

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 790483 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application 790483

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification (IPC¹)
A61K 0/

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date 14.02.1979

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 14.02.1979

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 17.08.1979

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 12.06.2019

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

16.02.1978 CH 171978

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • SCIENCE UNION ET CIE S FRANCAISE DE RECH, TOWN UNKNOWN, RANSKA, (FR)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • LAVOINE NICOLE SIMON, TOWN UNKNOWN, RANSKA, (FR)

2 • FORGEOT MARCEL, TOWN UNKNOWN, RANSKA, (FR)

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

Förfarande för framställning av ett enzym av bakteriellt ursprung och farmaceutiska kompositioner innehållande detsamma

10. v. 20. 1947.  Menetelmä bakteeriperäisen entsyymin valmistamiseksi sekä tätä sisältävät farmaseuttiset koostumukset - Förfarande för framställning av ett enzym av bakteriellt ursprung och farmaceutiska kompositioner innehållande detsamma

Tämä keksintö koskee uusia farmaseuttisia koostumuksia, jotka sisältävät aktiivisena aineena mikrobiperäisen entsyymin tai entsyymiseoksen.

Tarkemmin tämän keksinnön kohteena ovat uudet farmaseuttiset koostumukset, jotka on tarkoitettu virus-sairauksien hoitoon ja joiden aktiivisena aineena on glykosidohydrolaasi, joka on saatu mikrobikantaisista viljelmistä.

Erikoisesti tämä keksintö koskee farmaseuttisia koostumuksia, joissa aktiivisena aineena on N-asetyylimuraminaattiglykohydrolaasi, joka on tuotettu Streptococcus pneumoniae-viljelmistä (microsoccaceae-suku).

N-asetyylimuraminaattiglykohydrolaasi on entsyymi, joka kykenee lohkaisemaan N-asetyylimuramiinihapon glykoproteiineista, kun se si-
joitetaan polysakkaridiketjun ei-pelkistävään loppupäähän.

Monet N-asetyylimuraminaattiglykohydrolaasit ovat jo tunnettuja. Ne ovat joko virus- tai mikrobiperäisiä. N-asetyylimuraminaattigly-

kohydrolaasit *Vibrio cholerae*'sta *Clostridium perfringens*'sta, *Vibrio comma*'sta *Arthrobacter sialophilum*'sta on jo esitetty kirjallisuudessa. Lisäksi N-asetyyylimuraminaattiglykohydrolaaseja on saatu kemiallisesti käsittelemällä *Myxovirus influenzae*'n eri kantoja.

Jokaisella näistä glykohydrolaaseista on erilainen kemiallinen rakenne johtuen glykoproteiiniketjujen erilaisista yhdistelyistä. Siitä käy ilmi, että niillä on erilaiset fysikaaliset ja kemialliset ominaisuudet.

N-asetyyylimuraminaattiglykohydrolaasi jota tässä käytetään farmaseuttisten koostumusten muodossa, on saatu *Streptococcus pneumoniae*'n erilaisesta kannasta, jota on talletettu Pasteur-instituutissa Pariisissa numerolla I-044 16. helmikuuta 1978 lähtien. Sillä on fysikaalisia ominaisuuksia, jotka ovat aivan erilaisia kuin jo tunnettujen N-asetyyylimuraminaattiglykohydrolaasien ominaisuudet. Tällä entsyymillä tai entsyymiseoksella ei ole mitään galaktosidaasisia, proteaasisia, N-asetyyli-glukosaminidaasisia, fukosidaasisia ja aryyli-sulfataasisia ominaisuuksia ^{aktiivisuutta} päinvastoin kuin kirjallisuuden entsyymeillä.

Lisäksi Michaelis'in vakio, joka on määritetty bronkiaaliset glykopeptidit ^{aktiivisuutta} substraktina, on noin $K_m = 2,3 \cdot 10^{-4}$, joka on hyvin korkea luku todistaen vahvaa affiniteettia glykopeptideihin.

Isoelektrinen piste määritettynä isoelektrofokaalisaatiolla, osoittaa kaksi aktiivista piikkiä entsyymissä, paljastaen kahden isoentsyymin olemassaolon, joilla on isoelektriset pisteet 4,2 ja 3,7. Nämä kaksi isoentsyymiä tekevät *Streptococcus pneumoniae*-kannan I.044 entsyymien selvästi erilaiseksi *Clostridium perfringens*-entsyymistä, joka on homogeeninen elektrofokalisaatioltaan ja jonka isoelektrinen piste on 4,7.

Streptococcus pneumoniae'n entsyymi tai entsyymien seos dissoisoi N-asetyylineuramiinihapon happamasta ihmis 1-glykoproteiinista määrässä 82% 7 tunnissa ja vapauttaa suunnilleen kvantitatiivisesti (yli 90%) N-asetyylineuramiinihapon keuhkoputken silomusiinista 6 tunnin kosketuksen kuluttua.

Streptococcus pneumoniae'n kanta I-044 N-asetyyylimuraminaattiglykohydrolaasin kemiallisen rakenteen ovat jo määrittäneet P. Bienvenu et al, C.R. Acad. Sci. (Pariisi) 285 (osa D) 837 (1977). Sen eri aminohappojen pitoisuus osoittaa selvästi sen erikoislaatuisuuden verrattuna entsyymiin, joka on saatu *Myxovirus influenzae* A:n (Hong Kong) 1/68 entsyymaattisella hydrolyysillä.

Siksi tämän keksinnön kohteena ovat farmaseuttiset koostumukset, joiden aktiivisena osana on entsyymi tai entsyymien seos, joka on tuotettu *Streptococcus pneumoniae*'n (kanta I-044) viljelyllä seoksella tai yhteydessä jonkin inertin ei-toksisen terapeuttisesti sopivan kantajan tai väliaineen kanssa.

Tämän keksinnön mukaiset farmaseuttiset koostumukset ovat sopivia parenteraalisesti, ihon kautta, limakalvon kautta, kielen tai peräsuolen kautta annettavaksi. Sopivammin ovat ruiskutettavat liuokset jaettu ampulleihin, moniannospulloihin, itseinjektoiviin ruiskuihin, kielenalustabletit, puristetut koostumukset, jotka ovat valmiita suihkutettavaksi nenän tai nielun limakalvoihin, liuokset pollaarisessa liuottimessa soveltuen ihon kautta käytettäväksi; kielenalustabletit ja peräpuikot.

Nämä farmaseuttiset koostumukset voivat sisältää yhden tai useampia kantaja-aineita, täyteaineita, laimentimia, dispergointiaineita, pinta-aktiivisia aineita, emulgointiaineita, aromiaineita tai aineita jotka vapauttavat aktiivisen osa-aineen hitaasti kehoon. Riippuen valitusta käyttötavasta voi aktiivisen osa-aineen pitoisuus suuresti vaihdella. Se liikkuu 300 U - 5000 U annosyksikköä kohti, farmaseuttisissa koostumuksissa jotka on tarkoitettu ihmisen hoitoon. Lapsille keksinnön mukaisen farmaseuttisen koostumuksen aktiivisen osan pitoisuus alenee riippuen potilaan iästä ja painosta.

Keksinnön mukaisia farmaseuttisia koostumuksia annetaan 1-4 kertaa päivässä ihmiselle.

Tarkemmin, käytettäessä limakalvon kautta nenässä tai suussa, voi olla sopivaa käyttää keksinnön mukaisia farmaseuttisia koostumuksia paineenalaisen sprayn muodossa, jossa on vesi kantoaineena, kolme kertaa päivässä kahden päivän ajan.

Käytettäessä parenteraalisesti farmaseuttiset koostumukset injektoidaan joka päivä viikon ajan, sitten kerran viikossa vielä kahden kuukauden ajan.

Keksinnönmukaisia farmaseuttisia koostumuksia on tarkoitus käyttää sellaisten virussairauksien hoitoon, joissa aiheuttajana on kotelon muodostava virus sekä mikrobi-infektioiden hoitoon jotka usein liittyvät virusinfektioihin.

Erikoisesti ne vaikuttavat Myxovirus influenzae-, Rhinovirus- sekä muihin viruslajeihin, joilla on neuraminidaasi. Tämän vaikutuksen voidaan osoittaa johtuvan joko suorasta toiminnasta glykoproteiinisen rakenteen viruskuoreen alentaen virusten toisiintumisessa soluvaurioiden määrää, tai erikoisesti immunostimuloivasta vaikutuk-

sesta lajeihin joiden patogeeninen teho välittyy neuraminidaasilla jolla on antigeenisia ominaisuuksia, jotka ovat lähellä *Streptococcus pneumoniae*'n N-asetyylineuraminidaattiglykohydrolaasin ominaisuuksia esimerkiksi *Erysipelothrix*.

