

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 750952 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application 750952

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification (IPC¹)
A61K 45/02

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date 27.03.1975

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 27.03.1975

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 04.10.1975

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 12.06.2019

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

03.04.1974 NL 7404590

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Stichting Rega V.Z.W., 3, Krakenstraat Leuven, Belgium, BELGIA, (BE)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Stewart, William Edgar, Belgium, BELGIA, (BE)

2 • de Somer, Pierre Marie Hendrik Frans, Belgium, BELGIA, (BE)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Leitzinger Oy, High Tech Center, Tammasaarenkatu 1, 00180 Helsinki

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

Interferonin reaktivointi

Reaktivering av interferon

Stichting REGA V.Z.W.
3, Krakenstraat
B-3000 Leuven
Belgia

Kts. → Interferonin reaktivointi. - Reaktivering av interferon.
muuta
vaat.



Tämän keksinnön kohteena on interferonin reaktivointi.

Kts.
korp-
uhoia
250951-
uho-
mukasta



Nimi interfero on annettu sellulaariselle antivirismateriaalille, joka voidaan ottaa talteen elävistä soluista ja ekstrasellulaarisista nesteistä. Sen tuottoa soluissa voivat stimuloida useat agenssit, mukaanlukien ensisijassa virukset ja joukko muita agensseja bakteereista suurimolekyylipainoisiin polymeereihin asti. Interferoni voidaan ottaa talteen soluista tai ekstrasellulaarisista nesteistä eri puhtausasteina, ja sillä näyttää olevan kyky suojata eläinkudoksia ja soluja virusten hyökkäystä vastaan. Yleensä interferonin virustenvastainen aktiivisuus antaa epäspesifisen suojauksen muita viruksia vastaan niiden lisäksi, joita on käytetty solujen stimuloimiseen, vaikkakin eri virusten välillä on havaittu herkkyyseroja interferonin suhteen. Useimmissa tapauksissa interferonin on havaittu suojaavan paremmin sellaisia kudoksia ja soluja, joista se on valmistettu, kuin muita kudoksia ja soluja. Nykytiedon tasolla olevia yleiskatsauksia interferonista on löydettävissä kirjoista: "Interferon", J. Vilced, Springer-Verlag, Vienna-New York, 1969, ja "Selective Inhibitors of Viral Functions", W.A. Carter (toimittaja), CRC-Press, Celeveland, 1973, jotka on esitetty tässä yhteydessä viitteenä.

Vaikkakin interferonin fysikaalisen ja kemiallisen karakterisoinnin suhteen on tehty paljon työtä, ei ole vielä ollut mahdollista määrittää varmasti sen kemiallista rakennetta. Näyttää ilmeiseltä, että interferoni on laadultaan proteiininomainen, mutta suurin osa sen yksityiskohdista ovat epävarmoja. Tämän kemaillisen rakenteen määrittämistä suuresti on estänyt se seikka, että interferoneja näyttää olevan olemassa useita molekyylilajeja. Näillä lajeilla on eri molekyylipainot ja erilaiset ominaisuudet ja niiden muodostuminen riippuu useista tekijöistä, kuten interferonin tuottamiseen käytettyjen solujen laadusta (esimerkiksi solut, jotka ovat peräisin eri eläinlajeista, kuten hiirestä, kaniinista, kananpojasta tai ihmisestä, tai solut, jotka ovat peräisin yksittäisten eläinlajien eri kudoksista), tuottamisen stimuloimiseen käytetyn agenssin laadusta (esimerkiksi eri virukset), varsinaisesta tuottamismenetelmästä ja varsinaisesta menetelmästä, jolla interferoni otetaan talteen soluista tai nesteistä.

Interferonin valmistusta, puhdistamista ja kliinistä arviointia on lisäksi tähän mennessä estäneet useat tekijät, joista tärkein on se, että interferonia on pidetty epästabiilina. Vaikkakin on ilmoitettu, että erään tyyppiset interferonit, kuten ihmisten leukosyytti-interferoni ja kaniini-interferoni ovat enemmän tai vähemmän stabiileja inaktivoitumista vastaan, muun tyyppisiä interferoneja inaktivoivat helposti monet olosuhteet, kuten pidempiaikainen säilytys, epäsuotuisat pH-arvot, koskeammat lämpötilat ja kemialliset ja mekaaniset käsittelyt, kuten ravistelu, toistuvat pakastus- ja sulatusjaksot, vaahdotus suodattamisen aikana ja vastaavat. Eräillä toisen tyyppisillä interferoneilla, kuten ihmisten vibrolasti-interferonilla on sellainen epästabiilisuus, että niiden aktiivisuustasot eivät ole luotettavia. Lisäksi jopa suhteellisesti kaikkein stabiilimmat interferonityypit näyttävät tulevan laabiileiksi heti, kun on saavutettu suuri puhtausaste. Näiden hankaluuksien korjaamiseksi on ehdotettu lisättäväksi ulkopuolisia proteiineja interferonin suojaamiseksi sen puhdistamisen aikana, mutta tällä proteiinin lisäämisellä on useita haittoja, koska useimman tyyppiset interferonit vastustavat suojaamista, ja tällä on puhdistamisen tavoitteen vastainen vaikutus. Siten jatkuvasti tarvitaan menetelmää, jolla interferoni stabiloidaan tehokkaasti, ja erityisesti menetelmää, jolla stabiloidaan kaiken tyyppiset interferonit, jotka ovat vähemmän stabiileja inaktivaation kannalta joko luonteensa tai pitkälle menneen puhdistamisen vuoksi.

