

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 750951 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application 750951

(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 7404589

(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 stabilointi

Stabilisering av interferon

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

Koko kokous:

Interferonin stabilointi, (yhteinen)

Täsmennykset

Ka.
muut
muut
↓

Interferonin stabilointi. - Stabilisering av interferon.

Tämän keksinnön kohteena on interferonin stabilointi.

Nimi interferoni on annettu ^{solun} sellulaariselle ^{solun} antiviruseräälle, joka voidaan ottaa talteen elävistä soluista ja ekstrasellulaarisista nesteistä. Sen tuottoa soluissa voivat stimuloida useat ^{agenteit} agenssit, mukaanlukien ensisijassa virukset ja joukko muita ^{agenteit} agensseja bakteereista ^{et} suurimolekyyllipainoisiin ^{et} polymeereihin ^{et} 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, Cleveland, 1973, jotka on esitetty tässä yhteydessä viitteenä.

Vaikkakin interferonin fysikaalisen ja kemiallisen karakterisoimisen suhteen on tehty paljon työtä, ei ole vielä ollut mahdollista määrittää varmasti sen kemiallista rakennetta. Näyttää ilmeiseltä, että interferoni on ~~laadultaan~~ ^{m. laatuun} proteiinimainen, mutta suurin osa sen yksityiskohdista ~~ovat~~ ^{on} epävarmoja. Tämän kemiallisen rakenteen määrittämisestä suuresti on estänyt se seikka, että interferoneja näyttää olevan olemassa useita molekyyllilajeja. Näillä lajeilla on eri molekyyllipainot 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 ~~agensin~~ ^{ag. c. c.} 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~~ ^{pitkä} säilytys, epäsuotuisat pH-arvot, korkeammat lämpötilat ja kemialliset ja mekaaniset käsitteletyt kuten ravistelu, toistuvat pakastus- ja sulatusjaksot, vaahdotus suodattamisen aikana ~~ja vastaavat~~. Eräillä toisentyyppisillä interferoneilla kuten ihmisten fibroblasti-interferonilla on sellainen epästabiilisuus, että ~~niiden~~ ^{se} aktiivisuustasot eivät ole luotettavia. Lisäksi jopa suhteellisesti kaikkein stabiilimmat interferonityypit näyttävät tulevat labiileiksi 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~~ ^{eivät ole} suojaamista, ja tällä on puhdistamisen tavoitteen vastainen vaikutus. Siten jatkuvasti tarvitaan menetelmää, jolla interferoni stabiloidaan ^{stabiilista} tehokkaasti, ja erityisesti menetelmää, jolla ~~stabiloidaan~~ ^{stabiloidaan} ~~kaikentyyppiset~~ ^{erilaisia} interferonit, jotka ovat vähemmän stabiileja ~~inaktivaation~~ ^{inaktiivisuuden} kannalta joko luoteensa tai pitkälle menneen puhdistamisen vuoksi.

Keksinnön tavoitteena on täyttää tämä tarve ja tuoda esiin interferonin stabilointimenetelmä, jolla ei ole edellä mainittuja haittoja. Keksinnön tavoitteena on edelleen saada aikaan stabiloitu interferoni, joka sopii edelleen puhdistettavaksi ja kliiniseen arviointiin oleellisesti menettämättä aktiivisuuttaan.

Keksinnön mukaisesti on nyttemmin havaittu, että interferoni voidaan stabiloida käsittelemällä ^{siinä} kolmen ^{aineen} 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 natriumdodesyyilisulfaatti tai dodesyyliamiini. Kun interferonia käsitellään näillä reagensseilla, se säilyttää oleellisesti alkuperäisen aktiivisuutensa eikä inaktivoidu edellä mainittujen olosuhteiden ja käsittelyiden vaikutuksesta.

Tämän odottamattoman havainnon ansiosta on nyt mahdollista valmistaa stabiili interferonituote, joka sopii puhdistettavaksi edelleen ja kliiniseen arviointiin. Lisäksi on mahdollista aloittaa interferonin valmistaminen suuremmassa mitassa.

