

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

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

(10) **FI 905300 A7**

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

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 905300

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
C11D 3/386
C11D 7/42
A01N 63/00

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date 26.10.1990

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 26.10.1990

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 28.04.1991

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 13.06.2019

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

27.10.1989 US 428361

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •The Procter & Gamble Company, One Procter & Gamble Plaza, Cincinnati, OH 45202, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
2 •Genencor International, Inc., 4 Cambridge Place, 1870 South Winton Road, ROCHESTER, NY 14618,
AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Carpenter, Richard Shepart, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
2 •Lad, Pushkaraj Jogannath, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
3 •Goldstein, Irwin J., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
4 •Wolff, Ann Margaret, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Menetelmä ja valmiste joissa käytetään tyyppiä II olevaa endoglykosidaasia

Förfarande och preparat baserade på endoglykosidas av typ II

p 37, 38, 42, 49, 51, 52

Menetelmä ja formulaatio, joissa käytetään tyyppin II endoglykosidaasia

5 Tämä keksintö koskee menetelmiä ja formulaatioita glykosidia sisältävien aineiden, kuten glykoproteiinien, poistamiseksi pinnoilta käsittelemällä tyyppin II endoglykosidaasilla yksin tai yhdistettynä toisiin entsyymeihin ja/tai puhdistusaineisiin.

10 Entsyymien käyttö proteiineista ja/tai hiilihydraateista koostuvien tahrojen poistamiseksi yhdessä eri puhdistusaineiden kanssa on hyvin tunnettua puhdistusaineformulaatioiden alalla. Tällaiset entsyymiformulaatiot on suunniteltu poistamaan erityyppisiä tahroja pehmeistä pinnoista, kuten kankaasta, ja kovista pinnoista, kuten posliinista ja metallista. Siten esimerkiksi proteaaseja, 15 kuten trypsiiniä, pankreatiinia, papaiinia ja bromelaiinia, on raportoidusti käytetty puhdistusaineformulaatioissa proteiinia sisältävien tahrojen poistamiseen vaihtelevantasoisella menestyksellä. Spesifisiä glykosidaaseja, 20 kuten sellulaasia, lysotsyymia, amylaasia ja glukanaasia on toisaalta formuloitu eri puhdistusaineiden kanssa tiettyjen hiilihydraattitahrojen poistamiseksi. Muut puhdistusainekoostumukset ovat yhdistäneet proteaaseja ja glykosidaaseja tahrojen käsittelyä varten.

25 Jotkin puhdistusainekoostumuksissa käytetyt glykosidaasit, esim. β -amylaasi, α -galaktosidaasi ja β -galaktosidaasi, ovat eksoglykosidaaseja, jotka katkaisevat irti yhden tai useamman terminaalisen sokeritähteen oligosakkaridista tai polysakkaridista. Toiset glykosidaasit, esim. 30 sellulaasi ja α -amylaasi, ovat endoglykosidaaseja, jotka ovat reaktiivisia spesifisten, oligo- tai polysakkaridi-substraatin sisäisten sidosten kanssa. Tällaisiin endoglykosidaaseihin viitataan tässä tyyppin I endoglykosidaaseina. Vaikka puhdistusaineformulaatiot, joissa on yksi tai 35 usempi proteaasi ja/tai glykosidaasi (mukaan lukien tyyppin

I endoglykosidaasit), ovat parantaneet huomattavasti tahrojen poistoa, monet tahrat, esim. veri-, ulostemateriaali- ja ruumiin lian tahrat, jättävät usein jäämätahrnan käsittelyn jälkeen.

5 Piilolinssien puhdistuksen alalla on käytetty samankaltaisia entsyymi/puhdistusaineformulaatioita kovien ja pehmeiden piilolinssien puhdistamiseksi ja steriloimiseksi. Monissa tapauksissa näitä formulaatioita on käytetty hajottamaan biokalvo, joka muodostuu piilolinssien pin-

10 nalle ja jota eri silmäpatogeenit, kuten Pseudomonas aeruginosa ja Staphylococcus epidermidis, käyttävät tällaiseen linssiin kiinnittymiseen. Ks. esim. Duran, J. A. ym. (1987), Arch. Ophthalmol., 105, 106 - 109; Stern, G. A. ym. (1987) Ophthalmology, 94, 115 - 119 (jossa raportoi-

15 daan musiinilla päällystettyjen piilolinssien käsittely eri entsyymeillä, kuten pankreatiinilla, papaiinilla, trypsiinillä ja neuraminidaasilla Pseudomonaksen kiinnittymisen inhiboimiseksi); ja Slucher, M. M. ym. (1987) Arch. Ophthalmol., 105, 110 - 115.

20 Biokalvojen käyttö mikrobien kiinnittymiseen ei rajoitu piilolinssihin. Siten Streptococcus mutans käyttää raportoidun mukaan solunulkoisia polysakkarideja hammaskiilteeseen kiinnittymiseen. EP-julkaisu nro 0 195 672 raportoi α -1,3-glukanaasin tai α -1,6-glukanaasin käytön

25 niiden solunulkoisten polysakkaridien pilkkomiseksi, joita Streptococcus mutans käyttää hammaskiilteeseen kiinnittymiseen.

Danielsson, A. ym. (1977), Botanica Marina, 20, 13 - 17, ovat myös raportoineet tiettyjen entsyymien vaikutuksen lasipinnoille kiinnittyneisiin soluihin. Siinä raportoidun mukaisesti merivedestä eristetyn Pseudomonas-lajin annettiin kiinnittyä aluslaseille. Sen jälkeen lase-

30 ja käsiteltiin joko pronaasilla, trypsiinillä, α -amylasilla (tyypin I endoglykosidaasi) tai lysotsyymillä (myös tyypin I endoglykosidaasi). Tässä raportissa käsittely

35

proteolyyttisillä entsyymeillä pronaasilla ja trypsiinillä johti siihen, että osa kiinnittyneiden bakteerien populaatiosta irtosi, kun taas soluja hajottavalla entsyymillä lysotsyymillä nähtiin proteolyyttisiin entsyymeihin verrattuna pienempi aktiivisuus. α -amylaasilla ei raportoidun mukaan ollut minkäänlaista aktiivisuutta.

Mikro-organismien piilolinsseihin, hammaskiilteen ja lasipintoihin kiinnittymisen lisäksi monet muut pinnat ovat alttiita mikrobien kiinnittymiselle. Ks. esim. Marrie, T. J. ym. (1984), J. Clin. Microbiology, 19, 991 - 914 (bakteerien kiinnittyminen sydämentahdistimen johtoihin ja paristoihin); Freimer, N. B. ym. (1978), Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. B, 86, 53 - 57 (mikro-organismien sitoutuminen makrofaageihin); ja Mirelman ym. (1982), Tokai J. Exp. Clin. Med., 7, 77 - 183 (mikrobien kiinnittyminen nisäkkäiden limakalvojen pinnoille). Useita mekanismeja on esitetty kuvaamaan mikro-organismien, kuten bakteerien, kiinnittymistä ei-biologisiin kiinteisiin pintoihin. Ks. esim. Fletcher, M. (1987), Microbiological Sciences, 4, 133 - 136, ja Duddridge, J. E. ym. (1983), Factors Affecting the Adhesion of Bacteria to Surfaces in Microbial Corrosion, Delco Printing Co., Ltd., s. 28 - 35. Vaikka näissä viitteissä pohditaan mikrobien kiinnittymistä eri pinnoille ja tekijöitä, jotka voivat liittyä tällaiseen kiinnittymiseen, niissä ei pohdita mikro-organismien kasvun torjuntaa tällaisilla pinnoilla tai niiden poistamista niistä.

Tyypin II endoglykosidaasit, kuten termiä tässä käytetään, ovat luokka endoglykosidaaseja, jotka pystyvät katkaisemaan spesifisiä glykoproteiineissa esiintyviä sisäisiä glykosidisia sidoksia. Nämä endoglykosidaasit pilkkovat glykoproteiinista hiilihydraattirakenneosan kokonaan tai osan siitä riippuen reaktiivisen glykosidisen sidoksen paikasta glykoproteiinissa. Esimerkkeihin kuuluvat endo- β -N-asetyyli-glukosaminidaasit (endo-D, endo-H, endo-L, endo-

- C_I, endo-C_{II}, Gal-tyyppinen endo-F ja endo-F) endo- α -N-asetyyligalaktosaminidaasi ja endo- β -galaktosidaasit. Ks. esim. Tarentino, A. L. ym. (1985), Biochemistry, 24, 4665 - 4671; Arakawa, M. ym. (1974), J. Biochem., 76, 307 - 317; Plummer, T. H. ym. (1984) J. Biol. Chem., 259, 10700 - 10704; Tarentino, A. L. ym. (1975), Biochem. Biophys. Res. Comm., 67, 455 - 462; ja Trimble, R. B. ym. (1984), Anal. Biochem., 141, 515 - 522; sekä J. G. Beeleyn "Glycoprotein and Proteoglycan Techniques" (1985), luku 6, s. 153 - 300, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford. Sen lisäksi, että ne ovat spesifisiä glykoproteiinien sisäisille glykosidisille sidoksille, ainakin yksi endoglykosidaasi (endo- β -N-asetyyliglukosaminidaasi H) on osoittanut spesifisyyttä, joka tuottaa lipidiin liitettyjen oligosakkaridien katkaisun (Chalifour, R. J. ym. (1983) Arch. Biochem. Biophys., 229, 386 - 394) ja raportoidun mukaan di-N-asetyylikitobioosisidosten katkaisun oligosakkariideissa ja glykoproteiineissa [Tarentino, A. L. (1974), J. Biol. Chem., 249, 811 - 817].
- 20 Tällaisia tyyppin II endoglykosidaaseja on yleensä käytetty pääasiassa analyyttisiin tarkoituksiin, esim. proteiinin tai hiilihydraatin sekvenssin ja/tai spesifisten glykoproteiinien rakenteen ja toiminnan määrittämiseen. Ks. esim. Hsieh, P. ym. (1983), J. Biol. Chem., 258, 2555 - 2561 ja Geyar, R. ym. (1984), Eur. J. Biochem., 143, 531 - 539. Tuoreessa raportissa tyyppin II endoglykosidaasia raportoidun mukaan käytettiin Leishmania mexicana amazonensis glykoproteiiniantigeenin analysoimiseen [Chin Shen Chang ym. (1986), Mol. Biochem. Parasitol., 18, 197 - 210]. Tämä glykoproteiiniantigeeni saatettiin ensin sitoutumaan immunologisesti immunoaffiniteettipallosiin ("immunobeads"). Sen jälkeen kun immunologisesti sitoutunut glykoproteiini oli saatettu reagoimaan analyyttisten endo-H-määrien kanssa, immunoaffiniteettipalloset pestiin
- 35 puskurilla, joka sisälsi 1 % SDS:ä polyakryyliamidigeeli-

elektroforeesin valmistelemiseksi. Analyysi paljasti molekyyllipainon pienenemisen, jonka katsottiin johtuvan hiilihydraatin irtoamisesta immunologisesti sitoutuneesta glykoproteiiniantigeenistä.

- 5 Kuitenkaan tyyppin II endoglykosidaaseja ei ole käytetty aineiden, mukaan luettuina glykoproteiinit ja glykolipidit, poistamiseen pinnoista ja aineista kuten kangas, piilolinssit, metallit, keraamiset aineet, solut, kudokset ja näiden kaltaiset. Niitä ei myöskään ole käytetty mikro-
- 10 organismien kasvun torjuntaan suspensiossa tai tällaisilla pinnoilla.

- Glykosidaaseja on käytetty yhdistelminä toisten entsyymien kanssa eri materiaalien poistoon. β -glykosidaasit kuvataan hiilihydraatteja metabolisoivina entsyymeinä
- 15 artikkelissa Anderson ym. (1964), Biochem. J., 90, 30. Neuraminidaasin (N-asetyylineuraminaattiglykohydrolaasin) inhibiittorit nähdään mahdollisina antiviraalisina ja antibakteriaalisina aineina artikkeleissa Khorlin ym. (1979), FEBS Letters, 8, 17, ja Haskell ym. (1970),
- 20 J. Med. Chem., 13, 48. Dekstranaasin kuvataan katalysoivan bakteerin polysakkaridin, dekstraanin (α -1,6-glukaanin), hydrolyysiä isomaltoosiyksiköiksi artikkelissa Chaiet ym. (1970), Appl. Microbiol., 20, 421. Lysotsyymien (muramidasiin) kuvataan hydrolysoivan glykosidisia sidoksia joukon
- 25 mikrobeja mukopolysakkaridisoluseinärakenteessa artikkeleissa Chipman ym. (1969), Science, 165, 454 ja Montague (1964) Biochem. Biophys. Acta, 86, 588. Lopuksi lysotsyymien inhibitio D-glukosamiinijohdannaisilla kuvataan artikkelissa Neuberger ym. (1967), Nature, 215, 524.

- 30 Tyyppin II endoglykosidaaseja, kuten endo- β -N-asetyyli-glukosaminidaaseja H, D, F ja/tai PNGaasi F:ä ei ole kuitenkaan aiemmin yhdistetty antimikrobisiin aineisiin antimikrobisten koostumusten muodostamiseksi.

- Edellä käsiteltyt viitteet annetaan ainoastaan siksi,
- 35 että ne on esitetty ennen käsillä olevan tapauksen

jättöpäivää, eikä mitään tässä pidä tulkita sen myöntämiseksi, että tällaiset viitteet ovat tekniikan taso, tai sen, että keksijöillä ei ole oikeutta olla tällaista esittämistä aikaisempia aikaisemman keksinnön tai aikaisemmin jätettyjen patenttihakemusten nojalla.

Keksinnön tarkoitus on tuoda käytettäväksi menetelmiä, joissa käytetään tyypin II endoglykosidaaseja yksin tai yhdistelminä toisten entsyymien, puhdistusaineiden, pinta-aktiivisten aineiden ja/tai disulfidinkatkaisureagenssien kanssa, helpottamaan aineiden, mukaan luettuina glykoproteiinit ja glykolipidit, poistamista sellaisilta materiaaleilta kuin kankaalta, piilolinsseiltä, metallipinnoilta, muovipinnoilta, keraamisilta pinnoilta, solujen pinnoilta, kudoksesta ja näiden kaltaisilta.

Lisäksi keksinnön tarkoitus on tuoda käytettäväksi sellaisia tyypin II endoglykosidaaseja sisältäviä formulaatioita, jotka ovat hyödyllisiä tällaisten menetelmien harjoittamisessa.

Keksinnön tarkoitusten mukaisesti tuodaan käytettäväksi menetelmiä ainakin osan ainetta poistamiseksi pinnalta, johon se on sitoutunut toisin kuin immunologisella sidoksella. Aineella on proksimaalinen, pintaan sitoutunut osa, distaalinen, proksimaalisesta osasta ulospäin suuntautunut osa ja proksimaalisen ja distaalisen osan liitokohdassa sijaitseva sidos, joka on reaktiivinen tyypin II endoglykosidaasin kanssa. Menetelmälle on tunnusomaista, että saatetaan sitoutunut aine yhteyteen tyypin II endoglykosidaasin kanssa aineen distaalisen osan katkaisemiseksi irti proksimaalisesta osasta, jolloin distaalinen osa vapautuu pinnalta. Jos tällainen vapauttaminen ei poista distaalista osaa pinnalta, tätä poistamista voidaan edesauttaa saattamalla distaalinen osa yhteyteen pesuliuoksen kanssa, puhdistusaineformulaation kanssa, mukaan lukien pinta-aktiivisia aineita sisältävät, tai toista

entsyymiä, kuten eri glykosidaasia, proteaasia, lipaasia tai näiden yhdistelmää sisältävän nesteen kanssa.

Lisäksi tähän keksintöön sisältyy menetelmä ainakin osan glykosidia sisältävästä aineesta vapauttamiseksi pinnasta, johon se on sitoutunut, saattamalla glykosidia sisältävä aine yhteyteen ainakin ensimmäisen ja toisen entsyymin kanssa glykosidia sisältävän aineen irti katkaistun osan vapauttamiseksi pinnalta. Ensimmäinen entsyymi on aineen glykosidiosassa olevan glykosidisen sidoksen kanssa reaktiivinen tyypin II endoglykosidaasi. Toinen entsyymi on reaktiivinen glykosidin sisältävän aineen toisen sidoksen kanssa, joka on eri kuin se glykosidinen sidos, jonka kanssa ensimmäinen entsyymi on reaktiivinen. Tällaisiin toisiin entsyymeihin voivat kuulua glykosidaasit (mukaan luettuna toinen tyypin II endoglykosidaasi), proteaasit, lipaasit ja näiden yhdistelmät. Glykosidin sisältävän aineen osan poistamista voidaan edesauttaa saattamalla irti katkaistu glykosidin sisältävä aine yhteyteen jonkin puhdistusaineen kanssa, mukaan luettuina pinta-aktiivista ainetta sisältävät.

Keksintö sisältää myös menetelmän, jolla vapautetaan pinnasta ainakin osa glykosidia sisältävästä aineesta, jossa on hiilihydraattiosa, aglykoniosa ja glykosidinen sidos hiilihydraattiosan ja aglykoniosan liitoskohdassa, silloin kun glykosidin sisältävä aine on sitoutunut pintaan hiilihydraattiosan välityksellä. Menetelmälle on tunnusomaista, että glykosidinen sidos katkaistaan tyypin II endoglykosidaasilla glykosidin sisältävän aineen aglykoniosan vapauttamiseksi pinnasta. Glykosidin sisältävän aineen poistamista voidaan tarvittaessa edesauttaa käsittelemällä toisella entsyymillä, puhdistusaineella ja/tai pinta-aktiivisella aineella.

Kaikissa edellä mainituissa menetelmissä disulfidinkatkaisureagenssia voidaan käyttää denaturoimaan glykosidin sisältävään aineeseen liittynyttä proteiinia ja si-

ten helpottaa katkaisua tyyppin II endoglykosidaasilla tai toisella entsyymillä tai poistamista puhdistusaineella ja/tai pinta-aktiivisella aineella.

5 Keksintöön kuuluu myös formulaatioita. Eräs koostumus käsittää ainakin ensimmäisen ja toisen entsyymin, joista ensimmäinen entsyymi on tyyppin II endoglykosidaasi. Toinen entsyymi valitaan ryhmästä, jonka muodostavat proteaasit, glykosidaasit, lipaasit ja näiden yhdistelmät. Tällaisiin formulaatioihin voi kuulua myös puhdistusaineita ja/tai pinta-aktiivisiä aineita sekä myös disulfidin-
10 katkaisureagensseja.

Toinen koostumus sisältää tyyppin II endoglykosidaasin ja puhdistusaineen ja/tai pinta-aktiivisen aineen.

15 Kuvio 1 esittää N-sidoksellisten ja O-sidoksellisten glykoproteiinien yhteistä ydinrakennetta.

Kuvio 2 esittää eri tyyppin II endoglykosidaasien substraatteja ja tunnettuja katkaisukohtia.

Kuvio 3 on kuvion 2 proteiinien aminohappojen, hiilihydraattitähteiden ja katkaisukohtien yleinen esitys.

20 Kuvio 4 esittää N-sidoksellisen glykoproteiinin ydinrakennetta, tyyppin II endoglykosidaasin katkaisukohtaa ja proteiini- ja hiilihydraattiyksiköiden sekä tyyppin II endoglykosidaasilla katkaistaessa muodostuvien aglykonien ja hiilihydraattiosien suhdetta toisiinsa.

25 Kuviot 5A - 5E esittävät eri mekanismeja, joilla glykosideja sisältävä aine, mikro-organismit tai tyyppin II endoglykosidaasin kanssa reaktiiviset aineet voidaan irrottaa pinnalta käsittelemällä tyyppin II endoglykosidaasilla pelkästään tai yhdistelmänä toisen entsyymin kanssa.

30 Kuviot 6A ja 6B ovat elektronimikroskooppikuvia (8100X) nailontilkuista, jotka on tahrattu ulosteella ja käsitelty endo-H:n ollessa läsnä tai ilman sitä.

Kuviot 7A - 7H ovat elektronimikroskooppikuvia (5000X), jotka osoittavat endo-H:n ja muiden hiilihydraa-

sientsyymien tehon puuvillatilkkuihin, jotka on tahrattu ulosteella.

Kuviot 8, 9, 10A ja 10B osoittavat endo-H:n ja klooriheksidiinin eri pitoisuuksien, yksin tai yhdistelmänä, vaikutuksen E. colin elinkykyisyyteen.

Kuviot 11 ja 12 osoittavat, että endo-H:ta sisältävä puhdistusainekoostumus on tehokkaampi poistamaan S. aureuksen sian iholta kuin puhdistusainekoostumus, joka ei sisällä endo-H:ta.

Kuvio 13 osoittaa, että endo-H on tehokkaampi irrottamaan hometta suihkuverhosta kuin vesi tai puhdistusainekoostumus. Keskiavalokuva on osasta suihkuverhoa. Muut neljä valokuvaa ovat suurennoksia vastaavista keskivalokuvan neljänneksistä.

Kuvio 14 osoittaa endo-H:n antimikrobisen tehon yhdessä eri antimikrobisten aineiden kanssa.

Kuviot 15A - B ja 16A - B osoittavat endo-H:n tehon eri hiivalajeihin.

Kuviot 17 ja 18 osoittavat ulosteen irtoavan tehokkaammin vaippamateriaalista puhdistusainekoostumuksella, joka sisältää endo-H:ta.

Tyyppin II endoglykosidaaseja sekä tällaisia endoglykosidaaseja käyttäviä formulaatioita käytetään tämän keksinnön mukaisissa menetelmissä irrottamaan ja/tai poistamaan pinnalta tyyppin II endoglykosidaasien kanssa reaktiivisia aineita. Tämän reaktiivisuuden mekanismia ei tunneta varmuudella. Joissakin tapauksissa tällaiset aineet ovat glykosideja tai glykosideja sisältäviä aineita, joissa uskotaan olevan sellaisia glykosidisia sidoksia, jotka ovat tyyppin II endoglykosidaasien tunnettuja katkaisukohtia tai jotka ovat läheistä sukua tällaisille katkaisukohdille.

Tässä käytettynä "tyypin II endoglykosidaasit" ovat entsyymejä, jotka kykenevät katkaisemaan sidoksia glykoproteiinin proteiini- ja hiilihydraattiosien liitoskohdassa tai lähellä sitä. Edullisesti tällaiset tyyppin II endo-

glykosidaasit kykenevät katkaisemaan ainakin yhden glykosidisen sidoksen, joka on noin kolmen glykosidisen sidoksen säteellä proteiini- ja hiilihydraattiyksikön liitoskohdasta (mukaan luettuna proteiini- ja hiilihydraattiyksikön liitoskohdan muodostava glykosidinen sidos). Edullisimmin tällaiset glykosidiset sidokset ovat noin kahden glykosidisen sidoksen säteellä proteiini- ja hiilihydraattiyksikön liitoskohdasta (ks. kuviot 1, 2 ja 3).

Tyypin II endoglykosidaasit määritellään myös niiden spesifisyyksien mukaan tietyille, kuviossa 1 näytenäytteille N- ja O-sidoksellisten glykoproteiinien tunnettujen ydinrakenteiden glykosidisille sidoksille. Nämä vastaavat glykosidisia sidoksia aminohappojen seriini, treoniini tai asparagiini ja ensimmäisen hiilihydraattitähteen välillä sekä glykosidisia sidoksia ainakin ensimmäisen, toisen ja kolmannen hiilihydraattitähteen välillä. Vaikka tämä ydinrakenne kuvataan yksityiskohtaisemmin tämän jälkeen niiden spesifisten glykosidisten sidosten muodossa, joita esiintyvät tunnetuissa ydinrakenteissa, tällaisten spesifisten sidosten ei pidä tulkita olevan rajoittavia tälle tyypin II endoglykosidaasien määritelmälle. Tämän mukaisesti kaikki mahdolliset glykosidiset sidokset näiden aminohappojen ja hiilihydraattitähteen välillä määrittelevät N- ja O-sidoksellisen glykoproteiinin ydinosan, jota käytetään identifioimaan tyypin II endoglykosidaasit.

Tyypin II endoglykosidaaseja ei rajoita nykyinen tietämys glykoproteiinien ydinrakenteista ja tunnettujen endoglykosidaasien spesifisyydestä tällaisille ydinrakenteille. Kuvion 1 ydinrakenteiden vertailu kuvion 2 tyypin II endoglykosidaasien tunnettujen substraattien kanssa osoittaa, ettei tyypin II endoglykosidaaseja ole tunnistettu kaikille mahdollisille kuvion 1 ydinrakenteiden katkaisukohdille, jos niitä on olemassa. Lisäksi voi olla olemassa muita ydinrakenteita, joita ei vielä ole tunnistettu. Endoglykosidaasit, jotka reagoivat tällaisissa vie-

lä tuntemattomissa ydinrakenteissa olevien sidosten kanssa, ovat myös tyypin II endoglykosidaaseja. Tämän mukaisesti sellaiset glykoproteiinien glykosidiset sidokset, jotka määrittelevät tyypin II endoglykosidaasit, eivät rajoitu niihin sidoksiin, jotka sijaitsevat kolmen ensimmäisen glykoproteiinin proteiiniyksikköä lähinnä olevan joukossa, vaan saattavat ulottua kaukaisempiin glykosidisiin sidoksiin ydinrakenteessa, esim. neljänteen tai viidenteen glykosidiseen sidokseen proteiiniyksiköstä lähtien, tunnistetusta ydinrakenteesta riippuen.

Spesifisyys glykoproteiinien ydinrakenteille tarjoaa sopivan tyypin II endoglykosidaasien määritelmän, joka erottaa ne tyypin I endoglykosidaaseista. Tyypin I endoglykosidaasit katkaisevat spesifisiä sidoksia oligo- ja polysakkarideissa, mutta yleensä ne eivät ole reaktiivisia niiden glykoproteiinien ydinrakenteen glykosidisten sidosten kanssa, jotka määrittelevät tyypin II endoglykosidaasit. Esimerkkejä tyypin I endoglykosidaaseista ja sidoksista, joiden kanssa ne ovat reaktiivisia, on esitetty taulukossa I.

Taulukko I

	Tyypin I endoglykosidaasi	Oligo- tai polysakkaridi- substraatti
5	α -amylaasi	$\alpha 1-4$ (Glc-Glc) _n ↑
10	sellulaasi	$\beta 1-4$ (Glc-Glc) _n ↑
15	hyaluronidaasi	$\beta 1-3$ $\beta 1-4$ $\beta 1-3$ GlcA-GlcNAc-GlcA-GlcNAc * ↑
20	lysotsyymit: kananmunanvalkuaisen lysotsyymi T4:n lysotsyymi mutanolysiini	$\beta 1-4$ $\beta 1-4$ $\beta 1-4$ GlcNAc-MurNAc-GlcNAc-MurNAc ↑ *
25		
30	pullulanaasi	$\alpha 1-4$ $\alpha 1-4$ $\alpha 1-6$ $\alpha 1-4$ Glc-(Glc-Glc-)Glc-Glc ↑

*GlcA on D-glukuronihappo

MurNAc on N-asetyyylimuramiinihappo

↑ ilmaisee katkaisukohdan

Sellaisia spesifisiä glykosidisia sidoksia glykoproteiineissa, jotka määrittelevät edullisia tyyppin II endoglykosidaaseja, esitetään kuviossa 2. Katkaisukohdat on ilmaistu pystynuolella. Yleinen esitys proteiinin aminohapoista, hiilihydraattitähhteistä ja kuvion 2 katkaisukohdista on esitetty kuviossa 3. Kuten voidaan nähdä, tyyppin II endoglykosidaasit katkaisevat edullisesti ensimmäisiä, toisia tai kolmansia glykosidisia sidoksia N- tai O-sidoksellisissa glykoproteiineissa. Nämä sidokset käsittävät vastaavasti glykosidiset sidokset (1) proteiinin osan asparagiinin, seriinin tai treoniinin ja ensimmäisen hiilihydraattitähhteen välillä, (2) hiilihydraattitähhteiden 1 ja 2 välillä ja (3) hiilihydraattitähhteiden 2 ja 3 välillä. Tämä spesifisyys määräytyy ensisijaisesti glykoproteiinin hiilihydraattisekvenssin mukaan glykoproteiinin proteiini- osan vaikuttaessa jonkin verran spesifisyyteen ja reaktiivisuuteen. Siten glykosidisia sidoksia 2 ja 3 (jotka käsittävät vain hiilihydraattitähhteiden välisiä glykosidisia sidoksia) tarkasteltaessa tyyppin II endoglykosidaasit voivat olla reaktiivisia identtisten tai samankaltaisten glykosidisten sidosten kanssa, jotka sijaitsevat glykoproteiinin muilla alueilla, ehkä melko kaukana glykoproteiinin proteiini- ja hiilihydraattiosien liitoskohdasta.

Edeltävän määritelmän soveltaminen tiettyyn glykoproteiiniin valaisee asiaa. Naudan tyroglobuliinia on analysoitu käyttäen endo- β -N-asetyyli-glukosaminidaasi H:ta (endo-H:ta), α -mannosidaasia ja β -mannosidaasia [Tarentino, A. L. ym. (1973) J. Biol. Chem., 218, 5547]. Endo-H hydrolysoi glykosidisen sidoksen niiden kahden N-asetyyli-D-glukosamiinin välillä, joista toinen oli N-sidoksella kiinni tyroglobuliinin proteiini- osan asparagiinissa. Endo-H-käsittelyllä vapautunutta tyroglobuliinin oligosakkariidi- eli hiilihydraattiosaa käsiteltiin myös α - ja β -mannosidaasilla. Koska kumpikaan näistä entsyymeistä ei ole spesifinen kuvioissa 1, 2 tai 3 esitettyjä vastaavien

substraattien kanssa, ne eivät ole tyyppin II endoglykosidaaseja, ja niitä voidaan luonnehtia joko eksoglykosidaasiksi tai tyyppin I endoglykosidaasiksi. Endo-H:n spesifisyys on sama kuin kuviossa 2 endo-H:lle esitetty ja siksi

5 endo-H on tyyppin II endoglykosidaasi. Tämä on tietenkin triviaali sovellus. Mutta jos löydetään uusi endoglykosidaasi (esim. endo-X), jolla nähdään tämä spesifisyys tai yksi tai useampi muista kuvioiden 1, 2 tai 3 spesifisyyksistä, myös tämä endo-X olisi tyyppin II endoglykosidaasi.

10 Tätä glykoproteiinispesifisyydelle perustuvaa tyyppin II endoglykosidaasin määritelmää ei kuitenkaan pidä tulkita rajoituksena mekanismille, jota tyyppin II endoglykosidaasit käyttävät aineen irrottamiseen ja/tai poistamiseen pinnalta. Vaikka on joissakin tapauksissa oletettavaa,

15 että tyyppin II endoglykosidaasit katkaisevat ainakin osan glykosidia irti pinnasta reagoimalla glykosidin glykosidisen sidoksen kanssa, keksintö ei rajoitu tällaiseen katkaisuun. Pikemminkin tyyppin II endoglykosidaasien toiminta määritellään funktionaalisesti sen mukaan, että ne

20 kykenevät katkaisemaan irti pinnasta ainakin osan mitä tahansa tyyppin II endoglykosidaasin kanssa reaktiivista ainetta.

Tässä käytettynä termi "endoglykosidaasi" käsittää tyyppin I ja tyyppin II endoglykosidaasit.

25 Tässä käytettynä termi "glykosidi" viittaa polymeeriin, jolla on yksi tai useampia "hiilihydraattiosia" kovalenttisesti glykosidisella sidoksella kiinni "aglykoniosassa". Tämä glykosidin määritelmä on johdettu glykosidin tavallisesta määritelmästä, joka viittaa sellaiseen yhdisteeseen, josta saadaan hydrolyysissä sokeri ja aglykoni,

30 jolloin aglykoni on tällaisesta hydrolyysistä saatava yhdiste, joka ei ole sokeri. Tässä käytetyn mukaisesti glykosidi tuottaa tyyppin II endoglykosidaasilla katkaistaessa aglykonin ja oligo- tai polysakkaridihiilihydraattiosan.

35 Aglykoniyksikkö ei kuitenkaan rajoitu yhdisteeseen, joka

ei ole sokeri, koska tyypin II endoglykosidaasi voi hydrolysoida glykosidin tuottaen aglykoniosan, joka sisältää yhden tai useamman sokeritähteen tyypin II endoglykosidaasin katkaisukohdasta riippuen. Lisäksi aglykoniosa voi olla melko monimutkainen, kuten asia saattaisi olla peptidoglykaanien kohdalla, joissa voidaan tavata hiilihydraattimatriisissa kiinni olevia ristisidottuja peptidejä. Sit-
 5 ten glykosideihin sisältyvät glykoproteiinit, glykolipidit, peptidoglykaanit ja näiden kaltaiset, joista tyypin
 10 II endoglykosidaasilla käsiteltäessä saadaan hiilihydraattiosa ja aglykoniosa, missä hiilihydraattiosa ja aglykoniosa määritellään tyypin II endoglykosidaasin katkaisukohdan mukaan. Tämä glykosidin määritelmä tulee ilmeiseksi seuraavasta pohdinnasta.