2. Näin ollen tarvitaan menetelmä, jolla reaktivoidaan interferoni, joka on menettänyt koko aktiivisuutensa tai osan siitä luonteensa seurauksena tai jonkin edellä mainitun olosuhteen vaikutuksesta. Tarkemmin sanoen tarvitaan menetelmä, jolla voidaan reaktivoida kokonaan tällainen osittain tai kokonaan inaktivoitunut interferoni, so. palauttaa sen alkuperäinen aktiivisuus.

*opisto
gallien
lause
edellisen
jatkos!*

Vireillä olevassa patenttihakemuksessamme, joka on jätetty samana päivänä, on jo mainittu, että vesipitoinen interferoniliuos, jossa interferoni ei ole oleellisesti lainkaan menettänyt aktiivisuuttaan, voidaan stabiloida käsittelemällä komen reagenssin yhdistelmällä, so. (a) aineen, joka katkaisee ei-kovalenttiset sidokset, kuten urea tai guanidiini-hydrokloridi, (b) aineen, joka pelkistää disulfididisidokset, kuten merkaptoetanoli, ja (c) anionisen tai kationisen, pinta-aktiivisen aineen, kuten natriumdodesyyli-sulfaatti tai dodesyyliamiini. Kun interferonia käsitellään näillä kolmella aineella, se säilyttää oleellisesti alkuperäisen aktiivisuutensa eikä inaktivoidu edellä mainittujen olosuhteiden ja käsittelyiden vaikutuksesta.

Nyttemmin on aivan yllättäen havaittu, että interferoni, jonka aktiivisuus on jo pienentynyt tai joka on ehkäpä inaktivoitunut, voidaan reaktivoida osittain tai kokonaan käsittelemällä samojen kolmen reagenssin yhdistelmällä. Täydellinen reaktivointi on mahdollista varmasti, jos interferonia, sen jälkeen kun on lisätty mainitut kolme reagenssia, kuumennetaan $90 - 105^{\circ}\text{C}$:ssa joitakin minutteja, jolloin saadulla tuotteella on tässä tapauksessa oleellisesti sama tai jopa korkeampi aktiivisuus kuin alkuperäisellä, ei vielä inaktivoituneella interferonilla. Saatu aktiivisuus näyttää lisäksi pysyvän vakiona, jolloin näin saadaan tuote, joka kestää inaktivoivia olosuhteita ja käsittelyjä.

*korjaukset:
aktiiv.
näkyy
↓
loko
alkuperäinen*

Keksintö tuo esiin interferonin reaktivointimenetelmän, jolle on tunnusomaista, että käsitellään vesipitoista interferoniliuosta, jossa interferoni on menettänyt ainakin osan alkuperäisestä aktiivisuudestaan, (a) aineen, joka katkaisee ei-kovalenttiset sidokset, (b) aineen, joka pelkistää disulfididisillat ja (c) anionisen tai kationisen pinta-aktiivisen aineen yhdistelmällä. Sen jälkeen, kun interferoniliuokseen on lisätty mainitut kolme ainetta, on suositeltavaa suorittaa sille lämpökäsittely, esimerkiksi kuumentaminen $90 - 105^{\circ}\text{C}$:ssa 0,5 - 10 minuutin aikana, täydellisen reaktivoitumisen saavuttamiseksi.

*läh.
uusio
mat.*

Tämän havainnon ansiosta on mahdollista saada korkeammat saannot interferonin valmistuksessa ja puhdistuksessa ja lisäksi valmistaa stabiili interferonituote, joka sopii kliiniseen arviointiin.

