

(19) DANMARK



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT



(11) 158334 B

(21) Patentansøgning nr.: 5771/81

(22) Indleveringsdag: 23 dec 1981

(24) Løbedag: 29 apr 1981

(41) Alm. tilgængelig: 23 dec 1981

(44) Fremlagt: 07 maj 1990

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 29 apr 1980 SE 8003253 29 apr 1980 SE 8003256

(71) Ansøger: Ulf *Rothman; Box 120; 230 10 Skanoer, SE

(72) Opfinder: Ulf Sven Erik *Rothman; SE

(51) Int.Cl.⁵

A 61 K 39/00

A 61 K 39/395

A 61 K 35/56

C 07 K 15/08

(74) Fuldmægtig: Plougmann & Vingtoft Patentbureau

(54) Fremgangsmåde til fremstilling af polypeptidfraktioner fra muslinger

(56) Fremdragne publikationer

NO pat. nr. 57780
Andre publikationer. Chemical Abstract Vol. 85 (1976)
abstract no. 90466, Biochem. Soc. Trans. 1976, 4(3),
473-5 (Eng.)
Chemical Abstract Vol. 72 (1970). abstract no. 29217,
Drugs Sea, Trans. Symp. 1987 (Pub. 1968). 141-50 (Eng.)
Chemical Abstract Vol. 66 (1967), abstract no. 17178,
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 123(2), 299-302 (1966) (Eng.)
Chemical Abstract Vol. 63 (1965) no. 8908h, Ann. N.Y.
Acad. Sci. 118(15), 603-10 (1965) (Eng.)
Chemical Abstract Vol. 88 (1978) abstract no. 35740, J.
Invertebr. Pathol. 1977, 30(3), 406-13 (Eng.)
Patent Abstract of Japan, abstract 54-41314,
54-413115, 54-160709, 55-53219
Biochemical Journal Vol. 175, p. 467-77, publ. 1978,
Baldo B. A. et al., "Purification and Characterization
of a Galactan-Reactive Agglutinin from the Clam
Tridacna Maxima (Röding) and a Study of its Combining
Site"
Glyconjugata Research, 01.1. p. 459-89, publ. 1979,
(Proceedings of the Fourth International Symposium on
Glyco conjugates), Sharon N., "Possible functions of
lectins in microorganisms, Plants and Animals"

(57) Sammendrag:

5771-81

Polypeptidfraktioner, der er isoleret fra kropsvæsker hos muslinger, især Mytilus-arter, f.eks. blåmuslinger (Mytilus edulis), er i stand til biospecifikt at binde sialinsyre. Polypeptidsyrefraktionerne er virksomme mod et bredt spektrum af virus, bakterier og protozoer. Disse polypeptidfraktioner kan derfor anvendes som antimikrobielle lægemidler, der kan anvendes til at reducere mikrobers infektionsmuligheder.

DK 158334 B

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til fremstilling af en polypeptidfraktion til anvendelse som antimikrobielt lægemiddel, hvilken fraktion er isoleret ud fra legemsvæskerne i muslinger af arten *Mytilus*, især blåmuslinger (*Mytilus edulis*), og er i stand til biospecifikt at binde mindst én sialinsyre i nærværelse af calciumioner, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved, at legemsvæskerne fra muslinger opsamles, og at der af den deraf dannede ekstrakt isoleres mindst én polypeptidfraktion, som biospecifikt kan binde mindst én sialinsyre.

10 Influenzaepidemier er et stort problem, som man har forsøgt at løse ved vacciner med vacciner, der er fremstillet ved kendte metoder, f.eks. ved dyrkning i hønseæg. Dette frembyder imidlertid store vanskeligheder, da de fremstillede vacciner kun bliver virksomme mod den specielt anvendte virustype. Således er det nødvendigt at frem-
15 stille en særskilt vaccine for hver speciel virustype. Dette er højst utilfredsstillende i praksis, eftersom influenzavirus - og andre virus - let muterer til en ny type, som forbliver upåvirket af den pågældende vaccine. Fremstillingen af influenzavaccine ud fra levende virus er desuden kompliceret, og den fremstillede vaccine indeholder
20 uønskede forureninger, som giver uønskede bivirkninger, og som kan begrænse den immuniseringseffekt, der kan opnås. Disse problemer er til en vis grad løst, idet der er udviklet metoder til isolering af immunogene komponenter fra influenzavirus, hæmagglutinin og neuraminidase; jfr. f.eks. USA patentskrift nr. 4.064.232. Selv om man på
25 denne måde har elimineret en del af ulemperne ved konventionelle influenzavacciner, er der stadig det problem, at vaccins effekt er begrænset til en speciel virustype. Desuden er fremstillingsmetoden kompliceret, og det er også her nødvendigt at arbejde med levende virus.

