



NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **318921**

(13) **B1**

(51) Int Cl<sup>7</sup>

C 07 K 1/36, 1/34, 1/18 , A 61 K 35/20

**Patentstyret**

---

|      |            |                                                                        |      |                           |                              |
|------|------------|------------------------------------------------------------------------|------|---------------------------|------------------------------|
| (21) | Søknadsnr  | 19971474                                                               | (86) | Int.inng.dag og søknadsnr | 1995.09.08<br>PCT/US95/11398 |
| (22) | Inng.dag   | 1997.04.01                                                             | (85) | Videreføringsdag          | 1997.04.01                   |
| (24) | Løpedag    | 1995.09.08                                                             | (30) | Prioritet                 | 1994.10.03, US, 316474       |
| (41) | Alm.tilgj  | 1997.06.03                                                             |      |                           |                              |
| (45) | Meddelt    | 2005.05.23                                                             |      |                           |                              |
| (73) | Innehaver  | Stolle Milk Biologics Inc, 6954 Cornell Road, Cincinnati, OH 45242, US |      |                           |                              |
| (72) | Oppfinner  | Lee R. Beck, Lebanon, OH, US<br>Peter J. Fuhrer, , Dayton, OH, US      |      |                           |                              |
| (74) | Fullmektig | J.K. Thorsens Patentbureau AS, Postboks 9276 Grønland, 0134 Oslo, NO   |      |                           |                              |

---

|      |                       |                                                                               |  |  |  |
|------|-----------------------|-------------------------------------------------------------------------------|--|--|--|
| (54) | Benevnelse            | <b>Anti-inflammatorisk faktor, fremgangsmåte for isolering, og anvendelse</b> |  |  |  |
| (56) | Anførte publikasjoner | WO 92/04035<br>WO 94/09799                                                    |  |  |  |
| (57) | Sammendrag            |                                                                               |  |  |  |

Oppfinnelsen vedrører en antiinflammatorisk faktor isolert fra melk, fremgangsmåter for rensing av den antiinflammatoriske faktor som resulterer i vesentlig eller høyrensede preparater og fremgangsmåter for anvendelse av denne faktoren for å fjerne adherte nøytrofiler fra endotelceller, å hindre utvandring av celler fra vaskulaturen og å undertrykke responsen av lymfocytter på fremmede antigener.

### Oppfinnelsens område

Den foreliggende oppfinnelse vedrører en antiinflammatorisk faktor, en fremgangsmåte for dens fremstilling i hovedsakelig ren eller høyren form, dens anvendelse ved fremstilling av et  
 5 middel for behandling av inflammasjon, og en farmasøytisk formulering omfattende denne.

### Beskrivelse av bakgrunnsteknikk

Inflammasjon, som definert i Dorland's Medical Dictionary er  
 10 "en lokalisert beskyttende respons utløst ved skade eller ødeleggelse av vev som tjener til å ødelegge, fortynne eller fjerne både det skadelige middel og det skadede vev". Det er karakterisert ved fenestrasjon av mikrovaskulaturen, lekkasjer av elementene av blod inn i de interstitielle rom og  
 15 migrasjon av leukocytter inn i det betente vev. På et makroskopisk nivå ledsages dette vanligvis av de velkjente kliniske tegn på erytem, ødem, følsomhet (hyperalgesi) og smerte. Under denne komplekse respons frigis kjemiske mediatorer slik som histamin, 5-hydroksytryptamin, forskjellige kjemotaktiske  
 20 faktorer, bradykinin, leukotriener og prostaglandiner lokalt. Fagocytiske celler migrerer inn i området, og cellulære lysosomale membraner kan bryte, hvorved lytiske enzymer frigjøres. Alle disse hendelser kan bidra til den inflammatoriske respons.

25

Inflammasjon i pasienter med reumatoid artritt involverer sannsynligvis kombinasjonen av et antigen (gammaglobulin), med et antistoff (reumatoid faktor) og komplement som bevirker den lokale frigjøring av kjemotaktiske faktorer som tiltrekk-  
 30 er leukocytter. Leukocytene fagocytoserer kompleksene av antigen-antistoff og komplement og frigjør også de mange enzymer inneholdt i deres lysosomer. Disse lysosomale enzymer bevirker deretter skade i brusk og annet vev, og dette fremmer graden av inflammasjon. Cellemedierte immunreak-  
 35 sjoner kan også være involvert. Prostaglandiner frigjøres også under denne prosessen.

Prostaglandiner, som sannsynligvis dannes ved inflammasjon, forårsaker erytem og øker lokal blodflyt. To viktige vasku-

lære effekter av prostaglandiner deles generelt ikke av andre mediatorer av inflammasjon - en lengevarende vasodilatorvirkning og en kapasitet til å motvirke vasokonstriktoreffektene av substanser slik som noradrenalin og angiotensin.

5

Et antall mediatorer av inflammasjon øker vaskulær permeabilitet (lekkasje) i de postkapillære og samlende venyler. I tillegg er migrasjon av leukocytter inn i et betent område et viktig aspekt av den inflammatoriske prosess.

10

Arthus-reaksjonen er en inflammatorisk respons fremkommet ved dannelsen av immunkomplekser ved subkutane seter hvor et antigen kompleksdannes med antistoff til det antigen. Nøytrofiler festes karakteristisk til Fc-delen av immunoglobulin-komplekset som dannes ved det subkutane injeksjonssete hvor de frigjør fordøyelsesenzymer, hvilket forårsaker synlig akutt inflammasjon. Reaksjonen er således primært nøytrofilmediert og midler som bevirker utviklingen av reaksjonen gjør dette via en virkning på disse cellene.

20

Det er flere ruter hvorved et middel kan interferere med nøytrofil migrasjon fra blodkarene til et inflammatorisk sete. En sannsynlig rute er inhibering av margdannelse, den reversible "fastgjøring" av inflammatoriske celler til endotelcelle-innsideflaten av blodkarveggen. I den normale tilstand blir omtrent 50% nøytrofiler reversibelt adhert, men under en akutt inflammatorisk respons blir adhesjon mye sterkere og er et nøkkeltrinn i prosessen med nøytrofil-migrasjon. Mens prostaglandiner lite trolig blir direkte involvert i den kjemotaktiske respons, er et annet produkt av metabolismen av arakidonsyre, leukotrien, en svært kraftig kjemotaktisk substans.

Den antiinflammatoriske respons er en hvilken som helst respons karakterisert ved inflammasjon som definert i det foregående. Det er velkjent for de fagkyndige innen de medisinske fagområder at den inflammatoriske respons forårsaker mye av det fysiske ubehag, dvs. smerte og funksjonstap, som etterhvert har blitt assosiert med forskjellige sykdommer og

35

skader. Følgelig er det vanlig medisinsk praksis å administrere farmakologiske midler som har den effekt å nøytralisere den inflammatoriske respons. Midler som har disse egenskaper er klassifisert som antiinflammatoriske medikamenter. Antiinflammatoriske medikamenter anvendes for behandling av et bredt spektrum av sykdommer, og de samme medikamenter anvendes ofte for å behandle forskjellige sykdommer. Behandling med antiinflammatoriske medikamenter er ikke for sykdommen, men oftest for symptomet, dvs. inflammasjon.

De antiinflammatoriske, analgetiske og antipyretiske medikamenter er en heterogen gruppe av forbindelser, ofte kjemisk ubeslektet, som ikke desto mindre deler visse terapeutiske virkninger og bivirkninger. Kortikosteroider representerer den mest alminnelige klasse av forbindelser for behandling av antiinflammatorisk respons. Proteolytiske enzymer representerer en annen klasse av forbindelser som er ment å ha antiinflammatoriske effekter. Hormoner som direkte eller indirekte forårsaker at den adrenale korteks produserer og utskille steroider representerer en annen klasse av antiinflammatoriske forbindelser. Et antall ikke-hormonelle antiinflammatoriske midler er blitt beskrevet. Blant disse er salisylater de mest alminnelig anvendte. Acetylsalisylsyre, eller aspirin, er det mest alminnelig ordinerte analgetisk-antipyretisk og antiinflammatorisk middel. Eksempler på steroide og ikke-steroide antiinflammatoriske midler er angitt i Physician's Desk Reference, 1987 (se side 207 og 208 for en oversikt over slike preparater).

30

De naturlige og syntetiske kortikosteroidpreparater forårsaker et antall alvorlige bivirkninger, inkluderende forhøyelse av blodtrykk, salt- og vannretensjon, og økt kalium- og kalsiumekskresjon. Dessuten kan kortikosteroider skjule tegnene på infeksjon og fremme disseminasjon av infeksiose mikroorganismer. Disse hormoner betraktes ikke som sikre for anvendelse i gravide kvinner, og langvarig kortikosteroidbehandling har blitt assosiert med gastrisk hyperaktivitet og/eller peptiske ulcere. Behandling med disse forbindelser

kan også forverre diabetes mellitus, hvorved høyere doser insulin er påkrevet, og kan frembringe psykotiske lidelser. Hormonelle antiinflammatoriske midler som indirekte øker produksjonen av endogene kortikosteroider har det samme potensial for uheldige bivirkninger.

De ikke-hormonelle antiinflammatoriske midler er syntetiske biokjemiske forbindelser som kan være toksiske ved høye doser med et bredt spektrum av uønskede bivirkninger. For eksempel bidrar salisylater til de alvorlige syre-base balanseforstyrrelser som karakteriserer forgiftning av denne klasse forbindelser. Salisylater stimulerer respirasjon direkte og indirekte. Toksiske doser av salisylater bevirker sentral respiratorisk paralyse så vel som sirkulasjonskolaps som et sekundært symptom til vasomotorisk depresjon. Inntak av salisylat kan resultere i epigastrisk lidelse, kvalme og oppkast. Salisylatindusert gastrisk blødning er velkjent. Salisylater kan frembringe leverskade, og føre til en forlengelse av levringsstid. Derfor bør aspirin unngås i pasienter med alvorlig leverskade, hypoprotrombinemi, vitamin K-mangel eller hemofili, fordi inhiberingen av blodplatehemostase av salisylater kan resultere i blødning. Salisylatintoksikasjon er vanlig, og over 10.000 tilfeller av alvorlig salisylatintoksikasjon sees i De forente stater hvert år, hvorav noen medfører døden og mange forekommer i barn. Se Goodman og Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 7. utg., 1985. På tross av det store antall av antiinflammatoriske midler som for tiden er tilgjengelig er det følgelig fremdeles et behov for et sikkert, effektivt antiinflammatorisk produkt som er fritt for bivirkninger og uheldige reaksjoner.

Hvis et naturlig næringsmiddelprodukt, slik som ett avledet fra melk, for eksempel kunne oppnås og som har antiinflammatoriske effekter, ville det være et enkelt administrerbart, lett tilgjengelig sikkert terapeutisk preparat.

Det har vært kjent i tidligere teknikk å fremstille ulike typer melk som har mange forskjellige terapeutiske effekter.

Beck har for eksempel omtalt en melk inneholdende antistoff til *Streptococcus mutans* som har tannråte-inhiberende effekt (US patent nr., 4,324,782). Melken oppnås ved immunisering av en ku med *S. mutans* antigen i to trinn og oppnåelse av den terapeutiske melk derfra.

Stolle et al har omtalt en metode for behandling av vaskulære sykdommer er pulmonale sykdommer assosiert med røyking i et dyr som omfatter administrering til dyret av melk samlet fra en ku som er opprettholdt i en hyperimmun tilstand (US patent nr. 4,636,384). Beck har omtalt en metode for behandling av inflammasjon i et dyr som omfatter administrering til dyret av en antiinflammatorisk effektiv mengde av melk samlet fra en ku opprettholdt i en antiinflammatorisk faktor-produserende tilstand (US patent nr. 4,284,623). Heinbach, US patent nr. 3,128,230, har beskrevet melk inneholdende globuliner av alfa-, beta- og gammakomponenter ved inokulering av en ku med antigenene blandinger. Peterson et al. (US patent nr. 3,376,198), Holm (US søknad (publisert) med løpenr. 628,987), Tunnah et al. (britisk patent nr. 1,211,876) og Biokema S.A. (britisk patent 1,442,283) har også beskrevet antistoffinneholdende melk.

Ingen av de ovennevnte referanser omhandler imidlertid identiteten av komponenten eller komponentene av terapeutiske melk som frembringer de ønskede terapeutiske effekter. I Beck, US patent nr. 4,284,623, består for eksempel melkeproduktene anvendt som et terapeutisk middel av enten fluid helmelk, fluid fettfri myse eller helmelkspulvere. Selv om hvert av disse melkeproduktene har antiinflammatoriske egenskaper, er faktoren eller faktorene som faktisk tilveiebringer de terapeutiske fordeler ennå ikke blitt isolert eller identifisert eller renset til homogenitet.

En særlig vanskelighet ved oppnåelse av høyrensede preparater av melk-antiinflammatorisk(e) faktor(er) (MAIF) er den manglende evne til å fjerne fast bundede salter fra MAIF ved de for tiden anvendte renseprosedyrer. Ett av problemene som denne oppfinnelsen er rettet mot er blant annet fremstilling

i stor målestokk av MAIF inkluderende fjerningen av fast bundede salter fra MAIF preparatet, hvilket derved resulterer i høyrenset MAIF. Videre har problemer tidligere oppstått ved oppnåelse av høyrene preparater av MAIF i preparativ målestokk når det startes med store volumer av utgangsmaterialer (f.eks. 90 liter skummet melk). Oppfinnelsen tilveiebringer løsninger på disse problemer.

#### Oppsummering av oppfinnelsen

10 Den foreliggende oppfinnelse er rettet på en antiinflammatorisk faktor til stede i melk og forskjellige anvendelser av den antiinflammatoriske faktor til stede i melk.

Den foreliggende oppfinnelse vedrører således en fremgangsmåte for rensing av en antiinflammatorisk faktor fra skummet melk (MAIF), som er kjennetegnet ved at den omfatter:

- (i) ultrafiltrering av melken gjennom et filter med en molekylvektterskel på 10000 Dalton,
- (ii) oppsamling av et < 10000 Dalton permeat fra trinn (i),
- 20 (iii) tilføring av permeatet til en første ionebytterkolonne og vasking av kolonnen med deionisert vann,
- (iv) oppsamling av eluatet fra trinn (iii),
- (v) separering av eluatet fra trinn (iv) på en preparativ størrelseseksklusjon HPLC kromatografikolonne og
- 25 oppsamling av eluatet, og
- (vi) utføring av organisk partisjonsekstraksjon av eluatet oppnådd fra den preparative størrelseseksklusjon HPLC kromatografi og oppnåelse av det organiske ekstrakt fra ekstraksjonen.

30

Den foreliggende oppfinnelse vedrører også en rensset antiinflammatorisk faktor, som er kjennetegnet ved at den kan oppnås ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen for rensing av en antiinflammatorisk faktor fra skummet melk (MAIF).

35

Oppfinnelsen er videre rettet på anvendelse av en melk-antiinflammatorisk faktor for å hindre nøytrofiler fra å adhere til endotelet av vinyler eller å løsgjøre nøytrofiler som allerede har adhert til endotelcelle-innsideflaten av veggene

av venyler. På denne måte anvendes faktoren til å redusere vevsskaden assosiert med den inflammatoriske respons.

Oppfinnelsen er også rettet på anvendelse av den melk-anti-inflammatoriske faktor til å hindre interaksjoner mellom CD18 celleoverflate-antigener og andre molekyler. Det er kjent at slike interaksjoner er nødvendig for uttredelsen av celler fra vaskulaturen og at slik emigrasjon fører til økt vevsskade i dyr under den inflammatoriske respons. CD18 antigener er også kjent for å være viktige i den immunologiske respons til en vertsorganisme på fremmede antigener.

Også omfattet av oppfinnelsen er anvendelsen av den anti-inflammatoriske faktor i pattedyr for å hindre emigrasjon av celler fra vaskulaturen og å undertrykke den mitogene respons av lymfocytter på fremmede antigener.

Den foreliggende oppfinnelse vedrører således videre anvendelse av MAIF som kan oppnås ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen for rensing av en antiinflammatorisk faktor fra skummet melk (MAIF), ved fremstilling av et middel for:

- inhibering av nøytrofil-migrasjon,
- inhibering av inflammatorisk respons,
- inhibering av nøytrofiler fra å adhere til endotelceller i et pattedyr,
- løsgjøring av nøytrofiler som har adhert til endotelceller i et pattedyr,
- inhibering av interaksjon mellom CD18 celleoverflate-antigener som er tilstede i et pattedyr og molekyler som er i stand til å binde til CD18 celleoverflate-antigenene,
- inhibering av emigrasjon av leukocytter fra venesystemet til et pattedyr, eller
- undertrykking av den mitogene respons til lymfocytter i et verts-pattedyr på fremmede antigener.

35

Den foreliggende oppfinnelse vedrører videre anvendelse av MAIF som kan oppnås ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen



for rensing av en antiinflammatorisk faktor fra skummet melk (MAIF), ved fremstilling av et middel for behandling eller profylakse av inflammasjon og inflammatoriske tilstander slik som akutt og subakutt bursitt, akutt ikke-spesifikk tendovaginitis, systemisk lupus erythematosus, systemisk dermatomyositt, akutt revmatisk karditt, pemfigus, bulløs dermatitt, herpetiformis, alvorlig erytem, multiform eksfoliativ dermatitt, cirrhose, sesongmessig perennial rhinitt, bronkialastma, ektopisk dermatitt, serumsyke, keratitt, ophthalmicus iritis, diffus ureitt, chorditis, optikusnevritt, sympatisk oftalmi, symptomatisk sarkoidose, Loeffler's syndrom, berylliose, hemolytisk anemi, mastitt, mastoiditt, kontaktdermatitt, allergisk konjunktivitt, psoriatisk artritt, ankyloserende spondylitt, akutt giktisk artritt og herpes zoster.

Den foreliggende oppfinnelse vedrører videre en farmasøytisk formulering som er kjennetegnet ved at den omfatter MAIF som kan oppnås ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen for rensing av en antiinflammatorisk faktor fra skummet melk (MAIF), sammen med et farmasøytisk akseptabelt fortynningsmiddel.

Andre utførelsesformer av fremgangsmåten, den rensede antiinflammatoriske faktor, og anvendelsene av MAIF i henhold til oppfinnelsen fremgår av de uselvstendige patentkrav.

#### Kort beskrivelse av tegningene

En mer fullstendig forståelse av oppfinnelsen og mange av de medfølgende fordeler derav vil lett oppnås, når det samme forstås bedre ved referanse til den etterfølgende detaljerte beskrivelse når vurdert i forbindelse med de ledsagende tegninger, hvori:

- Fig. 1 Isolering av den antiinflammatoriske faktor ved ionebytterkromatografi på en kolonne av DEAE-cellulose.
- Fig. 2 Fraksjonering av den antiinflammatorisk faktor-inneholdende topp (andre) fra DEAE-cellulosekromatografi (fig. 1) på en Sephadex G-10 molekylsilkolonne.

- Fig. 3 Effekt av immun melk på karrageenan-indusert ødem i rotter (potevekt, % kontroll-pote, middelerdi  $\pm$  sem,  $n = 10$ ).
- Fig. 4 Effekt av intraperitoneal administrasjon av den antiinflammatoriske faktor på fotputeødem i rotter ( $\mu$ L, middelerdi  $\pm$  SA,  $n = 6$ ).
- Fig. 5 Intraperitoneal dose-respons-kurve for den antiinflammatoriske faktor i rotteputeødem-test (% kontroll, middelerdi  $\pm$  SA,  $n = 6$ ).
- Fig. 6 Effekt av hyperimmun melk-faktor vs. placebo (laktose) på fotputeødem i rotter (% kontroll, middelerdi  $\pm$  SA,  $n = 6$ ).
- Fig. 7 Effekt av iv og oral MAIF på fotputeødem i rotter (% kontroll, middelerdi  $\pm$  SA,  $n = 6$ ).
- Fig. 8 Effekt av lav iv dosering av MAIF på fotputeødem i rotter (% kontroll, middelerdi  $\pm$  SA,  $n = 6$ ).
- Fig. 9 Intravenøs dose-respons-kurve for MAIF i rotteputeødem-test (% kontroll, middelerdi  $\pm$  SA,  $n = 6$ ).
- Fig. 10 Kjøring 1, tvillingflokk/ultrafiltreringsforsøk (% gjennomsnittlig kontroll-ødem, middelerdi  $\pm$  SA,  $n = 6$ ).
- Fig. 11 Kjøring 2, tvillingflokk/ultrafiltreringsforsøk (% gjennomsnittlig kontroll-ødem, middelerdi  $\pm$  SA,  $n = 6$ ).
- Fig. 12 Kjøring 3, tvillingflokk/ultrafiltreringsforsøk (% gjennomsnittlig kontroll-ødem, middelerdi  $\pm$  SA,  $n = 6$ ).
- Fig. 13 Effekt av forskjellige behandlinger av MAIF på inhibering av fotputeødem i rotter ( $\mu$ L fotputeødem, middelerdi  $\pm$  SA,  $n = 6$ ).
- Fig. 14 Effekt av fraksjoner av MAIF og av immun mpk (myseproteinkonsentrasjon) på inhibering av fotputeødem i rotter ( $\mu$ L fotputeødem, middelerdi  $\pm$  SA,  $n = 6$ ).
- Fig. 15 Effekt av fem forskjellige anestetika på responsen på karrageenan i rotte-fotpute. Akkumuleringen av ødem ble overvåket ved utvalgte intervaller i de samme dyrene.  $n = 6$  for hvert datapunkt.

- Fig. 16 Demonstrasjon av tofase-naturen av responsen på karrageenan i rotte-fotputen.  $n = 5$  for hvert datapunkt. Eter ble anvendt som anestetikum.
- Fig. 17  
5 (A-B) MAIF, administrert ved enten 5 mg pr. rotte (A) eller 40 mg pr. rotte (B) inhiberer ikke den inflammatoriske respons på karrageenan i rotter bedøvet med eter.  $n = 4$  for alle datapunkter.
- Fig. 18 Suppresjon av karrageenan-indusert ødem-akkumulering  
10 under den sekundære, fagocytceller-medierte respons ved 40 mg MAIF injisert i.v. ved tidspunktet for karrageenan-testing (tid 0).  $n = 12$  for hvert datapunkt i kontrollgruppen og  $n = 10$  for hvert datapunkt i den MAIF-behandlede gruppe.
- 15 Fig. 19 Effekt av MAIF, gitt i.v. ved 4 mg pr. rotte ved forskjellige tidspunkter, på responsen på karrageenan i rotte-fotputen. Ødem ble vurdert 4 timer etter testing (challenge) i alle tilfeller.  $n = 12$  for hvert datapunkt.
- 20 Fig. 20 Effekt av 20 mg MAIF injisert i.v. på den reverse passive Arthus-reaksjon.  $* = p < 0,01$ ,  $** = p < 0,05$ .
- Fig. 21 Effekt av avtagende doser av MAIF på nøytrofilenes evne til å utvandre fra vaskulaturen inn i subkutan implanterte sterile svamper.  $* = p < 0,01$ .
- 25 Fig. 22 Effekt av MAIF, administrert i en dose på 20 mg pr. rotte, til å inhibere evnen av inflammatoriske celler til å akkumulere i subkutan implanterte svamper når administrert ved tidspunktet for implantering eller opp til 120 minutter etter implantering.  $* = p < 0,01$ .
- 30 Fig. 23 Tidsforløpet av den cellulære inflammatoriske infiltrasjon inn i subkutan implanterte svamper i normale dyr.
- Fig. 24 Effekt av preparater av antiinflammatorisk faktor på  
35 blodplateaktiverende faktor (PAF)-indusert adhesjon av nøytrofiler til venyler.
- Fig. 25 Effekt av preparater av antiinflammatorisk faktor på PAF-indusert nøytrofilutvandring.

- Fig. 26 Effekt av preparater av antiinflammatorisk faktor på PAF-indusert fluks av nøytrofiler gjennom venyler.
- Fig. 27 Reversering av nøytrofiladhesjon ved preparater av antiinflammatorisk faktor. 27a viser effekten av MAIF-preparatet (40 mg/rotte) med hensyn til å redusere antallet nøytrofiler som adherer til venyler som respons på PAF. 27b viser effekten av MAIF-preparatet (40 mg/rotte) på nye nøytrofil-endotelcelleadhesjoner.
- Fig. 28 Effekt av preparater av antiinflammatorisk faktor på hastigheten av nøytrofiler i venyler.
- Fig. 29 Effekt av preparater av antiinflammatorisk faktor på hastigheten av røde blodceller i venyler.
- Fig. 30 Effekt av antiinflammatorisk faktor på leukocyttfluks i venyler.
- Fig. 31 Effekt av 40 mg av MAIF-preparatene administrert i.v. på antallet sirkulerende nøytrofiler og lymfocytter i de 24 timene etter injeksjon.
- Fig. 32 Dose-respons-forhold mellom i.v. administrasjon av MAIF-preparatet og sirkulerende leukocyt-tall ( $p < 0,01$ ).
- Fig. 33 (A-E) Effekt av antiinflammatorisk faktor på ulike aspekter av lymfocytffunksjon. 33a viser effekten av tidligere administrasjon av faktor på responsen av vert T lymfocytter på fremmede histokompatibilitetsantigener. 33b viser resultatene oppnådd når lymfocytter fra MAIF-behandlede rotter injiseres inn i ubehandlede rotter. 33C og 33D viser effekten av MAIF-behandling på miltvekt og miltcelletall i rotter. 33E viser effekten av MAIF-behandling på concanavalin A-stimulert mitogen respons av lymfocytter.
- Fig. 34 Suppresjon av infeksjonsindusert ødem ved 40 mg MAIF injisert i.v. Middelverdiene av de to gruppene var: kontroller,  $87 \pm 22 \mu\text{L}$ ; MAIF,  $45 \pm 17 \mu\text{L}$ ;  $p < 0,01$ .
- Fig. 35 Effekt av MAIF-preparatene gitt i.v. ved 40 mg pr. rotte på bakteriereplikasjon og subkutan implanterte *E. coli*-infiserte svamper.

- Fig. 36  
(A-B)     Inhibering av inflammatorisk celleinfiltrasjon inn i infiserte svamper ved MAIF (40 mg pr. rotte i.v.).
- Fig. 37     Effekt av MAIF (40 mg pr. rotte i.v.) på suppresjon  
5     av den mellomliggende fase (4-16 timer) av inflammatorisk fluid-akkumulasjon i E. coli-infiserte svamper.
- Fig. 38     Effekt av 40 mg MAIF, gitt intravenøst ved tidspunktet for testing og 48 timer senere, på patogenesen av eksperimentell pyelonefritt. Den stiplete linjen på diagrammet til venstre representerer  
10     den midlere bakgrunns-nyrevekt. \* =  $p < 0,01$ , \*\* =  $p < 0,02$ .
- Fig. 39     Sammenligning av standardisert hyperimmun og  
15     kontroll-MAIF. MAIF fremstilt ved standardiserte metoder ble testet ved doser på 0,5, 1,5, 3, 5 og 8 mg/120-150 g hunnrotte med hensyn på deres evne til å inhibere migrasjonen av nøytrofiler til inflammatoriske seter. Referanse til "kommersiell" er til  
20     handelsvanlig skummet melk i pulverform.
- Fig. 40     Sammenligning av MAIF og andre melkekomponenter. Aktiviteten av standardisert MAIF fremstilt fra hyperimmun melk ble sammenlignet med sialinsyre og orotinsyre, kjente komponenter av melk som er antatt  
25     å ha antiinflammatorisk aktivitet.
- Fig. 41     Sammenligning av standardisert MAIF fra hyperimmun melk og antiinflammatoriske medikamenter (Indometacin og aspirin).
- Fig. 42     Analyse av sammensetningen av DEAE-avledet MAIF ved  
30     størrelseseksklusjon-HPLC.
- Fig. 43     Analyse av den tørkede etylacetatfraksjon i nøytrofilmigrasjons-inhiberingsanalysen viste sterk MAIF-aktivitet.
- Fig. 44  
(A-B)     Analyse av MAIF-forbindelsen på en aminopropyl-svak anionbytterkolonne før og etter ekstraksjon. "Før" (fig. 44A) og "etter" (fig. 44B) refererer til preparater før og etter organisk partisjonskromato-

grafi. Merk den signifikante forsvinning av skulder "A" i det skiftede elusjonsmønster i fig. 44B.

