



C (16) Patentti myönnetty
Patent mottolat 10 07 1988
(51) Kv.1k.5 - Int.cl.5

C 12P 19/44, 19/28, 21/00, C 07K 15/14,
C 07H 7/02, G 01N 33/569, A 61L 2/16

SUOMI-FINLAND

(FI)

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

(21) Patenttihakemus - Patentansökning	854179
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	25.10.85
(24) Alkupäivä - Löpdag	25.10.85
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	27.04.86
(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	31.03.92
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	
26.10.84 CH 5136/84 P	

(71) Hakija - Sökande

1. Societe des Produits Nestle S.A., Vevey, Switzerland, (CH)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Neeser, Jean-Richard, Rue du Temple 34, Lausanne, Switzerland, (CH)
2. Würsch, Pierre, Chemin de la Crausaz 64, La Tour-de-Peilz, Switzerland, (CH)

(74) Asiamies - Ombud: Leitzinger Oy

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä valmistaa glykopeptidiä tai oligosakkaridia, joka on aktiivinen patogeenisia bakteereja, joilla on tyypin I fimbriat, vastaan
Förfarande för framställning av glykopeptid eller oligosackarid, som är aktivt mot patogena bakterier med fimbria av typ I

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

EP A 89940 (A 61K 31/70),
FEMS Lettrs 20 (1983) 237-242, Pierce-Creted et al.

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Patogeenisten bakteereiden, joilla on tyypin I ripsut, kiinnittyminen eläinsoluihin inhiboidaan glykopeptideillä ja/tai oligosakkarideilla, jotka on valmistettu entsymaattisesti, parhaiten soijan glykoproteiinin 75 tai pavun glykoproteiinin II suhteen rikastetusta jakeesta.

Näillä aktiivisilla ainesosilla on samankaltainen polymannosidi-perusrakenne kuin bakteereiden tunnistamilla epiteelisoluilla. Bakteerit neutraloituvat eivätkä enää kiinnity soluihin.

Seoksia voidaan käyttää infektioautien, erityisesti koliformisten bakteereiden aiheuttamien infektioautien profylaksiasse, hoidossa ja diagnoosissa ja myös pintojen desinfiointissa.

86081

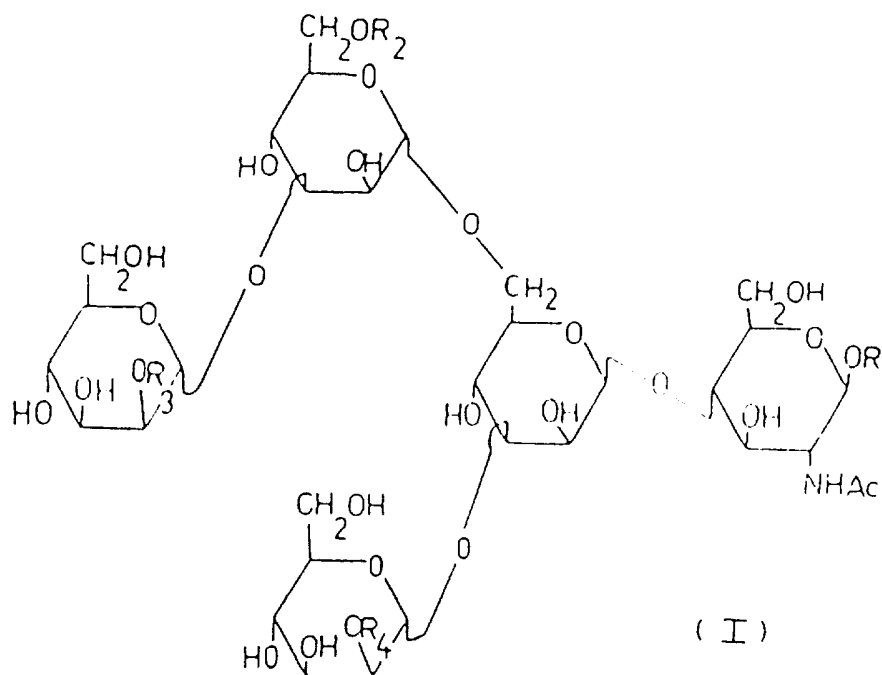
Fastsittande av patogeniska bakterier med flimmer av typ I vid djurceller inhiberas med glykopeptider och/eller oligosackarider, som framställt enzymatiskt, företrädesvis från en fraktion anrikad på sojaglykoprotein 7S eller bönglykoprotein II.

Dessa aktiva beståndsdelar har en likadan polymannosid basstruktur som epitelceller, som bakterier identifierar. Bakterierna neutraliseras och sitter icke längre fast vid cellerna,

Blandningarna kan användas för profylax, skötsel och diagnos av infektionssjukdomar, speciellt sådana, som förorsakats av coliliknande bakterier samt även för desinfektion av ytor.

Menetelmä valmistaa glykopeptidiä tai oligosakkaridia, joka on aktiivinen patogeenisia bakteereja, joilla on tyyppin I fimbriat, vastaan - Förfarande för framställning av glykopeptid eller oligosackarid, som är aktiv mot patogena bakterier med fimbria av typ I

Tämän keksinnön kohteena on menetelmä valmistaa glykopeptidiä tai oligosakkaridia, joka on aktiivinen patogeenisia bakteereja, joilla on tyyppin I fimbriat, vastaan, ja jonka kaava on



jossa R_1 on vetyatomi, tähde 4GlcNac β 1 -> ASN tai tähde

4GlcNac β 1 -> ASN $\begin{matrix} / R' \\ \backslash R'' \end{matrix}$, jossa R' ja R'' ovat samoja tai eri-

laisia ja tarkoittavat aminohappotähteitä tai polypeptidiketjuja; R_2 , R_3 ja R_4 ovat samoja tai erilaisia ja tarkoittavat vetyatomeja, mannoositähteitä tai oligomannosidiketjuja.