15 Tässä käytettynä termi "glykoproteiini" viittaa glykosidiin, jossa on yksi tai useampi oligo- tai polysakkaridi kovalenttisesti kiinni peptidissä tai proteiinissa. Oligo- ja polysakkarideihin viitataan tässä joskus "hiilihydraattiyksiköinä". Tällaiset hiilihydraattiyksiköt voi-
 20 vat kuitenkin poiketa glykosidin "hiilihydraattiosasta". Kuten kuviossa 4 esitetään, hiilihydraattiyksikkö käsittää toisentyypiseen molekyyliin, esim. proteiiniin tai peptidiin, kuten glykoproteiinissa, tai lipidiin kuten glykolipidissä, kiinnittyneen koko oligo- tai polysakkaridin. Jos
 25 tyypin II endoglykosidaasi katkaisee hiilihydraattiyksikön sen liitoskohdasta, esimerkiksi liitoskohdasta proteiiniin, niin hiilihydraattiyksikkö tarkoittaa samaa kuin glykosidin hiilihydraattiosa. Jos kuitenkin tyypin II endoglykosidaasi katkaisee hiilihydraattiyksikön sen sisällä
 30 olevan glykosidisen sidoksen kohdalta, niin tällaisessa katkaisussa muodostunut glykosidin hiilihydraattiosa on vähemmän kuin koko hiilihydraattiyksikkö. Tämä ero esitetään kuviossa 4 nuolen osoittamalle tyypin II endoglykosidaasin katkaisukohdalle.

Glykoproteiinin hiilihydraattiyksiköt voivat olla oligosakkarideja, jotka sisältävät 1 - 10 hiilihydraattitähdettä (sokeritähdettä) tai lyhyitä polysakkarideja, jotka sisältävät tavallisesti 10 - 25 hiilihydraattitähdettä. Korkeammat eliöt, kuten eukaryootit, mukaan luettuina hiiva- ja nisäkässolut, tuottavat monia glykoproteiineja. Sidos glykoproteiinin hiilihydraattiyksikön ja peptidi- tai proteiiniyksikön välillä on glykosidinen sidos, joka on tulos kondensaatioreaktiosta proteiiniyksikön aminohapon sivuketjun ja hiilihydraattiyksikön ensimmäisen tähteen anomeerisen hiilen välillä. Tällaiset glykosidiset sidokset nisäkkäiden glykoproteiineissa ovat joko N-glykosidisia sidoksia (hiilihydraatti liitetty asparagiinin amidotyyppien) tai O-glykosidisia sidoksia (hiilihydraatti liitetty seriinin tai treoniinin hydroksihapteen).

Hiilihydraattiyksikön (oligo- tai polysakkaridin) hiilihydraattitähdeet (monosakkaridit) voivat olla toisissaan kiinni monilla eri tavoilla. Niinpä tällaiset hiilihydraattiyksiköt voivat olla haarautumattomia, lineaarisia rakenteita tai monimutkaisia, haarautuneita rakenteita. Yleensä kuitenkin jokainen hiilihydraattiyksikön hiilihydraattitähde on kiinni glykosidisella sidoksella, jossa toisen hiilihydraattitähteen anomeerinen hiili on liittynyt toisessa hiilihydraattitähteessä olevaan hydroksyylihiileen. Tällaiset glykosidiset sidokset voivat olla alfa- tai beeta-sidoksia riippuen anomeerisen hiilen konfiguraatiosta. Toisen tähteen anomeerinen hiili voi yhdistyä minä tahansa toisen tähteen hydroksyylihiilistä kanssa. Siten monien glykoproteiinien monimutkaisuus juontuu monista erilaisista glykosidisista sidoksista, joita tavataan tällaisten molekyylien hiilihydraattiyksiköissä.

Monissa membraaniglykoproteiineissa on asparagiiniin liitettyjä hiilihydraattiyksiköitä (peptidissä olevaan asparagiiniin N-glykosidisella sidoksella liitettyjä hiilihydraattiyksiköitä). Tällaisten asparagiinisidoksel-

listen glykoproteiinien rakenne voi olla melko monimutkainen. Ks. esim. Schachter, H. (1984) Clinical Biochemistry, 17, 3 - 14. Monien näiden joukosta eri lähteitä saatavien asparagiinisidoksellisten membraaniglykoproteiinien (esim. 5 punasolujen plasmamembraanin glykoproteiineja, virusten vaippaglykoproteiineja) rakenne sekä liukoisten ei-membraaniglykoproteiinien rakenne viittaa siihen, että näillä kahdella tyypillä glykoproteiineja on monia yhteisiä rakennepiirteitä. Mts. 3. Tällaisten asparagiinisidoksellisten glykoproteiinien yhteinen ydinrakenne esitetään kuvioissa 1 ja 4, joissa GlcNAC on N-asetyyli-D-glukosamiini ja Man on mannoosi. Merkinnät α 1-6, α 1-3 ja β 1-4 kuvaavat glykosidisen sidoksen tyyppiä eri hiilihydraattitähteiden välillä. Tämä ydinsidos muodostaa perustan lukuisille glykoproteiineille, joissa on mikä tahansa lukumäärä hiilihydraattitähteitä kiinni ytimessä. Mts. 5. 10 15

O-sidokselliset glykoproteiinit sisältävät ydinrakenteen, jossa glykoproteiinin proteiiniyksikkö on kiinni hiilihydraattiyksikössä joko seriinin tai treoniinin hydroksyyli ryhmän välityksellä. Tämän ydinrakenteen yleinen piirre on N-asetyyli-D-galaktosamiinin (GalNAC) läsnäolo seriiniin tai treoniiniin liitettynä. Muita tällaisten glykoproteiinien yksityiskohtia esitetään kuviossa 1, jossa NeuAc on N-asetyylineuramiinihappo, Gal on galaktoosi ja L-Fuc on L-fukoosi. Kun Gal on toinen hiilihydraattitähde, glykosidinen sidos GalNAC:n ja Gal:n välillä on yleensä β 1-3. Katsausartikkelina glykoproteiinien, mukaan luettuina N- ja O-sidokselliset glykoproteiinit, rakenteesta, biosynteesistä ja toiminnasta ks. Berger, E. G. 20 25 30 ym. (1982) Experimentia, 38, 1229 - 1258.

Alemmat eliöt kuten prokaryootit, esim. bakteerit E. coli, Pseudomonas-lajit, Bacillus-lajit ja näiden kaltaiset, tuottavat peptidoglykaaneja ennemmin kuin glykoproteiineja. Peptidoglykaaneja tavataan bakteerien soluseinissä ja tyypillisesti niillä on polysakkariditukiran- 35

ka, jossa on vuorotellen N-asetyylioglukosamiinia ja N-asetyylimuramiinihappoa. N-asetyylimuramiinihappotähteisiin on joskus liittynyt peptidisivuketjuja, jolloin ristisidottuja peptidisiltoja usein kulkee peptidisivuketjujen välillä. Gram-positiivisten bakteerien soluseinä käsittää tyypillisesti noin 10 % peptidoglykaania, kun taas Gram-negatiivisten bakteerien soluseinän peptidoglykaannipitoisuus on tyypillisesti noin 50 %.

Peptidoglykaanit eivät kuitenkaan ole glykoproteiineja, ainakaan siinä määrin kuin glykoproteiinien spesifisiä glykosidisia sidoksia käytetään määrittelemään tyypin II endoglykosidaasien luokkaa. Siten endo-H on tyypin II endoglykosidaasi, koska se katkaisee sellaisen glykosidisen sidoksen kahden N-asetyylioglukosamiinisokeritähteen väliltä, joka esiintyy joissakin N-liitettyjä oligosakkarideja sisältävissä glykoproteiineissa. Ks. kuvio 4. Endo-H:lla voi kuitenkin olla jokin vielä määrittelemätön reaktiivisuus peptidoglykaanin kanssa, koska se pystyy helpottamaan ulosteen irtoamista pinnalta, kuten kangastilkuiltä. Tällaisen ulosteen tiedetään sisältävän suolistobakteereihin liittyviä peptidoglykaaneja. Lysotsyymit ovat peptidoglykaanin kanssa reaktiivia entsyymejä. Lysotsyymit, kuten kananmunan valkuaisen lysotsyymi, T4:n lysotsyymi ja mutanolysiini [Goodman ym. (1981), *J. Bacteriol.*, 146, 755] eivät kuitenkaan ole tyypin II endoglykosidaaseja. Tämä johtuu siitä, etteivät ne olennaisesti reagoi niiden N- ja O-sidoksellisissa glykoproteiineissa tavattujen ainutlaatuisten glykosidisten sidosten kanssa, joita käytetään määrittelemään tyypin II endoglykosidaasit. Ne reagoivat kuitenkin peptidoglykaanien kanssa tuottaen N-asetyylioglukosamiinin ja N-asetyylimuramiinihapon disakkarideja, joissa on kiinni peptidisivuketjuja. Näin ollen lysotsyymit luokitellaan tarkoituksenmukaisemmin tyypin I endoglykosidaasiksi. Siten, vaikkakin lysotsyymien ja endo-H:n reaktiivisuudessa peptidoglykaanien kanssa voi olla

päällekkäisyyttä, ne ovat suurimmaksi osaksi toisensa poissulkevia, mitä tulee endo-H:n spesifisyyteen niitä glykosidisia sidoksia kohtaan, jotka määrittelevät tyyppin II endoglykosidaasit, ja lysotsyymin olennaiseen reagoimattomuuteen niiden kanssa.

Tässä käytettynä "glykosidia sisältävä aine" tai "glykoproteiinia sisältävä aine" on pelkkä glykosidi tai glykoproteiini tai glykosidi tai glykoproteiini yhdessä muun komponentin kanssa. Siten glykosideja sisältäviin aineisiin kuuluvat glykosidit, kuten glykoproteiinientsyymit, esim. alkalinen fosfataasi, bromelaiini, karboksipeptidaasi-Y; glykoproteiinihormonit, esim. koriongonadotropiini, erytropoietiini; lektiinit, esim. perunasta ja soijapavusta saatavat lektiinit; seerumin glykoproteiinit, esim. IgG-immunoglobuliini, tyroglobuliini, protrombiini ja näiden kaltaiset sekä sekalaiset glykoproteiinit, kuten hemoglobiini ja interferoni; ja kompleksiset hiilihydraatit. Esimerkkejä glykosideista yhdessä muun komponentin kanssa ovat glykoproteiinit, jotka sisältävät membraanin ainesosia, esim. punasolujen sisältämä glykoforiini, influenssaviruksen sisältämä hemagglutiniini, naudan verkkokalvon sisältämä rodopsiini ja fibroblastien sisältämä kollageeni. Glykosideja sisältäviin aineisiin kuuluvat vielä virusten vaippaglykoproteiinit ja uloste, joka osaksi sisältää suolistobakteereihin liittyviä peptidoglykaaneja. Siten viruksia, fibroblasteja, ulostetta jne. pidetään glykosideja sisältävinä aineina.

Tässä käytettynä "mikro-organismi" (johon joskus viitataan glykosideja sisältävänä mikro-organismina) on sellainen, joka pystytään irrottamaan sen aineen pinnalta, johon se on sitoutunut, tyyppin II endoglykosidaasilla. Esimerkkejä ovat ulosteessa esiintyvät suolistobakteerit ja yleisesti piilolinssiä kontaminoivat bakteerit. Muita esimerkkejä ovat sienet ja levät, jotka voidaan irrottaa pinnalta tyyppin II endoglykosidaasilla.

Tässä käytettynä termi "in vitro" viittaa ympäristöön, jossa keksinnön mukaiset menetelmät tai prosessit pannaan käytäntöön. Sitä käytetään vain eron saamiseksi termiin "in vivo", joka kuvaa ympäristöä, jossa tyypin II endoglykosidaasit luonnossa esiintyvät, esim. eliöissä, jotka luonnostaan tuottavat tyypin II endoglykosidaasia. Tämän mukaisesti tyypin II endoglykosidaasia käyttävä in vitro -menetelmä on menetelmä tai prosessi, joka ei esiinny luonnossa. Termin in vitro ei kuitenkaan pidä tulkita rajoittavan tällaisia menetelmiä "lasiin" tai sulkevan pois tällaisten menetelmien toteutuksen elävän eliön pinnalla tai sisällä. Keksinnön mukaisia menetelmiä voidaan toteuttaa joukolla erilaisia muita pintoja kuin lasi, mukaan luettuina kangas, piilolinssit, metallipinnat, ke-
 raamiset pinnat, solujen pinnat, muovipinnat, kudokset ja näiden kaltaiset. Lisäksi tällaisia in vitro -menetelmiä voidaan toteuttaa esimerkiksi ihmisen suuontelossa, kuten edempänä kuvataan yksityiskohtaisemmin.

Joitakin tunnettuja tyypin II endoglykosidaaseja luettelaa taulukossa II yhdessä tällaisten entsyymien luonnollisen biologisen lähteen kanssa. Joidenkin tyypin II endoglykosidaasien katkaisukohdat esitetään kuviossa 2. Katso J. G. Beeleyn "Glycoprotein and Proteoglycan Techniques" (1985), luku 6, s. 153 - 300, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford. Eräs tyypin II endoglykosidaasi, jota ei luettelaa taulukossa II, on glykopeptidaasi F, johon joskus viitataan PNGaasi F:nä. PNGaasi F:ä voidaan saada Flavobacterium meningosepticumista. Se on myös kaupallisesti saatavana Boehringer Mannheim Biochemical -yhtiöstä, Indianapolis, Indiana.

Taulukko II

Entsyymi	Lähde	Tyypillinen substraatti
endo- β -N-asetyyliiglukosaminidaasi		
D	Diplococcus pneumoniae	N-sidokselliset kompleksityypiset (perifeeriset sokerit poistettu)
H	Streptomyces plicatus (Streptomyces griseus)	N-sidokselliset runsasmannosisen tyyppiset ja hybridityypiset
L	Streptomyces plicatus	N-sidokselliset vain pienimolekyyllipainoiset
C _I	Clostridium perfringens	N-sidokselliset kompleksityypiset (perifeeriset sokerit poistettu)
C _{II}	Clostridium perfringens	N-sidokselliset runsasmannosiset
Gal-tyyppinen F	Sporotrichum dimorphophosphorum	N-sidokselliset kompleksityypiset (vain kaksihaaraiset, vaatii terminaalisen Gal:n)
F	Flavobacterium meningosepticum	N-sidokselliset runsasmannosisen tyyppiset ja kompleksityypiset
endo- α -N-asetyyli-galaktoosaminidaasi	Diplococcus pneumoniae	O-sidokselliset, vain Gal-di-3galNAc1-
endo- β -galaktoosidaasi	Diplococcus pneumoniae	Veriryhmien A ja B determinantit
	Escherichia freundii Flavobacterium keratolyticus	Kerataanisulfaatti ja oligosakkaridit, jotka sisältävät sekvenssin R-GlcNAc- β 1-3Gal- β 1-4GlcNAc (tai Glc)

Kuten voidaan nähdä, endo-H, -F, -D, -C₁ ja Gal-tyyppinen endo-F kaikki katkaisevat glykoproteiinin toisen glykosidisen sidoksen. Gal-tyyppisen endo-F:n tapauksessa tämä glykosidinen sidos on GlcNAc:n ja Gal:n välissä. Endo-H:n, -F:n, -D:n ja -C₁:n tapauksessa katkaisu on kahden GlcNAc-tähteen välistä, jolloin substituentit U, V, W, X, Y ja Z määrittelevät spesifisyyden.

Endo-H katkaisee N-sidoksellisia glykoproteiineja, joissa on korkea mannoosipitoisuus. Siten kuviossa 2 W käsittää 2 - 150 mannoositähdettä, Y käsittää 1 - 2 mannoositähdettä ja X, Z, V ja U ovat H (vety). Endo-H katkaisee myös hybridirakenteita, joissa W käsittää 1 - 2 mannoositähdettä ja Y ja/tai Z käsittää NeuNAc-Gal-GlcNAc:n tai samankaltaisia rakenteita ja V käsittää H:n tai GlcNAc:n. Endo-H on edullinen keksinnön mukaisissa menetelmissä ja koostumuksissa käytettävä tyyppin II endoglykosidaasi.

Endo-D:llä ja endo-C₁:llä on samantapaiset reaktiivisuudet, vaikka nämä entsyymit ovat eri lähteistä peräisin. Endo-D ja endo-C₁ ovat aktiivisia glykoproteiinien N-sidoksellisia oligosakkarideja kohtaan ja katkaisevat runsasmannoosisia rakenteita, jotka sisältävät enemmän kuin 5 mannoosihiilihydraattitähdettä, jolloin X käsittää ydinrakenteeseen α 1-3-glykosidisella sidoksella liitetyn mannoosin, W käsittää ydinrakenteeseen α 1-6-glykosidisella sidoksella liitetyn mannoosin ja muut substituentit kuviossa 2 ovat H. Endo-D katkaisee myös kompleksisten rakenteiden tai hybridirakenteiden ydinosan sen jälkeen, kun suurin osa haarojen sokeritähteistä on poistettu eksoglykosidaaseilla, jolloin Y käsittää H:n tai GlcNAc:n ja U käsittää H:n tai fukoosin kuviossa 2.

Endoglykosidaasi endo-F on aktiivinen sellaisia runsaasti mannoosia sisältäviä N-sidoksellisia glykoproteiineja kohtaan, joissa kuviossa 2 X ja Y ovat yksi tai useampia mannoositähteitä ja loput substituentit ovat H.

Endo-F katkaisee myös kaksiahaaraisia hybridirakenteita, joissa X ja W käsittävät ydinrakenteeseen α 1-3- ja α 1-6-glykosidisilla sidoksilla liitetyn mannoosin ja Y käsittää NeuNAc-Gal-GlcNAc:n tai samankaltaisen rakenteen ja U käsittää H:n tai fukoosin. Endo-F katkaisee myös kaksiahaaraisia kompleksisia rakenteita. Tällaiset rakenteet käsittävät kuviossa 2 olevan endo-F:n substraatin ydinrakenteen, jossa X ja Y käsittävät NeuNAc-Gal-GlcNAc:n tai samankaltaisia rakenteita ja U käsittää H:n tai fukoosin.

Endo-L:llä on samankaltainen reaktiivisuus katkaista N-sidoksellisten glykoproteiinien toinen glykosidinen sidos. Se on spesifinen pienimolekyyllipainoisille substraateille, joihin sisältyy Man-GlcNAc-GlcNAc-Asn. Endo-C_{II}:lla nähdään endo-H:n kanssa samankaltainen spesifisyys. Endo- α -N-asetyyliagalaktosaminidaasi hydrolysoi sellaisia glykoproteiineja, joissa on O-sidoksella seriiniin tai treoniiniin liitettyjä oligosakkarideja, joissa GalNAc ja Gal ovat kaksi ensimmäistä hiilihydraattitähdettä. Myös endo- β -galaktosidaasin spesifisyys esitetään kuviossa 2, jossa R1 voi olla jokin niistä mannooseista, joista hiilihydraattiyksikön haarat voivat muodostua.

Tyypin II glykosidaasi glykopeptidaasi F (PNGaasi F) katkaisee N-sidoksellisissa glykoproteiineissa ensimmäisen glykosidisen sidoksen asparagiinin ja GlcNAc:n väliltä. Se katkaisee runsasmannoosisia rakenteita, joissa W, X ja Y käsittävät yhden tai useampia mannoositähteitä ja V ja Z käsittävät H:n fukoosin puuttuessa ensimmäisestä hiilihydraattitähteestä GlcNAc:sta. Se katkaisee myös hybridirakenteita, joissa W ja X käsittävät mannoosin, Y ja/-tai Z käsittää NeuNAc-Gal-GlcNAc:n tai samankaltaisen rakenteen ja V käsittää H:n tai GlcNAc:n, fukoosin tyypillisesti puuttuessa ensimmäisestä hiilihydraattitähteestä. Glykopeptidaasi F katkaisee myös kompleksisia rakenteita. Tällaiset rakenteet käsittävät kuviossa 2 esitetyn ydinrakenteen, jossa Y ja W käsittävät NeuNAc-Gal-GlcNAc:n

tai samankaltaisen rakenteen, X ja Z käsittävät H:n, NeuNAc-Gal-GlcNAc:n tai samankaltaisen rakenteen, V käsittää H:n tai GlcNAc:n ja fukoosi on joskus läsnä ensimmäisessä hiilihydraattitähteessä GlcNAc:ssa.

5 Endo- β -galaktosidaasin tiedetään katkaisevan glykosidisia sidoksia glykoproteiinin tai glykolipidin oligosakkarideissa. Tyypillinen glykoproteiinisubstraatti yhdessä endo- β -galaktosidaasin katkaisukohdan kanssa esitetään kuviossa 2, jossa R_2 on proteiini, lipidi tai hiilihydraatti ja R_1 on sokeritähde tai vety.

10 Tietenkään keksintö ei rajoitu endoglykosidaasien nykyiseen tunnettuun spesifisyyteen. Viime aikoihin asti kaupallisesti saatavana olleet endoglykosidaasit ovat olleet kalliita, mikä johtuu niiden suhteellisen alhaisista
15 ekspressiotasoista niiden luonnossa esiintyvissä lähteissä. Niinpä tällaisten entsyymien reaktiivisuutta ei ole tutkittu laajasti. Kuitenkin geeniteknologisten menetelmien myötä suurempia määriä endoglykosidaaseja on tullut tai on tulossa saataviksi. Siinä määrin kuin muita reaktiivisuuksia ja spesifisyyksiä saattaa löytyä näille tai
20 muille endoglykosidaaseille, tällaisen reaktiivisuuden on tarkoitus kuulua keksinnön suoja-alaan.

 Niinpä tässä käytettynä "tyypin II endoglykosidaasireaktiivinen aine" (johon viitataan myös "tyyppi II-reaktiivisena aineena" tai aineena, joka sisältää
25 "tyyppi II-reaktiivisen sidoksen") on mikä tahansa aine, joka reagoi tyypin II endoglykosidaasin kanssa. Tyyppi II-reaktiivisiin aineisiin kuuluvat tietenkin glykosideja sisältävät aineet ja glykoproteiini. Mukaan kuuluvat kuitenkin myös (1) muut, vielä tuntemattomat substraatit, jotka reagoivat tyypin II endoglykosidaasin kanssa muun
30 kuin glykosidisen sidoksen kohdalta, ja (2) usean komponentin aggregaatit, jotka sisältävät komponentteja, joissa on tyyppi II-reaktiivisia sidoksia.

Esimerkiksi mikro-organismeja, kuten bakteereita, voidaan poistaa pinnoista käsittelemällä endo-H:lla. Tällä hetkellä ei tiedetä, kuinka tähän tulokseen päästään. Bak-
 5 teerien ei tiedetä sisältävän sidoksia, jotka normaalisti reagoivat endo-H:n kanssa, ja niiden pintoihin, toisiin mikro-organismeihin ja muihin aineisiin kiinnittymisen yksityiskohtia ei ymmärretä hyvin. Kuitenkin bakteerien on havaittu irtoavan endo-H:lla.

Lisäksi muihin tahroihin voi liittyyä monimutkaisia
 10 aggregaatteja aineista, joista jotkin tai kaikki ovat reaktiivisia tyyppin II endoglykosidaasin kanssa. Termi tyyppi II-reaktiivinen aine kattaa kaikki tällaiset tilanteet. Siten tyyppin II endoglykosidaasin käyttöihin kuuluvat (1) tyyppi II-reaktiivisia aineita sisältävien pintojen puh-
 15 distaminen, (2) tyyppi II-reaktiivisten aineiden käsittely pinnalle kiinnittymisen estämiseksi ja (3) tyyppi II-reaktiivisten aineiden, kuten mikro-organismien, käsittely antimikrobisen vaikutuksen tuottamiseksi.

Keksinnössä käytettäviä tyyppin II endoglykosidaaseja voidaan saada taulukossa II luetelluista eliöistä ammattimiesten tuntemilla tavoilla. Jotkin taulukon II endoglykosidaaseista, esim. Streptomyces plicatuksen (aluksi luokiteltu Streptomyces griseukseksi) S. plicatuksessa tai S. lividansissa tuotettu endo-H ja Diplococcus pneumoniaen
 20 endo-D ovat saatavissa kaupallisesti Boehringer Mannheim Biochemical-yhtiöstä, Indianapolis, Indiana. Kaupallisesti saatavien valmisteiden lisäksi endo-H:ta voidaan saada E. colista, joka on transformoitu plasmidilla, joka koodittaa Streptomyces plicatuksen endo-H:n geeniä ja al-
 25 kalisen fosfataasin promoottoria [Oka, T. ym. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 7212 - 7216], samankaltaisilla menetelmillä kuin on raportoitu Streptomyces plicatuksen endo-H:n E. colissa kloonauksen ja ekspression suhteen
 30 [Robbins ym. (1981) J. Biol. Chem., 256, 10, 640]. Ks. myös Trumbly, R. J. ym. (1985) J. Biol. Chem., 260, 5683.

Endo-H:ta voidaan myös saada Streptomyces-soluista, jotka on geeniteknisesti muunnettu ekspressoimaan Streptomyces plicatuksesta saatua endo-H:ta (EP-julkaisu nro O 179 449, 30. huhtikuuta 1986). Vaihtoehtoisesti endo-H:ta voidaan
 5 tuottaa missä tahansa sopivassa isäntäsolussa, kuten Bacillus subtiliksessa, käyttäen ammattimiesten hyvin tuntemia menetelmiä. S. plicatuksen (S. griseuksen) endo-H:n aminohappo- ja DNA-sekvenssit on julkaistu [Robbins, P. W. ym. (1984) J. Biol. Chem., 259, 7577 - 7583].

10 Tässä esimerkeissä käytetty endo-H hankittiin kaupallisesti tai saatiin E. coli- tai B. subtilis-isännistä, jotka oli transformoitu ekspressoimaan S. plicatuksen endo-H:ta.

Yksi yksikkö endo-H-aktiivisuutta on se määrä entsyymiä, joka tarvitaan vapauttamaan 1 μmol (^3H)-dansyyli-Asn-GlcNAc:a (^3H)-dansyyli-Asn-(GlcNAc)₄(Man)₆:sta pH:ssa 5,5 37 °C:ssa yhdessä minuutissa [Tarentino, A. ym. (1978) Methods in Enzymology, 50, 574]. Muiden tyyppin II endoglykosidaasien yksikköaktiivisuudet määritellään samaan tapaan asiaankuuluvan substraatin avulla.
 20

Tietenkin voi olla olemassa muita tyyppin II endoglykosidaaseja, joita ei vielä ole tunnistettu. Tällaiset tyyppin II endoglykosidaasit samoin kuin tässä kuvatut, mukaan luettuina tällaisten endoglykosidaasien alleelivariaatiot ja geeniteknologisin menetelmin tehdyt muunnelmät kuuluvat tämän keksinnön suoja-alaan.
 25

Glykosidit ja glykosideja sisältävät aineet sitoutuvat usein suureen joukkoon erilaisia pintoja. Siten esimerkiksi glykoproteiinit, kuten vereen liittyvät (esim. glykosyloitunut hemoglobiini), voivat tahrata vaatteisiin, liinavaatteisiin ja näiden kaltaisiin käytettyjen kankaiden pintoja. Tällaiset tahrat ovat tähän asti olleet erittäin vastustuskykyisiä täydelliselle poistamiselle puhdistusaineilla tai puhdistusaineilla yhdessä eri entsyymien kanssa, joihin ei sisälly tässä keksinnössä käytettyjä en-
 30
 35

doglykosidaaseja. Vielä eräs glykosideja sisältävä aine, joka tahraa pintoja, kuten kangasta, ja on vaikea poistaa tunnetuilla menetelmillä, on uloste. Tällaiset ulostetahrat sisältävät useita suolistobakteereihin liittyviä glykosideja ja glykosideja sisältäviä aineita (esim. peptidoglykaaneja), katabolisia eritteitä, mukaanlukien glykoproteiineja, ja imeytymättömiä ravinteita ja näiden kaltaisia.

Muihin pintoihin, joihin glykosidit tai glykosideja sisältävät aineet voivat sitoutua, kuuluvat kovien ja pehmeiden piilolinssien pinnat. Pehmeät piilolinssit ovat tyypillisesti hydrofiilisiä ristosidoksellisia polymeerejä, joilla on hydrogeelirakenne, tai ne on valmistettu silikonipolymeereistä. Ks. esim. US-patentit nro 3 403 393 ja 2 976 576. Toisaalta kovat piilolinssit on tyypillisesti valmistettu metakrylaatti- tai metyyli-metakrylaattipolymeereistä. Muihin pintoihin kuuluvat luonnossa esiintyvät biofilmit, sydämentahdistimien johdot ja paristot, solujen ja limakalvojen pinnat, hammaskiille, ruuankäsittelyssä bakteerien ja hiukkasten poistamiseen käytettävät suodattimet; kemikaalit ja niiden kaltaiset; ilmastointilaitteiden suodattimet; erilaisten vesiympäristölle alttiina olevien rakenneseosien, esim. veneiden, laiturien ja niiden kaltaisten, pinnat; muovit ja komposiittimateriaalit, kuten formica; ja metallit ja lejeeringit, kuten teräs, alumiini jne.

Kuten myöhemmin esitetään yksityiskohtaisesti, tyyppin II endoglykosidaasit yksinään tai yhdessä toisen entsyymin, kuten subtilisiinin, kanssa joko puhdistusaineen kanssa tai ilman sitä parantavat tehokkaasti veri- ja ulostetahrojen poistamista kangastilkuista. Ei tiedetä täsmälleen, miten tällaiset tahrat tarttuvat tällaisiin tilkkuihin. Kuitenkin tällaisten aineiden tehostunut poistaminen näistä tilkuista tyyppin II endoglykosidaaseilla, yksin tai yhdessä muiden aineiden kanssa, viittaa siihen,

että ainakin yksi glykosidinen sidos on kankaan ja tahran sen osan välillä, joka irtoaa käsittelemällä tyypin II endoglykosidaasilla. Näihin tuloksiin perustuen seuraavat ovat ehdotettuja mekanismeja glykosideja sisältävien aineiden sitoutumiselle pintaan ja tällaisten aineiden irrottamiselle ja/tai poistamiselle tyypin II endoglykosidaasilla. Näitä ehdotettuja mekanismeja ei kuitenkaan pidä pitää rajoituksena keksinnön suoja-alalle.

Kuviot

10 Niinpä kuten kuviossa 5A esitetään, glykosidin sisältävä aine voi sitoutua pintaan toisin kuin immunologisella sidoksella. Tässä mielessä "immunologinen sidos" on sellainen, joka on antigeenin ja tälle antigeenille spesifisen vasta-aineen (polyklonaalisen tai monoklonaalisen) välillä. Kuten kuvioista 5A nähdään, glykosidin sisältävällä aineella on proksimaalinen osa pintaan sitoutuneena ja distaalinen osa, joka ulottuu poisproksimaalisesta osasta. Proksimaalista ja distaalista osaa yhdistää glykosidinen sidos, jonka kanssa tyypin II endoglykosidaasi on reaktiivinen. Kuten vielä kuvasta 5A nähdään, käsiteltäessä tyypin II endoglykosidaasilla glykosidin sisältävän aineen distaalinen osa "vapautuu" glykosidin sisältävän aineen proksimaalisesta osasta. Siinä määrin kuin distaalinen osa ei ole muulla tavalla sitoutunut pintaan, se myös "poistuu" vaivatta pinnalta ja voidaan pestä pois nesteellä.

Kuviossa 5B glykosidin sisältävä aine, tässä tapauksessa glykoproteiini, joka sisältää hiilihydraattiyksikön ja proteiiniyksikön, esitetään pintaan sitoutuneena. Tämä glykosidin sisältävä aine sisältää lisäksi hiilihydraattiosan ja aglykoniosan, joita yhdistää glykosidinen sidos, joka on tyypin II endoglykosidaasin kanssa reaktiivinen. Tässä erityisessä tapauksessa glykosidin sisältävä aine (glykoproteiini) on sitoutunut pintaan glykosidin sisältävän aineen hiilihydraattiosan välityksellä. Käsi-

teltäessä tyyppin II endoglykosidaasilla aglykoniosa irtoaa glykosidin sisältävän aineen hiilihydraattiosasta. Kuten kuviossa 5A, siinä määrin kuin aglykoniosa ei ole lisäksi muulla tavalla sitoutunut pintaan, aglykoniosa myös poistuu pinnalta.