Keksinnön avulla aikaansaatu reaktivoitumismekanismi ei ole vielä täysin selvä. Interferonimolekyylin oletetaan kuitenkin sisältävän polypeptidiketjun, jossa on kovalenttisia ja ei-kovalenttisia sidoksia ja lisäksi yksi tai useampia disulfididisiltoja, ja että syynä teologisesti aktiivisen interferonin ja sellaisen interferonin erolle, joka on inaktivoitunut edellä mainituissa olosuhteissa, voidaan pitää vain eroa molekyylin avaruusrakenteessa eli konformaatioissa. Siten on olemassa aktiivinen konformaatio ja inaktiivinen konformaatio. (Luonnollisesti voidaan kuvitella olosuhteita, joissa interferonimolekyyli on hajonnut jossakin määrin, mutta tällaisia olosuhteita ei tarkastella tässä yhteydessä). Kun inaktivoitunutta interferonia käsitellään näillä kolmella keksinnön mukaisella reagenssilla, ~~niin~~ ei-kovalenttisten sidosten katkeaminen ja disulfididisiltojen pelkistyminen ilmeisesti muuntaa molekyylin toiseen konformaatioon, jolla on "linear random coil" muoto ja jossa on vapaita sulfhydryyliryhmiä, jolloin anioninen tai kationinen pinta-aktiivinen aine sitoutuu polypeptidiketjun varautuneisiin ryhmiin ja suojaa vapautuneet sulfhydryyliryhmät uudelleenhapettumiselta, joka liittyy disulfididisiltojen intramolekulaariseen tai intermolekulaariseen uudelleenmuodostumiseen. Nämä reaktiot tapahtuvat jo suuremmalta osalta ympäröivässä lämpötilassa, mutta niitä voidaan nopeuttaa tai ne voidaan saattaa loppuun lämpökäsittelyn avulla, esimerkiksi kuumentamalla jonkin aikaa 90 - 105°C:ssa. Saadusta tuotteesta voidaan poistaa ylimääräinen pinta-aktiivinen aine ja katkaisevat ja pelkistävät aineet haluttaessa dialyysin avulla. Kun tuotetta inkuboidaan myöhemmin yhdessä proteiineja sisältävän mediumin, kuten mediumin, joka sisältää eläviä soluja, kanssa, tuote muodostaa spontaanisesti aktiivisen konformaation, jolla on oleellisesti vastaava interferonin alkuperäinen aktiivisuus tai eräissä tapauksissa jopa korkeampi aktiivisuus. Koko tapahtuma voidaan kuvata inaktivoituneen interferonin reaktivoitumisena.

~~Luonnollisesti on ilmeistä, ettei tämä teoreettinen selitys rajoita keksintöä. Sen sijaan keksintö käsittää kaikki tunnusmerkit ja aineet,~~ jotka kuuluvat ~~mukaanliitettyjen vaatimusten~~ ^{ei} piiriin.

2 Keksittyä menetelmää toteutettaessa lähtöaine voi olla minkä tahansa tyyppinen interferoni, joka on menettänyt ainakin osan alkuperäisestä aktiivisuudestaan. Hyödyllinen lähtöaine voi olla interferoni, joka on menettänyt osan aktiivisuudestaan tai koko aktiivisuutensa inaktivoivien olosuhteiden ja käsittelyiden vaikutuksesta, sekä interferoni, joka on otettu talteen labiilissa tai inaktivoituneessa tilassa valmistuksensa tai puhdistamisensa aikana. Seuraavista esimerkeistä on ilmeistä, että lähtöaineena voidaan käyttää hiili-interferonia (erityyppisiä) sekä ihmisen fibroblasti-interferonia enemmän tai vähemmän inaktivoituneessa tilassa; sopivia ovat myös monen muun tyyppiset interferonit (lukuunottamatta sen tyyppisiä, jotka ovat stabiileja per se). Tässä tapauksessa tämä interferoni on saatavissa vesiliuoksena, joka sisältää interferonia sellaisen määrän, että se vastaa alkuperäistä aktiivisuutta välillä $10^3 - 10^8$ interferoniyksikköä per milligramma proteiinia (tai välillä noin $10^1 - 10^6$ interferoniyksikköä per millilitra liuosta), ja tätä liuosta voidaan käyttää sellaisenaan keksinnön mukaiseen menetelmään.

lts. uusia aat.
Keksinnön mukaisesti tätä kokonaan tai osittain inaktivoitunutta interferonia käsitellään kolmen reagenssin, so. aineen, joka katkaisee ei-kovalenttiset sidokset, aineen, joka pelkistää disulfidisillat, ja anionisen tai kationisen pinta-aktiivisen aineen yhdistelmällä.

Keksityssä menetelmässä voidaan käyttää mitä tahansa sopivaa ainetta, joka katkaisee ei-kovalenttiset sidokset. Tyypillisiä esimerkkejä ovat urea ja guanidiini-hydrokloridi, joista ureaa pidetään parempana.

Keksityssä menetelmässä käytetyn tällaisen aineen määrän tulisi olla niin suuri, että se riittää aiheuttamana interferonimolekyylin polypeptidiketjun avautumisen niin, että tuloksena on "linear random coil". Yleensä käytetty uramäärä on sellainen, että saatu liuos sisältää 0,1-10 M ureaa, ja urea-konsentraatio on parhaiten 5 M. Konsentraatiolla alle 0,1 M ei ole vaikutusta, ja konsentraatiot yli 10 M ovat hyödyttömiä, koska tällöin on saavutettu kyllästymispiste.

V
Keksinnön mukaisessa menetelmässä voidaan käyttää mitä tahansa sopivaa ainetta, joka pelkistää disulfidisillat. Tyypillinen esimerkki on etaanitioli tai merkaptetaanoli. Käytetyn määrän tulisi olla sellainen, että se riittää pelkistämään kaikki interferonimolekyyliissä olevat disulfidisillat. Useimmissa tapauksissa merkaptetaanolin määrä

on sellainen, että saatu liuos sisältää merkaptoetanolia vähintään $10^{-2}M$. Määrillä alle $10^{-2}M$ on vain vähän tai ei lainkaan vaikutusta. Ylärajaa on vaikea antaa, koska korkeammat määrät eivät ole haitallisia. Liuoksessa on suositeltavaa käyttää merkaptoetanolin konsentraatioina noin $1,4 \times 10^{-2}M - 1,4 \times 10^{-1}M$.