Ei ole paljoakaan epäilyksiä siitä, että pääosa luonnon infektiosta alkaa patogeenisen aineen kiinnittymisellä limakalvo-

jen epiteelisoluihin, mikä mahdollistaa patogeenisen aineen siirrostumisen ja sen pesäkkeen muodostamisen eläinkudokseen. Kun infektion aiheuttavat bakteerit, joilla on "tyypin I fimbriana" tunnetut proteiinirakenteet, jolloin näiden bakteereiden kiinnittymistä eläinsoluihin kutsutaan "mannoosiherkiksi", nämä rakenteet tunnistavat spesifiset reseptorit, jotka ovat kompleksisia glusidiiniryhmiä, luultavasti oligomannosidiketjuja, jotka muodostavat osat glukokonjugaateista solumembraanien pinnalla.

Äskettäin on osoitettu (kts. viite 1 jäljempänä), että bakteereiden, joilla on tyypin I fimbriat, kiinnittymisilmiö epiteelisoluihin ja niiden kyky aiheuttaa marsuilla erytrosyyttien hemaglutinaatio, voi estyä eräiden membraanireseptoreiden spesifistä rakennetta muistuttavien oligosakkaridien läsnäollessa, jolloin bakteerit johdetaan näin harhaan ja kiinnittymään ensi sijassa kyseessä oleviin oligosakkarideihin. Näitä oligosakkarideja saadaan joko syntetisoimalla tai ne eristetään entsyymaattisista vajavuuksista kärsivien potilaiden virtsasta.

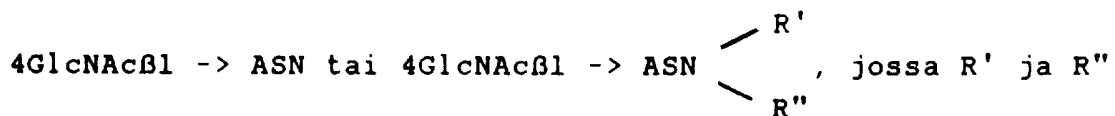
Eurooppalainen patenttijulkaisu nro 89940 koskee samoin esimerkiksi seosta, joka sisältää rakenteen Gal₁ -> 3Gal, joka saadaan kemiallisesti ja joka kykenee inhiboimaan "in vitro" Escherichia coli K88+ bakteereiden kiinnittymisen nuorten sikojen suoliston soluihin.

Esillä olevan keksinnön tavoitteena on tuoda esiin menetelmä valmistaa seos, joka sisältää aktiivisina ainesosina kasvi- tai eläinperäisiä glykopeptidejä ja/tai oligosakkarideja, jotka saadaan entsyymaattisesti ja jotka kykenevät korvaamaan tyypin I fimbrioiden tunnistaman normaalin reseptorin ja siten inhiboimaan tai kääntämään vastakkaiseksi patogeenisten bakteereiden, joilla on näitä fimbrioita, kiinnittymisen eläinsoluihin.

Esimerkkejä patogeenisista bakteereista, joilla on tyyppin I fimbriat, ovat pategooniset Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Salmonella typhimurium, Shigella flexneri kannat jne.

Edellä olevassa kaavassa (I) 4GlcNacβ1 -> ASN on 2-desoksi-glukoosirengas, joka on kiinnittynyt 4-asemassa terminaaliseen glukosamiiniin, omaa asetyyliaminoryhmän 2-asemassa ja on kiinnittynyt 1-asemassa β-konfiguraatiolla asparagiiniin, joka voi olla substituoitu aminohapoilla tai polypeptidiketjuilla.

Eräs hyvänä pidetty ryhmä, erityisesti, koska se inhiboi patogeenisten koliformi-enterobakteereiden kiinnittymistä, on edellä olevan kaavan I mukaiset glykopeptidit, joissa R₁ on



tarkoittavat samaa kuin edellä; R₃ ja R₄ ovat vetyatomeja ja R₂ on vetyatomi tai mannoositähde.

Eräs hyvänä pidetty oligosakkaridi, erityisesti, koska se inhiboi patogeenisia koliformi-enterobakteereita, on kaavan I mukainen oligosakkaridi, jossa R₁, R₃ ja R₄ ovat vetyatomeja ja R₂ on vetyatomi tai mannoositähde.

Keksinnön mukaiselle menetelmälle on tunnusomaista se, että soijasta tai pavuista peräisin oleva glykoproteiini digestoidaan proteolyttisellä entsyymillä, että saadut glykopeptidit muunnetaan valinnaisesti oligosakkarideiksi endo-β-N-asetyyli-glukosaminidaasi H:n vaikutuksen avulla, ja että saadut glykopeptidit tai oligosakkaridit sen jälkeen valinnaisesti digestoidaan kontrolloidulla tavalla ekso-α-mannosidaasilla kahden mannoositähteen välisen α1 -> 2-sidoksen ensijaiseksi lohkaemiseksi.

Lähtöaineena voidaan käyttää mitä tahansa kasvijauhoa, jonka tiedetään sisältävän runsaasti oligomannosideja sisältäviä varastoglykoproteiineja. Edullisesti käytetään soija- tai papujauhoa, josta rasva on poistettu.

Suosittelavaa on käyttää soijaglykoproteiinin 7S tai papuglykoproteiinin II suhteen rikastettua eristettä uuttamalla rasvaton jauho alkalisisessä pH-arvossa (8 - 9) ja sen jälkeen saostamalla glykoproteiini selektiivisesti pH-arvossa 4,5 - 5, esimerkiksi käyttämällä samanlaista menetelmää kuin mitä on kuvattu kirjallisuudessa (kts. viitteet 2 ja 4 jäljempänä).