Edelleen niillä on ei-spesifinen immunostimuloiva vaikutus joka sallii niiden käytön apuaineena rhinitiksen, rhinopharyngitiiksen, sinusitiiksen, anginan, amygdalytiiksen, laryngitiiksen, tracheitiiksen, akuutin bronchitin, broncholiittien, bronchopneumoniaksen ja kroonisten hengityssairauksien hoidossa.

Edelleen sairauksissa, joissa kehon vastustus on laskenut inhibiition takia, voivat keksinnön mukaiset koostumukset tukahduttaa inhibiition hydrolysoimalla inhibiitiosta vastuussa olevat glykoproteiinit ja eliminoimalla siaalihapon solukalvojen pinnalta.

Keksinnön mukaisia farmaseuttisia koostumuksia voidaan käyttää etukäteen ehkäisemään influenssaa jokaisen kuukauden kahtena ensimmäisenä päivänä kuuden talvikuukauden aikana ihmisiin tai eläimiin, jotka ovat tartunnalle alttiina ehkäistäkseen viruksen hajoamisen ensimmäisen vaiheen tai estääkseen influenssan aiheuttaman tulehduksen kliiniset oireet.

Niitä voidaan myös käyttää influenssan ensimmäisten oireiden jälkeen. Ne nopeuttavat parantumista ja limakalvosolujen parantumista ja ne pysäyttävät ylitulehdukseen aiheuttamat komplikaatiot. Keksinnön mukaiset farmaseuttiset koostumukset ovat erittäin hyvin siedettäviä johtuen siitä että *Streptococcus pneumoniae*'n N-asetyylineuraminidaattiglykohydrolaasi voidaan saada hyvin puhtaassa tilassa, se on neutraali ja vapaa vieraista proteiineista.

Siksi niillä ei ole vaimennetuista tai kuolleista viruksista saatujen rokotteiden sivuvaikutuksia.

Niiden aktiivisuus voidaan johtaa makrofaagien aktivoinnista, mikä ilmenee in vitro suurempana kykynä levitä, fagosytoosiksen kasvuna, E-rosettien ja EAC-rosettien määrän kasvuna ja DNA:n synteesin kasvuna lektiinien läsnäollessa. In vivo tämä aktivointi ilmenee humoraalisen responssin kasvuna ja viivästyneen hypersensitiviteetin stimuloitina.

Nämä immunostimulantti- ja antivirüs-vaikutukset ovat melko yllättäviä ja odottamattomia kirjallisuuteen nähden (P. Binder C R Acad.Sci (Pariisi) 481 (1975) D, 1545), mikä on osoittanut kuolleisuuden kasvua rotilla, joilla on malpighian karsinoma.

Edelleen muissa töissä on esitetty, että bakteeriperäisellä neuraminidaasilla ei ole minkäänlaista suojaavaa vaikutusta Myxovi-

rus Influenzae'n aiheuttamia virusinfektioita vastaan.

Siksi keksinnön mukaisten farmaseuttisten koostumusten osoittamat yllättävät terapeuttiset ominaisuudet tekevät selvän eron aikaisemmin tunnettujen neuraminidaasien ja Streptococcus pneumoniae'n kannan I-044 N-asetyyylimuramidaattiglykohydraasien välillä.

Seuraavat esimerkit on vain tarkoitettu kuvaamaan keksintöä ja esittämään parhaan suoritustavan.

Esimerkki I

N-asetyyylimuraminaattiglykohydrolaasin valmistaminen Streptococcus pneumoniae'sta

I Kanta

Kanta, joka tuottaa tämän entsyymin, on Streptococcus, joka kuuluu Micrococcaceae-sukuun, jota talletetaan Pasteur-instituutin kokoelmissa Pariisissa numerolla I-044.

II Kannan ominaisuudet

Streptococcus esiintyy Gram-positiivisena, kaksittain tai hyvin lyhyenä ketjuna, joskus koteloituneena cocci. Ne ovat mahdollisesti aerobisia. Viljelyn optimaalinen lämpötila on noin 37°C.

Säilytys

Kantaa pidetään agarilla, jossa on 10% hevosen verta lisättynä nalidiksaanihapon kanssa.

Ymppäys

Ymppäys suoritetaan vetämällä juovia viistoagarille.

Ympättyjen testiputkien inkubointi suoritetaan 18-24 tunnin ajan 37°C:ssa. Sitten ne lyofilisoidaan kuorittuun maitoon.

III Ympin valmistaminen

Lyofilisoidun koeputken sisältö suspensoidaan noin 2 ml:aan seuraavaa väliainetta:

Aivosydäntä (Difco)	25 g/l
Neopeptonia (Difco)	1 g/l
Vettä tarpeeksi	1 litraa varten

Tämän väliaineen pH säädetään arvoon 7,8 ja aine steriloidaan 120°C:ssa 30 minuutin ajan.

Tätä steriiliä ainetta käytetään viljelyyn pullossa, joka sisältää 4 litraa tätä ainetta. Inkubointi suoritetaan anaerobisesti 37°C:ssa ilman sekoitusta ja ilmastusta 24 tunnin ajan.

IV N-asetyyylimuramidaattiglykohydrolaasin valmistaminen

4 litraa edellämainittua steriiliä väliainetta käytetään fermentointiastian ympppäämiseksi, joka sisältää 1000 litraa seuraavaa seosta:

<i>Ennen kastelua</i>	Pastoosia (Pasteur-instituutti)	10 g/l
	Cerebriiniä	1 g/l
	Lihauutetta (Merieux-instituutti)	3 g/l
	Hiiva-autolysaattia	3 g/l
	Dikaliumfosfaattia	1 g/l
	Natriumkloridia	5 g/l
	Vesijohtovettä riittävästi	1 litraa varten

Väliaineen pH-arvo säädetään 7,8-8,0.

Sitä steriloidaan 120°C:ssa 20 minuutin ajan.

Fermentointi suoritetaan 37°C:ssa 29 tunnin ajan ilman sekoitusta ja ilmastusta. Fermentoinnin lopussa aineeseen lisätään 0,1 g/l lyotsyymiä helpottamaan mikrobisolujen rikkoutumista ja parantamaan täten muodostuneen N-asetyyylimuraminaattiglykohydrolaasin diffundoitumista väliaineeseen. Väliainetta sekoitetaan 37°C:ssa 3 tunnin ajan ja annetaan sitten palautua noin 20°C:seen.

Fermentoinnin kulkua seurataan mikroskooppikokeilla, pH-arvon ja neuraminidaasi-aktiviteetin määrityksillä.

V:Uuttaminen

Entsyymien uuttaminen tapahtuu fraktiointisaostamisella

a) ensimmäinen vaihe

500 g/l ammoniumsulfaattia ja 3 g hyflosuperceliä lisätään jokaista litraa kohti lientä. Seosta sekoitetaan 1 tunnin ajan ja suodatetaan. Jäännöskakku pestään ammoniumsulfaatin 40% vesiliuoksella. Jäljelle jäävä tahna otetaan veteen +4°C:ssa kolme kertaa 5 litral-la.

b) toinen vaihe

15 litraan pesuvesiä lisätään tarpeeksi ammoniumsulfaattia jotta saadaan pitoisuus 250 g/l. Liuokseen lisätään myös 40 g/l hyflosuperceliä ja sekoitetaan 1 tunnin ajan. Koko seos suodatetaan imulla.

c) kolmas vaihe

Edellä olevaan suodokseen lisätään 150 g/l ammoniumsulfaattia ja 10 g/l hyflosuperceliä ja seosta sekoitetaan 1 tunnin ajan. Saostuma erotetaan imulla ja liukenemattomat aineet pestään ammoniumsulfaatin 40% vesiliuoksella. Jäljelle jäävä tahna otetaan 2 litraan vettä 4°C:ssa kahdesti. Saadut liuokset yhdistetään ja dialy-

soidaan vettä vastaan 4°C:ssa 16 tunnin ajan (veden tulo 20 litraa/tunti).