30 Bakterieinfektioner er sædvanligt forekommende og udgør også et problem, der er svært at løse. F.eks. er sårinfektioner af forskellige patogene bakteriestammer en meget frygtet komplikation ved forskellige typer operationer ("hospitalsinfektion"). Dette problem er størst i dybe kaviteter og sår, hvilket gør, at konventionel behandling med antibiotika er meget svær at gennemføre. Desuden har mange
35 bakteriestammer gennem mutation udviklet antibiotikaresistens. For

mange antibiotika er effekten også begrænset til et smalt spektrum af bakterier. Der er indtil nu ikke fundet nogen tilfredsstillende løsning på disse og lignende problemer.

Der er således et stort behov for et middel, som giver effektiv immunbeskyttelse mod forskellige virustyper, og som desuden kan fremstilles i tilstrækkelige mængder og ved teknisk/økonomisk mulige metoder. Der er endvidere et stort behov for et antibakterielt middel, som er virksomt mod angreb af et bredt spektrum af patogene bakterier. Den foreliggende opfindelse har bl.a. til formål at løse disse problemer.

Den relevante teknik fremgår af NO 57.780, Chemical Abstracts, vol. 63, (1965) 8908h, Chemical Abstracts, vol. 66, (1967) 17.178, Chemical Abstracts, vol. 72, (1970) 29.217, Chemical Abstracts, vol. 85, (1976) 90.466, Chemical Abstracts, vol. 88, (1978) 35.740, Patent Abstract of Japan, nr. 54-41.314, Patent Abstract of Japan, nr. 54-41.315, Patent Abstract of Japan, nr. 54-160.709, Patent Abstract of Japan, nr. 55-53.219, Biochemical Journal, vol. 175 (1978) s. 467-477 og Glyconjugate Research, vol. 1 (1979) s. 459-489.

I det nævnte litteratursted i Biochemical Journal beskrives isolering af en polypeptidfraktion fra et toskallet skaldyr, *tridacna maxima*, hvilken fraktion omtales som besiddende interessante immunologiske egenskaber; denne kendte polypeptidfraktion er forskellig fra den foreliggende polypeptidfraktion.

Et råprodukt indeholdende en ifølge opfindelsen fremstillet polypeptidfraktion sammen med inaktive forurenninger har tidligere været isoleret fra hæmolympfen (legemsvæsken) hos blandt andre blåmuslinger (*Mytilus edulis*), og dets evne til at binde sialinsyre har været beskrevet (jfr. f.eks. Hardy et al., CA 85 (1976): 90466 p). Denne polypeptidfraktion har imidlertid hverken været anvendt eller foreslået til nogen praktisk anvendelse - f.eks. som lægemiddel - hverken i den kendte urene form eller i nogen (endnu ikke beskrevet) rensed form.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen til fremstilling af en polypeptidfraktion til anvendelse som antimikrobielt lægemiddel, hvilken fraktion er isoleret ud fra legemsvæskerne i muslinger af arten *Mytilus*, især blåmuslinger (*Mytilus edulis*), og er i stand til biospecifikt at
5 binde mindst én sialinsyre i nærværelse af calciumioner, er ejendommelig ved, at legemsvæskerne fra muslinger opsamles, og at der af den deraf dannede ekstrakt isoleres mindst én polypeptidfraktion, som biospecifikt kan binde mindst én sialinsyre.

Det ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen således fremstillede præparat indebærer en helt ny måde at angribe de ovennævnte problemer på. I modsætning til f.eks. kendt teknik på antivirksområdet anvendes der overhovedet ikke virus, hverken levende eller dræbt. Istedet udnyttes visse polypeptidfraktioner, som findes i forholdsvis store mængder i legemsvæskerne hos muslinger, især *Mytilus*arter. Disse
15 polypeptidfraktioner kan isoleres ved udnyttelse af i og for sig kendte og forholdsvis enkle separationsmetoder såsom søjlechromatografisk adskillelse.