Glykopeptidit saadaan siten, että glykoproteiinin suhteen rikastettu jae digestoidaan tämän jälkeen proteolyttisellä entsyymillä, esimerkiksi kirjallisuudessa (kts. viite 3 jäljempänä) kuvatuunlaista menetelmää.

Entsyaattinen käsittely voidaan suorittaa millä tahansa aktiivisella proteolyttisellä entsyymillä happamassa, neutraalissa tai alkalisisessä pH-arvossa. Entsyymi voi olla peräisin sienestä, mikrobista (esimerkiksi pronasi, alkalaasi), kasvista (esimerkiksi bromeliini, fisiini, papaiini) tai eläimestä (esimerkiksi tysiini, pepsini, pankreatiini).

Keksinnön mukaisen menetelmän ensimmäisessä suoritusmuodossa, jolla valmistetaan oligosakkarideja glykopeptideistä, edellä saatu entsyymikäsittelyn tuote käsitellään endo- β -N-asetyyli-glukosaminidaasi H-entsyymillä, jonka tarkoituksena on lohkaista selektiivisesti kahden kaavan I mukaisen N-asetyyli-glukosamiinitähteen välinen β 1, 4 sidos, jolloin ryhmä R_1 muuntuu vedyksi.

Keksinnön mukaisen menetelmän tämän ensimmäisen suoritusmuodon eräessä hyvänä pidetyssä muunnoksessa, jonka tarkoituksena on lyhentää mainittujen oligosakkaridien oligomannosidiketjuja niiden aktiivisuuden lisäämiseksi, oligosakkaridit käsitellään kontrolloidulla tavalla ekso- α -mannosidaasilla eli entsyymil-

lä, joka ensisijaisesti lohkaisee kahden mannoositähteen välisiä α , 2-sidoksia, esimerkiksi käyttämällä kirjallisuudessa (kts. viite 5 jäljempänä) kuvatuslaista menetelmää.

Keksinnön mukaisen menetelmän toisessa suoritusmuodossa, jota pidetään suositeltavana, koska sillä saadaan tuotteita, jotka ovat aktiivisempia kuin ensimmäisessä suoritusmuodossa saadut tuotteet, oligomannosidiketjut lyhennetään käsittelemällä edellä mainitut glykopeptidit kontrolloidulla tavalla ekssi- α -mannosidaasilla. Vastaavat oligosakkaridit voidaan vaihtoehtoisesti valmistaa sen jälkeen käsittelemällä nämä glykopeptidit endo H:lla. Keksinnön mukaisia seoksia voidaan käyttää bakteereiden, joilla on tyyppin I fimbriat, aiheuttamien infektio-tautien, tarkemmin sanoen koliformisten enterobakteereiden, kuten esimerkiksi Escherchia coli'n aiheuttamien ruonsulatuskanavan tautien profylaksiassa, hoidossa tai diagnoosissa. Nämä seokset voivat olla antamistapaan sopivassa muodossa.

Esimerkiksi oraalista tai enteraalista antamistapaa varten aktiivinen ainesosa voi olla formuloitu siirappina, pillerinä, kapselina, tablettina, lääkerakeena, liuoksena, suspensiona, emulsiona tai jauheena, joka voidaan rekonstrituoida lisäämällä vesipitoista mediumia, esimerkiksi parhaiten ruokavalio-tuotteena, esimerkiksi maitojauheena.

Parenteraalista antamistapaa varten se voi olla formuloitu fysikaalisesti stabiloituna, steriilinä ja apyrogeenisena liuoksena tai suspensiona.

Paikallista antamistapaa, esimerkiksi silmäsovellutuksia varten se voi olla formuloitu liuoksena, aerosolina, voiteena tai salvana.

Kun aktiivinen ainesosa on tarkoitettu patogeenisten bakteereiden diagnoosiin, indentifioimiseen tai eristämiseen, se on

edullisesti kytketty, parhaiten kovalentin sitomisen kautta makromolekyylitukiaineeseen.

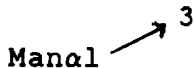
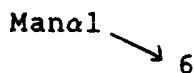
Keksinnön mukaisia seoksia voidaan lopuksi käyttää pintojen desinfioimiseen, esimerkiksi piilolinssien käsittelyyn tarkoitettuina liuoksina tai emulsioina.

Aktiivisen ainesosan määrä näissä seoksissa voi olla 0,1 - 90 painoprosenttia.

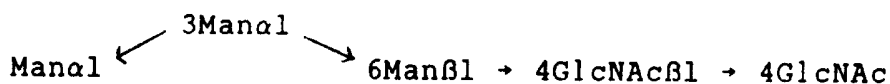
Keksintöä on havinnollistettu seuraavien esimerkkien avulla, joissa osat ja prosenttimäärät on laskettu painosta ellei toisin ole mainittu.

Seuraavissa esimerkeissä 1 - 3 kaavan I mukaisten aktiivisten ainesosien rakenteen todistaminen perustuu seuraaviin ominaisuuksiin:

a) Lähtöaineina käytettyjen glykoproteiinien glusidiinikoostumuksen analyysi osoittaa, että mukana on vain kaksi monosakkaridikomponenttia, nimittäin maannosi ja glukosamiini. Näistä kahdesta ainesosasta muodostuneet oligosakkaridit ovat kiinnittyneet polypeptidiketjuun asparagiinin tyypin kautta (N-glykosidisisidos). Näiden oligosakkaridien "endo"-osa vastaa siten seuraavaa rakennetta



b) Se, että endo- β -N-asetyyli-glukosaminidaasi H (endo H) hydrolysoi täydellisesti kaikki glykopeptidisubstraatit, osoittaa, että ne kaikki vastaavat tällaiseen entsyymaattiseen käsittelyyn vaadittavaa minimirakennetta (kts. viite 6 jäljempänä):



Näiden kahden edellä olevan rakenteen yhdistäminen johtaa ehdotetun yleisrakenteen mukaiseen formulaatioon.