Kuvio 5C kuvaa tilannetta, jossa glykosidin sisältävä aine on sitoutunut pintaan ainakin kahden kiinnittymispisteen kautta. Kuten näkyy, pinnan ja glykosidin sisältävän aineen välillä on ensimmäinen, glykosidinen sidos. Lisäksi myös toinen, toisen entsyymin kanssa reaktiivinen sidos esiintyy pinnan ja glykosidin sisältävän aineen poistettavan osan välillä. Jos käsitellään vain tyyppin II endoglykosidaasilla, glykosidin sisältävän aineen ensimmäisestä, glykosidisesta sidoksesta distaalinen osa vapautuu pinnalta ainakin siinä määrin, kuin se oli ensimmäisen, glykosidisen sidoksen sitoma. Jos se saatetaan kosketukseen toisen entsyymin kanssa, joka on reaktiivinen toisen esitetyn sidoksen kanssa, glykosidin sisältävän aineen se osa, joka on distaalinen ensimmäisestä, glykosidisesta sidoksesta ja toisesta sidoksesta, vapautuu pinnalta. Siinä määrin kuin tämä distaalinen osa ei ole muulla tavalla sitoutunut pintaan, ts. muilla kontaktipisteillä, jotka voivat olla reaktiivisia toisten entsyymien kanssa tai alttiita puhdistusaineille ja/tai pinta-aktiivisille aineille, tämä distaalinen osa irtoaa täysin pinnasta.

Kuviossa 5D nähdään mikro-organismi sitoutuneena pintaan ainakin osaksi kyseisen mikro-organismin glykosidiosan välityksellä. Glykosidiosa sisältää tyyppin II endoglykosidaasin kanssa reaktiivisen glykosidisen sidoksen. Mikro-organismin glykosidisesta sidoksesta distaalinen, irti katkaistu osa vapautuu pinnalta käsiteltäessä tyyppin II endoglykosidaasilla. Siinä määrin kuin tämä irti katkaistu osa ei ole muulla tavalla sitoutunut pintaan, se myös poistuu pinnalta. Kuitenkin pintaan voi olla useampia

kosketuspisteitä, jotka voivat vaatia lisäkäsittelyä muilla entsyymeillä ja/tai puhdistusaineella tai pinta-aktiivisella aineella.

Kuviossa 5E nähdään tyyppin II endoglykosidaasireaktiivinen aine sitoutuneena pintaan. Tällä tyyppi II-reaktiivisella aineella on proksimaalinen osa pintaan sitoutuneena ja distaalinen osa, joka ulottuu pois päin proksimaalisesta osasta. Proksimaalista ja distaalista osaa yhdistää tyyppi II-reaktiivinen sidos, joka viittaa tyyppin II endoglykosidaasin kanssa reaktiiviseen sidokseen. Käsiteltäessä tyyppin II endoglykosidaasilla tyyppi II-reaktiivisen aineen distaalinen osa "vapautuu" tyyppi II-reaktiivisen aineen proksimaalisesta osasta. On ymmärrettävää, että tyyppi II-reaktiiviset aineet voivat käsittää molekyylejä, mikro-organismeja tai sellaisten eri komponenttien aggregaatteja, jotka voivat kiinnittyä pintaan. Siinä määrin kuin tyyppi II-reaktiivisen aineen distaalinen osa ei ole muulla tavalla sitoutunut pintaan, se myös "poistuu" vaivatta pinnalta ja voidaan pestä pois nesteellä.

Se tyyppin II endoglykosidaasin määrä, jota käytetään tuottamaan kuvioissa yksilöityjen aineiden poistaminen määritellään funktionaalisesti tietyn aineen pinnasta poistamiseen "tehokkaaksi määräksi". Tämä määrä voi vaihdella riippuen käsiteltävästä aineesta ja pinnasta. Tyypilliset määrät esitetään tässä yksityiskohtaisemmin esitettyjen spesifisten sovellutusmuotojen muodossa.

Toiset entsyymit

"Toisiin entsyymeihin" kuuluvat proteaasit, lipaasit, glykosidaasit, kuten lysotsyymi, ja näiden yhdistelmät. Eri proteaaseihin, joita voidaan yhdistää tyyppin II endoglykosidaaseihin, kuuluvat subtilisiini, bromelaiini, papaiini, trypsiini, kymotrypsiini, pankreatiini, lysotsyymi ja näiden yhdistelmät. Tällaisia entsyymejä voidaan saada luonnossa esiintyvistä lähteistä, esim. subtilisiinia Bacillus subtiliksesta, tai geeniteknologisin menetel-

min käsitellyistä klooneista, esim. subtilisiinia ja mutanttisubtilisiineja kuten kuvataan EP-julkaisussa nro O 130 756. Ks. myös Wells, J. A. ym. (1983) Nucleic Acids Res., 11, 7911 - 7915; Yang, M. ym. (1984) J. Bacteriology, 160, 15 - 21; Estell, D. A. ym. (1985) J. Biol. Chem., 260, 6518 - 6521. Monia tällaisia entsyymejä tietysti on saatavana kaupallisista lähteistä.

Lisäksi tyyppin II endoglykosidaaseja voidaan yhdistää lipaasien, kuten bakteerien, nisäkkäiden ja sienien lipaasien ja näiden yhdistelmien kanssa.

Glykosidaaseihin, joita voidaan käyttää toisena entsyyminä, kuuluvat eksoglykosidaasit, toinen tyyppin II endoglykosidaasi ja tyyppin I endoglykosidaasit. Esimerkkejä ovat α - ja β -amylaasi, sellulaasi, pektinaasi, hemisellulaasi, dekstranaasi, eri glukanaasit ja näiden kaltaiset, sekä näiden yhdistelmät.

Lisäksi tyyppin II endoglykosidaasi voidaan yhdistää useamman kuin yhden edeltävistä toisen entsyymin luokista kanssa glykosidin sisältävän aineen pinnasta poistamisen helpottamiseksi.

Kun tyyppin II endoglykosidaasi yhdistetään yhden tai useamman toisen entsyymin kanssa, tyyppin II endoglykosidaasin suhde toiseen entsyymiin on edullisesti noin 0,01:100 ja edullisimmin 1:1.

25 Disulfidinkatkaisureagenssit

Tyyppin II endoglykosidaaseja voidaan käyttää myös yhdessä puhdistusaineiden kanssa joko yksin tai yhdessä yhden tai useamman toisen entsyymin ja/tai disulfidinkatkaisureagenssin kanssa puhdistusainekoostumuksen muodostamiseksi. Disulfidisidoksia katkaisemaan pystyviä aineita on erilaisia, mutta yleensä ne kuuluvat johonkin kolmesta luokasta: hapettimet, pelkistimet ja sekalaiset additio-substraatit, kuten ne, joista fumaarihappo ja natriumsulfiitti ovat esimerkkeinä. Sopiviin hapettimiin kuuluvat vetyperoksidi, permuurahaishappo, natriumperboraatti ja

hapettavat valkaisuaineet. Tehokkaisiin pelkistimiin kuuluvat ditiotreitoli (DTT), β -merkaptotaetanolii (BME), natriumboorihydridi ja näiden kaltaiset.

Vaihtoehtoiisiin disulfidinkatkaisureagensseihin, joita ei ole helppo luokitella, kuuluvat elohopea(II)kloridi, nitroprussidi, tributyylifosfiini ja fosfotiolaatti. Erityisen hyödyllinen katkaisureagenssi on natriumsulfiitti, joka johtaa disulfidin sulfitolyysiin reaktion: $R-S-S-R + SO_3^{2-} \rightarrow R-S-SO_3^{2-} + ^-SR$ mukaisesti. Tämän reaktion tasapainoa voidaan siirtää poistamalla tiolianioni käyttäen raskasmetalli-ioneja tai hapettimia. Hapetusvoima voidaan tuottaa ilmastamalla tai hapettimella kuten $CuSO_4$:lla tai natriumperboraatilla.

Edeltävää disulfideja katkaisemaan kykenevien aineiden listaa ei ole tarkoitettu kattavaksi, ja päinvastoin siitä puuttuu aineita, jotka ovat tehokkaita, mutta eivät välttämättä soveliaita kaupalliseen tuotteeseen. Menestyäkseen kaupallisesti lisätyn aineen täytyy olla suhteellisen halpa, eikä sillä saa olla sen aiottuun käyttöön nähden ei-toivottuja ominaisuuksia. Siten esimerkiksi, vaikka elohopea(II)kloridin käyttö toimisi keksinnön mukaisen menetelmän toteutuksessa, se ei olisi sovelias kaupalliseen käyttöön aiottuihin tavallisiin puhdistusainetuotteisiin. β -merkaptotaetanolii ja DTT ovat kaupallisesti saatavissa, mutta niissä on lievästi vastenmielinen tuoksu. Siksi erityisen edullisia aineita kaupalliseen formulaatioon ovat natriumsulfiitti (edullisesti yhdessä hapettimen kanssa) tai vetyperoksidi, jotka ovat halpoja ja suhteellisen turvallisia. Katsauksia materiaaleista, jotka ovat hyödyllisiä disulfidisidosten katkaisuun löytyy esimerkiksi teoksissa Chemical Modification of Proteins, Means, G. E. ym., toim. (1971), Holden-Day, Inc., San Francisco, Kalifornia, luku 8, ja Chemical Reagents for Protein Modification, Lundbald, R. L. ym., toim. (1984), CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, luku 7.

Tyypillisesti tyypin II endoglykosidaasi yksin tai yhdessä yhden tai useamman toisen entsyymin kanssa muodostaa 0,01 - 3 %, w/w, keksinnön mukaisista puhdistusainekoostumuksista, jotka voivat sisältää myös disulfidinkatkaisureagensseja, joiden määrä vaihtelee välillä noin 10 - 40 % koostumuksesta, w/w. Mukana olevat määrät riippuvat tietysti endoglykosidaasin (ja toisen entsyymin, jos sitä käytetään) ja disulfidinkatkaisureagenssin luonteesta, puhdistusaineen laimennuksesta pesuliuoksessa ja pesuolosuhteista. Kuitenkin annetut vaihteluvälit ovat yleensä tyypillisiä.

Eräässä keksinnön sovellutusmuodossa pintoja, joihin on sitoutunut glykoproteiineja sisältäviä aineita, käsitellään yhdistelmällä (yhtäaikaaisella tai peräkkäisellä) disulfidinkatkaisureagenssia, tyypin II endoglykosidaasia ja toista entsyymiä sopivassa pH:ssa ja lämpötilassa sopivan aikaa. Näitä olosuhteita voidaan tietysti vaihdella sen mukaan, kuin on tarkoituksenmukaista, ja tyypin II endoglykosidaasin, proteaasin ja disulfidinkatkaisureagenssin valinta riippuu jonkin verran tästä valinnasta. Kuitenkin usein tavattavat soveliaat olosuhteet ovat pH-arvot 5 - 12. Lämpötilat 20 - 55 °C, erityisesti 40 - 55 °C vaiheilla, ja ajat 20 minuuttiin asti, yleensä 10 - 15 minuutin vaiheilla, ovat tyypillisiä ja edullisia. Edulliset ajat ja lämpötilat ovat ne, joita yleensä käytetään kotitalouspesukoneissa, talopesuloissa ja ammattipesuloissa, koska ollakseen kaupallisesti toteutettavissa menetelmä pitää suorittaa olosuhteissa, jotka ovat käyttäjän normaalisti saatavissa.

Toisessa keksinnön sovellutusmuodossa käytetään kaupallisia puhdistusaineita käytettäviä tavanomaisia pesumenetelmiä, ja tyypin II endoglykosidaasi, toinen entsyymi ja disulfidinkatkaisureagenssi tuodaan käytettäväksi, joko erikseen tai yhdessä, lisäaineena, melko lailla valkaisuaineen käyttömenetelmien tapaan. Niinpä nämä voidaan lisä-

tä yhdessä puhdistusaineen kanssa pesuohjelman alussa tai jossakin kohdassa keskellä, esimerkiksi noin puolen pesuohjelmasta mentyä. Tällä tavalla käsiteltynä, olettaen kiinteän tai nestemäisen puhdistusainekoostumuksen noin

5 1:500 laimennus (kiinteää ainetta noin 2 mg/ml), mielivaltaisia määriä tyypin II endoglykosidaasia, toista entsyymiä ja disulfidinkatkaisureagenssia voidaan lisätä ilman tämän laimennuksen asettamaa ylärajaa. (Jos tyypin II endoglykosidaasi, toinen entsyymi ja disulfidinkatkaisureagenssi olisi lisätty alunperin puhdistusainekoostumukseen, ja jos esimerkiksi disulfidinkatkaisureagenssi muodostaisi 50 % koostumuksesta, vain 1 mg/ml saataisiin lopulliseen pesuliuokseen. Kuitenkin, jos nämä materiaalit lisätään erikseen, tehokkaimmat määrät kulloistakin tyypin

10 II endoglykosidaasia, disulfidinkatkaisureagenssia ja toista entsyymiä voidaan lisätä.)

Mitä tyypin II endoglykosidaasiin ja toiseen entsyymiin tulee, tarvitaan yleensä vain hyvin pieniä määriä. Tyypillisesti tyypin II endoglykosidaasia ja toista entsyymiä lisätään lopulliseen pitoisuuteen noin 1 -

20 500 µg/ml pesuliuosta kumpaakin entsyymiä. Disulfidinkatkaisureagenssin tapauksessa kuitenkin suuremmat määrät kuin puhdistusaineen laimennus sallii voivat olla toivottavia. Esimerkiksi disulfidisidosten katkaisu natriumboorihydridiä käyttäen voidaan mukavasti suorittaa niinkin

25 korkeilla reagenssin pitoisuuksilla kuin 0,2 M samaa luokkaa olevien puskurimäärien ollessa läsnä (Lundbald, R. L. ym., Chemical Reagents for Protein Modification, mainittu edellä).

30 Vaikka tällaiset korkeat määrät ovat tavanomaisia, niitä ei välttämättä vaadita ja alhaisemmat pitoisuudet ovat toimivia. Sulfitolyysi suoritetaan yleensä natriumsulfiittipitoisuuksissa luokkaa 0,1 M, vaikka niinkin alhaisia pitoisuuksia kuin 0,01 M ja alempia voidaan myös

35 käyttää. DTT on tehokasta käytettynä pitoisuuksissa luok-

kaa 0,02 - 0,1 M. Lyhyesti sanottuna disulfidinkatkaisureagenssin pitoisuutta voidaan vaihdella laajalla vaihteluvälillä millä tahansa näistä reagensseista ja teho säilyy. Optimipitoisuus kulloiseenkin sovellukseen riippuu tietenkkin tahran laadusta ja reagenssin laadusta samoin kuin pesumenettelyn olosuhteista, mukaan luettuina aika, lämpötila ja pH.

Vaihtoehtoisessa ja tarkoituksenmukaisemmassa lähestymistavassa tyypin II endoglykosidaasi, toinen entsyymi ja disulfidinkatkaisureagenssi lisätään alkuperäiseen puhdistusainekoostumukseen, ja menetelmä toteutetaan tavallisena pesumenettelynä käyttäen näitä muunnettua puhdistusaineita. Näissä olosuhteissa puhdistusainekoostumus vastaa edellä kuvattua, mutta koostumuksen määrää voidaan myös vaihdella välillä noin 0,5 - 10 mg/ml pesuliuosta tai enemmän riippuen jälleen pesuliuoksen ja -menettelyn olosuhteista ja puhdistusaineen komponenttien liukoisuudesta. Joka tapauksessa tyypin II endoglykosidaasin, di-sulfidinkatkaisureagenssin ja toisen entsyymin mukaan ottaminen puhdistusaineeseen rajoittaa näiden komponenttien pitoisuuksia puhdistusaineen laimennuksen mukaisesti. Siten, vaikka käytetään laimennusta 1:100 (10 mg/ml), ja esimerkiksi disulfidinkatkaisureagenssi rajoitetaan 50 %:in puhdistusainekoostumuksesta, maksimikonsentraatio 5 mg/ml disulfidinkatkaisureagenssia saatavassa pesuliuoksessa on yläraja. Tietenkkin disulfidinkatkaisureagenssin pitoisuus puhdistusaineessa on tyypillisesti alle 50 %, mikä pakottaa disulfidinkatkaisureagenssin pitoisuudet vielä alemmiksi.

Keksinnön mukaiset puhdistusainekoostumukset sisältävät pääasiassa puhdistusaineaktiivisia aineita, suhteessa pienempiä määriä disulfidinkatkaisureagenssia, jos sitä käytetään, ja melko pieniä määriä tyypin II endoglykosidaasia ja toista entsyymiä, jos sitä käytetään, mikä on erityisen toivottavaa entsyymikomponenttien hintaa ajatel-

len. Siten yleensä valmiste sisältää 60 - 90 % puhdistus-
aineaktiivisia aineita mukaan lukien tavanomaiset kauppal-
liset puhdistusaineiden lisäaineet, kuten pesuaineiden ra-
kenneaineet ja valkaisuaineet, 0,01 - 3 % tyyppin II endo-
5 glykosidaasia ja toista entsyymiä sekä noin 10 - 40 %
disulfidinkatkaisureagenssia.

Tietenkin on myös mahdollista lisätä vain yhtä
näistä kolmesta lisäaineesta alkuperäiseen puhdistusaine-
seen ja toimittaa muut erikseen pesuliuokseen. Erityisesti
10 tyyppin II endoglykosidaasi voidaan lisätä esipesuun ja sen
jälkeen toisen entsyymin sisältävä puhdistusaine, tai en-
doglykosidaasin sisältävän puhdistusaineen lisäystä voi
seurata tai edeltää käsittely toisella entsyymillä.

Puhdistuskoostumukset

15 Endo-D, -F ja -H ovat edullisia tyyppin II endogly-
kosidaaseja käytettäväksi puhdistuskoostumuksissa. Endo-H
on edullisin.

Glykosidia sisältävien aineiden poistamiseksi nämä
koostumukset käsittävät edullisesti noin 0,1 - 1 200 mil-
joonasosaa, edullisemmin noin 1 - 1 000 miljoonasosaa,
20 edullisimmin noin 20 - 200 miljoonasosaa tyyppin II endo-
glykosidaasia, koostumuksen tyypistä riippuen. Puhdistus-
koostumukset ovat edullisia. Pyykinpesuainekoostumukset
ovat edullisimpia tässä käytettäväksi ja käsittävät edul-
25 lisesti noin 0,1 - 1 200 miljoonasosaa tyyppin II endogly-
kosidaasia, edullisesti noin 20 - 200 miljoonasosaa endo-
D:tä, -F:ä tai -H:ta, edullisimmin noin 50 - 125 miljo-
nasosaa endo-H:ta.

Käytettäessä mikro-organismien torjuntaan tai pois-
30 toon koostumukset käsittävät edullisesti noin 0,1 - 1 200
miljoonasosaa, edullisemmin noin 1 - 1 000 miljoonasosaa,
edullisimmin noin 20 - 400 miljoonasosaa tyyppin II endo-
glykosidaasia, edullisesti endo-H:ta. Puhdistuskoostumuk-
set ovat edullisia ja käsittävät edullisesti samat määrät
35 tyyppin II endoglykosidaasia, edullisesti endo-H:ta.

Seuraavassa kuvataan ehdotuksia koostumustyypeiksi, jotka käsittävät tyyppin II endoglykosidaasin, glykosidia sisältävien aineiden ja/tai mikro-organismien poistamiseen. Koostumukset voidaan tehdä ja niitä voidaan käyttää millä tahansa tavalla, joka ei tuhoa entsyymiaktiivisuutta. Ne voidaan tehdä mistä tahansa ainesosista, jotka eivät kohtuuttomasti estä entsyymin aktiivisuutta. Koostumukset voivat olla pyykinpesuaineita, astianpesuaineita, kovien pintojen puhdistusaineita, hammaskiilteen puhdistusaineita, neste- ja palasaippuunia, aknenvastaisia koostumuksia, antiperspirantteja, shampoita, kasvovoiteita, hedelmien ja vihannesten pintasäilöntäaineita tai kankaan pehmentäjiä.

Sen lisäksi, että tässä kuvatuilla puhdistuskoostumuksilla puhdistetaan kankaita pesukoneissa tavallisin pesuohjelmin, niitä voidaan käyttää myös glykosidia sisältävien aineiden ja/tai mikro-organismien poistamiseen muilta pinnoilta, kuten metalleilta ja lejeeringeiltä, kuten kirurgisissa instrumenteissa, putkistoissa, metalliastioissa ja näiden kaltaisissa esiintyviltä, muoveilta ja komposiittimateriaaleilta, kuten formicalta, ja veneiden, laitureiden ja näiden kaltaisten pinnoilta. Kulloisestakin sovelluksesta riippuen koostumus voi käsittää tyyppin II endoglykosidaasin yksinään tai yhdessä disulfidinkatkaisureagenssin, toisen entsyymin ja/tai pinta-aktiivisen puhdistusaineen kanssa.

Tyyppin II endoglykosidaasi voidaan myös formuloida koostumukseen, jolla poistetaan glykosidia sisältäviä aineita ja/tai mikro-organismeja, mukaan luettuina hiiva, sienet, levät ja bakteerit, "biologisilta pinnoilta", kuten ihon, ihohuokosten, hiusten, karvatuppien ja kudoksen pinnoilta. Niinpä shampookoostumusten, hoitoainekoostumusten, saippuakoostumusten ~~ja lääkinnän alojen~~ ammattimiehet voivat vaivatta soveltaa edeltävää puhdistusaineformulaatioita koskevaa kuvausta tyyppin II endoglykosidaa-

sien käyttämiseksi tällaisissa sovelluksissa. Näin formuloituina tällaiset koostumukset ovat hyödyllisiä sellaiten glykosidia sisältävien aineiden poistamiseksi, jotka voivat tarttua tällaisiin pintoihin.

5 Tyypin II endoglykosidaasi voidaan myös formuloida koostumukseen, jolla poistetaan glykosidia sisältäviä aineita ja/tai mikro-organismeja, erityisesti hiivaa ja sientä, kasvien, kuten hedelmien ja vihannesten, pinnoilta. Tällaisiin koostumuksiin sisältyy edullisesti ei-ioni-

10 nen pinta-aktiivinen aine.

Lisäksi tyypin II endoglykosidaasi voidaan formuloida deodoranttikoostumuksiin sinänsä tunnetulla tavalla, jotta saataisiin käytettäväksi endoglykosidaasiaktiivisuutta ei-toivottavista hajuista vastuussa olevien glykosidia sisältävien aineiden ja/tai mikro-organismien poistamiseksi. Tällaiset deodoranttiformulaatiot, joissa käytetään tyypin II endoglykosidaasia, voivat olla muunnelmia ammattimiesten tuntemista formulaatioista puikko-, voide-

15 ja aerosolideodoranteja varten.

20 Lisäksi tyypin II endoglykosidaaseja voidaan formuloida yleensä tulehduksesta johtuvan aknen hoitoa varten, ainakin siinä määrin kuin tällaisesta tulehduksesta vastuussa olevat tai siihen liittyvät glykosidia sisältävät aineet ja/tai mikro-organismit ovat sitoutuneet pintaan.

25 Kuten edellä mainituissa formulaatioissa, ammattimiehet pystyvät muuntamaan tunnettuja akneformulaatioita tyypin II endoglykosidaasin ottamiseksi mukaan yksin tai yhdessä toisten entsyymien, puhdistusaineiden ja/tai pinta-aktiivisten aineiden kanssa.

30 Käytettäessä piilolinssin käsittelyyn tyypin II endoglykosidaasia lisätään puhdistuskoostumuksiin soveliaasti pitoisuus noin 0,1 - 20 µg/ml ja toisen entsyymin, kuten proteaasin, pitoisuus on samoissa rajoissa, jos tällaisia toisia entsyymejä käytetään. Käsittelyajat voivat

35 vaihdella noin viidestä minuutista noin 15 tuntiin, mutta

normaali sopiva puhdistusaika on yön yli, niin että käyttäjä voi antaa linssien olla liossa nukkuessaan. Monet eri menettelyohjeet ovat sopivia, mutta erityisen edullista on käyttää yhtä liuosta, joka sisältää tyyppin II endoglykosidaasia ja toista entsyymiä (jos käytetään), 10 minuutista kahteen tuntiin tai yli yön huoneenlämpötilassa tai 10 minuutista kahteen tuntiin esiliotus tyyppin II endoglykosidaasin liuoksen ollessa läsnä ja sen jälkeen samanlainen yli yön käsittely toista entsyymiä sisältävän liuoksen kanssa.

Edullisiin yleiskäyttöisiin toisiin entsyymeihin piilolinssiformulaatiota varten kuuluvat proteaasit, kuten papaiini, pankreatiini ja subtilisiini. Edullinen tyyppin II endoglykosidaasientsyymi on Streptomyces plicatuksen endo-H. Yksittäistä proteaasia voidaan käyttää toisena entsyyminä tai koostumus voi sisältää seoksen toisia entsyymejä.

Lisäksi piilolinssikoostumukset voivat sisältää vielä muita komponentteja, jotka auttavat entsyymaattista kokonaishajotusta. Erityisen hyödyllisiä näiden joukossa ovat disulfidinkatkaisureagenssit, kuten 2-merkaptotetanolli, kysteiinihydrokloridi, ditiotreitoli, ditioerytritoli, natriumvetysulfaatti, natriummetavetysulfiitti, tiourea ja näiden kaltaiset, yleensä edullisesti pitoisuutena noin 0,01 - 5 paino-%, edullisesti 0,05 - 1 paino-%. Lisäksi koostumukseen voidaan sisällyttää detergenttejä auttamaan linssin kostumista entsyymiä sisältävällä liuoksella. Sopivia detergenttejä ovat natriumdodekyylisulfaatti, natriummonolauraatti, ionittomat pinta-aktiiviset aineet, kuten alkoholietoksylaatit (esim. polyetoksietanoli), anioniset pinta-aktiiviset aineet, kuten eetterisulfonaatit, lineaariset alkyylibentseenisulfonaatit, natriumlauryylisulfaatti ja näiden kaltaiset.

Piilolinssien puhdistukseen sopivia puskureita ja stabilointiaineita voidaan myös käyttää ja niitä ovat nat-

rium- ja kaliumsitraatti, sitruunahappo, boorihappo, natrium-EDTA, erilaiset seosfosfaattipuskurit ja NaHCO_3 . Yleensä puskureita ja stabilointiaineita voidaan käyttää määriä noin 0,001 - 2,5 paino-% ja edullisesti noin 0,1 - 1 paino-%. Tulisi ymmärtää, että edeltävä kuvaus eri yhdisteiden määristä, joita tässä keksinnössä voidaan käyttää piilolinssien puhdistukseen, on ilmaistu ainesosien prosenttimäärinä liuoksessa (paino/tilavuus). Formulaatio voi myös olla yhden tai useamman sellaisen tavanomaisen kiinteän annosmuodon muodossa kuten tablettien, jotka sopivat käytettäväksi mitatussa määrässä soveliasta liuotinta, kuten vettä. Kiinteiden annosmuotojen prosenttinen koostumus on sellainen, että liuotettaessa ne tiettyyn vesimäärään liuoksella on selityksessä esitetyissä rajoissa oleva prosenttinen koostumus. Jos kiinteitä annosmuotoja käytetään, formulaatioon voi sisältyä tavanomaisia liuokkuaineita, sideaineita ja apuaineita, joihin kuuluvat glyseroli, sorbitoli, boorihappo, propyleeniglykoli, polyetyleeniglykolit, dekstraani, metyyliiselluloosa, hydroksietyyliiselluloosa, karboksimeytyyliiselluloosan vesiliukoiset suolat tai luonnossa esiintyvät hydrofiiliset aineet, kuten gelatiini, alginaatit, tragantti, pektiini, akaasia ja liukoiset tärkkelykset.

Tyypillisiin piilolinssinpuhdistuksessa hyödyllisiin koostumuksiin ja menettelyohjeisiin kuuluvat seuraavat:

1. Koostumus sisältää 1 - 100 µg/ml tyypin II endoglykosidaasia. Linssit poistetaan ja saatetaan kosketukseen liuoksen kanssa 12 tunnin ajaksi 22 °C:ssa. Linssit poistetaan puhdistusliuoksesta ja huuhdellaan.

2. Liuos A sisältää 10 µg/ml tyypin II endoglykosidaasia; liuos B sisältää 5 µg/ml subtilisiinia. Linssejä liotetaan liuoksessa A 30 minuuttia 25 °C:ssa, otetaan pois ja upotetaan liuokseen B 10 tunniksi 25 °C:ssa.

3. Puhdistusliuos sisältää 10 µg/ml pepsiiniproteaasia ja 10 µg/ml tyypin II endoglykosidaasia. Linssejä liotetaan tässä liuoksessa 5 tuntia 20 °C:ssa.

5 4. Puhdistusliuos sisältää 5 µg/ml subtilisiinia, 5 µg/ml tyypin II endoglykosidaasia ja 10 mM 2-merkaptotaetanolia. Linssit upotetaan tähän liuokseen 5 tunniksi 30 °C:ssa.

10 5. Puhdistusliuos sisältää 7 µg/ml subtilisiinia, 3 µg/ml tyypin II endoglykosidaasia, 10 mM 2-merkaptotaetanolia ja 2 % natriumdodekyyli sulfaattia (SDS). Linssejä liotetaan tässä liuoksessa 3 tuntia 20 °C:ssa.

15 6. Puhdistusliuos sisältää 4 µg/ml subtilisiinia, 2 µg/ml trypsiiniä, 10 µg/ml tyypin II endoglykosidaasia ja 2 % SDS:ä. Linssejä liotetaan tässä liuoksessa 7 tuntia 20 °C:ssa.

20 7. Liuos A sisältää 4 µg/ml subtilisiinia ja 2 µg/ml trypsiiniä 2 % SDS:ssä. Liuos B sisältää 10 µg/ml tyypin II endoglykosidaasia ja 10 mM 2-merkaptotaetanolia. Linssit upotetaan liuokseen B 20 minuutiksi 30 °C:ssa ja sitten liuokseen A 6 tunniksi 25 °C:ssa.

Kaikissa edeltävissä esimerkeissä linssit huuhdellaan perusteellisesti suolaliuoksessa ennen kuin ne pannaan takaisin käyttäjän silmiin.

25 Tässä olevat koostumukset voidaan formuloida erilaisiin fysikaalisiin muotoihin mukaan luettuina nesteet, geelit, tahtaat ja kiinteät partikkelit, kuten jauheet ja rakeet. Koostumukset voidaan formuloida pyykinpesuaineiksi, kuten US-patenteissa 4 507 219, 4 318 818, 4 605 509 ja 4 412 934 esitettyjen mukaisiksi; astianpesuaineiksi, 30 kuten US-patenteissa 4 714 562, 3 630 923, 4 133 779, 4 316 824 ja 4 555 360 esitettyjen mukaisiksi; kovien pintojen puhdistusaineiksi, kuten US-patenteissa 4 414 128, 3 679 608, 3 985 668 ja 4 005 027 esitettyjen mukaisiksi; kankaiden pehmittimiksi, kuten US-patenteissa 3 944 694, 35 4 073 996, 4 424 134 ja 4 661 269 esitettyjen mukaisiksi;

palasaippuiksi, kuten US-patenteissa 3 993 722 ja 3 070 547 esitettyjen mukaisiksi; shampoiksi, kuten US-patenteissa 4 345 080, 4 704 272 ja 4 741 855 esitettyjen mukaisiksi; antiperspiranteiksi, kuten US-patentissa 4 725 432 esitettyjen mukaisiksi; ~~aknenvastaisiksi tuotteiksi, kuten US-patenteissa 4 318 907 ja 4 608 370 esitettyjen mukaisiksi~~ ja suuhun käytettäväksi koostumuksiksi, kuten US-patentissa 4 684 518 esitettyjen mukaisiksi. Edellä olevat patentit liitetään viitteinä tähän.

10 Koostumuksilla on edullisesti pH noin 4 - 10, edullisemmin noin 5 - 8, entsyymien hyvän suorituskyvyn takia.

Mikro-organismien poistoa koskeva laboratoriotyö on osoittanut, että tehokkaan poistamisen saavuttamiseksi mikro-organismeja sisältävän pinnan liottaminen vaatii 15 joissakin tilanteissa fysikaalista tai kemiallista toimitusta mikro-organismien poistamiseksi. Testattuja mikro-organismeja olivat:

Escherichia coli mukaan luettuina tyyppi 1- ja tyyppi 3 -fimbriallisia

20 Staphylococcus aureus

Staphylococcus epidermidis

Serratia marcescens

Streptococcus mutans

Streptococcus sanguis

25 Bacillus sp.

Candida sp.