Keksinnön mukaisessa menetelmässä voidaan käyttää mitä tahansa sopivaa anionista tai kationista pinta-aktiivista ainetta. Anioninen aine on useimmiten alkyyli-sulfaatti, jonka alkyyli-ryhmässä on 8 - 22 hiiliatomia, kuten natriumdodesyyli-sulfaatti tai natriumdesyyli-sulfaatti, tai muu vastaava alkyyli-sulfonaatti, kuten natriumdodesyyli-sulfonaatti. Kationinen aine on yleensä alkyyliamiini, jonka alkyyli-ryhmässä on 8 - 22 hiiliatomia, kuten dodesyyliamiini tai desyyliamiini. Tämän aineen käytetyn määrän tulisi olla sellainen, että se riittää sitomaan proteiinin ja suojaamaan interferonimolekyylin sulfhydryyliryhmät, jotka edellä mainittu pelkistävä aine on vapauttanut. Halutun vaikutuksen varmistamiseksi useimmissa tapauksissa käytetään 1 - 5-kertainen ylimäärä pinta-aktiivista ainetta lasketun liuoksessa olevan proteiinin kokonaismäärästä. Jos lähtöaine on interferoniliuos, joka sisältää noin 10^4 interferoniyksikkö per ml, tämä tarkoittaa sitä, että liuoksen tulisi sisältää pinta-aktiivista ainetta vähintään $1 \times 10^{-3}M$ ja korkeintaan $1 \times 10^{-1}M$. Tässä tapauksessa on suositeltavaa käyttää natriumdodesyyli-sulfaattia $3,5 \times 10^{-3}M - 3,5 \times 10^{-2}M$.

Näiden kolmen reagenssin lisäysjärjestys ei ole kriittinen, vaikkakin on suositeltavaa lisätä pinta-aktiivinen aine samanaikaisesti kahden muun aineen kanssa tai ennen niitä, jotta varmistuttaisiin siitä, että tämä pinta-aktiivinen aine pystyy reagoimaan polypeptidin kanssa ja suojaamaan sulfhydryyliryhmät heti, kun pelkistävä aine on vapauttanut ne. Suositeltavaa on lisätä kaikki nämä kolme ainetta oleellisesti samalla hetkellä tai hieman toistensa jälkeen.

Vaikkakin nämä kolme reagenssia yleensä reagoivat jo ympäröivässä lämpötilassa inaktivoituneen interferonin kanssa, reaktio ei aina pääse loppuun asti. Siten jos lähtöaine on vesipitoinen interferoniliuos, joka on inaktivoitu täysin kiehattamalla, käsittely kolmella reagenssilla ympäröivässä lämpötilassa johtaa vain sellaiseen reaktivoitumiseen, että aktiivisuus on noin 50 % alkuperäisestä interferonin aktiivisuudesta. Tällaisissa tapauksissa on suositeltavaa lämpökäsitellä interferoniliuos näiden kolmen reagenssin lisäämisen jälkeen. Tämä

lämpökäsittely voi olla esimerkiksi kuumentaminen lämpötilassa $90 - 105^{\circ}\text{C}$ 0,5 - 10 minuutin aikana, ja parhaiten liuoksen kuumennettaminen 100°C :ssa 1 minuutin ajan. Tällainen lämpökäsittely voi johtaa kaikissa tapauksissa interferonin täydelliseen reaktivoitumiseen.

Sen jälkeen, kun reaktio on suoritettu näiden kolmen reagenssin kanssa, ylimääräinen pinta-aktiivinen aine ja molemmat toiset reagenssit kokonaisuudessaan voidaan poistaa haluttaessa dialysoimalla. Tämä poistaminen ei ole kuitenkaan ehdottoman välttämätöntä tuotteen jatkokäytön kannalta.

Keksinnön mukaisen menetelmän ansiosta inaktivoitunut interferoni voidaan reaktivoida oleellisesti tai kokonaan ja lisäksi tuote stabiloituu myöhempiä inaktivoivia olosuhteita ja käsittelyjä vastaan. Näyttää siltä, että inaktivoitunut ihmisten vibrolasti-interferoni sekä inaktivoitunut hiiri-interferoni saa takaisin alkuperäisen aktiivisuutensa käsiteltäessä urealla, merkaptoetanolilla ja natriumdodesyyilisulfaattilla ja suoritettaessa sen jälkeen lämpökäsittely. Lisäksi saatu tuote näyttää olevan stabiili myöhemmää, 56 tai 100°C :sa tapahtuvaa kuumentamista vastaan.