**Detaljert beskrivelse av de foretrukne utførelsesformer**

5 Oppfinnelsen omfatter isolasjon og rensing av en antiinflammatorisk faktor fra melk og anvendelse av nevnte faktor ved fremstilling av et middel for å behandle antiinflammatoriske sykdommer. Med unntak av når annet er indikert, gjelder de følgende definisjoner:

10

Med uttrykket "melk-antiinflammatorisk faktor" menes en faktor oppnådd fra enten hyperimmun melk eller normal kumelk. Med uttrykket "vesentlig ren melk-antiinflammatorisk faktor" menes, for oppfinnelsens formål, en antiinflammatorisk faktor  
15 som eluerer som en enkel symmetrisk hovedtopp på HPLC-kromatografi etter fjerning av substanser med høy molekylvekt (>10.000 dalton) og isolasjon av de negativt ladede species med lav molekylvekt ved ionebytterkromatografi. Med uttrykket "høyrenset" eller "høyren" menes en antiinflammatorisk  
20 faktor som har et elueringsmønster lignende, skjønt ikke nødvendigvis identisk med, det i fig. 44B, på aminopropyl-svak anionbytterkolonne. Et særlig karakteristisk trekk av en slik elueringsprofil er betydelig tap av skulder A (som det fremgår av fig. 44A) som det fremgår i den skiftede profil i  
25 fig. 44B. Både normal melk og hyperimmun melk kan bearbeides ved hjelp av metodene beskrevet heri for å oppnå den antiinflammatoriske faktor.

Med uttrykket "hyperimmun melk" menes, for oppfinnelsens  
30 formål, melk oppnådd fra melkeproduserende dyr opprettholdt i en hyperimmun tilstand, idet detaljene for hyperimmunisering beskrives mer detaljert i det etterfølgende.

Med uttrykket "myse" menes, for oppfinnelsens formål, melk  
35 hvorfra fløte er blitt fjernet.

Med uttrykket "normal melk" menes, for oppfinnelsens formål, melk som er oppnådd fra melkeproduserende dyr ved hjelp av alminnelige metoder og praksis i meierier.

Med uttrykket "melkeproduserende dyr" menes, for oppfinnelsens formål, pattedyr som produserer melk i kommersielt interessante mengder, foretrukket kuer, sauer og geiter, mer foretrukket melkekuer av slekten Bos (bovid), særlig de raser  
5 som gir de høyeste utbytter av melk, slik som Holstein.

Med uttrykket "bakterielt antigen" menes, for oppfinnelsens formål, et frysetørket preparat av varmedrepte bakterie-celler.

10

Med uttrykket "mikroinnkapslet form" menes, for oppfinnelsens formål, polymere mikropartikler som innkapsler en eller flere bakterielle antigener for administrasjon til melkeproduserende dyr.

15

Med uttrykket "inflammasjon" menes, for oppfinnelsens formål, en lokalisert beskyttende respons utløst ved skade eller ødeleggelse av vev som tjener til å ødelegge, fortynne eller fjerne både det skadelige middel og det skadede vev, karakterisert i akutt form ved den klassiske sekvens av smerte, varme, rødhet, hevelse og tap av funksjon, og involverer histologisk en kompleks serie av hendelser, inkluderende dilatasjon av arterioler, kapillærer og venyler med økt permeabilitet og blodflyt, eksudasjon av fluider inkluderende  
20 plasmaproteiner, og leukocyttmigrasjon inn i det inflammatoriske fokus.

25

Med uttrykket "behandling" menes, for oppfinnelsens formål, at symptomene av sykdommen og/eller den patogene opprinnelse  
30 av sykdommen bedres eller elimineres fullstendig.

Med uttrykket "administrere" menes, for oppfinnelsens formål, en hvilken som helst metode for behandling av et individ med en substans, slik som oralt, intranasalt, parenteralt (intra-  
35 venøst, intramuskulært eller subkutant) eller rektalt. Med uttrykket "dyr" menes, for oppfinnelsens formål, et hvilket som helst vesen som er utsatt for inflammasjon, inkluderende mennesker, gårdsdyr, husdyr eller dyr i zoologisk hage.

Eksempler på inflammatoriske tilstander som kan behandles ved hjelp av det isolerte og rensede melkeprodukt i samsvar med den foreliggende oppfinnelse er tilstander valgt fra gruppen bestående av akutt og subakutt bursitt, akutt ikke-spesifikk tendinitt, systemisk lupus erythematosus, systemisk dermatomyositt, akutt reumatisk karditt, pemfigus, bulløs dermatitt, herpetiform, alvorlig erytem, multiform eksfoliativ dermatitt, cirrhose, sesongmessig perennial rinitt, bronkialastma, ektopisk dermatitt, serumsyke, keratitt, ophthalmicus iritis, diffus ureitt, chorditis, optikusnevritt, sympatisk oftalmi, symptomatisk sarkoidose, Løfflers syndrom, berylli-  
 10 ose, hemolytisk anemi, mastitt, mastoiditt, kontaktdermatitt, allergisk konjunktivitt, psoriatisk artritt, ankyloserende spondylitt, akutt giktisk artritt og herpes zoster. Videre  
 15 kan det isolerte og rensede melkeprodukt anvendes for å behandle individer som er eksponert for potensielt inflammatoriske midler.

Oppfinnelsen er basert delvis på det funn at når et melkeproduserende dyr slik som et bovid bringes til en spesifikk tilstand av hyperimmunisering vil dyret produsere melk som har nivåer over det normale av den svært fordelaktige anti-inflammatoriske faktor, idet nevnte faktor ikke bare undertrykker symptomene på inflammasjon hos mennesker og andre  
 25 dyr, men også er et profylaktisk middel i forventning om nærværet av inflammatoriske midler i resipienten. Med uttrykket "nivåer over det normale" menes nivåer utover det funnet i melk fra ikke-hyperimmuniserte dyr. Induksjon av immunsensitivitet alene er utilstrekkelig til å forårsake tilsyn-  
 30 komst av nivåer over det normale av MAIF i melk, som vist ved det faktum at normal kumelk ikke inneholder disse nivåer over det normale, selv om kuene har blitt gjort sensitive overfor ulike antigener under normal immunisering mot kusykdommer og under normal eksponering for omgivelsene. Det er kun i  
 35 spesifikke hyperimmune tilstander at melken har de ønskede nivåer over det normale.

Denne spesielle tilstand kan oppnås ved administrering av en initial immunisering, etterfulgt av periodiske boostere med



tilstrekkelig høye doser av spesifikke antigener. Den foretrukne dosering av booster bør være lik eller større enn 50% av doseringen som er nødvendig for å frembringe primær immunisering av bovidet. Det er således en terskel-boosterdosering hvorunder egenskapene ikke frembringes i melken, selv om kua er i det som normalt ville kalles en immun tilstand. For å oppnå den nødvendige hyperimmune tilstand er det av vesentlig betydning å teste den hyperimmune melk etter en første serie av booster-administrasjoner. Hvis de fordelaktige faktorer ikke er til stede i melken administreres ytterligere boostere med høy dosering inntil egenskapene kommer til syne i melken.

Proessen med produksjon av den hyperimmune melk inneholdende nivåer over det normale av antiinflammatorisk faktor er omhandlet i løpende US patentsøknad med løpenr. 580,382 innlevert 11. september 1990 og også i US patentsøknad med løpenr. 355,786 innlevert 22. mai 1989 (nå US patent nr. 5,106,618, en "file wrapper continuation" av US patentsøknad med løpenr. 069,139 innlevert 2. juli 1987) og i US patentsøknad med løpenr. 910,297 innlevert 17. september 1986 (nå US patent nr. 4,919,929, en "file wrapper continuation" av US patentsøknad med løpenr. 576,001 innlevert 1. februar 1983). I sammendrag omfatter en prosess for fremstilling av den hyperimmune melk inneholdende nivåer over det normale av antiinflammatorisk faktor de følgende trinn: (1) antigen-seleksjon, (2) primær immunisering av bovidet, (3) testing av serumet for å bekrefte sensitivitetsinduksjon, (4) hyperimmunisering med boostere ved passende dosering, og eventuelt (5) testing av melken med hensyn på antiinflammatoriske egenskaper, (6) samling av melken fra det hyperimmune bovid, og (7) bearbeiding av melken for å isolere MAIF.

Trinn 1: Hvilke som helst antigener eller kombinasjon av antigener kan anvendes. Antigenene kan være bakterielle, virale, protozo, fungale, cellulære eller hvilke som andre substanser som immunsystemet til et melkeproduserende dyr ville respondere på. Det kritiske punkt i dette trinnet er at antigenet eller antigenene må være i stand til ikke bare å

indusere immune og hyperimmune tilstander i det melkeproduserende dyr, men også å produsere nivåer over det normale av antiinflammatorisk faktor i melken. Et hvilket som helst antigen kan anvendes til å produsere nivåer over det normale av faktor. En foretrukket vaksine er en blanding av polyvalente bakterielle antigener, referert til som Series 100 vaksine, beskrevet detaljert i eksempel 1A i det etterfølgende.

- Trinn 2: Antigenet eller antigenene kan administreres ved en hvilken som helst metode som forårsaker sensitivisering. I en metode administreres en vaksine som består av antigen avledet fra  $1 \times 10^6$  til  $1 \times 10^{20}$ , foretrukket  $10^8$  til  $10^{10}$ , mest foretrukket  $2 \times 10^8$ , varmedrepte bakterier ved intramuskulær injeksjon. Imidlertid kan andre metoder slik som intravenøs injeksjon, intraperitoneal injeksjon, rektalt suppositorium eller oral administrasjon anvendes.

- Trinn 3: Det er nødvendig å bestemme om det melkeproduserende dyr har blitt sensitivt overfor antigenet eller ikke. Det er et antall metoder kjent for de fagkyndige innen området immunologi for å teste med hensyn på sensitivitet (Methods in Immunology and Immunochemistry, William, C.A. og Chase, W.M., Academic Press, New York, vol. 1-5 (1975)). Den foretrukne metode er å anvende en polyvalent vaksine omfattende multiple bakterielle species som antigenet og å teste med hensyn på nærværet av agglutinerende antistoffer i serumet av dyret før og etter testing med vaksinen. Tilsynkomsten av melkeantistoffer etter immunisering med vaksinen indikerer sensitivitet. Ved dette punkt er det mulig å gå videre til trinn 4.

- Trinn 4: Dette involverer indusering og opprettholdelse av den hyperimmune tilstand i det sensitiviserende dyr. Dette utføres ved gjentatt booster-administrasjon ved faste tidsintervaller av den samme polyvalente vaksine som ble anvendt for å oppnå den primære sensitivisering. Et to uker boosterintervall er optimalt for polyvalente bakterielle antigener. Det er imidlertid nødvendig å sikre at dyret ikke går fra en

hyperimmun tilstand til en tilstand med immuntoleranse overfor antigenet.

I en foretrukket utførelsesform kan hyperimmunisering av bovider oppnås ved en enkelt administrasjon av mikroinnkapslet vaksine, fremstilt som beskrevet detaljert i eksempel 1B i det etterfølgende. Fordelen med den kontrollerte frigivelsesform av hyperimmunisering er at den konstante eksponering for antigenet sikrer at dyret forblir i den hyperimmune tilstand.

I en alternativ utførelsesform er det også mulig å kombinere forskjellige immuniseringsprosedyrer, f.eks. samtidig administrering av mikroinnkapslet og flytende antigen, eller intramuskulær injeksjon for primær immunisering, og booster doser ved oral administrasjon eller parenteral administrasjon ved hjelp av midler for mikroinnkapsling. Mange forskjellige kombinasjoner av primær og hyperimmunisering mer kjent for de fagkyndige i teknikken.

20

Trinn 5: Det er nødvendig å teste melken for antiinflammatoriske aktivitetsnivåer. Dette kan utføres ved en hvilken som helst undersøkelsesteknikk som tester effektene av enten den hyperimmune melk eller produkter avledet derfra ved inflammasjon. Kjemisk induisert inflammasjon av rottepoten er en standard analyse for antiinflammatoriske medikamenter.

Trinn 6: Dette involverer samling og bearbeiding av melken. Melken kan samles ved hjelp av konvensjonelle metoder. Bearbeiding av melken for å isolere den antiinflammatoriske faktor er beskrevet nedenfor.

Den enkleste prosess for isolering, rensing og testing av den antiinflammatoriske faktor omfatter de følgende trinn:

1. fjerning av fett fra den hyperimmune melk for å fremstille skummet melk,
2. fjerning av kasein fra skummet melk for å fremstille myse,
3. fjerning fra mysen av makromolekyler med molekylvekt større enn omtrent 10.000 dalton ved ultrafiltrering,

4. fraksjonering av produktet fra trinn 3 ved anvendelse av en ionebytterharpikskolonne for å isolere en negativt ladet antiinflammatorisk species med molekylvekt mindre enn 10.000 dalton,
  5. separering av den negativt ladede species fra trinn 4 ved molekylsilkromatografi, og
  6. biologisk analyse av antiinflammatorisk faktor-preparatet fra trinn 5.
- 10 I en alternativ foretrukket utførelsesform blir fraksjonene fra molekylsilkromatografi som har biologisk aktivitet videre renset ved filtrering gjennom en membran som tilbakeholder makromolekyler med molekylvekt større enn omtrent 5.000 dalton.
- 15
7. Den antiinflammatoriske virkning av melkefaktoren testes på ødem som er forårsaket ved injeksjon av en oppløsning av karrageenan i poten til rotter. Rottepotettesten er standard-dyretesten for antiinflammatoriske medikamenter.
- 20 Winter, C.A., Risley, G.A., Nuss, A.W., "Carrageenan-Induced Edema in the Hind Paw of the Rat as an Assay for Anti-inflammatory Drugs", Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 3:544 (1967). Alternativt kan man anvende en plevral nøytrofil migrasjonsinhibering-analyse som beskrevet i
- 25 eksempel 24. Vinegar et al., "Some Quantitative Characteristics of Carrageenan-induced Pleurisy in the Rat", Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 143:711-714 (1973); Ammendola, G. et al. "Leukocyte Migration and Lysozomal Enzymes Release in Rat Carrageenan Pleurisy", Agents and Actions 5:250-255 (1975); Vinegar, R. et al. "Quantitative Studies
- 30 of the Pathway to Acute Carrageenan Inflammation". Fed. Proc. 35:2447-2456 (1976). En rekke forskjellige andre tester kan anvendes. Wetnick, A.S. og Sabin, C. "The Effects of Clonixin and Bethaurethasone on Adjuvant-
- 35 Induced Arthritis and Experimental Allergic Encephalomyelitis in Rats, "Jap. J. Pharm. 22:741 (1972). Rottepotettesten er imidlertid den enkleste og mest direkte test som er tilgjengelig, og har vist seg å være tilfredsstillende for alle antiinflammatoriske medikamenter. Denne testen

har blitt beskrevet detaljert i Beck, US patent 4,284,623, som er innlemmet heri ved referanse i den grad at den beskriver rottepotetesten. I korte trekk involverer testen injeksjon av en liten mengde karrageenan inn i fotputen  
5 til voksne hvite rotter. Dette er kjent å indusere en antiinflammatorisk respons. Den resulterende grad av hevelse kan kvantifiseres. Prøver inneholdende en antiinflammatorisk faktor administreres til rotten på en hvilken som helst passende måte, foretrukket ved intraperi-  
10 tonal injeksjon, og blokkeringen eller bedringen av den inflammatoriske prosess kvantifiseres ved hjelp av enten volumetriske eller gravimetrisk metoder.

Sammenfattet kan man isolere den antiinflammatoriske faktor  
15 fra hyperimmunisert melk ved å følge en prosess med fjerning av fett fra melken, fjerning av kasein, fjerning av makromolekyler større enn 10.000 dalton, og å fortsette med ionebytter- og molekylsilkromatografi. Den biologiske aktivitet av passende preparater av antiinflammatorisk faktor kan testes ved å gjøre et dose-respons-forsøk på rotter som  
20 beskrevet heri.

I en ytterligere foretrukket utførelsesform av den foreliggende oppfinnelse renses den antiinflammatoriske faktor til  
25 stede i hyperimmunisert melk ved anvendelse av en kombinasjon av trinn som involverer: filtrering på en membran som er i stand til å separere molekyler basert på deres molekylvekter, ionebyttekromatografi, molekylsilkromatografi, og affinitetskromatografi (eksempel 15). Det foretrukne første trinn  
30 omfatter filtrering av hyperimmun skummet melk, produsert som beskrevet i det foregående, gjennom en membran som tilbackholder molekyler med molekylvekter på omtrent 10.000 dalton eller mer. Materialet som slippes igjennom av membranen (dvs. filtratet eller permeatet) samles og anvendes i videre  
35 rensetrinn. Anordninger og membraner for å utføre slike filtreringer er velkjent innen fagområdet.

Det foretrukne trinn etter filtrering er ionebyttekromatografi på en anionbytter. Byttere som har dietylaminoetyl-

grupper er blitt funnet å effektuere gode separasjoner men det forventes at også andre anionbyttere kan anvendes. Det er foretrukket at den faste bæreren av ionebytteren er i stand til å opprettholde høye gjennomstrømningsmengder. Sefarose er blitt funnet å være egnet for dette formål.

Det foretrukne trinn etter ionebytterkromatografi er gelfiltreringskromatografi. Det bør velges en kolonnefylling for dette trinn som er i stand til å fraksjonere molekyler med molekylvekter på mindre enn 10.000 dalton. Den foretrukne fylling er Toyopearl HW-40 (Rhom and Haas) men andre fyllinger som er velkjent innen fagområdet kan også anvendes. Eksempler på andre fyllinger som kan anvendes og som er kommersielt tilgjengelige er polymere karbohydratbaserte fyllinger, f.eks. Sephadex G-10 eller G-25 (Pharmacia), eller polyakrylamidbaserte fyllinger, f.eks. Biogel P-2, P-4, P-6, P-10 eller P-30 (Bio-Rad).

Det foretrukne trinn etter gelfiltreringskromatografi er affinitetskromatografi på en borataffinitetsbærer. Disse bærere er blitt funnet å være effektive ved fraksjonering av forbindelser med lav molekylvekt med cis-diolgrupper. Den foretrukne bærer er AffiGel 601 (Bio-Rad). Dette er et boratderivat av polyakrylamid-gelfiltreringsbæreren Bio-Gel P-6 (også solgt av Bio-Rad).

Den foretrukne lagringsmåte for preparater etter ionebytte-, gelfiltrerings- eller affinitetskromatografitrinn er som et frysetørket pulver. Filtratet samlet i det første rensetrinnet kan lagres nedkjølt inntil bruk. Aktiviteten av den antiinflammatoriske faktor som resulterer fra rensingen kan bestemmes ved anvendelse av rottepotettesten beskrevet i det foregående.

I en annen foretrukket utførelsesform av den foreliggende oppfinnelse blir den antiinflammatoriske faktor til stede i hyperimmunisert melk analytisk eller preparativt renset ved anvendelse av en kombinasjon av trinn som involverer: ultrafiltrering med en membran som har en molekylvektterskel

(cutoff) på 10.000 dalton, ionebytterkromatografi, størrelsesseksklusjonskromatografi på en preparativ HPLC-kolonne og organisk ekstraksjonspartisjon.

- 5 I et foretrukket første trinn føres et stort volum (f.eks. 90 liter) av skummet melk gjennom en ultrafiltreringsmembran med en 10.000 dalton terskel. Det resulterende permeat (<10K permeat) samles for ytterligere rensetrinn.
- 10 Det foretrukne trinn etter den ovennevnte ultrafiltrering er å tilføre et stort volum (f.eks. 60 liter) permeat fra det tidligere trinn til en ionebytterkolonne. Eluatet kan deretter frysetørkes. Dietylaminoetyl (DEAE)-Sepharose Fast Flow bytteharpiks er blitt funnet å effektivere god separasjon.
- 15

- Det foretrukne trinn etter den ovennevnte ionebytterkromatografi er anbringelse på en preparativ HPLC-kolonne av en stor mengde (f.eks. 100 mg) av det rensede preparat fra ionebytte-
- 20 kolonnen. Selv større mengder kan oppnås ved separering av multiple prøver på 100 mg hver på HPLC-kolonnen og å samle dem i det samme sett av rør. Rørene kan deretter tas sammen og deres innhold frysetørkes.

- 25 Det neste foretrukne trinn er organisk partisjonsekstraksjon som kan medføre å ta 50-100 mg av de frysetørkede HPLC-kolonneprøvene og å ekstrahere med n-heksan for å fjerne nøytrale lipider, surgjøring og deretter å ekstrahere på ny med etylacetat. Analysen av et preparat på en aminopropyl-
- 30 svak anionbytterkolonne før og etter organisk partisjonsekstraksjon er vist i fig. 44.

- Resultater av forsøk beskrevet i eksempel 16 indikerer at forbehandling av dyr med preparater av antiinflammatorisk
- 35 faktor reduserer den blodplateaktiverende faktor (PAF) stimulerende adhesjon av nøytrofiler til endotelcellene som utgjør innsideflaten i venyler og reduserer den rate hvorved nøytrofiler emigrerer fra venyler. I tillegg ble administrasjon av preparater av faktoren etter behandling av dyr med PAF funnet

å redusere antallet nøytrofiler som adherer til endotel-celler. I den grad at pasienter eller dyr kan ha fordel av disse effekter, omfatter den foreliggende oppfinnelse anvendelse av den antiinflammatoriske faktor. Dette er tilfellet uavhengig av den spesielle sykdom som er indikert. Likeledes indikerer dataene i eksempel 16 at den antiinflammatoriske faktor forårsaker dens effekter på adhesjon og emigrasjon ved direkte å interagere med celleoverflate CD18 antigener og å hindre andre molekyler i å interagere med dette glykoprotein-komplekset. Den foreliggende oppfinnelse omfatter anvendelse av den antiinflammatoriske faktor også for dette formål.

Som vist i eksempel 18 undertrykker administrasjon av et preparat av antiinflammatorisk faktor til dyr Host-vs.-Graft men ikke Graft-vs.-Host reaksjonen og bevirker en økning i miltvekt og i antallet miltlymfocytter. Lymfocytteresponsen på Concanavalin A ble også funnet å bli motvirket av preparatet. Disse data indikerer at den antiinflammatoriske faktor er anvendbar ved inhibering av vevsødeleggende infeksiose prosesser, og i situasjoner hvor suppresjon av lymfocyttsfunksjon er ønskelig.

Som vist i figur 43 resulterer avsalting av MAIF (oppnådd ved organisk partisjonsekstraksjon) i dramatiske økninger i rensing som indikert ved at så mye som en 10.000 ganger lavere dose av MAIF er nødvendig for å oppnå lignende nivåer av migrasjonsinhibering av rotte-plevralleukocytter.

Preparatene i samsvar med den foreliggende oppfinnelsen kan administreres på en hvilken som helst måte som tilveiebringer antiinflammatorisk aktivitet. For eksempel kan administrasjon være parenteral, subkutan, intravenøs, intramuskulær, intraperitoneal eller oral.

Faste doseringsformer for oral administrasjon inkluderer kapsler, tabletter, piller, pulvere og granuler. I slike faste doseringsformer er den aktive forbindelse blandet med minst ett inert fortynningsmiddel slik som sukrose, laktose eller stivelse. Slike doseringsformer kan også omfatte,



hvilket er normal praksis, ytterligere substanser bortsett fra inert fortynningsmiddel. I tilfellet med kapsler, tabletter og piller kan doseringsformene også omfatte buf-  
ringsmidler. Tabletter og piller kan ytterligere fremstilles  
5 med et enterisk belegg.

Flytende doseringsformer for oral administrasjon inkluderer farmasøytisk akseptable emulsjoner, oppløsninger, suspensjoner, siruper og eliksirer, inneholdende inerte fortynningsmidler alminnelig anvendt innen det farmasøytiske  
10 område. Foruten inerte fortynningsmidler kan slike preparater også inkludere adjuvanter, slik som fuktemidler, emulgerings- og suspensjonsmidler, og søtningsmidler.

15 Preparater i samsvar med denne oppfinnelsen for parenteral administrasjon inkluderer sterile vandige eller ikke-vandige oppløsninger, suspensjoner eller emulsjoner. Eksempler på ikke-vandige løsningsmidler eller vehikler er propylenglykol, polyetylenglykol, vegetabiliske oljer slik som olivenolje og  
20 injiserbare organiske estere slik som etyloleat.

Doseringen av aktive ingredienser i preparatet i samsvar med denne oppfinnelsen kan varieres. Det er imidlertid nødvendig at mengden av den aktive bestanddel skal være slik at en  
25 passende doseringsform oppnås. Den valgte doseringsform avhenger av den ønskede terapeutiske effekt, på administrasjonsruten og på varigheten av behandlingen.

Administrasjonsdosering og -hyppighet vil avhenge av alderen  
30 og den generelle helsetilstand til pasienten, idet muligheten for bivirkninger tas i betraktning. Administrasjon vil også være avhengig av samtidig behandling med andre medikamenter og pasienters toleranse av det administrerte medikament.

35 Idet oppfinnelsen nå er beskrevet i generelle vendinger, vil oppfinnelsen beskrives ytterligere ved referanse til visse spesifikke eksempler som er tilveiebragt heri kun med det formål å være forklarende.

**Eksempel 1A****Fremstilling av S-100 vaksine**

En bakteriekultur inneholdende det spektrum av bakterier som er vist i tabell 1 i det etterfølgende som oppnådd fra the  
5 American Type Culture Collection ble rekonstituert med 15 ml medier og inkubert over natten i 37°C. Så snart god vekst var oppnådd ble omtrent halvparten av bakteriesuspensjonen anvendt til å inokulere en liter dyrkingsløsning idet inokulatet inkuberes ved 37°C. Den gjenværende suspensjon ble  
10 overført til sterile glykolrør og lagret ved -20°C i opp til 6 måneder.

Etter at god vekst var synlig i kulturen ble bakteriecellene høstet ved sentrifugering av suspensjonen i 20 minutter for å  
15 fjerne media. Den oppnådde bakteriepellet ble resuspendert i steril saltoppløsning og bakterieprøven ble sentrifugert tre ganger for å vaske mediene fra cellene. Etter den tredje vask med steril saltoppløsning ble bakteriepelleten oppnådd ved sentrifugering resuspendert i en liten mengde dobbelt-  
20 destillert vann.

Den mediafrie bakteriesuspensjon ble varmedrept ved anbringelse av suspensjonen i en glasskolbe i et 80°C vannbad over natten. Levedyktigheten av dyrkingsløsnings-kulturen ble  
25 testet med en liten mengde varmedrepte bakterier. Dyrkningsløsningen ble inokulert med varmedrepte bakterier, inkubert ved 37°C og kontrollert daglig for vekst, da bakteriene må være drept for anvendelse i vaksinen.

30 De varmedrepte bakterier ble frysetørket inntil tørr tilstand. De tørre bakterier ble deretter blandet med steril saltoppløsning til en konsentrasjon på  $2,2 \times 10^8$  bakterieceller/ml saltoppløsning (1,0 optisk densitet-avlesning ved 660 nm).

| Tabell 1                                |       |                   |       |
|-----------------------------------------|-------|-------------------|-------|
| S-100 Bakterieliste                     |       |                   |       |
| Navn                                    | Media | Gram +<br>eller - | ATTC# |
| 1. <i>Staph. aureus</i>                 | BHI   | +                 | 11631 |
| 2. <i>Staph. epidermidis</i>            | BHI   | +                 | 155   |
| 3. <i>Strep. pyogenes</i> , A. Type 1   | APT   | +                 | 8671  |
| 4. <i>Strep. pyogenes</i> , A. Type 3   | APT   | +                 | 10389 |
| 5. <i>Strep. pyogenes</i> , A. Type 5   | APT   | +                 | 12347 |
| 6. <i>Strep. pyogenes</i> , A. Type 8   | APT   | +                 | 12349 |
| 7. <i>Strep. pyogenes</i> , A. Type 12  | APT   | +                 | 11434 |
| 8. <i>Strep. pyogenes</i> , A. Type 14  | APT   | +                 | 12972 |
| 9. <i>Strep. pyogenes</i> , A. Type 18  | APT   | +                 | 12357 |
| 10. <i>Strep. pyogenes</i> , A. Type 22 | APT   | +                 | 10403 |
| 11. <i>Aerobacter aerogenes</i>         | BHI   | -                 | 884   |
| 12. <i>Escherichia coli</i>             | BHI   | -                 | 26    |
| 13. <i>Salmonella enteritidis</i>       | BHI   | -                 | 13076 |
| 14. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>       | BHI   | -                 | 7700  |
| 15. <i>Klebsiella pneumoniae</i>        | BHI   | -                 | 9590  |
| 16. <i>Salmonella typhimurium</i>       | BHI   | -                 | 13311 |
| 17. <i>Haemophilus influenzae</i>       | BHI   | -                 | 9333  |
| 18. <i>Strep. mitis</i>                 | APT   | +                 | 6249  |
| 19. <i>Proteus vulgaris</i>             | BHI   | -                 | 13315 |
| 20. <i>Shigella dysenteriae</i>         | BHI   | -                 | 11835 |
| 21. <i>Diplococcus pneumoniae</i>       | APT   | +                 | 6303  |
| 22. <i>Propionibacter acnes</i>         | D.1.* | +                 | 11827 |
| 23. <i>Strep. sanguis</i>               | APT   | +                 | 10556 |
| 24. <i>Strep. salivarius</i>            | APT   | +                 | 13419 |
| 25. <i>Strep. mutans</i>                | BHI   | +                 | 25175 |
| 26. <i>Strep. agalactiae</i>            | APT   | +                 | 13813 |

\*Dyrkingsløsning

Kuer ble gitt daglige injeksjoner av 5 ml prøver av den polyvalente flytende vaksine. Antistoff (IgG) titernivåer for det injiserte kveg ble bestemt periodisk ved anvendelse av en enzyme-linked immunoassay for bovint antistoff mot det polyvalente antigen.