VI Kromatografiaa karboksimeytyyliselluloosalla (CM23)

Kromatografiaa varten valmistetaan kolonni, jonka halkaisija on 15 cm ja korkeus 100 cm. Se täytetään 1,6 kg:lla CM 23 karboksimeytyyliselluloosaa ja pestään 55 litralla 0,0025 -M fosfaattipuskuriliuosta (pH 6,8).

Dialysoidut uutteet on aikaisemmin selvitetty suodattamalla ja saatettu pH-arvoon 6,8 lisäämällä sitruunahapon 1-M liuosta. Ne pannaan kolonniin, sen jälkeen lisätään 10-15 litraa 0,0025-M fosfaattipuskuriliuosta. Kiinnittynyt N-asetyylimuraminaattiglykohydrolaasi eluoidaan 10-15 litralla 0,2-M sitraattifosfaattipuskuriliuosta (pH 6,8) käyttäen virtausnopeutta 4 l/h.

Pääfraktio on tilavuudeltaan noin 5 litraa ja se dialysoidaan sitten 1% natriumkloridiliuosta vastaan 16 tunnin ajan +4°C:ssa (virtaus 4 l/h). Dialysaatti lyofilisoidaan. Saatua jäännös muodostuu raaasta N-asetyylimuraminaattiglykohydrolaasista, jonka ominaisaktiviteetti on noin 500.

VII Puhdistus kromatograafilla Sephadex G 50:llä

20 g edellä saatua raakaa ainetta (vastaten 10 g proteiinia määritettynä Lowry'n menetelmällä) liuotetaan 150 ml:aan 0,1-M fosfaattisitraattipuskuriliuosta (pH 6,8) ja viedään kolonniin, joka on täytetty Sephadex G 50:llä ja edeltäkäsinkin pesty 0,1-M fosfaattisitraattipuskuriliuoksella. Kiinnittymisen jälkeen kolonni pestään samalla puskuriliuoksella ja 20 ml:n fraktioita kerätään. Kerätään fraktiot, jotka sisältävät N-asetyylimuraminaattiglykohydrolaasia, dialysoidaan 1% natriumkloridiliuosta vastaan ja dialysaatti lyofilisoidaan. Saadun konsentraatin ominaisaktiviteetti on noin 20 000. Se määritetään mittaamalla siaalihapon määrä, joka vapautuu yhdessä minuutissa 37°C:ssa N-asetyyli-neuraminyyli-laktoosista milligrammoina proteiinia ja ilmaistaan nanomooleina.

Seuraava taulukko kokoaa yhteen puhdistuksen etenemisen

Aktiviteetti saatuna mg proteiinia	Raaka entsyymi	Entsyymi karboksimeytyyliselluloosakromatografian jälkeen	Entsyymi Sephadex-kromatografian jälkeen
Neuramini-daasi	3,1	500	20.000
N-asetyyli-glukos-aminidaasi	1,6	0	0
α-galaktosidaasi	0,3	0	0

Aktiviteetti saatuna mg proteiinia	Raaka entsyymi	Entsyymi karboksi- metyyliselluloosa- kromatografian jälkeen	Entsyymi Sephadex-kroma- tografian jälkeen
β -galaktosidaasi	0,03	0	0
α -fukosidaasi	0	0	0
β -fukosidaasi	0	0	0
Aryylisulfataasi	0	0	0
Proteaasi	0	0	0

Esimerkki II

Immunologisen yhteyden puuttuminen virusperäisten neuraminidaasien ja Streptococcus pneumoniae'n N-asetyylimuraminidaattiglykohydrolaasin välillä.

a) Yritykset vastustaa Streptococcus pneumoniae'n (kanta I-044) N-asetyylimuraminidaattiglykohydrolaasin neuraminidaasi-aktiviteettia kaniineilla, jotka oli aikaisemmin tehty immuuneiksi virusperäisillä neuraminidaaseilla, eivät antaneet mitään tulosta.

Virusperäiset neuraminidaasit tulevat ihmisen Myxovirus Influenzae Singapore 57:stä, Hong Kong 68:sta, Englanti 72:sta; eläimen kannoista A equi I, A equi; ja ihmisen Myxovirus parainfluenzae tyypeistä 1,2 ja 3 lumps, Sendai SV 5.

b) Yritykset neutraloida virusneuraminidaasit kaniiniseerumeilla, jotka oli aikaisemmin tehty immuuneiksi N-asetyylimuraminidaattiglykohydrolaasia vastaan, jäivät negatiivisiksi.

Esimerkki III

N-asetyylimuraminidaattiglykohydrolaasin teho influenssaviruksen, kanta A Port Chalmers 1/73 H_3N_2 , lisääntymiseen.

Streptococcus pneumoniae'n (kanta I-044) N-asetyylimuraminidaattiglykohydrolaasin erilaiset erät testattiin Fazekas'in esittämän sikiö-menetelmän (engl. method of egg-bits) mukaisesti. Sikiöt pidettiin elossa pienissä Perspex-laattakupeissa, jotka sisälsivät muutamia paloja klorio-allantoiinikalvoa. Solut ympätettiin A-virus Port Chalmers'lla (0,1 ml laimennusainetta + 0,9 ml viljelyainetta, joka antaa viruksen infektiotiitterin 10^{-5} ID/0,1 ml). Kun on inkuboitu 6 tunnin ajan 33°C :ssa, S. pneumoniae'n N-asetyylimuraminidaat-

tiglykohydrolaasi lisätään (0,1 ml laimennus 10^{-2} ominaisaktiiviteettia 8000 varten ja konsentraatiota 1 mg proteiineja/ml varten).

Entsyymien vaikutus viruksen moninkertaistamiseen kestää noin 72 tuntia. Tämän ajanjakson kuluttua mitataan muodostuneen viruksen infektiotiitteri määrittämällä sikiöiden hemagglutiinitiitteri. Saadut tulokset on koottu taulukkoon I. Kaikki kokeet on suoritettu käyttämällä samaa laimennusainetta, samaa tiitteriä ja samaa proteiinkonsentraatiota.

S. pneumoniae'n N-asetyylimuraminaattiglykohydrolaasin vaikutus on testattu rokottamalla joka 6. tunti sama annos entsyymiä. Virus kasvaa ensimmäisen 6 tunnin aikana sikiöissä, jotka on inkuboitu 33°C :ssa. Kuudentena tuntina lisätään N-asetyylineuraminaattiglykohydrolaasi ja inkubointia suoritetaan vielä 72 tuntiin asti. Infektiotiitteri määritetään samoin hemagglutinaatiolla käyttäen kanan punaisia verisoluja 2%:na suspensiona.

Influenssaviruksen moninkertaistumisen kinetiikka N-asetyylimuraminaattiglykohydrolaasin läsnäollessa tai poissaollessa on esitetty taulukossa I. Se osoittaa, että keksinnön mukaisella N-asetyylimuraminaattiglykohydrolaasilla on hyvin merkittävä osuus viruksen moninkertaistumisessa.

Esimerkki IV

S. pneumoniae'n N-asetyylimuraminaattiglykohydrolaasin vaikutuksen määrittäminen Myxoviruksen (villit kannat) lisääntymisnopeuden lisäämisajan funktiona.

Ensimmäinen testi

S. pneumoniae'n N-asetyylimuraminaattiglykohydrolaasi on ympätty Myxoviruksen viljelmissä sikiöihin annoksissa 2,7 U/ml/levy.

Viruksen lisääntyminen ilman *S. pneumoniae*'n N-asetyylimuraminaattiglykohydrolaasia suoritetaan 72 tunnin ajan 33°C :ssa. Tämän ajan kuluttua annos viljelmää otetaan pois ja määritetään hemagglutiinitiitteri. Jäljelle jääneet fraktiot kerätään ja yhdistetään fraktiopooliksi. Määritetään tämän poolin hemagglutiiniaktiiviteetti, neuraminidaasiaktiiviteetti ja hedelmöitettyjen munien infektiotiitteri. Pooli ympätään uudelleen tuoreisiin sikiöihin. Toinen viruksen moninkertaistuminen määritetään sitten 72 tunnin kuluttua 33°C :ssa. Sen fraktiot kerätään samoja määrityksiä varten. Jäljelle jääneet osat ympätään uudelleen viruksen kolmannen moninkertaistumisen aikaansaamiseksi samoissa koeolosuhteissa.

Samaten kolme peräkkäistä viruksen moninkertaistamista suoritetaan S-pneumoniae'n N-asetyyylimuraminaattiglykohydrolaasin läsnäollessa, joka on ympätty moninkertaistamisvaiheen kuudennella tunnilla.