De ifølge opfindelsen fremstillede polypeptidfraktioner er i nærværelse af calciumioner i stand til biospecifikt at binde sialinsyre.
20 Herved menes, at den pågældende polypeptidfraktion skal være i stand til biospecifikt at affinitetsbindes til i det mindste en aminosukker fra gruppen af sialinsyrer. Udtrykket "sialinsyrer" anvendes her i den almindeligt vedtagne betydning, nemlig N- og/eller O-substituerede acylderivater (f.eks. acetyl- og/eller glycylderivater) af neuraminsyre; jfr. f.eks. Sai-Sun Ng og Joel A. Dain, The natural
25 occurrence of sialic acids (1974) og The Merck Index, 9. udgave, 1976. Polypeptidfraktionernes nøjagtige kemiske opbygning er ikke kendt. Udtrykket "polypeptidfraktion" er derfor i den foreliggende sammenhæng ikke begrænset til polypeptider eller proteiner i den snævre
30 betydning, men omfatter alle fra muslinger isolerede fraktioner, som overvejende består af polypeptidsekvenser, og som biospecifikt kan affinitetsbinde sialinsyre. De ifølge opfindelsen fremstillede polypeptidfraktioner kan således f.eks. eventuelt omfatte glycoproteiner. Sådanne fragmenter eller undergrupper af de nævnte polypeptidfrak-
35 tioner, som er i stand til biospecifikt at binde sialinsyre i nærværelse af calciumioner, hvorhos undergrupperne fortrinsvis admini-

streres i nærværelse af calciumioner, kan især anvendes som antibakterielt middel.

Det har overraskende nok vist sig, at immunisering med de ovenfor definerede polypeptidfraktioner øger modstandskraften (immunbeskyttelsen) mod angreb fra et stort antal forskellige virustyper, f.eks. forskellige myxovirus, især forskellige typer influenzavirus. De pågældende polypeptidfraktioner kan derfor bl.a. anvendes som en praktisk taget ideel influenza-"vaccine", eftersom ét og samme produkt beskytter mod praktisk taget alle - måske til og med alle - typer influenzavirus, og også mod andre virustyper.

Det har endvidere overraskende nok vist sig, at de ovenfor definerede polypeptidfraktioner udgør et effektivt antibakterielt middel til behandling af legemsoverflader (inklusive legemshulheder og knogleoverflader), hvorfor midlet er virksomt mod angreb fra et stort antal forskellige patogene bakterier og andre mikroorganismer.

Årsagen til, at man ved immunisering ved hjælp af de ovenfor definerede polypeptidfraktioner opnår en virksom beskyttelse mod et bredt spektrum af virusinfektioner er ikke helt klarlagt. Nedenstående forsøg på en teoretisk forklaring af mekanismen for den iagttagne effekt skal derfor ikke betragtes som en begrænsning af opfindelsen. Mekanismebeskrivelsen angår især influenzavirus, men den kan på analog måde tillempes også andre virustyper.

Influenzavirus er bl.a. karakteriseret ved evnen til biospecifikt at bindes til sialinsyre. Denne egenskab er også af betydning for viruspartiklens evne til at formere sig ved indtrængen i kroppen. Herved kobles det sialinsyrespecifikke virus til forskellige slags kropsceller, som har sialinsyre i deres membran, hvorved virusets hæmagglutinindel kobles med sialinsyren. Årsagen til, at viruspartiklen kan trænge ind i cellen og derefter begynde at formere sig, er, at viruset indeholder enzymet neuraminidase, som sprænger sialinsyregrupperne bort fra cellemembranen under dannelse af et meget lille hul. På grund af virusets formering i cellen får patienten de sædvanlige influenzasymptomer og det påfølgende sygdomsforløb. Samtidig danner kroppen også antistoffer mod det pågældende virus, og en del

af disse antistoffer er rettet på hæmagglutiner på virusoverfladen, de såkaldte antihæmagglutinin-antistoffer. Ved et senere influenza-angreb af samme virustype vil disse antistoffer krydsreagere med hæmagglutininet på viruset. Denne krydsreaktivitet fører til, at

5 virusets hæmagglutinin hæmmes i sit forsøg på at koble sig med sialinsyren på cellerne. En analog reaktionsmekanisme gælder ved vaccination mod influenza med sædvanlig influenzavaccine. Ved injektion af en sådan vaccine danner kroppen bl.a. antistoffer, der er rettet mod det pågældende virus' hæmagglutinin. Ved en sådan vaccination får man

10 en relativt god beskyttelse mod det pågældende virus, men dog ikke så langvarig som ved en virusinfektion.

Ved injektion med en sialinsyrespecifik polypeptidfraktion af den ovenfor anførte art, vil kroppen danne antistoffer, der er rettet mod polypeptidfraktionen. En del af disse antipolypeptid-antistoffer vil

15 på tilsvarende måde som ved et sædvanligt influenzaangreb eller ved sædvanlig vaccination krydsreagere med hæmagglutininet på det angribende virus og på analog måde hindre virushæmagglutininet i at blive bundet til de sialinsyregrupper, som findes på forskellige typer af celler i kroppen. Sandsynligvis på grund af, at polypeptidfraktionerne hidrører fra et meget lavtstående dyr, bliver de aktuelle

20 antipolypeptid-antistoffer ikke specifikke for noget specielt virus, men de vil krydsreagere med hæmagglutininet hos et bredt spektrum af virus. Polypeptidfraktionernes evne til at krydsreagere med vacciner mod forskellige typer virus er påvist ved dyreforsøg,

25 som beskrives nærmere nedenfor.