Keksinnön aiheuttaman stabiloitumisen mekanismi ei ole vielä aivan selvä. Kuitenkin oletetaan, että interferonimolekyyli käsittää polypeptidiketjun, jossa on kovalenttisia ja ei-kovalenttisia sidoksia ja jossa on edelleen yksi tai useampia disulfididisilloja; aine, joka katkaisee ei-kovalenttiset sidokset, ja aine, joka pelkistää disulfidisillat, muuntavat tällöin luultavasti molekyylin natiivin muodon

2 tai konformaation toiseksi konformaatioksi, ^{muodoksi} jonka muoto on nk. "linear random coil" ^{h.s.} ja jossa on vapaita sulfhydryyliryhmiä. Sen jälkeen pinta-aktiivinen aine voi sitoutua polypeptidimolekyylin varautuneisiin ryhmiin ja suojata vapautuneita sulfhydryyliryhmiä ja suojata näin nämä ryhmät uudelleen hapettumiselta, johon liittyy disulfididisiltojen intramolekulaarista tai intermolekulaarista uudelleenmuodostumista.

Suom. Vaikkakin nämä reaktiot saavat aikaan interferonimolekyylin denaturoitumisen, niillä on siitä huolimatta suojaava vaikutus, ja näin on mahdollista puhua suojaavasta denaturoisesta. Haluttaessa saadusta tuotteesta voidaan dialyysin avulla poistaa katkaisevat ja pelkistävät aineet sekä ylimääräinen pinta-aktiivinen aine. Kun tuotetta inkuboidaan myöhemmin yhdessä proteiineja sisältävän ^{väliseinän} mediumin, kuten eläviä soluja sisältävän ^{soluainesten} mediumin kanssa, tuote kehittää spontaanisesti aktiivisen ^{muodon} konformaation, jolla on oleellisesti natiivin interferonin ^{aktiivisuutta}

alkuaktiivisuus. Koko tapahtumaa voidaan kuvata interferonin stabi-
loimiseksi suojaavan denaturoinnin avulla.

Luonnollisesti on ilmeistä, ettei ^{e.} Tämä teoreettinen selitys rajoita
keksintöä. ~~Sen sijaan~~ ^{no. määrittely} Keksintö käsittää kaikki tunnusmerkit ~~ja aineet~~,
jotka kuuluvat ~~mukaanliitettyjen~~ ^{no. määrittely} vaatimusten piiriin.

Keksinnön menetelmää toteutettaessa lähtöaine voi olla minkä tahansa
tyyppinen natiivi tai puhdistettu interferoni ^{siis} ja tilassa, joka on ^{siis}
~~seuraus valmistamisesta~~ ^{uuden} ja/tai puhdistamisesta ^{uuden yhteydestä} edellyttää, että se
~~ei~~ ole oleellisesti menettänyt alkuperäistä aktiivisuuttaan. Inter-
feronilähde ei ole oleellisesti kriittinen, vaikkakin parhaina pide-
tään sen tyyppisiä interferoneja, jotka ovat luonteeltaan suhteelli-
sen epästabiileja tai epästabiileja puhdistamisen seurauksena kuten
hiiri-interferonia ja ihmisten ^{uuden} fibroblasti-interferoni. Useimmissa
tapauksissa ^{uuden} tämä interferoni saadaan vesiliuoksena, jonka aktiivisuus
on välillä noin 10^3 ja 10^8 interferoniyksikköä per mg proteiinia
(tai noin 10^1 - noin 10^6 interferoniyksikköä per ml liuosta), ja tätä
liuosta voidaan käyttää sellaisenaan keksinnön mukaisessa menetelmäs-
sä.

^{ks.}
^{uuden}
^{uuden} Keksinnön mukaisesti tätä interferonia käsitellään kolmen reagenssin,
so. aineen, joka katkaisee ei-kovalenttiset sidokset, aineen, joka
pelkistää disulfidisillat, ja anionisen tai kationisen pinta-aktiivi-
sen aineen yhdistelmällä.

Aine, joka katkaisee ei-kovalenttiset sidokset, voi olla mikä tahansa
tämän tyyppinen sopiva aine. Tyypillisiä esimerkkejä ovat urea
ja guanidiini-hydrokloridi, joista ureaa pidetään parempana.