#### Eksempel 1B

##### Immuniseringsprosedyrer

Varmedrepte bakterier ble frembragt på samme måte som beskrevet ovenfor. Den oppnådde polyvalente antigenprøve (S-100) ble mikroinnkapslet ved en konvensjonell faseseparasjonsprosess for å fremstille et polyvalent antigeninnholdende mikropartikkelprodukt. Generelt dannes de antigeninnholdende formede matriksmaterialer fra polymerer av bioforlikelig material, foretrukket biologisk nedbrytbare eller biologisk eroderbare materialer, foretrukket polymelkesyre, polyglykolsyre, kopolymerer av melkesyre og glykolsyre, polykaptolakton, kopolyoksalater, proteiner slik som kollagen, fettsyrestere av glycerol, og celluloseestere. Disse polymerer er velkjent innen fagområdet og er beskrevet for eksempel i US 3,773,919, US 3,887,699, US 4,118,470, US 4,076,798, alle innlemmet heri ved referanse. Det anvendte polymere matriksmaterial var en biologisk nedbrytbar laktidglykolid-kopolymer.

25

Varmedrepte bakterielle antigener innkapsles i slike matriksmaterialer, foretrukket som mikrokuler med diameter mellom 1-500 mikrometer, foretrukket 10-250 mikrometer. Innkapslingsprosessene er konvensjonelle og omfatter faseseparasjonsmetoder, grenseflaterreaksjoner og fysiske metoder. Mange kombinasjoner av matrikser og mange konsentrasjoner av assorterte antigener kan anvendes, for å sørge for optimale frigjøringsrater av bakterielle antigener til vertskroppen fra mikropartiklene. Disse kombinasjoner kan bestemmes av de fagkyndige på området uten unødvendig eksperimentering.

35

Mikropartiklene i eksempelet var mindre enn 250 mikrometer i diameter. Omtrent 750 mg mikropartikler inneholdende 22% (16,5 mg) polyvalent antigen ble deretter suspendert i om-

trent 3 ml av en vehikkel (1 vekt% Tween 20 og 2 vekt% karboksymetylcellulose i vann).

En liten gruppe kveg ble utvalgt fra en større kvegflokk.

- 5 Fem av disse vilkårlig utvalgte kveg ble valgt som kontroller. Fire kveg ble injisert intramuskulært med mikropartikler inneholdende polyvalent antigen. Mikropartikkelprøver ble sterilisert med 2,0 mRad gammastråling. Antistoff (IgG) titernivåer ble bestemt periodisk fra prøver av kumelk opp-
- 10 nådd fra de inokulerte kuer, så vel som fra kontrollkuene.

## Eksempel 2

### Isolasjon av MAIF faktor fra hyperimmunisert melk

#### *Trinn 1: Fremstilling av melkefiltrat*

- 15 20 liter frisk melk fra hyperimmuniserte kuer ble kjørt gjennom en fløteseparator (DeLaval Model 102) for å fjerne fett.

- De resulterende 16 liter skummet melk ble ultrafiltrert for å
- 20 fjerne species med høy molekylvekt (over 10.000 dalton) ved anvendelse av en hulfiber-diafiltrering/konsentrator (Amicon DL-10L). Konsentratoren er utstyrt med to 10.000 dalton molekylvektterskel-patroner (Amicon H<sub>5</sub>P<sub>10-43</sub>). Den skummete melken ble kjørt ved en pumpehastighet på 80 på måleren og
- 25 innløps- og utløpstrykk på henholdsvis 0,21 MPa og 0,17 MPa.

- 12 liter av filtratet (<10.000 dalton) som kommer ut av patronene ved en strømningshastighet på 4 liter pr. time ble frosset eller frysetørket for lagring og for ytterligere
- 30 rensing.

#### *Trinn 2: Ionebytterkromatografi*

Den melk-antiinflammatoriske faktor i filtratet ble først isolert ved hjelp av en anionbytterkromatografikolonne.

35

I denne prosedyren ble DEAE-Sepharose CL-6B (Pharmacia) anvendt for å fylle en 5x10 cm glasskolonne som var ekvilibrert med sterilt dobbeltdestillert vann, pH 7,0.

1 liter filtrat (<10.000) ble tilført til kolonnen og eluert med sterilt dobbeltdestillert vann, pH 7,0 ved en strømningshastighet på 160 ml pr. time. 10 ml fraksjoner ble samlet og kontrollert ved 280 nm i en LKB Uvicord 4700 absorpsjonsmåler med en optisk densitet skrevet ut på en tilknyttet skriver (Pharmacia REC-482).

Substanser forskjellig fra den antiinflammatoriske faktor som har positive og nøytrale ladninger er ikke bundet til DEAE-Sepharose-gelen. De elueres ved gjennomfallings-toppen (første topp). Den antiinflammatoriske faktor som bærer en negativ ladning tilbakeholdes av gelen.

For å eluere faktoren ble kolonnen eluert med en trinnvis gradient ved anvendelse av steril fysiologisk saltoppløsning, pH 7,0. En typisk profil er vist i fig. 1. Bioassay av de individuelle fraksjoner åpenbarte at den andre topp inneholder faktoren. Fraksjoner omfattende den andre topp og dens skulder anvendes for videre rensing. Utvinningsundersøkelser viser at 8,8 gram tørret pulver ble oppnådd ved denne prosessen.

### *Trinn 3: Gelfiltreringskromatografi*

Den andre topp oppnådd fra trinn 2 inneholder den antiinflammatoriske faktor og andre negativt ladede molekyler. Et ytterligere rensingstrinn var derfor nødvendig. For å oppnå ytterligere rensing er det hensiktsmessig å anvende en gelfiltreringskolonne for å separere forskjellige komponenter på grunnlag av molekylvekt.

30

I denne prosessen ble Sephadex G-10 harpiks (Pharmacia) fylt i en 2,5x80 cm glasskolonne og ekvilibrert med sterilt dobbeltdestillert vann, pH 7,0. To gram av den andre fraksjonen fra trinn 2 ble oppløst på ny i sterilt dobbeltdestillert vann og tilført til toppen av kolonnen. Kolonnen ble eluert ved en strømningshastighet på 30 ml pr. time. Fraksjoner (3,3 ml) ble samlet og kontrollert ved 254 nm og 280 nm (Pharmacia Duo Optical Unit) med optisk densitet skrevet ut på en tilknyttet skriver (Pharmacia REC-482).

Der var typisk 3 topper vist i elueringsprofilen som illustrert i fig. 2. Den første og andre topp inneholdt anti-inflammatorisk aktivitet.

- 5 Den første topp er et aggregat som dannes på G-10 kolonnen som inneholder den aktive faktor.

Den andre topp inneholder den ikke-aggregerte form av faktoren. Både aggregatformen (topp 1) og den ikke-aggregerte form  
10 (topp 2) er biologisk aktive i rotte-bioassay.

### Eksempel 3

#### Karakterisering av melk-antiinflammatorisk faktor

Molekylvekten av den ikke-aggregerte form av faktor fremstilt  
15 ved metoden beskrevet i det foregående ble funnet å være mindre enn 10.000 dalton. Dette ble utledet fra det faktum at det første trinn i isoleringen av faktoren fra myse var ved ultrafiltrering under anvendelse av en membran som ikke tillater passering av species med molekylvekt >10.000 dalton.

20 Faktoren har en negativ ladning. Dette ble bestemt ved tilføring av melk-ultrafiltrat til en DEAE-celluloseionebytterkolonne. Den antiinflammatoriske aktivitet eluerte ikke fra kolonnen med vann. Endring av elueringsmediene til natriumklorid (0,9% pH) forårsaket eluering av flere topper (fig. 1). Nøytrale og positivt ladede species adherer ikke til  
25 ionebytterharpiksen, og negativt ladede species elueres ved økning av saltkonsentrasjonen. Når permeatet med molekylvekt mindre enn 10.000 dalton ble tilført til DEAE kolonnen elu-  
30 erte nøytrale salter og sukkerer med vann (topp 1, fig. 1). Tre tydelige topper eluerte når bufferen ble endret til saltoppløsning (topper 2-4). Den andre topp og dens skulder inneholdt antiinflammatorisk biologisk aktivitet i rotteanalysen. Det konkluderes derfor at faktoren har en negativ  
35 ladning.

Et annet kjemisk kjennetegn av faktoren er at det danner et aggregat under prosessen med fjerning av salt. Denne egenskapen ble åpenbar når permeat med molekylvekt <10.000 dalton

ble ført over en Sephadex G-10 kolonne, ekvilibrert med dobbeltdestillert vann og eluert med vann ved en pH på 7 (fig. 2). Tre topper eluerte fra G-10 kolonnen. Den første toppen eluerte med det ubesatte volum hvilket antyder en molekylvekt lik eller større enn 10.000 dalton. Dette var uventet fordi molekyler større enn 10.000 dalton tidligere hadde blitt fjernet fra denne prøven ved ultrafiltrering. Den andre topp eluerte i den stilling som var forventet for den antiinflammatoriske faktor. Både den første og andre topp utviste antiinflammatorisk biologisk aktivitet i rotte-poteanalysen, mens den tredje topp manglet aktivitet. Det var overraskende å finne at både den første og andre topp hadde antiinflammatorisk biologisk aktivitet. Materialet utvunnet fra den første topp av G-10 kolonnen (trinn 3) ble frysetørket og tilført til en G-100 kolonne. En enkelt topp ble eluert med det ubesatte volum, hvilket antyder en molekylvekt på 100.000 dalton eller større. G-10 kolonnen i trinn 3 fjerner salt på samme tid som den separerer de forskjellige molekylvekt-species. Det konkluderes derfor at under passering over G-10 kolonnen og resulterende fjerning av salt dannet den antiinflammatorisk faktor et aggregat med stor molekylvekt. Aggregasjonsgraden varierte med saltkonsentrasjonen.

Aggregasjonsegenskapen antyder den mulighet at et bredt spektrum av species med forskjellig molekylvekt kan dannes som har antiinflammatorisk biologisk aktivitet på grunn av tilstedeværelsen av den antiinflammatoriske faktor. Funnet av denne egenskap henleder tanken på den mulighet å produsere melk-antiinflammatoriske faktorer som har et bredt spektrum av forskjellige biokjemiske egenskaper avhengig av aggregasjonsgraden av sluttproduktet. For eksempel kan formuleringer som har lengere eller kortere biologiske halveringstider fremstilles ved anvendelse av aggregater med større eller mindre molekylvekt, idet molekylvektfordelingen styres ved saltkonsentrasjonen under bearbeiding. Kolonnekromatografimetoden beskrevet heri resulterer i species med den minste molekylvekt som har blitt oppnådd som har biologisk aktivitet (dvs. topp 2 fra G-10 kolonnen i trinn 3). Denne



observasjonen leder også tankene hen på anvendelse av andre metoder for dannelsen av aggregatene. For eksempel bevirker fortynning i vann at aggregasjon inntreffer. Kjemiske midler som binder salter, særlig kalsium, kan forårsake dannelsen av aggregatet. Etter at dette funn er gjort vil andre metoder for dannelsen av aggregatet og separering av faktoren være åpenbare for de fagkyndige innen området.

#### Eksempel 4

##### 10 Analyse av biologisk aktivitet

Den antiinflammatoriske aktivitet av renset antiinflammatorisk faktor ble testet på ødem som var forårsaket av injeksjon av en oppløsning av karrageenan inn i fotputene til rotter. En frysetørket prøve av melk-antiinflammatorisk faktor-preparatet ble oppløst i en passende vehikkel og gitt intraperitonealt til forsøksrotter. Karrageenanet ble deretter administrert til rottene i en mengde på 0,1 ml av en 1% saltoppløsning i hver bakre fotpute. Fotputene ble målt før injeksjonene ble gitt og 2,5 timer etter injeksjonene, under anvendelse av en tykkelsesmåler. Resultatene er illustrert i tabeller 2 og 3. I disse tabellene refererer forkortelsen MAIF til preparatet av melk-antiinflammatorisk faktor oppnådd under anvendelse av prosedyrene beskrevet i eksempler 1 og 2 i det foregående.

25

Den ikke-aggregerte form av faktoren (topp 2 fra G-10 kolonnen) fra kontroll- og hyperimmun melk bevirket reduksjon i inflammasjon av rottepoten ved doser mellom 1 mg og 0,25 mg (tabell 2). Både den hyperimmune melk og den regulære melk utviste aktivitet. Det hyperimmune material var imidlertid mer kraftig. Det ble fra dette konkludert at den antiinflammatoriske faktor er til stede i større konsentrasjon i melken fra hyperimmune kuer.

35 Den andre topp fra DEAE kolonnen utviste aktivitet når isolert fra enten hyperimmun melk eller regulær melk. Aktiviteten er vesentlig større i den hyperimmune melk (tabell 3).

Den første topp fra G-10 kolonnen, som er den aggregerte form av faktoren, utviste aktivitet i rottepotetester (tabell 2). Den aggregerte form er imidlertid ikke så kraftig som den ikke-aggregerte form på et grunnlag med lik vekt.

5

Det konkluderes fra disse undersøkelser at den antiinflammatoriske faktor forekommer naturlig i kumelk. Hyperimmunisering av kuene forårsaker høyere konsentrasjon av faktor i melken. Faktoren er et lite, negativt ladet molekyl som kan separeres fra melken ved hjelp av en rekke forskjellige metoder. Faktoren kan danne aggregater med høy molekylvekt som ikke naturlig forekommer i melk, men dannes under bearbeiding.

10

| <b>Tabell 2</b><br><b>Effekt av melk-antiinflammatorisk faktor (MAIF)</b><br><b>på reduksjon av inflammasjon i rotter</b> |                  |                    |           |                        |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|--------------------|-----------|------------------------|
| <b>Fremstilt fra hyperimmun melk</b>                                                                                      |                  |                    |           |                        |
| <u>Fotpute-målinger (mm)</u>                                                                                              |                  |                    |           |                        |
| MAIF Dosering                                                                                                             | Før<br>injeksjon | Etter<br>injeksjon | Forskjell | %<br>Inflamma-<br>sjon |
| 2,0 mg/rotte                                                                                                              | 3,43             | 5,01               | 1,58      | 46                     |
| 1,0 mg/rotte                                                                                                              | 3,49             | 5,39               | 1,90      | 54                     |
| 0,5 mg/rotte                                                                                                              | 3,42             | 5,51               | 2,09      | 61                     |
| 0,1 mg/rotte                                                                                                              | 3,43             | 5,86               | 2,43      | 71                     |
| Kontroll/<br>saltoppløsning                                                                                               | 3,43             | 5,82               | 2,39      | 70                     |
| <b>Fremstilt fra normal kumelk</b>                                                                                        |                  |                    |           |                        |
| 2,0 mg/rotte                                                                                                              | 3,30             | 5,24               | 1,94      | 59                     |
| 1,0 mg/rotte                                                                                                              | 3,31             | 5,22               | 1,91      | 58                     |
| 0,5 mg/rotte                                                                                                              | 3,32             | 5,33               | 2,01      | 61                     |
| 0,25 mg /rotte                                                                                                            | 3,31             | 5,42               | 2,11      | 64                     |

| Tabell 3<br>Sammenligning av halvrensede fraksjoner av MAIF<br>på reduksjon av inflammasjon i rotter<br>(Fremstilt fra hyperimmun og regulær melk) |                  |                                 |           |                        |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|---------------------------------|-----------|------------------------|
| Fotpute-målinger (mm)                                                                                                                              |                  |                                 |           |                        |
|                                                                                                                                                    | Før<br>injeksjon | 2,5 timer<br>etter<br>injeksjon | Forskjell | %<br>Inflamma-<br>sjon |
| DEAE kolonne<br>andre topp<br>hyperimmun<br>melk<br>2 mg/rotte                                                                                     | 3,25             | 5,04                            | 1,79      | 55                     |
| DEAE kolonne<br>andre topp<br>regulær melk<br>2 mg/rotte                                                                                           | 3,30             | 5,24                            | 1,94      | 59                     |
| G-10 kolonne<br>første topp<br>2 mg/rotte                                                                                                          | 3,31             | 4,98                            | 1,67      | 50                     |
| Kontroll/<br>saltoppløsning                                                                                                                        | 3,34             | 5,63                            | 2,29      | 69                     |

#### Eksempel 5

##### Kjemisk analyse av antiinflammatorisk faktor

Antiinflammatorisk faktor-prøver ble analysert kjemisk.

- 30 Faktoren er ikke krystallinsk av struktur, som bestemt ved røntgendiffraksjonsundersøkelser. MAIF preparater ga en elementæranalyse i overensstemmelse med karbohydrat-sammensetning. Forholdene av C, H og O var i overensstemmelse med et polymert eller oligomert material idet noen karbinolgrupper
- 35 er oksydert til karboksyl. Det svake overskudd av kalsium-ekvivalenter i forhold til kloridioner kan gjøres rede for delvis som karboksylatsalter. Det gjenværende kan være natrium- eller kaliumsalter. Smeltingsoppgjørselen, eller
- 40 snarere ikke-smeltingsoppgjørselen, tydet imidlertid på saltlignende sammensetninger og/eller sammensetninger med høyere molekylvekt. Materialer i den foreliggende renhetstilstand

inneholder åpenbart en varierende mengde salter av kalsium og klorid, sannsynligvis  $\text{CaCl}_2$ .

Intet preparat inneholdt en betydelig mengde nitrogen som  
5 utelukker enhver peptidkomponent i sin sammensetning. Fraværet av vesentlig nitrogen kan likeledes utelukke nærværet av aminosukker og andre nitrogeninnholdende materialer slik som forskjellige komplekse lipider som hovedkomponent(er).

10 Pyrolytiske massespektra åpenbarte vesentlige spor av fettsyrer med 18 karbonatomer. Dette faktum, tatt sammen med spor av N og P, antyder nærværet av et komplekst lipid i preparatet.

15 Infrarød spektroskopi åpenbarte absorpsjoner svarende til karbinol- og karboksylatfunksjonaliteter. Ultrafiolett, synlig og fluorescerende spektroskopi åpenbarte ingen vesentlig mengde av kromoforer utover dem indikert ved infrarød spektroskopi.

20

De kjemiske tester overensstemmer med et oligomert karbohydrat, hvori karbonylfunksjonen (aldehyd eller keton) er bundet opp i subenhets-bindinger. Det oligomere karbohydrat inneholder også noe sidekjede-oksydasjon til karboksylat.

25

MAIF preparatet er i alt vesentlig, men ikke fullstendig rent.

#### Eksempel 6

30 Rottepoteødem-tester: Oral administrasjon

Karrageenan-rottefotputeanalysen ble anvendt for å teste effektiviteten av den antiinflammatoriske faktor som et in vivo antiinflammatorisk middel. 30 voksne hvite rotter ble vilkårlig delt i tre grupper av ti rotter pr. gruppe. Gruppene mottok, i fem daglige behandlinger på rad, enten 10 mg  
35 skummet melk-pulver fra hyperimmuniserte dyr, 10 mg skummet melk-pulver fra ikke-immuniserte dyr eller ingen behandling (kun 20 ml vann pr. dag). Pulverene ble oralt administrert i 20 ml vann. På den femte dag ble den høyre pote av hver

rotte injisert med 0,1 ml av 1% karrageenan i saltoppløsning. Denne prosedyren er kjent å forårsake akutt inflammasjon (ødem). 24 timer etter injeksjon ble rottene avlivet, potene amputert, og vekten av venstre (kontroll) og høyre (oppsvulmet) poter ble sammenlignet. Resultatene av analysen er vist i tabell 4 (uttrykt som vekt i gram) og i fig. 3 (uttrykt som prosentandel av den gjennomsnittlige vekt av kontrollpoter).

| <b>Tabell 4</b><br><b>Resultater av rottepoteødem-test</b><br>(Pote-vekt, g, middelerdi $\pm$ sem, n = 10) |                               |                            |                  |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|----------------------------|------------------|
| Behandling                                                                                                 | Karrageenan<br>Pote (vekt, g) | Kontroll<br>Pote (vekt, g) | Forskjell<br>(g) |
| Immun melk                                                                                                 | 1,78 $\pm$ 0,03               | 1,71 $\pm$ 0,02            | 0,06 $\pm$ 0,02  |
| Kontrollmelk                                                                                               | 1,88 $\pm$ 0,06               | 1,64 $\pm$ 0,03            | 0,24 $\pm$ 0,05  |
| Vann                                                                                                       | 1,86 $\pm$ 0,03               | 1,65 $\pm$ 0,03            | 0,22 $\pm$ 0,02  |

Den inflammatoriske respons på karrageenaninjeksjon ble markert redusert i rottene behandlet med immun melk når sammenlignet med gruppen gitt ikke-immun melk og kontrollgruppen gitt vann. Ingen tegn på bivirkninger eller uheldige virkninger på den generelle helse til rottene ble påvist. Fra disse data kan det konkluderes at daglig forbruk av skummet melk-pulver fra hyperimmuniserte dyr nesten fullstendig blokkerte den inflammatoriske respons induert ved injeksjon av karrageenan i fotputen til rotter.

#### Eksempel 7

##### Kvantitative rottepoteødem-tester

En serie forsøk ble utført på hyperimmun melk-fraksjonen. Forsøkene var utformet for å bekrefte den antiinflammatoriske aktivitet av den melk-antiinflammatoriske faktor når gitt intraperitonealt og å etablere en dose-respons-kurve, utforske alternative administrasjonsruter og undersøke doseringskurver som kan danne grunnlaget for videre undersøkelser.

Topp I fra G-10 kolonnen, levert av Stolle Milk Biologics International, ble fremstilt i samsvar med metodene beskrevet i patent nr. 4,956,349. Laktose, oppnådd fra kommersielle kilder, ble anvendt som placebo. Aspirin ble anvendt som positiv kontroll. Aspirin ble oppløst i vann og ble gitt oralt ved gastrisk gavage ved et forhold på 200 mg pr. kilo, en dose kjent for å være aktiv i analysen. En 2% oppløsning av kappa-karrageenan (Sigma C-1263) har blitt funnet å frembringe de mest reproduerbare resultater og ble således anvendt i disse forsøk. Fotputeanalysen ble modifisert ved anvendelse av isotopisk merket humant serumalbumin ( $^{125}\text{I}$ -HSA) som lokaliseres i den karrageenaninduserte lesjon i direkte forhold til volumet av eksudatet. Ved bestemmelse av det totale radioaktive tall i fotputen og sammenligne dette med tallene i et kjent volum av plasma fra det injiserte dyr, oppnås en direkte måling av ødem i mikroliter plasma-ekvivalenter.  $^{125}\text{I}$ -HSA ble injisert intravenøst ved en dose på 1,0 mikrocurie pr. rotte. Dark Agouti hunnrotter ble anvendt. Rottene var omtrent 12 uker gamle, veide mellom 160 og 200 gram, og ble oppnådd fra kolonien innavlet i firmaet.

For å utføre karrageenan-fotputeanalysen ble 0,1 ml av 2% karrageenan-oppløsning injisert subkutan inn i hver bakfotpute til en bedøvet rotte. Denne injeksjonen ble umiddelbart etterfulgt av injeksjon av 1,0 mikrocurie  $^{125}\text{I}$ -HSA i 0,5 ml saltoppløsning i halevenen. Etter fire timer ble hver rotte veiet, blodprøver ble tatt og rodden ble avlivet. Begge bakføtter ble deretter fjernet og radioaktivitetsnivåene i hver fot og i den 200  $\mu\text{l}$  plasmastandard ble målt i en automatisert gammateller. Fra disse målingene ble volumet av ødem i hver fot beregnet og uttrykt i mikroliter.

#### *Forsøk 1: Intraperitoneal doserespons*

Fig. 4 illustrerer effekten av intraperitoneal administrasjon av et rensed preparat av MAIF sammenlignet med laktose (CON), aspirin og ingen behandling (ingen  $R_x$ ). Alle behandlinger (laktose, aspirin, MAIF) ble gitt 30 minutter før injeksjonen av karrageenan.

Karrageenaninjeksjon resulterte i ødem som utgjør i gjennomsnitt 250  $\mu$ l (ingen  $R_x$ ). Ødemet ble inhibert ved hjelp av aspirin og alle doseringer av MAIF preparatet men ble ikke inhibert ved hjelp av laktose. Den intraperitoneale dose-respons-kurve oppnådd med MAIF preparatet, utledet ved å uttrykke dataene som prosentandel av gjennomsnittlig kontroll (ingen behandling) ødem er vist i fig. 5.

10 *Forsøk 2: Effekter av forskjellige administrasjonsruter for MAIF*

Fig. 6 illustrerer effekten, på fotputeødem, av administrasjonen av laktose og et preparat av renset MAIF oralt (ORAL), intramuskulært (IM), subkutan (SUB Q) og intravenøst (IV). Det er også vist en positiv kontroll (aspirin) og en ikke-behandlet kontroll (ingen  $R_x$ ).

Preparatene ble administrert forut for karrageenan-testing i samsvar med den følgende plan: Aspirin: oralt, 30 minutter før; subkutan MAIF: 1 time før; oral MAIF: 24, 16 og 1 timer før; intramuskulær MAIF: 30 minutter før; intravenøs MAIF: ved tidspunktet for testing (isotop ble også injisert).

Resultatene indikerer, uttrykt som prosentandel av gjennomsnittlig kontroll-ødem i hver separate analyse, at den anti-inflammatoriske faktor ved alle administrasjonsruter inhiberte ødemdannelse. 40 mg av MAIF preparatet gitt intravenøst opphevet nesten fullstendig den inflammatoriske respons på karrageenan. Disse resultatene demonstrerer den antiinflammatoriske aktivitet av MAIF og, i betraktning av resultatene i forsøk 1 i det foregående, antyder at rekkefølgen av effektivitet for forskjellige administrasjonsruter er IV > IP > IM > SUB Q > ORAL.

35 *Forsøk 3: Effekt på ødem av intravenøs og langvarig oral administrasjon: doserespons*

Fig. 7 viser effektene av IV og oral administrasjon av et renset preparat av antiinflammatorisk faktor på fotputeødem i rotter. Oral behandling med MAIF (40 mg pr. rotte pr. døgn) ble gitt daglig i seks dager og også en time før

karrageenantesting (PO). Intravenøse behandlinger (5, 10, 20 mg) ble gitt ved tidspunktet for karrageenantesting (IV). Det er også vist en positiv kontroll (aspirin) og en negativ kontroll (ingen behandling).

5

Resultatene vist i fig. 7 indikerer at alle tre doseringer av MAIF preparatet resulterer i antiinflammatorisk aktivitet som overskrider selv aktiviteten av aspirin i analysen, mens langvarig oral administrasjon resulterer i markert men  
10 begrenset aktivitet.

Undersøkelsen ble derfor utvidet til å undersøke effektene av ytterligere reduserte intravenøse doseringer av antiinflammatorisk faktor. Intravenøse doseringer av laktoseplacebo ble  
15 inkludert som en kontroll. Resultatene av disse undersøkelser er vist i fig. 8. Intravenøse doseringer av 2,5 og 1 mg av MAIF preparatet (IV) induserte antiinflammatorisk aktivitet i aktivitetsområdet induisert ved aspirin. 10 ml intravenøs laktoseplacebo (10 mg PLAC IV) induserte ikke  
20 aktivitet i det området.