Jäljelle jäänyt osa jokaisen moninkertaistamisen pooleista, jotka on otettu 72 tunnin kuluttua, konsentroidaan, sitten puhdistetaan viruksen kasvun morfologisten arvojen määrittämiseksi N-asetyyylimuraminaattiglykohydrolaasin läsnäollessa tai puuttuessa.

Jotkut sikiöt, jotka ovat peitettyt palalla chorio-allantoiniinikalvoa, otetaan pois 26 tunnin kuluttua jokaisen vaiheen moninkertaistumisvaiheessa. Ne kiinnitetään 2% glutaraldehydiin, jotta voitaisiin nähdä viruksen lähteminen kalvosta elektronimikroskooppilla. Toiset kiinnitetään 1% glutaraldehydiin, jotta voitaisiin suorittaa jäädytysleikkauksia ja määrittää joitain morfologisia eroavaisuuksia ei-infektoiduissa ja infektoiduissa, käsitellyissä ja käsittelemättömissä kalvoissa.

Toinen testi

S-pneumoniae'n N-asetyyylimuraminaattiglykohydrolaasi ympätään Myxovirus A₂PC/73:n ja Myxovirus A₂VIC/3/75:n viljelmiin konsentraatiossa 0,5 U/ml/levy. Myxovirus A₂ VIC /3/75:n virologiset tiedot ovat seuraavat:

Hemagglutiiniitiitteri	200
Neuraminidaasiitiitteri	80
EID ₅₀	10 ⁷⁻⁵
Hemagglutiiniitiitterin ja MCA:n suhde	= 10 ^{4,5}

Käytetyn S-pneumoniae'n N-asetyyylimuraminaattiglykohydrolaasin analyttiset vakiot ovat seuraavat:

ominaisaktiviteetti	2700 U/ml
0,1 ml:n ymppe laimennettuna 1/100 vastaa	2,7 U/ml/levy
emäliuos laimennettuna 1/5, eli	540 U/ml
0,1 ml:n ymppe, joka on aiemmin laimennettu 1/100, eli	
0,54U/ml/levy	

Koe suoritetaan tavallisella sikiöiden tekniikalla, määrittämällä hemagglutiiniitiitteri, neuraminidaasiaktiviteetti ja infektiotiitteri (EID₅₀) hedelmöitettyillä munilla.

Edelleen suoritetaan kalvojen värjäys elektronimikroskooppitarkastelua ja jäädytysleikkausta varten.

Tulos

Näin saadut tulokset on kerätty seuraaviin histogrammeihin I, II ja III. Ne osoittavat, että S-pneumoniae'n N-asetyyylimurami-

naattiglykohydrolaasin lisääminen sen jälkeen kun Myxovirus influenzae on viljelty 6 ja 24 tuntia sikiöissä aiheuttaa moninkertaistumisasteen, joka on $2 \log 10$ pienempi kuin käsittelemättömien viljelyjen. Lisäys 30 tuntia viljelyn jälkeen antaa vielä positiivisen vaikutuksen. Lisäys 48 ja 54 tuntia viljelyn jälkeen aiheuttaa vain heikon vaikutuksen.

Esimerkki V

Influenssaviruksen moninkertaistumisasteen määrittäminen S-pneumoniae'n N-asetyylimuraminaattiglykohydrolaasin eri määrien läsnäollessa.

On valmistettu liuokset tätä entsyymiä, jotka sisältävät 0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 ja 1 mg proteiinia ml kohden. Annos jokaista liuosta ($0,1 \text{ ml } 10^2$) ympätään sikiöiden virusviljelmiin MCA:n kanssa ja entsyymin vaikutus moninkertaistumisasteeseen määritetään.

Menetelmä

a) Testatut kannat

Myxovirus influenzae A	Hong Kong 1/68
	Port Chalmers 1/73
	Victoria 3/75

b) 11 päivän hedelmöitettyt munat

Fazekas (1958) on julkaissut viljelytekniikan. Kun on inkuboitu 6 tuntia 33°C :ssa, lisätään viljelty S-pneumoniae'n N-asetyylimuraminaattiglykohydrolaasin liuosannosten kanssa eri konsentraatioissa. Moninkertaistamista jatketaan 72 tuntia 33°C :ssa. Tämän ajanjakson kuluttua otetaan $0,1 \text{ ml}$ väliainetta pois jokaisesta levystä ja viruksen moninkertaistumisaste määritetään N-asetyylimuraminaattiglykohydrolaasin eri konsentraatioiden funktiona (hemagglutiini- ja neuraminidaasiaktiiviteettien määrittäminen). Lisäksi suoritetaan hemagglutiinitesti suoraan jokaisesta levystä kanan punaisen verisolujen $0,2\%$ suspension kanssa, minkä avulla voidaan verrata viruksen infektiotiitteriä N-asetyylimuraminaattiglykohydrolaasin kanssa ja ilman sitä.

Tulokset

Täten saadut tulokset on kerätty taulukoihin II, III ja IV.

Esimerkki VI

S-pneumoniae'n N-asetyylimuraminaattiglykohydrolaasin antivirussyöntein vaikutuksen "in vivo" tutkiminen.

A) Estävä vaikutus influenssaviruksen moninkertaistumiseen

Koe on suoritettu in vivo frettierissä, joihin on ympätty tietty annos MRC 11 Myxovirus Influenzae'ta intranasaalisesti. 1 tai 18 tuntia myöhemmin on samalla tavalla annettu annos N-asetyylimuraminaattiglykohydrolaasia

N-asetyylimuraminaattiglykohydrolaasin vaikutus viruksen moninkertaistumisasteeseen määritetään mittaamalla ajan funktiona

- ympätyn viruksen häviäminen
- hemagglutiiniaktiiviteetin määrittäminen
- neuraminidaasiaktiiviteetin määrittäminen
- infektiotititterin määrittäminen munista kurkkulimanäytteessä eri aikaväleillä viruksen ymppäämisen jälkeen (3 päivää, 6 päivää, 9 päivää, 15 päivää).

Samanlaiset määritykset tehtiin kontrolleille, jotka saivat vain annoksen virusviljelmää.

Entsyymien vaikutus on määritetty myös freteillä mittaamalla viraalisen anti-hemagglutiinin ja antineuraminidaasin vasta-aineiden tuotannon aleneminen tutkimalla paikallisia vasta-aineita kurkkulimanäytteessä ja tutkimalla kiertäviä vasta-aineita.

Frettierät, jotka ovat saaneet vain virusviljelmiä, osoittavat influenssalle ominaisia oireita. Ne aivastavat paljon ja kuusi päivää infektion jälkeen niiden kuono vuotaa runsaasti. Päinvastoin ne fretit, jotka saivat N-asetyylimuraminaattiglykohydrolaasia eivät osoita oireita.

B) Estävän vaikutuksen "in vivo"-tutkimus influenssaviruksen moninkertaistumisasteeseen

Kolmeen erään frettejä ympättiin pernasaalisesti yksinkertaisella annoksella MRC 11 virusta (1 ml allantoiiniseosta). N-asetyylimuraminaattiglykohydrolaasi ruiskutettiin samalla tavalla 6 tuntia viruksen ymppäämisen jälkeen ruiskuttamalla kerran annos, joka vastaa 1 mg proteiineja 0,5 ml:ssa suolaliuosta.

Kurkkulimanäytteet otettiin joka 3. päivä ymppäämisen jälkeen. Viruksen moninkertaistumisen ja absorption kinetiikka trakeaalisoluisissa määritettiin N-asetyylimuraminaattiglykohydrolaasin läsnäollessa ja puuttuessa.

Menetelmä

- yksi erä frettejä sai vain virusviljelmää
- frettierät saivat virusviljelmää ja 6 tuntia myöhemmin N-asetyylimuraminaattiglykohydrolaasia
- frettierät saivat virusviljelmää ja 6 tuntia ennen tätä ymppää-

mistä S-pneumoniae'n N-asetyyylimuraminaattiglykohydrolaasia.

Kurkkulimanäytteet otetaan joka 3. päivä. Näytteet suspensoidaan sitten 1,5 ml:aan Parkerin elatysainetta ja määritetään hemagglutiinivaikutus ja hemagglutiini-estovaikutus (HA-tiitteri MRC 11 virusta vastaan). Lievä sydänpunktio suoritetaan 15. ja 21. päivinä ymppäämisen jälkeen kiertävien vasta-aineiden määrän määrittämiseksi.

