

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

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

(10) **FI 830557 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **830557**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification (IPC⁵)
C07K 3/12
C07K 15/26

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **18.02.1983**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **18.02.1983**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **02.09.1983**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **12.06.2019**

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

01.03.1982 US 353,442

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • F. Hoffmann-La Roche & Co., Grenzachersstrasse 124-184, 4002 basel, SVEITSI, (CH)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Stein, Stanley, TOWN UNKNOWN, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 • Wolfe, Richard A, TOWN UNKNOWN, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

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

Ihmisen homogeeninen immuuni-interferoni ja menetelmä sen valmistamiseksi.

Mänskligt homogent immuninterferon och förfarande för dess framställning.

Ihmisen homogeeninen immuuni-interferoni ja menetelmä sen valmistamiseksi

Kyseessä oleva keksintö koskee ihmisen interferonia
 5 kestävän, homogeenisen proteiinin uudessa muodossa sekä sen valmistusmenetelmää. Sellainen homogeeninen ihmisen immuuni-interferoni on terapeuttisesti käyttökelpoinen virusten vastaisena ja lisääntymistä estävänä aineena ja se toimii muihin interferonien muotoihin, kuten esim. leukosyytti-
 10 interferoniin, yhdistettynä tällaisten muiden interferonien aktiivisuuden yhteisvaikutuksen aikaansaajana.

Georgiades ja Johnson [Methods in Enzymology 78, 536 (1981)] kuvaavat ihmisen immuuni-interferonin osittaista puhdistamista. Käytettyihin puhdistusvaiheisiin sisältyi kä-
 15 sittely, joka suoritettiin Matrex Blue absorboimisaineen avulla, supernatantti käsitellään interferonin absorboimiseksi huokosia lisättävällä lasilla, jonka huokoskoko on määrätty, interferoni eluoidaan NaCl-etyleeniglykolilla ja interferonijakeet yhdistetään ja kromatografoidaan Ultrogel
 20 AcA-54 pylväässä eluoimalla interferonihuippu 1M NaCl/18 % etyleeniglykoliseoksella. Interferoniaktiivisuuden pääosa eluoituu 35 000 - 70 000 suuruisen molekyylipainon alueella. Ultrogeelihiippujakeen spesifisen aktiivisuuden on ilmoitettu olevan $10^{6,30}$. Tämän osoitettiin olevan puhtaimman,
 25 tähän mennessä saadun materiaalin ja sen puhtaus oli alhaisempi kuin noin 10 %.

Johnson et al. [Methods in Enzymology, 78, 158 (1981)] esittävät suuressa mittakaavassa suoritettun ihmisen immuuni-interferonien induktion ja valmistuksen. He esittävät, että
 30 interferonin suurimmat saannot saadaan ihmisen perifeerisistä lymfosyyteistä, jotka ovat peräisin normaaleilta luovuttajilta, jotka on indusoitu T-solu mitogeeni stafylokokki-enterotoksiini A:lla. Tämä menetelmä tarjoaa mediaani interferonikonsentraation, joka on 1 000 yksikköä/ml eli
 35 $2,5 \times 10^5$ yksikköä 100 ml kohti verta. Edellä mainitusta lähtöaineesta peräisin olevan osittain puhdistetun immuuni-interferonin kirjoittajat ovat osoittaneet soveltuvan

vasta-aineen valmistukseen sekä kliinisten kokeiden suorittamiseen ihmisillä, mutta yksityiskohtia ei ole esitetty.

Tunikamysiiniä käyttämällä Mizrahl ja O'Malley [Methods in Enzymology, 78, 209 (1981)] saivat glykosyloitumattoman ihmisen immuuni-interferonin raa'assa muodossa. Glykosyloitumaton immuuni-interferoni osoitti biologista aktiivisuutta, mutta se menetti kykynsä sitoutua liikkumatto-

maan lektiiniin (ConA-Sepharose). O'Malley kuvasi ihmisen immuuni-interferonin affiniteettikromatografiaa [Methods in Enzymology, 78, 540 (1981)]. Erilaisten potilaiden immuuni-interferonitasojen perusteella käy ilmi, että immuuni-interferonilla on osuutta isännän puolustusreaktiossa virusinfektiota vastaan ja että isännillä, joilla immuunivaste on vaimennettu, on alentunut reaktiokyky. Lisäksi tulokset, jotka on saatu erilaisia induktoreita käyttämällä sekä monien erilaisten affiniteettipylväiden avulla, ilmaisevat immuuni-interferonin koostuvan heterogeenisestä populaatiosta interferonikomponentteja, jotka eroavat hydrofobisuusasteiden suhteen. Karakterisointia ei voitu edelleen suorittaa menettämättä puhdistettujen interferonivalmisteiden käyttökelpoisuutta, joista valmisteista kontaminoivat peiteaineet on poistettu.

Nathan et al. [Nature 292, 842 (elokuun 27 p:nä, 1981)] ovat tiedottaneet ihmisen immuuni-interferonin valmistuksesta, joka suoritetaan ihmisen T-lymfosyyttisolulinjan avulla. Interferoni puhdistettiin käyttämällä lasihelmiä, joilla oli määrätty huokoskoko, jonka jälkeen suoritettiin pylväskromatografia Ultragel AcA-44:llä. Tästä pylvästä saadun huippujakeen spesifinen aktiivisuus oli $1,2 \times 10^6$ (puhtaus alle 5 %) ja näennäinen molekyylipaino oli noin 40 000.