En intravenøs dose-respons-kurve ble utledet ved å kombinere resultatene fra forsøk 2 og 3 og å uttrykke disse resultatene som prosentandel gjennomsnittlig kontroll-ødem (ingen behandling) i hver separate analyse. Kurven er vist i fig. 9.  
25

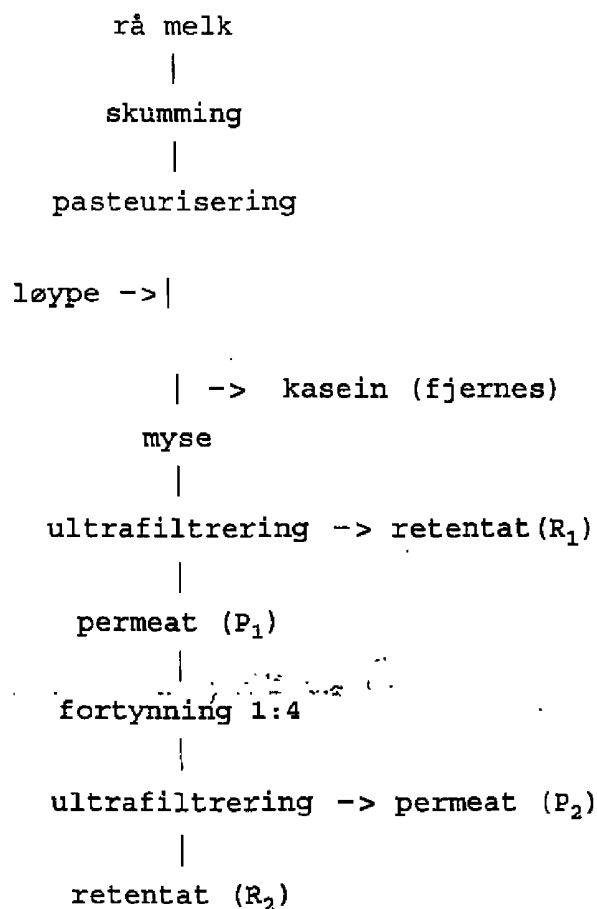
Konklusjonene som kan trekkes fra de kvantitative rottepote-ødem-testene er som følger: melkefraksjon topp I fra G-10 kolonnen, ekstrahert og rensset som beskrevet i patent nr.  
30 4,956,349, viser konsistent antiinflammatorisk aktivitet når testet i rottepoteødem-modellen. En dosering av 4 mg MAIF preparat pr. rotte gitt intravenøst ved tidspunktet for karrageenaninjeksjon er tilstrekkelig til å drastisk inhibere ødem og ble derfor valgt som en standard som andre preparater  
35 ville sammenlignes mot i ytterligere forsøk.

#### Eksempel 8

Antiinflammatoriske egenskaper av preparater av hyperimmun melk oppnådd fra identiske tvillingkuer



Effekten av vaksinasjon på den antiinflammatoriske aktivitet av melk ble undersøkt ved testing av bioaktiviteten av forskjellige melkefraksjoner og oppnådd fra identiske tvillingkuer. Basert på ekstraksjonsmetodene beskrevet i patent nr. 4,956,349 ble et ekstraksjonsskjema som benytter ultrafiltrering utarbeidet. Bearbeidingssekvensen var som følger:



Melkeprøver ble fremstilt fra immuniserte tvillingkuer, ikke-immuniserte kontroll-tvillingkuer, og rekonstituert skummet melk-pulver tidligere fremstilt fra immuniserte kuer. Prøvegruppen besto av 45 grupperinger av identiske tvillingkuer. En ku fra hver tvillinggruppering ble vaksinert annen hver uke med Stolle S100 blandet bakterin (beskrevet i patent nr. 4,956,349). Bioaktiviteten av de forskjellige fraksjoner ble testet ved hjelp av intravenøs injeksjon under anvendelse av karrageenan-rottefotpute-analysen beskrevet i det foregående.

Hypotesene som skulle testes var at (a) hyperimmunisering var ansvarlig for den antiinflammatoriske aktivitet beskrevet i det foregående, (b) MAIF kunne ekstraheres i kommersiell målestokk ved ultrafiltrering, og (c) fortynning av permeatet ville forårsake aggregasjon av den antiinflammatoriske faktor, hvilket bevirker at den tilbakeholdes av 30.000 molekylvekt-ultrafiltreringsmembranen.

Fig. 10 illustrerer resultatene av et tvillingflokk-ultrafiltreringsforsøk utformet for å teste bioaktiviteten av forskjellige fraksjoner dannet fra melken av ikke-vaksinerte kontroll-tvillinger og fra rekonstituert melkepulver fra immuniserte kuer. Fraksjonene som ble testet er som følger: Topp I, G-10 kolonnepreparat, 4 ml (OHIO MAIF STD);  $R_2$  sluttretentat fra ikke-vaksinert tvilling (KONTROLL-TVILLING  $R_2$ );  $P_2$  sluttpermeat fra det rekonstituerte melkepulver (REKON S100  $P_2$ ); dialysert  $R_2$  sluttretentat fra ikke-vaksinert tvilling (KON DIALYSERT  $R_2$ ); dialysert sluttretentat fra det rekonstituerte melkepulver (S100 DIALYSERT  $R_2$ ).

Ingen antiinflammatorisk aktivitet kunne detekteres i sluttretentatfraksjonen  $R_2$  fremstilt fra ikke-immuniserte kuer, selv etter dialyse. Ingen antiinflammatorisk aktivitet ble detektert i sluttpermeat  $P_2$  fraksjonen fremstilt fra det rekonstituerte melkepulver. Rekonstituert melkepulverretentat  $R_2$  fraksjonen, etter dialyse, utviste antiinflammatorisk aktivitet i aktivitetsområdet til MAIF standarden.

Fig. 11 illustrerer resultatene av tvillingflokk-ultrafiltreringsforsøkene utformet for å teste bioaktiviteten av forskjellige melkefraksjoner dannet fra vaksinerte og ikke-vaksinerte tvillingkuer og fra rekonstituert melkepulver fra immuniserte kuer. Fraksjonene som ble testet var som følger: Topp I, G-10 kolonnepreparat, 4 ml (OHIO MAIF STD); dialysert sluttretentat  $R_2$  fra ikke-vaksinerte tvillinger (KON DIALYSERT  $R_2$ ); sluttretentat  $R_2$  fra det rekonstituerte melkepulver (REKON S100  $R_2$ ); sluttretentat  $R_2$  fra vaksinerte tvillinger (IMMUN TVILLING  $R_2$ ); første retentat  $R_1$  fra det rekonstituerte melkepulver, fortynnet for: 1 (S100 FORTYNNET  $R_1$ ).

Liten antiinflammatorisk aktivitet ble detektert i det dialyserte retentat  $R_2$  fra ikke-vaksinerte kontroll-tvillinger eller i det ikke-dialyserte retentat  $R_2$  fra de vaksinerte tvillinger. Noe aktivitet er detekterbart ved hjelp av punktdiagram.  $R_2$  retentat fremstilt uten dialyse fra rekonstituert Stolle melkepulver fra immuniserte kuer var sterkt antiinflammatorisk. Imidlertid var preparatet dannet ved fortykning av den rekonstituerte melk før ultrafiltrering snarere enn fortykning av myse dannet fra melken kun marginalt aktiv. Dette resultatet indikerer at antiinflammatorisk aktivitet ekstraheres mer effektivt fra mysefraksjonen.

Fig. 12 illustrerer resultatene av tvillingflokk-ultrafiltreringsforsøk utformet for å teste bioaktiviteten av dialysert retentat fra vaksinerte tvillingkuer. De testede fraksjonene er som følger: Topp I, G-10 kolonnepreparat (OHIO MAIF STD); dialysert sluttretentat  $R_2$  fra vaksinerte tvillinger (IMM DIALYSERT  $R_2$ ); dialysert sluttretentat fra G-10 preparatet (DIALYSERT OHIO MAIF). Resultatene viser at antiinflammatorisk aktivitet var til stede i  $R_2$  fraksjonen fra den immuniserte tvilling etter dialyse. Dialysert MAIF var mer aktiv i analysen enn den ikke-dialyserte MAIF standard. Dette resultatet antyder at dialyse er et effektivt middel for ytterligere konsentrering av melkefaktoren som er ansvarlig for antiinflammatorisk aktivitet.

Resultatene presentert i figurer 10-12 i det foregående understøtter de følgende konklusjoner: (1) antiinflammatorisk aktivitet kan ekstraheres fra rekonstituert melk fra immuniserte kuer ved ultrafiltrering av det fortynnede permeat. (2) antiinflammatorisk aktivitet ble ikke demonstrert i de ovennevnte preparater som var dannet fra melken av ikke-immuniserte kuer. (3) Antiinflammatorisk aktivitet ble demonstrert i sluttretentatet  $R_2$  etter ultrafiltrering av fortynnet permeat fremstilt fra melken av immuniserte kuer, men dialyse var nødvendig for å demonstrere aktiviteten.

**Eksempel 9****Stabilitet av MAIF, oppvarming og proteinasebehandling av MAIF**

Det tidligere tegn på at den melk-antiinflammatoriske faktor  
5 kjemisk ikke var et protein eller et peptid var i stor grad  
basert på kjemiske analyser som gjennomgående viste et nesten  
fullstendig fravær av nitrogen. For ytterligere karakterise-  
ring av den antiinflammatoriske faktor ble flere preparater  
testet i rottepoteødem-analysen ved anvendelse av 4 mg av  
10 topp I, G-10 kolonnepreparat, intravenøst som standard. De  
følgende behandlinger ble utført: proteinase (pronase)  
behandling i seks timer; seks timer uten proteinasebehandling  
som kontroll; ubehandlet positiv kontroll; oppvarming ved  
100°C i 30 minutter.

15

Resultatene av denne analysen er illustrert i fig. 13.  
Konklusjonene utledet fra denne undersøkelsen var at den  
antiinflammatoriske aktivitet ikke skyldes et protein eller  
peptid og at den antiinflammatoriske faktor ikke inaktiveres  
20 ved koking. Effektiviteten av pronasebehandling ble bekreft-  
et ved det funn at parallell pronasebehandling fullstendig  
denaturerte melkeprotein.

**Eksempel 10****25 Antiinflammatorisk aktivitet av ytterligere rensset MAIF og  
myseproteinkonsentrat fra immuniserte kuer**

Retentat og permeat fra ultrafiltrering under anvendelse av  
en Amicon YM5 membran ble testet for biologisk aktivitet ved  
anvendelse av intravenøs administrasjon i rottepoteødem-ana-  
30 lysisen. I denne prosessen ble MAIF i topp I av G-10 kolonnen,  
fremstilt i samsvar med patent nr. 4,956,349, ytterligere  
renset ved ultrafiltrering på en Amicon YM5 membran. Denne  
membranen tilbakeholder molekyler med molekylvekt 5.000 eller  
større. Myseproteinkonsentrater (MPK'er) ble også fremstilt  
35 fra melk fra immuniserte dyr og filtret gjennom YM5 membran-  
en. De følgende prøver ble testet i analysen ved anvendelse  
av 4 mg topp I, G-10 kolonnepreparat, intravenøst som stand-  
ard: permeat fra Amicon YM5 ultrafiltrering; retentat fra  
Amicon YM5 ultrafiltrering; MPK fra immuniserte kuer, 30 mg

pr. rotte; MPK fra kommersiell produksjon (ikke-immuniserte kuer), 30 mg pr. rotte.

Resultatene av analysen er illustrert i fig. 14. Det er  
5 klart fra disse resultatene at all aktiviteten er i retentatet som omfattet omtrent 0,5% av den totale vekt av fraksjonen tilført til YM5 filteret. Reduksjonen av ødem som sees i dette forsøket ble oppnådd etter administrasjon av 20-25 µg material.

10 Hva angår aktiviteten av MPK, viste MPK fremstilt fra hyper-immuniserte dyr klart antiinflammatorisk aktivitet som forventet. Som interessant er, viste også MPK fremstilt fra ikke-immuniserte dyr antiinflammatorisk aktivitet. Tilstedeværelsen av antiinflammatorisk aktivitet i melken av ikke-immuniserte kuer er ikke overraskende siden den må være en naturlig substans. Den deteksjon reflekterer sensitiviteten av bioassayen.

#### 20 Eksempel 11

##### **Kontinuerlig overvåking av karrageenanindusert fotputeødem**

Det ble etablert at 4 mg MAIF preparat gitt intravenøst ved tidspunktet for karrageenaninjeksjon reduserte akkumulasjonen av ødem i fotputen med mellom 40% og 50%. Selv om disse  
25 resultatene viste at materialet inneholdt en antiinflammatorisk enhet, var der liten indikasjon på virkningssetet eller farmakologisk profil av MAIF. For å oppnå slike data var det nødvendig å etablere en metode som tillot kontinuerlig overvåking av fotputeødem gjennom hele responsen på  
30 karrageenan. Dette ble oppnådd ved å holde rottefoten i en demontert Gammastrålingsdetektor. Prosedyren krevde at dyrene var bedøvet i opp til fire timer, og siden anestetika er kjent å undertrykke den inflammatoriske respons, var det først nødvendig å bestemme effekten av anestetika på det  
35 karrageenaninduserte ødem. Fem midler alminnelig anvendt for å indusere anestesi i rotter ble derfor evaluert. Disse var eter, kloralhydrat, Innovar-vet, nembutal og uretan. Resultatene er vist i fig. 15.

Det var klart fra disse resultatene at eter var det valgte anestetikum når den inflammatoriske respons skulle evalueres ved denne teknikken. Formen av den oppnådde kurven når eter ble anvendt indikerte en tofaserespons. For å skissere responsen mer detaljert ble et ytterligere forsøk utført hvori volumet av ødem ble målt ved 12 tidspunkter over en 5 timers periode. Resultatene bekreftet en tofaserespons. Den tidlige respons forekom mellom 0 og 1 time etter testing og senfaserespons mellom 1,5 og 2 timer (fig. 16).

De to fasene, som også har blitt observert av andre forskere, har blitt betegnet henholdsvis den ikke-fagocytiske inflammatoriske respons, (NPIR) og den fagocytiske inflammatoriske respons (PIR).

NPIR initieres, som respons på skade, ved hjelp av oppløselige mediatorer slik som histamin og bradykinin mens PIR er avhengig av at nøytrofiler deltar. Protokollen var derfor å administrere MAIF og overvåke akkumuleringen av ødem kontinuerlig i et forsøk på å bestemme om de antiinflammatoriske egenskaper av middelet var et resultat av en effekt på den tidlige ikke-cellulære (NPIR) eller den senere cellulære (PIR) fase. 5 mg eller 40 mg MAIF preparat pr. rotte ble administrert intravenøst ved tidspunktet for karrageenan-testing og akkumuleringen av ødem ble overvåket ved regelmessige intervaller over en fire timers periode. Hverken den ene eller andre dosen påvirket akkumuleringen av ødem under den ene eller andre fasen (fig. 17).

Dette resultatet var overraskende siden mange tidligere analyser, hvori effekten av rensede preparater av MAIF på karrageenanindusert ødem 4 timer etter testing ble bestemt, hadde demonstrert betydelig antiinflammatorisk aktivitet i fraksjonene. Det var derfor sannsynlig at den kontinuerlige eksponering for eter undertrykket eller inaktiverte den aktive antiinflammatoriske komponent av MAIF in vivo.

Tidligere undersøkelser indikerte at korttidseksponering for eter ikke påvirket aktiviteten av den antiinflammatoriske

faktor. Derfor ble det utført et forsøk hvori effekten av MAIF på progressiv ødemakkumulering ble bestemt ved kun fire tidspunkter, 0, 1, 3 og 4 timer, idet eksponeringen av dyrene for eter således begrenses. Tidspunktet 1 time ble valgt for  
 5 å vurdere effekten på den tidlige ikke-fagocytiske inflammatoriske respons mens målingene ved 3 og 4 timer ble valgt for å kvantifisere effekten på den senere fagocytiske inflammatoriske respons. I dette forsøket resulterte MAIF preparatet administrert ved 40 mg i en reduksjon i akkumuleringen av  
 10 ødem under den sekundære, fagocytcelle-medierte fase, men hadde ingen signifikant effekt på den primære, oppløselige mediator-drevede fase (fig. 18).

De følgende konklusjoner kan trekkes fra denne serien med  
 15 forsøk.

1. Eter er det foretrukne anestetikum for anvendelse i forsøk hvor den inflammatoriske respons på karrageenan skal overvåkes kontinuerlig.  
 20
2. Kontinuerlig eteranestesi inhiberer den in vivo anti-inflammatoriske aktivitet av antiinflammatorisk faktor i fotpute-karrageenananalysen.
- 25 3. MAIF bedrer inflammasjon ved inhibering av den sene, fagocytcelle-medierte fase av den inflammatoriske respons på karrageenan.

#### Eksempel 12

#### 30 Tidsforløp av effekten av MAIF på karrageenanindusert fotputeødem

En ytterligere serie forsøk ble utført hvori middelet ble administrert ved valgte tidspunkter før eller etter injeksjon av karrageenan snarere enn ved tidspunktet for testing. Formålet ved undersøkelsen var å tilveiebringe informasjon om  
 35 a) det mest effektive tidspunkt for administrasjon av MAIF i forhold til den inflammatoriske stimulus.  
 b) den biologiske halveringstid av den antiinflammatoriske enhet.

c) punktene i utviklingen av inflammatorisk respons påvirket av MAIF.

Undersøkelsen ble utført i tre deler. Et preparat av MAIF ble administrert intravenøst ved en dose på 4 mg/rotte ved ett av 11 tidspunkter, som varierer fra 150 minutter før til 150 minutter etter injeksjon av karrageenan. Resultater av dette forsøket er vist i fig. 19 og tabell 5.

10

Tabell 5

15

20

| Forsøk  | Tidspunkt for A i forhold til testing (min) | Midlere fot-volum av kontrollgrupper ( $\mu\text{l} \pm \text{SA}$ ) | Midlere fot-volum av MAIF grupper ( $\mu\text{l} \pm \text{SA}$ ) | Inhibering av ødem ved MAIF (% av kontrollvolum $\pm \text{SA}$ ) |
|---------|---------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| 3       | -150                                        | 311 $\pm$ 65                                                         | 246 $\pm$ 52                                                      | 79 $\pm$ 17                                                       |
| 2       | -90                                         | 304 $\pm$ 71                                                         | 211 $\pm$ 33                                                      | 73 $\pm$ 11                                                       |
| 2       | -60                                         | 304 $\pm$ 71                                                         | 186 $\pm$ 34                                                      | 61 $\pm$ 11                                                       |
| 1       | -30                                         | 391 $\pm$ 63                                                         | 261 $\pm$ 49                                                      | 67 $\pm$ 13                                                       |
| 3       | -15                                         | 311 $\pm$ 65                                                         | 152 $\pm$ 41                                                      | 49 $\pm$ 13                                                       |
| 1, 2, 3 | 0                                           | 336 $\pm$ 78                                                         | 184 $\pm$ 42                                                      | 55 $\pm$ 13                                                       |
| 3       | 15                                          | 311 $\pm$ 65                                                         | 218 $\pm$ 30                                                      | 70 $\pm$ 10                                                       |
| 1       | 30                                          | 391 $\pm$ 63                                                         | 218 $\pm$ 30                                                      | 56 $\pm$ 8                                                        |
| 2       | 60                                          | 304 $\pm$ 71                                                         | 212 $\pm$ 40                                                      | 69 $\pm$ 13                                                       |
| 2       | 90                                          | 304 $\pm$ 71                                                         | 216 $\pm$ 37                                                      | 70 $\pm$ 12                                                       |
| 3       | 150                                         | 311 $\pm$ 65                                                         | 261 $\pm$ 42                                                      | 84 $\pm$ 14                                                       |

25

En signifikant inhibering av ødem ble observert ved alle undersøkte tidspunkter. Inhiberingsnivået var imidlertid mindre ved ytterpunktene ( $\pm 150$  min). En interessant cyklisk respons på MAIF administrasjon ble sett i gruppene behandlet nærmere punktet for testing. Det faktum at MAIF var mer effektiv når gitt 30 minutter etter testing enn når gitt 15 minutter etter testing understøtter det konsept at den sekundære, fagocytceller-medierte fase av responsen inhiberes av middelet. Preparatet av MAIF inhiberte sterkt responsen på karrageenan når administrert 15 minutter før eller ved tidspunktet for testing. Det er dessuten åpenbart at middelet

35



har en relativt lang halveringstid i serumet (1-2 timer) og dets effektivitet er relatert til tidspunktet for testen og den dynamiske natur av den inflammatoriske respons.

- 5 Det er således antatt at den antiinflammatoriske effekt skyldes en effekt på inflammatoriske celler, sannsynligvis nøytrofilene.

### Eksempel 13

#### 10 Effekt av MAIF på den reverse passive Arthus-reaksjon

Den mulighet at den antiinflammatoriske faktor kan påvirke nøytrofil-engasjement ble undersøkt ved evaluering av materialets evne til å modulere den reverse passive Arthus-reaksjon (RPA). Denne immunkompleks-induserte respons er primært nøy-

15 trofilmediert og midler som påvirker utviklingen av reaksjonen gjør dette via en effekt på disse cellene. For å indusere RPA ble rotter injisert intradermalt med kanin-antistoff til ovalbumin og intravenøst med nativt ovalbumin. Ovalbumin/-

20 valbumin-antistoff immunkomplekser dannes i og rundt de dermale blodkarvegger, verts-nøytrofiler binder til Fc-delen av antistoffet og en intens inflammatorisk reaksjon initieres. Det skal bemerkes at selv om responsen initieres ved immunkomplekser, foregår den uavhengig av vertens immunsystem.

- 25 Tre parametre anvendes for å kvantifisere RPA. Disse er (1) ødem - målt ved anvendelse av akkumulering av  $^{125}\text{I}$ -HSA, (2) blødning - vurdert ved in vivo pre-merking av RBC'er med  $^{59}\text{Fe}$  og (3) nøytrofilakkumulering - målt ved bestemmelse av vevsnivåer av det nøytrofil-spesifikke enzym myeloperoksidase
- 30 (MPO). Disse analysene er kjent for de alminnelig fagkyndige på området.

18 rotter ble fordelt i tre grupper på 6. Kanin-antiovalbumin (40  $\mu\text{l}$ ) ble injisert intradermalt ved fire seter på ryggen til hvert dyr og 2 mg ovalbumin injisert intravenøst

35 umiddelbart etterpå. En gruppe dyr mottok ingen annen behandling og tjente som kontroller. Den andre gruppen ble injisert intravenøst med 20 mg av et laktosepreparat, mens

den siste gruppen ble injisert intravenøst med 20 mg av et rensset preparat av MAIF. Både laktose og MAIF preparat ble administrert med ovalbuminet. Alvorligheten av reaksjonen ble vurdert 3,5 timer etter testing. Når MAIF preparatet ble administrert ved en dose på 20 mg/rotte forut for initieringen av RPA responsen, var der en svært signifikant inhibering av de tre parametre anvendt for å måle responsen (tabell 6, fig. 20). Laktosekontrollmaterialet forårsaket også en beskjeden og marginalt signifikant undertrykkelse av nøytrofilakkumulering og blødning. Dette indikerer at det er en liten mengde antiinflammatorisk aktivitet i normal melk.

Tabell 6

| Gruppe        | Nøytrofil-akkumulering:<br>Enheter av MPO | $\mu$ l av ødem | Blødning:<br>$\mu$ l av RBC |
|---------------|-------------------------------------------|-----------------|-----------------------------|
| Kontroll      | 0,30 $\pm$ ,157                           | 107 $\pm$ 29    | 4,8 $\pm$ 3,1               |
| Laktose       | 0,214 $\pm$ ,176**                        | 104 $\pm$ 23    | 3,0 $\pm$ 1,5**             |
| MAIF          | 0,056 $\pm$ ,013                          | 60 $\pm$ 27*    | 1,5 $\pm$ 1,7*              |
| * = p < 0,01  |                                           |                 |                             |
| ** = p < 0,05 |                                           |                 |                             |

Når nøytrofilen er den primære mediator av RPA, viser disse resultatene ytterligere at MAIF var i stand til å inhibere den inflammatoriske respons via en effekt på nøytrofilfunksjon.

#### Eksempel 14

##### Effekt av MAIF på nøytrofilmigrasjon

For å delta effektivt i en inflammatorisk respons må nøytrofiler først migrere fra vaskulaturen til setet for inflammasjon. For å bestemme hvorvidt antiinflammatorisk faktor forstyrrer nøytrofilmigrasjon, ble det anvendt en modell av inflammasjon som anvender den subkutane implantering av sterile polyuretansvamper. Svampene fjernes ved intervaller etter implantasjon og ved veiling av svampene og deretter ekstrahering og telling av cellene i infiltratet kan både den fluide

og cellulære fase av responsen kvantifiseres. 24 timer etter implantasjon er >95% av cellen funnet i svampen nøytrofiler.

To forsøk har blitt utført. I det første ble dyr behandlet  
5 med enten 5, 10, 20 eller 40 mg av et renset MAIF preparat ved tidspunktet for svampimplantasjon. Svampene ble fjernet 24 timer etter implantasjon. Hver gruppe besto av mellom 5 og 8 rotter og to svamper ble implantert i hvert dyr. Resultatene er vist i fig. 21.

10

20 eller 40 mg MAIF preparat, administrert intravenøst ved tidspunktet for svampimplantasjon, hadde en markert effekt på evnen av inflammatoriske celler til å migrere. En mindre markert, men like betydelig, inhibering av fluidakkumulering  
15 ble også sett. De to lavere doser av MAIF hadde ingen påviselig effekt i denne inflammasjonsmodellen.

Et andre forsøk, utformet for å skissere det tidsmessige forhold mellom den inflammatoriske testing (svampimplantasjon)  
20 og MAIF administrasjon ble utført. I denne undersøkelsen ble 20 mg MAIF preparat administrert intravenøst 30, 60 eller 120 minutter etter svampimplantasjon. En fjerde, kontroll, gruppe forble ubehandlet. Det var fem dyr i hver gruppe. To svamper ble implantert i hvert dyr og disse ble fjernet etter  
25 24 timer. Resultatene er illustrert i fig. 22. Inkludert i dette diagrammet er resultater oppnådd fra en prøvegruppe av rotter som mottok 20 mg av MAIF preparatet ved tidspunktet for implantasjon (se fig. 21).

30 Resultater fra tidsforløpet av effekten av MAIF på karrageen-anindusert fotputeødem viser at MAIF er forholdsvis ineffektiv når administrert 60 minutter eller senere etter testing. Det er verdt å legge merke til at mens 20 mg av MAIF preparatet var påkrevet for å undertrykke inflammasjonen assosiert  
35 med svampimplantasjonen, var 4 mg tilstrekkelig til å inhibere det karrageenanindusert ødem. Uten at det er tilsiktet å bli bundet av denne fortolkningen, kan denne vesensforskjellen relateres til det forskjellige provokasjonsnivået fremvist overfor verten av de to stimuli. Svampimplantatet er et rela-

tivt benignt stimulus som induserer en sakte inflammatorisk respons og hovedmassen av cellene akkumulerer mellom 8 og 16 timer etter implantasjon (fig. 23). På den annen side er den subkutane injeksjon av karrageenan et svært sterkt stimulerende middel som induserer en tilsvarende sterk respons over en relativt kort periode (fig. 16).

#### Eksempel 15

##### Alternativ metode for rensing av den antiinflammatoriske faktor fra melk (Preparat "AIF")

Det følgende eksempel beskriver en metode for rensing av den antiinflammatoriske faktor fra melk i sin uaggregerte form med laveste molekylvekt. Preparatet som resulterer fra rensetrinnene beskrevet heri er blitt gitt betegnelsen "AIF" for å skille den fra preparatet oppnådd ved anvendelse av prosedyren beskrevet i eksempel 2. I det foreliggende eksempel og i eksempelet som følger (dvs. eksempel 16) refereres den aktive faktor i preparatene ganske enkelt til som den "antiinflammatoriske faktor". Alle rensetrinnene ble utført for å minimalisere mulig forurensning med bakterier eller pyrogenener. Sterilt vann ble anvendt til å fremstille oppløsninger og alt glassutstyr ble depyrogenert.

##### Trinn 1: <10.000 molekylvekt ("MV") ultrafiltrering

Frisk S100 immun skummet melk (se eksempel 1 for en beskrivelse av prosedyrer anvendt ved oppnåelse av den immune melk) ble pumpet gjennom en 10.000 MV terskel ultrafiltreringsmembran (Filtron) ved et trykk på 0,21 MPa. Permeatet ble samlet i depyrogenerte flasker holdt på is. Permeatet ble sterilfiltrert og nedkjølt inntil bruk. <10.000 MV permeatet inneholder den melk-antiinflammatoriske faktor som peptider med lav molekylvekt, oligosakkarider og en stor mengde laktose. Antiinflammatorisk aktivitet i permeatet forekommer i uaggregert form med en lavmolekylvekt.

