivisuutta ja joka sisältää delipidoidun, rikastetun lipaasiuutteen, joka on saatu edellä kohdassa e)1,

15 kromatografoidaan käyttäen molekyyliseulaa, otetaan talteen pidätetty eluointifraktio, joka vastaa molekyylipainoja 45 000-50 000 daltonia ja joka sisältää lipaasin,

20 suodatetaan kyseinen eluointifraktio, joka sisältää lipaasin, käyttäen kalvoa, jonka läpäisyraja on 5 000-10 000 daltonia, jolloin saadaan suolasta vapautettu liuos, joka sisältää lipaasin, ja

25 lyofilisoidaan suolasta vapautettu liuos, joka sisältää lipaasin, tai

f)2 käyttäen perustana pidätettyä eluointifraktiota, joka vastaa molekyylipainoja 30 000-55 000 daltonia ja joka sisältää delipidoidun, rikastetun lipaasiuutteen, joka on saatu edellä kohdassa e)2,

30 adsorboidaan se ioninvaihtokantajalle,

desorboidaan kantaja eluointiaineella, jonka ioniväkevyys kasvaa progressiivisesti ajan funktiona,

otetaan talteen eluointifraktio, jolla on lipaasiaktiivisuutta ja joka sisältää lipaasin,

35 suodatetaan eluointifraktio, jolla on lipaasiaktiivisuutta ja joka sisältää lipaasin, käyttäen kalvoa,

jonka läpäisyraja on 5 000-10 000 daltonia, jolloin saadaan suolasta vapautettu eluointifraktio, joka sisältää lipaasin, ja

5 lyofilisoidaan suolasta vapautettu eluointifraktio, joka sisältää lipaasin, jolloin saadaan haluttu lipaasi.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kohdassa a) kosketus vesivä-

10 liaineen kanssa suoritetaan lämpötilassa 4-20 °C.

3. Patenttivaatimusten 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vesipitoinen liuos erotetaan kiinteistä aineista suodattamalla, dekantoimalla tai sen-

15 trifugoimalla lämpötilassa, joka on alle 25 °C ja edullisesti 4-20 °C.

4. Jonkin patenttivaatimuksen 1-3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että lisätään 80-700g vesiliukoisia suoloja ja että ne jätetään 15 minuutista 20 tuntiin lämpötilaan 0-20 °C.

5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että suolat ovat magnesium-, ka-

20 lium-, natrium- ja edullisesti ammoniumsuoloja ja moniarvoisia anioneja, erityisesti fosfaatteja ja sulfaatteja.

6. Jonkin edellä olevan patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että delipidointitoimenpide suoritetaan saattamalla kiinteät osat koske-

25 tukseen liuottimien kanssa, jotka pystyvät liuottamaan rasva-aineita, kuten hiilivetyjen, eettereiden, ketonien, alkoholien tai hiilihalogenidien kanssa, joiden kiehumispiste on alle 80 °C.

7. Jonkin edellä olevan patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että adsorptiot ioninvaihtokantajalle suoritetaan käyttämällä kationin-

30 vaihtokantajaa.

8. Jonkin edellä olevan patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että ennen pohju-

35

koiden saattamista kosketukseen happaman vesiväliaineen kanssa ne paloitteltaan alle 1 cm:n kokoisiksi kappaleiksi.

Patentkrav

1. Förfarande för framställning av lipasextrakt eller lipas, k ä n n e t e c k n a t därav, att man

5

a) för framställning av ett lipasextrakt,

bringar magfundus från fullvuxen häst eller kanin i kontakt med ett surt vattenmedium med ett pH av 1,5-5 i en mängd av 10 volymdelar surt medium per 1 viktdel fundus vid en temperatur av 4-30 °C under en tid från 1 minut till 15 timmar, varvid erhålls fasta ämnen och en vattenhaltig lösning innehållande en lipasdel,

10

separerar den vattenhaltiga lösningen från de fasta ämnena, varvid erhålls en separat vattenhaltig lösning,

15

sätter till den separata vattenhaltiga lösningen en lämplig mängd vattenlösligt salt och lämnar det däri under en lämplig tid för att av lipasextraktet bilda ett salt och för att erhålla en supernatantlösning, och

separerar det önskade lipasextraktet från supernatantlösningen och tillvaratar detsamma;

20

b) för erhållande av ett från salt frigjort lipasextrakt,

löser lipasextraktet i en vattenhaltig fas,

filtrerar den vattenhaltiga fasen under användning av en membran med en genomsläpplighetsgräns av 5000-10000 dalton, varvid erhålls en lösning av ett från salt frigjort lipasextrakt, och

25

lyofiliserar den från salt frigjorda lipasextraktlösningen till från salt frigjort lipasextrakt;

30

c) för erhållande av ett delipiderat lipasextrakt,

underkastar någon av de fasta delarna innehållande lipasextraktet, som erhållits från magfundus, lipasextraktet och det från salt frigjorda lipasextraktet en delipideringsoperation;