ESIMERKKI 1

a) Glykoproteiini: Glykoproteiinin 7S suhteen rikastettu jae valmistetaan rasvattomasta soijajauhosta uuttamalla pH-arvossa 8,0 0,5-millimolaarisella Na_2SO_3 -liuoksella, saostamalla pH-arvossa 5,7 ensimmäisen jakeen (runsaasti 11S proteiinia) poistamiseksi ja saostamalla toisen kerran pH-arvossa 4,5, minkä jälkeen pestään kaksi kertaa samassa pH-arvossa, jolloin saadaan 7S-proteiinin suhteen rikastunut jae.

b) Glykopeptidit: Proteiini-jae digestoidaan entsymaattisesti käyttämällä 30 g proteiinia 2 litrassa tris-HCl-puskuriliosta (0,05 moolia, pH 8,0) tolueenin läsnäollessa 24 tunnin aikana 40°C :ssa käyttämällä 600 mg pronaaasi E entsyymiä (Merck AG) ja sen jälkeen 48 tuntia käyttämällä vielä 300 mg entsyymiä. Tämän liuoksen suodattamisen jälkeen glykopeptidit eristetään johtamalla eluaatti Dowex 50W-X8^(R) hartsin (H^+ -muoto) läpi, pesemällä hartsi tislattulla vedellä, kunnes glusidit ovat hävinneet pesuvesistä, ja neutraloimalla yhdistetyt jakeet Amberilite IRA 400^(R) hartsilla (CO_3^{--} -muoto). Lopullinen liuos väkevöidään ja pakkaskuivataan ja tuote voidaan lopuksi puhdistaa fraktioimalla Sephadex G-25^(R)-pylväässä. Menetelmän kokonaissaanto on 88 % laskettuna mannoosin loppumäärästä glykopeptidiseoksessa. Edellä kuvatulla tavalla saadun seoksen glysidinikoostumuksen analyysi (viitteessä 7 kuvatulla menetelmällä) osoitti, että mannoosia oli mukana keskimäärin 7,6 yksikköä kahta N-asetyyli-glukosaminiyksikköä kohti.

c) Oligosakkaridit: Edellä kuvatulla tavalla eristetyt glykopeptidit osoitettiin voitavan täydellisesti digestoida endo- β -

N-asetyyliiglukoaminidaasilla H (endo H, Seikagaku Kogyo Co. Ltd.). Tämä viimeksi mainittu ominaisuus muodostaa perustan menetelmälle, jolla saatiin vastaavat oligosakkaridit: glykopeptidinäyte, joka sisältää 7,5 mg oligomannosidia, liuotetaan 10 ml:aan sitraatti-fosfaattipuskuriliuosta (pH 6,0, 10 millimoolia) ja saatuun liuokseen lisätään 100 millilyksikköä endo H-entsyymiä (valmistajan määrittelemä yksikkö) ja 0,5 ml toluenia. Inkuboidaan 24 tuntia 37°C:ssa, minkä jälkeen entsyymi denaturoidaan kuumentamalla. Näin saatua hydrolysaattia voidaan käyttää tässä muodossa (puhdistamattomana) hemagglutinaatiotesteissä (kts. esimerkki 4 jäljempänä). Sama hydrolysaatti voidaan myös käsitellä Amberilite MB 3^(R)-hartsilla (H⁺ ja OH⁻-muoto) näin vapautuneiden oligosakkaridien eristämiseksi: hartsin lisäämisen sekoittamisen ja dekantoinnin jälkeen se pestään tislattulla vedellä, kunnes glusidit ovat hävinneet pesuvesistä, ja yhdistetyt jakeet väkevöidään. Näin puhdistettujen oligosakkaridien analyysi osoitti, että tuotteessa, joka sisälsi 85 % mannoosia, oli mukana 7 - 8 mannoosiyksikköä yhtä N-asetyyliglukosamiiniyksikköä kohti. Oligosakkaridien entsyymaattisen hydrolyysin ja eristämisen kokonaissaanto oli oleellisesti kvantitatiivinen. Endo H-digestiokäsittelyn puhdistamattoman tuotteen ja puhdistettujen oligosakkaridien seoksen HPTLC-analyysi (high-performance thin-layer chromatography) antaa samanlaiset tulokset: entsyymi vapauttaa kolme erilaista tuotetta vastaten rakenteita GlcNAc-(Man)₆ (18 %), GlcNAc-(Man)₇ (26 %), ja GlcNAc-(Man)₈ (56 %) (Man on mannoositähde), jotka hiilihydraatit vapautuvat täydellisesti glykopeptidilähtöaineista.