On huomattava, että samaa vaikutusta ei voida saada aikaan vain yhdellä tai kahdella edellä mainitulla kolmella reagenssilla. Siten urea ja merkaptoetanolii, kun niitä käytetään yksin tai yhdessä, eivät omaa mitään reaktivoivaa vaikutusta, vaan pikemminkin ne vaikuttavat interferoniin distabiilisuutta lisäävästi huolimatta siitä, että interferonin flokkuloituneet osat liukenevat tällä tavoin uudelleen. Natriumdodesyyilisulfaatti tai natriumdodesyyilisulfaatin ja urean yhdistelmä voi johtaa osittaiseen reaktivoitumiseen, mutta tämä reaktivoituminen pysyy hyvin pienenä. Kun lähdetään täysin inaktivoituneesta ihmisen vibrolasti-interferonista tai hiiri-interferonista ja käytetään näitä kumpaakin reagenssia, alkuperäisestä aktiivisuudesta ei voida ottaa talteen enempää kuin noin 5 % huoneen lämpötilassa eikä enempää kuin 10 % alkuperäisestä aktiivisuudesta kiehutettaessa 1 minuutti 100°C :ssa. Tämä tarkoittaa sitä, että täydellisen reaktivoitumisen saavuttamiseksi on aina välttämätöntä käyttää näiden kolmen reagenssin yhdistelmää tai ei-yhdessä lämpökäsittelyn kanssa.

Tässä selityksessä esitetty interferonin reaktivointimenetelmä tarjoaa mahdollisuuden ottaa talteen kaiken tyyppiset interferonit,

jotka ovat menettäneet osan aktiivisuudestaan puhdistamisen aikana, ja lisäksi mahdollisuuden ottaa talteen kaikki interferoniseokset, joiden aktiivisuus on pienentynyt pitkään kestäneen säilytyksen aikana. Siten voidaan paremmin käyttää hyödyksi mikä tahansa interferoni, joka on jo valmistettu aikaisemmassa vaiheessa. Se seikka, että tämä reaktivoitu interferoni ei enää inaktivoidu, tekee mahdolliseksi käyttää tätä interferonia monin eri tavoin ja soveltaa sitä kliinisesti. Kliinisessä reaktivoitussa muodossa voidaan siten antaa suhteellisen puhdasta reaktivoitua interferonia, jonka aktiivisuus on noin 10^3 - 10^8 interferoniyksikkö per mg proteiinia. Proteiinit sitovat yleensä vain 1,44 g natriumdodesyyilisulfaattia per g proteiinia, ja tämä tarkoittaa sitä, että annos, joka sisältää miljoonia interferoniyksiköitä, sisältää vain muutaman mikrogramman natriumdodesyyilisulfaattia. Kliinisen antamisen aikana ei siten ole olemassa mitään komplikaatoriskejä.

Seuraavat esimerkit on annettu vain keksinnön havainnollistamiseksi ~~sitä millään tavoin rajoittamatta.~~

Esimerkki 1

Lähtöaine oli hiiri-interferonin liuos, joka oli peräisin Newcastle-taudin viruksella stimuloidusta L₉₂₉-tyyppisistä soluista. (NDV). Tämä liuos tehtiin happameksi pH-arvoon 2, minkä jälkeen "extraneous"-proteiinit saostettiin lisäämällä ammoniumsulfaattia, kunnes saavutettiin kyllästymisaste 20 % lämpötilassa 20°C. Selkeytetty liuos säädettiin pH-arvoon 7,2 dialysoimalla 0,01 M TRIS-CH1 puskuria vasten. Saadun puhdistetun liuoksen aktiivisuus oli 10^4 interferoniyksikköä per ml (biologinen määrittäminen).

Tämän puhdistetun interferoniliuoksen 1 ml suuruinen tasaosa asetettiin koeputkeen, joka oli upotettu kiehuvalle vedelle täytettyyn dekantterilasiin. Kuumennettiin 2 1/2 minuuttia 100°C:ssa, jolloin interferoni oli oleellisesti kokonaan inaktivoitunut, koska sen aktiivisuus oli pienentynyt alle 10^1 interferoniyksikön per ml.

Joukko muita puhdistetun interferoniliuoksen 1 ml suuruisia tasaosia kuumennettiin 100°C:ssa edellä mainitulla tavalla 2 1/2 minuutin aikana. Inaktivoituneiden liuosten jäädyttämisen jälkeen niihin lisättiin yksi tai useampia reagensseja ryhmästä, johon kuuluvat kiinteä urea, nestemäinen merkaptoetanoli ja natriumdodesyyilisulfaa-

tin (SDS) vesiliuos, sellaisia määriä, että näiden reagenssien, mikäli niitä oli mukana, loppukonsentraatiot olivat 5 M ureaa, $1,4 \times 10^{-2}$ M merkapto-etanolia ja $3,5 \times 10^{-3}$ M natriumdodesyyilisulfaattia. Eräissä tapauksissa lisättiin myös vettä, jotta kaikissa kokeissa laimennuskertoimet saataisiin samoiksi. Kaikilla reagensseilla tai reagenssien yhdistelmillä reaktio suoritettiin kerran huoneen lämpötilassa ja kerran korotetussa lämpötilassa. Tätä jälkimmäistä tarkoitusta varten liuosta kuumennettiin 100°C :ssa 1 minuutti reagenssien lisäämisen jälkeen. Sen jälkeen saatujen seosten aktiivisuudet arvioitiin biologisella määrityksellä. Tulokset on annettu seuraavassa taulukossa 1.