Aspergillus sp.

Siinä tapauksessa, että poistetaan bakteereja, kuten esimerkiksi E. colia, pintaan sitoutuneita mikro-organismeja voidaan käsitellä endo-H:lla ja sitten poistaa kemiallisesti, kuten käsittelemällä antimikrobisella aineella, tai fysikaalisesti, kuten huuhtomalla vedellä tai pyyhkimällä kädellä. Neste- ja palasaippuille, hammaskiilteen puhdistusaineille, antiperspiranteille, ^{ja} hajusta estäville kankaan pehmittimille ja ~~aknenvastaisille koos-~~

~~tumuksille~~ on edullista, että koostumus sisältää antimikrobista ainetta, kuten Irgasanin^R-tuotetta (Ciga-Geigy) tai klooriheksidiiniä, endo-H:n lisäksi. Antimikrobista ainetta ei tarvita koostumuksessa (esimerkiksi kovien pintojen puhdistusaineessa), kun fysikaalinen toimita, kuten huuhtelu vedellä tai pyyhkiminen kädellä, tullaan tekemään.

Edullisia tässä ovat pesuainepuhdistuskoostumukset, erityisesti rakeiset ja nestemäiset pyykinpesuainekoostumukset. Nämä pesuainepuhdistuskoostumukset käsittävät edullisesti 1 - 90 paino-%, edullisemmin noin 5 - 50 paino-%, pinta-aktiivisia pesuaineita, edullisimmin noin 10 - 40 paino-%.

Tässä kuvatuissa pesuainekoostumuksissa käyttökel-poisiin pinta-aktiivisiin aineisiin kuuluvat tunnetut synteettiset anioniset, ionittomat, amfoteeriset ja kahtais-ioniset pinta-aktiiviset aineet. Näistä tyypillisiä ovat alkyylibentseenisulfonaatit, alkyyli- ja alkyylieetterisulfaatit, parafiinisulfonaatit, olefiinisulfonaatit, alkoksyloidut (erityisesti etoksyloidut) alkoholit ja alkyylifenolit, amiinioksidit, rasvahappojen ja rasvahappoeste-reiden alfasulfonaatit, alkyylibetainit ja näiden kaltaiset, jotka ovat hyvin tunnettuja pesuainealalla. Yleensä tällaiset puhdistavat pinta-aktiiviset aineet sisältävät C₉-C₁₈-alkyyli-ryhmän. Anionisia puhdistavia pinta-aktiivisia aineita voidaan käyttää niiden natrium-, kalium- tai trietanoliammoniumsuolojen muodossa ja ionittomat pinta-aktiiviset aineet sisältävät yleensä noin 5 - 17 etyleenioksidiryhmää. C₁₁-C₁₆-alkyylibentseenisulfonaatit, C₁₂-C₁₈-parafiinisulfonaatit ja alkyylisulfaatit ovat erityisen edullisia esillä olevan tyyppisissä koostumuksissa.

Yksityiskohtainen luettelo näihin koostumuksiin soveliaista pinta-aktiivisista aineista voidaan löytää US-patentista 3 936 537, Baskerville, julkaistu 3. helmikuuta 1976, joka liitetään tähän viitteenä. Tällaisten pinta-aktiivisten aineiden kaupallisia lähteitä voi-

daan löytää McCutcheonin Emulsifiers and Detergents -teoksesta, North American Edition, 1984, McCutcheon Division, MC Publishing Company, joka myös liitetään tähän viitteenä.

5 Käyttökelpoisia pesuaineen rakenneaineita tässä kuvattuja pesuainekoostumuksia varten ovat mitkä tahansa tavanomaiset epäorgaaniset ja orgaaniset vesiliukoiset rakenneainesuolat sekä myös erilaiset veteen liukenemattomat ja niin sanotut "siemenkiteelliset" ("seeded") rakenneaineet. Käyttövalmiit pyykinpesuainekoostumukset käsit-
10 tävät noin 1 - 75 paino-%, edullisemmin noin 5 - 40 paino-%, edullisimmin noin 10 - 20 paino-% pesuaineen rakenneaineita. Näillä koostumuksilla on edullisesti pH noin 6 - 10.

15 Ei-rajoittavia esimerkkejä soveliaista vesiliukoisista epäorgaanisista emäksisistä pesuaineiden rakenneainesuoloista ovat alkalimetallikarbonaatit, -boraatit, -fosfaatit, -polyfosfaatit, -tripolyfosfaatit, -vetykarbonaatit, -silikaatit ja -sulfaatit. Spesifisiä esimerk-
20 kejä tällaisista suoloista ovat natrium- ja kaliumtetraboraatit, -vetykarbonaatit, -karbonaatit, -tripolyfosfaatit, -pyrofosfaatit ja -heksametafosfaatit.

Esimerkkejä soveliaista orgaanisista alkalisista pesuaineen rakenneainesuoloista ovat: (1) vesiliukoiset
25 aminopolyasetaatit, esim. natrium- ja kaliumetyleenidiamiinitetra-asetaatit, nitrilotriasetaatit ja N-(2-hydroksietyyli)nitrilodiasetaatit; (2) fytiinihapon vesiliukoiset suolat, esim. natrium- ja kaliumfytaatit; (3) vesiliukoiset polyfosfonaatit, mukaan luettuina etaani-1-hyd-
30 roksi-1,1-difosfonihapon natrium-, kalium- ja litiumsuolat, metyleenidifosfonihapon natrium-, kalium- ja litiumsuolat sekä näiden kaltaiset.

Siemenkiteellisiin rakenneaineisiin kuuluvat sellaiset aineet kuin natriumkarbonaatti tai natriumsilikaatti,
35 kalsiumkarbonaatti ja bariumsulfaatti siemenkiteinä.

Hydratoitu natriumzeoliitti A, jolla on partikkelikoko alle 5 μm , on erityisen toivottava.

Yksityiskohtainen luettelo soveliaista pesuaineen rakenneaineista voidaan löytää US-patentista 3 936 537, joka liitetään tähän viitteenä. Edullisia rakenneaineita ovat rasvahapot, polykarboksylaattit, polyfosfaatit ja näiden seokset.

Valinnaisia pesuainekoostumuksen komponentteja ovat entsyymit (esim. proteaasit ja amylaasit), peroksidivalkaisuaineet ja valkaisuaineiden aktivoijat, halogeenivalkaisuaineet (esim. natrium- ja kaliumdikloori-isosyanuraattit), lianirrotusaineet (esim. metyyliiselluloosa), likaa suspendoivat aineet (esim. natriumkarboksimeyyliiselluloosa), kankaiden kirkasteet, entsyymien stabilointiaineet, väritäplät, vaahdontehostajat tai vaahdonestäjät, korroosionestoaineet, väriaineet, täyteaineet, mikrobeja tappavat aineet, pH:n säätöaineet, alkalisuuden lähteet, jotka eivät ole rakenneaineita, ja näiden kaltaiset.

Endoglykosidaasi antimikrobisten aineiden kanssa

Tyyppin II endoglykosidaaseista endo- β -N-asetyyli-glukosaminidaasi H, D, F ja/tai PNGaasi F ovat edullisia antimikrobisten koostumusten formuloimiseen ja käyttöön tässä olevissa antimikrobisissa menetelmissä. Endo-H on edullisin.

Kun tyyppin II endoglykosidaasia käytetään yksin, se formuloidaan niin, että sen pitoisuus tuottaa antimikrobisen vaikutuksen. Kun antimikrobinen koostumus käsittää ainakin kaksi eri komponenttia, ts. tyyppin II endoglykosidaasin ja yhden tai useampia antimikrobisia aineita, kutakin komponenttia on mukana pitoisuus, joka riittää tuottamaan antimikrobisen vaikutuksen. Ainakin yhden komponentin määrä kyseisissä koostumuksissa on yleensä vähemmän kuin tältä komponentilta siihen vaadittava määrä, että se tuottaisi saman antimikrobisen vaikutuksen, jos sitä käytettäisiin yksin samankaltaisessa koostumuksessa.

Tässä käytettynä termiin "antimikrobinen vaikutus" kuuluu mikro-organismin poistaminen, tappaminen, kasvun estäminen, muutos yleisessä morfologiassa, protoplastien muodostuminen ja/tai soluseinän hajotus, kun mikro-organismi saatetaan kosketukseen tyypin II endoglykosidaasin kanssa yksin tai yhdessä toisen komponentin kanssa, joka käsittää antimikrobisen aineen.

Tässä käytettynä termi "antimikrobinen menetelmä" viittaa menetelmään, joka tuottaa antimikrobisen vaikutuksen. Keksinnökön eräältä puolelta antimikrobinen menetelmä tappaa mikro-organismeja, estää mikro-organismien kasvua ja/tai muuttaa mikro-organismien yleistä morfologiaa. Keksinnökön toiselta puolelta antimikrobinen menetelmä irrottaa mikro-organismeja pinnalta. Niissä antimikrobisissa menetelmissä, joissa irrotetaan mikro-organismeja pinnoilta, on edullista, että pintaa käsitellään antimikrobisella aineella ja tyypin II endoglykosidaasilla samanaikaisesti ennemmin kuin käsiteltäisiin lisätyllä antimikrobisella aineella välittömästi tyypin II endoglykosidaasilla käsitelyn jälkeen. Joissakin antimikrobisten menetelmien sovellutuksissa voi aiheutua yhdistetty antimikrobinen vaikutus, esim. tappaminen ja/tai kasvun estyminen voi esiintyä yhdessä mikro-organismin pinnalta irtoamisen kanssa.

Tässä käytettynä termi "antimikrobinen koostumus" viittaa koostumukseen, joka sisältää ainakin kaksi eri komponenttia: tyypin II endoglykosidaasin ja toisen, erilaisen komponentin, joka käsittää antimikrobisen aineen. Tällaisilla antimikrobisilla koostumuksilla on vaihtelevia antimikrobisia vaikutuksia riippuen tyypin II endoglykosidaasin ja antimikrobisen aineen määrästä ja valinnasta. Havaittuihin antimikrobisiin vaikutuksiin kuuluvat mikro-organismien tappaminen ja/tai mikro-organismien kasvun esto, mikro-organismien poistaminen pinnalta ja mikro-organismin pintoihin kiinnittymisen ehkäisy.

Tässä käytettynä termi "antimikrobinen menetelmä" viittaa menetelmään, joka tuottaa antimikrobisen vaikutuksen. Keksinnön eräältä puolelta antimikrobinen menetelmä tappaa mikro-organismieja, estää mikro-organismien kasvua ja/tai muuttaa mikro-organismien yleistä morfologiaa. Keksinnön toiselta puolelta antimikrobinen menetelmä irrottaa mikro-organismeja pinnalta. Niissä antimikrobisissa menetelmissä, joissa irrotetaan mikro-organismeja pinnoilta, on edullista, että pintaa käsitellään antimikrobisella aineella ja tyyppin II endoglykosidaasilla samanaikaisesti ennen kuin käsiteltäisiin lisätyllä antimikrobisella aineella välittömästi tyyppin II endoglykosidaasilla käsittelyn jälkeen. Joissakin antimikrobisten menetelmien sovellutuksissa voi aiheutua yhdistetty antimikrobinen vaikutus, esim. tappaminen ja/tai kasvun estyminen voi esiintyä yhdessä mikro-organismin pinnalta irtoamisen kanssa.

Tässä käytettynä termi "antimikrobinen koostumus" viittaa koostumukseen, joka sisältää ainakin kaksi eri komponenttia: tyyppin II endoglykosidaasin ja toisen, erilaisen komponentin, joka käsittää antimikrobisen aineen. Tällaisilla antimikrobisilla koostumuksilla on vaihtelevia antimikrobisia vaikutuksia riippuen tyyppin II endoglykosidaasin ja antimikrobisen aineen määrästä ja valinnasta. Havaittuihin antimikrobisiin vaikutuksiin kuuluvat mikro-organismien tappaminen ja/tai mikro-organismien kasvun esto, mikro-organismien poistaminen pinnalta ja mikro-organismin pintoihin kiinnittymisen ehkäisy.

Tässä Käytettynä termi tyyppin II endoglykosidaasin "antimikrobisesti tehokas pitoisuus" viittaa yleensä sellaiseen tyyppin II endoglykosidaasin lopulliseen pitoisuuteen, jota käytetään yksinään mikro-organismin kanssa yhteyteen saatettavaksi, jotta tuotettaisiin antimikrobinen vaikutus.

Tässä käytettynä termi "antimikrobinen aine" on antimikrobisen koostumuksen toinen, erilainen komponentti.

Tällaiset antimikrobiset aineet ovat yleensä antibiootteja, ja niihin kuuluu aineita, jotka tappavat mikro-organismeja, ja sellaisia, jotka estävät mikro-organismien kasvua. Esimerkkeihin tällaisista antimikrobisista aineista kuuluvat bakterisidit, fungisidit ja algisidit, jotka vastaavasti pystyvät tappamaan bakteereita, sieniä tai leviä tai estämään niiden kasvua. Bakterisideihin kuuluu sellaisia yhdisteitä kuin klooriheksidiini, 2,4,4'-trikloori-2'-hydroksidifenyylietteri, Triclocarban^R, penisilliinit, tetrasykliini ja Bacitracin^R. Fungisideihin kuuluvat Nystatin^R, Amphotericin B^R, Benomyl^R, Captan^R ja Dichloran^R. Muita esimerkkejä antimikrobisista aineista ovat pinta-aktiivisten aineiden läsnäollessa stabiilit antimikrobiset entsyymit, kuten pinta-aktiivisten aineiden läsnäollessa stabiilit β -1,3-glukanaasit, lysotsyymit, proteaasit ja kitinaasit sekä puhdistavat pinta-aktiiviset aineet, kuten ammattimiesten tuntemat anioniset, ei-ioniset, kationiset, amfolyyttiset ja kationiset pinta-aktiiviset aineet. Viimeksimainittuja pitäisi käyttää riittävä määrä antimikrobisen vaikutuksen tuottamiseksi. Edeltävät geneerisellä nimellä tai tavaramerkillä yksilöidyt antimikrobiset aineet ovat koostumuksia teoksessa Merck Index, 10th Ed. (1983), Merck & Co., Inc., Rahway, New Jersey, yksilöidyn mukaisesti.

Antimikrobisten koostumusten ensimmäisestä komponentista eroavia tyyppin II endoglykosidaaseja voidaan myös käyttää antimikrobisena aineena. Siten siinä määrin kuin tyyppin II endoglykosidaasit ovat itse antimikrobisia aineita (esim. pystyvät tuottamaan antimikrobisen vaikutuksen, kuten morfologisia muutoksia tai protoplastien muodostumisen), niitä voidaan yhdistää toisen tyyppin II endoglykosidaasin kanssa antimikrobisen koostumuksen muodostamiseksi. Siksi antimikrobiset koostumukset voivat käsittää yhden tai useampia erilaisia tyyppin II endoglykosidaaseja yhden tai useamman sellaisen antimikrobisen aineen kanssa,

jotka eivät käsitä tyyppin II endoglykosidaaseja, tai ilman niitä.

Edullisia antimikrobisia aineita tässä käytettäviksi ovat klooriheksidiini, 2,4,4'-trikloori-2'-hydroksidifenyylieetteri, Triclocarban^R, Nystatin^R, Amphotericin B^R antibiootti, anioniset ja ei-ioniset puhdistavat pinta-aktiiviset aineet. Pinta-aktiivisten aineiden läsnäollessa stabiili antimikrobinen lysotsyymi esitetään samaan aikaan vireillä olevassa US-patenttihakemuksessa sarjanumero _____ 10 otsikoltaan Methods and Compositions Employing Certain Lysozymes and Endoglycosidases, joka on Richard S. Carpenterin ja Ann M. Wolffin nimissä, jätetty samana päivänä tämän hakemuksen kanssa. Muita lysotsyymejä, esim. 15 kananmunanvalkuaisen lysotsyymiä, on käytetty tuottamaan antimikrobisia vaikutuksia joskin vähemmässä määrin ja vaihtelevin tuloksin.

Keksinnön mukaiset antimikrobiset koostumukset ja menetelmät voivat tuottaa antimikrobisen vaikutuksen laajaa joukkoa mikro-organismeja kohtaan, mukaan luettuina 20 Gram-positiiviset ja -negatiiviset bakteerit, sienet ja levät. Tällaisiin bakteeriin kuuluvat Escherichia coli, Streptococcus mutans, Staphylococcus epidermidis ja Staphylococcus aureus. Tällaisiin sieniin kuuluvat hiivat, kuten Candida ja Saccharomyces, ja rihmasienten, kuten 25 Aspergilluksen, Sporobolomyceksen, Basidioboluksen ja Entomophthoran lajit.

Spesifinen etu tyyppin II endoglykosidaasin (esim. endo-H:n, -D:n, -F:n ja/tai PNGaasi F:n) yhdistämisestä antimikrobisen aineen kanssa on se, että antimikrobista 30 ainetta voidaan käyttää vähemmän antimikrobisen vaikutuksen tuottamiseksi. Joissakin keksinnön puolissa antimikrobinen aine käytettäessä tyyppin II endoglykosidaasin kanssa tuottaa antimikrobisen vaikutuksen, joka käsittää pintoihin kiinnittyneiden mikro-organismien poistamisen tai niiden 35 tällaisiin pintoihin kiinnittymisen ehkäisyn. Toisissa

US pat
numero

puolissa tavataan negatiivinen vaikutus mikro-organismien elinkyvylle tai mikro-organismien morfologialle.

Pintakäsittely(itä) tyyppin II endoglykosidaasilla ja antimikrobisella aineella voidaan suorittaa ajoittain, jotta estettäisiin mikro-organismien uusi kasvu tai kiinnittyminen tai tarttuminen käsittelyn kohteena oleville pinnoille.

Tyyppin II endoglykosidaaseista endo-H, -D, -F ja/tai PNGaasi F ovat edullisia. Näistä endo-H on edullisin. Yleensä tyyppin II endoglykosidaasien antimikrobisesti tehokas määrä antimikrobisten aineiden kanssa yhdessä käytettäväksi on noin 1 - 1 200 miljoonasosaa endo-H:ta, -D:tä, F:ä ja/tai PNGaasi F:ä, edullisesti noin 1 - 1 200 miljoonasosaa endo-H:ta, edullisemmin noin 20 - 1 000 miljoonasosaa endo-H:ta, edullisimmin noin 50 - 400 miljoonasosaa endo-H:ta. Käytettävä määrä riippuu käsittelyn tyypistä ja käsiteltävän pinnan tai mikro-organismien esiläolon määrästä. Yleensä tehokas määrä antimikrobista ainetta, joka riippuu siitä, mitä ainetta käytetään, on noin 0,5 - 1 200 miljoonasosaa, edullisesti 2 - 1 200 miljoonasosaa, edullisimmin noin 5 - 350 miljoonasosaa klooriheksidiiniä tai 2,4,4'-trikloori-2'-hydroksidifenyyliete-teriä tai 0,5 - 100 miljoonasosaa Nystatinia^R.

Kun tyyppin II endoglykosidaasia käytetään yksinään tappamaan ja/tai inhiboimaan mikro-organismeja, yleensä vaaditaan käytettäväksi olennaisesti enemmän tyyppin II endoglykosidaasia. Esimerkiksi noin 100 - 1 000 miljoonasosan endo-H:ta on osoitettu vähentävän olennaisesti tällaisille pitoisuuksille altistettujen hiivasolujen elinkykyisyyttä. Kun hiiva altistetaan alle 100 miljoonasosalle endo-H:ta, ei ole kuitenkaan havaittu merkitsevää elinkyvyn vähentymistä. Vaikka alarajaa, joka tarvitaan vaikuttamaan hiivan elinkyvyn vastaisesti, ei ole vielä määritetty endo-H:lle, sen antimikrobisesti tehokkaan pitoisuuden alarajan uskotaan olevan 10 ja 100 miljoonasosan vä-

lillä. Vastaavien määrien endo-H:ta uskotaan olevan hyödyllisiä tappamaan ja/tai inhiboimaan muita mikro-organismeja, kuten leviää ja sieniä. Endo-H:n ja muiden tyyppin II endoglykosidaasien tarkkaa vaikutusta näihin eliöihin ja muihin, esim. bakteereihin, kun niitä käytetään yhdessä antimikrobisten aineiden kanssa, ei ole vielä määritetty. Tyyppin II endoglykosidaasin antimikrobisesti tehokkaiden pitoisuuksien alue tällaisia eliöitä vastaan käytettäessä voidaan kuitenkin määrittää rutiininomaisesti.

Keksinnön mukaisia antimikrobisia menetelmiä ja koostumuksia voidaan soveltaa laajasti ja niitä ovat esim. antimikrobiset menetelmät henkilökohtaista hygieniää, terveydenhoitoa sekä koti- ja teollisuussiivousta varten. Niinpä tällaisia menetelmiä ja koostumuksia voidaan käyttää antimikrobisen suuveden, hammas- tai tekohammaspuhdisteen sekä myös antimikrobisten nestemäisten tai kiinteiden käsi- tai vartalosaippuoiden, ~~aknen vastaisen lääkkeen~~ deodorantin, shampoon ja kasvovoiteiden sekä haavojen puhdistamista ja infektioiden estoa varten olevien koostumusten formuloimiseksi ja käyttämiseksi. Tyypillisiin kotitaloussovelluksiin kuuluvat antimikrobiset puhdistustuotteet, kuten nestesaippua, kovien pintojen puhdistusaineet sekä nestemäiset ja rakeiset pyykinpesuaineet. Myös raskaaseen käyttöön tarkoitettuja antimikrobisia puhdistusainekoostumuksia voidaan formuloida teollisuuskäyttöön.

Klooriheksidiini on tehokas suun antibakteriaallinen aine, ja se on edullinen käytettäväksi hammassovelluksissa. 2,4,4'-trikloori-2'-hydroksidifenyylietteri on saatavana nimellä Irgasan^R DP 300 Ciba-Ceigyiltä, ja se on laajakirjoinen antimikrobinen aine, joka on tehokas henkilökohtaisen hygienian sovelluksissa ja pyykinpesusovelluksissa. Triclocarban^R Monsantoilta on palasaippuoissa hyödyllinen bakteristaatti. Myös perinteisiä antibiootteja voidaan käyttää tässä lisättävänä antimikrobisena aineena. Lopuksi, pinta-aktiivisten aineiden läsnäollessa stabiileja

antimikrobisia entsyymejä voidaan käyttää hammassovelluk-
 sissa sekä shampoiden ja muiden pinta-aktiivisia aineita
 sisältävien formulaatioiden säilöntään. Edullinen pinta-
 aktiivisten aineiden läsnäollessa stabiili antimikrobinen
 entsyymi on edellä yksilöidyssä, samaan aikaan vireillä
 olevassa, Carpenterin ja Wolffin nimissä olevassa patent-
 tihakemuksessa esitetty lysotsyymi. Antimikrobisten ent-
 syymien stabiilisuutta pinta-aktiivisten aineiden ollessa
 läsnä voidaan arvioida tässä sen aktiivisuuden perustella,
 joka on jäljellä edustavien määrien esimerkiksi alkyyli-
 eetterisulfaattia tai lineaarista alkyylibentseenisulfaat-
 tia ollessa läsnä.

Antimikrobinen koostumus voidaan formuloida anti-
 mikrobiseksi suuvedeksi, hammas- tai tekohammaspuhdisteek-
 si. Mikro-organismien käsittelylle antimikrobisen vaiku-
 tuksen tuottamiseksi (esim. mikro-organismien kiinnittymi-
 sen irrottamiseksi tai estämiseksi suuontelon luonnolli-
 silla tai synteettisillä pehmeillä ja/tai kovilla pinnoil-
 la tai mikro-organismien tappamiseksi tai niiden kasvun
 estämiseksi suuontelossa) on siis olennaisesti tunnus-
 omaista se, että huuhdellaan antimikrobisella suuvedellä,
 puhdistetaan hampaat antimikrobisella hammasjauheella tai
 -tahnalla ja/tai puhdistetaan tekohampaat antimikrobisella
 tekohampaiden puhdisteella. Tässä kuvatut antimikrobinen
 suuvesi, hammasjauhe- tai tahna ja tekohammaspuhdisteet
 käsittävät edullisesti endo-H:n sekä klooriheksidiinin
 ja/tai pinta-aktiivisten aineiden läsnäollessa stabiilin
 antimikrobisen entsyymin antimikrobisena aineena. Silloin,
 kun klooriheksidiiniä käytetään, antimikrobinen suuvesi,
 hammasjauhe- tai tahna tai tekohammaspuhdiste käsittää
 edullisesti noin 50 - 1 200 miljoonasosaa endo-H:ta ja
 noin 50 - 350 miljoonasosaa klooriheksidiiniä. Silloin,
 kun pinta-aktiivisten aineiden läsnäollessa stabiilia an-
 timikrobista entsyymiä käytetään, antimikrobinen suuvesi,
 hammasjauhe- tai tahna tai tekohammaspuhdiste käsittää

edullisesti noin 50 - 150 miljoonasosaa endo-H:ta ja noin 50 - 1 000 miljoonasosaa pinta-aktiivisten aineden läsnäollessa stabiilia antimikrobista entsyymiä.

Antimikrobinen koostumus voidaan myös formuloida antimikrobisiksi henkilökohtaisen hygienian tuotteiksi tai kotitalouden puhdistustuotteiksi. Tällaisissa tuotteissa endo-H:ta käytetään edullisesti pitoisuudessa noin 1 - 1 200 miljoonasosaa. Näissä tuotteissa käytettävä antimikrobinen aine on edullisesti klooriheksidiini, edullisimmin pitoisuudessa noin 150 - 1 200 miljoonasosaa, tai 2,4,4'-trikloori-2'-hydroksidifenyylietteri, edullisimmin pitoisuudessa noin 2 - 500 miljoonasosaa. Edulliset henkilökohtaisen hygienian tuotteet tai kotitalouden puhdistustuotteet ovat nestemäisiä käsisaippuoita, kovien pintojen puhdistusaineita, pyykinpesuaineita ja shampoota (kuvataan edempänä).

Edullinen antimikrobinen nestemäinen käsisaippua käsittää noin 50 - 400 miljoonasosaa endo-H:ta, noin 5 - 100 miljoonasosaa 2,4,4'-trikloori-2'-hydroksidifenyylietteriä ja edullisesti noin 1 - 40 paino-% puhdistavaa pinta-aktiivista ainetta. Edullisesti käytetään noin 2 - 20 paino-%, edullisimmin 3 - 10 paino-% puhdistavaa pinta-aktiivista ainetta, edullisesti valittuna ryhmästä, jonka muodostavat anioniset, ei-ioniset, kahtaisioniset, amfolyyttiset ja kationiset pinta-aktiiviset aineet. Nestemäinen käsisaippua voi lisäksi sisältää pehmitinainetta (30 paino-%:in asti) ja pieniä määriä hajustetta, väriainetta, liuotinta ja läpinäkyväksi tekevää ainetta.

Tässä kuvatut antimikrobiset kovien pintojen puhdistusaineet voivat olla lasin puhdistusaineita, hiovia kovien pintojen puhdistusaineita, hankaavia puhdistusaineita tai WC-altaan puhdistusaineita. Näitten pitäisi olla olennaisesti vailla hypokloriittia tuottavia valkaisuaineita ja muita endoglykosidaasien kanssa yhteensopimattomia ainesosia. Edullinen kovien pintojen puhdistusaine

käsittää noin 100 - 1 000 miljoonasosaa endo-H:ta ja antimikrobisen aineen sekä noin 0,1 - 20 paino-% puhdistavaa pinta-aktiivista ainetta. Noin 2 - 10 paino-% puhdistavaa pinta-aktiivista ainetta on edullisinta, valittuna edullisesti ryhmästä, jonka muodostavat anioniset, ei-ioniset, kahtaisioniset, amfolyyttiset ja kationiset pinta-aktiiviset aineet. Tässä olevat antimikrobiset kovien pintojen puhdistusaineet mahdollisesti käsittävät lisäksi hiontaainetta, apuainetta, laimennusainetta, liuotinta, suspensointiainetta (kuten savea, karboksimeetyyliselluloosaa ja polyakrylaattia), hajustetta ja/tai väriainetta.

Tässä kuvattu antimikrobinen pyykinpesuaine käsittää tyyppin II endoglykosidaasin ja antimikrobisen aineen lisäksi edullisesti 1 - 99 paino-%, edullisemmin 5 - 60 paino-%, edullisimmin 10 - 40 paino-% puhdistavaa pinta-aktiivista ainetta, valittuna edullisesti ryhmästä, jonka muodostavat anioniset, ei-ioniset, kahtaisioniset, amfolyyttiset ja kationiset pinta-aktiiviset aineet. Edullinen nestemäinen tai rakeinen antimikrobinen pyykinpesuaine käsittää noin 2 - 250 miljoonasosaa endo-H:ta, noin 2,5 - 40 miljoonasosaa 2,4,4'-trikloori-2'-hydroksidifenyylietteriä ja noin 1 - 99 paino-%, edullisesti noin 5 - 60 paino-% puhdistavaa pinta-aktiivista ainetta. Tässä kuvatut antimikrobiset pyykinpesuaineet sisältävät lisäksi mahdollisesti apuainetta, hajustetta, valkaisuainetta, laimennusainetta, vaahdonestoainetta, väriainetta, kirkastetta, liankantajaa, lian takaisin tarttumisen estäjiä, pehmittimiä ja/tai lianirrotusaineita.

Tässä käytettäväksi tarkoitettu antimikrobinen shampoo käsittää edullisesti endo-H:n, antimikrobisen aineen ja noin 5 - 60 paino-% puhdistavaa pinta-aktiivista ainetta, valittuna edullisesti ryhmästä, jonka muodostavat lauryylisulfaatti, isoetionaatti, asyyliamidobetaiini, alkyyli glyseerylieetterisulfonaatti ja alkyylieetterisulfonaatti. Valinnaisia ainesosia ovat vaahdontehostaja,

hoitoaine, värjäysaine, väriaine, hajuste ja/tai hilseen-
estoaaine.

Esillä olevat antimikrobiset koostumukset voivat
olla myös kasvipintojen käsittelyyn tarkoitettun säilöntä-
5 aineen tai mikro-organismien torjunta-aineen muodossa.
Edullisia ovat säilöntäaine hedelmien tai vihannesten pin-
noille tai antimikrobinen tuote, jota käytettäisiin vilje-
lykasveille mikro-organismien torjumiseksi. Viimemainittu
on edullisesti sellaisen liuoksen muodossa, jota sumutet-
10 taisiin viljelykasveille, kuten maissille, sitrushedelmä-
puille, vehnälle, tupakalle, soijapavuille, tomaateille ja
mansikoille mikro-organismien kasvun torjumiseksi ja eh-
käisemiseksi.

Seuraava esitetään vain esimerkkinä, eikä sitä pidä
15 tulkita keksinnön suoja-alaa rajoittavaksi.

Esimerkki 1

Veren ja ulosteen poisto kankaasta

Erillisiä verellä ja ulosteella tahrattuja (puuvil-
lakankaisia) tilkkuja pestiin kaupallisilla pesuaineilla
20 automaattipesukoneessa käyttäen lämmintä (noin 37 °C) pe-
suohjelmaa. Sitten tilkut huuhdottiin ja ilmakeivattiin.
Niitä inkuboitiin eri endoglykosidaasimäärien ja -tyyppien
[(0,005 U endo-D:tä (Boehringer Mannheim Biochemical) tai
endo-H:tä (Boehringer Mannheim Biochemical, S. griseukses-
25 ta, luettelonumero 752 967) tai 0,25 U N-glykanaasia
(PNG-aasi F eli peptidiendoglykosidaasi F) Genzyme,
Boston, Massachusetts] kanssa 0,75 ml:ssa 50 mM Tris-HCl-
puskuria, pH 7,0, 37 °C:ssa 30 minuuttia koeputkessa.
Kontrollissa oli puskuria mutta ei endoglykosidaasia. Inku-
30 baatioajan lopuksi kontrolliin ja entsyymiä sisältäviin
näytteisiin lisättiin 0,25 ml pesuaineliuosta (1:125 lai-
mennus kaupallisesta pesuaineliuoksesta, joka ei sisältä-
nyt väriaineita, hajusteita, entsyymeitä eikä kirkasteita,
1 M Tris-HCl-puskurissa, pH 7,5), joka sisälsi subtilisiini
35 BPN':a 80 µg/ml, ja inkuboitiin vielä 20 minuuttia. Tä-

män käsittelyn lopuksi putket sentrifugoitiin ja supernatanttien proteiinipitoisuus määritettiin mittaamalla absorbanssi aallonpituudella 280 nm. Joka käsittelylle valmistettiin reagenssinollanäyte, joka ei sisältänyt tilkkua määrityksen aikana. Nollanäytteiden arvot vähennettiin käsiteltyjen näytteiden absorbanssista aallonpituudella, jotta määritettäisiin, kuinka paljon 280 nm absorboivaa materiaalia irtosi inkubaation aikana. Korkeampi absorbanssi edustaa lisääntyneitä proteiinin irtoamista kuiduista. Tulokset esitetään taulukossa III.