Keksityssä menetelmässä käytetyn tällaisen aineen määrän tulisi olla
niin suuri, että se riittää aiheuttamaan interferonimolekyylin poly-
peptidiketjun avautumisen niin, että tuloksena on "linear random
coil". Yleensä käytetty ureamäärä 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 kyllästymis-
piste.

Aine, joka pelkistää disulfidisillat, voi olla mikä tahansa tämän
tyyppinen tavanomainen aine. Tyypillinen esimerkki on etaanitioli

tai merkapttoetanoli. Keksityssä menetelmässä käytetyn määrän tulisi olla niin suuri, että se riittää pelkistämään kaikki interferonimolekyyli-
 kyllissä olevat disulfididisillat. Useimmissa tapauksissa merkapttoetanolin määrä on sellainen, että saatu liuos sisältää vähintään $10^{-2}M$ merkaptto-etanolia. 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 merkapttoetanolin konsentraatioita noin $1,4 \times 10^{-2}M - 1,4 \times 10^{-1}M$.

Anioninen tai kationinen pinta-aktiivinen aine voi olla mikä tahansa tämän tyyppinen tavanomainen aine. Anioniseksi pinta-aktiiviseksi aineeksi riittää useimmissa tapauksissa alkyylisulfaatti, jonka alkyyliryhmässä on 8-22 hiiliatomia, kuten esimerkiksi natriumdodesyyli-sulfaatti tai natriumdodesyyli-sulfaatti, mutta haluttu vaikutus voi olla myös vastaavalla alkyylisulfonaatilla kuten natriumdodesyyli-sulfonaatilla. Kationinen aine on yleensä alkyyliamiini, jonka alkyyliryhmässä on 8-22 hiiliatomia, kuten esimerkiksi dodesyyliamiini tai dodesyyliamiini. Tämän aineen käytetyn määrän tulisi riittää sitoutumaan proteiiniin ja suojaamaan interferonimolekyylin sulfhydryyliryhmät, jotka edellä mainittu pelkistysaine on vapauttanut. Halutun vaikutuksen varmistamiseksi useimmissa tapauksissa käytetään 1- - 5-kertaista ylimäärää pinta-aktiivista ainetta laskettuna liuoksessa olevan proteiinin kokonaismäärästä. Jos lähtöaine on interferoniliuos, joka sisältää noin 10^4 interferoniyksikköä per millilitra, tämä tarkoittaa sitä, että liuoksen tulisi sisältää vähintään 1×10^{-3} ja korkeintaan $1 \times 10^{-1}M$ pinta-aktiivista ainetta. Tässä tapauksessa on suositeltavaa käyttää natriumdodesyyli-sulfaattia $3,5 \times 10^{-3}M - 3,5 \times 10^{-2}M$.

Näiden kolmen ~~reagenssin~~ ^{aineiden} lisäämisjärjestys ei ole kriittinen, vaikkakin on suositeltavaa lisätä pinta-aktiivinen aine samanaikaisesti mainitun kahden muun aineen kanssa tai ennen niitä, jotta varmistauduttaisiin siitä, että tämä pinta-aktiivinen aine kykenee reagoimaan peptidirungon varattujen ryhmien kanssa ja suojaamaan sulfhydryyliryhmät heti, kun pelkistävä aine on vapauttanut ne. Kaikki kolme ainetta lisätään suositellusti oleellisesti samalla hetkellä tai vähän toistensa jälkeen.

Mainittujen kolmen aineen reaktiot interferonin kanssa voivat tapahtua helposti huoneen lämpötilassa, tai yleensä lämpötiloissa $15-30^{\circ}C$.

Siten näiden reaktioiden nopeuttamiseen ei tarvita mitään erityistoi-
menpiteitä. Reaktion jälkeen ylimääräinen pinta-aktiivinen aine ja
molemmat muut reagenssit kokonaisuudessaan voidaan poistaa dialyysin
avulla, vaikkakaan tämä ei ole ehdottoman välttämätöntä.