Tulokset

Tarkistukset: Frettieriin ympätään yksinkertainen annos MRC-virusta 0-hetkellä. 6 tuntia myöhemmin ne saivat suolaliuosta. Kaikilla freteillä on erittäin merkittäviä influenssan oireita kuudennesta päivästä lähtien ymppäämisen jälkeen. Merkittävä prosenttiosuus freteistä kuoli. Jäljelle jääneet elossa olevat fretit toipuivat täysin noin yhdeksäntenä päivänä.

Hemagglutiinitiitteri - joka paljastaa viruksen läsnäolon - osoittaa nousua kuudenteen päivään asti maksimin ollessa kolmannesta kuudenteen päivään, sitten se laskee ja häviää täydellisesti viidentenätoista päivänä.

Anti-hemagglutiinisia vasta-aineita ilmaantuu kuudennesta päivästä lähtien ja ne enenevästi kasvavat 21. päivään asti.

Käsiteltyt erät

Frettierät, joihin on ympätty virusviljelmää ja 6 tuntia myöhemmin S-pneumoniae'n N-asetyyylimuraminaattiglykohydrolaasia osoittavat hyvin lievää aivastelua virusviljelmän ymppäämisen jälkeen. Näin saadut tulokset on kerätty taulukoihin V ja VI.

Esimerkki VII

S-pneumoniae'n N-asetyyylimuraminaattiglykohydrolaasin kliininen tutkimus.

A) Potilaitten luonne

Keksinnön mukaisia farmaseuttisia koostumuksia on kokeiltu 9 perheeseen, joilla oli 19 aikuista ja 8 lasta.

B) Annostus

He saivat kolme kertaa päivässä kahtena peräkkäisenä päivänä nenä-suihkeena entsyymien vesiliuosta, joka sisälsi 333 yksikköä annosyksikköä kohti. He saivat kukin yhteensä 4000 U Streptococcus pneumoniae'n N-asetyyylimuraminaattiglykohydrolaasia.

C) Tulokset

17 potilasta saivat tartunnan jälkeen entsyymiliuosta. He osoittivat merkittävää subjektiivista paranemista. Mitään sivuvaikutuksia

ei esiintynyt. 12 vapaaehtoista, jotka ennalta saivat entsyymiliuosta, vain yksi sairastui. Sitävastoin kuudesta kontrollista kolme sairastui.

Patenttivaatimukset:

1. Menetelmä farmaseuttisten koostumusten valmistamiseksi, jotka sisältävät vaikuttavana aineena Streptococcus pneumoniae'n N-asetyylimuraminaattiglykohydrolaasia seoksena tai yhdessä inerten ei-toksisen terapeuttisesti sopivan farmaseuttisen kantajan tai väliaineen kanssa.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä farmaseuttisten koostumusten valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että vaikuttava aine on läsnä annoksena, joka on noin 300 - noin 5000 U annosyksikköä kohden.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä farmaseuttisten koostumusten valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että kantoaineet tai väliaineet ovat sellaisia, jotka soveltuvat parenteraaliseen, limakalvon kautta, perkutaaniseen tai rektaaliseen annostukseen.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä farmaseuttisten koostumusten valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että Streptococcus pneumoniae'n N-asetyylimuraminaattiglykohydrolaasi on sellainen, joka on valmistettu kannasta I-044, jota talletetaan Pasteurinstituutin kokoelmissa Pariisissa.

Patentkrav:

1. Förfarande för framställning av farmaceutiska kompositioner vilka såsom aktiv beståndsdel innehåller N-acetyl-muraminat-glykohydrolas från *Streptococcus pneumoniae* i blandning eller i kombination med en inert, icke-toxisk terapeutiskt aktiv farmaceutisk bärare eller hjälpmedel.

2. Förfarande enligt patentkravet 1 för framställning av farmaceutiska kompositioner, k ä n n e t e c k n a t därav att den aktiva beståndsdel är närvarande i en dos av ca 300 - ca 5000 U per enhetsdos.

3. Förfarande enligt patentkravet 1 för framställning av farmaceutiska kompositioner, k ä n n e t e c k n a t därav att bärarna eller hjälpmedlen är sådana som är lämpliga för parenteral dosering, dosering via slemhinnorna, perkutan eller rektal dosering.

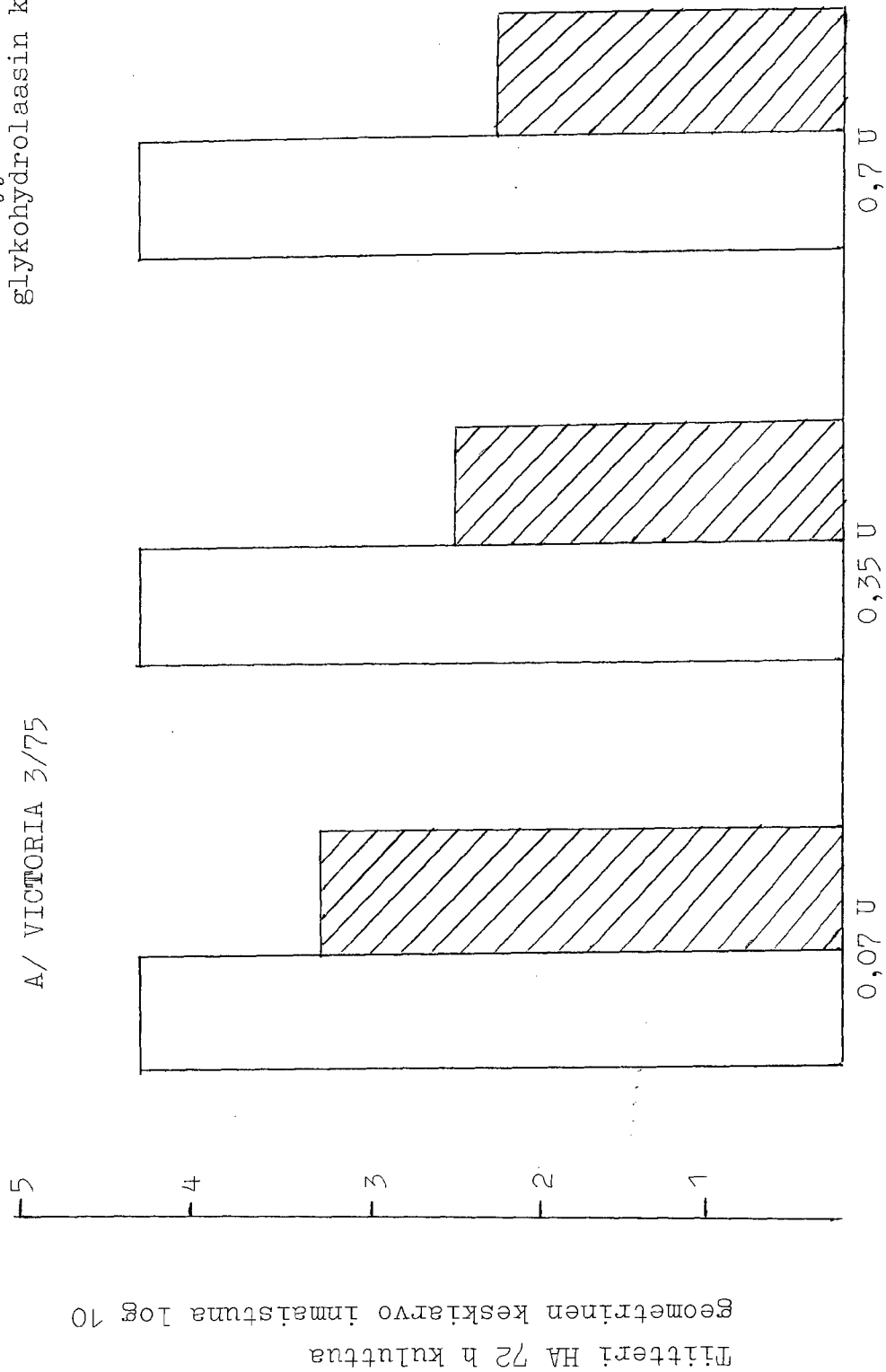
4. Förfarande enligt patentkravet 1 för framställning av farmaceutiska kompositioner, k ä n n e t e c k n a t därav att N-acetyl-muraminat-glykohydrolasen från *Streptococcus pneumoniae* är producerad av stammen I-044 som är deponerad i Pasteur-institutets samlingar i Paris.