Taulukko III

	Käsittely	Absorbanssi aallonpituudella 280 nm	
		Veritahra	Ulostetahra
	Kontrolli	0,79	2,07
15	Endo-D	0,84	2,14
	Endo-H	0,83	2,12
	N-glykanaasi	0,78	2,10

Nämä tulokset viittaavat siihen, että endoglykosidaasit endo-D ja endo-H yhdessä toisen entsyymin subtiliinin kanssa lisäsivät aallonpituudella 280 nm absorboivan materiaalin irtoamista verellä tahratuista tilkuista verrattuna kontrolliin. Lisäksi endo-D, endo-H ja N-glykanaasi kaikki osoittivat lisäystä aallonpituudella 280 nm absorboivan materiaalin irtoamisessa ulosteella tahratuista tilkuista.

Esimerkki 2

Endo-H:n vaikutus ulostetahrann poistoon

Tämä esimerkki on samankaltainen kuin esimerkki 1, mutta se suoritettiin käyttäen nailonkankaasta tehtyjä ulostetahrattuja tilkkuja. Tilkut pestiin pesuaineliuoksessa, huuhdottiin ja kuivattiin. Pesuaine koostui kaupallisesta nestemäisestä pesuaineesta, joka ei sisältänyt entsyymeitä, kirkasteita, väriaineita eikä hajusteita. Yksi erä tilkkuja pidettiin syrjässä, ja siihen viitataan

"käsittelemättömänä kontrollina". Nämä tilkut käsiteltiin samoin kuin näytetilkut, paitsi että niitä ei käsitelty endo-H:lla. Näytetilkut inkuboitiin 0,01 U:n endo-H:ta kanssa (Boehringer Mannheim Biochemical, luettelonumero 752 967) puskurissa (10 mM Na-asetatti, pH 6,0) 37 °C:ssa 15 minuuttia. Sitten lisättiin 0,25 ml pesuaineliuosta (1:125 laimennus 1,0 M Tris-HCl-puskurissa, pH 7,5), ja inkuboitiin vielä 15 minuuttia. Lopuksi putket sentrifugoitiin ja supernatantit poistettiin imulla. Tilkut ilma-
 10 kuivattiin. Tilkuista otettuja kuituja tarkasteltiin pyyhkäisyelektronimikroskopiolla kriittisen pisteen kuivauksen jälkeen. Elektronimikroskooppikuva pesuaineella pestystä ulosteella tahratusta tilkusta esitetään kuviossa 6A. Kuten voidaan nähdä, sauvamaisia bakteereita ja pieniä hiuk-
 15 kasia esiintyy kankaan pinnalla. Kuvio 6B esittää endo-H:lla ja pesuaineella käsiteltyä tilkkua. Tässä kuviossa nähdään sileä, puhdas kangas, mikä osoittaa, että endo-H ja pesuaineet helpottavat pienten hiukkasten ja bakteerijätteiden irrottamista.

20 Esimerkki 3

Endo-F:n vaikutus ulostetahraan

Ulosteella tahrattuja tilkkuja (2,5 cm halkaisijaltaan) pestiin pesuaineliuoksella, huuhdottiin ja kuivattiin. Tilkut leikattiin neljänneksiksi ja käytettiin seuraavissa kokeissa.
 25

A) Tilkkuja inkuboitiin 1 ml:ssa 10 mM natriumasetattipuskuria, pH 5,5, endo-F:n (Boehringer Mannheim Biochemical) kanssa (0,15 yksikköä) tai ilman sitä 30 minuuttia 37 °C:ssa. Sitten putkia sentrifugoitiin kahdeksan minuuttia. Supernatantit poistettiin ja jokaisen absorbanssi mitattiin aallopituudella 280 nm. A₂₈₀:n muutos määritettiin vähentämällä asianmukaiset nollanäytteet (ks. esimerkki 1). Korkeampaan absorbanssiin liittyy tilkuista vapautuneen proteiiniaineksen tai aallopituudella 280 nm
 30 absorboivan aineksen määrän lisääntyminen. Kontrolleilla
 35

keskimääräinen A280:n muutos oli 0,93. Endo-F:llä käsiteltyjen tilkkujen keskimääräinen muutos oli 1,05. Tämä osoitti endo-F:n lisäävän ulostetahrojen poistotehoa.

5 B) Tilkkuja inkuboitiin 0,75 ml:ssa 10 mM natrium-asetaattipuskuria, pH 5,5, endo-F:n kanssa (0,15 yksikköä) tai ilman sitä 15 minuuttia 37 °C:ssa. Tämän käsittelyn lopussa lisättiin 0,25 ml pesuaineliuosta (0,1 M Tris-HCl-puskurissa, pH 7,5), joka sisälsi 10 µg proteaasia subtilisiini BPN', ja putkia inkuboitiin 37 °C:ssa toiset 10 15 minuuttia. Lopuksi putket sentrifugoitiin, supernatantit poistettiin, ja absorbanssi aallonpituudella 280 nm mitattiin. Kontrollin kohdalla (ei endo-F:ä) A280:n keskimääräinen muutos oli 1,08, kun taas endo-F:llä käsiteltyllä näytteellä nähtiin A280:n muutos 1,36. Tämä ilmaisi, 15 että endo-F:n vaikutus tehostui pesuaineen läsnäolosta.

C) Samankaltainen koe kuin B suoritettiin, paitsi että pesuaineliuos sisälsi 10 mM 2-merkapttoetanolia subtilisiinin sijasta. Kontrollille keskimääräinen A280:n muutos oli 1,05, kun taas endo-F:llä käsitelty näyte tuotti 20 A280:n muutoksen 1,24. Nämä tulokset osoittavat endo-F:n kyvyn poistaa ulostetahroja disulfidinkatkaisureagenssien ollessa läsnä.

D) Samankaltainen koe kuin B suoritettiin, paitsi että pesuaineliuos sisälsi 10 mM 2-merkapttoetanolia ja 25 10 µg subtilisiini BPN':a. Kontrollille keskimääräinen A280:n muutos oli 1,14, kun taas endo-F:llä käsiteltyllä näytteellä A280:n muutos oli 1,29. Nämä tulokset osoittavat, että endo-F kykenee poistamaan ulostetta pesuaineen, proteaasin ja disulfidinkatkaisureagenssin (2-merkapttoetanolin) ollessa läsnä. 30

Esimerkki 4

Endo-H:n vertailu muiden entsyymien kanssa

Esimerkin 3 osassa B kuvattujen kanssa samankaltaisia kokeita toistettiin endo-H:lla (Boehringer Mannheim Biochemical luettelonumero 100 119) ja muilla karbohydraa- 35

sientsyymeillä, paitsi ettei mitään proteaasia, kuten subtilisiinia, käytetty. Muutoksia A280:ssä seurattiin ja kuituja tarkasteltiin pyyhkäisyelektronimikroskopiolla. Hiukkas- ja bakteerijätteiden irtoaminen kankaasta nähtiin endo-H:lla ja "Lysing Enzymes" -seoksella (Sigma Chemical Companylta saatu proteaasi- ja glykanaasiseos). Kuitenkin entsyymeillä lysotsyymi, α -glukosidaasi, β -glukosidaasi ja β -glukuronidaasi nähtiin vähän tai ei lainkaan hyötyä. (Tuloksia ei esitetä.) Tämän kokeen elektronimikroskopian tulokset käsittelyistä edellä mainituilla entsyymeillä tai ilman niitä esitetään kuvioissa 7A - 7H. Kuvio 7A on kontrolli, jota ei käsitelty endoglykosidaasilla. Kuvio 7B on elektronimikroskooppikuva lysotsyymillä käsitellystä tilkusta; kuvio 7C on endo-H:lla käsitelty tilkku; kuvio 7D on α -glukosidaasilla käsitelty tilkku; kuvio 7E on β -glukosidaasilla käsitelty tilkku; kuvio 7F on elektronimikroskooppikuva "Lysing Enzymes" -seoksella käsitellystä kuidusta; kuvio 7G on elektronimikroskooppikuva β -glukuronidaasilla käsitellystä tilkusta; ja kuvio 7H on elektronimikroskooppikuva kitinaasilla käsitellystä tilkusta. Kuten voidaan nähdä, endo-H:lla käsitelty tilkku (kuvio 7C) on perusteellisesti puhdistunut ulostetahrasta. Samankaltaisia tuloksia saatiin "Lysing Enzymes" -seoksella käsitellyillä tilkuilla, kuten kuviossa 7F näkyy.

25 Esimerkki 5

Bakteerien poistaminen kiinteältä pinnalta

Endo-H:n vaikutuksen testaamiseksi bakteerien poistamisessa kiinteiltä pinnoilta (lasilta), seuraavaa menetelyohjetta käytettiin. Trypticase-soijaliemeen (TSB) (10 ml) siirrostettiin mikrobilajeja (Staphylococcus aureus ATCC-viljelmä nro 6 538 tai Escherichia coli ATCC-viljelmä nro 10 536) varastovinopintaviljelmästä ja inkuboitiin yli yön 37 °C:ssa. Valmistettiin suspensio, jossa oli noin 10^8 solua/ml TSB:tä, ja 100 μ l tätä suspensiota pantiin aluslasille uurretun ympyrän sisäpuolelle.

Kutakin lasia inkuboitiin 5 minuuttia 37 °C:ssa kuivassa inkubaattoriuunissa, minkä jälkeen ylimääräinen mikrobiliuos kopautettiin pois. Sitten lasit huuhdottiin 100 µl:lla steriiliä tislattua vettä. Ylimääräinen liuos ja irtonaiset eliöt kopautettiin sitten pois.

Sen jälkeen, kun bakteerien oli annettu tarttua aluslaseihin (ainakin 2 tuntia 37 °C:ssa), 100 µl seuraavia liuoksia pantiin erillisille laseille: (a) 10 mM asetaattipuskuri, pH 5,5, (b) 10 mM asetaattipuskuri, pH 5,5 + 1 miljoonasosa endo-H:ta (Boehringer Mannheim Biochemical luettelonumero 100 119), (c) pesuaineliuos, (d) pesuaineliuos + 1 miljoonasosa endo-H:ta. Erä laseja pidettiin syrjässä käsittelemättöminä kontrolleina eikä niitä käsitelty millään liuoksilla. Sitten muita kuin kontrollilaseja inkuboitiin 15 minuuttia 37 °C:ssa. Inkubaation lopussa liuokset kopautettiin pois. Sitten lasit huuhdottiin 100 µl:lla steriiliä tislattua vettä ja ilma-kuivattiin huoneenlämpötilassa. Bakteerit, jotka jäivät jäljelle tämän käsittelyn jälkeen lämpökiinnitettiin ja värjättiin normaalilla Gram-värjäysmenetelmällä. Sitten laseja tarkasteltiin valomikroskoopilla (kirkaskenttävalaistus, 125X suurennos), ja eliöiden määrä/näkökenttä määritettiin. 20 näkökenttää laskettiin joka lasilta, joista laskettiin keskiarvo eliötä/näkökenttä.

Saatiin seuraavat tulokset:

A) Staphylococcus aureukselle:

- | | |
|---------------------------|------------------------|
| i) Ei käsittelyä | >100 eliötä/näkökenttä |
| ii) Puskuri | >100 eliötä/näkökenttä |
| iii) Puskuri + endo-H | < 10 eliötä/näkökenttä |
| iv) Pesuaineliuos | >100 eliötä/näkökenttä |
| v) Pesuaineliuos + endo-H | < 10 eliötä/näkökenttä |

Nämä tulokset osoittavat, että endo-H yksin puskurissa tai yhdessä pesuaineen kanssa vähensi aluslaseille

tarttuneiden S. aureus -bakteereiden määrää kymmenkertaisesti verrattuna käsittelyyn pelkällä pesuaineella.

B) Escherichia colille

- | | | |
|---|-------------------------------|------------------------|
| | i) Ei käsittelyä | >100 eliötä/näkökenttä |
| 5 | ii) Puskuri | >100 eliötä/näkökenttä |
| | iii) Puskuri + endo-H | >100 eliötä/näkökenttä |
| | iv) Pesuaineliuos | >100 eliötä/näkökenttä |
| | v) Pesuaineliuos + | < 10 eliötä/näkökenttä |
| | endo-H | |

- 10 Nämä tulokset osoittavat, että endo-H yhdessä pesuaineen kanssa vähensi aluslaseille tarttuneiden E. colien määrää kymmenkertaisesti verrattuna käsittelyyn pelkällä pesuaineella.

Esimerkki 6

- 15 Bakteerien poistaminen kiinteältä pinnalta

- Samankaltainen koe kuin esimerkki 5 suoritettiin kahdella limaa tuottavalla Staphylococcus aureus -viljelmällä (määritettynä niiden polystyreeniputkiinsitoutumiskyvyn perusteella). Mikroskooppialuslaseja muunnettiin tekemällä kaksi ympyrää (halkaisijaltaan n. 1,7 cm) kynsilakalla. Eliöiden yli yön kasvatettuja viljelmiä laimennettiin 1:10 1 % peptoniliuksella. Laimennettua viljelmää (100 µl) pantiin ympyröihin. Lasit pantiin 150 mm petri-maljoille ja inkuboitiin 37 °C:ssa. Kahden tunnin inkubaation jälkeen lasit huuhdottiin tislatusella vedellä ja käsiteltiin kolmissa eri olosuhteissa (A. Na-asetaattipuskuri, B. pesuaine ja C. pesuaine ja 1 µg endo-H:ta/ml) kuten esimerkissä 5. Endo-H saatiin E. colista, joka oli transformoitu tuottamaan S. plicatuksen endo-H:ta. 15 minuutin kuluttua inkubaatiolasit huuhdottiin tislatusella vedellä ja Gram-värijätettiin. Bakteerien lukumäärä laskettiin mikroskoopissa 100X näkökenttää kohti 20 kentästä. Tulokset ilmaistaan solujen keskimääräisenä lukumääränä näkökenttää kohti.

Olosuhteet	Viljelmä I	Viljelmä II
A. Kontrolli	23	202
B. Pesuaine	9	58
C. Pesuaine + endo-H	2	33

5 Esimerkki 7

Bakteerien poisto kangaspinnalta

Endo-H:n vaikutuksen testaamiseksi bakteerien poistamiseen kangaspinnalta käytettiin seuraavaa menettelyohjetta. Staphylococcus aureusta (ATCC 6 538) ja Staphylococcus epidermidistä (ATCC155) viljeltiin erikseen 5 ml:ssa Lurian lientä ja annettiin kasvaa 37 °C:ssa 12 tuntia. Sitten viljelmät lisättiin 30 ml:an 0,2 M Na-sitraattipuskuria, pH 5,5, tiheyteen noin 10³ solua/ml, kahteen ravistelijan 100 ml:n pulloon. Myös kaksitoista kangastilkkaa (1,3 x 1,3 cm puuvillatilkkuja) lisättiin pulloihin siirrostaamisen jälkeen. Kahden tunnin 37 °C:ssa varovaisessa pyörittelyssä (150 rpm) inkubaation jälkeen tilkut siirrettiin steriileihin putkiin ja pestiin kolmesti 200 mM Na-sitraattipuskurilla, pH 5,5, joka oli edeltä steriloitu 0,22 µm suodatuksella. Kuusi tilkkua pantiin sitten ravistelijan pulloon, jossa oli 0,5 mg/ml endo-H:ta 30 ml:ssa sitraattipuskuria, ja kuusi tilkkua lisättiin kontrollina ravistelijan pulloon, jossa oli vain sitraattipuskuria. Endo-H saatiin S. plicatuksen endo-H:ta tuotavasta E. colista. 1,5 tunnin 37 °C:ssa, varovaisessa pyörittelyssä (100 rpm) inkubaation jälkeen tilkut siirrettiin steriileihin putkiin ja pestiin kuten edellä on kuvattu. Sitten tilkut maljattiin varovasti trypticase-soija-agarmaljoille ja niiden päälle pantiin riittävästi nestemäistä trypticase-soija-agaria tilkkujen peittämiseksi. Maljojen kuivuttua niitä inkuboitii 37 °C:ssa 18 tuntia, ja Staphylococcus aureus - ja Staphylococcus epidermidis -pesäkkeet kankaan pinnalla laskettiin preparointimikroskooppia käyttäen.

Saatiin seuraavat tulokset:

A) Staphylococcus aureukselle

Kontrolli 103 ± 24 pesäkettä tilkkua kohti

Endo-H 53 ± 18 pesäkettä tilkkua kohti

5 49 %:n bakteeripesäkkeiden väheneminen endo-H-käsittelyllä.

B) Staphylococcus epidermidikselle

Kontrolli 57 ± 11 pesäkettä tilkkua kohti

Endo-H 16 ± 10 pesäkettä tilkkua kohti

10 72 %:n bakteeripesäkkeiden väheneminen endo-H-käsittelyllä.

Nämä tulokset osoittavat, että endo-H-käsittely vähentää merkittävästi kangaspintaan tarttuneiden bakteerien lukumäärää.

15 **Esimerkki 8**

Endo-H:n sitoutuminen bakteereihin

Seuraava koe suoritettiin sen määrittämiseksi, onko tyyppin II endoglykosidaasi endo-H vuorovaikutuksessa bakteerien Staphylococcus aureus ja Streptococcus mutans jonkin pintakomponentin kanssa. Tällainen vuorovaikutus havaittiin. Vaikka sitä ei tässä karakterisoida täydellisesti, tätä vuorovaikutusta ei aikaisemmin tunnettu, ja se voi muodostaa perustan edellä kuvatulle endo-H:n kyvylle poistaa tällaisia bakteereita pinnalta.

25 Transformoidusta E. colista saatu endo-H, joka oli puhdistettu muuntamalla menetelmiä, jotka ovat kuvanneet Trumbly, R. J. ym. (1985), J. Biol. Chem., 260, 5683 - 5690, leimattiin biotiinilla sen menetelmän mukaisesti, jonka ovat kuvanneet Updyke, T. V. ja Nicolson, G. L. 30 (1986), Methods in Enzymology, 121, 717 - 725. Tällaisen leimauksen jälkeen endo-H säilytti suurimman osan reaktiivisuudestaan ovalbumiini-glykoproteiinia kohtaan.

35 Lurian liemessä yli yön kasvatetut viljelmät Staphylococcus aureusta (ATCC 6 538) ja Difcon aivo-sydän -infuusiomediumissa kasvatettua Streptococcus mutansia

(ATCC 27 607) sentrifugoitiin ja pestiin kolmesti 200 mM Na-sitraattipuskurilla, pH 5,5, ja suspensoitiin samaan puskuriin pitoisuuteen noin 10^9 solua/ml. 0,5 ml:n näytteet pantiin kolmeen 1,5 ml:n Eppendorf-putkeen, ja niitä inkuboi-
 5 boitiin eri olosuhteissa eri aikoja.

Putki	Soluja	2 % BSA	Biotiny- loitu endo-H	0,2 M	Inkubaa- tioaika
				Na-sit- raatti pH 5,5	(minuut- tia)
10					
1	0,5 ml	5 μ l	-	0,5 ml	30
2	0,5 ml	-	5 μ l	0,5 ml	2
3	0,5 ml	-	5 μ l	0,5 ml	30

15 Inkubaatio tehtiin huoneenlämmössä hidasta heilut-
 tajaa käyttäen joko 2 tai 30 minuuttia. BSA:ta (naudan
 seerumin albumiinia) laimennettuna Tris-puskuroituun suo-
 laliuokseen käytettiin kontrolliliuoksena mahdollisen epä-
 spesifisen proteiinien soluihin sitoutumisen estämiseksi.
 20 Inkubaation jälkeen putket sentrifugoitiin, ja supernatan-
 tit heitettiin pois. Solut pestiin kahdesti 2 % BSA-liuok-
 sella lisäämällä 1,0 ml BSA:ta soluihin, vortex-sekoitta-
 malla hyvin, sentrifugoimalla ja heittämällä pois superna-
 tantti. Pestyihin soluihin käytettiin 0,5 ml streptavidii-
 25 ni-HRP:tä (streptavidiinileimattu piparjuuren peroksidaa-
 si, Kirkegaard and Perry Laboratories, Inc.) ja inkuboi-
 tiin 30 minuuttia huoneenlämpötilassa. Putket sentrifugoi-
 tiin taas ja pestiin kuten edellä on kuvattu. Bakteeri-
 soluihin sitoutuva endo-H määritettiin havaitsemalla
 30 HRP-streptavidini, joka sitoutuu hyvin tiukasti soluihin
 sitoutuneeseen biotinyloituun endo-H:hon. HRP havaittiin
 lisäämällä 0,5 ml HRP-substraattia OPD:tä (o-fenyleenidi-
 amiinia), joka oli laimennettu vetyperoksidia sisältävään
 sitraatti-fosfaatti -puskuriliuokseen. Kromogeenin muodos-
 35 tuminen lopetettiin 2 M H_2SO_4 :lla minuutti OPD:n lisäyksen

jälkeen. Solut sentrifugoitiin ja supernatantti mitattiin aallonpituudella 490 nm.

Saatiin seuraavat tulokset:

Staphylococcus aureukselle

5 Absorbanssi 490 nm

Kontrolli 0,13

Endo-H, 2 minuuttia 1,89

Endo-H, 30 minuuttia 1,90

Streptococcus mutansille

10 Absorbanssi 490 nm

Kontrolli 0,18

Endo-H, 2 minuuttia 3,76

Endo-H, 30 minuuttia 3,80

Nämä tulokset viittaavat siihen, että endo-H sitoutuu bakteereihin Staphylococcus aureus ja Streptococcus mutans. Tulokset osoittavat, että suurin osa sitoutuvasta endo-H:sta sitoutuu ensimmäisen kahden minuutin tai vähemmän aikana sen jälkeen, kun se on saatettu yhteyteen solujen kanssa. Streptococcus mutansilla saatu korkeampi absorbanssi saattaa viitata korkeampaan endo-H:n sitoutumistasoon.

Esimerkki 9

Tämän keksinnön mukainen raskaaseen käyttöön tarkoitettu nestemäinen pyykinpesuainekoostumus on seuraavanlainen:

25	Komponentti	Aktiivinen paino-%
	Lineaarinen C ₁₃ -alkyylibentseenisulfonihappo	8,00
	C ₁₄₋₁₅ -alkyylipolyetoksylaatti(2,25)-sulfonihappo	12,00
30	1,2-propaanidioli	3,50
	Natriumdietyleenitriamiinipenta-asetatti	0,30
	Monoetanoliamiini	2,00
	C ₁₂₋₁₃ -alkoholipolyetoksylaatti (6,5)*	5,00
	Etanoli	8,50
35	Kaliumhydroksidi	1,80

	Natriumhydroksidi	3,85
	C ₁₂₋₁₄ -rasvahappo	10,00
	Sitruunahappo	4,00
	Kalsiumformiaatti	0,12
5	Natriumformiaatti	0,86
	C ₁₂ -alkyyli(trimetyyli)ammoniumkloridi	0,50
	Tetraetyleenipenta-amiinietoksyylaatti (15-18)	2,00
	Vesi	35,12
	Väriaine	0,08
10	Hajuste	0,25
	Proteaasi**	0,125
	Endoglykosidaasi H	2000 mil- joonasosaa

Huomautuksia:

- 15 (*) Alkoholi ja monoetoksyloitu alkoholi poistettu.
 (**) mg aktiivista entsyymiä/g (kantaseoksesta 34 mg aktiivista entsyymiä/g)

Edellä luetellut ainesosat lisätään yhdellä sekoittimella varustettuun sekoitustankkiin siinä järjestyksessä kuin ne esiintyvät. Ennen kuin proteaasientsyymi, väriaine ja hajuste lisätään, seoksen pH säädetään niin, että 10-painoprosenttisella vesiliuoksella 20 °C:ssa on pH noin 8,5.

25 Tällä koostumuksella saadaan hiilihydraattia sisältävät tahrat puhdistumaan paremmin, jopa verrattuna proteaasia ja/tai amylaasia sisältäviin pesuaineisiin.

Esimerkki 10

30 Tämän keksinnön mukainen raskaaseen käyttöön tarkoitettu nestemäinen pyykinpesuainekoostumus on seuraavanlainen:

	Komponentti	Aktiivinen paino-%
	Lineaarinen C ₁₃ -alkyylibentseenisulfonihappo	8,00
	C ₁₄₋₁₅ -alkyylipolyetoksylaatti(2,25)-sulfonihappo	12,00
5	1,2-propaanidioli	3,50
	Natriumdietyleenitriamiinipenta-asettaatti	0,30
	Monoetanoliamiini	2,00
	C ₁₂₋₁₃ -alkoholipolyetoksylaatti (6,5)*	5,00
	Etanoli	8,50
10	Kaliumhydroksidi	1,80
	Natriumhydroksidi	3,85
	C ₁₂₋₁₄ -rasvahappo	10,00
	Sitruunahappo	4,00
	Kalsiumformiaatti	0,12
15	Natriumformiaatti	0,86
	C ₁₂ -alkyyli trimetyyliammoniumkloridi	0,50
	Tetraetyleenipenta-amiinietoksylaatti (15-18)	2,00
	Vesi	37,12
	Väriaine	0,08
20	Hajuste	0,25
	Proteaasi**	0,125
	Endoglykosidaasi H	125 mil- joonasosaa

Huomautuksia:

- 25 (*) Alkoholi ja monoetoksyloitu alkoholi poistettu.
 (**) mg aktiivista entsyymiä/g (kantaseoksesta 34 mg aktiivista entsyymiä/g)

30 Edellä luetellut ainesosat lisätään yhdellä sekoittimella varustettuun sekoitustankkiin siinä järjestyksessä kuin ne esiintyvät. Ennen kuin proteaasientsyymi, väriaine ja hajuste lisätään, seoksen pH säädetään niin, että 10-painoprosenttisella vesiliuoksella 20 °C:ssa on pH noin 8,5.

Tällä koostumuksella saadaan hiilihydraattia sisältävät tahrat puhdistumaan paremmin, erityisesti ulostetahrat.

- 5 Muita tämän keksinnön mukaisia koostumuksia saadaan, kun endo-H-taso lasketaan arvoon 0,40 mg/ml, vesi lasketaan 35,72:en, ja lisätään 1 % Irgasania (Ciba-Geigyn antibakteriaallinen aine).

Esimerkki 11

- 10 Tämän keksinnön mukainen nestesaippuakoostumus on seuraavanlainen:

	Komponentti	Aktiivinen paino-%
	Ammoniumlauryylisulfaatti	6,0
	Natriumlauryylisarkosinaatti	5,7
15	Kokamidopropyylibetaiini	6,3
	Kookospähkinän rasvahappo	1,0
	Kvaternaarinen amiini	0,3
	Etyleenidiamiinitetraetikkahappo	0,2
	Ammoniumsulfaatti	0,4
20	Hajuste	0,25
	Kathon	5 miljoonanosaa
	Vesi	72,0
	Endoglykosidaasi H	1000 miljoonanosaa
25	Triclocarban	1,50

Edellä luetellut ainesosat lisätään yhdellä sekoittimella varustettuun sekoitustankkiin siinä järjestyksessä kuin ne esiintyvät.

- 30 Tämä koostumus tarjoaa antibakteriaalisen vaikutuksen normaalin ihon flooran poistamiseksi, jopa verrattuna glykosidaasia sisältämättömiin antibakteriaalsiin saippuihin.

Esimerkki 12

Tämän keksinnön mukainen kovien pintojen hankaus-
puhdistusaine on seuraavanlainen:

	Komponentti	Paino-%
5	"False body" -nestefaasi (ominaispaino 1,1)	93,5
	Barasum NAS-100 (natriumsaponiittisavi)	4,25
	Tetrakaliumpyrofosfaatti	6,00
	Trikaliumfosfaatti	2,00
	Natriumhypokloriittivalkaisuaine	0,90
10	Natriumlauryylialkyyilisulfaatti	0,25
	Pinta-aktiivinen aine	
	Väriaine ja hajuste	0,26
	Endoglykosidaasi H	1000 miljoonaa
		nasosaa
15	Pehmeä vesi	<u>78,86</u>
	Hankausaine (expanded Perlite, ominaispaino 2,0, keskimääräinen partikkelihalkaisija 50 µm)	
		5,0
20	Hercoflat 135 -täyteaine (jauhettu polypropyleeni, ominaispaino 0,9, keskimääräinen partikkelihalkaisija 35 µm)	1,50
	Keskimääräisten partikkelihalkaisijoiden suhde hankausaine/täyteaine = 1,43:1	
25	Koostumus valmistetaan sekoittamalla tetrakaliumpyrofosfaatti, trikaliumfosfaatti, natriumsaponiittisavi, väriaine, hajuste ja deionisoitu vesi käyttäen suhteellisen korkean leikkaavan voiman alaista sekoitusta siinä määrin kuin on tarpeen "false body" -nestefaasin muodostamiseksi.	
30	Sitten pinta-aktiivinen alkyylisulfaatti sekoitetaan tähän seokseen ja sen jälkeen polypropyleenitäyteainemateriaali. Natriumhypokloriitista ja Perlite-hankausaineesta valmistetaan erillinen vesipohjainen vetelä massa, ja sitten se sekoitetaan "false body" -nestefaasiin	
35	kohtuullisen leikkaavan voiman alaisessa sekoituksessa. Saatu hankauskoostumus on "false bodied", ts. geelimäinen	

lepotilassa, mutta nesteytyy helposti leikkaavan voiman alaisena. Tällainen koostumus on erityisen tehokas tahrojen ja lian poistamiseksi kivilta pinnoilta.

Esimerkki 13

5	Tämän keksinnön mukainen shampookoostumus on seuraavanlainen:	
	Komponentti	Määrä
	Ammoniumalkyyli-sulfaatti (29 % vesiliuos)	55,25 %
	US-patentin 4 345 080 esimerkin I mukaisia	
10	sinkkipyridiini-ionikiteitä	2,0
	Kookospähkinän monoetanoli-amidi	3,0
	Etyleeniglykolidistearaatti	5,0
	Natriumsitraatti	0,5
	Sitruunahappo	0,2
15	Väri-liuos	0,1
	Hajuste	0,5
	Endoglykosidaasi H	1000 miljoonaa
		nasosaa
	Vettä	q.s. 100,00 %
20	asti	

Esimerkki 14

	Tämän keksinnön mukainen antiperspiranttipuikko tehdään käyttäen seuraavia komponentteja:		
	Komponentti	Määrä	
25	Syklometikoni	42,55	
	Nestemäinen AP	4,99	
	Stearyyli-alkoholi	11,49	
	Hydrattu risiiniöljy	4,99	
	Talkki	6,99	
30	Zirkonium/aluminium/glysiini -kompleksi	26,67	
	Hajunpeittäjä	0,80	
	C ₂₀ -alkoholi	0,12	
	Pyridoksaalifosfaatti	1,00	
35	Endoglykosidaasi H	500 miljoonaa	
		nasosaa	

Esimerkki 15

Tämän keksinnön mukainen nestesaippuakoostumus on seuraavanlainen:

		Aktiivinen paino-%
5	Komponentti	
	Ammoniumlauryylisulfaatti	6,0
	Natriumalkyyylisarkosinaatti	5,7
	Kokamidopropyylibetaini	6,3
	Kookospähkinän rasvahappo	1,0
10	Etyleenidiamiinitetraetikkahappo	0,2
	Ammoniumsulfaatti	0,4
	Hajuste	0,25
	Väriaine	5 miljoon- nasosaa
15	Vesi	80,15
	Endo-H	50 miljoon- nasosaa
	2,4,4'-trikloori-2'-hydroksidifenyylietteri	100 miljoon- nasosaa

20 Edellä luetellut ainesosat lisätään yhdellä sekoit-
timella varustettuun sekoitustankkiin siinä järjestyksessä
kuin ne esiintyvät edellä. Ennen kuin väriaine ja hajuste
lisätään, seoksen pH säädetään niin, että 10-painoprosent-
tisella vesiliuoksella 20 °C:ssa on pH noin 6,5.