Immuniseringsmidler, som indeholder de ovenfor definerede polypeptidfraktioner, kan anvendes præventivt til at forhindre opståen af virusinfektioner, men de kan også anvendes kurativt under igangværende sygdomstilstande. Her kan midlet administreres som ved sædvanlig

30 vaccination, dvs. f.eks. ved parenteral, fortrinsvis subcutan injektion af polypeptidfraktionen sammen med et egnet inert væskeformigt fortyndingsmiddel, f.eks. i en fysiologisk isotopisk opløsning, f.eks. 0,9%'s fysiologisk kogsaltopløsning, som eventuelt kan være pufret med f.eks. phosphatpuffer. Om nødvendigt kan der på i og for

35 sig kendt måde tilsættes forskellige tilsætningsstoffer, f.eks. konserveringsmidler. Midlet kan også indeholde sædvanlige immunolo-

giske adjuvanter såsom aluminiumhydroxid eller aluminiumphosphat. Ved parenteral injektion af polypeptidfraktionerne fremstillet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen er det normalt tilfredsstillende med doser på mellem 1 μ g og 1 g. Om nødvendigt kan injektionen gentages med f.eks. samme dosis med én eller flere ugers mellemrum. Det foretrækkes at injicere polypeptidfraktionerne fremstillet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen i form af en suspension i det nævnte inerte væskeformige fortyndingsmiddel. Dette kan f.eks. foregå ved justering af pH-værdien til det isoelektriske punkt, hvorved der fås en turbiditet eller suspension. Et egnet alternativ er at administrere polypeptidfraktionerne som depotpræparat, f.eks. ved binding til en bærer, såsom aluminiumhydroxid, hvilket er kendt i forbindelse med andre vacciner.

Det har overraskende nok vist sig, at de pågældende polypeptidfraktioner også giver en effektiv lokal immunbeskyttelse mod virusinfektioner i de øvre luft- eller slimveje (herunder lungerne) ved topisk applikation, f.eks. i form af en spray. Ved en sådan applikation kan polypeptidfraktionerne fremstillet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen anvendes både præventivt og kurativt under en igangværende infektion. En foretrukken administrationsmåde er nasal applikation, dvs. spraying i næse/mundhulen, med en foretrukken dosis på 1 - 1000 μ g én gang dagligt i 5 - 10 dage. Man kan i dette tilfælde tænke sig, at effekten opstår ved mindst to forskellige reaktionsmekanismer.

Ved præventiv behandling ved nasal applikation gentagne gange vil polypeptidfraktionerne fremstillet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen danne lokalt virkende antistoffer, og en del af disse vil analogt med den ovenstående mekanismebeskrivelse krydsreagere og hindre et angribende virus i at angribe de sialinsyregrupper, som er nødvendige for, at viruset kan overleve og formere sig. Ved en igangværende virusinfektion kan applikation af polypeptidfraktionerne fremstillet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen også hurtigt danne den type antistoffer og derved dæmpe det igangværende sygdomsforløb. En yderligere effekt kan tænkes at opstå ved en reaktionsmekanisme, som indebærer, at den sialinsyrespecifikke polypeptidfraktion fremstillet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen ved lokal applikation

bindes til de i luftvejene rigt forekommende sialinsyregrupper på cellerne i f.eks. spyt og i næse- og mundsekret. Kropscellernes sialinsyregrupper skulle herigennem blive "blokeret" og dermed hindre eller mindske muligheden for, at hæmagglutinet på viruspartiklerne
5 bindes til sialinsyregrupperne, hvilket er en forudsætning for virusets vækst. Denne mekanisme er ikke nogen immunologisk reaktion i egentlig forstand, men indebærer snarere en direkte "belægning" af celleoverfladen ved bindingen til dens sialinsyregrupper.

Årsagen til, at der ved behandling af legemsoverflader med de ovenfor
10 definerede polypeptidfraktioner opnås en virksom beskyttelse mod angreb - igangværende eller ventede - af et bredt spektrum af bakterier er ikke helt klarlagt. Følgende forsøg på en teoretisk forklaring af mekanismen for den observerede effekt skal derfor heller ikke betragtes som nogen begrænsning af opfindelsens omfang.