##### Trinn 2: DEAE-Sepharose-kromatografi

Initial fraksjonering av antiinflammatorisk aktivitet ble utført på DEAE-Sepharose. En 5x50 cm kolonne inneholdende 1 liter DEAE-Sepharose ble ekvilibrert med permeatbuffer.

Permeatbuffer er en steril, endotoksinfri oppløsning inneholdende de diffuserbare ioner funnet i bulk-melk i de passende konsentrasjoner. Permeatbuffer inneholder  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{NaCitrat}$  og  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ . Typisk ble omtrent 8 liter av

5 <10.000 MV permeat pumpet opp i DEAE-Sepharose-kolonnen ved en strømningshastighet på omtrent 500 ml pr. time. Kolonne-eluat ble overvåket ved 280 nm. Kolonnen ble vasket med destillert vann inntil absorbansen ved 280 returnerte til basislinjen (omtrent 6 til 8 liter destillert vann var typisk

10 nødvendig). Antiinflammatorisk aktivitet ble bundet til kolonnen og ble eluert med omtrent 4 liter 0,5 M ammoniumacetat i vann, pH 7,4. Eluatet ble frysetørket til tørrhet og veiet. Vekten av utvunnet material oppnådd fra 8 liter permeat var typisk mellom 15 og 20 gram. Siden ammoniumacetat fullstendig flyktiggjøres under frysetørking, representerer restvekten vekten av bundet material. Antiinflammatorisk aktivitet ble analysert i muse-nøytrofilmigrasjon-inhiberingsanalysen.

#### 20 Trinn 3: *H-40 kromatografi*

Materialet eluert fra DEAE-Sepharose-kolonnen ble ytterligere fraksjonert på en sorteringskolonne for å separere faktoren ansvarlig for den antiinflammatoriske aktivitet fra andre komponenter med lav molekylvekt. 8 gram av DEAE-prøven ble

25 oppløst i 50 ml destillert vann og tilført til en 2,5x150 cm kolonne inneholdende 736 ml Toyopearl HW-40 (Rohm og Haas) ekvilibrert i vann. Kolonnen ble utviklet i destillert vann ved en strømningshastighet på 40 ml pr. time og eluat ble overvåket ved 280 nm. Fraksjoner ble samlet og analysert for

30 antiinflammatorisk aktivitet i muse-nøytrofilmigrasjon-inhiberingsanalysen. Fraksjoner som viser aktivitet og minimal absorbans ved 280 nm ble samlet og frysetørket. Omtrent 80 mg material inneholdende antiinflammatorisk aktivitet ble utvunnet fra 8 liter permeat.

35

#### Trinn 4: *AffiGel 601 kromatografi*

Sluttrensetrinnet involverte affinitetskromatografi av den aktive faktor i en kolonne fylt med et boratderivatisert polyakrylamidbasert medium (AffiGel 601, Bio-Rad) som har en

affinitet for nærliggende cis-hydroksylgrupper i samme plan. 40 mg HW-40-avledet material med lav molekylvekt ble ekvilibrert i 10 ml 0,25 M ammoniumacetat, pH 7,0, og tilført til AffiGel-kolonnen som også hadde blitt ekvilibrert i 0,25 M ammoniumacetat. Eluat ble overvåket ved 280 nm. Kolonnen ble vasket med 400 ml 0,25 M ammoniumacetat ved en strømningshastighet på 50 ml pr. time inntil absorbansen ved 280 nm avtok til bakgrunnsverdien. AffiGel-kolonnen ble deretter eluert med 1.600 ml 0,1 M maursyre, pH 2,8. Eluatet ble testet for aktivitet i muse-nøytrofilmigrasjon-inhiberingsanalysen og frysetørket til tørrhet. Omtrent 8 til 10 mg bundet material inneholdende antiinflammatorisk faktor ble utvunnet fra 8 liter permeat.

Preparatet oppnådd ved denne metoden gis betegnelsen "AIF". Preparatet var i alt vesentlig renset med hensyn til den antiinflammatoriske faktor men er ikke homogent. Preparatet utviser antiinflammatorisk aktivitet i muse-nøytrofilmigrasjon-inhiberingsanalysen, i rottepoteødem-analysen, i rotte-øreopphovnings-analysen og blokkerer nøytrofilbinding til mesenteriumvenyle-endotel (visualisert ved intravital mikroskopi). Basert på sammenligningsanalyser i muse-nøytrofilmigrasjon-inhiberingsanalysen, er AIF omtrent 55.000 ganger mer renset enn det opprinnelige skummet melk <10.000 permeat.

#### Eksempel 16

**Effekt av preparater av antiinflammatorisk faktor på adhesjon av nøytrofiler til endotelceller og på utvandring av nøytrofiler fra vaskulaturen**

Effekten av den antiinflammatoriske faktor på adhesjonen av nøytrofiler til endotelceller og på utvandringen av nøytrofiler fra vaskulaturen ble testet. To forskjellige preparater av antiinflammatorisk faktor ble anvendt. Ett preparat ble fremstilt ved anvendelse av renseprosedyren beskrevet i eksempel 2. For det foreliggende eksempls formål refereres dette preparatet ganske enkelt til som "MAIF". Det andre preparatet av antiinflammatorisk faktor ble fremstilt ved anvendelse av renseprosedyren beskrevet i eksempel 15 og refereres til både i det eksempelet og i det foreliggende eksem-

pel som "AIF". Det skal forstås at både MAIF og AIF inneholder i seg den antiinflammatoriske faktor ved forskjellige renhetstilstander.

5 *Kjemikalier:*

Humant serumalbumin, trypsin, blodplateaktiverende faktor (PAF), forbolmyristatacetat (PMA), propidiumjodid og Histo-  
pague ble anskaffet fra Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo. Human Neutrophil elastase ble innkjøpt fra Calbiochem. Et  
10 murint anti-humant CD18 monoklonalt antistoff (IgG<sub>1</sub>-under-  
klasse; FITC konjugat), og et murint anti-nøkkelhull-albue-  
skjell-hemocyanin (keyhole limpet hemocyanin) (IgG<sub>1</sub>-under-  
klasse; FITC konjugat), anvendt som et negativt kontroll-  
antistoff, ble innkjøpt fra Becton Dickinson Systems Inc.,  
15 Mountain View, CA. Simply Cellular Microbeads ble innkjøpt  
fra Flow Cytometry Standards Corp., Research Triangle Park,  
NC. Andre reagenser var av den beste kvalitet som er kommer-  
sielt tilgjengelig å bli anvendt uten ytterligere rensing.

20 *In vivo metoder:*

**Intravitalt mikroskopiforsøk.** 24 Wistar hannrotter (180-  
250 g) ble holdt på en renset laboratoriediett og fastet i 24  
timer forut for kirurgi. Dyrene ble initialt bedøvet med  
pentobarbital (12 mg/100 g kroppsvekt). En høyre halsarterie  
25 og jugular vene ble kannulert for å måle henholdsvis syste-  
misk arterietrykk (Statham P23A trykktransduktor og et Grass  
fysiologisk registreringsapparat) og medikamentadministra-  
sjon. Et midtlinje-abdominalsnitt ble utført og dyrene ble  
lagt på ryggen. Et segment av midt-jejunum ble lagt ut  
30 igjennom abdominalsnittet og alt eksponert vev ble dekket med  
gas bløtet med saltoppløsning for å minimalisere dehydrering  
av vev. Mesenterium ble forsiktig anbragt over en optisk  
klar sokkel for iakttagelse som tillot gjennomlysning av et  
2 cm<sup>2</sup> vevssegment. Temperaturen til sokkelen ble holdt ved  
35 37°C med en konstant temperatur-sirkulasjonsinnretning  
(Fisher Scientific, modell 80). Rektal og mesenterial temp-  
eratur ble kontrollert ved anvendelse av et elektrotermometer.  
Mesenterium ble badet med varmet bikarbonat-bufret saltopp-  
løsning (pH 7,4). Et intravitalt mikroskop (Nikon Optiphot-

2, Japan) med en X25 objektivlinse (Leitz Wetzlar L25/0,35, Tyskland) og X10 okular ble anvendt for å observere den mesenteriale mikrosirkulasjon. Et videokamera montert på mikroskopet prosjekterte bildet på en fargemonitor og bildene ble bevart for avspillingsanalyse ved anvendelse av en videokasettopptager. Enkle uforgrenede venyler med diametere som varierer mellom 25 og 40  $\mu\text{m}$  ble valgt for undersøkelse. Venylediameter ble målt "on line" ved anvendelse av en video-tykkelsesmåler. Antallet adherente og utvandrede nøytrofiler ble bestemt "off-line" under avspilling av videobåndopptatte bilder. En nøytrofil ble vurdert som adherent til venyle-endotel hvis den forble stasjonær i 30 sekunder eller mer. Rullende nøytrofiler ble definert som de hvite blodceller som beveget seg ved en hastighet mindre enn hastigheten for erytrocytter i det samme karet. Leukocyt-rullehastighet ble bestemt ved den tid som var påkrevet for en leukocyt for å tilbakelegge en gitt avstand langs lengden av venylen.

#### Forsøksprotokoll

Etter at alle hemodynamiske parametre var i stabil tilstand ble bilder fra mesenterium registrert i 5 minutter. Mesenterium ble deretter underkjølt i 60 minutter med 100 nM PAF i nærvær av enten 40 eller 5 mg/rotte av MAIF preparatet (i.v.). Målinger av tidligere nevnte parametre ble igjen utført ved 30 og 60 minutter av PAF underkjøling. I to forsøksgrupper ble mesenterialpreparatene igjen eksponert for PAF som beskrevet ovenfor, men ved 30 minutter mottok de enten 40 eller 5 mg/rotte av MAIF preparatet. I tre ytterligere forsøk ble AIF preparatet gitt enten som en forbehandling eller som en etterbehandling.

#### *In vitro metoder*

**Isolering av nøytrofiler.** Nøytrofiler fra friske donorer ble rensset ved hjelp av dekstransedimentering etterfulgt av hypotonisk lyse og Histopaque-sentrifugering. Med unntak av dekstransedimenteringstrinnet, som ble utført ved romtemperatur, ble cellene holdt ved 4°C gjennom hele isoleringsprosedyren. Cellepreparater inneholdt 95% nøytrofiler og mer enn 99% av disse var levedyktige som bestemt ved anvendelse av Trypan



Blue. Etter isolering ble nøytrofilene resuspendert ved en sluttkonsentrasjon på  $2 \times 10^6$  celler/ml i fosfatbufret saltoppløsning (PBS). Prøvemengder av celler ble deretter inkubert ved 37°C i 20 minutter med varierende konsentrasjoner av enten MAIF preparatet eller AIF preparatet. Etter vasking ble nøytrofilene inkubert i mørket ved 4°C i 30 minutter med mettende konsentrasjoner av fluorescein-konjugerte murine anti-humane CD18, humane CD11b, IGG belagte mikrokuler (Simply Cellular mikrokuler) eller det murine negative kontroll-antistoff.

**Immunfluorescensfarging og FACS analyse.** Direkte immunfluorescens som et mål på CD18 overflateekspressjon ble bestemt ved analyse på en FACScan (Becton Dickinson Systems, Inc., Mountain View, CA) ved anvendelse av det kanaltall (log-skala) som representerer den midlere fluorescensintensitet av 10.000 celler. De logaritmiske kanaltall ble omdannet til lineære verdier ved anvendelse av metoder som er velkjent innen fagområdet. Den spesifikke midlere fluorescensintensitet for celler farget ved hjelp av CD18 antistoffer ble beregnet etter subtrahering av den midlere fluorescensintensitet av cellene eksponert for det negative kontroll-antistoff. Ikke-levedyktige celler ble screenet ut ved anvendelse av propidiumjodid.

**Peroksydanalyse.** Peroksydproduksjon fra isolerte nøytrofiler ble målte etter PMA og N-formyl-Met-Leu-Phe ("fMLP") stimulering i nærvær av forskjellige konsentrasjoner av MAIF. Reduksjonen av cytokrom C ved hjelp av aktiverte nøytrofiler ble målt ved anvendelse av et spektrofotometer (Hitachi U2000) ved 550 nm. I korte trekk, ble prøve tilsatt til to kyvetter og en kyvette ble anvendt som en referanse. Sistnevnte inneholdt superoksyddismutase (peroksyddfjerner). Nøytrofiler fikk ekvilibrere ved 37°C i 5 minutter i nærvær av forskjellige konsentrasjoner av MAIF og cellene ble deretter stimulert med enten PMA eller fMLP. Peroksydproduksjon ble målt i 3 minutter.

**Proteasefrigivelse.**  $^{125}\text{I}$ -merket albumin ble belagt på brønner og fikk tørke over natten. Ubundet albumin ble vasket og deretter ble PMA-stimulerte nøytrofiler inkubert i brønnene i en time i nærvær eller fravær av forskjellige konsentrasjoner av MAIF. Fri radioaktivitet i supernatanten av brønnene ble dividert med total radioaktivitet i hver brønn for å vurdere graden av proteolyse.

#### Resultater:

- Resultatene er oppsummert i figurer 24-20 og tabeller 7-9. Fig. 24 demonstrerer at PAF underkjøling økte nøytrofiladhesjon til postkapillære venyler omtrent 6 ganger over en 60 minutters periode. 40 mg/rotte av MAIF preparatet reduserte den PAF-induserte nøytrofiladhesjon med mer enn 90% ved 30 minutter og mer enn 80% ved 60 minutter. Som interessant er, syntes MAIF forbehandling å også redusere antallet adherente nøytrofiler forut for eksponering for PAF. Den lavere konsentrasjon av MAIF (5 mg pr. rotte) var mindre effektiv, idet leukocyttadhesjon reduseres med 50% ved 60 minutter. AIF preparatet ved en konsentrasjon på 0,01 mg pr. rotte ble funnet å redusere leukocyttadhesjon med omtrent 50% ved 60 minutter. Ved en 10 ganger høyere konsentrasjon av AIF ble en svært stor økning i leukocyttadhesjon observert (data ikke vist). Adhesjonen var så dramatisk at videobåndet ikke kunne analyseres. Fig. 25 viser effekten av MAIF og AIF på nøytrofilutvandring. MAIF ved en konsentrasjon på 40 mg pr. rotte og 5 mg pr. rotte og AIF ved en konsentrasjon på 0,01 mg pr. rotte ble funnet å fullstendig hindre økningen i nøytrofilutvandring over tid ved PAF eksponering. Nøytrofilfluks syntes ikke å endres signifikant i den MAIF behandlede gruppe sammenlignet med den ubehandlede gruppe (fig. 26). Når AIF ble gitt ble det initialt observert flere nøytrofiler som ruller enn vanlig, idet antallet imidlertid avtok over tid.
- I en andre serie forsøk ble de forskjellige antiinflammatoriske midler administrert etter at nøytrofiler allerede var adherente (fig. 27). I denne serien forsøk ble leukocyttadhesjon reversert ved en MAIF dose på 40 mg/rotte men ikke ved en dose på 5 mg/rotte. AIF ved en dose på 0,01 mg pr.

rotte reverserte nøytrofiladhesjon med omtrent 25%. For ytterligere å vurdere effekten av den høyere konsentrasjon av MAIF (40 mg/rotte) ble antallet adherente nøytrofiler ved begynnelsen av registreringsprosedyren og antallet nye nøytrofiler som adherte i løpet av 5 minutter ved hver periode undersøkt. Fig. 27a demonstrerer at det var færre nøytrofiler adherente etter 10 minutters MAIF administrasjon hvilket indikerer at den antiinflammatoriske faktor faktisk hadde "skrellet bort" adherente nøytrofiler. Dessuten viser fig. 27b klart at MAIF blokkerte nye nøytrofil-endotelcelle-adhesjoner. Hastigheter som nøytrofiler rullet langs lengden av venyler med forandret seg ikke mellom grupper eller over tid med det unntak at AIF kan ha økt nøytrofil-rullehastighet (fig. 28). Denne effekten var ganske interessant i lys av det faktum at hastighet av rødt blodcelle forble uendret (fig. 29). Resultatene antyder at en enkel økning i hydrodynamiske krefter ikke forklare økningen i nøytrofil-rullehastighet. Nøytrofilfluks var også upåvirket av MAIF men ble igjen redusert av AIF (fig. 30).

In vitro data indikerer at den antiinflammatoriske faktor ikke forstyrrer aktiveringen av nøytrofiler per se. Peroksydradikal-fjernerer, peroksyddismutase blokkerte fullstendig cytokrom C reduksjon ved PMA og fMLP-stimulerte nøytrofiler, hvilket antyder at dette er en peroksydmediert prosess. MAIF ved ekstremt høye konsentrasjoner påvirket kun minimalt cytokrom C reduksjon, hvilket antyder at MAIF ikke direkte fjerner peroksyd (tabell 7). Proteasefrigivelse ble ikke påvirket av MAIF (data ikke vist).

Det ble funnet at binding av anti-CD18 monoklonalt antistoff kunne reduseres med MAIF eller AIF (tabell 8). Dette forekom ikke med CD11b antistoffet. Binding av CD18 antistoff til IgG-belagte mikrokuler ble heller ikke påvirket av MAIF eller AIF-preparatene hvilket antyder at den antiinflammatoriske faktor ikke påvirket evnen av anti-CD18 monoklonale antistoff til å binde til substrat, men virket mere sannsynlig på liganden, CD18. Det samme mønster ble observert med stimulerte nøytrofiler (tabell 9). Det skal bemerkes at

bindingen til CD18 varierte fra dag til dag fordi forskjellige celler ble anvendt hver dag. Derfor kan det ikke utføres en direkte sammenligning av resultatene i tabell 8 med resultatene i tabell 9.

5

| Tabell 7                                       |                                                                          |                                                                           |
|------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| Effekt av MAIF på peroksydsekresjon ved celler |                                                                          |                                                                           |
| MAIF                                           | PMA-stimulert<br>peroksydproduksjon<br>(nmol/min/10 <sup>7</sup> celler) | fMLP-stimulert<br>peroksydproduksjon<br>(nmol/min/10 <sup>7</sup> celler) |
| 0,0 mg/ml                                      | 153                                                                      | 55                                                                        |
| 0,1 mg/ml                                      | 145                                                                      | 50                                                                        |
| 1,0 mg/ml                                      | 143                                                                      | 40                                                                        |
| 5,0 mg/ml                                      | 140                                                                      | 32                                                                        |
| 10,0 mg/ml                                     | 127                                                                      | -                                                                         |

10

15

20

| Tabell 8                                                                                             |                              |                              |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Effekt av antiinflammatorisk faktor på tilgjengeligheten<br>av CD18 og CD11 celleoverflate-antigener |                              |                              |
| Ustimulerte<br>nøytrofiler                                                                           | Midlere<br>kanal-fluorescens | Midlere<br>kanal-fluorescens |
|                                                                                                      | Anti-CD18 Antistoff          | Anti-CD11 Antistoff          |
| Nøytrofiler alene                                                                                    | 314,24                       | 1594,57                      |
| +0,1 mg/ml MAIF                                                                                      | 234,26                       | 1553,74                      |
| +1,0 mg/ml MAIF                                                                                      | 262,78                       | 1796,00                      |
| +0,1 µg/ml AIF                                                                                       | 248,28                       | 1577,04                      |
| +1,0 µg/ml AIF                                                                                       | 188,93                       | 1554,61                      |
| Kuler + Anti-CD18 Antistoff                                                                          | 60,03                        |                              |
| +1 mg/ml MAIF                                                                                        | 88,61                        |                              |
| +1 µg/ml AIF                                                                                         | 84,99                        |                              |

25

30

35

Tabell 9

Effekt av MAIF på tilgjengeligheten av CD18  
celleoverflate-antigener på stimulerte og  
ustimulerte nøytrofiler

| Midlere kanal-fluorescens |        |
|---------------------------|--------|
| Ustimulerte nøytrofiler   | 236,95 |
| + MAIF 1 mg/ml            | 216,08 |
| + MAIF 5 mg/ml            | 251,51 |
| Stimulerte nøytrofiler    | 266,69 |
| + MAIF 1 mg/ml            | 158,68 |
| + MAIF 5 mg/ml            | 171,96 |

#### Diskusjon:

Dataene i det ovennevnte eksempel antyder at den antiinflammatoriske faktor hindrer nøytrofiladhesjon og utvandring i venyler på en doseavhengig måte. Mere viktig er det imidlertid at den antiinflammatoriske faktor kunne, innen en kort periode (10 minutter), reversere nøytrofiladhesjon til disse kar. De eneste andre midler som bevirker adherente nøytrofiler til å frigjøre sin fastholding på endotelet med slik effektivitet er monoklonale antistoffer rettet mot CD11/CD18 glykoproteinkomplekset på nøytrofilen. MAIF syntes ikke å ha noen effekt på blodflyt gjennom de individuelle kar eller på systemisk blodtrykk, hvilket antyder at hemodynamiske faktorer slik som skjærspenning ikke kunne forklare reverseringen av leukocyttadhesjon. Selv om leukocytttrulling synes å være en forutsetning for leukocyttadhesjon, påvirket MAIF ikke leukocytt-rullehastighet eller leukocyttfluks. Det sistnevnte resultat antyder at den antiinflammatoriske faktor ikke påvirker antallet nøytrofiler som rullet gjennom karet, og derfor at reduksjonen i adherente leukocytter ikke var et resultat av færre leukocytter som interagerer med endotelet. Det faktum at leukocytt-rullehastighet så vel som leukocyttfluks ble uendret antyder at adhesjonsmolekyler på nøytrofiler og endotel som er ansvarlig for leukocytttrulling, (1L-selektin, P-selektin) ikke ble påvirket av den antiinflammatoriske faktor i MAIF preparatet.

Det er blitt rapportert at leukocyttene kan regulere sin egen adhesjon ved frigjøring av peroksyd så vel som protease. Det var derfor tenkelig at mangelen på leukocyttheadhesjon i nærvær av MAIF og AIF skyldtes evnen til disse preparatene til å  
5 blokkere frigivelsen av peroksyd eller proteaser. Denne muligheten er uholdbar i lys av det faktum at MAIF hadde liten effekt på peroksyd- eller proteasefrigivelse og interagerer ikke med frigjorte proteaser eller fjerner frigjort peroksyd. Dessuten syntes ikke MAIF å påvirke nøytrofil-  
10 levedyktighet som vurdert med propidiumjodid hvilket gjør en direkte cytotoxisk effekt av den antiinflammatoriske faktor på nøytrofiler usannsynlig.

For at en nøytrofil skal adhere og utvandre må den ha et  
15 intakt CD11/CD18 glykoproteinkompleks. Immunonøytralisering av adhesjonskomplekset svekker fullstendig nøytrofilens evne til permanent å addere til endotelet og utvandre til det omliggende vev. Siden nøytrofiladhesjon og -utvandring er et hastighetsbegrensende trinn i vevsskaden assosiert med et an-  
20 tall inflammatoriske tilstander, ville et middel som forstyrrer disse prosessene også sannsynligvis blokkere den inflammatoriske respons. I den foreliggende undersøkelse reverserte både MAIF og AIF dramatisk nøytrofiladhesjon og blokkerte nøytrofilutvandring induert av PAF. På grunn av lik-  
25 heten mellom AIF-, MAIF- og anti-CD18 monoklonalt antistoff-indusert reversering av nøytrofiladhesjon syntes det mulig at den antiinflammatoriske faktor i AIF og MAIF utøvde sin effekt ved direkte interagering med CD18 glykoproteinkomplekset. In vitro dataene presentert ovenfor understøtter  
30 denne betraktning, idet at både MAIF og AIF blokkerte evnen av et anti-CD18 antistoff til å binde til CD18 glykoproteinkomplekset. I motsetning påvirket hverken AIF eller MAIF bindingen av CD11b til sitt respektive monoklonale antistoff. Til slutt, AIF og MAIF preparatene forstyrret ikke evnen til  
35 det anti-CD18 monoklonale antistoff til å binde til IgG-belagte mikrokuler. Det kan derfor konkluderes at den antiinflammatoriske faktor interagerer med CD18-komplekset direkte og hindrer CD18 i å binde til forskjellige ligander, inkluderende endotelcelleadhesjonsmolekyler.

**Eksempel 17****Effekt av MAIF på sirkulerende leukocytter**

Flere farmakologiske midler kan inhibere nøytrofilmigrasjon. Mens noen, slik som cyklofosfamid, er cytoreduktive og virker ved inhibering av hemopoiese i benmargen, har andre midler, slik som steroider og de ikke-steroide antiinflammatoriske medikamenter, spesifikke virkningssteder og resulterer ikke i leukocytose. Det var derfor viktig å bestemme effekten av den antiinflammatoriske faktor på sirkulerende hvit blodcelle-tall og forhold.

To forsøk ble utført. I det første ble MAIF preparatet administrert intravenøst i en dose på 40 mg/rotte til en gruppe av seks dyr og en kontrollgruppe ble injisert med saltoppløsning. Blodprøver ble tatt ved basislinjen og en, fire og 24 timer etter behandling. Resultatene er oppsummert i fig. 31.

MAIF administrasjon resulterte i en økning i sirkulerende nøytrofilitall, maksimalt ved fire timer, og en tilsvarende reduksjon i antallet perifere blodlymfocytter. En ytterligere dose-respons-undersøkelse ble utført hvori en gruppe rotter ble injisert intravenøst med saltoppløsning, 5, 10 eller 20 mg av MAIF-preparatet. Blod fra hver rotte var blitt tatt syv dager tidligere for å tilveiebringe basislinjeverdier og ble tatt igjen fire timer etter injeksjonen av MAIF. Resultatene er vist i fig. 32. Inkludert i diagrammet er resultatene oppnådd fra prøven tatt fire timer etter administrasjon av 40 mg av MAIF preparatet (se fig. 31).

Alle doser av MAIF resulterte i en økning i antallet sirkulerende nøytrofiler og en reduksjon i antallet lymfocytter. Mens effekten på lymfocytter sto i et lineært forhold til dose, var økningen i nøytrofilitall i form av en kurve, idet den største effekt observeres i de dyr som er gitt 10 mg.

Disse resultater understøtter det konsept at den antiinflammatoriske faktor modulerer inflammasjon ved å påvirke adhesjonen av nøytrofiler til endotelceller.

- 5 Det ble også oppnådd data vedrørende effekten av tre andre celle-targetrettede, antiinflammatoriske/immunomodulerende midler på sirkulerende leukocytter i rotten. Det stereoide medikament, metylprednisolon, bevirker en endring i lymfocytt/nøytrofilforholdet analogt med det som sees med MAIF.
- 10 Det tidsmessige forhold mellom medikamentadministrasjon og effekt er noe forskjellig. Det antirejeksjons/antiinflammatoriske middel cyklosporin A bevirker også en økning i antallet sirkulerende nøytrofiler, men lymfocyttertall blir enten økt eller ikke påvirket avhengig av dosen. I motsetning
- 15 depleterer det cytotoxiske medikament cyklofosfamid både sirkulerende lymfocytter og nøytrofiler. Effektene av den antiinflammatoriske faktor ville vise seg å være nær parallell med virkningen av metylprednisolon.

#### 20 Eksempel 18

- Effekt av den antiinflammatoriske faktor på lymfocytffunksjon
- Evnen til den antiinflammatoriske faktor til å indusere en reversibel reduksjon i antallet sirkulerende lymfocytter (eksempel 17) ga anledning til videre undersøkelse av effekten av faktoren på lymfocytffunksjon. Graft-versus-Host
- 25 (GvH) og Host-versus-Graft (HvG) analyser ble anvendt for å bestemme effekten av faktoren på T-lymfocytffunksjon.

- I HvG-analysen ble parentale Dark Agouti rotter ("DA") injisert i.v. med 20 mg MAIF preparatet 48, 24 og tre timer før lymfocytter fra deres F1 hybridavkom (DA x Hooded Oxford rotter) ble injisert inn i deres fotputer. Effekten av den antiinflammatoriske faktor på evnen til T-lymfocytter fra en intakt vert (DA) til å respondere på de fremmede histokompatibilitetsantigener av F1 lymfocytterne ble således målt.
- 35 Protokollen frembragte en svært signifikant reduksjon (30 %) i responsen som vist ved en reduksjon i popliteal lymfekjertelvekt (fig. 33A).



I GvH-reaksjonen ble parentale (DA) lymfocytter oppnådd fra MAIF-behandlede parentale rotter (DA) og injisert inn i fotputene til deres F1 (DA x Hooded Oxford) avkom. Denne analyse målte den in vivo responderbarhet til T-lymfocytter fjernet fra verten under evaluering, dvs fra MAIF-behandlede rotter. MAIF-kuren hadde ingen effekt på GvH-responsen (fig. 33B).