ESIMERKKI 2

a) Glykoproteiini: Glykoproteiini II:n suhteen rikastettu jae valmistetaan jauhetusta ja rasvattomasta tarhapapujauhasta (Phaseolus vulgaris) uuttamalla pH-arvossa 9,0 ja dialysoimalla hapanta vettä vasten pH-arvossa 5,0, jolloin saadaan saostumaton glykoproteiinijae, joka erotetaan ja liuotetaan uudelleen pH-arvossa 8,0. Glykoproteiinia II runsaasti sisältävä

jae saadaan sen jälkeen, kun yhdistetyt supernatantit on sentrifugoitu kaksi kertaa ja pakkaskuivattu.

b) Glykopeptidit: Proteiini jae digestoidaan entsyymaattisesti täysin samalla tavoin kuin soijasta glykoproteiini 7S (esimerkki 1b edellä). Saadun seoksen glukosidiinikoostumuksen analyysi (kts. viite 7 jäljempänä) osoitti, että mukana oli keskimäärin 7,8 mannoosiyksikköä kahta N-asetyyli-glukosamiinisyksikköä kohti.

c) Oligosakkaridit: Edellä kuvatulla tavalla eristetyt glykopeptidit voidaan digestoida täydellisesti endo H-entsyymillä. Oligosakkaridien entsyymaattinen hydrolyysi ja eristäminen suoritetaan täysin samalla tavoin kuin soijan glykopeptidien (kts. esimerkki 1c edellä). Tässä tapauksessa HPTLC-analyysi osoitti, että vapautui 5 erilaista tuotetta, jotka vastasivat rakenteita GlcNAc-(Man)₅ (5 %), GlcNAc-(Man)₆ (10 %), GlcNAc-(Man)₇ (26 %), GlcNAc-(Man)₈ (15 %) ja GlcNAc-(Man)₉ (44 %).

ESIMERKKI 3

Esimerkkien 1 ja 2 tuotteista valmistettiin pienempirakenteisia glykopeptideitä ja oligosakkarideja käyttämällä hyväksi α -mannosidaasin (canavalian, Canavalia, Sigma Chemical Company) kykyä lohkaista Man α 1 \rightarrow 2-sidokset ensi sijassa Man α 1 \rightarrow 3-sidoksiksi.

Glykopeptidinäyte, joka sisältää 350 mg soijan glykoproteiinista 7S saatua oligomannosidia (esimerkki 1b edellä) liuotetaan 75 ml:aan sitraatti-puskuriliuosta (0,01 moolia, pH 4,5) ja saatuun liuokseen lisätään 190 yksikköä α -mannosidaasia (canavalia:sta, valmistajien määrittelemä yksikkö). Inkuboidaan 1 tunti 25°C:ssa, minkä jälkeen seos kuumennetaan, jäädytetään ja suodatetaan. Sen jälkeen suodos pakkaskuivataan. Pakkaskuivattua tuotetta voidaan käyttää sellaisenaan (puhdistamattomana) hemaglutinaatiotesteissä (kts. esimerkki 4 jäljempänä). Se voidaan myös puhdistaa Sephadex G-25^(R)-pylvääs-

sä, joka tehokkaasti erottaa glykopeptidiseoksen ja entsyymin vapauttaman mannosiin.

Tuotteen glusidiinikoostumuksen analyysi (kts. viite 7 jäljempänä) osoitti, että mukana oli 4,8 mannoosiyksikköä kahta N-asetyyli-glukosamiinia kohti.

Tuotteiden, jotka saatiin edellä kuvatulla tavalla kasvisperäisistä vastaavista oligosakkarideista (esimerkit 1c ja 2c edellä), HPTLC-analyysi vahvistaa, että kaavaa $\text{ClcNac}-(\text{Man})_5$ vastaava yhdiste on todella saatujen seosten pääkomponentti.

ESIMERKKI 4

Kiinnittyvien E.coli-kantojen aiheuttaman erytrosyyttien hemaglutinaation inhibiitio marsuilla glykopeptidien ja oligosakkaridien läsnäollessa

Hemaglutinaatiotesteissä ja hemaglutinaation inhibiitiotesteissä käytettiin systemaattisesti kahta kiinnittyvää E.coli-kantaa, so. kliinisesti eristettyä E.coli 16375-kantaa (Univ.-Klinik für Kinderheilkunde, Innsbruck) ja E.coli 0119.K69,L74-30 (K69)-kantaa. Nämä bakteerit pestiin suolavedellä (0,9 % NaCl) ja suspensio säädettiin 10^9 kpl/ml bakteerikonsentraatioon (mittaamalla optinen tiheys).

Marsun erytrosyyttejä suspendoitiin suolaveteen 1-prosentin konsentraatiossa.

Hemaglutinaatio- ja hemaglutinaation inhibiitiotestit suoritettiin sekoittamalla 25 μl (mikrolitraa) bakteerisuspensiota, 50 μl erytrosyyttisuspensiota ja 25 μl suolaliuosta (vastavasti ilman inhibiittiä tai inhibiittiä sisältäen, jossa tapauksessa testattiin sarjassa useita eri konsentraatioita). Lukemat otettiin 2 tunnin seisottamisen jälkeen 4°C :ssa.

Tulokset on esitetty seuraavassa taulukossa I:

Taulukko I

Erytroosyyttinen hemagglutinaation inhibiitio marsuilla
Kosentraatio a) Kosentraatio b) Aktiivisuus
(ppm oligomannosidia) (u-molaarisuus) α -MM:n suhteen