Käsittely mainituilla kolmella reagenssilla johtaa interferonin täy-
delliseen stabiloitumiseen sellaisia inaktivoitumista aiheuttavia
olosuhteita ja käsittelyjä vastaan kuten ^{esim.} pidennettyä säilytystä, al-
liallista kuumentamista ja ~~vastaavia~~. Urealla, merkaptotoetanolilla
ja natriumdode^{ky}syylisulfaattilla suoritettun käsittelyn jälkeen sekä
ihmis-interferoni että hiiri-interferoni näyttävät täysin kestävän
kuumentamista lämpötilassa 56°C ja 100°C . Pitkäaikainen ^{kuumentaminen} kiehu-
tus käsittely näiden kolmen reagenssin läsnäollessa aiheuttaa jonkin
verran aktiivisuuden häviämistä, mutta jos urea poistetaan dialysoi-
malla ennen ^{kuumentamista} kiehuttamista, niin interferoni pysyy stabiilina myös
pitkään kiehutettaessa.

On huomattavaa, ettei samaa vaikutusta voida saada aikaan vain yh-
dellä tai kahdella edellä mainitulla kolmella reagenssilla. Siten
urealla ja merkaptotoetanolilla, kun niitä käytetään yksin tai yhdessä,
ei ole mitään stabiloivaa vaikutusta interferoniin, vaan pikemminkin
ne lisäävät epästabiilisuutta. Luultavasti interferoni on yhä
"linear random^{my} coil" muotoon muuntuneena, jossa on vapaita sulfhyd-
ryyliryhmiä, mutta molekyyli ei ole tällä tavoin suojattu hapettu-
mista vastaan, ja niin se inaktivoituu lähes kokonaan ^{kuumentamisen} kiehu-
tustekäsittelyn aikana.

Siinä tapauksessa, että pinta-aktiivinen aine lisätään yksinään inter-
feroniin, ~~niin~~ interferonin aktiivisuus pienenee 60-90 % tuotteen
^{kuumentamisen} kiehu-
tuskäsittelyn aikana. Jäljelle jäänyt aktiivisuus pysyy samalla
tasolla niin kauan^{kin} kun pinta-aktiivista ainetta on mukana, mutta
interferonin täydellinen stabiloiminen vaatii aina edellä mainittujen
kolmen ^{aineen} reagenssin yhdistelmää.

Tässä selityksessä esitetyllä interferonin stabilointimenetelmällä
on mahdollista stabiloida interferoni useissa talteenotto- ja puhdis-
tustiloissa ja sen avulla on myös mahdollista säilyttää interferonia
pitkiä aikoja. Suhteellisen puhdasta stabiloitua interferonia, jonka
ominaisaktiivisuus on noin 10^8 yksikköä per mg proteiinia, voidaan
täten antaa kliinisesti stabiloidussa muodossa. Kun otetaan huomioon

se, että proteiinit sitovat yleensä vain 1,44 g natriumdodesyyilisulfaattia per g proteiinia, annos, jossa on miljoonia interferoniyksiköitä, sisältää vain muutaman mikrogramman natriumdodesyyilisulfaattia, eikä kliinisessä käytössä ole odotettavissa komplikaatiovaaroja.

Seuraavat esimerkit havainnollistavat yksityiskohtaisesti keksintöä ~~sitä kuitenkaan rajoittamatta.~~

Esimerkki 1

*Interferoni-
degronaatio*
Lähtöaine oli hiiri-interferonin liuos, joka oli peräisin Newcastle-taudin viruksella stimuloituista L₉₂₉-tyyppisistä soluista. 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-HCl puskuria vasten. Saadun puhdistetun liuoksen aktiivisuus oli 10⁴ interferoniyksikköä per ml (biologinen määritys).