15 Selve reaktionsmekanismen for patogene bakteriers binding til sår-overflader og lignende er relativt ukendt, men det sker sandsynligvis ved en form for kobling, som involverer sialinsyre. Det er kendt, at alle patogene bakterier i deres cellemembran bl.a. har sialinsyre, og de har sandsynligvis også i deres kontaktplade ("attachment"-gruppe)
20 en type hæmagglutiner, som binder et eller andet sialinsyrederivat. Når man påfører de sialinsyrespecifikke muslingepolypeptidfraktioner fremstillet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen på f.eks. friske operationssår, bindes disse fraktioner derfor sandsynligvis til cellernes sialinsyregrupper. Herved kan patogene bakterier, som
25 invaderer såret, ikke bindes til cellerne (eftersom disse allerede er "blokerede" af polypeptidfraktionen). Dette indebærer, at bakterierne ikke kan formere sig, men dør, hvilket igen fører til, at såret læger hurtigere.

Hvis der allerede forekommer en bakterieinfektion i et sår, opstår
30 der ved behandling med den sialinsyrespecifikke polypeptidfraktion fremstillet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen sandsynligvis en udpræget konkurrence mellem polypeptidets sialinsyrespecificitet og bakteriernes specificitet. En yderligere tænkelig forklaring er, at polypeptidfraktionerne praktisk taget helt inhiberer bakteriernes

evne til at reagere videre med cellevæggen ved at få bakterierne (som har sialinsyre i deres membran) til at agglutinere.

Ved behandling af sår og andre legemsoverflader påfører man fortrinsvis polypeptidfraktionerne topisk på de pågældende legemsoverflader i form af en opløsning i et egnet fortyndingsmiddel, f.eks. i fysiologisk kogsaltopløsning eller steriliseret vand. Der anvendes til dette formål fortrinsvis et frysetørret præparat, som opløses i fortyndingsmidlet i tilslutning til applikationen, hvilket f.eks. kan ske ved pensling eller påsprøjtning. Behandlingen kan hensigtsmæssigt ske med doser på mellem 1 μ g og 1 g 1 - 3 gange dagligt, indtil infektionen er standset.

Ved behandling af tarminfektioner med polypeptidfraktionerne fremstillet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen kan man tænke sig lignende reaktionsmekanismer som ved sårbehandling. I tarmen findes normalt *Escherichia coli*-bakterier af forskellige stammer i fri tilstand, dvs. ikke hæftet på tarmvæggen. En del *Escherichia coli*-stammer har forskelligartet kemisk opbygning, som gør dem tilbøjelige til at fæstnes på tarmvæggen. Ved en sådan fastgørelse vil også bakteriofager angribe bakterierne, hvorved endotoxiner frigøres i tynd/tyktarmen og forårsager diarrétilstand. Ved tilførsel af polypeptidfraktioner fremstillet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen til tarmen kan disse dels bevirke agglutination af de patogene bakterier og derved inaktivere disse, dels blokere sialinsyren på tarmvæggen, så at bakterierne ikke kan angribe denne. Tilsvarende reaktionsmekanismer kan også udnyttes til f.eks. blæreskylning med polypeptidfraktioner fremstillet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen ved urinvejsinfektioner.

Ved behandling af tarminfektioner med polypeptidfraktionerne fremstillet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen er det væsentligt at sikre, at polypeptidfraktionerne passerer mavesækken intakt. Til dette formål indesluttet polypeptidfraktionerne (fortrinsvis i frysetørret form) hensigtsmæssigt i en syrefast kapsel, som kan passere den sure mavesaft uden at blive ødelagt, men som opløses i den alkaliske tarmvæske under frigørelse af polypeptidfraktionerne. En passende dosering er f.eks. 10 μ g - 1 g polypeptidfraktion/kapsel.

Som ovenfor anført isoleres de ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen fremstillede sialinsyrespecifikke polypeptidfraktioner fra muslinger af arten *Mytilus* såsom blåmuslinger (*Mytilus edulis*), *Mytilus perna*, *Mytilus gello provincialis*, *Mytilus Californianus*, *Mytilus smaragdinus*. Af interesse er først og fremmest sådanne arter, som er tilstrækkeligt rigeligt forekommende og let tilgængelige til at muliggøre fremstilling i industriel skala.