Inhibiittori	E.coli K 69		E.coli 16375		E.coli K 69	E.coli 16375	E.coli K 69
	E.coli K 69	E.coli 16375	E.coli K 69	E.coli 16375			
Metyyli- α -D-mannosidi (α -MM)	125	60	650	325			1
Glykopeptidit endo-H-diges-) soijasiementen taatti (puhdistamaton)) glykoproteiini-puhdistetut oligosakkariidit) nista 7S	130/130	65/75	100	50			6,5
Glykopeptidit endo-H-diges-) pavunsiementen taatti (puhdistamaton)) glykoproteiini-puhdistetut oligosakkariidit) nista 7S	125	60	90	45			7
Ovalbumiinin c) glykopeptidien seos GP IV	40/60	20/30	70	35			10
GP V	95	n.t.	90	n.t.			7,5
Oligosakkariidit (soijan glykoproteiinista 7S) digestoituna (lh) α -mannosidaasilla	10/15	5	12	6			60
Oligosakkariidit (pavun glykoproteiinista II) digestoituna (lh) α -mannosidaasilla	10/25	10/15	18	12			30
Mancl 3 Mancl 4 GlcNAc (alkuperä syntet-tinen) d)	10/25	10	18	12			30
Glykopeptidit (soijan glykoproteiinista 7S) digestoituna (lh) α -mannosidaasilla	7,5	5,5	20	15			25
Glykopeptidit (pavun glykoproteiinista II) digestoituna (lh) α -mannosidaasilla	12/18	6/9	15	7,5			40
Glykopeptidit (pavun glykoproteiinista II) digestoituna (lh) α -mannosidaasilla	12/18	6/9	15	7,5			40

Taulukon 1 selitykset:

a) Hemaglutinaation täydelliseen inhibiitioon johtava pienin inhibiitiokonsentraatio loppuseoksessa.

b) Tuotteen glusidiinikoostumuksen analyysin perusteella kaavasta laskettu inhibiittorin konsentraatio (seosten tapauksessa keskiarvo).

c) Tuotteet GP IV ja V vastaavat kirjallisuuden (kts. viite 5 jäljempänä) mukaisesti saatuja, erotettuja ja nimettyjä, asparagiiniin kiinnittyneitä hiilihydraatteja. Ovalbumiinista saatujen glykopeptidien seos on kuvatulainen (kts. viite 5 jäljempänä).

d) Prof. Dr. Hans Paulsen'in (Institut für Organische Chemien und Biochemie der Universität Hamburg) ystävällisesti antama synteettinen tuote.

n.t. tarkoittaa ei-testattua.

Muut kokeet ovat osoittaneet, että kasvi-glykopeptideillä on vertailukelpoinen inhihoiva vaikutus enteropatoogeenisten E.coli 086.K61,B74-10 ja 0111.K58,B75-44 kantojen aiheuttamaan marsun erytrosyyttien hemaglutinaatioon.

ESIMERKKI 5

Enteropatoogeenisen E.coli 16375-kannan kiinnittyminen ihmisen poskisoluihin ja kiinnittymisen inhibiitio

Solut saatiin ottamalla sivelyviljelmät erään laboratorion henkilökunnan jäsenen suusta, pestiin neljä kertaa fosfaattipuskuroidulla fysiologisella suolaliuoksella (NaCl 0,15 moolia, fosfaatti 0,01 moolia, (PBS) ja lopuksi laimennettiin 10^6 solua/ml konsentraatioon. Kliinisen eristeviljelmän 16375 enteropatoogeeniset E.coli-bakteerit pestiin kaksi kertaa PBS-

puskurilla ja laimennettiin 2×10^9 solua/ml bakteerikonsentraatioon.

Inkuboinnit suoritettiin sekoittamalla 500 μ l solususpensiota, 250 μ l bakteerisuspensiota ja 250 μ l PBS-puskuria (kiinnittymisen mittaamista varten) tai inhibiittoria (inhibitiion mittaamiseksi testattiin sarja eri konsentraatioita). Sekoittaminen suoritettiin pyörittämällä hitaasti 30 minuuttia ympäristön lämpötilassa. Pestiin neljä kertaa PBS-puskurilla (5 ml) ja sen jälkeen otettiin leviteviljelmät talteen ja gram-värijättiin. Optisessa mikroskoopissa laskettiin kiinnittyneiden bakteereiden lukumäärä solua kohti analysoimalla 50 solua testiä kohti. Tulokset on esitetty seuraavassa taulukossa II:

TAULUKKO II

<u>Inhibiittori</u>	<u>Konsentraatio (ppm ekvivalenttia mannosidia)</u>	<u>Kiinnittymisen inhibiitio-%</u>
Metyyli- α -D-mannosidi:	100	70
	50	45
	10	35
Glykopeptidit soijan glykoproteiinista 7S (esimerkki 1b)	100	65
	50	30
	10	25
Glykopeptidit soijan glykoproteiinista 7S digestoituna (1H) - mannosidaasilla (esimerkki 3)	100	90
	25	77
	5	21

ESIMERKKI 6

Glykopeptidien kiinnittäminen kiinteään tukiaineeseen

Pronaasidigestiolla (esimerkit 1b ja 2b) saadut glykopeptidit voidaan kiinnittää Sepharose-geeliin seuraavalla menetelmällä: 2 g CNBr:llä aktivoitua Sepharose 6MB^(R) hartsia (Pharmacia Fine Chemicals) pestiin HCl-liuoksella (1 millimooli, 400 ml)

ja suodatettiin. Samanaikaisesti liuotettiin NaHCO_3 -puskuriliuokseen (0,1 moolia, pH 8,3), joka sisälsi natriumkloridia (0,5 moolia), 63 mg (kuivapaino, jossa 25 mg oligomannosidia) pavun glykoproteiinista II (esimerkki 2b) saatuja glykopeptidejä. Glykopeptidiliuosta ja suspendoitua geeliä sekoitettiin pyörittämällä hitaasti 2 tuntia ympäristön lämpötilassa. Pestiin peräkkäin $\text{NaHCO}_3/\text{NaCl}$ -puskurilla, etanoliamiiniliuoksella (2 tuntia ympäristön lämpötilassa), uudelleen $\text{NaHCO}_3/\text{NaCl}$ -puskurilla, natriumkloridia (0,5 moolia) sisältävällä asetaattipuskuriliuoksella (0,1 moolia, pH 4,0) ja lopuksi jälleen $\text{NaHCO}_3/\text{NaCl}$ -puskurilla, jolloin saatiin glykopeptideihin kytkettyä geeliä. Kiinnittämismarkin saanto oli 48 % (laskettuna mannoosin annostuksesta).