Ihmisen leukosyyttien induktio Con A:lla ja osittaisen puhdistus adsorboimalla ne piihappoon sekä etyleeniglykolia sisältävällä puskurilla suoritettu eluointi tuotti kaksi virustenvastaisesti aktiivista komponenttia, jotka voitiin erottaa toisistaan geelisuodatuksen avulla. Komponenttien (merkitty 45K:ksi ja 22K:ksi) näennäiset

molekyyllipainot olivat noin 45 000 ja noin 22 000. Komponentti 45K oli lajispesifinen, suhteellisen herkkä hapolle (pH 2) ja ihmisen fibroblasti-interferonin vasta-aineet neutraloivat sen huonosti. Kirjoittajat päättelivät, että
 5 kaiken todennäköisyyden mukaan 45K-komponentti pääasiassa sisälsi ihmisen immuuni-interferonin molekyylimuunnoksia. Katso Van Damme et al. [Eur. J. Immunol., 11. 937-942 (1981)].

Aivan äskettäin Yip et al. [Science 215, 411 (tammi-
 10 kuun 22 p:nä 1982)] kuvasivat voimakkaasti väkevöityjen, osittain puhdistettujen ihmisen immuuni-interferonivalmisteiden käsittelyä 0,1 %:lla SDS:llä 20^o ja 25^oC:n välisissä lämpötiloissa. He havaitsivat, ettei sellainen käsittely täysin tuhonnut biologista aktiivisuutta, kuten oli aiemmin
 15 havaittu korkeampia lämpötiloja käytettäessä. He saivat takaisin kaksi huippua, joilla oli SDS-PAGE-analyysin perusteella biologista aktiivisuutta sekä joiden näennäiset molekyylipainot olivat 20 000 ja 25 000 ja pieni määrä aktiivisuutta havaittiin alueella, joka vastasi noin 50 000 suuruista molekyylipainoa. Kirjoittajat esittävät teorian,
 20 jonka mukaan määrittäksessä käytetyissä denaturoivissa olosuhteissa immuuni-interferonin suurimolekyylinen muoto disosioituu kahdeksi havaituksi komponentiksi (Katso myös Yip et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 79, 1820 (maaliskuu
 25 1982)).

Lopuksi Goeddel et al. ovat esittäneet Second Annual International Congress for Interferon Researchissa, San Franciskossa, Kaliforniassa, elokuun 21-23 p:nä, 1981, julkaisun, jossa he kuvasivat ihmisen immuuni-interferonille
 30 komplementaarisen DNA:n kloonauksen ja sen ekspressiota kolmessa erilaisessa isäntävektorijärjestelmässä. Tämän kloonatun geenin nukleotidisekvenssin perusteella sekä olettaen ekspressoitujen proteiinisekvenssin alun sopivan sijainnin, oletettu ihmisen immuuni-interferoni koostuu 146 aminohaposta ja sen kokonaismolekyylipaino on noin 17 000. Grayn
 35 et al. mukaan [Nature 295, 503 (helmikuun 11 p:nä, 1982)] nukleotidisekvenssistä johdettu aminohappokoostumus on seuraava:

Ala	8	Gln	10	Leu	10	Ser	11
Arg	7	Glu	9	Lys	20	Thr	5
Asn	10	Gly	5	Met	4	Trp	1
Asp	10	His	2	Phe	10	Tyr	5
5 Cys	2	Ile	7	Pro	2	Val	8

Ihmisen raaka immuuni-interferoni, joka soveltuu kyseessä olevan keksinnön toteuttamiseen, voi olla peräisin mistä tahansa sopivasta lähteestä. Ihmisen raa'an immuuni-interferonin eräs sopiva lähde on peräisin indusoiduista normaaleista leukosyyteistä. Ihmisen immuuni-interferonin lisääntyneitä saantoja ja tiittereitä voidaan saada ymppeämällä soluviljelmäelatusaine, jota on täydennetty seerumilla, kuten esim. vasikan sikiön seerumilla ja aineella, joka stimuloi solujen lisääntymistä ja erilaistumista ja antamalla seoksen inkuboitua ajan, joka on riittävä, jotta soluilla tapahtuu ainakin yksi kaksinkertaistuminen. Tälle menetelmälle soveltuva, täydennetty soluviljelmäelatusaine on RPMI 1640 elatusaine, kaupallinen artikkeli, joka sisältää noin 2-10 % vasikan sikiön seerumia. Täydennetty elatusaine saattaa sisältää myös tavanomaisia, lisättyjä komponentteja, jotka ovat soluviljelmän suhteen käyttökelpoisia, kuten esim. puskuria, esim. 12,5 - 25 mM Hepes (N-2-hydroksietyyli-piperatsiini-N'-2-etaanisulfonihappoa). Solun lisääntymistä stimuloiva aine, joka on käyttökelpoinen kyseessä olevan keksinnön toteuttamisessa, on fytohemagglutiniini (PHA), jota lisätään määrältään noin 0,1 - 10 µg/ml. Käytetyn inkubointilämpötilan tulisi mieluummin olla noin 37°C. Yleensä soluille tapahtuu 1-2 kaksinkertaistumista noin kahden päivän aikana.