INFLUENSSAVIRUS PORT CHALMERS'IN MONINKERTAISTUMISASTEEN KINETIIKKA
N-ASETYylimuraminaattiglykorydrolaasin läsnäollessa.

PORT CHALMERS 1 73 H ³ N ²	6 H	12 H	24 H	30 H	36 H	48 H	54 H	60 H	72 H
TARKISTUS- TIITTERI (HA)	-	0	0	0	2	2,10 ⁴	4,10 ⁵	8,10 ⁵	8 10 ⁵
VIRUS + N-ASETYLI- MURAMINAATTIGLYKO- HYDROLAASI (3,5 U) lisätty kuudennella tunnil- la (tiitteri HA)	↑ entsyy- min lisäys	0	0	0	0	0	0	2 10 ³	4 10 ³

Tarkistukset vain
viruksella

Virus + koe-erät
N-asetyyliimuraminaatti-
glykohydrolaasin kanssa



Bakteerinen glykohydrolaasi
lisätty 6 h viruksen ymp-
päämisen jälkeen

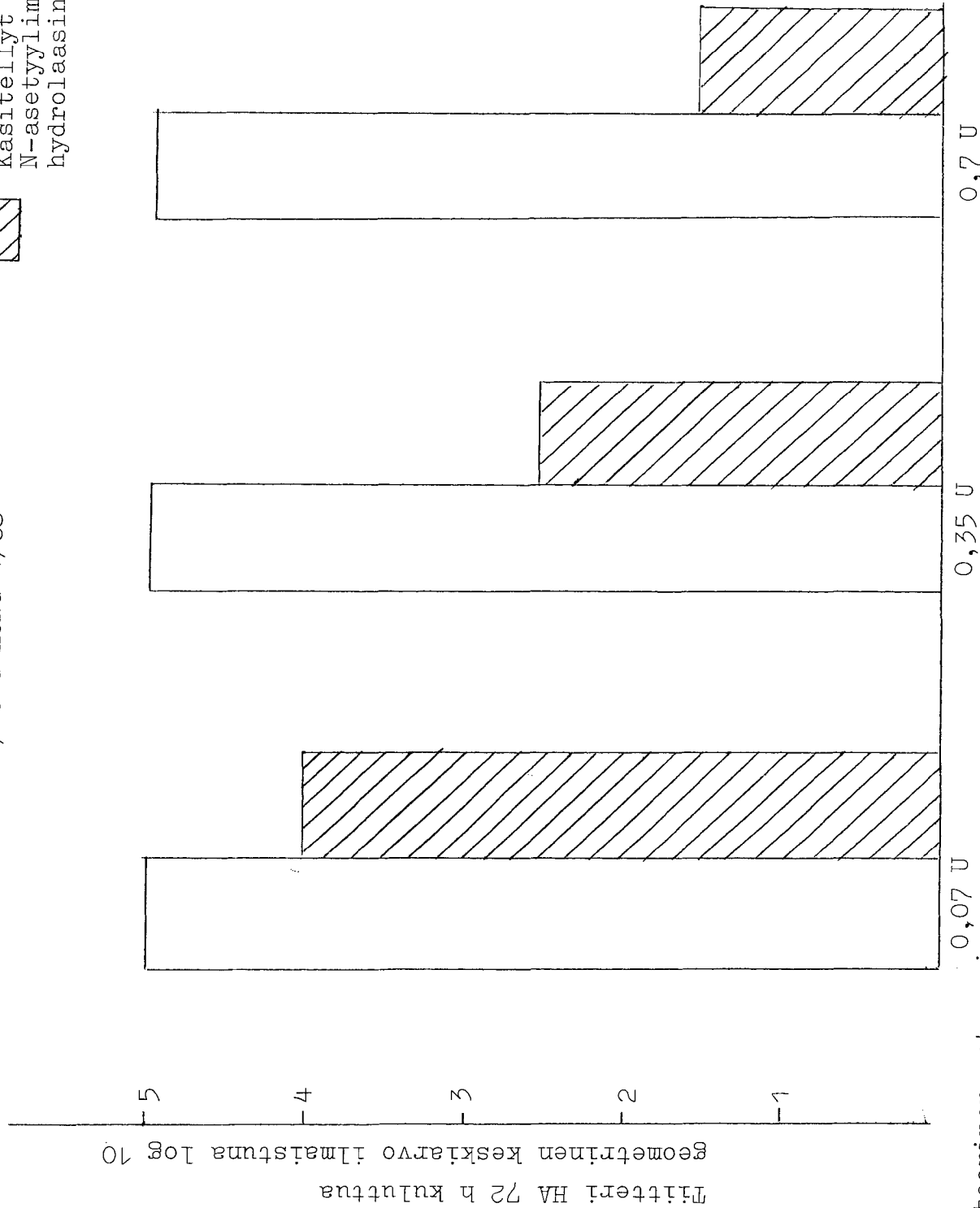
VIRUKSEN MONINKERTAISTUMISASTE BAKTEERISEN ENTSYYMIN
MÄÄRÄN FUNKTIONA

TAULUKKO III

A/HONG KONG 1/68

Tarkistukset vain
viruksella

Käsiteltyt erät viruksen ja
N-asetyylimuraminaattiglyko-
hydrolaasin kanssa



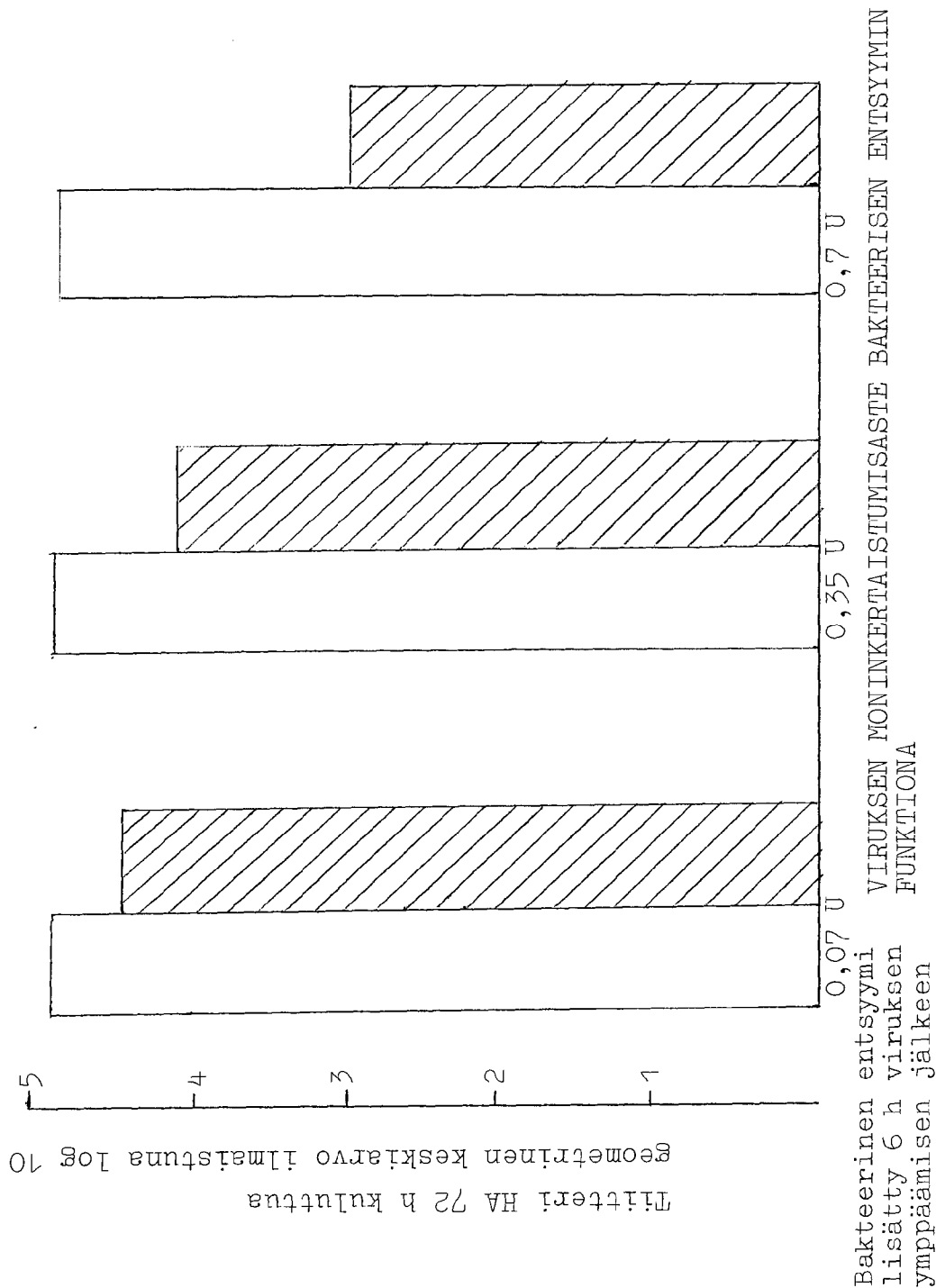
Bakteerinen entsyymi
lisätty 6 h viruksen
ympäpäimisen jälkeen