Tässä yhteydessä käytettynä nimitys "tiitteri" tarkoittaa aktiivisuuden desimaalilogaritmia (interferoniyksiköissä per ml). Kaikki tiitteriarvot ovat kolmen erillisen kokeen keskiarvoja.

Taulukko 1

Inaktivointi	Reaktivoimiseen käytetyt reagenssit	Tiitteri
Ei	Ei	4,0
100°C- 2 /12 min.	Ei	<1,0
"	Urea	<1,0
"	Urea + 100°C-1 min.	<1,0
"	Merkaptoetanoli	<1,0
"	Merkaptoetanoli+100°C-1 min.	<1,0
"	Urea+merkaptoetanoli	<1,0
"	Urea+merkaptoetanoli	
"	+100°C-1 min.	<1,0
"	SDS	2,7
"	SDS + 100°C-1 min.	3,0
"	SDS + urea	2,0
"	SDS + urea + 100°C-1 min.	2,5
"	SDS + merkaptoetanoli	3,7
"	SDS + merkaptoetanoli	3,9
	+ 100°C-1 min.	
"	SDS + urea + merkaptoetanoli	3,7
"	SDS + urea + merkaptoetanoli	
	+ 100°C-1 min.	4,0

Taulukosta 1 havaitaan, että inaktivoitunut interferoni voidaan reaktivoida oleellisesti tai täydellisesti käsittelemällä kolmen reagenssin yhdistelmällä keksinnön mukaisesti. Inaktivoidun interferonin käsittely pelkästään natriumdodesyyilisulfaattilla tai natriumdodesyyilisulfaatin ja yhden toisen reagenssin yhdistelmällä johtaa aktiivisuuden tietynasteiseen palautumiseen, mutta tämä reaktivoituminen ei ole täydellinen edes kuumennettaessa 1 minuutti 100°C:ssa. Käsittely urealla tai merkaptoetanolilla joko pelkästään tai yhdistelmänä ei saa aikaan mitään reaktivoitumista.

Esimerkki 2

Joukko interferoniliuoksia, jotka oli saatu eri lähteistä ja joilla oli erilaiset aktiivisuudet, inaktivoitiin ensin ja reaktivoitiin sen jälkeen keksinnön mukaisesti.

Tähän esimerkkiin käytetyt liuokset olivat:

1) Hiiri-interferoniliuos, joka oli valmistettu L-soluissa, jotka oli inokuloitu UV-valolla säteilytetyllä Newcastle Disease viruksella (NDV-UV). Tämä interferoni sisälsi 0,5 % seerumialbumiinia, ja sen aktiivisuus oli alussa 10^8 interferoniyksikköä per mg proteiinia eli 10^6 interferoniyksikköä per ml.

2) Hiiri-interferoniliuos, joka oli valmistettu L₉₂₉-soluissa, jotka oli inokuloitu Newcastle Disease viruksella (NDV). Käytettiin kolmea eri tyyppiä, joiden aktiivisuudet olivat vastaavasti 10^4 , 10^6 ja yli 10^7 interferoniyksikköä per mg proteiinia. Tämä vastaa jokaisessa tapauksessa 10^4 interferoniyksikköä per ml.

3) Hiiri-interferoniliuos, joka oli valmistettu interferoni-primed Lpa soluissa, jotka oli inokuloitu encefalomyocarditis-viruksen MM-kannalla. Käytettiin kahta tyyppiä, joiden aktiivisuudet olivat vastaavasti 10^4 ja 5×10^6 interferoniyksikköä per mg proteiinia. Tämä vastaa kummassakin tapauksessa 10^4 interferoniyksikköä per ml.

4) Ihmisten diploidinen fibroblasti-interferoniliuos, joka oli valmistettu ihmisten diploidisissa fibroblastisoluiissa ja indusoitu polyribonosiinihapolla ja polysytidylihapolla (Poly I, Poly C) ja sen jälkeen "superindusoitu" Havell'in ja Vilcek'in menetelmällä (Antimicrobial Agents Chemother., 2, 476-484 (1972). Käytettiin kolmea tyyppiä, joiden aktiivisuudet olivat vastaavasti 10^4 , noin 10^3 ja noin 10^2 interferoniyksikköä per ml.

Interferoniaktiivisuuden arvioimiseksi käytetyt biologiset määritykset suoritettiin määrittämällä loppupiste, jossa plakkien määrä pieneni 50 %. Tämä suoritettiin hiiri-interferonille vesicular stomatitis viruksella L₉₂₉-soluissa ja ihmis-interferonille samalla viruksella L₁₃₂-fibroblastisoluiissa.

Inaktivoiti suoritettiin eri tavoin, esimerkiksi kiehattamalla 100°C:ssa 2 1/2 minuuttia, kuumentamalla 30 minuuttia 56°C:ssa, pakastamalla ja sulattamalla 100 kertaa tai lisäämällä ureaa ja merkapttoetanolia sellaiset määrät, että niiden loppukonsentraatiot olivat vastaavast 5 M ureaa ja $1,4 \times 10^{-2}$ M merkapttoetanolia. Nämä inaktivointitapahtumat on lueteltu taulukossa 2. Paras inaktivoimistapa näytti olevan kuumentaminen 100°C:ssa. Inaktivoitumisnopeus ja

aste eivät riippuneet "extraneous"-proteiinien kokonaismäärästä.