Inkubointijakson päätyttyä solut indusoidaan. Käyttökelpoisia indusointiaineita, joita voidaan käyttää, on hyvin tunnettuja ja niihin sisältyy spesifisiä antigeeneja tai epäspesifisiä mitogeeneja. Sellaisten indusointiaineiden esimerkkeihin kuuluu fytohemagglutiniineja (PHA), konkavaliini A (Con A), kermesmarjamitogeeni (PWA), puhdistettu proteiinijohdannainen (PPD), tetanustoksidi (TT), virusrokoteantigeeni (VM), stafylokokilta saatu enterotoksiini A,

Forboliestereitä, kuten esim. 12-0-tetra-dekanoyyliforboli-
 13-asetatti (TPA), yms. On yleisesti havaittu, että in-
 duktiomenetelmät, joissa käytetään spesifisiä antigeeneja,
 joita tavallisesti lisätään lymfosyyttejä sisältäviin vil-
 5 jelmiin, jotka on aiemmin herkistetty antigeenin suhteen,
 tuottavat suhteellisen huonoja immuuni-interferonin saantoja.
 Täten induktio T-solu-mitogeeneilla on edullista. Mitogee-
 nien piirissä erityisen edullisia ovat fytohemagglutiniinit,
 jolloin edullisin on fytohemagglutiniini-L TPA:han yhdis-
 10 tettynä, kuten Yip et al. ovat kuvanneet, Proc. Natl. Acad.
 Sco. USA 78, 1601 (1981).

PHA:a käytetään konsentraatioalueella 1-10 $\mu\text{g/ml}$,
 kun taas TPA:a käytetään noin 5-20 ng/ml. Forboli-esteriä
 lisätään elatusaineeseen ensin, jonka jälkeen, noin 2-3 tun-
 15 nin kuluttua, siihen lisätään PHA:a. Inkubointijakso saat-
 taa olla 48-120 tuntia, mieluummin noin 96 tuntia. Ne koo-
 taan sitten sentrifugoimalla pallolina ja immuuni-interferonia
 sisältävä supernatantti suodatetaan jokaisen solunpirsta-
 leen poistamiseksi, mieluummin suodattimen avulla, jonka
 20 huokoskoko on 3 mikronia. Käyttämällä tällaista menetelmää
 solun lisääntymiseen ja induktioon, on oleellisesti mahdol-
 lista lisätä ihmisen immuuni-interferonin saantoa ja tiit-
 teriä, joka voidaan tuottaa solupopulaatioyksikköä kohti,
 kun verrataan tähän mennessä aiemmin tunnettuihin menetel-
 25. miin. Täten esimerkiksi 45 valmisteiden tiittereiden keskiar-
 vo oli noin 13 000 yksikköä/ml.

Ihmisen raa'an immuuni-interferonin vaihtoehtoinen
 lähde on saatu yhdistelmämikro-organismeilta, jotka on trans-
 formoitu ekspressiovektorilla, joka sisältää ihmisen immuu-
 30 ni-interferonin toiminnallisessa tilassa, käyttämällä tut-
 kimustyössä hyvin tunnettuja yhdistelmä-DNA-tekniikoita.
 Yhdistelmämikro-organismeita voidaan panna käymään, koota ja
 immuuni-interferoni voidaan uuttaa soluista tavanomaisilla
 menetelmillä, kuten esimerkiksi yhdenmukaisesti seuraavien
 35 kuvattujen menetelmien kanssa, Goeddel et al., Nature 287,
 411 (1980); Wetzel et al., Journal of Interferon Research
 1, 381 (1981) sekä Gray et al., Nature 295, 503 (1982).

Syntyvä soluton uute voidaan sitten valmistaa samalla tavalla kuin on tässä yhteydessä kuvattu supernatanttielatusaineen suhteen, joka on peräisin indusoiduista leukosyyteistä. Olisi huomattava kuitenkin, että immuuni-interferoni, leukosyytti-interferonista poiketen, on labiili korkeiden lämpötilojen sekä happamen tai emäksisen pH:n suhteen ja täten tulee olla huolellinen raakojen materiaalien valmistusten suhteen ja välttää tällaisia ääriolosuhteita.

Kyseessä olevan keksinnön mukaiseen valmistustapaan kytkeytyy kolmivaiheinen menetelmä ihmisen immuuni-interferonin puhdistamiseksi soluttomasta supernatantista tai uutteesta. Ensimmäisessä vaiheessa ihmisen immuuni-interferoni adsorboidaan selektiivisesti affiniteettipylvääseen, adsorboimattomat epäpuhtaudet pestään pois pylväästä ja siten ihmisen immuuni-interferoni eluoidaan muodossa, jonka puhdistusaste on korkeampi. Ihmisen immuuni-interferonin affiniteettipylväspuhdistus on jo tutkimustyössä tunnettu. Spesifiset pylväsmateriaalit sekä seluutio-olosuhteet eivät ole ahtaasti kriittisen tarkkoja kyseessä olevan keksinnön käytännön suhteen ja täten saatetaan käyttää mitä tahansa tutkimustyössä käytettyä affiniteettikromatografiamenetelmää, esim. lasia, jolla on säädetty huokoskoko tai tuettua lektiinipylvästä. Keksinnön mukaiseen, kolmivaiheiseen menetelmään soveltuva, edullinen affiniteettikromatografiamenetelmä, sikäli kuin on kysymys luonnossa esiintyvistä interferonista, käyttää hyväksi konkavaliini-A Sepharose-pylvästä, joka on kauppa-artikkeli, joka on mieluummin esipestetty fosfaatilla purkuroidulla suolaliuoksella tai elatusaineella, kuten esim. minimaalielatusaineilla. Pylvään pakkaamisen ja sen jälkeen, kun se on pesty ainakin yhdellä tilavuudella PBS:a tai mainittua elatusainetta, ihmisen immuuni-interferoni voidaan eluoida laimealla puskuroidun α -metyyli-D-mannosidin liuoksella, jonka konsentraatio on mieluummin noin 0,2M.