35

d) för erhållande av ett icke-delipiderat, anrikt lipasextrakt,

löser lipasextraktet i en buffert med ett pH av 2-7, varvid erhålls en buffrad lösning,

kromatograferar den buffrade lösningen med ett pH av 2-7 under användning av en molekylsil med ett gränsvärde överstigande 1000000 dalton och tillvaratar den avlägsnade lipasfraktionen, som innehåller det icke-delipiderade, anrikade lipasextraktet i buffrad lösning,

filtrerar den avlägsnade elueringsfraktionen under användning av en membran med en genomsläpplighetsgräns av 10000 dalton, varvid erhålls en från salt frigjord fraktion, och

lyofiliserar denna från salt frigjorda fraktion till det önskade, icke-delipiderade anrikade lipasextraktet;

e) för erhållande av ett delipiderat, anrikat lipasextrakt,

e)1 löser lipasextraktet i vatten, varvid erhålls en vattenhaltig lösning innehållande lipasextraktet,

filtrerar den vattenhaltiga lösningen innehållande lipasextraktet under användning av en membran med en genomsläpplighetsgräns av 5000-10000 dalton, varvid erhålls en lösning, som ej innehåller salt,

adsorberar den saltfria lösningen på en jonbytbärare,

desorberar bäraren med ett elueringsmedel med en jonstyrka, som ökar progressivt som en funktion av tiden,

tillvaratar en elueringsfraktion med lipasaktivitet och innehållande det delipiderade, anrikade lipasextraktet,

filtrerar elueringsfraktionen med lipasaktivitet under användning av en membran med en genomsläpplighetsgräns av 5000-10000 dalton, varvid erhålls en från salt frigjord fraktion, och

lyofiliserar elueringsfraktionen till det önskade, delipiderade, anrikade lipasextraktet, eller

e)2 kromatograferar den buffrade lösningen med ett pH av 2-7, vilken erhållits i punkt d), under användning av en molekylsil,

tillvaratar den kvarhållna elueringsfraktionen, som motsvarar molekylvikter av 30000-55000 och som innehåller det delipiderade, anrikade lipasextraktet,

filtrerar den kvarhållna elueringsfraktionen motsvarande molekylvikter av 30000-55000 och innehållande det anrikade lipasextraktet under användning av en membran med en genomsläpplighetsgräns av 5000-10000 dalton, varvid erhålls en saltfri, delipiderad, anrikad lipasextraktlösning, och

lyofiliserar det från salt frigjorda, delipiderade, anrikade lipasextraktet;

f) för erhållande av lipasen,

f)1 genom att som bas använda elueringsfraktionen med lipasaktivitet och innehållande det delipiderade, anrikade lipasextraktet, som erhållits i punkt e)1,

kromatograferar under användning av en molekylsil,

tillvaratar en kvarhållen elueringsfraktion, som motsvarar molekylvikter av 45000-50000 dalton och som innehåller lipasen,

filtrerar ifrågavarande elueringsfraktion innehållande lipasen under användning av en membran med en genomsläpplighetsgräns av 5000-10000 dalton, varvid erhålls en från salt frigjord lösning innehållande lipasen, och

lyofiliserar den från salt frigjorda lösningen innehållande lipasen, eller

f)2 genom att som bas använda elueringsfraktionen motvarande molekylvikter av 30000-55000 dalton och innehållande det delipiderade, anrikade lipasextraktet, som erhållits ovan i punkt e)2,

adsorberar denna på en jonbytarbärare,

desorberar bäraren med ett elueringsmedel med en jonstyrka, som ökar progressivt som en funktion av tiden,

tillvaratar en elueringsfraktion med lipasaktivitet och innehållande lipasen,

filtrerar elueringsfraktionen med lipasaktivitet och innehållande lipasen under användning av en membran
5 med en genomsläpplighetsgräns av 5000-10000 dalton, varvid erhålls en från salt frigjord elueringsfraktion innehållande lipasen, och

lyofiliserar den från salt frigjorda elueringsfraktionen innehållande lipasen, varvid erhålls den öns-
10 kade lipasen.

2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att i punkt a) kontakten med vattenmediumet utförs vid en temperatur av 4-20 °C.

3. Förfarande enligt patentkravet 1 eller 2,
15 k ä n n e t e c k n a t därav, att den vattenhaltiga lösningen separeras från de fasta ämnena genom filtrering, dekantering eller centrifugering vid en temperatur, som är under 25 °C och företrädesvis 4-20 °C.

4. Förfarande enligt något av patentkraven 1-3,
20 k ä n n e t e c k n a t därav, att 80-700 g vattenlösliga salter tillsätts och dessa får vara från 15 minuter till 20 timmar vid en temperatur av 0-20 °C.

5. Förfarande enligt patentkravet 4, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att salterna är magnesium-, kalium-,
25 natrium- och företrädesvis ammoniumsalter och flervärda anjoner, speciellt fosfater och sulfater.

6. Förfarande enligt något av föregående patentkrav,
30 k ä n n e t e c k n a t därav, att delipideringsoperationen utförs genom att bringa de fasta delarna i kontakt med lösningsmedel, som förmår lösa fettämnen, såsom med kolväten, etrar, ketoner, alkoholer eller kolhalogenider, vilka har en kokpunkt under 80 °C.

7. Förfarande enligt något av föregående patentkrav,
35 k ä n n e t e c k n a t därav, att adsorptionerna på jonbytarbäraren utförs genom att använda en katjonbytarbärare.

8. Förfarande enligt något av föregående patentkrav, k ä n n e t e c k n a t därav, att fundus uppdelas i stycken med en storlek under 1 cm innan fundus bringas i kontakt med det sura vattenmediumet.