De pågældende polypeptidfraktioner isoleres fra legemsvæskerne i de angivne dyr. Med legemsvæsker menes her samtlige systemer hos disse lavtstående dyr, som svarer til blod-, lymfe- og kirtelsystemerne hos højerestående dyr. En oftest egnet isoleringsmetode er at danne en ekstrakt af disse legemsvæsker og eventuelt efter passende oparbejdning fraseparere den ønskede polypeptidfraktion ved affinitetschromatografi, f.eks. analogt med den nedenfor specielt for blåmuslinger angivne isoleringsmetode. Den rensede, sialinsyrespecifikke polypeptidfraktion pakkes hensigtsmæssigt som et frysetørret produkt i enkelt doser, hvorhos det frysetørrede produkt kan opløses i et passende fortyndingsmiddel i tilslutning til administrationen.

Opfindelsen beskrives nærmere i nedenstående udførelseseksempler:

EKSEMPEL 1

Levende blåmuslinger (*Mytilus edulis*) åbnes, og al væske og muskelvæv overføres til et centrifugeglas, som centrifugeres ved 4°C og 9000 omdrejninger/minut i 40 minutter. Den overstående væske opsamles og opvarmes til 45°C i 30 minutter for at ødelægge lytisk effekt. Den vundne opløsning centrifugeres igen ved 4°C og 9000 omdrejninger/minut i 30 minutter. Den overstående væske opsamles, og under omrøring tilsættes mættet ammoniumsulfatopløsning til en mætningskoncentration på 65%. Det vundne bundfald holdes ved stuetemperatur i 30 minutter og centrifugeres derefter ved 9000 omdrejninger/minut i 30 minutter. Den overstående væske kasseres, og det udfældede materiale opløses i 0,05M phosphatpuffer, pH-værdi 7,4, 0,05M natriumchlorid

(PBS) og dialyseres mod PBS. En frysetørret prøve af produktet er farveløst og let opløseligt i destilleret vand.

1,0 mg bovint submaxillært mucin (som er sialinsyreholdigt) kobles på i og for sig kendt måde til 30 g bromcyanaktiveret Sepharose® 4B (agarose, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sverige). Den dannede gel pakkes derefter i en gelfiltreringskolonne og indstilles på ligevægt med 0,05M tris-HCl, 0,1M natriumchlorid, 0,01M calciumdichloridpuffer, pH-værdi 8,5. 40 ml af den på den ovenfor beskrevne måde fremstillede, dialyserede polypeptidfraktion holdes på kolonnen, som elueres med den nævnte puffer (puffer A på tegningen). Eluatet fra kolonnen følges ved absorption ved 280 nm og opsamles i fraktioner. Efter eluering af en hovedfraktion af proteinerne (se top A på tegningen) udskiftes elueringspufferen til 0,05M tris-HCl, 1,0M NaCl, 0,01M calciumdichloridpuffer, pH-værdi 8,5 (puffer B på tegningen). Med denne puffer elueres et antal proteinholdige fraktioner, jfr. top B på tegningen. Til sidst elueres kolonnen med 0,05M tris-HCl, 1,0M NaCl-puffer, pH-værdi 8,5 (puffer C på tegningen), hvorved en mindre mængde protein elueres - se top C på tegningen. De opsamlede fraktioner (A, B og C) undersøges med henblik på hæmagglutinerende effekt. Hæmagglutinationstesten udføres ved den af S. Hammarström og E. A. Kabat i Biochemistry 8, 2696 (1969) beskrevne metode. Til dette formål anvendes mikrotiterplader og en 2%'s opløsning af humane erythrocyter tilhørende forskellige blodtyper i 0,9%'s natriumchlorid. Kun fraktion C agglutinerer røde blodlegemer, dvs. er sialinsyrespecifik (se kurven "opsamlet aggl." på tegningen).

Den aktive polypeptidfraktion C koncentrerer ti gange ved ultrafiltrering (Amicon UM 10 filter) og dialyseres til ligevægt mod 0,05M tris-HCl, pH-værdi 8,5; 0,15M natriumchlorid, 0,003M calciumchloridpuffer. Efter frysetørring fås et farveløst produkt, som er letopløseligt i vand.

Den isolerede sialinsyrespecifikke fraktions molekylvægt bestemmes ved SDS-polyacrylamidelektroforese ved anvendelse af gradientgelen PAA (polyacrylamid) 4/30 og molekylvægtskalibreringssæt (fra Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sverige). Ved elektroforesen fås fire bånd inden for molekylvægtsområdet 14.500 - 30.000. Disse bånd i

elektroforesen hidrører sandsynligvis fra såkaldte undergrupper i et større protein, som kan gendannes ved rekobling af undergrupperne i nærværelse af calciumioner.

Aminosyresammensætningen er undersøgt ved sædvanlig aminosyreanalyse.