Affiniteettikromatografiavaiheesta saadut, yhdistetyt aktiiviset jakeet käytetään sitten uuteen, erittäin tehokkaaseen, nestekromatografiavaiheeseen, jossa

käytetään kati-ioninvaihtajaa. Tässä toisessa vaiheessa valmistetaan karboksimeyyliipihappopylväs (CM) pesemällä se suhteellisen väkevöidyllä, esim. 1-2 M suolaliuoksella, kuten esim. alkalimetallihalogenidilla, -fosfaatilla tai
 5 -sulfaatilla, mieluummin KCl:lla. Sitten pylväs uudelleen tasapainotetaan vettä sisältävällä puskurilla, mieluummin fosfaattipuskurilla, pH 7,5 tai vedellä ja siihen pannaan affiniteettipylväsvaiheesta saadut, yhdistetyt aktiiviset jakeet, jotka on laimennettu vedellä. Sen jälkeen, kun pylväs on pesty vedellä tai liuoksella, jolla on alhainen suolakonsentraatio, kunnes effluentissa havaittu proteiinikon-
 10 sentraatio palaa taustan tasolle, pylväs eluoidaan lisääntyvän suolakonsentraation gradientilla. Aktiiviset jakeet havaitaan eläinkokeen avulla ja ne yhdistetään. Pylvään koko, käytetyt virtausnopeudet sekä käytetyt puskurit eivät ole hyvin kriittisiä keksinnön onnistuneelle käytännön toteutukselle. Olisi huomattava, ettei valittu suolaliuos saisi häiritä proteiinin havaitsemiseen käytettyä metodiikkaa. Edullinen järjestelmä käyttää hyväksi proteiinin fluoreskaniini-analyysiä ja yhteen sopivaa suolagradienttia,
 20 joka on valmistettu 0-1 molaarisesta kalsiumkloridista puskuriliuokseen, kuten esim. laimeaan kalsiumfosfaattiin, pH 7,5.

Karboksimeyyliipihappopylvästä saadut aktiiviset
 25 jakeet yhdistettiin ja väkevöitiin. Immuuni-interferonia sisältävän liuoksen väkevöintiin edullinen menettely on käyttää suodatinsuppiloa, mieluiten suodatinsuppiloa CF 25, joka on edeltäkäs in pesty 0,4 M HCl:lla, 25 mM kaliumfosfaatilla, pH 7,5 sekä H₂O:lla. Väkevöity liuos ruiskutetaan
 30 sitten etukäteen tasapainotettuun piihappogeelipermeaatiopylvääseen ja eluoidaan laimealla, puskuroidulla suolaliuoksella. Kuten aiemmin, suola, joka saatetaan käyttää, ei ole rajoittuneesti kriittinen ja se saatetaan valita min-
 35 kä tahansa alkalimetallihalogenidin, -fosfaatin tai sulfaatin joukosta, mieluummin se on kaliumkloridi konsentraatioalueella 0,01 - 1,0 M. Tässä vaiheessa käytetty puskuri on laimea alkalimetallifosfaattipuskuri, mieluummin

kaliumfosfaatti, pH 7,5. Puhdistettu ihmisen immuuni-interferoni eluoituu yksinkertaisena proteiinin päähuippuna biologisen aktiivisuuden vastatessa tätä proteiinihuippua. Riippuen lähtöaineena käytetyn raa'an immuuni-interferonin tilasta ja puhdistusvaiheiden tehokkuudesta, saattaa tässä kohdassa olla mahdollista saada homogeeninen tuote. Kuitenkaan, jos valmistetta ei ole vielä täydellisesti puhdistettu, aktiiviset jakeet on mahdollista uudelleen väkevoidä ja sitten toistaa kromatografia joko TSK- tai CM-pylväässä

10 homogeenisuuden saavuttamiseksi.

Jakeet, jotka oli saatu karboksimeetyylipiihappo sekä piihappogeelipermeaatiopylväistä, määritettiin sytopaattisen vaikutuksen (CPE) estomäärityksellä, kuten on kuvattu US-patentissa nro 4 241 174, joka on julkaistu joulukuun

15 23 p:nä 1980, käyttäen sekä Hep-2:a (ihmisen) sekä MDBK:a (härän) määrittämissoluina. Jakeilla, jotka oli saatu molemmista pylväistä, todettiin virustenvastaista aktiivisuutta ihmisen Hep-2 solulinjan avulla, mutta aktiivisuutta ei havaittu, kun samat jakeet testattiin härän MDBK-

20 soluja vastaan. Tämä lajispesifisyys ilmaisee ihmisen immuuni-interferonin läsnäolon ja sulkee pois ihmisen leukosyytti- tai fibroblastityyppisen interferonin olennaisten määrien läsnäoloa, mikä voisi antaa positiivisen tuloksen härän MDBK-soluja vastaan.

25. Homogeenisella ihmisen immuuni-interferonilla, joka oli saatu käyttämällä yllä mainittua menetelmää, oli spesifinen aktiivisuus noin 1×10^8 yksikköä/mg proteiinia. Spesifisen aktiivisuuden arvo oli vain likimääräinen, mikä johtuu määrityksen luontaisesta vaihtelevuudesta sekä ihmisen immuuni-interferonin viitestandardin puuttumisesta.