25 Tämä koostumus tarjoaa antibakteriaalisen vaikutuk-
sen normaalin ihon flooran poistamiseksi.

Esimerkki 16

Tämän keksinnön mukainen kovien pintojen puhdistus-
aine on seuraavanlainen:

	Komponentti	Aktiivinen paino-%
	Natriumlauryylialkyyli sulfaatti	0,5
	Natriumalkyyli sulfaatti	0,5
5	Butyylikarbitoli	4,0
	Natriumvetykarbonaatti	0,5
	Sitruunahappo	0,04
	Formaldehydi	0,03
	Hajuste	0,05
10	Tartraattimono-/disukkinaatti	5,0
	Endo-H	1000 miljoonaa
	Vesi	88,4

Edellä luetellut ainesosat lisätään yhdellä sekoittimella varustettuun sekoitustankkiin siinä järjestyksessä kuin ne esiintyvät edellä. Ennen kuin hajuste lisätään, seoksen pH säädetään niin, että 10-painoprosenttisella vesiliuoksella 20 °C:ssa on pH noin 7.

Koostumus on tehokas saippuavaahdon ja homeen irtottamiseen kovilta pinnoilta, ja se on tehokkaampi kuin puhdistusaine, jossa ei ole endoglykosidaasia.

Esimerkki 17

Kokonaisten hedelmien, vihannesten tai muiden kasvipintojen puhdistamiseen ja/tai säilyttämiseen käytetty koostumus on seuraavanlainen:

	Komponentti	Aktiivinen paino-%
	Vesi	96,4
	C ₁₂₋₁₃ -alkoholipolyetoksy-	0,1
30	laatti	
	Endo-H	3500 miljoonaa

Tämä koostumus valmistetaan sekoittamalla vastaavat määrät alkoholipolyetoksy-laattia ja endo-H:ta veteen ja säätämällä lopullinen pH välille 6-7. Lopullinen koostumus

sumutettuna kasvipinnoille, kuten kokonaisille hedelmille ja vihanneksille, on hyödyllinen mikrobien kasvun estämiseksi kyseisillä pinnoilla.

Esimerkki 18

- 5 Antimikrobisen aineen bakterisidisen tehon voimistuminen endo-H:n vaikutuksesta

Yli yön kasvatettu viljelmä Escherichia colia laimennettiin tuoreeseen ravintoliemeen, ja sitä kasvatettiin neljä tuntia 37 °C:ssa. Solut eristettiin sentrifugoimalla ja pestiin 0,2 M sitraattipuskurissa (SCB), pH 5,5. Sentrifugoinnin jälkeen solut suspensoitiin uudelleen SCB:hen. Seuraavat putket (kahtena rinnakkaisena) valmistettiin:

15		1000 mil-joonasosaa	5000 mil-joonasosaa		
	<u>Olosuhteet</u>	<u>endo-H:ta</u>	<u>sidiiniä</u>	<u>SCB</u>	<u>Vesi</u>
	Kontrolli	0 µl	0 µl	200 µl	10 µl
	Klooriheksidiini	0 µl	10 µl	200 µl	10 µl
20	Endo-H	200 µl	0 µl	0 µl	10 µl
	Endo-H + klooriheksidiini	200 µl	10 µl	0 µl	0 µl

- Endo-H oli S. plicatuksen endo-H:ta tuottavasta E. colista. Kuhunkin putkeen lisättiin 790 µl solususpensiota (lopullinen tilavuus nyt 1 ml), ja 10 µl näytteet otettiin 0 minuutin kontrollina. Putkia inkuboitiin 37 °C:ssa pyörittävässä ravistelijassa, ja 10 µl näytteet otettiin 1 ja 3 tunnin kohdalla. Nämä 10 µl erät sekoitettiin 990 µl:n PBS:ä (fosfaattipuskuroitua suolaliuosta) kanssa (laimennus 10^{-2}) ja laimennettiin eteenpäin sarjalaimennuksena (1PBS:än (100 µl 900 µl:ssa PBS:ä). 10 µl kutakin laimennettua liuosta maljattiin Lurian-Bertanin agarmaljoille. Maljoja inkuboitiin 37 °C:ssa yli yön, ja pesäkkeet laskettiin. Pesäkkeitä muodostavien bakteerien määrä putkissa laskettiin tehtyjen laimennusten perusteel-

la, ja tämän lukumäärän logaritmia käytettiin vielä tehtäviin käyriin ja laskuihin.

5	Olosuhteet	0 minuutin kontrolli	1 tunti (logaritminen tappo)	3 tuntia (logaritminen tappo)
10	Kontrolli	8,62	8,57 (0,05)	8,53 (0,09)
	200 miljoonasosaa endo-H:ta	8,64	8,55 (0,09)	8,55 (0,09)
15	50 miljoonasosaa kloori- heksidiiniä	8,60	4,42 (4,15)	2,44 (6,59)
	200 miljoonasosaa endo-H:ta + klooriheksidiiniä	8,61	2,40 (6,17)	2,00 (>6,53)
20				

Näistä tuloksista on piirretty kuvaaja kuviossa 8. Kuten voidaan nähdä, 200 miljoonasosaa endo-H:ta tehostaa 50 miljoonasosan klooriheksidiiniä bakterisidistä vaikutusta.

Samankaltaisia tuloksia saatiin hieman erilaisilla klooriheksidiinin ja endo-H:n pitoisuuksilla yhden tunnin ajalla mitattuna. Nämä tulokset esitetään kuviossa 9. Kuten voidaan nähdä, 140 miljoonasosaa endo-H:ta tehostaa 40 miljoonasosan klooriheksidiiniä tehokkuutta.

Tämän vaikutuksen tutkimiseksi edelleen tehtiin samankaltainen koe käyttäen 20 miljoonasosaa klooriheksidiiniä (lopullinen pitoisuus) vaihtelevien endo-H-pitoisuuksien kanssa. Tulokset esitetään kuvioissa 10A ja 10B. Nämä kuvaajat edustavat pesäkkeen muodostavien yksiköiden (CFU) logaritmin muutosta. Kuten voidaan nähdä, lisätyn endo-H:n määrä vaikuttaa suhteellisen lineaarisesti noin 280 miljoonasosaan endo-H:ta asti. Endo-H-pitoisuuden lisäykset vielä tästä tehostavat haittavaikutusta bakteerien elinkyvälle ainakin 1000 miljoonasosaan endo-H:ta asti yhdessä 20 miljoonasosan klooriheksidiiniä kanssa.

Esimerkki 19

Endo-H:n vaikutus sienten elinkykyisyyteen yksin ja yhdessä antimikrobisen aineen kanssa

Logaritmisen kasvun vaiheessa olevaa Candida albicans -viljelmää kasvatettiin, laimennettiin tuoreeseen elatusaineeseen ja käsiteltiin 0, 1, 10, 100 ja 1 000 miljoonasosalla endo-H:ta (lopullinen pitoisuus) 4 tunnin ajan inkuboiden sekoituksessa 37 °C:ssa. Endo-H oli Bacillus subtiliksesta, joka oli transformoitu tuottamaan S. plicatuksen endo-H:ta. Yksi-, kymmen- ja satakertaiset laimennokset tehtiin ja maljattiin elinkykyisten solujen lukumäärien saamiseksi. Nollasta kymmeneen miljoonasosaan endo-H:ta ei vähentänyt merkitsevästi solujen elinkykyisyyttä, vaikka yhdessä tapauksessa 10 miljoonasosaa endo-H:ta vähensi elinkykyisyyttä noin 36 %:lla 18 tunnin inkubaation jälkeen. Kuitenkin 100 - 1 000 miljoonasosaa endo-H:ta vähensi talteen saatujen elinkykyisten solujen lukumäärää vastaavasti 50 - 88 %:lla, verrattuna kontrolliin, jota ei käsitelty endo-H:lla käsiteltäessä 4 tuntia.

Erillisessä kokeessa Candida albicansin viljelmä kasvatettiin, laimennettiin tuoreeseen elatusaineeseen, ja sitä käsiteltiin 2,5 µg/ml Nystatinilla® yhdessä 0, 1, 10, 100 tai 1 000 miljoonasosan (lopullinen pitoisuus) endo-H:ta kanssa 18 tuntia inkuboiden sekoituksessa 37 °C:ssa. Yksi-, kymmen-, sata- ja tuhatkertaiset laimennokset tehtiin ja maljattiin elinkykyisten solujen lukumäärien saamiseksi. Endo-H vähensi talteen saatujen elinkykyisten solujen määrää seuraavasti, verrattuna Nystatinilla® yksin saatuun:

Miljoonasosaa endo-H:ta	Vähentymis-%
0	0 %
1	69 %
10	93 %
100	99 %

Kuten voidaan nähdä, niinkin vähän kuin 1 miljoonasa endo-H:ta tehostaa merkitsevästi Nystatinin^R mykosidista tehoa, kun taas 10 miljoonasa ja 100 miljoonasa endo-H:ta tappaa lähes kaikki pelkästä Nystatin^R-käsittelystä selviävät sienet.

Samankaltainen koe suoritettiin käyttäen Amphotericin B:tä^R pitoisuudessa 0,5 µg/ml kolmen tunnin ajan. Tulokset olivat seuraavat:

	Miljoonasa endo-H:ta	Elinkykyisyyden vähentymis-%
10	0	0 %
	1	17 %
	10	5 %
	100	96 %
	1 000	94 %

Kuten voidaan nähdä, 100 miljoonasa endo-H:ta tehostaa Amphotericin B:n^R mykosidista tehoa.

Esimerkki 20

Endo-H:n antimikrobinen teho yksin tai yhdessä lysotsyymin kanssa

48 tuntia kasvatettua jatkoviljelmää E. colia (ATCC 31 617) käytettiin testaamaan lysotsyymi mutanolysiinin (Sigma Chemical Co.) vaikutusta yksin tai yhdessä puhdistusaineen ja/tai endo-H:n kanssa. Endo-H oli E. colista, joka oli transformoitu tuottamaan S. plicatuksen endo-H:ta. Seuraava menettelykuvaus ja tulokset saatiin kahden tunnin 37 °C:ssa käsittelyn jälkeen:

		Muta- noly- sii- ni, mil- joo- nas- osaa	Na- sit- raat- ti, pH 5,5	Na- sit- raat- ti, pH 7,0	Tide, 200 mil- joo- nas- osaa	Endo- H, 200 mil- joo- nas- osaa	Tulokset
5							
10	1	Kont- rolli					Fimbrioita, tiivis soluseinä
	2	200	+				Fimbrioita, tiivis soluseinä
15	3	200		+			Fimbrioita, tiivis soluseinä
	4	200	+		+		Fimbrioita, tiivis soluseinä
20	5	200		+	+		Fimbrioita, solujen kondensoituminen
25	6	200	+			+	Fimbrioiden menetys
	7	200		+		+	Vähän soluja, hieman solujäänteitä, solu- seinän hajoaminen
30	8	200	+		+	+	Joitakin fimbrioita
	9	200		+	+	+	Solut huonossa kun- nossa (kondensoitu- neita), mutta vielä läsnä
35							

Kuten voidaan nähdä, endo-H:lle ja mutanolysii-
nille, joko ilman puhdistusainetta tai sen kanssa, eri
pH:issa altistettujen bakteerien yleinen morfologia muut-
tui merkitsevästi. Dramaattisimmat vaikutukset olivat
pH:ssa 7, kun endo-H:ta käytettiin yksin tai yhdessä puh-
distusaineen kanssa. Solujen elinkykyisyyteen ei kuiten-
kaan ollut näkyvää vaikutusta. Endo-H ja mutanolysiini
eivät vähentäneet maljauskokeessa saatujen pesäkkeiden
lukumäärää verrattuna puskurikontrolliin.

Esimerkki 21

Bakteerien poisto lasipinnoilta endo-H:lla ja PNGaasi F:llä

5 Escherichia colia (ATCC 31 617) ja Staphylococcus epidermidistä (ATCC 155) käytettiin aluslaseille siirrostamiseen. Kussakin lasissa oli kaksi kaiverrettua ympyrää, ja kuhunkin siirrostettiin E. colia tai S. epidermidistä. Bakteerien annettiin inkuboitua 37 °C:ssa kaksi tuntia.

10 Tislatulla vedellä huuhtelun jälkeen lasit käsiteltiin joko 1) PBS-puskurilla, 2) endo-H:lla (100 miljoonasosaa) PBS-puskurissa tai 3) PNGaasi F:llä (100 miljoonasosaa) PBS-puskurissa. Endo-H oli peräisin S. plicatuksen endo-H:ta tuottavasta E. colista. 30 minuutin kuluttua 37 °C:ssa lasit huuhdottiin tislatussa vedessä. Gram-värjäyksen jälkeen lasit tutkittiin valomikroskoopin kirkaskent-

15 täoptiikalla.

Puskurikontrollin tapauksessa lasilla pysyvien bakteerien lukumäärä oli suurempi kuin 100 näkökenttää kohti. Endo-H:lla käsitellyt lasit sisälsivät paljon vähemmän

20 bakteereita. S. epidermidiksen tapauksessa vain noin 1 - 3 bakteeria havaittiin näkökenttää kohti. E. colin tapauksessa noin 5 - 10 havaittiin näkökenttää kohti. Niillä laseilla, jotka oli käsitelty PNGaasi F:llä, havaittiin kohtalaisia määriä bakteereita sekä S. epidermidiksellä

25 että E. colilla (noin 20 näkökenttää kohti).

Nämä tulokset viittaavat siihen, että PNGaasi F kykenee poistamaan bakteereita lasipinnoilta, vaikkakaan ei yhtä tehokkaasti kuin endo-H.

Esimerkki 22

30 Endo-H:ta sisältävä tekohampaiden puhdistustabletti Natriumvetykarbonaatti, natriumperboraatin monohydraatti, viinihappo, natriumtripolyfosfaatti, sulfaamihappo, polyetyleeniglykoli (molekyylipaino 20 000) ja etyleenidiamiinitetra-asetatti granuloidaan erikseen nesteyttämällä kuumailmahauteessa 60 - 65 °C:ssa 30 minuuttia. Sit-

35

•

10

15

20

		Paino-%
	Natriumperboraatin monohydraatti	30,00
	Kaliummonopersulfaatti	28,00
	Natriumvetykarbonaatti	13,34
5	Natriumtripolyfosfaatti	10,00
	Natriumvetykarbonaatti/väri	4,00
	Trilon B	3,00
	Natriumkarbonaatti	3,00
	Polyetyleeniglykoli	2,50
10	Piidioksidi	2,00
	Piparminttu jauhe	1,50
	Wasag-esteri 7	0,70
	Wasag-esteri 15	0,70
	Kovetetut triglyseridit	0,50
15	Natriumdodekyylibentseenisulfonaatti	0,40
	Sukkinaattidetergentti	0,30
	Blue Lake No. 1	0,06
	Endo-H	100 miljoo- nasosaa

- 20 Tabletti valmistetaan HORN-rotaatiotablettikonees-
sa, jossa on 39 paininta. Puristaminen on kaksivaiheinen:
Aluksi "toisen kerroksen" sininen seos puristetaan sullo-
malla hyvin alhaisella paineella (10 kN/tabletti). Sitten
"ensimmäisen kerroksen" valkoinen seos johdetaan sisään ja
25 puristetaan paineella 70 kN/tabletti. Tällä tavalla tuo-
tetaan 4 gramman tabletti, joka on 2,7 grammaa sinistä ja
1,3 grammaa valkoista.

Kuluttaja liuottaa tabletit veteen puhdistukseen
veteen pannut tekohampaat.

30 **Esimerkki 23**

Endo-H:ta sisältävä kevyt emulsiovoide

- Öljy-vesi -auringonsuojaemulsiopohja tehdään seu-
raavista ainesosista, jotka ilmaistaan niiden kemiallisil-
la nimillä tai Cosmetic, Toiletry and Fragrance Associa-
tionin (CTFA:n) nimien suomalaisilla vastineilla:

35

Ainesosa	Paino-%
Vesifaasi:	
Metyyliparabeeni (säilöntäaine)	0,20
Pantetiini (kosteuttaja)	0,10
5 Carbomer 934 (sakeutusaine)	0,08
Natriumhydroksidi, 10 % (neutralointiaine)	1,00
Endo-H	100 miljoonaa nasosaa
Puhdistettu vesi	q. s. 100 % asti
10 Öljyfaasi:	
Raskas mineraaliöljy	4,00
kahdesti puristettu steariinihappo (anioninen emulsiointiaine)	3,00
Kolesteroli (apuemulsiointiaine)	1,00
15 Setyylialkoholi (apuemulsiointiaine)	1,80
Risiiniöljy (pehmennysaine)	1,00
Setyylipalmitaatti (pehmennysaine)	1,20
Oktyylidimetyyli-PABA (UV-absorboija)	1,40
Propyyliiparabeeni (säilöntäaine)	0,10
20 Vesi ja muut vesifaasin ainesosat paitsi natriumhydroksidi ja endo-H:n vesiliuos lisätään mekaanisella sekoittimella varustettuun sekoitusastiaan, ja niitä sekoitetaan kuumentaan noin 75 - 80 °C:seen tasa-aineisen vesidisersion muodostamiseksi. Sitten natriumhydroksidiliuos lisätään ja sekoitetaan vesifaasiin happaman Carbo-	
25 mer-sakeutusaineen neutraloimiseksi.	
Mineraaliöljy ja öljyfaasin ainesosat lisätään erilliseen sekoitusastiaan, ja niitä sekoitetaan kuumentaan noin 80 - 82 °C:seen tasa-aineisen öljyfaasin muodostamiseksi. Kuuma öljyfaasi lisätään hitaasti kuumaan vesifaasiin käyttäen suurinopeuksisia mekaanisia dispersointivälineitä. Sekoitusta jatketaan, kunnes saadaan homogeeninen öljy/vesi-emulsio. Emulsio jäähdytetään huoneenlämpöön. Jos niin halutaan, valinnaisia väriaineita, kuten	
30 vesiliukoisia väriaineita, sekoitetaan edullisesti emulsi-	
35	

oon noin 45 - 50 °C:ssa, ja tuoksuvia öljyjä lisätään edullisesti noin 35 - 40 °C:ssa. Endo-H sekoitetaan emulsioon noin 35 - 40 °C:ssa.

Esimerkki 24

5 S. aureuksen poistaminen sian nahasta

Sian nahka infektoitiin S. aureuksella ($1,2 \times 10^7$ pesäkettä/ml) levittämällä 0,1 ml viljelmää nahan pinnalle. Eliöiden annettiin asettua nahalle kaksi tuntia huoneenlämpötilassa. Kaksi rinnakkaista näytettä nahan paloista käsiteltiin sitten 30 sekunnin ajan:

- 1) käsittelemätön kontrolli
- 2) pelkällä vedellä
- 3) 10 % saippualluoksella
- 4) kohdalla 3 + endo-H:lla (20 miljoonasosaa)
- 15 5) 20 miljoonasosalla endo-H:ta puskurissa

Endo-H saatiin S. plicatuksen endo-H:ta tuottamaan transformoidusta E. colista. Käsittelyn jälkeen näytteet huuhdottiin tislatusella vedellä ja pantiin 2 % osmiumtetroksidiin, ja sen jälkeen kiinnitettiin Ryterin-Kellenbergerin kiinnitteessä. Sitten näytteitä käsiteltiin peräkkäin osmiumissa ja tiosemikarbatsonissa. Kriittisen pisteen kuivauksen jälkeen kaikkia näytteitä tarkasteltiin SEM:illä. Mikroskooppivalokuvia otettiin.

25 S. aureus -pesäkkeitä tavattiin runsaasti käsittelemättömissä, vesikäsitellyissä ja pelkällä saippualla käsitellyissä näytteissä. Ks. esim. kuviota 11, joka osoittaa nestemäisellä käsisaippualla käsittelyn tehon. Endo-H-käsitellyissä näytteissä nähtiin merkitsevä eliöiden väheneminen. Ks. esim. kuviota 12, joka osoittaa

30 S. aureuksen poistuvan sian nahasta käsiteltäessä yhdessä nestemäisellä käsisaippualla ja endo-H:lla.

Esimerkki 25

Homeen poisto suihkuverhosta

Muovinen suihkuverho kostutettiin hanavedellä ja pantiin pimeään kolmeksi viikoksi. Tämän ajan kuluttua
5 pieni näyte verhosta, joka oli homeen peitossa, käsiteltiin:

- 1) tislattulla vedellä
- 2) + 2 000 miljoonasosalla Joy-pesuainetta
- 3) + 1 000 miljoonasosalla endo-H:ta
- 10 4) ei käsitelty

Endo-H saatiin S. plicatuksen endo-H:ta tuottamaan transformoidusta E. colista. Käsittelyt kestivät 10 - 15 sekuntia huoneenlämmössä. Suihkuverhoa pyyhittiin käsitte-
lyn jälkeen pumpulitupolla.

15 Kuvio 13 kuvaa saatuja tuloksia. Käsittelemättömässä kontrollissa (alaoikea valokuva - keskivalokuvan alaoikea neljännes) nähtiin runsaasti home- ja härmähiukkasia sekä makro- että mikroskooppisesti.

20 Tislattulla vedellä käsitellyssä kontrollissa (yläoikea valokuva - keskivalokuvan yläoikea neljännes) nähtiin vähemmän eliöitä, vaikka hiukkasia oli vielä jäljellä ja tummuminen oli selvä.

Joy-käsitellyssä kontrollissa (alavasen valokuva - keskivalokuvan alavasen neljännes) nähtiin vähemmän eliöitä kuin vesikäsitellyssä näytteessä, mutta tummuminen oli
25 vielä selvä.

Endo-H käsitellyssä näytteessä (ylävasen valokuva - keskivalokuvan ylävasen neljännes) ei ollut eliöitä eikä lainkaan tummumia.

30 **Esimerkki 26**

Bakteerien poisto kankaasta

Kangastilkkuja leikattiin petrimaljan kokoisiksi. Lisää kangasta (jota ei infektoitu) lisättiin 5 %:n kangaskuormitukseen pääsemiseksi. Tilkut steriloidtiin autoklaavissa 15 minuuttia 1 atm:n ylipaineessa 121 °C:ssa.
35

Yksi kangaskuormituserä tarvittiin kuhunkin käsittelyyn. Lasihelmiä (40 g) ja 100 ml 0,2 M sitraattipuskuria pH 7,0 pantiin 250 ml Erlenmeyer-pulloihin. Pullot suljettiin kumitulpilla ja alumiinifoliolla ja steriloidtiin autoklaavissa. E. colia jatkoviljeltiin tuoreeseen ravintoliemeen ja inkuboitiin 48 tuntia 37 °C:ssa. Puolivahvuisia trypticase-soija-agarmaljoja (10 g/500 ml) valmistettiin ja steriloidtiin. Jäähdyttämisen jälkeen lisättiin tetratsoliumia (1 ml/litra).

Agarmaljoille siirrostettiin seuraavasti:

1) sarjalaimennukset 48 tunnin viljelmästä tehtiin (1:10 ja 10-kertaiset laimennukset vielä kolmen putken kautta peptonivedessä);

2) Sen jälkeen jokaiselle tilkulle siirrostettiin 2 ml viimeistä laimennusta (10^4).

3) Sitten tilkkuja inkuboitiin 37 °C:ssa kaksi tuntia (kaksi tilkkua/käsittely).

Inkubaation jälkeen tilkut pestiin seuraavasti:

Pesua

100 ml steriiliä 0,2 M sitraattipuskuria, pH 7,0 + 40 g lasihelmiä + kuviossa 14 kuvattu käsittely (jossa AWA on endo-H S. plicatuksen endo-H:ta tuottamaan transformoidusta E. colista) 250 ml:n Erlenmeyer-pullossa (steriili). Kaksi siirrostettua tilkkua ja steriiliä kangasta 5 %:n kangaskuormitukseen asti pestiin 35 °C:ssa 12 minuuttia ravistellen.

Huuhtelu

Pesun jälkeen tilkut huuhdeltiin lisäämällä 100 ml steriiliä kahdesti tislattua/deionisoitua vettä ja 40 g lasihelmiä 250 ml:n Erlenmeyer-pulloon (steriili) huoneenlämmössä ravistellen.

Sitten kangastilkut pantiin petrimaljoille, ja niiden päälle kaadettiin 3 ml puolivahvuista trypticase-soija-agaria, jossa oli tetratsoliumia. 48 tunnin inkubaation jälkeen pesäkkeet laskettiin.

Tulokset esitetään kuviossa 15. Nämä tulokset ilmaisevat, että 2 % Irgasan yhdessä neste-Tiden kanssa johtavat kahden logaritmiyksikön vähenemiseen bakteerikasvussa verrattuna pelkkään Tideen. Kuitenkin 40 miljoonasosan endo-H:ta lisääminen vähentää bakteerikasvua vielä yhden logaritmiyksikön.

Esimerkki 27

Endo-H:n vaikutus hiivaan

Candida albicansin ja Saccharomyces cerevisiaen liemiviljelmiä (18 tuntia) käsiteltiin:

1) 0,2 M sitraattipuskurilla, pH 5,5

2) kohdalla 1 + 200 miljoonasosalla endo-H:ta (S. plicatuksen endo-H:ta tuottavasta E. colista)

Käsittelyt kestivät 2 tuntia 37 °C:ssa.

Käsittelyn jälkeen pieni erä kumpaakin pantiin formvar-pinnoitetulle 200 mesh kupariverkolle ja tarkasteltiin TEM:llä. Tutkittavista otettiin mikroskooppivalokuvia, ja ne esitetään kuvioissa 15 ja 16.

Kuten kuviossa 15A voidaan nähdä, pelkällä puskurilla käsitelty Candida oli morfologialtaan hyvässä kunnossa. Kuten kuvasta 15B ilmenee, endo-H:lla käsitellystä Candidasta vuoti nopeasti ulos materiaalia, ja se menetti rakenteellisen eheytensä.

Pelkällä puskurilla käsitelty Saccharomyces oli morfologialtaan hyvässä kunnossa, kuten voidaan nähdä kuviossa 16A. Käsiteltäessä endo-H:lla kuitenkin jäi jäljelle vain hyvin rajoitettuja kalvomateriaalin kappaleita. Ks. kuvio 16B.

Esimerkki 28

Endo-H:n ja lysotsyymiin vaikutus E. colin elinkyisyyteen

Yli yön Laurien liemessä (LB) kasvatettu E. coli K12:n viljelmä laimennettiin 1:1 000 LB:hen ja kasvatettiin uudestaan 4 tuntia 37 °C:ssa. Solut sentrifugoitiin, pestiin ja suspensoitiin uudelleen 0,1 M Na-asetaatipus-

kuriin, pH 5,5 (NA). Kahdeksan putkea järjestettiin seuraavasti:

	Putken numero	1,2	3,4	5,6	7,8
	µl soluja	800	800	800	800
5	µl NA-puskuria	200	-	-	200
	µl endo-H:ta (1 mg/ml)	-	200	200	-

Endo-H oli *S. plicatus* endo-H:ta tuottamaan transformoidusta *B. subtilis* ksesta. Putkia inkuboitiin tunnin ajan 37 °C:ssa. Putket sentrifugoitiin, pestiin ja suspensioitiin uudelleen 8,00 µl:an 0,1 M Na-fosfaattipuskuria, pH 7,2 (NP), joka sisälsi 0,1 M EDTA:n. Puskuria tai kananmunanvalkuaisen lysotsyymia lisättiin putkiin seuraavasti:

	Putken numero	1,2	3,4	5,6	7,8
15	µl NP-puskuria	200	200		
	µl lysotsyymiä (1 mg/ml)	-	-	200	200

Pienet näytteet otettiin tässä vaiheessa pesäkkeitä muodostavien yksiköiden (CFU) määrittämiseksi (palsta A). Tunnin 37 °C:ssa inkubaation jälkeen CFU:t määritettiin pienistä näytteistä (palsta B). Pesäkkeitä muodostavien yksiköiden logaritmit laskettiin. Vähenneminen CFU:n logaritmeissa määritettiin vähentämällä B A:sta. Tulokset esitetään seuraavassa:

		Log(CFU)		Log(CFU):n
	Olosuhteet	A	B	muutos
25	Kontrolli	7,89	7,90	+0,01
	Endo-H (200 miljoonasosaa)	8,21	7,92	-0,29
	Lysotsyymi (200 milj.osaa)	7,87	7,68	-0,19
	Endo-H + lysotsyymi	8,17	7,53	-0,64

30 Nämä tulokset viittaavat siihen, että endo-H:n ja lysotsyymien yhdistelmä vähentää *E. colin* elinkykyisyyttä verrattuna pelkään endo-H:hon tai lysotsyymiin.

Esimerkki 29

Endo-H:n vertailu T-4:n tai kananmunanvalkuaisen lysotsyymin kanssa E. colin elinkykyisyyden suhteen

E. coli -soluja pestiin ja suspensoitiin 0,1 M Na-asetaatipuskuriin, pH 5,5. Solut jaettiin (10 ml) kah-
 5 teen putkeen. Toiseen putkeen lisättiin pelkkää puskuria (kontrolli) ja toiseen lisättiin endo-H:ta (käsitelty). Endo-H oli S. plicatuksen endo-H:ta tuottamaan transfor-
 moidusta B. subtiliksesta. Soluja inkuboitiin tunnin ajan
 10 37 °C:ssa. Putket sentrifugoitiin, pestiin ja suspensoi-
 tiin uudelleen 0,1 M Na-fosfaattipuskuriin, pH 7,2. Solut
 jaettiin tasan ja käsiteltiin joko puskurilla tai lysot-
 syymillä. Kananmunanvalkuaisen (HL) ja T-4:n (TL) lysot-
 syymeja verrattiin tässä kokeessa. Putkia inkuboitiin 1,5
 15 tuntia. Näytteet laimennettiin ja maljattiin CFU-määritys-
 tä varten inkubaatiota ennen (A) ja sen jälkeen (B).
 CFU:iden logaritmit määritettiin. Saatiin seuraavat tulok-
 set.

	Inkubaatio-olosuhteet		Log(CFU)		Log(CFU):n
20	Ensimmäinen	Toinen	A	B	muutos
	Endo-H (300 miljoonasosaa)	-	7,60	7,23	-0,37
25	-	HL (445 miljoonasosaa)	6,69	6,73	-0,23
	Endo-H (300 miljoonasosaa)	HL (445 miljoonasosaa)	7,41	6,81	-0,60
30	-	TL (445 miljoonasosaa)	4,98	4,53	-0,45
35	Endo-H (300 miljoonasosaa)	TL (445 miljoonasosaa)	5,27	4,30	-0,93

Nämä tulokset viittaavat siihen, että myös T-4:n lysotsyymi on tehokas vähentämään E. colin elinkykyisyyttä yhdessä endo-H:n kanssa.

Esimerkki 30

Likaantuneen vaippamateriaalin käsittely endo-H:lla
 Saatiin näytteitä likaantuneesta vaipasta. Kukin
 näyte jaettiin kahtia. Vasen puoli näytteestä pestiin
 5 2 000 miljoonasosalla Tidea ja yhdellä miljoonasosalla
 BPN':a (Bacillus amyloliquifaciensin subtilisiiniproteaas-
sia). Oikea puoli pestiin 2 000 miljoonasosalla Tidea,
 yhdellä miljoonasosalla BPN':a ja 40 miljoonasosalla Endo-
 H:ta (Boehringer Mannheim Biochemical luettelonumero
 10 100 119). Kumpaakin näytettä pestiin 12 minuuttia
 35 °C:ssa. Kahden kokeen tulokset esitetään kuvioissa 17
 ja 18. Kuten voidaan nähdä, kuvioiden 17 ja 18 oikeanpuo-
 leinen vaippamateriaali sisältää olennaisesti vähemmän
 ulostetahroja verrattuna kuvioiden 17 ja 18 vasemmalla
 15 puolella esitettyyn Tidella ja proteaasilla käsiteltyyn
 vaippaan.

Kun esillä olevan keksinnön edulliset suoritusmuo-
 dot on nyt kuvattu, ammattimiehet huomaavat, että voidaan
 tehdä erilaisia muunnoksia ja että tällaiset muunnokset on
 20 tarkoitettu tämän keksinnön suoja-piiriin kuuluviksi. Mui-
 ta tämän keksinnön mukaisia koostumuksia saadaan, kun esi-
 merkeissä endo-H korvataan endo-D:llä tai -F:llä tai
 PNGaasi F:llä.

Kaikki tässä mainitut viitejulkaisut liitetään ni-
 25 menomaisesti viitteinä mukaan.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä pintojen puhdistamiseksi irrottamalla ainakin osa aineesta, edullisesti glykoproteiinia sisältävästä aineesta, edullisemmin tyypin II endoglykosidaasireaktiivisesta aineesta, pinnalta, johon se on sitoutunut muulla kuin immunologisella sidoksella, jolloin aineella on proksimaalinen, pintaan sitoutunut osa, distaalinen, proksimaalisesta osasta ulospäin suuntautunut osa ja proksimaalisen ja distaalisen osan liitoskohdassa sijaitseva sidos, joka on reaktiivinen tyypin II endoglykosidaasin kanssa, t u n n e t t u siitä, että sidos katkaistaan tyypin II endoglykosidaasilla distaalisen osan irroittamiseksi proksimaalisesta osasta.