Tämän puhdistetun interferoniliuoksen tasaosaan lisättiin natriumdodesyyilisulfaatin (SDS) vesiliuosta ja sen jälkeen välittömästi kiinteää ureaa ja nestemäistä merkaptoetanolia. Lisätyt määrät olivat sellaiset, että saatu liuos sisälsi ureaa 5 M, merkaptoetanolia 1,4 x 10⁻² M ja natriumdodesyyilisulfaattia 3,5 x 10⁻³ M. Saatua liuosta kuumennettiin 60 minuuttia lämpötilassa 56°C, ~~mutta ulkomuodossa ei havaittu mitään muutosta.~~ Biologinen määritys osoitti, että interferoniaktiivisuus oli säilynyt samalla tasolla. Samanlaiset tulokset saatiin 2 1/2 minuutin jälkeen kiehumisessa lämpötilassa 100°C ja 30 pakastus-(kuivajään ja asetonin seoksessa) ja sulatus- (lämpötilassa 37°C) jakson jälkeen. Käsitelty interferoniliuos osoittautui siten täysin stabiloituneen inaktiivisuutta aiheuttavia olosuhteita ja käsittelyjä vastaan. Vertailun vuoksi suoritettiin samat kokeet puhdistetun lähtöliuoksen toiselle tasaosalle lisäämättä edellä mainittuja reagensseja. Liuoksen aktiivisuus laski noin 10 %:iin alkuperäisestä arvostaan sen jälkeen, kun sitä oli kuumennettu 60 minuuttia lämpötilassa 56°C, ja myös noin 10 %:iin alkuperäisestä arvostaan 30 pakastus-sulatusjakson jälkeen. Kiehumiskokeessa ~~osoittautui, että interferoni-aktiivisuus oli laskenut~~ lämpötilassa 100°C tapahtuneen 1 minuutin kiehumisen jälkeen arvoon alle 10¹ interferoniyksikköä per ml. 2 minuutin kiehumisen jälkeen tapahtui saostumista. Tämä käsittelemätön interferoniliuos oli siten hyvin labiili inaktiivisuut-

ta aiheuttavien olosuhteiden ja käsittelyjen suhteen.

Esimerkki 2

Tasaosaan samaa puhdistettua hiiri-interferoniliuosta, jota käytettiin esimerkissä 1, lisättiin natriumdodesyyilisulfaattiliuosta ja sen jälkeen kiinteää ureaa ja nestemäistä merkapttoetanolia. Näitä aineita lisättiin sellaiset määrät, että saatu liuos sisälsi ureaa 5 M, merkapttoetanolia $1,4 \times 10^{-1}$ M ja natriumdodesyyilisulfaattia $3,5 \times 10^{-2}$ M. Saaduille liuksille tehtiin samat kokeet kuin esimerkissä 1, ja niiden tulokset olivat samanlaiset. Siten käsitelty interferoniliuos stabiloitui täysin inaktiivisuutta aiheuttavia olosuhteita ja käsittelyjä vastaan.

Vertailun vuoksi suoritettiin samat kokeet toiselle tasaosalle puhdistettua lähtöliuosta lisäämättä edellä mainittuja kolmea reagenssia. Samoin kuin esimerkin 1 vertailukokeissakin tämä liuos menetti suurimman osan aktiivisuudestaan kuumennettaessa lämpötilassa 56°C ja kieuhutettaessa 1 minuutti lämpötilassa 100°C . Käsittelemätön interferoniliuos oli siten hyvin labiili inaktiivisuutta aiheuttavien olosuhteiden ja käsittelyiden suhteen.

Esimerkki 3

Lähtöaine oli ihmis-interferoniliuos, joka oli peräisin synteettisellä kaksijänteisellä polyribonukleiinihapolla, polyriboinosihapolla ja polyribosytidyylillä stimuloiduista ihmisen diploidisista fibroblastisolusta. Tämän aineen pH säädettiin arvoon 7,2 dialysoimalla 0,01 M TRIS-HCl puskuria vasten. Saadun liuoksen aktiivisuus oli noin 10^4 interferoniyksikköä per ml (biologinen määrittäminen).

Tasaosaan tätä interferoniliuosta lisättiin seuraavat aineet: Ensin natriumdodesyyilisulfaatin vesiliuos, sen jälkeen nestemäinen urea ja nestemäinen merkapttoetanolli. Lisätyt määrät olivat sellaisia, että saatu liuos sisälsi ureaa 5 M, merkapttoetanolia $1,4 \times 10^{-2}$ M ja natriumdodesyyilisulfaattia $3,5 \times 10^{-3}$ M. Saaduille liuksille tehtiin samat kokeet kuin esimerkissä 1, ja saatiin samanlaiset tulokset. Siten käsitelty interferoniliuos stabiloitui täysin inaktiivisuutta aiheuttavia olosuhteita ja käsittelyjä vastaan.