30 Homogeenisen proteiinin näennäinen molekyylipaino on noin 45 000 daltonia polyakryyliamidigeelielektroforeesilla natriumdodekyylisulfaattissa määritettynä. Tämä molekyylipaino on myös sopusoinnussa sen TSK-pylväässä tapahtuvan ryhmit-

35 tymisen kanssa.

Interferoneilla on virustenvastaista, kasvaintenvastaista, kasvua inhiboivaa sekä immuunosuppressioaktiivi-

suutta. Nämä aktiivisuudet on saatu vieläpä kliinisellä tasolla käyttäen päivittäin $1-10 \times 10^6$ yksikköä suhteellisen raakoja valmisteita, joista vähemmän kuin 1 % oli ihmisen interferonia. Aivan äskettäin on kliinisiin kokeisiin otettu erittäin puhtaita ihmisen yhdistelmäleukosyytti-interferoneita A ja D (IFLr-A ja IFLr-D). IFLr-A:lla suoritetuilla nousevien annosten testeillä on havainnollistettu, että voidaan sietää yksittäisiä annoksia, jotka ovat aina 198 miljoonan yksikön suuruisia. Yleensä voidaan käyttää terapeuttisia päiväannoksia, jotka ovat noin 10-100 miljoonan yksikön alueella, mieluiten noin 50 miljoonaa yksikköä. Ihmisen homogeenista immuuni-interferonia voidaan käyttää samalla annosalueella suoraan analogisesti edellä esitetyn kanssa. Samanaikaisessa hoidossa on myös mahdollista käyttää hyväksi useampaa kuin yhtä ihmisen interferonityyppiä. Aiheeseen perehtyneille ovat selviä sopivat, käytettävät annosohjeet, kun käytetään esim. ihmisen immuuni-interferonia ihmisen leukosyytti-interferoniin, kuten esim. IFLr-A:n, yhdistettynä. Sellaisen samanaikaisen hoidon käytön tulokseksi on interferonien aktiivisuuden lisääntyminen sekä sen määrän väheneminen, joka tarvitaan halutun terapeuttisen vaikutuksen saavuttamiseen.

Tämän keksinnön menetelmä- ja valmistusnäkökantoja valaistaan edelleen viittaamalla seuraaviin esimerkkeihin:

25. Esimerkki 1

7-10 normaalin henkilön luovuttama veri (noin 50 ml/luovuttaja) kootaan leukoforeesin avulla. Kukin millilitra leukoforeesin avulla käsiteltyä verta tuottaa 15×10^6 leukosyyttiä. Leukosyytit erotetaan punasoluista sedimentoimalla 2-%:isessä hydroksietyylitärkkelyksessä. Leukosyytit imeetään ylemmästä jakeesta ja kootaan sentrifugoimalla $500 \times g$:lla.

Sitten leukosyytit inokuloidaan konsentraationa 10^6 solua/ml 5-8 litraan RPMI 1640 elatusainetta (Gibco), johon on lisätty 2-10 % vasikan sikiön seerumia, 25 mM Hepesiä sekä 0,2 - 0,5 $\mu g/ml$ PHA-L:a. PHA stimuloi solujen lisääntymistä. Viljelmää inkuboidaan kahden päivän ajan $37^{\circ}C$:ssa,

16 litran vetoisessa pullossa. Solut kahdentuvat 1-2 kertaa tämän inkubaation kuluessa.

Viljelmä indusoidaan, sen jälkeen kun on lisätty yhtä suuri tilavuus tuoretta elatusainetta TPA:n ja PHA:n
 5 kanssa, kuvatulla tavalla. Forboliesteriä lisätään viljelyastiaan konsentraationa 10 ng/ml kolmeksi tunniksi, jonka jälkeen lisätään PHA:a 2 μ g/ml. Induktio tapahtuu noin 96 tunnin ajan. Sitten solut kootaan sentrifugoimalla 1 000 x g ja immuuni-interferonia sisältävä supernatantti suodatetaan
 10 (3 mikronia) solunpirstaleiden poistamiseksi. Suodatettu liuos on nyt valmis puhdistettavaksi.

Kaikki seuraavat vaiheet suoritettiin kylmässä, 4°C:n lämpötilassa.

Edellä kuvatulla tavalla saatu, konditionoitu elatusaine suodatettiin peräkkäin jälleen 3 mikronin ja sitten 0,22 mikronin Nalgene-suodattimen läpi. Sitten se pantiin konkavaliini-A Sepharose (Con A) -pylvääseen (Pharmacia Fine Chemicals or Sigma Chemical Co.), joka aiemmin oli pesty joko Dulbeccon fosfaatilla puskuroidulla keittosuola-
 20 liuoksella (PBS) (Grand Island Biological Supply Co.) tai F-11 elatusaineella (Grand Island Biological Supply Co.). Tyypillisesti käytettiin 35 ml pakatun kolonnin tilavuutta adsorboimaan immuuni-interferoni 1 litrasta konditinoitua elatusainetta. Pylväs pestiin sitten ainakin yhdellä pylvään tilavuudella PBS:a tai F-11 elatusainetta. Interferoni
 25 eluointiin sitten PBS:llä, jossa oli 0,2 M α -metyyli-D-mannosidia ja aktiiviset jakeet yhdistettiin. Sellaisten aktiivisten jakeiden stabiliteetti on esitetty alla taulukossa 1.