2. Menetelmä pintojen puhdistamiseksi irrottamalla pinnalta ainakin osa glykosidin sisältävästä aineesta, edullisesti glykoproteiinia sisältävästä aineesta, jolloin glykosidin sisältävällä aineella on ainakin hiilihydraattiosa, aglykoniosa ja glykosidinen sidos hiilihydraattiosan ja aglykoniosan liitoskohdassa, ja jolloin aine on sitoutunut pintaan hiilihydraattiosalla, t u n n e t t u siitä, että glykosidinen sidos katkaistaan saattamalla se reagoimaan tyypin II endoglykosidaasin kanssa aglykoniosan vapauttamiseksi hiilihydraattiosasta.

3. Menetelmä pintojen puhdistamiseksi irrottamalla ainakin osa pintaan sitoutuneesta glykosidin sisältävästä aineesta, edullisesti glykoproteiinia sisältävästä aineesta, jossa on ainakin yksi glykosidinen sidos, t u n n e t t u siitä, että glykosidin sisältävä aine saatetaan kosketukseen ainakin ensimmäisen entsyymin ja toisen entsyymin kanssa, joista ensimmäinen entsyymi on tyypin II endoglykosidaasi, joka on reaktiivinen ensimmäisen, glykosidisen sidoksen käsittävän sidoksen kanssa, ja toinen entsyymi, edullisesti subtilisiini tai mutantt subtilisiini, on reaktiivinen sitoutuneessa glykosidin sisältävässä

aineessa olevan toisen sidoksen kanssa, joka on eri kuin mainittu ensimmäinen glykosidinen sidos, jolloin pinnasta irtoaa glykosidin sisältävän aineen se pintaan nähden distaalinen osa, joka muodostuu ensimmäisen ja toisen entsyymien katkaisun vaikutuksesta.

4. Menetelmä pintojen puhdistamiseksi, joille on sitoutunut glykosidin sisältävä aine, edullisesti glykoproteiinia sisältävä aine, tunnetaan siitä, että glykosidin sisältävä aine saatetaan kosketukseen sellaisen tyypin II endoglykosidaasin kanssa, joka on reaktiivinen glykosidin sisältävässä aineessa olevan glykosidisen sidoksen kanssa, jolloin ainakin osa aineesta irtoaa mainitulta pinnalta.

5. Menetelmä pintojen puhdistamiseksi irroittamalla ainakin osa pintaan sitoutuneesta glykosidin sisältävästä aineesta, edullisesti glykoproteiinia sisältävästä aineesta, jossa on ainakin yksi glykosidinen sidos, tunnetaan siitä, että sitoutunut glykosidin sisältävä aine saatetaan kosketukseen tyypin II endoglykosidaasin ja puhdistusaineen kanssa, jolloin tyypin II endoglykosidaasi on reaktiivinen glykosidisen sidoksen kanssa, jolloin mainitusta pinnasta glykosidin sisältävän aineen pintaan nähden distaalinen katkaistu osa irtoaa.

6. Minkä tahansa edeltävistä patenttivaatimuksista mukainen menetelmä, tunnetaan siitä, että tyypin II endoglykosidaasi kykenee katkaisemaan ainakin yhden glykosidisen sidoksen ensimmäisten kolmen, edullisesti ensimmäisten kahden, glykosidisen sidoksen joukosta glykoproteiinin proteiini- ja hiilihydraattiyksiköiden liitospohdasta, ja edullisemmin kykenee katkaisemaan ainakin yhden glykosidisen sidoksen N-sidoksellisten tai O-sidoksellisten glykoproteiinien ydinrakenteessa.

7. Minkä tahansa edeltävistä patenttivaatimuksista mukainen menetelmä, tunnetaan siitä, että pinnasta irroitettu aineen osa saatetaan kosketukseen pesuliuoksen tai nesteen kanssa, joka sisältää puhdistusainetta, mai-

nitun osan poistamiseksi pinnalta pesuliuoksessa tai nesteessä.

8. Minkä tahansa edeltävistä patenttivaatimuksista mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että tyypin II endoglykosidaasi on endo- β -N-asetyylioglukoosiaminidaasi, endo- α -N-asetyyliagalaktoosiaminidaasi tai endo- β -galaktosidaasi, edullisesti endo- β -N-asetyylioglukoosiaminidaasi D, H, L, C_I, C_{II}, Gal-tyyppinen F tai F tai glykopeptidaasi F, ja edullisemmin endo- β -N-asetyylioglukoosiaminidaasi H.

9. Minkä tahansa edeltävistä patenttivaatimuksista mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että siinä lisäksi mainittu pinta saatetaan kosketukseen disulfidinkatkaisureagenssin tai pinta-aktiivisen aineen kanssa.

10. Puhdistuskoostumus, joka käsittää ensimmäisen entsyymin ja toisen entsyymin, t u n n e t t u siitä, että ensimmäinen entsyymi on tyypin II endoglykosidaasi ja toinen entsyymi on proteaasi, lipaasi, nukleaasi tai muu glykosidaasi kuin ensimmäinen entsyymi, edullisesti ekso-glykosidaasi, tai näiden yhdistelmä, jolloin toinen entsyymi on edullisesti subtilisiini tai mutantt subtilisiini.

11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen koostumus, t u n n e t t u siitä, että se lisäksi sisältää puhdistavaa pinta-aktiivista ainetta, joka edullisesti on anioninen, ioniton, amfolyyttinen, kahtaisioninen tai kationinen pinta-aktiivinen aine, tai disulfidinkatkaisureagenssia.

12. Puhdistusainekoostumus, joka sisältää puhdistavaa pinta-aktiivista ainetta, t u n n e t t u siitä, että se lisäksi sisältää tyypin II endoglykosidaasia.

13. Patenttivaatimuksen 10, 11 tai 12 mukainen koostumus, t u n n e t t u siitä, että tyypin II endoglykosidaasi on endo- β -N-asetyylioglukoosiaminidaasi, endo- α -N-asetyyliagalaktoosiaminidaasi tai endo- β -galaktosidaasi, edullisesti endo- β -N-asetyylioglukoosiaminidaasi D, H,

L, C_I, C_{II}, Gal-tyyppinen F tai F tai glykopeptidaasi F, ja edullisemmin endo- β -N-asetyylioglukoosi-aminidaasi H.

14. Puhdistusainekoostumus, t u n n e t t u siitä, että se sisältää tyypin II endoglykosidaasia, joka on edullisesti joko endo- β -N-asetyylioglukoosi-aminidaasi H, F tai D, sellaisen määrän, joka on tehokas poistamaan glykosidia sisältäviä aineita pinnoilta.

15. Patenttivaatimuksen 14 mukainen puhdistuskoostumus, t u n n e t t u siitä, että sen pH on 4 - 10, edullisesti 5 - 8.

16. Patenttivaatimuksen 14 tai 15 mukainen puhdistuskoostumus, joka lisäksi käsittää proteaasientsyymejä.

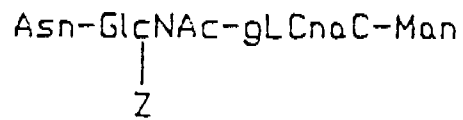
17. Patenttivaatimuksen 14, 15 tai 16 mukainen puhdistusainekoostumus, joka lisäksi käsittää 1 - 90 paino-%, edullisesti 5 - 50 paino-%, puhdistavaa pinta-aktiivista ainetta.

18. Patenttivaatimuksen 14, 15, 16 tai 17 mukainen pyykinpesuainekoostumus, joka lisäksi käsittää 1 - 75 paino-%, edullisesti 5 - 40 paino-%, puhdistusaineen apuainetta, joka edullisesti on rasvahappo, polykarboksylaatti, polyfosfaatti tai näiden seos.

19. Patenttivaatimuksen 18 mukainen nestemäinen pyykinpesuainekoostumus, t u n n e t t u siitä, että se käsittää 10 - 40 paino-% puhdistavaa pinta-aktiivista ainetta, 10 - 20 paino-% puhdistusaineen apuainetta ja 20 - 200 miljoonasosaa endo- β -N-asetyylioglukoosi-aminidaasia H, F tai D.

20. Menetelmä glykosidin sisältävien aineiden, edullisesti tyypin II endoglykosidaasireaktiivisten aineiden, edullisemmin N-asetyylioglukoosi-amiinia sisältävien aineiden, poistamiseksi pinnoilta, t u n n e t t u siitä, että mainitut aineet saatetaan kosketukseen minkä tahansa patenttivaatimuksista 10 - 17 mukaisen koostumuksen kanssa, jota on tehokas määrä mainittujen aineiden poistamiseksi pinnoilta, joihin ne ovat kiinnittyneet tai joihin ne ovat tunkeutuneet.

N-sidoksellinen ydinrakenne



O-sidoksellinen ydinrakenne

Ser- tai
Thr-

-GalNAc-NeuAc

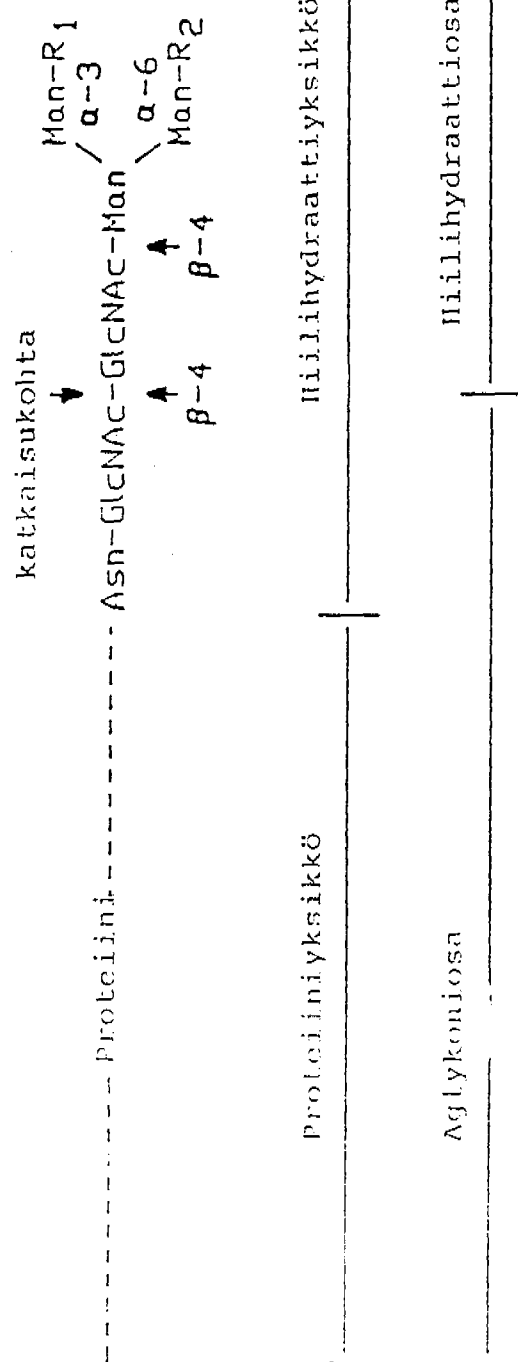
-GalNAc-Gal

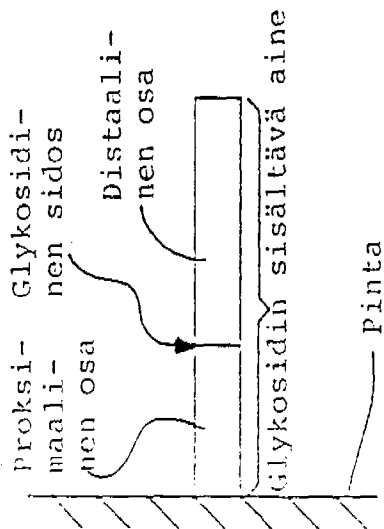
-GalNAc-Gal-NeuAc
|
NeuNAc

-GalNAc-Gal
|
L-Fuc

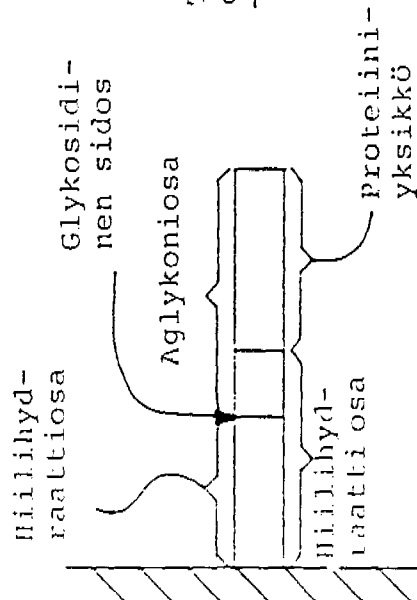
Tyypin II endoglykosidaasi	Substraatti
Glykopeptidaasi F (PNGaasi F)	$\begin{array}{c} \text{Asn-GlcNAc-GlcNAc-Man-v} \\ \uparrow \quad \quad \diagup \quad \diagdown \\ \text{(Fuc)} \quad \quad \text{Man-X} \\ \quad \quad \quad \text{Man-Y} \\ \quad \quad \quad \text{Z} \end{array}$
Endo-H, -F, -D, -C _I Endo-H, F, D, C _I	$\begin{array}{c} \text{Asn-GlcNAc-GlcNAc-Man-v} \\ \quad \quad \uparrow \quad \diagup \quad \diagdown \\ \text{U} \quad \quad \quad \text{Man-X} \\ \quad \quad \quad \text{Man-Y} \\ \quad \quad \quad \text{Z} \end{array}$
Gal-tyyppinen endo-F	$\begin{array}{c} \text{Asn-GlcNAc-Gal-Man} \\ \uparrow \quad \diagup \quad \diagdown \\ \quad \quad \text{Man-} \\ \quad \quad \text{Man-} \end{array}$
Endo- α -N-asetyyligalak- tosaminidaasi	$\begin{array}{c} \boxed{\begin{array}{c} \text{Ser} \\ \text{Thr} \end{array}} \quad \begin{array}{c} - \text{galNAc-Gal-} \\ \uparrow \end{array} \end{array}$
Endo- β -galaktosidaasi	$\begin{array}{c} \downarrow \\ \text{R}_1\text{-GlcNAc-Gal-GlcNAc-R}_2 \end{array}$

Proteiinin aminohappo	Hiilihydraatti- tähde 1	Hiilihydraatti- tähde 2	Hiilihydraatti- tähde 3
Asn, Ser Thr	GlcNAC GalNAC	GlcNAC tai Gal	GlcNAC tai mannoosi
Glykosidinen sidoks	Glykosidinen sidoks	Glykosidinen sidoks	Glykosidinen sidoks
1	2	3	

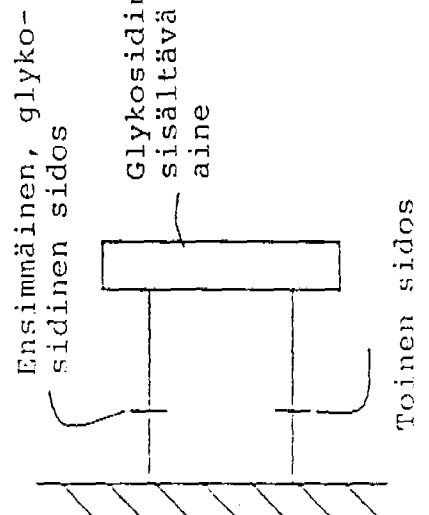




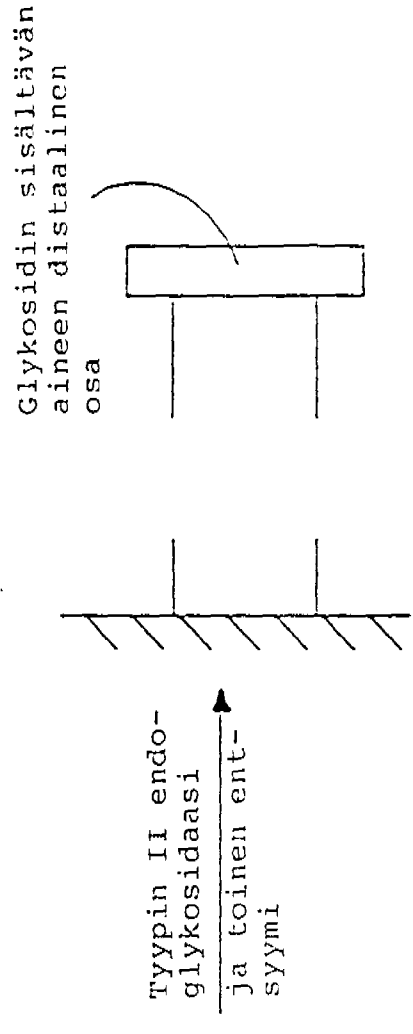
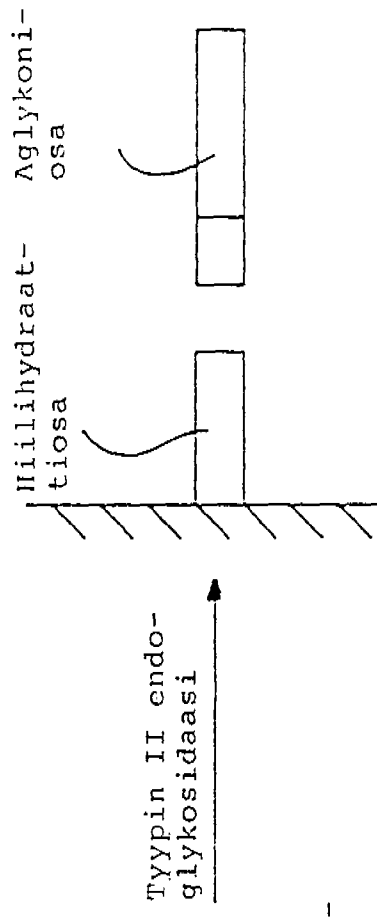
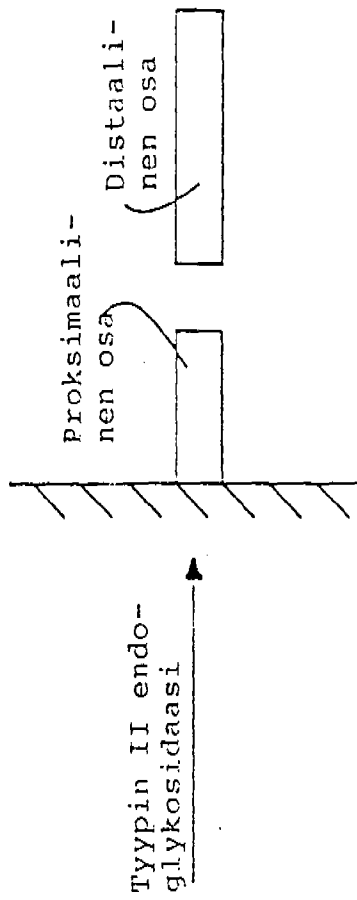
Kuv. 5A