Vertailun vuoksi suoritettiin samat testit puhdistetun interferoniliuoksen toiselle tasaosalle lisäämättä reagensseja. Tulokset olivat samanlaiset kuin esimerkin 1 vertailukokeissa, so. aktiivisuudesta jäi jäljelle vain 10 % kuumennettaessa lämpötilassa 56°C ja 30 pakastus- ja sulatusjakson jälkeen. Kiehutettaessa 1 minuutti lämpötilassa 100°C aktiivisuudesta jäi jäljelle lisäksi alle 10^1 interferoniyksikköä per ml. Tämä käsittelemätön liuos oli siten hyvin labiili inaktiivisuutta aiheuttavien olosuhteiden ja käsittelyjen suhteen.

Esimerkki 4

Saman puhdistetun ihmis-interferoniliuoksen kuin jota käytettiin esimerkissä 3 tasaosaan lisättiin natriumdode^ksyylisulfaattiliuosta ja sen jälkeen kiinteää ureaa ja nestemäistä merkaptoetanolia sellaiset määrät, että saatu liuos sisälsi ureaa 5 M, merkaptoetanolia $1,4 \times 10^{-1}\text{M}$ ja natriumdode^ksyylisulfaattia $3,5 \times 10^{-2}\text{M}$. Saaduille liuoksille tehtiin samat kokeet kuin esimerkissä 1, ja niiden tulokset olivat samanlaiset. Käsitelty interferoniliuos oli siten jälleen stabiloitunut täysin inaktiivisuutta aiheuttavia olosuhteita ja käsittelyjä vastaan.

Vertailun vuoksi suoritettiin samat kokeet puhdistetun lähtöliuoksen toiselle tasaosalle lisäämällä edellä mainittua kolmea reagenssia. Samalla tavoin kuin vertailukokeissa esimerkissä 3 tämäkin liuos menetti suurimman osan aktiivisuudestaan kuumennettaessa lämpötilassa 56°C ja ~~kiehutettaessa~~ ^{kuumennettaessa} 1 minuutti lämpötilassa 100°C . Käsittelemätön interferoniliuos oli siten hyvin labiili inaktiivisuutta aiheuttavien olosuhteiden ja käsittelyjen suhteen.

Esimerkki 5

Saman puhdistetun hiiri-interferoniliuoksen kuin jota käytettiin esimerkeissä 1 ja 2 tasaosaan lisättiin dode^ksyliamiinin liuosta ja sen jälkeen ureaa ja nestemäistä merkaptoetanolia. Näitä aineita lisättiin sellaiset määrät, että saatu liuos sisälsi ureaa 5 M, merkaptoetanolia $1,4 \times 10^{-1}\text{M}$ ja dode^ksyliamiinia $2 \times 10^{-2}\text{M}$.

Saaduille liuoksille tehtiin samat kokeet kuin esimerkissä 1, ja niiden tulokset olivat samanlaiset. Siten käsitelty interferoniliuos oli täysin stabiloitunut inaktiivisuutta aiheuttavia olosuhteita ja käsittelyjä vastaan.

Vertailun vuoksi suoritettiin samat kokeet puhdistetun interferoniliuoksen toiselle tasaosalle lisäämättä edellä mainittuja kolmea reagenssia. Samoin kuin vertailukokeissa esimerkissä 1 tämäkin liuos menetti suurimman osan aktiivisuudestaan kuumennettaessa lämpötilassa 56°C ja ~~kuumennettaessa~~ ^{kiehutettaessa} 1 minuutti lämpötilassa 100°C . Käsittelemätön interferoniliuos oli siten hyvin labiili inaktiivisuutta aiheuttavien olosuhteiden ja käsittelyjen suhteen.

Patenttivaatimukset

1. Interferonin stabilointimenetelmä, t u n n e t t u siitä, että käsitellään vesipitoista interferoniliuosta (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 lähtöaine on natiivin tai puhdistetun interferonin, joka ei ole oleellisesti menettänyt alkuperäistä aktiivisuuttaan, liuos.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 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.