Taulukko 1

Con A -puhdistetun immuuni-interferonin stabiliteetti
4°C:ssa

	Viikkoja	Havaittu tiitteri (yks./ml)
5	0	$3,0 \times 10^5$
	1	$3,1 \times 10^5$
	2	$1,5 \times 10^5$
	3	$7,7 \times 10^4$
	5	$4,1 \times 10^4$
10	8	$4,1 \times 10^5$
	11	$2,0 \times 10^5$
	12	$6,1 \times 10^5$

Määrittäminen

Kaikki immuuni-interferoninäytteet titrattiin käyttämällä CPE:n vähenemismäärittäystä, kuten on kuvattu U.S. 4 241 174:ssä, paitsi että Hep-2-soluja (ATCC nro CCL 23) käytettiin määrittäyssoluina. Määrittäykset oli suoritettava vesicular stomatitis viruksella (VSV) kuuden tunnin mittaisen, interferoninäytteen ja määrittäyssolujen kanssa suoritettuna inkuboinnin jälkeen.

Kaikki immuuni-interferonitiitterit sovitetaan viiteyksiköiden mukaisesti käyttämällä NIH (G-023-901-527) leukosyytti-interferonistandardia.

Seuraavassa puhdistusvaiheessa käytettiin hyväksi erittäin tehokasta, heikon kati-ioninvaihtajan sisältävää liuoskromatografiapylvästä. CM 200 hartsi, 10 μ m (Separation Industries, Orange, N.J.) pakattiin I.D.-pylvääseen, jonka koko oli 25 x 0,46 cm ja valmistettiin käyttöä varten puhdistamalla 2M KCl:lla ja tasapainotettiin uudelleen 25 mM fosfaattipuskurilla, pH 7,5 tai tislatusella ionittomalla vedellä (tämän laatuista vettä käytettiin läpi koko tämän menetelmän). Con-A-pylväästä saatu, aktiivinen, koottu eluaatti laimennettiin yhtä suurella tilavuudella vettä ja pumpattiin nopeudella 1,5 ml/min CM-pylvääseen. Pylväs pestiin sitten 25 mM kaliumfosfaatilla, pH 7,5, kunnes proteiinin määrä pylvään effluentissa oli jälleen taustan tasolla, fluoreskaniinin avulla suoritettuna pylvään automaattisella

tarkkailulla määritettynä. Pylväs eluoitiin sitten nopeudella 0,5 ml/min KCl:n nousevalla gradientillä (0-1 M) 25 mM:ssa kaliumfosfaattipuskurissa, pH 7,5. Interferoni eluoitui pylvästä lähellä suolagradientin keskikohtaa ja 5 aktiiviset jakeet määritettiin biologisen määrityksen avulla.

CM-pylvästä saadut aktiiviset jakeet yhdistettiin ja väkevöitiin esipestyllä CF-suodatinsuppilolla (Amicon Corp.). Sitten väkevöity liuos (0,5 ml tai vähemmän) ruiskutettiin TSK 250 pihappogeelipermeaatiopylvääseen (30 x 10 0,75 cm) (Bio-Rad Laboratories), joka oli edeltä käsin tasapainotettu ja eluoitiin 0,3 M KCl:lla, 25 mM kaliumfosfaatilla, pH 7,5, nopeudella 24 ml/h ja jakeet koottiin yhden minuutin välein. Aktiivisuus vastasi proteiinihiuippua. 15 Homogeeninen immuuni-interferoni saatettiin saada yhdessä tai useammassa jakeessa tässä vaiheessa, riippuen lähtöaineesta ja aiempien vaiheiden tehokkuudesta. Jos on tarpeellista, epäpuhtaita jakeita voidaan uudelleen väkevöidä ja uudelleen kromatografoida TSK- tai CM-pylväässä homogeenisuuden saavuttamiseksi. 20

Yllä kuvatulla tavalla indusoiduista ihmisen leukosyyteistä valmistetun ihmisen homogeenisen interferonin aminohappoanalyysi suoritettiin fluoreskaniinin avulla, pylvään jälkeistä havaitsemista käyttäen. Näytteet kuivattiin 25 tyhjiössä ja hydrolysoitiin 6N HCl:lla, joka sisälsi 4 % tioglykoli-happoa, 24 tunnin ajan tyhjiössä, 110°C:ssa. Systemiinihappoanalyysiä varten näytteitä käsiteltiin permura-haishapolla kahden tunnin ajan 0°C:ssa, kuivattiin ja hydrolysoitiin 6N HCl:ssa, 24 tunnin ajan tyhjiössä, 110°C:ssa. 30 Kahden näytteen aminohappoanalyysi (yksi näyte kahtena kapaleena) annetaan alla olevassa taulukossa 2. Olisi huomattava, ettei analyysiä korjata tiettyjen herkkien aminohappojen, kuten esim. tryptofaanin, treoniinin ja seriinin häviöiden eikä epätäydellisen hydrolyysin suhteen.