- 5 Resultaterne er gengivet i nedenstående tabel. Der kunne ikke påvises aminosukker:

	Aminosyre	%	Aminosyre	%
10	Asp	16,5	Met	0,4
	Thr	5,5	Ile	4,3
	Ser	8,3	Leu	5,2
	Glu	10,8	Tyr	9,6
	Pro	3,3	Phe	5,6
	Gly	5,1	His	3,8
15	Ala	2,0	Lys	7,3
	Val	4,4	Arg	7,7

Polypeptidfraktionens isoelektriske punkt er 4,6.

EKSEMPEL 2

- Et til subcutan injektion egnet præparat fremstilles ved opløsning af
 20 150 µg frysetørret produkt ifølge eksempel 1 i 0,5 ml destilleret vand og justering af pH-værdien til 4,6 (turbiditet).

EKSEMPEL 3

- Et til nasal applikation egnet præparat kan fremstilles ved at opløse
 50 - 100 µg (engangs-dosis) fysetørret polypeptidfraktion ifølge
 25 eksempel 1 i 1 - 1,5 ml sterilt, destilleret vand. Præparatet fyldes på sprayflasker og appliceres hensigtsmæssigt ved spraying uden drivgas. Flerdosispakninger kan fremstilles ved proportional forøgelse af mængden af polypeptidfraktion og fortyndingsmiddel.

EKSEMPEL 4

Den hæmagglutinationshæmmende effekt ved immunisering med de ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen fremstillede polypeptidfraktioner er undersøgt på følgende måde:

- 5 2 mg frysetørret polypeptidfraktion (fremstillet ifølge eksempel 1) suspenderes i 0,5 ml fysiologisk kogsaltopløsning (0,9%) plus 0,5 ml Freund's adjuvans og injiceres subcutant ved flere injektioner på ryggen af 2 kaniner (hver med en vægt på 3 kg). 14 dage senere injiceres på samme måde yderligere 2 mg i hver kanin, dvs. i alt 4 mg
- 10 polypeptidfraktion til hver kanin. Der udtages blodprøve før første injektion og 3 uger derefter, og serumprøverne undersøges på Ouchterlony-plader. Det viser sig, at der sker udfældning mellem polypeptidfraktionen og 3-ugersserummet. Derimod er der ingen udfældning med serum taget før immuniseringen. Hver kanin tjener således som sin
- 15 egen kontrol.

- 3-Ugersserummet undersøges derefter ved en sædvanlig hæmagglutinationsinhiberingstest. Til dette formål anvendes som viruskilde følgende polyvalente influenzavacciner: 1) A-USSR-90,92,97-77(H1N1), 2) A-England-864-75(H3N2) og 3) B-Hongkong-8-73. Hver ml vaccine inde-
- 20 holder 50 μ g hæmagglutinin. Testen foretages på den måde, at man på et objektglas blander dels en dråbe vaccinesuspension, dels en dråbe 3-ugersserum fra de immuniserede kaniner, dels også en dråbe (omhyggeligt rensede) hundeerythrocyter opslået i fysiologisk kogsaltopløsning (2 vægt/volumenprocents suspension). Som kontrol anvendes
- 25 henholdsvis 1 dråbe 0,15M phosphatpuffer og nul-serum (dvs. serumprøve før immuseringen) fra kaninerne i stedet for 1 dråbe 3-ugersserum.

- Der sker ingen hæmagglutination med 3-ugersserum fra de immuniserede kaniner, medens der umiddelbart sker hæmagglutination (inden for 1 minut) ved samtlige kontroller. Der er ingen forskel mellem de to
- 30 kaniner. Disse resultater viser entydigt, at injektion af polypeptidfraktionen fremstillet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen har ført til dannelse af antistoffer, som er virksomme mod et bredt virus-spektrum.

EKSEMPEL 5

Et til sårbehandling egnet præparat fremstilles ved opløsning af 200 μg frysetørret polypeptidfraktion fra eksempel 1 i 1,5 ml steriliseret vand eller fysiologisk kogsaltopløsning.

5 EKSEMPEL 6

Et til oral behandling af tarminfektioner egnet præparat fremstilles ved at indhulle frysetørrede polypeptidfraktioner fra eksempel 1 i syrefaste kapsler, som i hovedsagen intakte passerer igennem den sure mavesaft, men som opløses i det alkaliske miljø i tynd- og tyktarmen under frigørelse af de indhyllede polypeptidfraktioner. En egnet dosering er f.eks. 200 -300 μg /kapsel.