ESIMERKKI 7

Diagnoositesti, jolla identifioidaan bakteerit, joilla on spesifiset akseptorit aktiivisten ainesosien rakenteiden suhteen

a) Esimerkin 4 mukaisessa hemaglutinaatiotestissä sekoitetaan bakteereita marsun erytrosyyttien kanssa. Samanaikaisesti valmistetaan samanlainen seos lisäämällä jonkin biologisesti aktiivisen tuotteen liuosta (niin suuri konsentraatio, että tämä inhiboi täydellisesti taulukon I mukaisesti). Lukema, joka mahdollistaa bakteerisuspension aiheuttaman erytrosyyttien hemaglutinaation ja sen inhibiition lisättäessä jotakin aktiivista ainesosaa, todistaa, että bakteereilla on spesifiset akseptorit tämän ainesosan rakenteeseen nähden.

b) Vaihtoehtoisesti voidaan valmistaa mikroskooppilevyllä bakteerisuspension ja glykopeptideihin kytketyn Sepharosegeelin (esimerkki 6) seos. 15 minuutin inkuboinnin jälkeen optisen mikroskoopin avulla suoritettu analyysi osoittaa, että jos bakteereilla on spesifiset akseptorit, ne peittävät geelihiukkaset, kun taas vastakkaisessa tapauksessa samat hiukkaset eivät kiinnitä mitään bakteereita.

ESIMERKKI 8Bakteereiden, joilla on spesifisiä akseptoreita aktiivisten ainesosien rakenteiden suhteen, eristäminen

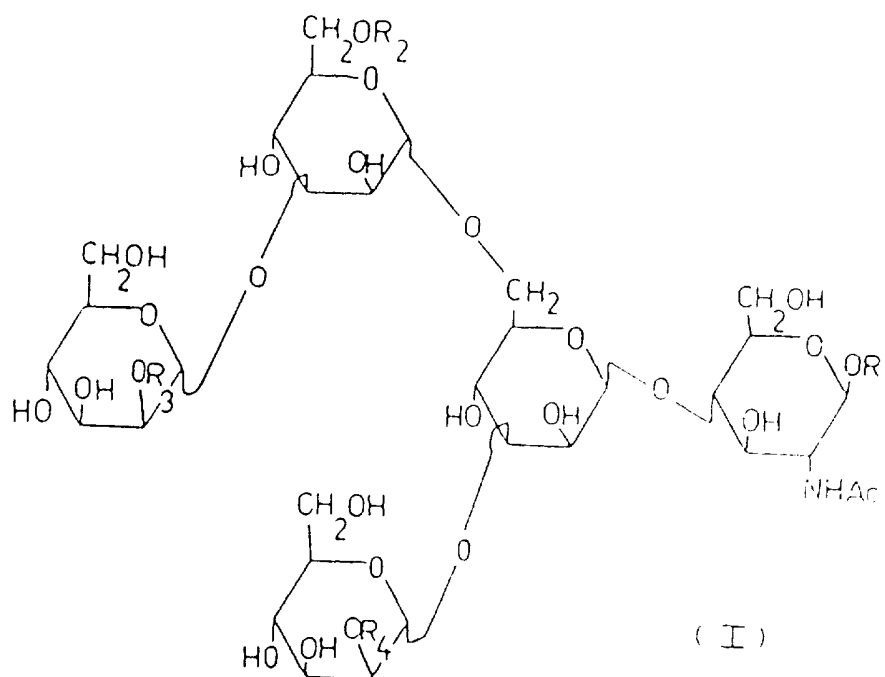
Glykopeptidien kanssa kytkettyä Sepharose-geeliä, joka on saatu esimerkin 6 mukaisesti, viedään pylvääseen. Bakteereiden seos johdetaan tämän pylvään läpi, jolloin bakteerit, joilla on spesifisiä akseptoreita geeliin kytkettyjen glykopeptidien suhteen, pidättyvät, kun taas muut bakteerit eluoituvat suoraan. Huuhtelun jälkeen käytetään yhtä aktiivista ainesosaa sisältävää puskuria eluoimaan puhtaassa muodossa bakteerit, joilla on spesifisiä akseptoreita.

VIITTEET

1. N. Firon, I. Ofek ja N. Sharon, Carbohydr. Res. 120 (1983), 235-249.
2. M. Shemer, H.L. Creinin, R.E. McDonald ja W.E. Irwin, Cereal Chem. 55 (1978), 383-391.
3. F. Yamauchi, M. Kawase, M. Kanbe ja K. Shibazaki, Agr. Biol. Chem. 39 (1975) 873-878.
4. A. Pusztai ja W.B. Watt, Biochem, Biophys. Acta 207 (1979), 413-431.
5. T. Tai, K. Yamashita, M. Ogata-Arakawa, N. Koide. T. Muramatsu, S. Iwashita, Y. Inoue ja A. Kobata, J. Biol. Chem. 250 (1975), 8569-8575.
6. Tarentino, R.B. Trimble ja F. Maley, Methods in Enzymology (V. Ginsberg, toim., Academic Press, New York), 50 (1978) 574-580.
7. J.R. Neeser ja T.F. Schweizer, Anal. Biochem. (1984).