Taulukko 2

Ihmisen immuuni-interferonin aminohappokoostumus

		Ajo			Keskiarvo
		A	B	C	
5	Asp	49,7	32,9	32,1	38,2 ± 7,6
	Thr	28,4	21,2	22,5	24,0 ± 2,9
	Ser	26,0	19,4	19,1	22,5 ± 3,3
	Glu	51,0	37,9	41,9	43,6 ± 5,1
	Pro*		18,6	24,3	21,5 ± 3,4
10	Gly	25,2	22,9	20,9	23,0 ± 1,5
	Ala	26,7	23,2	24,3	24,7 ± 1,3
	Val	25,1	24,3	24,2	24,5 ± 1,7
	Met	4,0	3,9	4,3	4,1 ± 0,2
	Ile	18,5	18,4	17,9	18,3 ± 0,3
15	Leu	39,4	40,0	41,2	40,2 ± 0,7
	Tyr	10,0	10,0	10,8	10,3 ± 0,4
	Phe	17,8	17,8	18,5	18,0 ± 0,3
	His	5,3	5,2	6,4	5,6 ± 0,5
	Lys	23,8	32,3	25,0	27,0 ± 3,5
20	Arg	20,0	22,2	22,0	21,4 ± 0,7
	Trp	1,8	2,7	2,2	2,2 ± 0,3
	Cys	5,9		4,0	5,0 ± 1,0

*Arvot voivat olla artefaktien vuoksi liian korkeita

25

Kuten edellä on osoitettu, ihmisen homogeeniselle immuuni-interferonille spesifinen aktiivisuus on noin 1×10^8 yks./mg ja homogeenisen proteiinin näennäinen molekyylipaino on noin 45 000 daltonia polyakryyliamidi (10-20 % gradientti)-geelielektroforeesin mukaan, joka suoritetaan SDS:ssä käyttämällä noin 100 ng suuruista panosta sekä hopeavärjäystä.

30

Esimerkki 2

Ihmisen homogeenisen immuuni-interferonin parenteraalinen annosmuoto

35

Injektioon käytettävä ihmisen homogeeninen immuuni-interferoni on lyofilisoitu valmiste, joka on steriileissä

- pulloissa. Kukin pullo sisältää noin 15 ng ihmisen homogeenisesta interferonista. Lyofilisoitu kakku liuotetaan uudelleen ennen käyttöä 1 ml:aan steriiliä vettä injeksiota varten. Tämä valmiste soveltuu lihakseen suoritettavaan injektioon eikä suonensisäiseen käyttöön. Formulaatio voi sisältää seuraavia aineosia:

Aineosat	Määrä pulloa kohti	Kohtuullinen vaihtelu pulloa kohti
Ihmisen homogeeninen		
10 immuuni-interferoni	15 ng	7-23 ng
Natriumkloridi	9 mg	7-11 mg
Fenoli*	3 mg	2-4 mg
Ihmisen seerumin albumiini	5 mg	3-7 mg
Vesi injeksiota varten	1 ml	1-2 ml
15 *Hävinnyt suurimmaksi osaksi lyofilisoinnin aikana.		

Patenttivaatimukset:

1. Menetelmä ihmisen immuuni-interferonin puhtauden lisäämiseksi, t u n n e t t u siitä, että menetelmässä
5 liuos, joka sisältää osittain puhdistetun ihmisen immuuni-interferonin, pannaan heikon kati-ioninvaihtajan sisältävään nestekromatografiapylvääseen, jolla on korkea suorituskyky ja aktiiviset jakeet, jotka sisältävät ihmisen immuuni-interferonin, jolla on lisääntynyt puhtaus, eluoidaan pylvääs-
10 tä käyttämällä nousevan suolakonsentraation gradienttia.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu heikko kationinvaihtajanestekromatografiapylväs on karboksimeetyyliselluloosa.
3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu pylväs eluoidaan KCl:n 0-1 M gradientilla kaliumfosfaattipuskurissa, pH 7,5.
4. Menetelmä ihmisen immuuni-interferonin puhtauden lisäämiseksi, t u n n e t t u siitä, että liuos, joka si-
20 sisältää osittain puhdistetun ihmisen immuuni-interferonin, pannaan piihappogeelipermeaatiopylvääseen ja aktiiviset jakeet, jotka sisältävät ihmisen immuuni-interferonin, jolla on alhainen suolakonsentraatio.
5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu eluutioliuos on 0,3 M KCl
25 25 mM kaliumfosfaattipuskurissa, pH 7,5.
6. Menetelmä ihmisen homogeeneen immuuni-interferonin valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että menetelmä käsittää seuraavien valmistusvaiheiden yhdistelmän:
 - a) ihmisen raaka immuuni-interferoniliuos lasketaan
30 affiniteettipylvään läpi, joka adsorboi mainitun interferonin, adsorboitumattomat epäpuhtaudet pestään mainitusta pylväästä ja aktiiviset jakeet, jotka sisältävät ihmisen immuuni-interferonin, eluoidaan mainitusta pylväästä;
 - b) vaiheesta a) saadut, kootut, aktiiviset jakeet
35 lasketaan heikon kationinvaihtajanestekromatografiapylvään läpi, jolla on korkea suorituskyky ja aktiiviset jakeet, jotka sisältävät ihmisen immuuni-interferonin, jolla on

lisääntynyt puhtaus, eluoidaan pylvästä käyttämällä nousevan suolakonsentraation gradienttia;

c) vaiheesta b) saadut, kootut, aktiiviset jakeet lasketaan piihappogeelipermeaatiopylvään läpi ja aktiiviset jakeet, jotka sisältävät ihmisen interferonin, jolla on lisääntynyt puhtaus, eluoidaan pylvästä käyttämällä purkuroitua liuosta, joka sisältää alhaisen suolakonsentraation ja, jos on välttämätöntä,

d) vaiheesta c) saadut, yhdistetyt aktiiviset jakeet kierrätetään uudelleen vaiheen b) tai vaiheen c) kautta ihmisen homogeeneen immuuni-interferonin saamiseksi.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu affiniteettipylväs menetelmän vaiheessa a) on konkavaliini-A Sepharose, raaka ihmisen immuuni-interferoni on luonnossa esiintyvää materiaalia ja aktiiviset jakeet eluoidaan puskuroidulla α -metyyli-D-mannosidi-liuoksella.

8. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vaiheen b) mainittu, heikko kationin-vaihtajanestekromatografiapylväs on karboksimeetylipiihappoa ja mainittu pylväs eluoidaan KCl:n 0-1 M gradientilla kaliumfosfaattipuskurissa, pH 7,5.

9. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu piihappogeelipermeaatiopylväs eluoidaan liuoksella, jossa on 0,3 M KCl:a 25 mM kaliumfosfaattipuskurissa, pH 7,5.

10. Menetelmä parenteraalisen annosmuodon valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että mainitussa menetelmässä sekoitetaan ihmisen homogeeneen immuuni-interferoni kantaja-aineen kanssa, joka soveltuu parenteraaliseen annosteluun ja terapeuttisesti soveltuvien adjuvanttien kanssa sekä viedään syntyvä seos sopivaan annosmuotoon, haluttaessa vesiliuoksen lyofilisointi mukaan lukien.

Patentkrav:

1. Förfarande för ökande av renheten hos mänskligt immuninterferon, k ä n n e t e c k n a t därav, att för-
5 farande omfattar ledande av en lösning, vilken innehåller partiellt renat mänskligt immuninterferon, på en högeffektiv, svagt katjonbytande, flytande kromatografikolonn och eluerande av aktiva fraktioner, vilka innehåller mänskligt immuninterferon av ökad renhet från kolonnen genom användan-
10 de av en gradient med ökande saltkoncentration.
2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att nämnda svagt katjonbytande, flytande kromatografikolonn är karboximetylkiselsyra.
3. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att kolonnen elueras med en 0-1M-
15 gradient av KCl i kaliumfosfatbuffertmedel, pH 7,5.
4. Förfarande för ökande av renheten hos mänskligt immuninterferon, k ä n n e t e c k n a t därav, att förfarandet omfattar ledande av en lösning, vilken innehåller
20 partiellt renat, mänskligt immuninterferon, på en silikagelgenomträngningskolonn och eluerande av aktiva fraktioner, vilka innehåller mänskligt immuninterferon av ökad renhet från kolonnen genom användning av en buffertlösning med låg saltkoncentration.
- 25 5. Förfarande enligt patentkravet 4, k ä n n e t e c k n a t därav, att elueringslösningen är 0,3 M KCl i 25 mM kaliumfosfatbuffermedel, pH 7,5.
6. Förfarande för framställning av homogent, mänskligt immuninterferon, k ä n n e t e c k n a t av en kombination
30 av nedanstående processteg, vid vilka man
 - a) leder en lösning av rått, mänskligt immuninterferon genom en affinitetskolonn, vilken absorberar det nämnda interferonet, tvättar icke adsorberade förorenligheter från kolonnen och eluerar aktiva fraktioner, vilka innehåller
35 mänskligt immuninterferon, från kolonnen;
 - b) leder de uppsamlade aktiva fraktionerna från steget a) på en högeffektiv, svagt katjonbytande, flytande

kromatografikolonn och eluerar aktiva fraktioner, vilka innehåller mänskligt immuninterferon av ökad renhet, från kolonnen genom användande av en gradient med ökande saltkoncentration;

5 c) leder uppsamlade aktiva fraktioner från steg b) på en silikagelgenomträngningskolonn och eluerar aktiva fraktioner, vilka innehåller mänskligt immuninterferon av ökad renhet, från kolonnen genom användning av en buffertlösning med låg saltkoncentration och, ifall behövt,

10 d) återcirkulerar uppsamlade aktiva fraktioner från steget c) ånyo genom steget b) eller steget c) erhållande av homogent mänskligt interferon.

7. Förfarande enligt patentkravet 6, k ä n n e - t e c k n a t därav, att affinitetskolonnen i steget a) 15 är concanavalin-A Sepharose, att det råa mänskliga immuninterferonet är naturellt förekommande material och att de aktiva fraktionerna elueras med en buffert α -metyl-D-mannosidlösning.

8. Förfarande enligt patentkravet 6, k ä n n e - t e c k n a t därav, att den svagt katjonbytande, flytande 20 kromatografikolonnen i steget b) är karboximetylkiselsyra och att kolonnen elueras med en 0-1 M gradient av KCl i ett kaliumfosfatbuffertmedel, pH 7,5.

9. Förfarande enligt patentkravet 6, k ä n n e - t e c k n a t därav, att silikagelgenomträngningskolonnen 25 elueras med en lösning bestående av 0,3 M KCl i 25 mM kaliumfosfatbuffertmedel, pH 7,5.

10. Förfarande för framställning av en parenteral doseringsform, k ä n n e t e c k n a t därav, att homogent 30 mänskligt immuninterferon blandas med en bärare, vilken lämpar sig för parenteral administrering, och med terapeutiskt lämpliga hjälpämnen, varefter den resulterande blandningen bringas i en lämplig doseringsform, vilket, ifall önskvärt, inkluderar lyofilisering av en vattenlösning.

Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patentansökning

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

FI 69476 , 70721 (C O7K 15/26)

CH

DE

DK

FR

GB

NO

SE

US

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

EP

WO

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

Chemical Abstracts vol 92 (1980) 39568r
Nature vol 292 (1981) J. Nathan et al., "Immune
(γ)interferon produced by a human T-lymphoblast
cell line" s 842-844

Anja Verhas
Allekirjoitus