Kuv. 5B



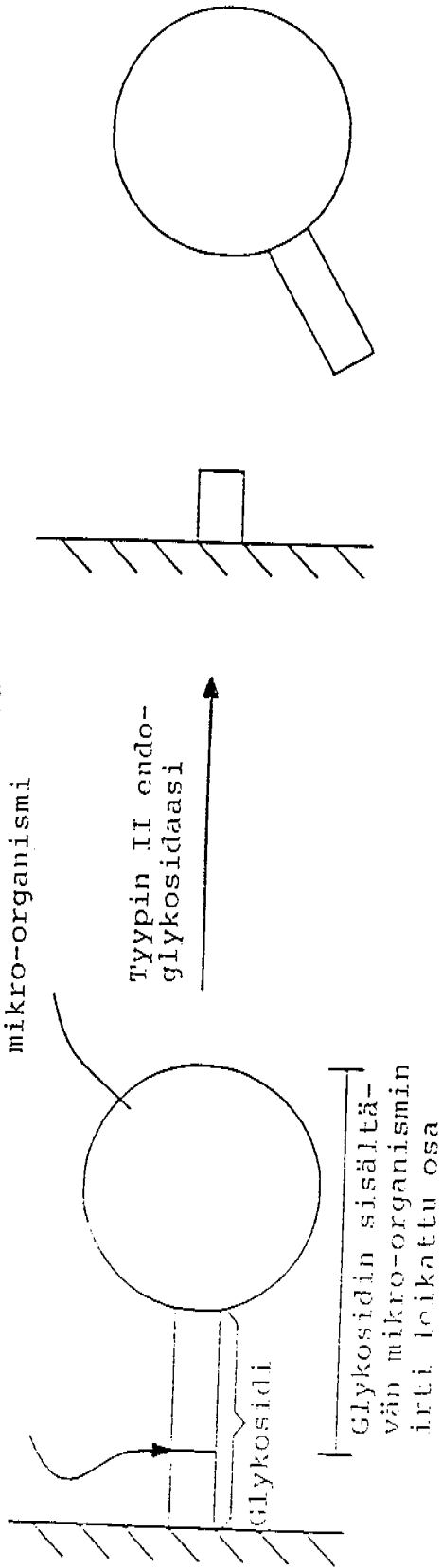
Kuv. 5C



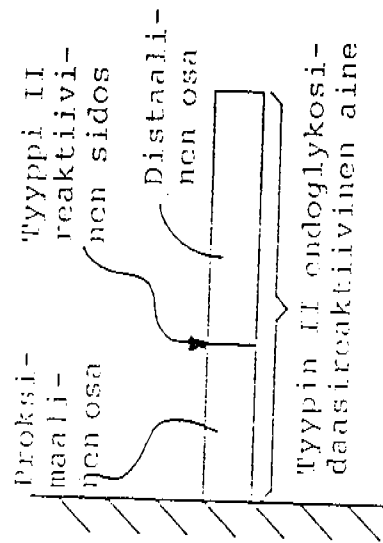
Glykósidi-

nen sidos

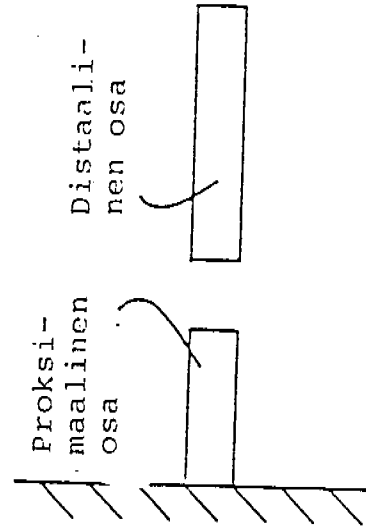
Glykosidin sisältävä mikro-organismi



Kuv. 5D

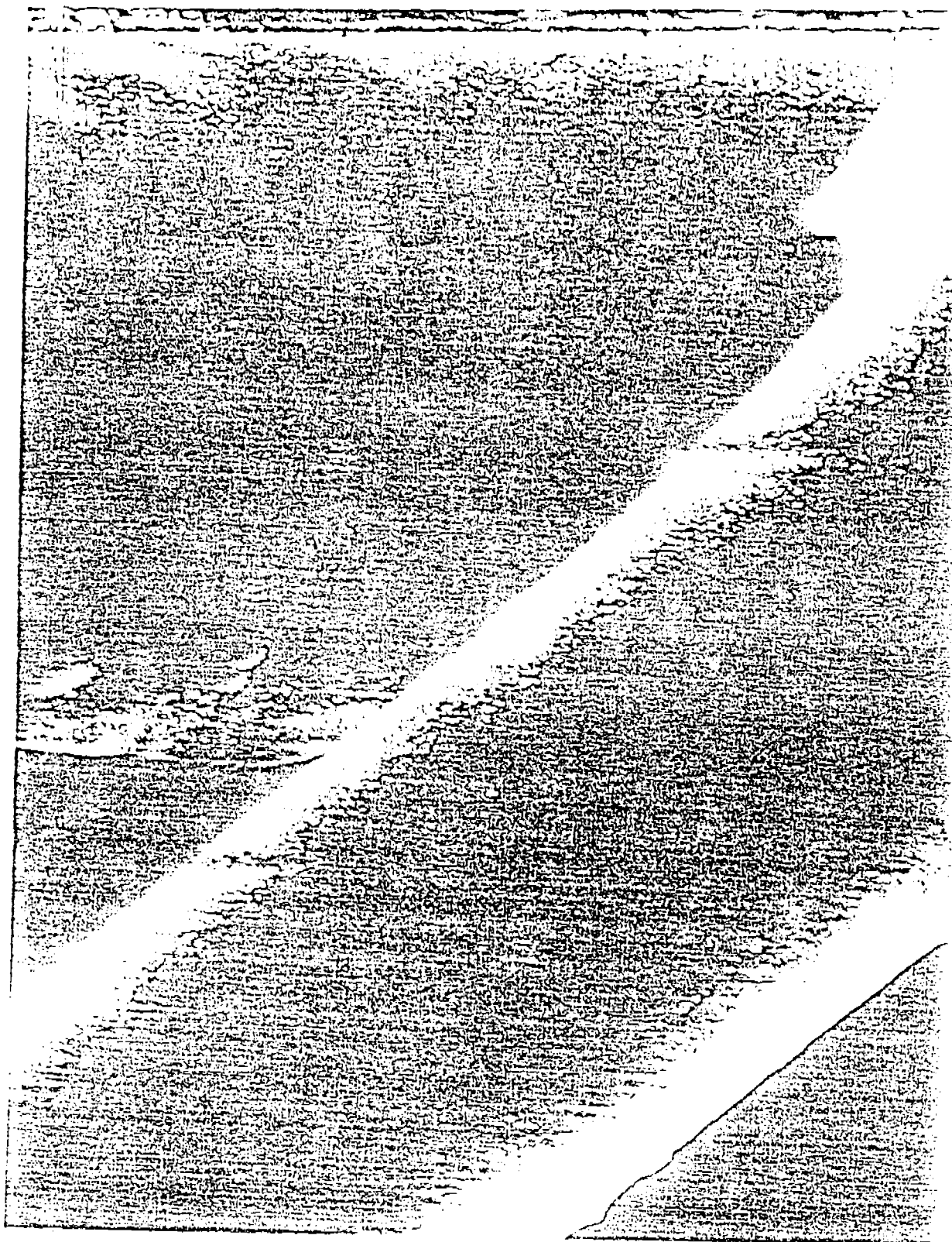


Kuv. 5E





Kuv. 6A



Kuv. 6B



Kuv. 7A



Kuv. 7B



Kuv. 7C



Kuv. 7D



Kuv. 7E

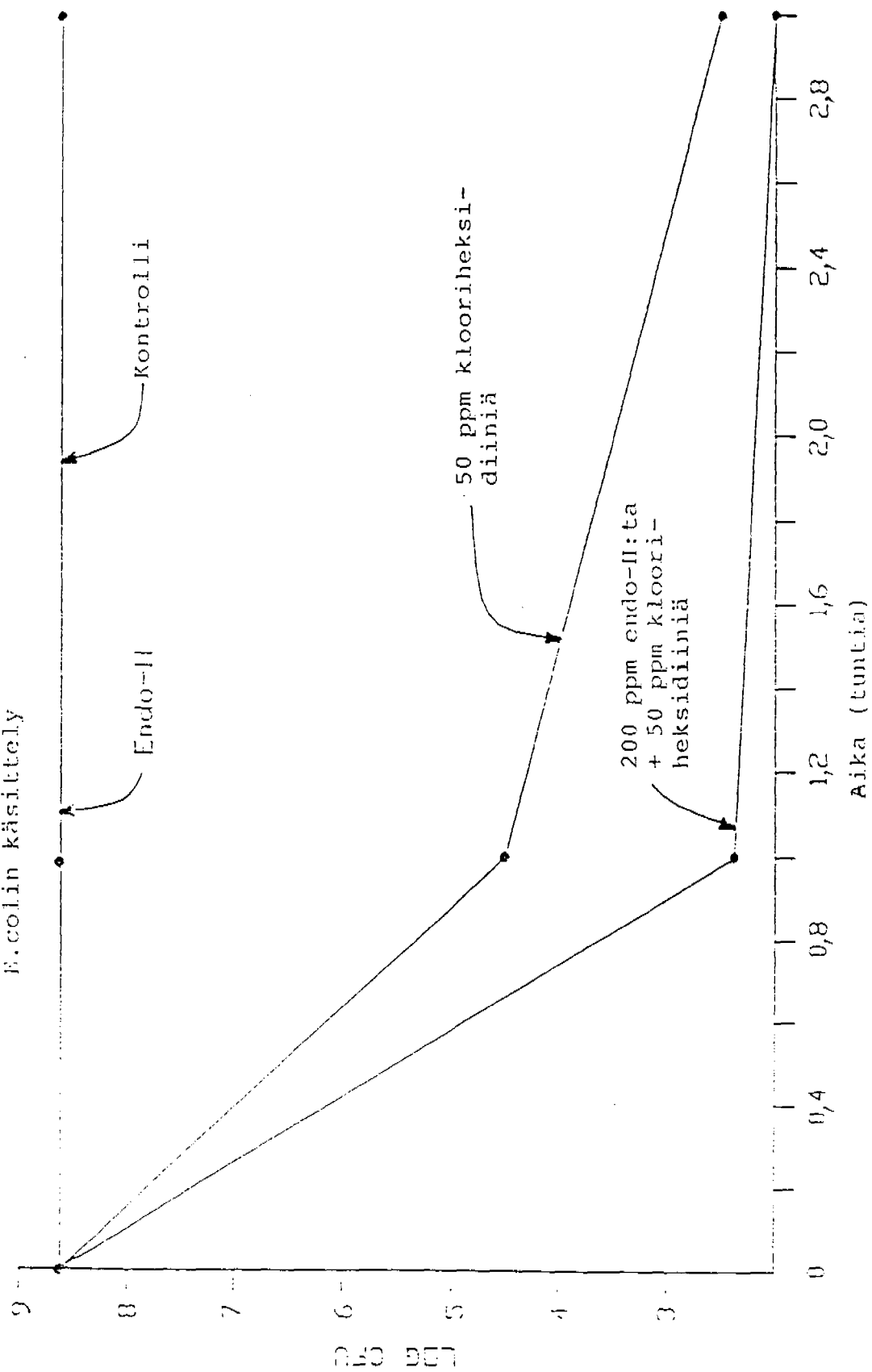


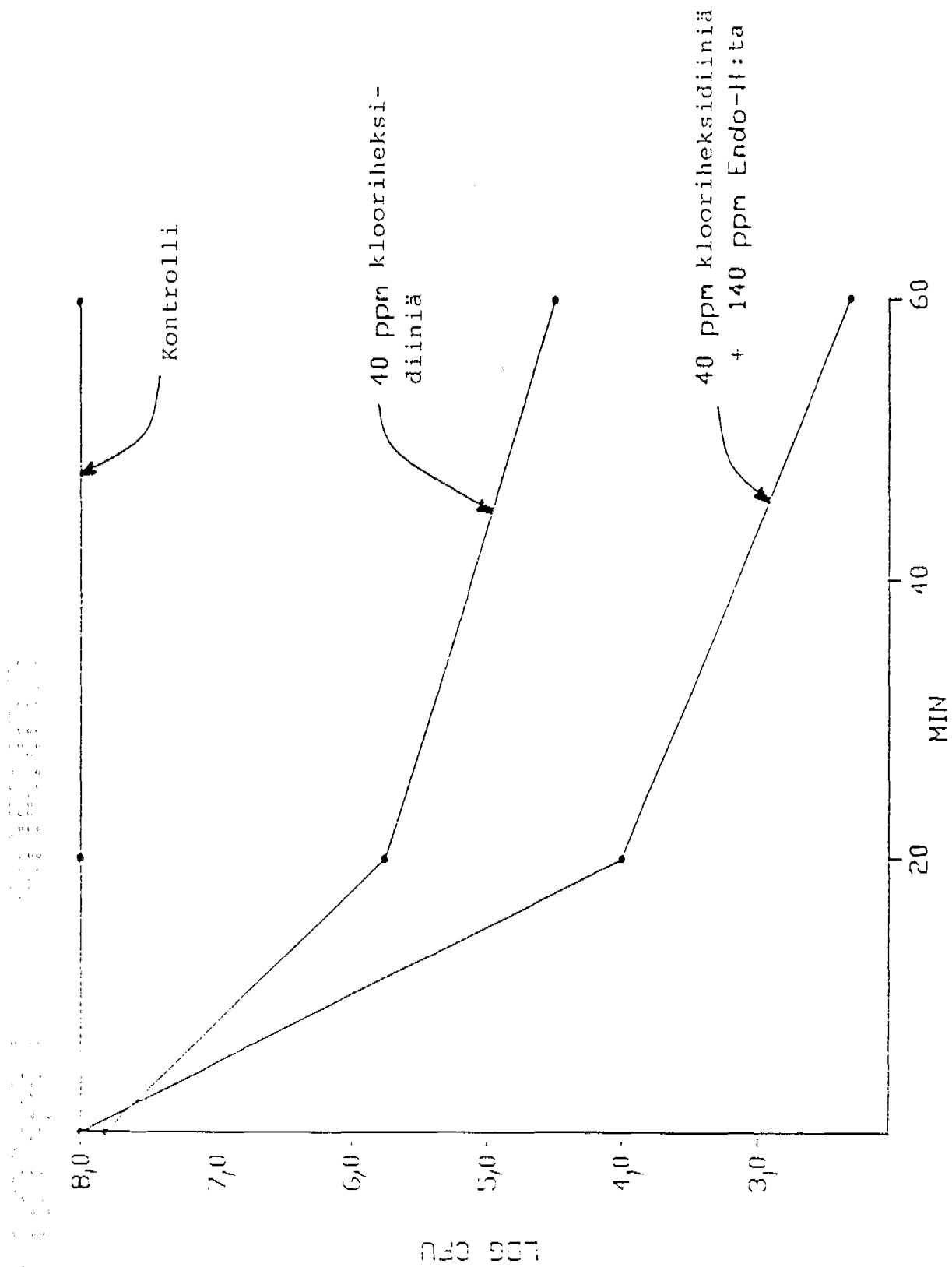
Kuv. 7F

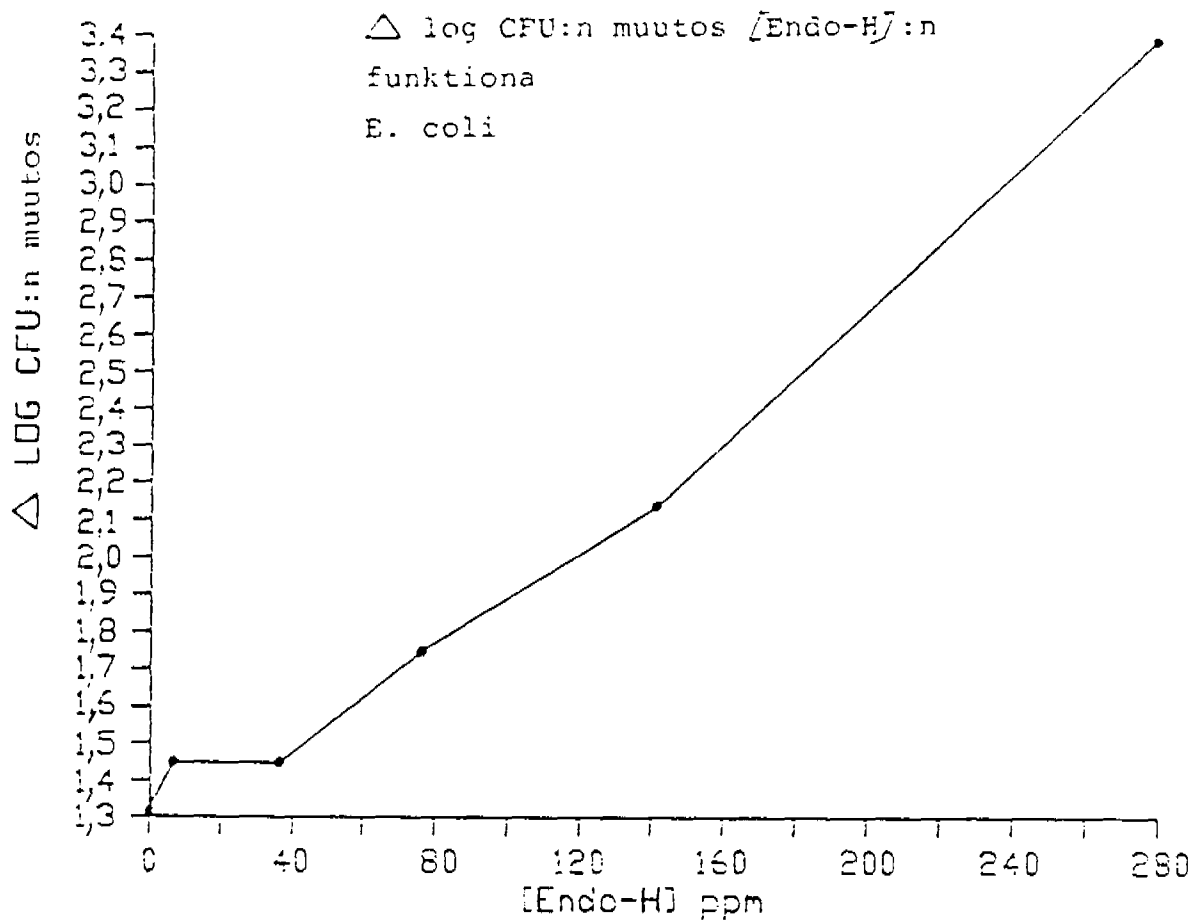


Kuv. 7H

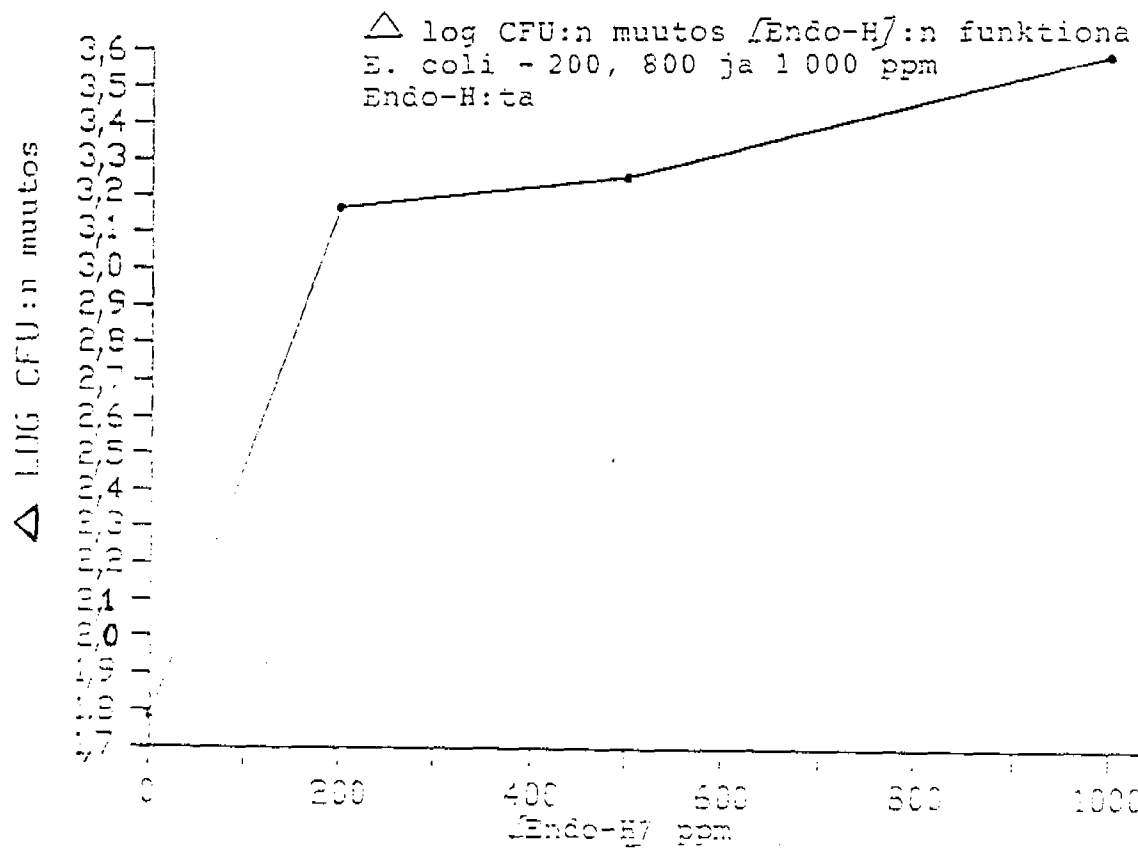
Endo-II ja klooriheksidiini E.colin käsittely



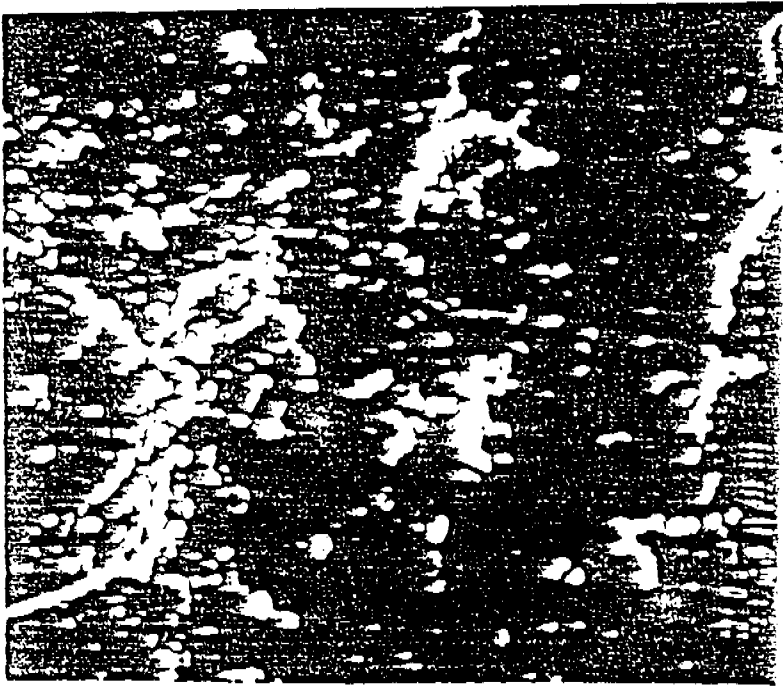




Kuv. 10A



Kuv. 10B



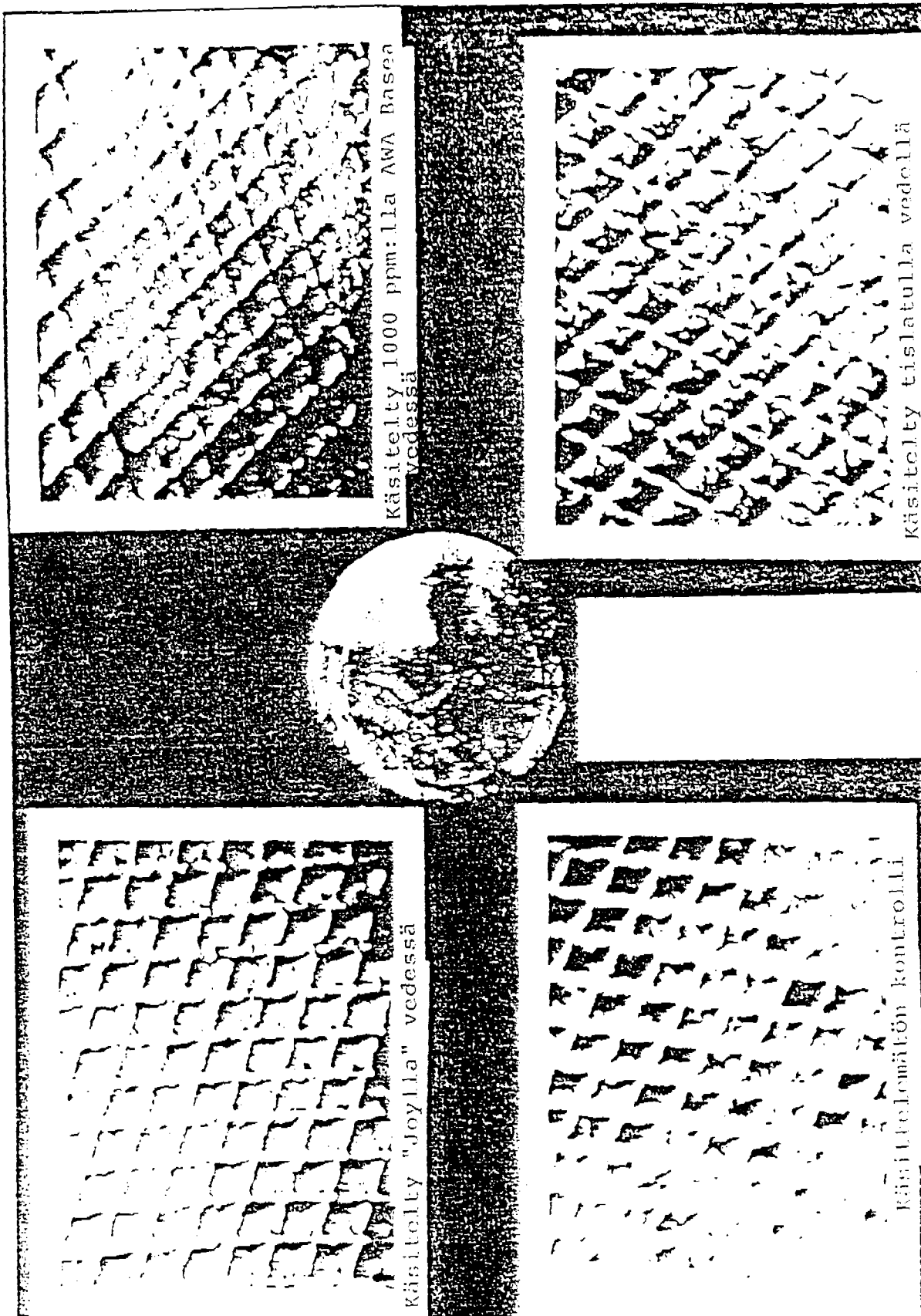
Sian nahka, johon on ympätty
S. aureusta ja jota on käsi-
telty nestemäisellä käsienpe-
susaippualla. 2000X

Kuv. 11



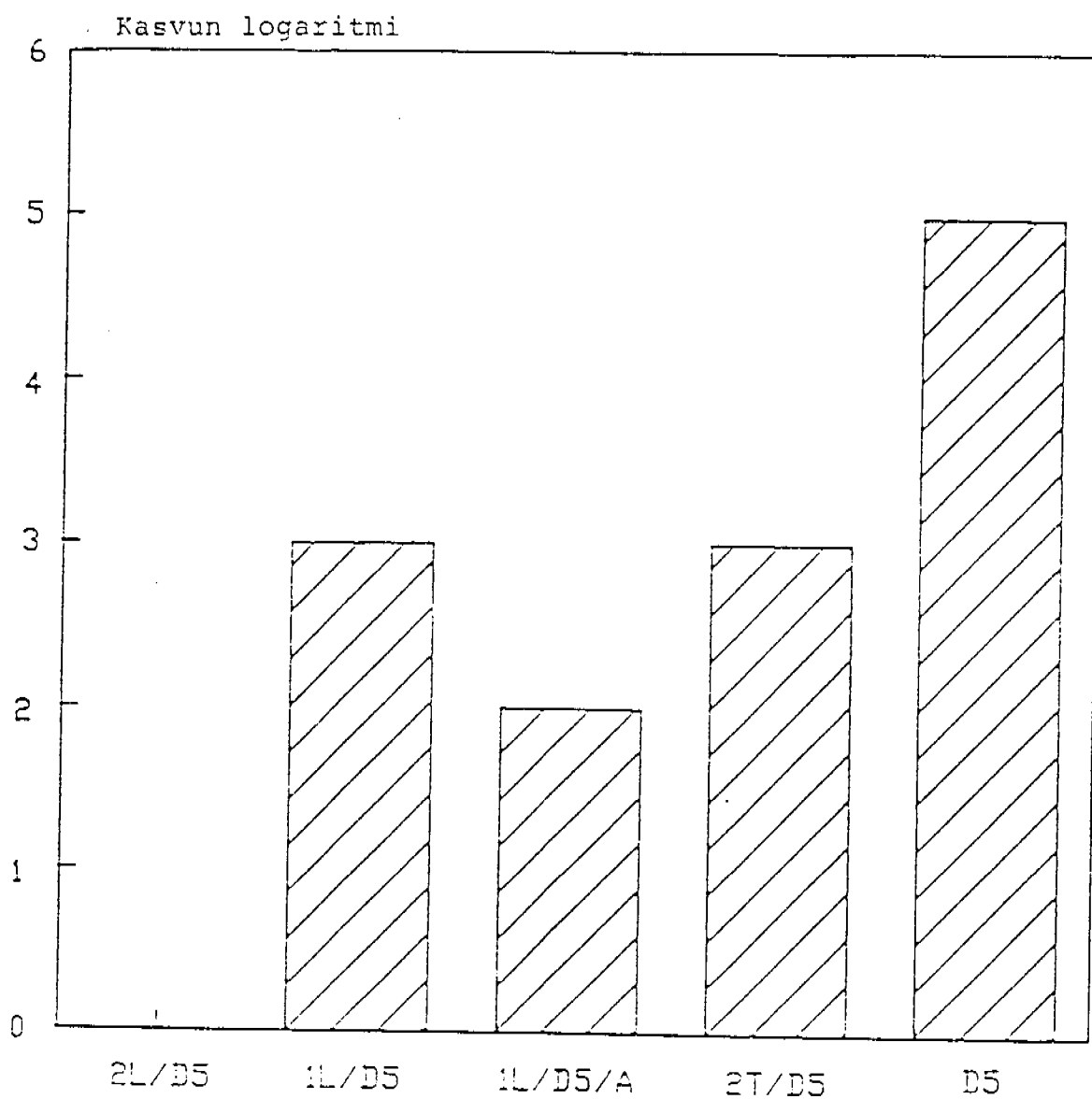
Sian nahka, johon on ympätty
S. aureusta ja jota on käsi-
telty nestemäisellä käsienpe-
susaippualla ja Endo-H:lla. 2000X

Kuv. 12



Kuv. 13

Antimikrobiaalinen teho pesussa



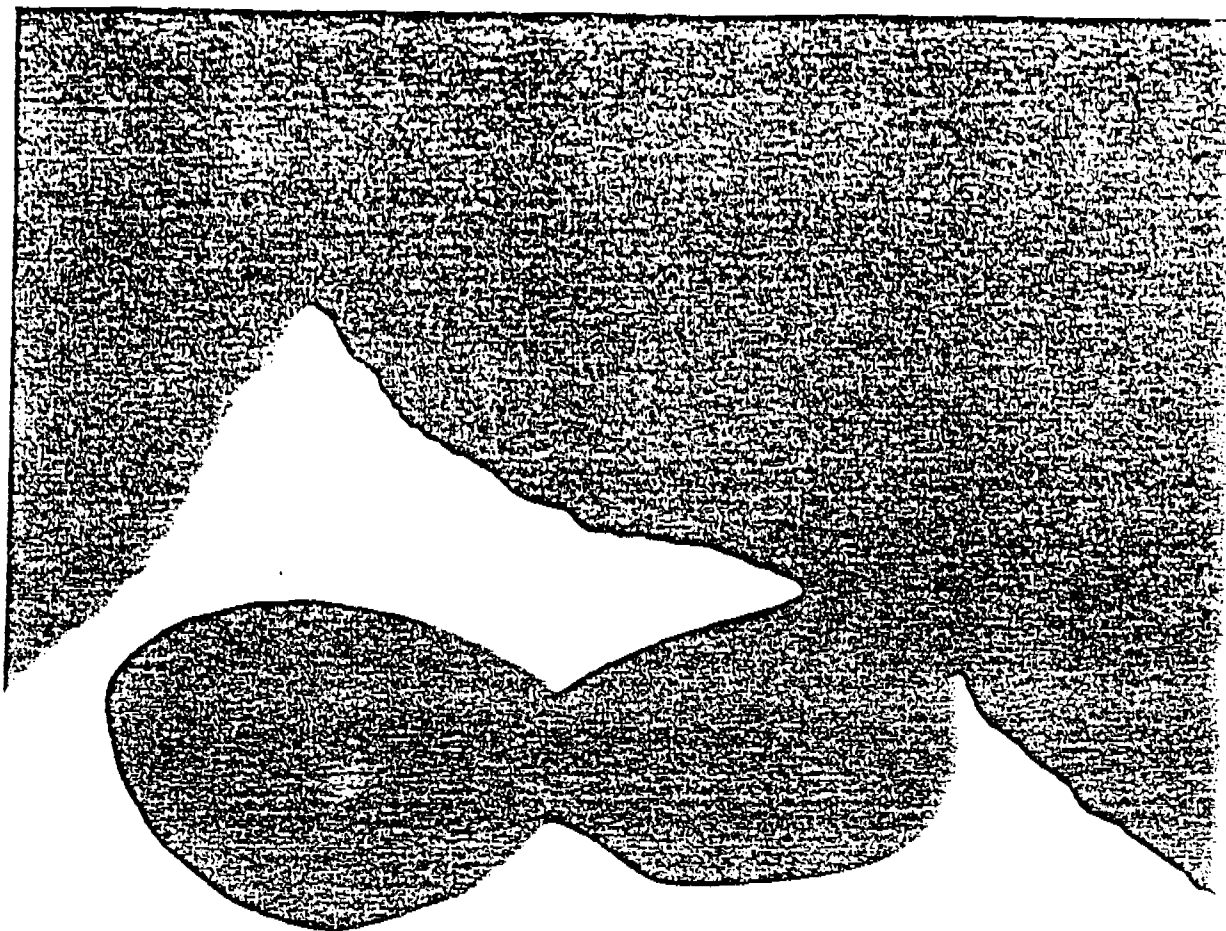
D5 = puhdistusaine

L = IRGASAN

T = TRICLOCARBAN

A = Endo-H

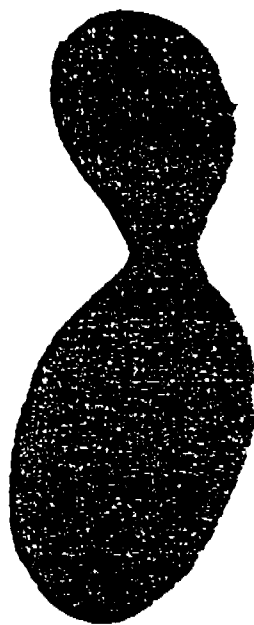
2, 1 = vastaavasti 2 tai 1 %



Puskurilla pH:ssa 5,5 käsitelty *Candida albicans*
TEM. 5400X



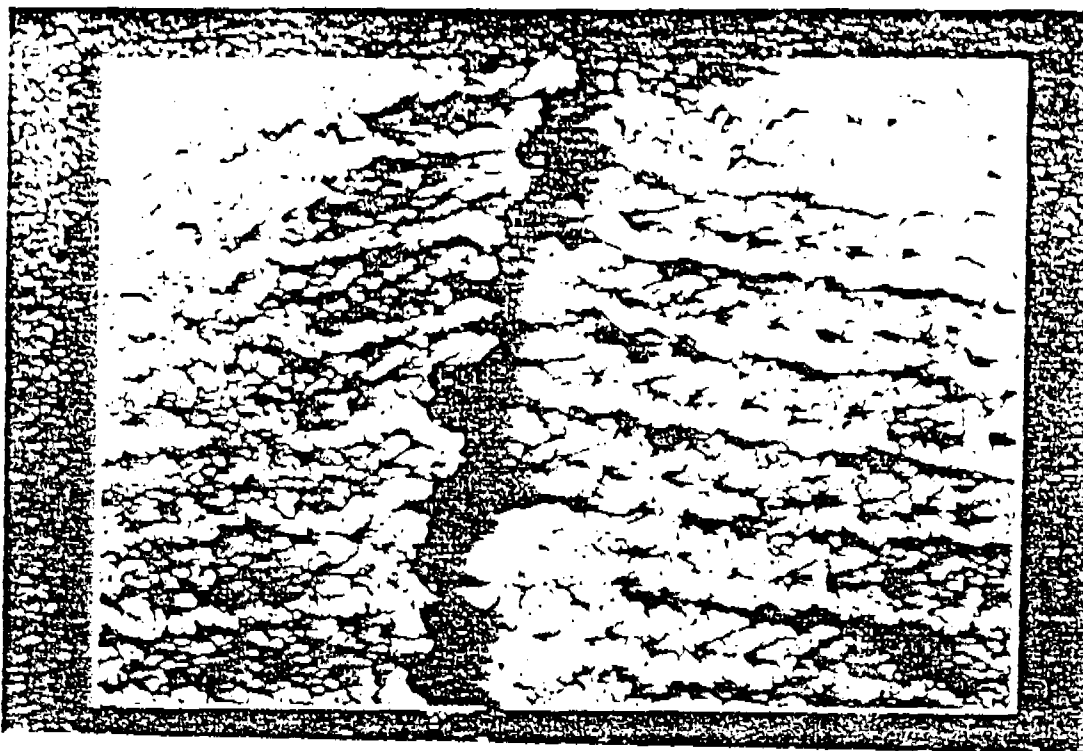
AWA:lla pH:ssa 5,5 käsitellyn *Candida albicansin*
TEM. Huomaa materiaalin irtoaminen eliöstä. 5400X



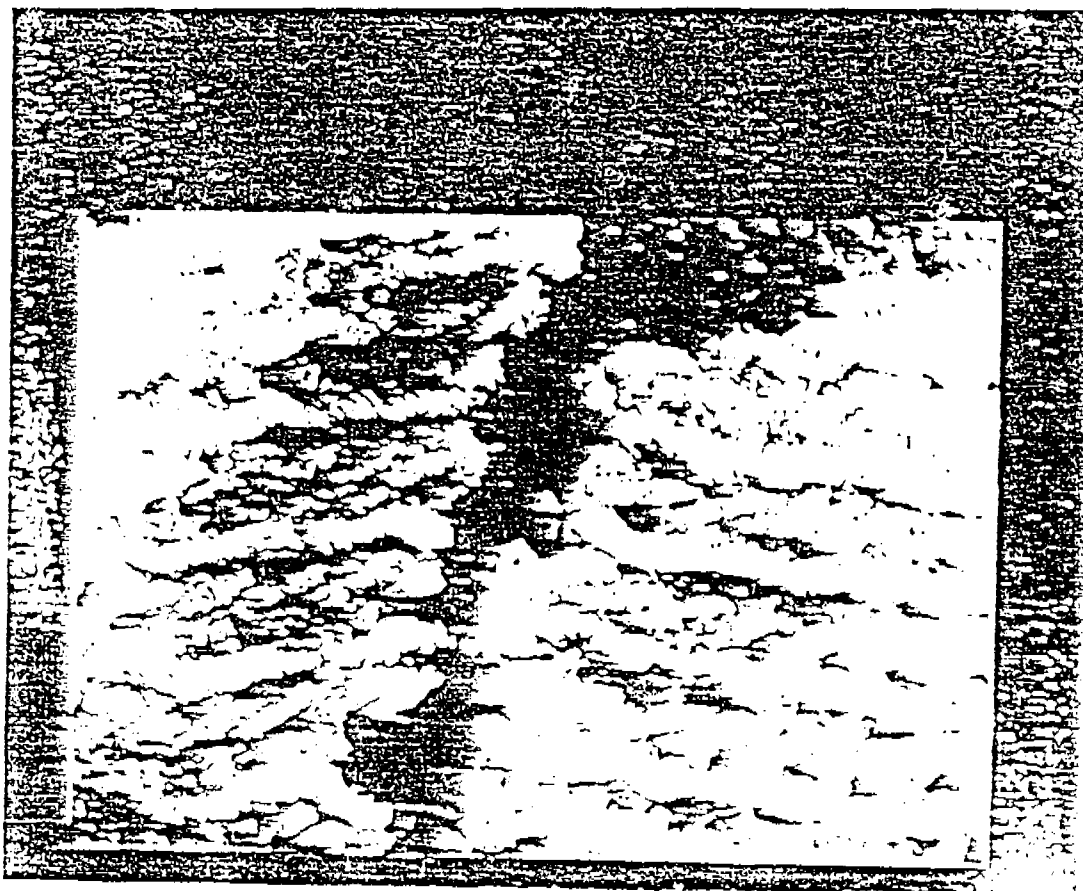
Puskurilla pH:ssa 5,5 käsitellyn *Saccharomyces cerevisiae* TEM. 5400X



AWA:lla pH:ssa 5,5 käsitellyn *Saccharomyces cerevisiae* TEM.
Kaikki mitä eliöstä on jäljellä, on pieniä paloja sen memb-
raaneista, jotka näkyvät mikroskooppikuvan keskellä. 5400X.



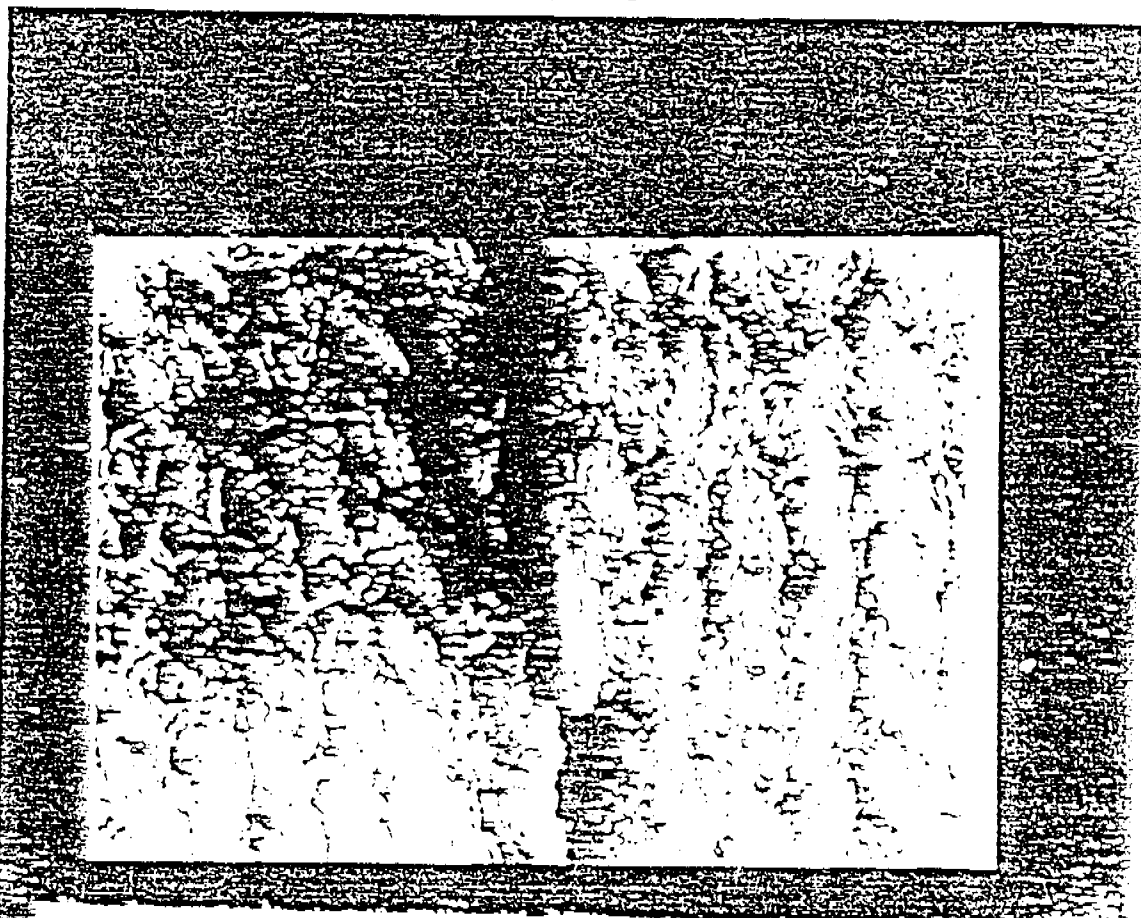
Ulosteella tahrattua kangasta. Vasen puoli proteaasi-
pesuaineessa pesty. Oikea puoli proteaasipesuaineella
ja AWA-Basella pesty. 125X



Lähikuva samasta kuvasta. 250X



Ulosteella tahrattua kangasta toisesta näytteestä. Vasen puoli proteaasipesuaineella pesty. Oikea puoli proteaasipesuaineella ja AWA-Basella pesty. 125X



Lähikuva samasta kuvasta 350X.

Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patentansökningar

Hakemus-, kuulutus- ja patenttijulkaisuja: - Ansökningspublikationer,
utläggnings- och patentskrifter:

FI _____

CH _____

DE _____

DK _____

FR _____

GB _____

NO _____

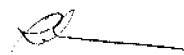
SE _____

US P 4801 451 A61K 37754
P 4521 254 B08B 3708
P 4062 941 A61K 37742
P 4144 327 —

EP

WO

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:



Allekirjoitus