Under de foregående forsøk ble det lagt merke til en tydelig økning i antallet miltlymfocytter i MAIF-behandlede dyr. Ytterligere forsøk viste en signifikant økning i både miltvekt og i miltcelletall (fig. 33C og 33D). Økningen i miltcelletall var omtrent lik reduksjonen i antallet sirkulerende celler rapportert i det foregående.

Til slutt ble effekten av den antiinflammatoriske faktor på evnen til de isolerte miltlymfocytter til å respondere på mitogenet konkanavalin A bestemt. Administrasjon av MAIF preparatet ble funnet å nesten totalt motvirke den mitogene respons av dyrkede lymfocytter til dette lektin (fig. 33E).

#### Eksempel 19

##### Suppresjon av infeksjonsindusert inflammasjon ved den antiinflammatoriske faktor

Det er blitt utført forsøk for å bestemme hvorvidt endringer i serienivåer av akutte fasereaktanter (AFR'er) kunne anvendes til å kvantifisere den antiinflammatoriske aktivitet av den antiinflammatoriske faktor. AFR'ene er en gruppe proteiner som er syntetisert som respons på en inflammatorisk stimulus. Ett av disse, alfa-2-makroglobulin, er vanlig for både mennesker og rotter, og metodikk for måling for denne inflammatoriske komponent er tilgjengelig. To intravenøse injeksjoner av MAIF preparat (0 og 24 timer) reduserte ikke toppresponsen (48 timer) av alfa-2-makroglobulin. Dette resultat indikerer at faktoren ikke påvirker den senere inflammatoriske respons.

**Eksempel 20**

**In vitro og in vivo evaluering av melkeavledet anti-inflammatorisk faktor (bovin brystmakrofaganalyse, infeksjonsmodeller i mus)**

- 5 Inkubasjon av bovine brystmakrofager med den hyperimmune melkefraksjon fremmet ikke påvisbart graden av fagocytose, men økte evnen av makrofagene til å drepe fagocytosert *Staphylococcus aureus*. Mus injisert intraperitonealt med 10 mg av MAIF preparatet pr. kg viste økt resistens overfor  
10 intraperitoneal testing med letal *Staphylococcus aureus*.

- I en intrabrust *Staphylococcus aureus* mastitis testingsmodell viste MAIF-injiserte mus også signifikant mindre brystinflammasjon og involusjon og økt clearance av den infeksiose organisme. Kvantitativ histologisk analyse av brystvev fra MAIF-  
15 behandlede mus viste betydelig mer lumen, mindre interalveolært bindevev, og mindre leukocytisk infiltrasjon sammenlignet med kontrollmus. Brystkjertler av behandlede mus inneholdt også færre kolonidannende enheter enn kontrollmus.  
20 Den antiinflammatoriske faktor synes å utøve sin effekt på det ikke-spesifikke forsvarssystem ved en modulering av leukocytffunksjon.

**Eksempel 21**

- 25 **Effekt av den antiinflammatoriske faktor på patogenesen av eksperimentell infeksjon**

- De mest alminnelige inflammagener som mennesker treffer på er mikrobielle, og det er viktig å bestemme effekten av et hvilket som helst middel som modulerer forsvar hos verten mot  
30 infeksjon. Vevsskaden som ledsager mange infeksiose sykdommer er faktisk forårsaket av vertsresponsen på infeksjon snarere enn av den angripende organisme. Mens evnen til å modulere den inflammatoriske respons på infeksjon kunne være en anvendbar klinisk teknikk, må det erkjennes at inhibering av  
35 vertsresponsen under infeksjon kan være ufordelaktig. Dette gjelder særlig i tilfellet av nøytrofil inhibering. Undersøkelser med midler som demper deltagelsen av nøytrofiler i de tidlige trinn av infeksjon har vist at, mens inflammasjon og vevsskade initialt kan undertrykkes, den økte bakterielle

belastning som forekommer som et resultat av den reduserte cellulære respons til slutt fører til en eksaserbasjon av vevsskade. Det er således essensielt å evaluere potensialet av den melk-antiinflammatoriske faktor til å modulere infeksjon for å (1) bestemme om middelet kan redusere infeksjonsindusert vevsskade, og (2) å vurdere hvorvidt eventuell observert suppresjon av vertsresponsen ledsages av en økning i alvorligheten av infeksjon.

Effekten av den antiinflammatoriske faktor på ødemdannelse etter den intradermale injeksjon av *E. coli* 075 ble bestemt. To grupper av åtte dyr ble anvendt. En gruppe var ubehandlet og tjente som kontroller mens individer i den andre gruppen ble injisert intravenøst med 40 mg av MAIF preparatet i 0,5 ml saltoppløsning. Umiddelbart etter administrasjonen av MAIF ble 100  $\mu$ l av en kultur av *E. coli* 075 dyrket over natten injisert intradermalt med to hudseter på den barberte ryggen av rotten, etterfulgt av intradermal injeksjon av 100  $\mu$ l saltoppløsning ved ytterligere to seter. For å tillate estimering av ødemvolum i den infiserte hud ble 0,1  $\mu$ Ci av  $^{125}$ I-HSA injisert intravenøst ved tidspunktet for testing. Seks timer senere ble dyrene bedøvet, en blodprøve ble tatt, huden på ryggen ble fjernet og de infiserte og saltoppløsningsinjiserte seter ble stanset ut. Volumet av ødem ble beregnet ved å relatere vevstellinger til plasmatellinger som beskrevet. For å oppnå volumet av ødem som akkumuleres som et resultat av nærværet av *E. coli* ble ødem/plasmavolum av de saltoppløsningsinjiserte seter trukket fra. Resultatene er vist i fig. 34.

MAIF administrasjon resulterte i en 48 % inhibering av ødemdannelse. Dette forsøk godtgjorde at den antiinflammatoriske faktor kunne modulere den lokale inflammatoriske respons på infeksjon.

For å undersøke forholdene mellom administrasjon av antiinflammatorisk faktor, bakteriell replikasjon, akkumulering av fluid og inflammatorisk celleinfiltrasjon ble en alternativ infeksjonsmodell anvendt. Polyuretansvamper, fremstilt og

implantert som tidligere beskrevet, ble infisert med en kvantifisert prøve av *E. coli* 075 ved tidspunktet for implantasjon. Svampene ble fjernet ved tidsintervaller, veiet for å bestemme volumet av fluideksudatet og deretter klempt sammen i media for å frigjøre bakteriene og cellene fra svampen. Bakterietall og celletall ble estimert ved anvendelse av teknikker kjent for de fagkyndige innen området. Det etterfølgende forsøk ble utført ved anvendelse av denne modell.

90 dyr ble delt i to grupper på 45. En av disse gruppene var ubehandlet og tjente som kontroller. Den andre gruppen ble injisert intravenøst med 40 mg av MAIF preparatet. Svampene ble deretter implantert subkutan og, ved tidspunktet for implantasjon ble hver svamp inokulert med  $10^5$  *E. coli* 075. Grupper på seks til åtte dyr ble avlivet ved mellomrom deretter, og den bakteriologiske status og størrelsen av det inflammatoriske infiltrat i svampene ble bestemt. Resultatene er illustrert i fig. 35 til 37.

Graden av bakteriell replikasjon var mye større i MAIF-behandlede dyr enn i kontrollene, og det var henholdsvis en 10, 1000 og 10.000 ganger forskjell i bakterietall ved fire, åtte og 16 timer. Deretter avtok bakterietallene selv om det fremdeles var en stor forskjell ved 96 timer (fig. 35).

Den tidlige respons på infeksjon er den kritiske determinant for utfallet av en infeksjons hendelse. I dette forsøk var det cellulære infiltrat ved to, fire og åtte timer i dyrene gitt MAIF henholdsvis 27 %, 35 % og 46 % av kontrollinfiltratet (fig. 36B). Cellene som akkumuleres i løpet av de første 24 timer etter testing er > 90 % nøytrofiler og suppresjon av denne cellulære komponent under denne fase kan forklare den hurtige økning i bakterietall. Akkumuleringen av fluid ved to timer ble ikke påvirket av administrasjonen av MAIF, men var betydelig mindre fire, åtte og 16 timer etter testing. Dette er i overensstemmelse med det tidligere funn at den antiinflammatoriske faktor ikke undertrykket den primære, ikke-cellulære fase av ødemdannelse i karrageenan-fotputemodellen. I tidligere undersøkelser, under anvendelse av de immunomodulerende midler cyklosporin A og

metylprednisolon, ble det vist en lignende assosiasjon mellom  
 suppresjonen av det akutte cellulære inflammatoriske infil-  
 trat og fremmelsen av bakteriell replikasjon. I disse forsøk  
 fremmet imidlertid den økte bakterielle belastning en vertss-  
 5 respons mellom 24 og 48 timer etter testing hvori det var en  
 massiv innstrømming av nøytrofiler. Når vev var involvert  
 resulterte den økte inflammatoriske respons i en markert  
 eksaserbasjon av vevsskade og arrdannelse. Som interessant  
 er, selv om administrasjon av MAIF undertrykket den tidlige  
 10 inflammatoriske respons og ble assosiert med en 10.000 ganger  
 økning i bakterietall, var det ingen massiv innstrømming av  
 nøytrofiler 24 til 48 timer etter testing.

#### Eksempel 22

#### 15 Effekt av den antiinflammatoriske faktor på eksperimentell pyelonefritt

Et middel som kan undertrykke inflammasjon ved infeksjon uten  
 å resultere i en følgesykdom av økt vevsskade ville ha et  
 betydelig potensial. En klinisk relevant modell av infeksjons-  
 20 sykdom kunne tilveiebringe et eksperimentelt grunnlag for  
 etablering av et slikt potensial.

Pyelonefritt er en infeksjons sykdom som demonstrerer lokal  
 inflammasjon, vevsødeleggelse av arrdannelse som kardinal-  
 25 histologiske trekk. En velkarakterisert modell av sykdommen  
 er tilgjengelig, hvilken reproducerer de sentrale patologiske  
 trekk av sykdommen hos mennesker. Pyelonefritt induseres i  
 rotter ved en direkte inokulering av den kirurgisk blottlagte  
 nyre med et forutbestemt antall av E. coli 075. Etter test-  
 30 ing øker bakterietallet hurtig og når en topp tre til fire  
 dager senere. I normale dyr avtar infeksjonsnivået i løpet  
 av de følgende fem eller seks dager og når et platå ved om-  
 trent ti dager etter testing. Etter 21 dager er lesjonene  
 resorbert og fremstår som fokale områder av tiltenkt arrvev.  
 35 For å vurdere effekten av den antiinflammatoriske faktor på  
 denne infeksjonsmodellen ble pyelonefritt indusert i begge  
 nyrer i 26 dyr. Halvparten av disse dyrene ble behandlet med  
 MAIF preparatet intravenøst ved en dose på 40 mg/rotte ved  
 tidspunktet for testing, og igjen 48 timer senere. Syv dyr

fra hver gruppe ble avlivet fire dager etter induksjon av pyelonefritt og de to gjenværende gruppene av seks dyr ved 21 dager. Nyrene ble fjernet aseptisk og veiet for å bestemme det relative volum av fluideksudatet. Omfanget av størrelsen av overflatelesjon ble estimert ved direkte visualisering og  
5 nyrene homogenisert for å tillate opptelling av bakterietall. Resultatene er vist i fig. 38.

Fire dager etter testing ble den inflammatoriske respons, som  
10 vist ved inhiberingen av fluidakkumulering og størrelsen av lesjonene på overflaten av nyren, undertrykt ved administrasjonen av MAIF. Som tidligere observert i undersøkelsene som involverer infiserte, subkutanterte svamper, resulterte den tidlige suppresjon av inflammasjon i en logaritmisk  
15 økning i antallet bakterier i MAIF-behandlede dyr. Etter 21 dager var det ingen forskjell i sykdomspatologien som målt ved nyrevekt, bakterietall eller størrelse av nyreoverflatelesjoner. Således, mens suppresjon av den tidlige inflammatoriske respons med MAIF ikke resulterte i en reduksjon i  
20 vevsødeleggelse i den kroniske (21 dager) fase av pyelonefritt, fremmet den heller ikke utviklingen av patologiske lesjoner som andre antiinflammatoriske og immunomodulerende midler har gjort.

#### 25 Eksempel 23

##### Oppsummering av forsøksdata

Det ble utviklet en metode som tillot akkumulering av ødem i den karrageenaninjiserende fotpute som skal overvåkes kontinuerlig.

30

Den tidlige, ikke-fagocytiske fase av den inflammatoriske respons ble ikke påvirket av antiinflammatorisk faktor, mens den senere, cellulært drevede fase av reaksjonen ble betydelig inhibert. Ytterligere forsøk, hvori MAIF ble administrert med mellomrom før eller etter injeksjon av karrageenan, ga ytterligere bevis på at MAIF utøvet sin antiinflammatoriske effekt ved modulering av den sekundære, nøytrofilmedierte, inflammatoriske respons.

Den antiinflammatoriske faktor ble vist å ha en halveringstid på en til to timer etter i.v. injeksjon og utvikling av inflammasjon kunne undertrykkes når faktoren ble administrert 30 minutter etter testing. Dette resultat er relevant for  
5 den potensielle terapeutiske anvendelse av den antiinflammatoriske faktor.

Nøytrofilen er den viktigste cellen involvert i den akutte inflammatoriske respons. Under Arthus-reaksjonen ble en  
10 >80 % reduksjon i nøytrofilakkumulering observert etter MAIF administrasjonen som igjen ble assosiert med en svært signifikant inhibering av de sekundære karakteristikker av den inflammatoriske reaksjon, nemlig ødem og blødning. Dette resultat impliserte videre nøytrofiler som et mål i MAIF-  
15 indusert suppresjon av inflammasjon.

Ett av nøkkeltrinnene i utviklingen av inflammasjon er migrasjonen av nøytrofiler fra vaskulaturen til vevet. Den intra-venøse administrasjon av den antiinflammatoriske faktor ble  
20 vist å resultere i inngående og doseavhengig inhibering av nøytrofilmigrasjon. Når effekten av den antiinflammatoriske faktor på perifere blodleukocytter ble undersøkt, ble det observert en markert økning i antallet sirkulerende nøytrofiler, ledsaget av en tilsvarende reduksjon i antallet lymfocytter.  
25 Denne effekt var også doseavhengig, men var i tilfellet med økning i nøytrofiltall ikke lineær.

Administrasjonen av den melk-antiinflammatoriske faktor ble funnet å både blokkere adhesjonen av nøytrofiler til endotelet og å fremme dissosiasjonen av vertsnøytrofiler som var adherente ved tidspunktet for administrasjon. Denne effekten er antagelig resultatet av evnen til den antiinflammatoriske faktor til å blokkere interaksjonen mellom celleoverflate CD18 antigener og andre molekyler. Inhiberingen av CD18  
35 binding ved faktoren synes å være spesifikk i det at faktoren hindret bindingen av anti-CD18 monoklonalt antistoff til celler, men hindret ikke på samme måte bindingen av anti-CD11b monoklonalt antistoff.

Blokkeringen av intermolekylære interaksjoner som involverer CD18 celleoverflateantigenet kan også forklare den observasjon at faktoren var i stand til å inhibere evnen til verty-lymfocytter til å respondere på fremmede histokompatibilitets-  
5 antigenener. I andre forsøk ble den antiinflammatoriske faktor funnet å blokkere den konkanavalininduserte mitogene respons i lymfocytter.

Til slutt undertrykket faktoren signifikant den tidlige  
10 cellulære respons på infeksjon, en effekt som resulterte i en logaritmisk økning i bakterietall i en subkutan infeksjonsmodell. Denne eksaserbasjon av infeksjon resulterte ikke i et tilbakefall av den inflammatoriske respons, som det sees med andre midler som undertrykker akutt inflammasjon i infeksjon.  
15 Et andre forsøk under anvendelse av en klinisk relevant infeksjonsmodell, pyelonefritt, viste også en undertrykkende effekt på inflammasjon som var assosiert med en økning i bakterietall. Igjen ble ingen tilbakefallseffekt observert og det var ingen forskjell i graden av vevsskade  
20 som forekom i MAIF-behandlede og kontrollgrupper.

De følgende konklusjoner kan trekkes fra denne serie forsøk:

1. Antiinflammatorisk faktor, administrert i.v., undertrykker den sekundære, nøytrofilmedierte, fase av den karrageenan-induserte inflammatoriske respons.  
25
2. Når evaluert i karrageenan-fotputeanalysen har den antiinflammatoriske faktor en biologisk halveringstid på en til to timer og er effektiv selv når administrert etter at inflammasjon er indusert. Etterfølgende forsøk indikerer  
30 at den effektive halveringstid er avhengig av både dosen og den anvendte inflammatoriske stimulus.
3. Antiinflammatorisk faktor inhiberer nøytrofilutvandring in vivo.
4. Administrasjon av antiinflammatorisk faktor resulterer i  
35 en økning i antallet sirkulerende nøytrofiler og en tilsvarende reduksjon i lymfocyttall.
5. Antiinflammatorisk faktor undertrykker vertysforsvar mot infeksjon, antagelig via en effekt på nøytrofilutvandring.



6. Antiinflammatorisk faktor blokkerer interaksjoner mellom celleoverflate CD18 antigener og andre molekyler.
7. Antiinflammatorisk faktor blokkerer adhesjonen av nøytrofiler til endotelet.
- 5 8. Antiinflammatorisk faktor fremmer dissosiasjonen av adherente nøytrofiler fra endotelet.
9. Antiinflammatorisk faktor blokkerer evnen til vertys-lymfocytter til å respondere på fremmede histokompatibilitetsantigener.
- 10 10. Antiinflammatorisk faktor blokkerer den mitogene respons av lymfocytter.

De oppnådde forsøksdata i disse undersøkelser viser klart at melk-antiinflammatorisk faktor har en markert effekt på både  
 15 nøytrofiler og lymfocytter. De observerte effekter kan være resultatet av en direkte effekt av antiinflammatorisk faktor på celler per se, eller resultatet av suppresjonen (eller stimuleringen) av en eller annen cellulær eller oppløselig mediator som indirekte endrer de biologiske aktiviteter av  
 20 celler. Det er også alminnelig akseptert at de fleste farmakologiske midler har multiple virkninger og det er mulig at den antiinflammatoriske faktor vil finnes å påvirke et antall andre, ennå uidentifiserte, biologiske prosesser.

#### 25 **Eksempel 24**

##### **Metode for oppnåelse av høyrenset MAIF**

Standard metoder for fremstilling av MAIF lignende dem beskrevet tidligere i denne søknad gir en viss grad av rensning av MAIF fra skummet melk. Den etterfølgende protokoll  
 30 resulterer imidlertid i et mer høyrenset preparat av MAIF enn tidligere oppnåelig.

**Materialer.** Kjemikalier var alle av reagenskvalitet. Vann anvendt for preparative prosedyrer i stor skala var sterilt  
 35 vann for injeksjon.

**Standardisert MAIF preparat.** For å sammenligne MAIF-aktivitetene i forskjellige partier melk fra hyperimmune kuer eller fra kontrollkuer ble en standardisert prosedyre som innebærer

ultrafiltrering og ionebytterkromatografi tatt i bruk for å fremstille en delvis rensset, høyaktiv prøve. Et hensiktsmessig volum (3 til 100 liter) av frisk, kald skummet melk ble underkastet ultrafiltrering gjennom Minisette-enheten (Omega membran) ved 0,21 MPa inntil volumet av det oppsamlede filtrat var lik to tredjedeler av utgangsvolumet av melk. Et hensiktsmessig volum av standardisert, < 10.000 dalton (< 10 K dalton) permeat (250 ml, 500 ml, etc.) ble tilført til en DEAE kolonne som var 26,7 % av permeatvolumet. Kolonnen ble vasket med et volum av deionisert vann to ganger volumet av permeatet og eluert med et volum av 0,15 M NaCl lik 58,3 % av permeatvolumet. MAIF aktiviteten i standardiserte DEAE preparater ble bestemt i nøytrofilmigrasjonsinhiberingsanalysen (se nedenfor) og ble definert som prosent inhibering av nøytrofilmigrasjon induisert ved en dose på 3 mg/120-150 g rotte.

#### **Høyrenset MAIF preparat**

**Ultrafiltrering.** 90 liter frisk, kald (4°C), ikke-pasteurisert skummet melk fra hyperimmuniserte kuer ble pumpet gjennom et 25°C varmebad i prosesslinjen og deretter ført gjennom en Minisette (Filtron) ultrafiltreringskassett inneholdende en Omega (modell nr. OS010C01) membran med en molekylvektterskel på < 10 K dalton. Innløpstrykk ble opprettholdt ved 0,21 MPa. Det resulterende permeat (< 10 K permeat) ble oppsamlet på is inntil et volum på 60 liter var akkumulert. < 10 K permeatet ble anvendt umiddelbart for ytterligere rensing ved ionebytterkromatografi eller ble frosset og lagret ved -20°C eller ble frysetørket.

30

**Ionebytterkromatografi.** 60 liter kald, frisk < 10 K permeat ble tilført direkte til en 37 cm x 15 cm kolonne (Pharmacia, modell KS 370/15) inneholdende 16 liter dietylaminøetyl (DEAE) Sepharose Fast Flow ionebytterharpiks (Pharmacia nr. 17-0709-05) ved en strømningshastighet på 4,8 liter pr. time under anvendelse av en peristaltisk lavtrykkspumpe. Kolonneeffluenten ble overvåket ved 280 og 254 nm med en Pharmacia Dual Path UV kontrollinnretning (modell 19-24217-01). Den påfylte kolonne ble vasket med 120 liter

sterilt, deionisert vann for å eluere ubundet material inntil absorbanse ved 280 nm av effluente returnerte til basislinjen. Bundede komponenter ble eluert med 35 liter 0,15 M NaCl. Kolonneeluatet ble frysetørket og lagret i gule hetteglass i mørket. MAIF aktivitet i kolonneeluatet ble bestemt i nøytrofilmigrasjonsinhiberingsanalysen (se nedenfor).

**Størrelsesseksklusjonskromatografi.** Delvis rensede DEAE preparater av MAIF ble separert på en preparativ TSK G2500PW (21,5 x 600 mm) størrelsesseksklusjon HPLC kromatografikolonne (Toso Haas, Montgomeryville, PA) ekvilibrert med 0,15 M  $\text{NH}_4\text{OAc}$  på en Hewlett-Packard modell 1090 HPLC med en automatisk injektor og en diodeoppstillingsdetektor. Frysetørket DEAE-MAIF (100 mg) ble oppløst i 0,25 ml av 0,15 M  $\text{NH}_4\text{OAc}$  og injisert på kolonnen. Kolonnen ble eluert med 0,15 M  $\text{NH}_4\text{OAc}$  ved en strømningshastighet på 5 ml/min. Effluente ble overvåket ved 220 og 280 nm. Imidlertid ble diodeoppstillingsdata lagret for alle bølgelengder mellom 190 og 600 nm. Fraksjoner (9 ml) ble oppsamlet på en LKB "ultrorac" fraksjonsoppsamlingsanordning. For å fremstille store mengder MAIF ble multiple prøver på 100 mg hver separert på TSK kolonnen og oppsamlet i det samme sett av rør. Rør inneholdende den aktive faktor ble samlet, frysetørket og veiet.

**Organisk partisjonsekstraksjon.** MAIF ble selektivt isolert fra bundede salter ved en organisk partisjonsekstraksjonsmetode hvori den halvrensede TSK-MAIF prøve ble oppløst i destillert vann, alkalisert, ekstrahert med n-heksan for å fjerne nøytrale lipider, surgjort og deretter ekstrahert med etylacetat. 50 til 100 mg TSK-MAIF ble oppløst i 2 ml avionisert vann i en tjårebredd ekstraksjonsbeholder. pH av oppløsningen ble innstilt til 8,0 med fire dråper 0,02 N  $\text{NH}_4\text{OH}$ . 2 ml n-heksan ble tilsatt og blandingen ble rystet kraftig. Den øvre fase bestående av heksan ble fjernet, tørket og veiet. Den gjenværende vandige oppløsning ble surgjort til pH 3,5 med 100 dråper sitronsyre. 50 ml etylacetat ble tilsatt og blandingen ble rystet kraftig og sentrifugert ved 1000 opm for å separere lag. Etylacetatlaget ble overført til en tjårebredd beholder. Ekstraksjonen ble gjentatt

med et andre 5 ml volum av etylacetat. Etylacetatlagene ble kombinert, tørket under nitrogen og veiet.

**Svak anionbytterkromatografi.** En aminopropyl Supelcosil (Supelco) HPLC kolonne ble anvendt til å separere svakt ioniske negativt ladete MAIF komponenter befridd for bundede salter ved etylacetatekstraksjonsprosedyren. Den aminobundede kolonne som virker som en svak ionebytter med vandige buffere, ble ekvilibrert med 78 % ACN/H<sub>2</sub>O. En 50 mg TSK-MAIF prøve ble oppløst i 25 % ACN/3 mM NH<sub>4</sub>OAc og tilført til kolonnen. Kolonnen ble utviklet med et tredelt eluerings-system bestående av 78 % ACN/H<sub>2</sub>O til 69 % ACN/3 mM NH<sub>4</sub>OAc i 0 til 15 minutter etterfulgt av 69 % ACN/3 mM NH<sub>4</sub>OAc til 65 % ACN/3 mM NH<sub>4</sub>OAc fra 15 til 30 minutter ved en strømnings-  
hastighet på 1 ml/min. Kolonneeluatet ble overvåket ved 220 og 280 nm. Utvalgte fraksjoner ble testet for MAIF aktivitet i nøytrofilmigrasjonsinhiberingsanalysen (se nedenfor).

**Nøytrofilmigrasjonsinhiberingsanalyse.** MAIF-antiinflammatorisk aktivitet ble bestemt i en pleural nøytrofilmigrasjonsinhiberingsanalyse. Hvite laboratorie-hunnrotter med vekt 120 til 150 g ble injisert intraplevralt med 1,0 ml 1 % kappa-karrageenin i PBS for å indusere nøytrofilmigrasjon inn i pleurahulen. Rottene ble umiddelbart injisert intraperitonealt med 0,5 ml doser av MAIF prøver i PBS. PBS ble anvendt som en kontroll. Etter fire timer ble rottene avlivet, plevraleksudater ble oppsamlet og de utvandrede nøytrofiler ble tallet.

### 30 Resultater

**Standardisering av preparative metoder.** Reproduserbare metoder som innebærer ultrafiltrerings- og DEAE kolonneprosedyrer og analyse av sammenlignbare prøver i rotte-nøytrofilmigrasjonsinhiberingsanalysen ble etablert for fremstilling av høyaktive MAIF preparater. Valget av standardiserte rensemetoder tillot kvantifisering av MAIF aktivitet i spesifikke melkeprodukter og i partier for storskalaproduksjon. For å evaluere den standardiserte metode ble MAIF fremstilt fra hyperimmun melk, fra kontrollmelk oppnådd fra ikke-immu-

niserte kuer og fra en handelsvanlig tørrmelk, og ble blindtestet i nøytrofilmigrasjonsinhiberingsanalysen. MAIF prøver ble testet ved doser på 0,5, 1,5, 3, 5 og 8 mg/120-150 g rotte med hensyn på deres evne til å inhibere migrasjonen av nøytrofiler til inflammatoriske seter (fig. 39). MAIF fra hyperimmun melk ga en maksimal nøytrofilinhibering på mer enn 70 % ved 3 mg dose. Frisk kontrollmelk og handelsvanlig kontrollmelk ga hver kun 18 % inhibering ved 3 mg dose. Aktiviteten av standardisert MAIF fremstilt fra hyperimmun melk ble sammenlignet med sialinsyre og orotinsyre, kjente komponenter av melk antatt å ha antiinflammatorisk aktivitet (fig. 40) og med to antiinflammatoriske medikamenter (fig. 41). Hverken sialsyre eller orotinsyre utviste noen inhiberende aktivitet på migrasjonen av rottenøytrofiler i de testede doser. Indometacin utviste 35 % inhiberende aktivitet ved en dose på 0,5 mg/120-150 g rotte. Inhiberingen falt imidlertid til 30 % ved 3 mg/120-150 g rotte og avtok jevnt ved høyere doser. Aspirin, ved rottedoser ekvivalent med menneskedoser, viste mindre enn 10 % inhibering og nådde høyinhiberingsområdet kun ved doser nær 100 ganger den menneske-ekvivalente rottedose.