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä valmistaa glykopeptidiä tai oligosakkaridia, joka on aktiivinen patogeenisia bakteereja, joilla on tyyppin I fimbriat, vastaan, ja jonka kaava on



jossa R_1 on vetyatomi, tähde 4GlcNac β 1 -> ASN tai tähde

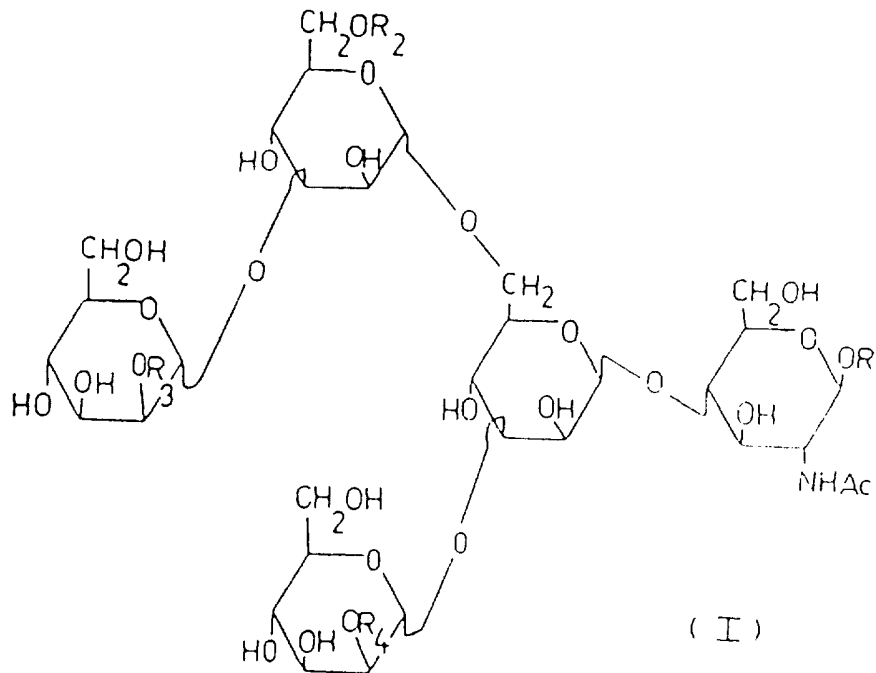
4GlcNac β 1 -> ASN $\begin{matrix} / R' \\ \backslash R'' \end{matrix}$, jossa R' ja R'' ovat samoja tai eri-

laisia ja tarkoittavat aminohappotähteitä tai polypeptidiketjuja; R_2 , R_3 ja R_4 ovat samoja tai erilaisia ja tarkoittavat vetyatomeja, mannoositähteitä tai oligomannosidiketjuja, t u n n e t t u siitä, että soijasta tai pavuista peräisin oleva glykoproteiini digestoidaan proteolyttisellä entsymillä, että saadut glykopeptidit muunnetaan valinnaisesti oligosakkarideiksi endo- β -N-asetyyliglukosaminidaasi H:n vaikutuksen avulla, ja että saadut glykopeptidit tai oligosakkaridit sen jälkeen valinnaisesti digestoidaan kontrolloidulla tavalla ekso- α -mannosidaasilla kahden mannoositähteen välisen α 1 -> 2-sidoksen ensijaiseksi lohkaisemiseksi.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että glykoproteiini-lähtöaine eristetään rasvattomasta kasvijauhosta, ja on parhaiten soijaglykoproteiinin 7S tai papuglykoproteiinin II suhteen rikastettu eriste.
3. Patenttivaatimuksen 1 mukaisen seoksen valmistusmenetelmä, t u n n e t t u siitä, että glykopeptidi saatetaan reagoimaan lisäksi aktivoituneen makromolekyylitukiaineen kanssa.
4. Jonkin patenttivaatimuksen 1-3 mukaisen menetelmän mukaan valmistetun glykopeptidin tai oligosakkaridin käyttö spesifisten bakteereiden, joilla on tyypin I fimbriat, identifioimiseen ja/tai eristämiseen.
5. Jonkin patenttivaatimuksen 1-3 mukaisen menetelmän mukaan valmistetun glykopeptidin tai oligosakkaridin käyttö pintojen desinfiointiin.

Patentkrav

1. Förfarande för framställning av glykopeptid eller oligosackarid, som är aktiv mot patogena bakterier med fimbria av typ I, och som har formeln



där R_1 är en väteatom, gruppen $4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow \text{ASN}$ eller gruppen

$4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow \text{ASN} \begin{matrix} / R' \\ \backslash R'' \end{matrix}$, där R' och R'' är lika eller olika

och avser aminosyragrupper eller polypeptidkedjor; R_2 , R_3 och R_4 är lika eller olika och avser väteatomer, mannosgrupper eller oligomannosidkedjor, k ä n n e t e c k n a t därav, på soja eller bönor baserad glykoprotein digestiseras med ett proteolytiskt enzym, att de erhållna glykopeptiderna eventuellt omvandlas till oligosackarider under inverkan av endo- β -N-acetylglukosaminidas H, och att de erhållna glykopeptiderna eller oligosackariderna därefter eventuell digestiseras på ett kontrollerat sätt med exo- α -mannosidas för i första hand spjälkning av $\alpha 1 \rightarrow 2$ -bindningen mellan två mannosgrupper.

2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att glykoprotein-utgångsämnet isoleras från ett fettfritt växtextrakt, och är företrädesvis ett i avseende å soijaglykoprotein 7S eller bönglykoprotein II berikat isolat.
3. Framställningsförfarande för blandning enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att glykopeptiden därtill omsätts med ett aktiverat makromolekylstödämne.
4. Användningen av glykopeptid eller oligosackarid framställd enligt något av patentkraven 1-3 för indentifiering och/eller isolering av specifika bakterier med fimbria av typ I.
5. Användningen av glykopeptid eller oligosackarid framställd enligt något av patentkraven 1-3 för desinficering av ytor.