Inaktivoimisen jälkeen interferoniliuokset reaktivoitiin keksinnön mukaisesti. Tähän käsittelyyn kuului kiinteään urean, nestemäisen merkaptotoetanolin ja natriumdodesyyilisulfaatin vesiliuoksen lisääminen sellaisissa määrissä, että niiden loppukonsentraatiot olivat vastavasti 5 M ureaa, $1,4 \times 10^{-2}$ M merkaptotoetanolia ja $3,5 \times 10^{-3}$ M natriumdodesyyilisulfaattia; tämän jälkeen kuumennettiin koko seosta 1 minuutti 100°C :ssa.

Lähtöainetta, alkuperäistä tiitteriä, inaktivoimistapaa, inaktivoimisen jälkeistä tiitteriä ja reaktivoimisen jälkeistä tiitteriä koskevat muut yksityiskohdat on esitetty seuraavassa taulukossa 2. Nimitys "tiitteri" tarkoittaa interferoniyksiköinä per ml olevan aktiivisuuden desimaalilogaritmia.

Nimitys "ominaisaktiivisuus" tarkoittaa aktiivisuutta per mg proteiinia.

Interferoni	Alkup. tiit- teri	Inaktivoimis- tapantuma	Tiitteri inaktivoi- misen jäl- keen	Tiitteri reaktivoi- misen jäl- keen
Hiiri-L NDV-UV, sisältää 0,5 % seerumialbumiinia	4,0	100°C-2 1/2 min.	<1,0	4,0
Hiiri-L- ₉₂₉ NDV om.akt. 10 ⁴	4,0	100°C-2 1/2 min.	<1,0	4,5
Interferoni-primed hiiri-L-paMM om.akt. 10 ⁴	4,7	100°C-2 1/2 min.	<1,0	5,3
Interferoni-primed hiiri-Lpa-MM om.akt. 5 x 10 ⁶	4,3	100°C-2 1/2 min.	<1,0	4,8
Hiiri-L ₉₂₉ -NDV om.akt. >10 ⁷	3,7	100°C-2 1/2 min.	<1,0	3,8
Hiiri-L ₉₂₉ -NDV om.akt. 10 ⁶	4,0	100°C-2 1/2 min.	<1,0	4,0
"	4,0	56°C-30 min.	3,2	4,0
"	4,0	Pakastus-sulatusjaksot (100 x)	2,9	4,0
"	4,0	5M urea + 1,4x10 ⁻² M Merkaptoetanoli	3,0	4,0
Ihmisen diploidinen poly I	4,0	100°C- 2 1/2 min.	<1,0	4,0
poly C superindusoitu				
"	2,3	100°C-2 1/2 min.	<1,0	3,0
"	3,3	100°C- 2 1/2 min.	<1,0	3,3

Taulukosta 2 havaitaan, että täydellinen reaktivoituminen voidaan saada aikaan useilla erilaisilla lähtöaineilla.

Patenttivaatimukset

1. Interferonin reaktivointimenetelmä, t u n n e t t u siitä, että käsitellään vesipitoista interferoniliuosta, jossa interferoni on menettänyt ainakin osan alkuperäisestä aktiivisuudestaan, (a) aineen, joka katkaisee ei-kovalenttiset sidokset, (b) aineen, joka pelkistää disulfidisillat, ja (c) anionisen tai kationisen pinta-aktiivisen aineen yhdistelmällä.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että interferoniliuos sisältää noin 10^3 - noin 10^8 interferoniyksikköä per mg proteiinia tai noin 10^1 - noin 10^6 interferoniyksikköä per ml.
3. Jonkin patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että aine, joka katkaisee ei-kovalenttiset sidokset, on urea.
4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että ureaa käytetään sellainen määrä, että saatu liuos sisältää ureaa 0,1 - 10 M ja parhaiten 5 M.
5. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että aine, joka pelkistää disulfidisillat, on merkapto-etanoli.
6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että merkaptoetanolia käytetään sellainen määrä, että saatu liuos sisältää merkaptoetanolia vähintään 10^{-2} M ja parhaiten $1,4 \times 10^{-2}$ M - $1,4 \times 10^{-1}$ M.
7. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että anioninen tai kationinen pinta-aktiivinen aine on vastaavasti natriumdode^ssyylisulfaatti tai dode^ssyyliamiini.
8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että pinta-aktiivista ainetta käytetään 1 - 5-kertainen ylimäärä laskettuna liuoksessa olevan proteiinin kokonaismäärästä.
9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että, kun interferonipitoisuus liuoksessa on noin 10^4 interferoniyk-

Pää-
ruok.
/ sikköä per ml, pinta-aktiivista ainetta lisätään sellainen määrä, että liuos sisältää pinta-aktiivista ainetta 1×10^{-3} - 1×10^{-1} M.

10. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 9 mukainen menetelmä, t u n -
n e t t u siitä, että mainitun kolmen aineen lisäämisen jälkeen saatua interferoniliuosta lämpökäsitellään.