**MAIF rensing ved preparativ HPLC.** Anvendelse av DEAE ionbytterkromatografi for å fremstille MAIF resulterte i en 25 ganger rensning av den antiinflammatoriske aktivitet med hensyn til < 10 K permeatet. Analyse av sammensetningen av den DEAE-avledede MAIF ved størrelseseksklusjon HPLC (fig. 42) indikerte nærvær av to hovedkomponenter ved 17 og 25 minutter og seks eller flere komponenter i mindre mengder som eluerte mellom 30 og 60 minutter. Analyse av samlede fraksjoner i nøytrofilmigrasjonsinhiberingsanalysen viste at hovedkonsentrasjonen av MAIF aktivitet forekom i toppen ved 25 minutter. Disse resultater indikerte at et preparativt størrelsesseparasjonstrinn ville tillate fremstilling av et mer høyrenset preparat av MAIF. Forsøk på å oppnå sammenlignbare resultater på et preparativt væskrokromatografmedium ga ikke tilstrekkelige separasjoner. En preparativ HPLC TSK2500PW kolonne, eluert med 0,15 M  $\text{NH}_4\text{OAc}$ , ga fremragende separasjon av MAIF toppen ved 25 minutter. DEAE-MAIF ble

separert på HPLC kolonnen i 100 mg kjøringer og den samlede topp ved 25 minutter ble frysetørket. Den 0,15 M  $\text{NH}_4\text{OAc}$  elueringsbuffer ble valgt fordi alle buffersalter ville være fullstendig fjernbare fra isolerte MAIF prøver under fryse-  
5 tørking. Når gjentatte 100 mg kjøringer av DEAE-MAIF ble fraksjonert ved preparativ HPLC, utviste imidlertid utvunnede vekter av toppen ved 25 minutter kun en 10 % reduksjon i vekt. Elementæranalyse av MAIF toppen indikerte at mer enn 40 % av vekten kunne tilskrives salt. Flere salter, inklu-  
10 derende natriumklorid, natriumacetat og magnesiumklorid, ble testet for å bestemme deres elueringsposisjon på TSK2500PW kolonnen. Hvert salt eluerte mellom 35 og 40 minutter. Dette resultat indikerte at salt var spesifikt bundet av MAIF forbindelsen som eluerer ved 25 minutter.

15

**Eliminering av forurensende salt.** For å befri MAIF forbindelsen for bundede salter ble det anvendt en organisk partisjonsekstraksjonsmetode hvori det HPLC-rensede MAIF preparat ble alkalisert for å eksponere negativt ladede  
20 grupper og ekstrahert med heksan for å fjerne heksanoppløselige forurensninger. Den vandige fase ble deretter surgjort for å protonere negative ladninger, ekstrahert inn i etylacetat og veiet. Den ekstraherte rest utviste en reduksjon i vekt på mer enn 96 %. Analyse av den tørkede etylacetat-  
25 fraksjon i nøytrofilmigrasjonsinhiberingsanalysen viste sterk MAIF aktivitet og krevde så mye som en 10.000 ganger redusert dose av den høyrensede MAIF for å oppnå samme grad av nøytrofilmigrasjonsinhibering som MAIF oppnådd forut for den organiske partisjonsekstraksjon (fig. 43). Analyse av MAIF  
30 forbindelsen på en aminopropylsvak anionbytterkolonne før og etter ekstraksjon viste et betydelig skift i elueringsposisjon av de gjenværende komponenter og tap av en skulder i profilen (fig. 44). Disse resultater indikerte at partisjonsekstraksjonsmetoden resulterte i fjerning av de for-  
35 urensende bundede salter og tillater fremstilling av et mer høyrenset preparat av MAIF enn tidligere oppnåelig.

Den standardiserte MAIF metode frembringer en høyaktiv, delvis renset form av MAIF i mengder som er tilstrekkelig for

utførelse av sammensetningsmessige og strukturelle undersøkelser. MAIF fremstilt ved denne metode utviser høy aktivitet når sammenlignet med MAIF fra kontrollmelk eller med postulerte eller kjente antiinflammatoriske medikamenter.

- 5 Anvendelse av preparativ TSK HPLC for å fraksjonere MAIF er effektivt ved fremstilling av et mer renset MAIF. Salter forblir imidlertid bundet til MAIF forbindelsen på en uventet måte.

- Organisk partisjonsekstraksjon av MAIF forbindelsen inn i
- 10 etylacetat tillater fjerning av de forurensende salter, hvilket således tillater storskalafremstilling av høyrenset MAIF.

## PATENTKRAV

1. Fremgangsmåte for rensing av en antiinflammatorisk faktor fra skummet melk (MAIF),  
5 k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter:
  - (i) ultrafiltrering av melken gjennom et filter med en molekylvektterskel på 10000 Dalton,
  - (ii) oppsamling av et < 10000 Dalton permeat fra trinn (i),
  - (iii) tilføring av permeatet til en første ionebytterkolonne  
10 og vasking av kolonnen med deionisert vann,
  - (iv) oppsamling av eluatet fra trinn (iii),
  - (v) separering av eluatet fra trinn (iv) på en preparativ størrelseseksklusjon HPLC kromatografikolonne og oppsamling av eluatet, og  
15 (vi) utføring av organisk partisjonsekstraksjon av eluatet oppnådd fra den preparative størrelseseksklusjon HPLC kromatografi og oppnåelse av det organiske ekstrakt fra ekstraksjonen.
- 20 2. Fremgangsmåte som angitt i krav 1, som videre omfatter trinnet med svak anionbytterkromatografi av det organiske ekstraktet.
3. Fremgangsmåte som angitt i krav 1 eller 2, hvori harpiksen  
25 i den første ionebytterkolonnen er dietylaminoetyl (DEAE)-Sepharose hurtigstrømnings-ionebytterharpiks.
4. Fremgangsmåte som angitt i ett eller flere av kravene 1 til 3, hvori den preparative størrelseseksklusjon HPLC  
30 kolonne er en TSK G2500PW størrelseseksklusjonskolonne.
5. Fremgangsmåte som angitt i ett eller flere av kravene 1 til 4, hvori, i trinn (vi), den organiske partisjonsekstraksjonen omfatter:
  - 35 (i) ekstrahering med heksan og  $\text{NH}_4\text{OH}$ ,
  - (ii) reekstrahering av den vandige fasen fra trinn (i) med etylacetat, og
  - (iii) oppsamling av etylacetatekstraktet.



6. Fremgangsmåte som angitt i krav 5, som videre omfatter:

- (i) tilføring av etylacetatekstraktet til en svak anion-bytterkolonne, og
- (ii) utvikling av kolonnen med et tredelt elueringssystem.

5

7. Fremgangsmåte som angitt i ett eller flere av kravene 1 til 6, hvori ultrafiltreringstrinnet begynner med omtrent 90 til 225 liter skummet melk og ionebyttertrinnet begynner med omtrent 60 til 150 liter permeat.

10

8. Fremgangsmåte som angitt i krav 7, hvori man begynner HPLC størrelseseksklusjonskromatografien med 100 mg MAIF fra et DEAE ionebyttertrinn.

15

9. Renset antiinflammatorisk faktor, karakterisert ved at den kan oppnås ved en fremgangsmåte som angitt i ett eller flere av kravene 1 til 8.

20

10. Renset antiinflammatorisk faktor som angitt i krav 9 for anvendelse i medisin.

11. Anvendelse av MAIF som kan oppnås ved en fremgangsmåte som angitt i ett eller flere av kravene 1 til 8 ved frem-

25

stilling av et middel for:

inhibering av nøytrofil-migrasjon,

inhibering av inflammatorisk respons,

inhibering av nøytrofiler fra å adhere til endotelceller i et pattedyr,

30

løsgjøring av nøytrofiler som har adhert til endotelceller i et pattedyr,

inhibering av interaksjon mellom CD18 celleoverflate-antigener som er tilstede i et pattedyr og molekyler som er i stand til å binde til CD18 celleoverflate-antigenene,

35

inhibering av emigrasjon av leukocytter fra venesystemet til et pattedyr, eller

undertrykking av den mitogene respons til lymfocytter i et verts-pattedyr på fremmede antigener.

12. Anvendelse som angitt i krav 11 ved fremstilling av et middel for løsgjøring av nøytrofiler som har adhert til endotelceller i et pattedyr, hvori nøytrofilene har adhert til endotelcellene som respons på blodplateaktiverende faktor.

5

13. Anvendelse som angitt i krav 11 ved fremstilling av et middel for inhibering av emigrasjonen av leukocytter fra venesystemet til et pattedyr, hvori leukocytterne er nøytrofiler.

10

14. Anvendelse som angitt i krav 11 ved fremstilling av et middel for undertrykking av den mitogene respons til lymfocytter i et verts-pattedyr på fremmede antigener, hvori antigenene er på celleoverflaten.

15

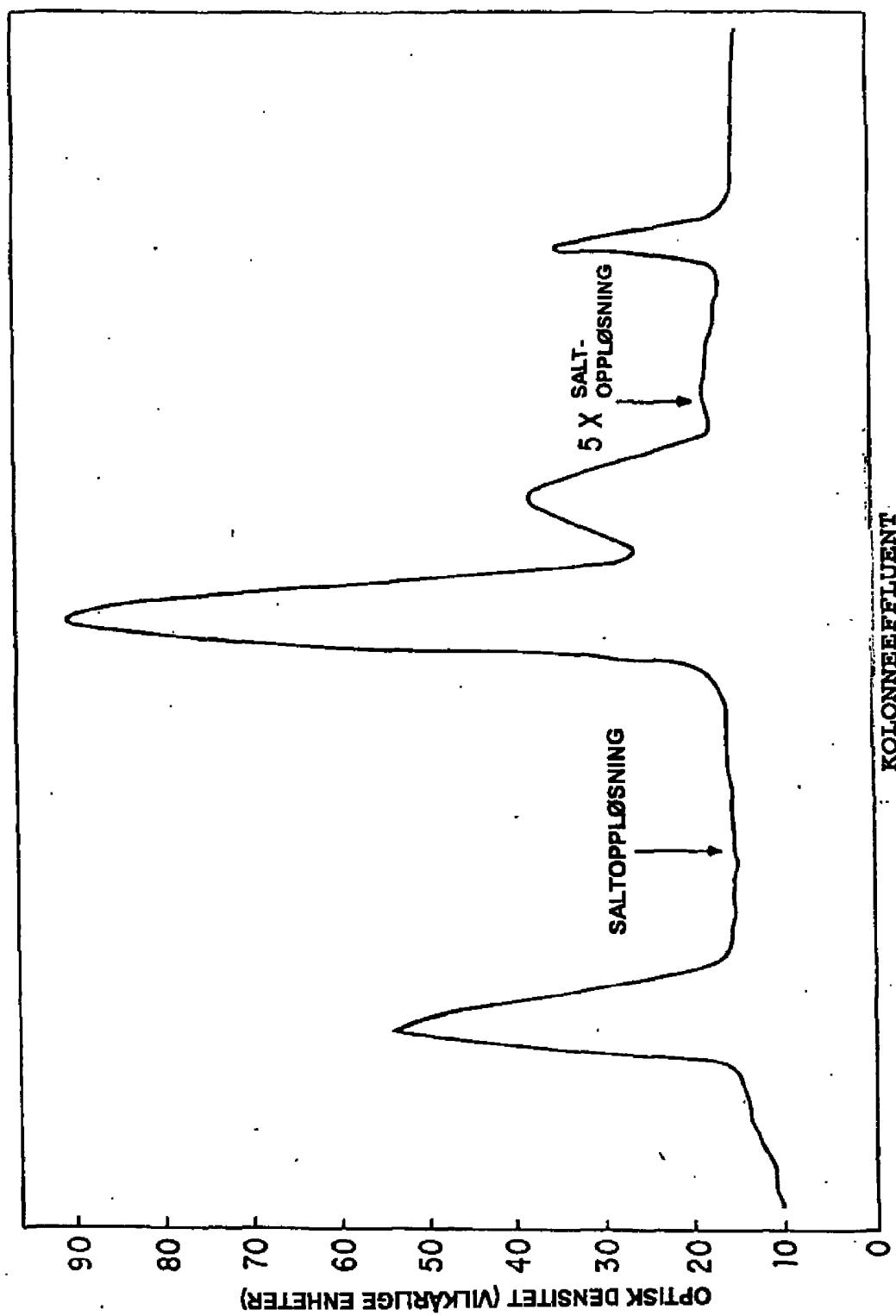
15. Anvendelse som angitt i krav 14, hvori cellene er leukocytter eller lymfocytter.

16. Anvendelse av MAIF som kan oppnås ved en fremgangsmåte som angitt i ett eller flere av kravene 1 til 8 ved fremstilling av et middel for behandling eller profylakse av inflammasjon og inflammatoriske tilstander slik som akutt og subakutt bursitt, akutt ikke-spesifikk tendonitis, systemisk lupus erythematosus, systemisk dermatomyositt, akutt revmatisk karditt, pemfigus, bulløs dermatitt, herpetiformis, alvorlig erytem, multiform eksfoliativ dermatitt, cirrhose, sesongmessig perennial rhinitt, bronkialastma, ektopisk dermatitt, serumsyke, keratitt, ophthalmicus iritis, diffus ureitt, chorditis, optikusnevritt, sympatisk oftalmi, symptomatisk sarkoidose, Loeffler's syndrom, berylliose, hemolytisk anemi, mastitt, mastoiditt, kontaktdermatitt, allergisk konjunktivitt, psoriatisk artritt, ankyloserende spondylitt, akutt giktisk artritt og herpes zoster.

35

17. Farmasøytisk formulering, karakterisert ved at den omfatter MAIF som kan oppnås ved en fremgangsmåte som angitt i ett eller flere av kravene 1 til 8 sammen med et farmasøytisk akseptabelt fortynningsmiddel.