4. Jonkin patenttivaatimuksen 1-3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että aine, joka katkaisee ei-kovalenttiset sidokset, on urea.

5. Patenttivaatimuksen 4 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.

6. Jonkin patenttivaatimuksen 1-5 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että aine, joka pelkistää disulfidisillat, on merkaptoetanoli.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että merkaptoetanolia käytetään sellainen määrä, että saatu liuos sisältää merkaptoetanolia ainakin 10^{-2} M ja parhaiten $1,4 \times 10^{-2}$ M - $1,4 \times 10^{-1}$ M.

8. Jonkin patenttivaatimuksen 1-7 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että anioninen tai kationinen pinta-aktiivinen aine on vastavasti natriumdode^ksyylisulfaatti tai dode^ksyliamiini.

9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että natriumdode^ksyylisulfaattia tai dode^ksyliamiinia käytetään 1- - 5-kertainen ylimäärä laskettuna liuoksessa olevien proteiinien kokonaismäärästä.

10. Patenttivaatimuksen 9 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kun liuoksen interferonipitoisuus on noin 10^4 interferoniyksikköä per ml, pinta-aktiivista ainetta lisätään sellainen määrä, että liuos sisältää pinta-aktiivista ainetta $1 \times 10^{-3} - 1 \times 10^{-1} \text{M}$.

Tästä

11. Jonkin patenttivaatimuksen 1-10 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että edellä mainituilla kolmella reagenssilla tapahtuneen käsittelyn jälkeen ylimääräinen pinta-aktiivinen aine ja molemmat muut aineet kokonaisuudessaan poistetaan dialysoimalla.

9015

TL suht.

Suht.

12. Stabiloitu interferonituote, t u n n e t t u siitä, että se on vesipitoinen interferoniliuos, joka on käsitelty (a) aineen, joka katkaisee ei-kovalenttiset sidokset, (b) aineen, joka pelkistää disulfidisillat, ja (c) anionisen tai kationisen pinta-aktiivisen aineen yhdistelmällä.

Patentkrav

1. Stabiliseringsförfarande för interferon, k ä n n e t e c k n a t därav, att en vattenhaltig interferonlösning 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 utgångsämnet är en lösning av nativ eller renad interferon, som väsentligt ej har förlorat sin originala aktivitet.
3. Förfarande enligt patentkravet 1 eller 2, 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.
4. Förfarande enligt ett av patentkraven 1-3, k ä n n e t e c k n a t därav, att ämnet, som avbryter de icke-kovalentiska bindningarna, är urea.
5. Förfarande enligt patentkravet 4, 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.
6. Förfarande enligt ett av patentkraven 1-5, k ä n n e t e c k n a t därav, att ämnet, som reducerar disulfidbryggorna, är merkaptoetanol.
7. Förfarande enligt patentkravet 6, 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.
8. Förfarande enligt ett av patentkraven 1-7, 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.
9. Förfarande enligt patentkravet 8, k ä n n e t e c k n a t därav, att natriumdodecylsulfat eller dodecylamin användes i 1-5-faldigt överskott räknat på totalmängden av i lösningen befintliga proteiner.

10. Förfarande enligt patentkravet 9, 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.

11. Förfarande enligt ett av patentkraven 1-10, 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.

12. Stabiliserad interferonprodukt, k ä n n e t e c k n a d därav, att den är en vattenhaltig interferonlösning, som behandlats 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, utlägg-
nings- och patentskrifter:

Suomi - Finland _____

Iso-Britannia - Storbritannien _____

Norja - Norge _____

Ranska - Frankrike _____

Ruotsi - Sverige _____

Saksa - BRD - Tyskland _____

Sveitsi - Schweiz _____

Tanska - Danmark _____

USA _____

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

- Proceedings of the Nat. Acad. of Sci.
67 (1970) no 2 620-628
- J. Hyg. Camb. 68 (1970) 77
- Ann. Med. Exp. Funct. 44 (1966) 265
- J. Gen. Virol. 17 (1972) 107
- Antimicrob. Agents Chemother. 2 (1972)
476

77-09-14 Hely Lommi

Allekirjoitus