VIRUKSEN MONINKERTAISTUMISASTE BAKTEERISEN
ENTSYYMIN MÄÄRÄN FUNKTIONA

TAULUKKO IV

A/PORT CHALMERS 1/73

Tarkistukset vain
viruksella
Käsiteltyt erät viruksen
ja N-asetyyliamuramiinatti-
glykohydrolaasin kanssa



TAULUKKO V

N-ASETYylimuraminAATTIGlykOHYdrolAASin VAikutus fRETTeihin, jOTKA ON
AIKAISEMMIN INFekTOITU MRc 11-INFLUENSSAVIRUKSELLA

TARKISTUKSET		KÄSITELTY	
SAIRAS	TERVE	SAIRAS	TERVE
14/14	0/14	0/18	18/18

TAULUKKO VI

BAKTEERISEN ENTSYYMIN KOKONAISTERAPEUTTINEN TEHO INFLUENSsavirus MRC 11:lla infektioituihin fretteihin

ELÄINTEN TILA	KONTROLLIT YMPÄTTY 1 ml:lla MRC 11 - (E.I.D. 50 10 ⁷)	FRETTIT, JOTKA SAAVAT 3 5000 U ENTSYYMIÄ JOKO ENNEN TAI JÄLKEEN YMPÄÄ- MISEN 1 ml:lla VIRUSTA MRC 11 - (E.I.D. 50 10 ⁷)
SAIRAS	22 33:sta	20 60:stä
TERVE	11 33:sta	40 60:stä

$P < 0,01$

BAKTEERISEN ENTSYIMIN TERAPEUTTINEN VAIKUTUS FRETTEIHIN JOTKA ON INFEKTOITU AIKAISEMMIN INFLUENSSAVIRUKSELLA 11.

ERÄT	KONTROLLIT		ENTSYIMI 6. h JÄLKEEN		ENTSYIMI 6 h ENNEN		ENTSYIMI 18 h JÄLKEEN	
	SAIRAS	TERVE	SAIRAS	TERVE	SAIRAS	TERVE	SAIRAS	TERVE
1. ERÄ (6 frettiä)	3/3	0/3	0/3	3/3	-	-	-	-
2. ERÄ (12 frettiä)	4/4 joi- sta 1 kuoli 8. päi- vänä	0/4	0/4	4/4	0/4	4/4	-	-
3. ERÄ (9 frettiä)	3/3	0/3	0/3	2/3	0/3	3/3	-	-
4. ERÄ (8 frettiä)	4/4	0/4	-	-	-	-	2/2	2/2
YHTEENSÄ (35 frettiä)	14/14	0/14	1/10	9/10	0/7	7/7	2/2	2/2