11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu lämpökäsittely käsittää liuoksen kuumentamisen $90 - 105^{\circ}\text{C}$:ssa 0,5 - 10 minuutin aikana.

12. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 11 mukainen menetelmä, t u n -
n e t t u siitä, että edellä mainitulla kolmella reagenssilla tapahtuneen käsittelyn jälkeen ylimääräinen pinta-aktiivinen aine ja molemmat muut aineet kokonaisuudessaan poistetaan dialysoimalla.

13. Reaktivoitu interferonituote, t u n n e t t u siitä, että se on vesipitoinen interferoniliuos, jonka aktiivisuus on palautettu käsittelemällä (a) aineen, joka katkaisee ei-kovalenttiset sidokset, (b) aineen, joka pelkistää disulfidisillat, ja (c) anionisen tai kationisen pinta-aktiivisen aineen yhdistelmällä.

PMS
OK
Sird.
Sämann

Patentkrav

1. Reaktiveringsförfarande för interferon, k ä n n e t e c k n a t därav, att en vattenhaltig interferonlösning där interferonen förlorat åtminstone en del av sin originala aktivitet, behandlas med en kombination av (a) ett ämne, som avbryter icke-kovalentiska bindningar, (b) ett ämne, som reducerar disulfidbryggorna, och (c) ett anjoniskt eller katjoniskt ytaktivt ämne.
2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att interferonlösningen innehåller c:a 10^3 - c:a 10^8 interferonenheter per mg protein eller c:a 10^1 - c:a 10^6 interferonenheter per ml.
3. Förfarande enligt patentkravet 1 eller 2, k ä n n e t e c k n a t därav, att ämnet, som avbryter de icke-kovalentiska bindingarna, är urea.
4. Förfarande enligt patentkravet 3, k ä n n e t e c k n a t därav, att urea användes i en sådan mängd, att den erhållna lösningen innehåller 0,1-10 M urea, helst 5 M.
5. Förfarande enligt ett av patentkraven 1-4, k ä n n e t e c k n a t därav, att ämnet, som reducerar disulfidbryggorna, är merkaptoetanol.
6. Förfarande enligt patentkravet 5, k ä n n e t e c k n a t därav, att merkaptoetanol användes i en sådan mängd, att den erhållna lösningen innehåller merkaptoetanol åtminstone 10^{-2} M och helst $1,4 \times 10^{-2}$ M - $1,4 \times 10^{-1}$ M.
7. Förfarande enligt ett av patentkraven 1-6, k ä n n e t e c k n a t därav, att det anjoniska eller katjoniska ytaktiva ämnet är respektive natriumdodecylsulfat eller dodecylamin.
8. Förfarande enligt patentkravet 7, k ä n n e t e c k n a t därav, att ytaktivt ämne användes i 1-5-faltidgt överskott räknat på totalmängden av i lösningen befintlig protein.
9. Förfarande enligt patentkravet 8, k ä n n e t e c k n a t därav,

att då lösningens interferonhalt är c:a 10^4 interferonenheter per ml, tillsättes ytaktivt ämne en sådan mängd, att lösningen innehåller ytaktivt ämne 1×10^{-3} - 1×10^{-1} M.

10. Förfarande enligt patentkraven 1-9, k ä n n e t e c k n a t därav, att efter tillsatsen av de tre ovannämnda ämnena värmebehandlas den erhållna interferonlösningen.

11. Förfarande enligt patentkravet 10, k ä n n e t e c k n a t därav, att den nämnda värmebehandlingen omfattar lösningens upphettning i $90-105^{\circ}\text{C}$ under 0,5-10 minuter.

12. Förfarande enligt ett av patentkraven 1-11, k ä n n e t e c k n a t därav, att efter behandlingen med de tre ovannämnda reagenserna avlägsnas överskottet av det ytaktiva ämnet samt de båda övriga ämnena totalt genom dialys.

13. Reaktiverad interferonprodukt, k ä n n e t e c k n a d därav, att den är en vattenhaltig interferonlösning, vars aktivitet återställs genom behandling med en kombination av (a) ett ämne, som avbryter de icke-kovalentiska bindningarna, (b) ett ämne, som reducerar disulfidbryggorna, och (c) ett anjoniskt eller katjoniskt ytaktivt ämne.



Missing part

Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patentansökningar:

75-0014

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

Suomi - Finland P 46073 (Cot G 7/02)

Iso-Britannia - Storbritannien _____

Norja - Norge _____

Ranska - Frankrike _____

Ruotsi - Sverige _____

Saksa - BRD - Tyskland _____

Sveitsi - Schweiz _____

Tanska - Danmark _____

USA _____

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

- Proc. Natl. Acad. Sci. 67 (1970) 2, 620-628

- J. Hyg. Camb. 68 (1970) 77

- Kabat Mayer's Experimental Immunology 1967, 350-357

- Pharmazie 1972, 367-368

Merkittä hakemusjulkaisun (esim. saksal. Offenlegungsschrift) numeron eteen H ja vastaavasti kuulutus- ja patenttijulkaisun numeron eteen K ja P.

77-09-14 Helly Lommi

Allekirjoitus