10

EKSEMPEL 7

På to Sprague-Dawley-rotter (400 g) skæres på ryggen to sår ned til fascia (overflade $\approx 2,8 \text{ cm}^2$). For at forhindre kontaminering syes enkle sårringe fast og limes på kanten af såret. Et af sårene behandles med 0,2 ml 0,1%'s opløsning af den ifølge eksempel 1 isolerede polypeptidfraktion, medens det andet sår behandles med 0,2 ml 0,9%'s fysiologisk kogsaltopløsning. Gennemsigtige låg, som tillader inspektion af sårene, skrues fast på de to sårringe for at forhindre kontaminering. Hver dag i 5 dage behandles sårene med henholdsvis 0,2 ml polypeptidopløsning og 0,2 ml fysiologisk kogsaltopløsning. På dag nr. 1, 4, 6 og 8 udtages prøver med gelatinesprøjte fra såroverfladerne til bestemmelse af bakterieindholdet. Til prøven sættes fysiologisk kogsaltopløsning, og den inkuberes i 15 minutter i vandbad ved 37°C. Fortyndingsserier af prøven appliceres på agarplader, som inkuberes natten over ved 37°C. Koloniantallet tælles. Samtidig observeres sårhelingsforløbet. Der kan ikke iagttages nogen signifikant forskel med hensyn til bakterieindhold. I modsætning hertil iagttages en bedre og hurtigere helingsproces for det sår, som er

15

20

25

30

EKSEMPEL 8

På ryggen af fire Sprague-Dawley-rotter skæres 3 cm^2 store sår. På to af rotterne vaskes sårene med 0,2 ml 0,1%'s opløsning af det ifølge eksempel 1 fremstillede frysetørrede produkt. Efter 15 minutters for-
5 løb renses sårene igen med denne opløsning og efter yderligere 15 minutters forløb med 0,1 ml af opløsningen. Sårene på de to øvrige rotter vaskes med tilsvarende mængder 0,9%'s fysiologisk kogsaltopløsning på tilsvarende tidspunkter.

20 minutter efter den sidste vask inficeres samtlige sår med
10 $1,7 \times 10^4$ af bakterierne *Pseudomonas aeruginosa*. De to forsøgsrotters sår behandles 3 gange/dag med 0,2 ml polypeptidfraktionopløsning i 4 dage, medens kontrolrotterne derimod behandles med 0,2 ml fysiologisk kogsaltopløsning i 4 dage. Rotternes almentilstand observeres daglig i 7 dage. Kontrolrotterne opviser som resultat af infektionen næse-
15 blødninger, vægttab og alment dårlig helbredstilstand, medens behandlingsgruppen opviser uforandret almentilstand.

EKSEMPEL 9

På samme måde som i eksempel 1 opsamles og varmebehandles hæmolympfe fra *M. edulis*, og det vundne bundfald fjernes ved centrifugering.
20 30 ml af den således varmebehandlede hæmolympfe tilsættes 15 ml 0,2M tris-HCl-puffer, pH-værdi 9,3, hvorved pH-værdien i blandingen stiger til 8,5 (denne pH-værdi bør ligge i intervallet 8 - 9). Opløsningen afkøles til -5°C under magnetomrøring. Derefter tilsættes under magnetomrøring 15 ml koldt 53%'s ethanol via en peristaltisk pumpe
25 med en hastighed på 23,2 ml/time, hvorved der dannes et bundfald. Suspensionen lades henstå under magnetomrøring ved -5°C i yderligere 30 minutter. Derefter centrifugeres suspensionen ved 9000 omdrejninger/minut i 30 minutter ved -5°C . Det centrifugerede bundfald opslættes ved stuetemperatur i 6 ml 0,15M natriumchloridopløsning.
30 Suspensionen centrifugeres ved 20.000 omdrejninger/minut i 20 minutter ved 4°C . Den centrifugerede opløsning, hvis pH-værdi er 8,0,

filtreres gennem et 0,22 μ filter og frysetørres. Den sialinsyrebindende evne hos den fremstillede ekstrakt bestemmes ved evnen til at agglutinere en 2%'s suspension af humane røde blodlegemer i 0,15M natriumchloridopløsning. Synlig agglutination observeres endnu ved

5 256 ganges fortynding (1:256) af ekstrakten.

PATENTKRAV

1. Fremgangsmåde til fremstilling af en polypeptidfraktion til anvendelse som antimikrobielt lægemiddel, hvilken fraktion er isoleret ud fra legemsvæskerne i muslinger af arten *Mytilus*, især blåmuslinger

10 (*Mytilus edulis*), og er i stand til biospecifikt at binde mindst én sialinsyre i nærværelse af calciumioner,

k e n d e t e g n e t ved, at legemsvæskerne fra muslinger opsamles, og at der af den deraf dannede ekstrakt isoleres mindst én polypeptidfraktion, som biospecifikt kan binde mindst én sialinsyre.