P < 0,001

P < 0,001

P < 0,001

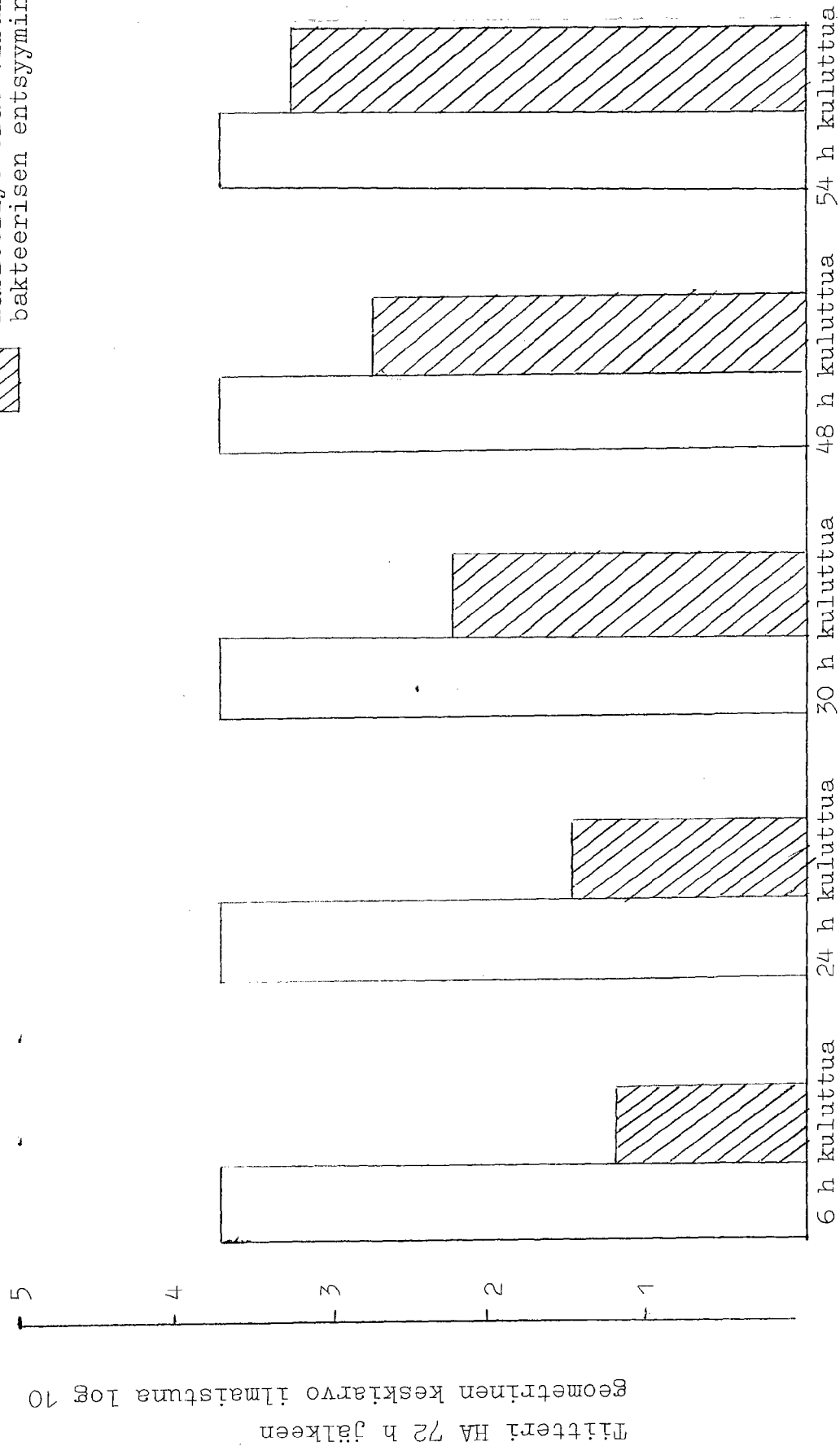
P < 0,01

ESIMERKKI IV

HISTOGRAMMI I

A/VICTORIA 3/75

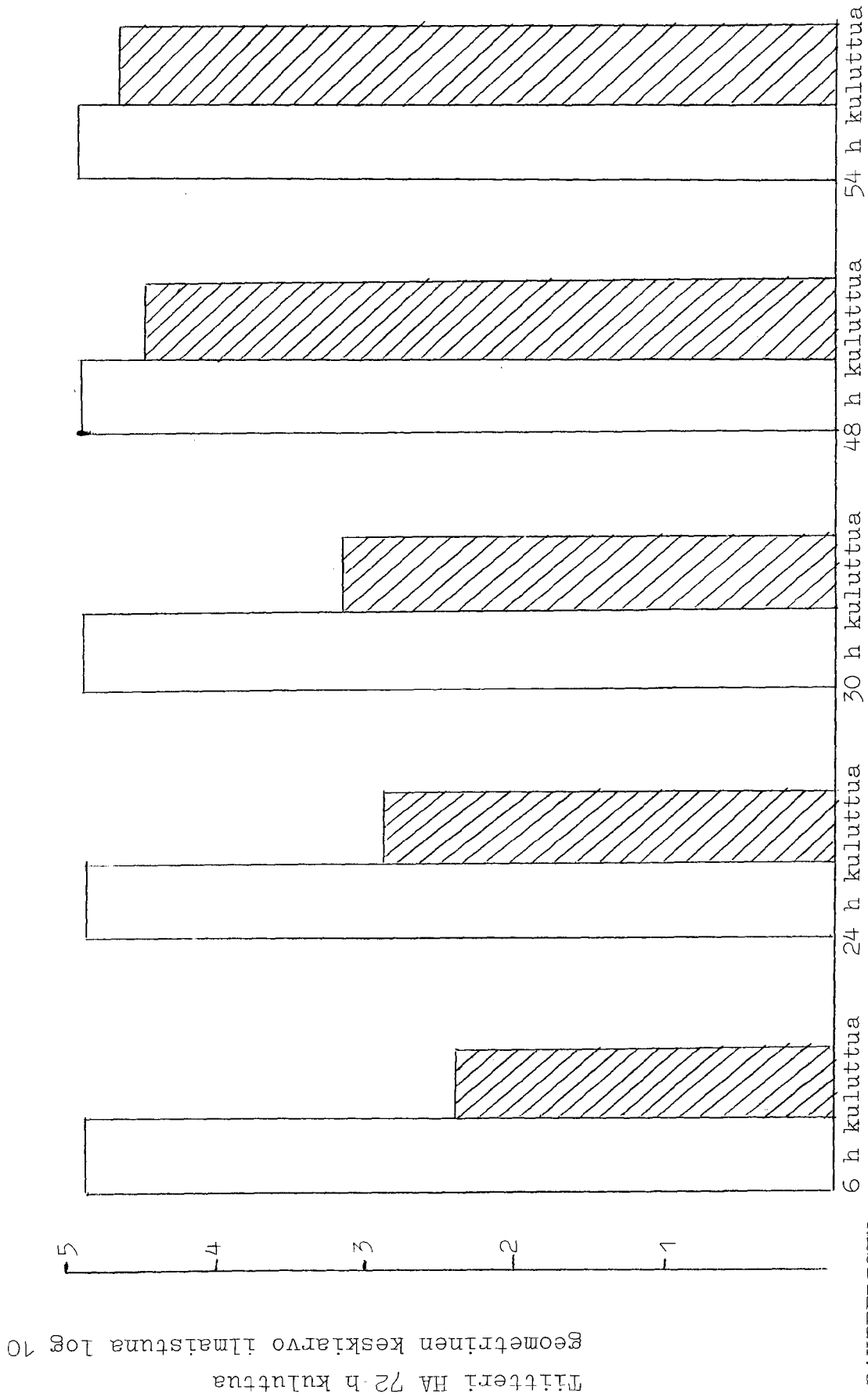
Tarkistukset vain viruksella
Käsiteltyt erät viruksen ja bakteerisen entsyymin kanssa



BAKTEERISEN VIRUKSEN MONINKERTAISTUMISASTE .5 U BAKTEERISTA ENTSYYMIÄ LÄSNÄOLLESSA
ENTSYYMIN LISÄYS KÄYTTÖAJAN FUNKTIONA.

HISTOGRAMMI II
A/PORT CHALMERS 1/73

□ Tarkistukset vain
viruksella
▨ Käsiteltyt erät viruksen ja
bakteerisen entsyymin kanssa



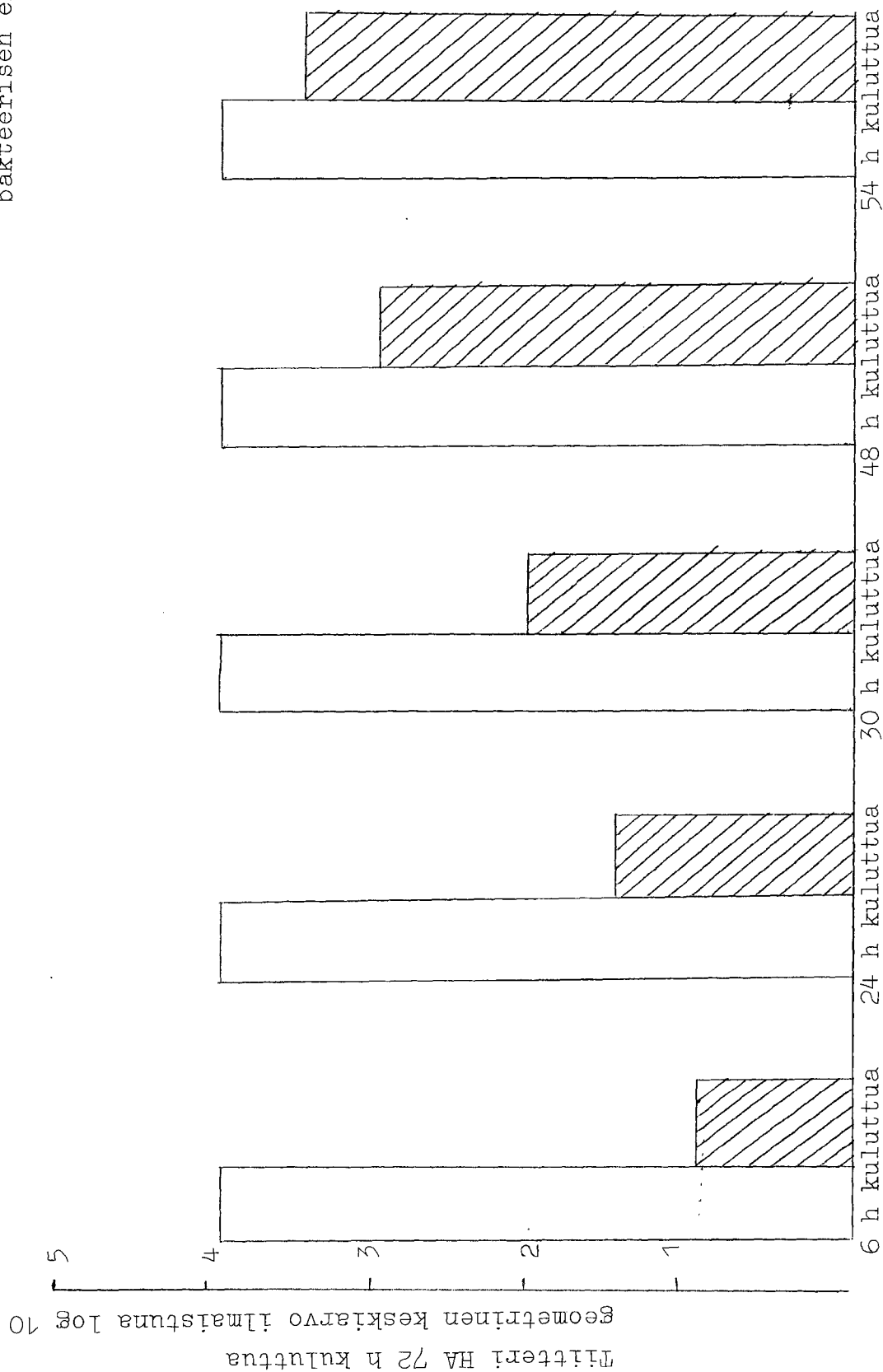
BAKTEERISEN VIRUKSEN MONINKERTAISTUMISASTE 5 U BAKTEERISTA ENTSYMIÄ LÄSNÄOLLESSA
ENTSYYMIN LISÄYS KÄYTTÖAJAN FUNKTIONA

HISTOGRAMMI III

A/ HONG KONG 1/68

Tarkistukset vain
viruksella

Käsiteltyt erät jotka vas-
taantottavat viruksen +
bakteerisen entsyymin



BAKTEERISEN
ENTSYMIN LISÄYS
VIRUKSEN MONINKERTAISTUMISASTE 0.5 U BAKTEERISTA ENTSYYMIÄ LISÄYKSEN
JÄLKEEN KÄYTTÖAJAN FUNKTIONA.

Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patent-
ansökningar: _____

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

Suomi - Finland _____

Iso-Britannia - Storbritannien _____

Norja - Norge _____

Ranska - Frankrike _____

Ruotsi - Sverige _____

Saksa - BRD - Tyskland _____

Sveitsi - Schweiz _____

Tanska - Danmark _____

USA _____

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

C.R. Acad. Sci. 285 (ser D), 1977, s. 837

14/12-82 Eero Kivisto

Allekirjoitus

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