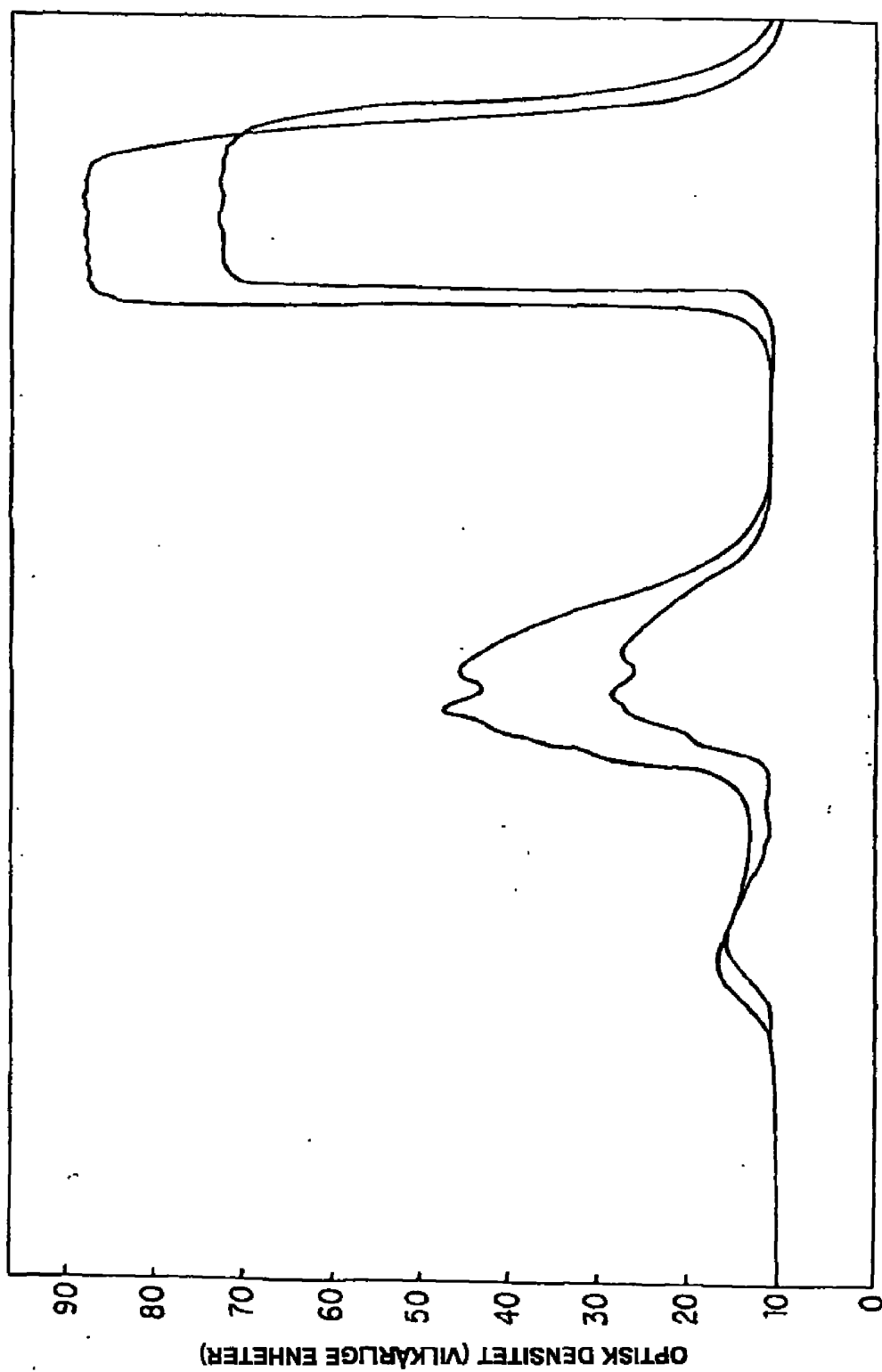
1/45



KOLONNEEFFLUENT

FIG.1

2/45



KOLONNEEFFLUENT

FIG. 2

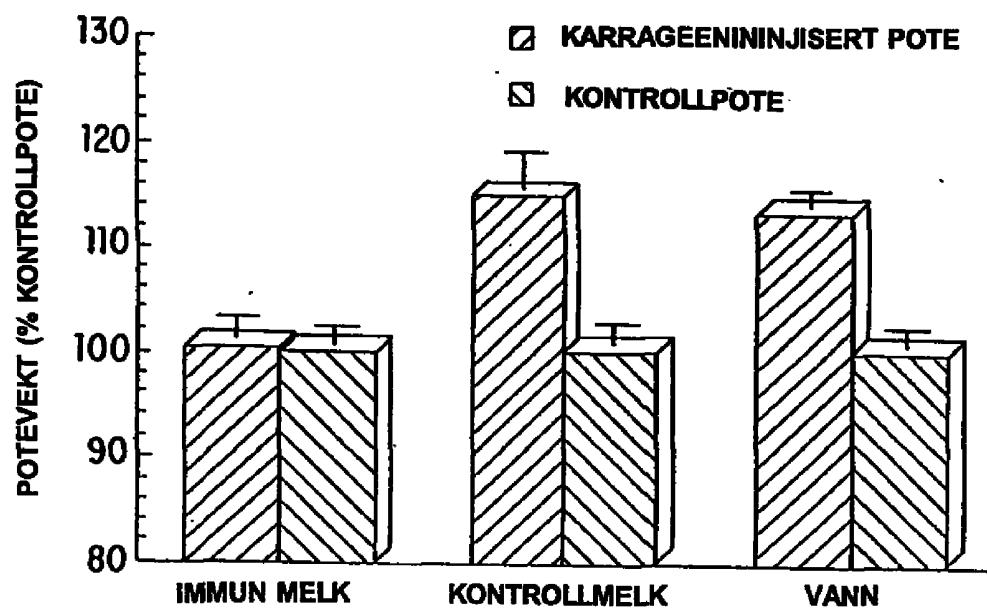


FIG. 3

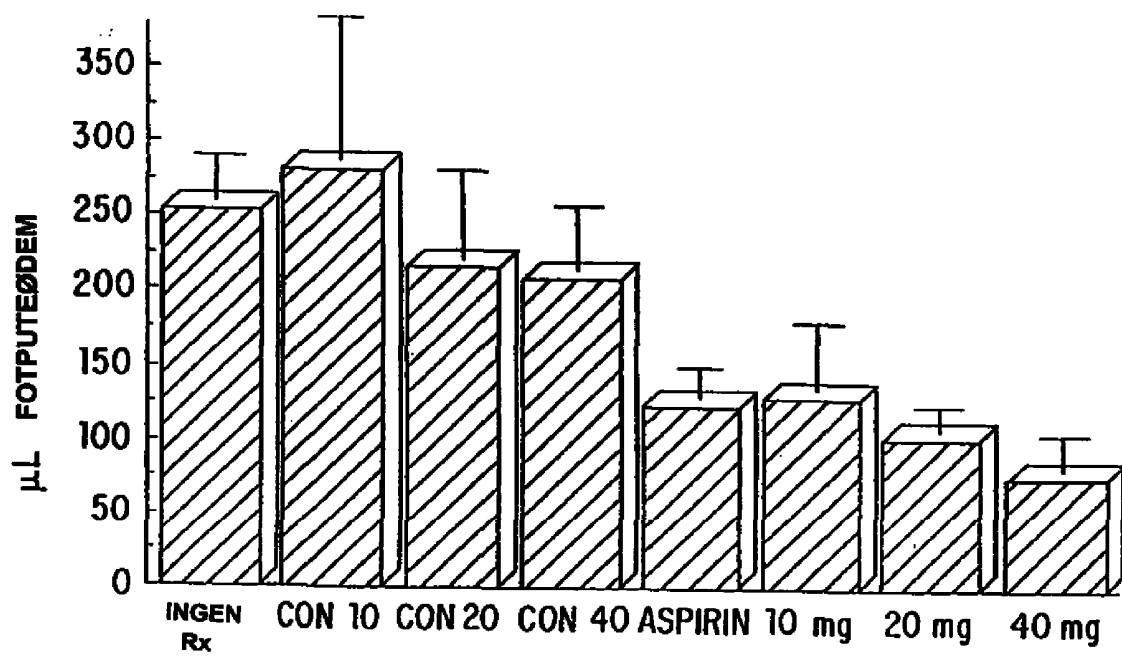


FIG. 4

5/45

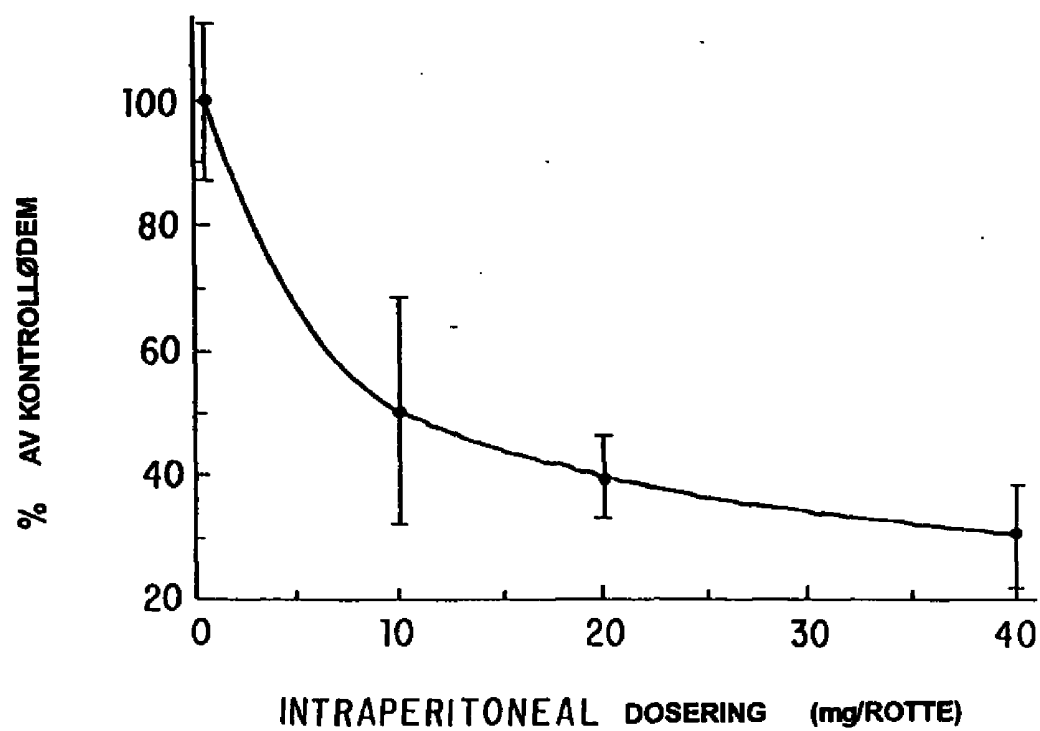


FIG. 5

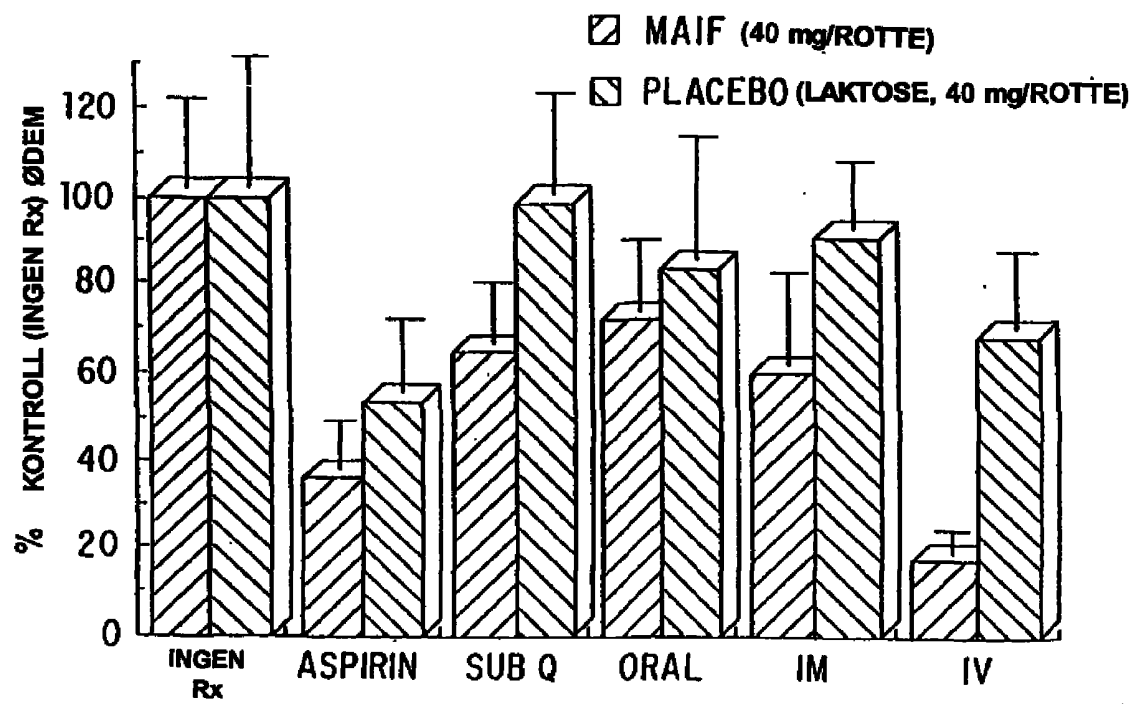


FIG. 6



7/45

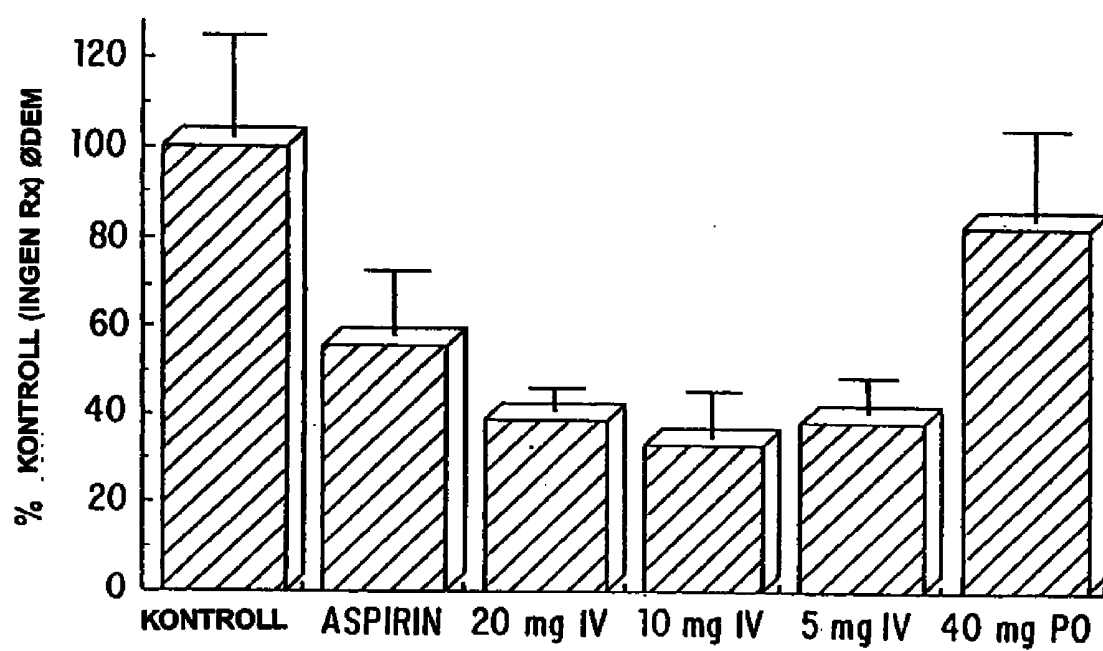


FIG. 7

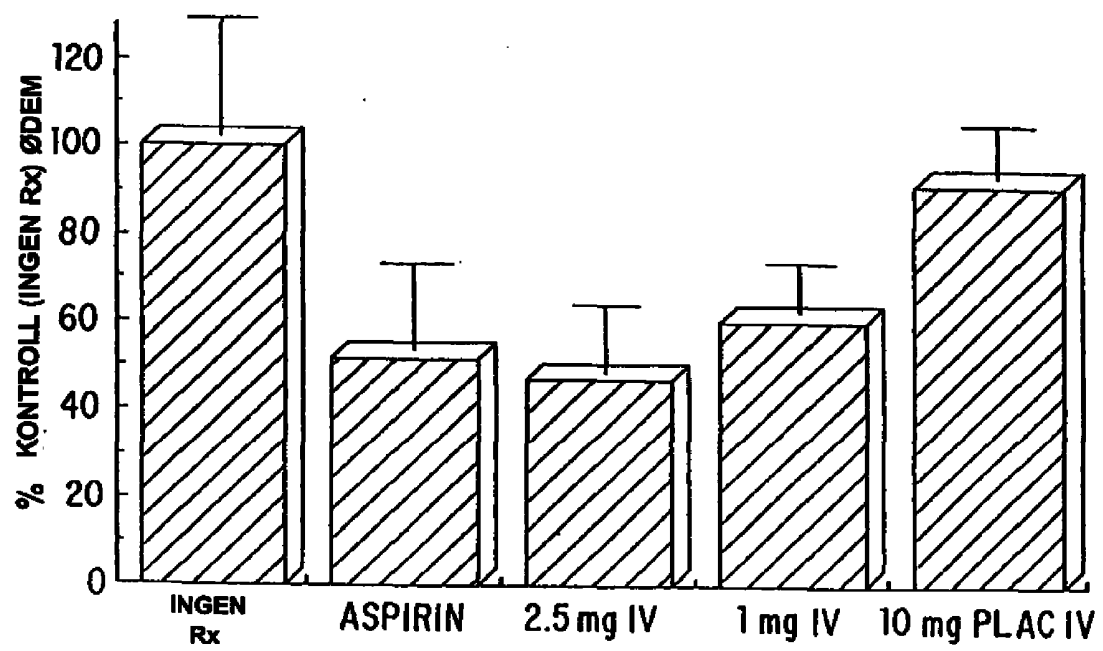


FIG. 8

9/45

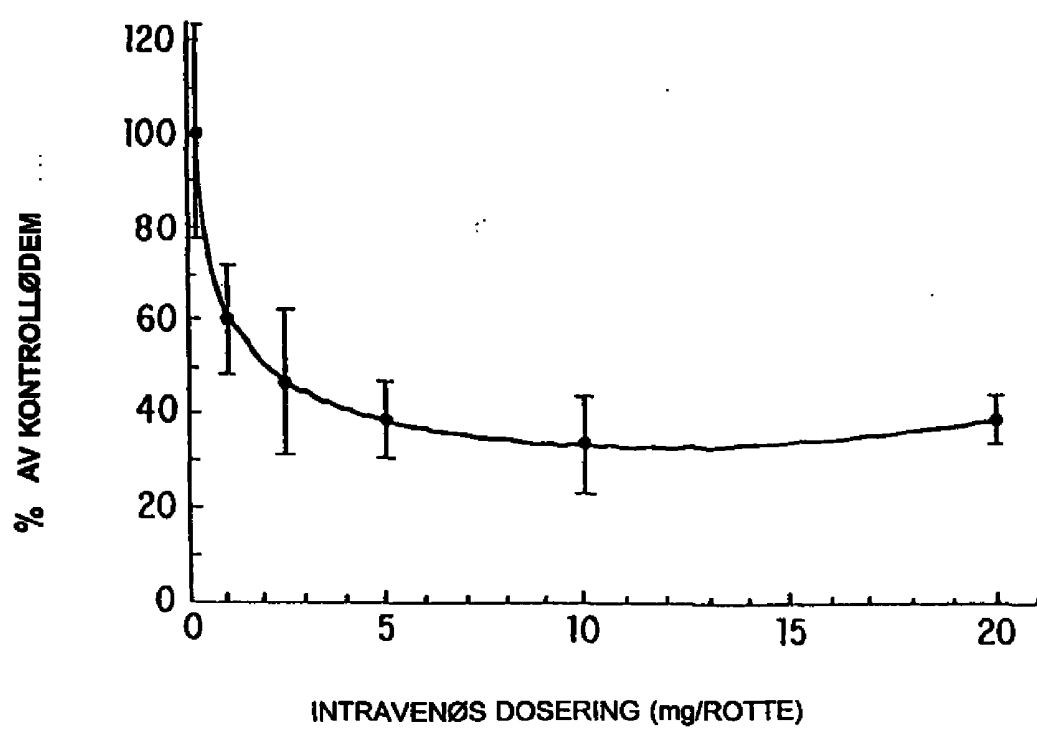


FIG. 9

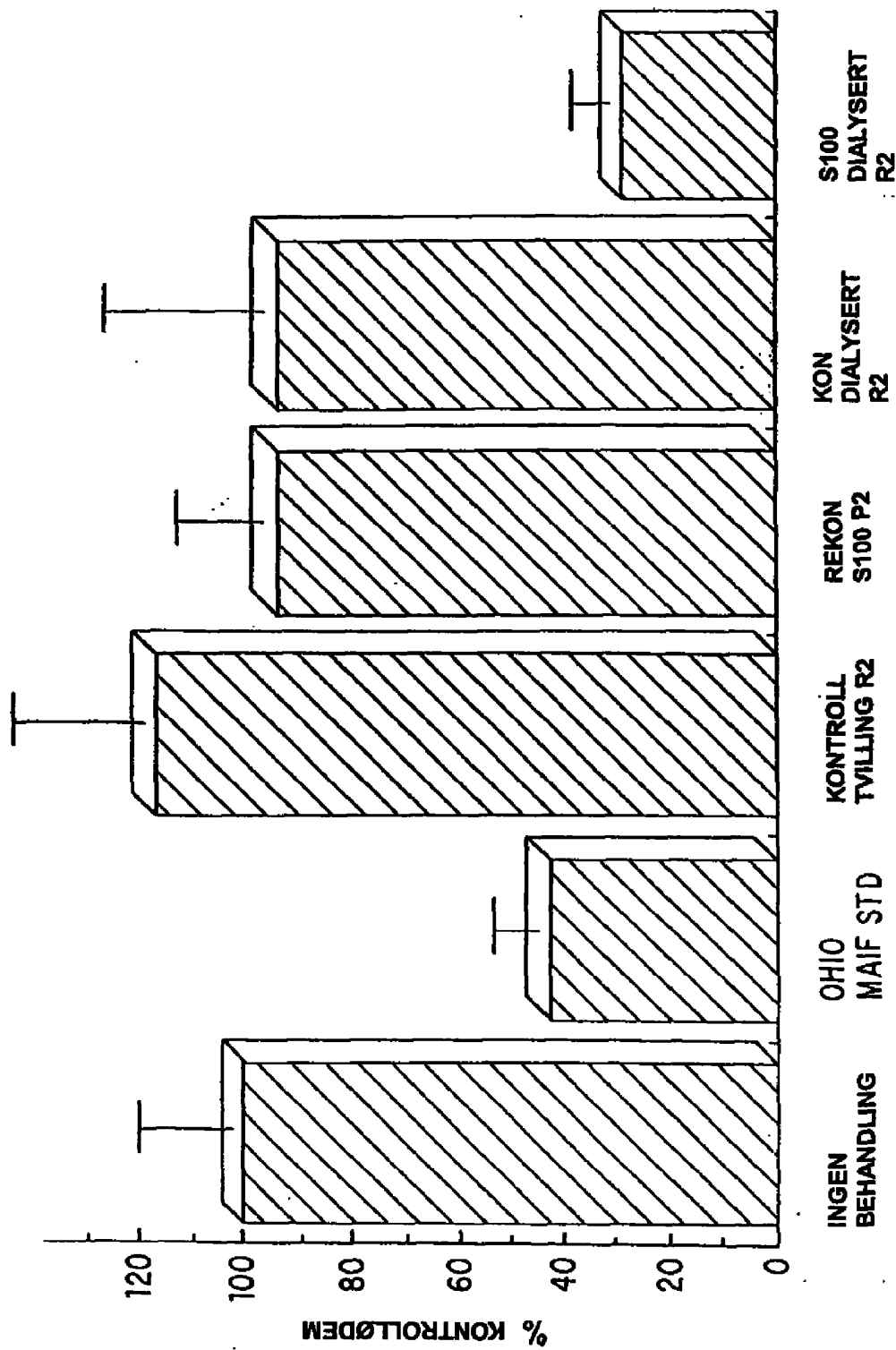


FIG. 10

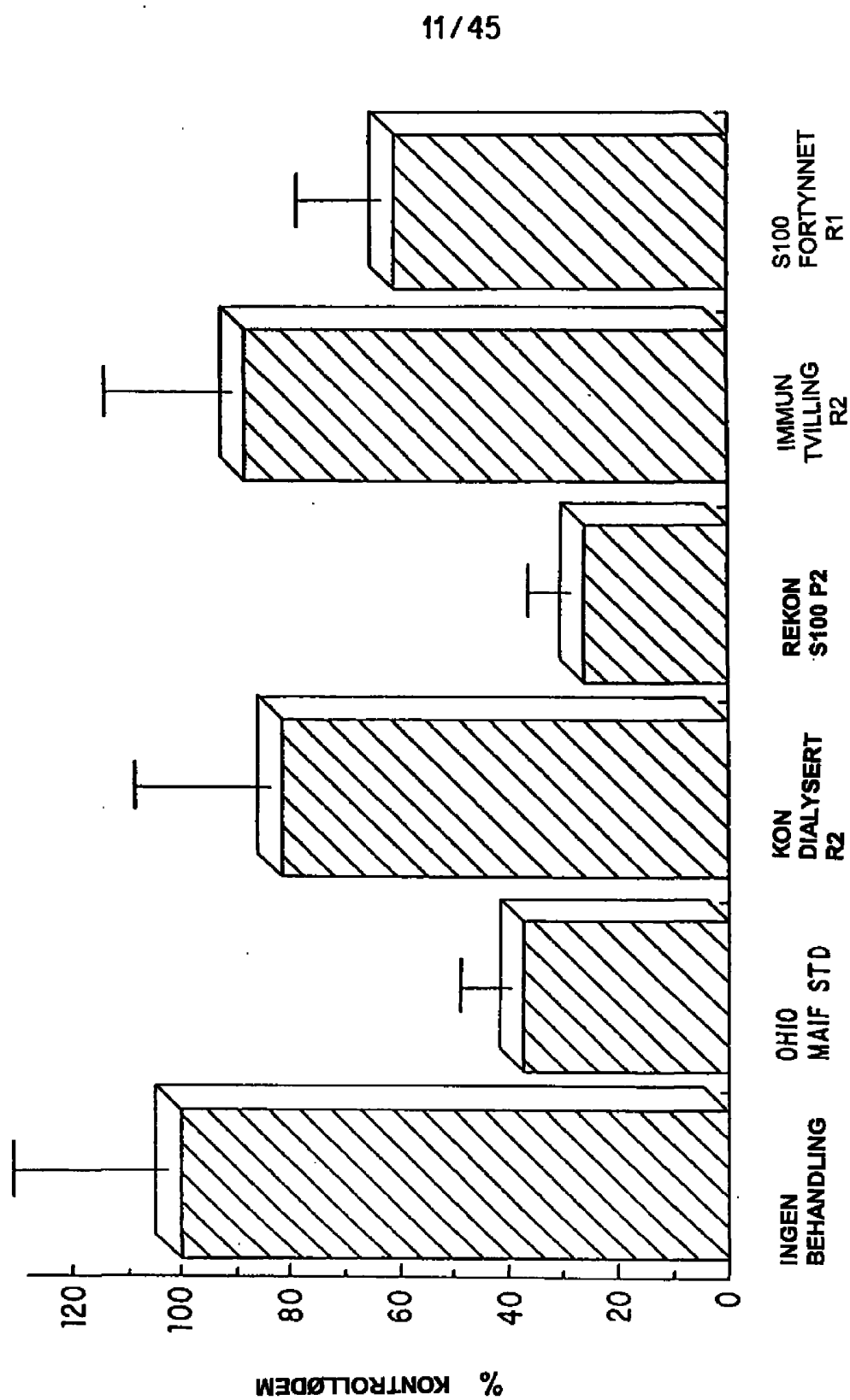


FIG.11

12/45

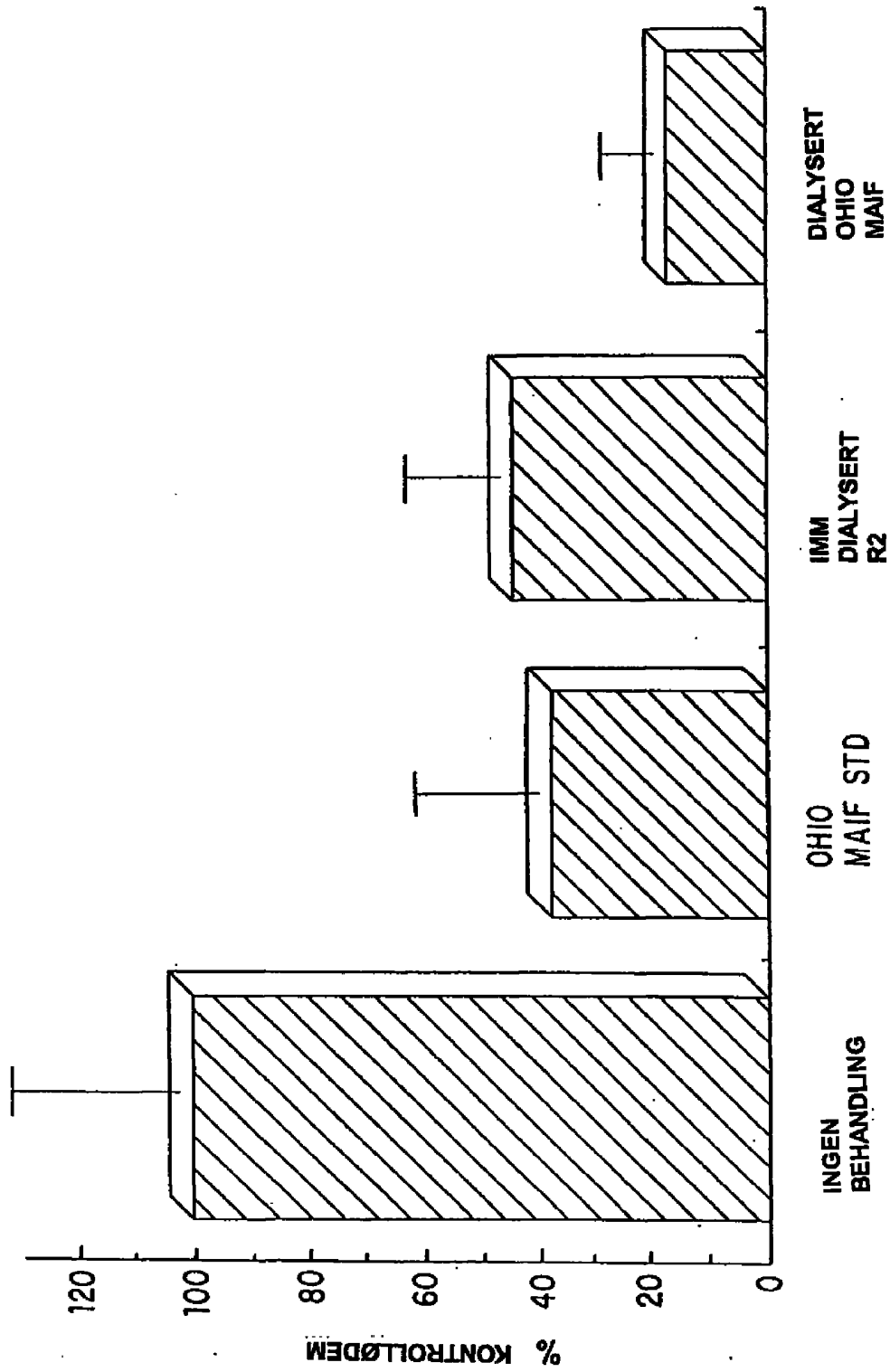


FIG. 12

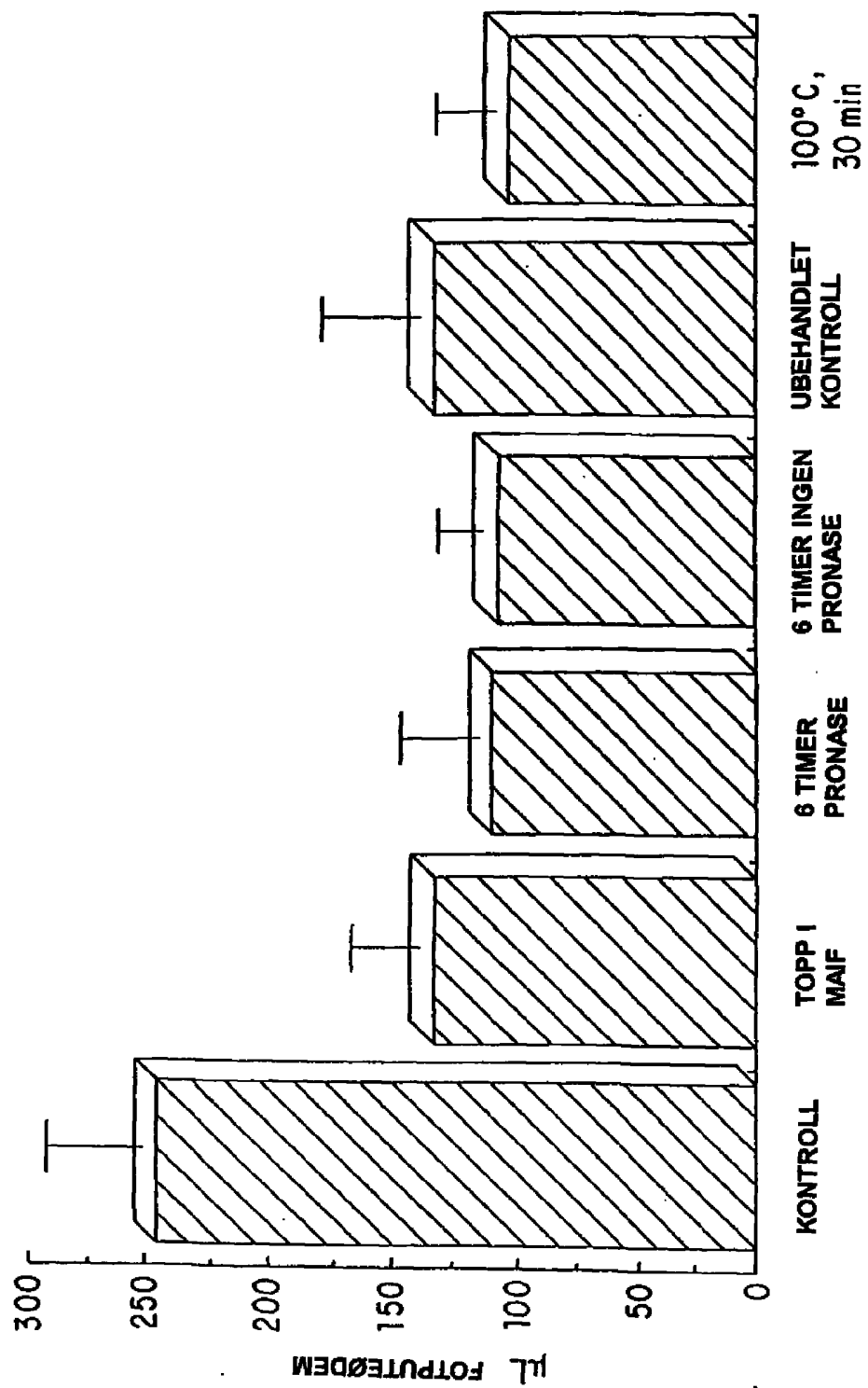


FIG. 13

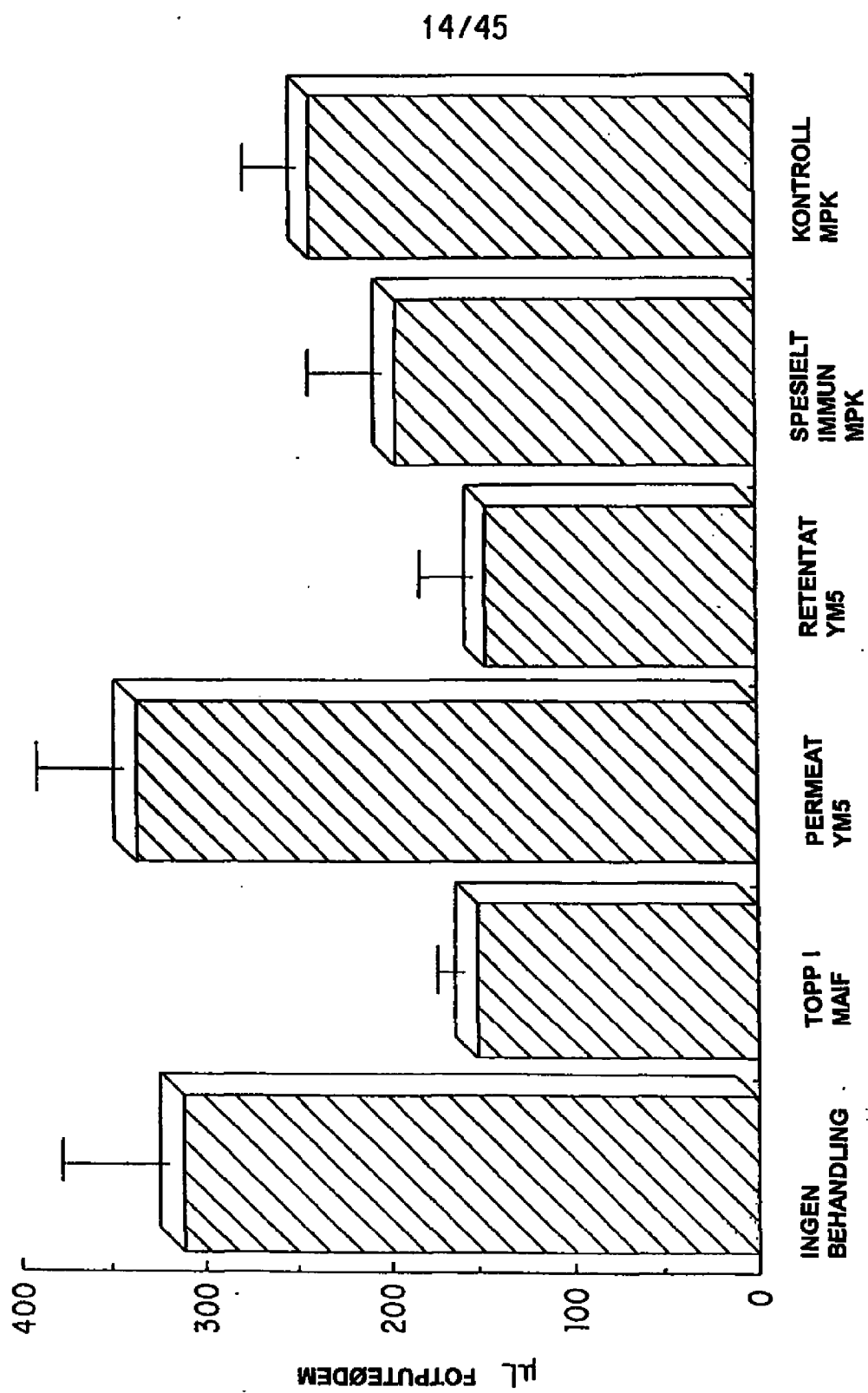


FIG. 14



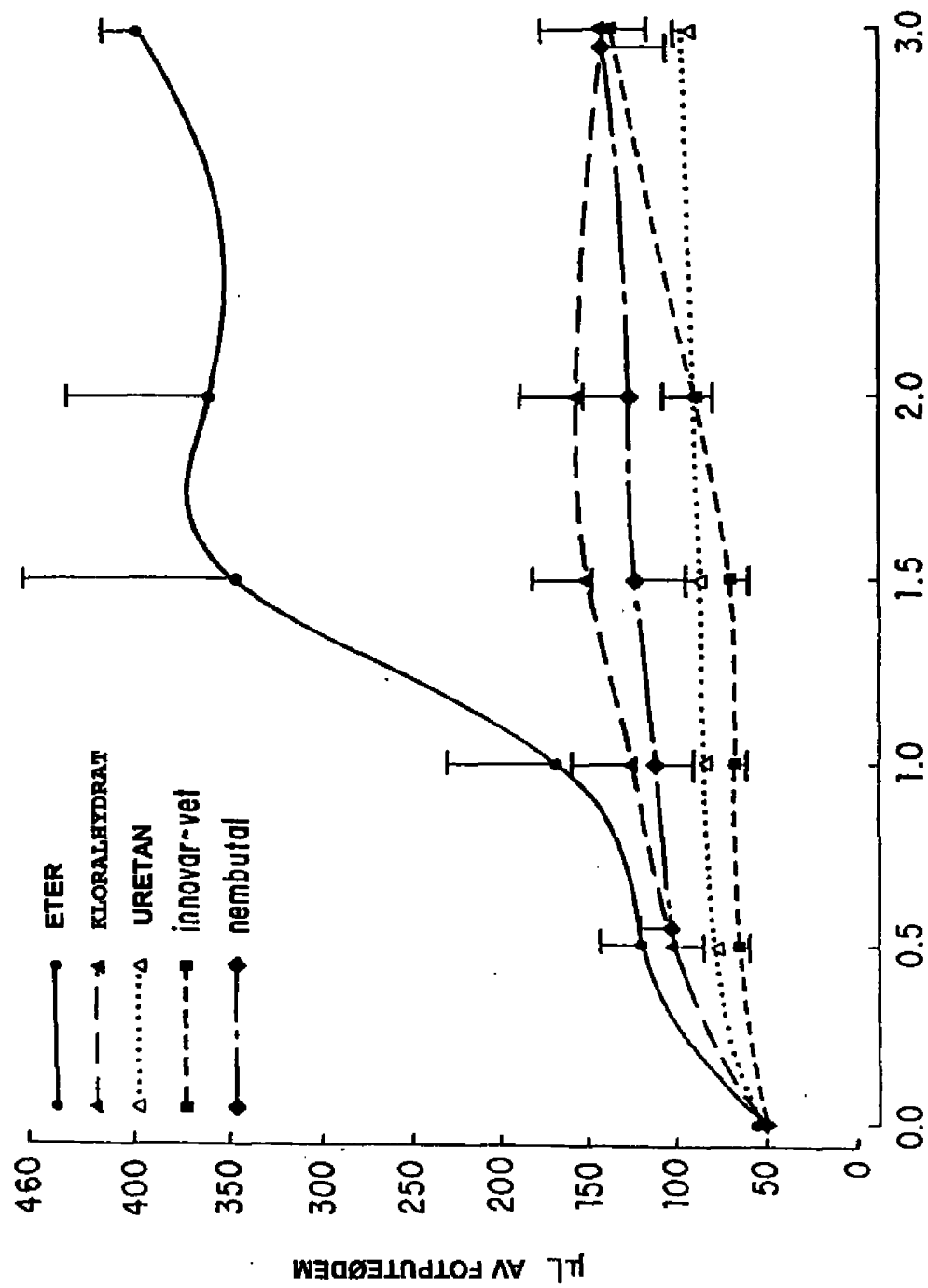


FIG. 15

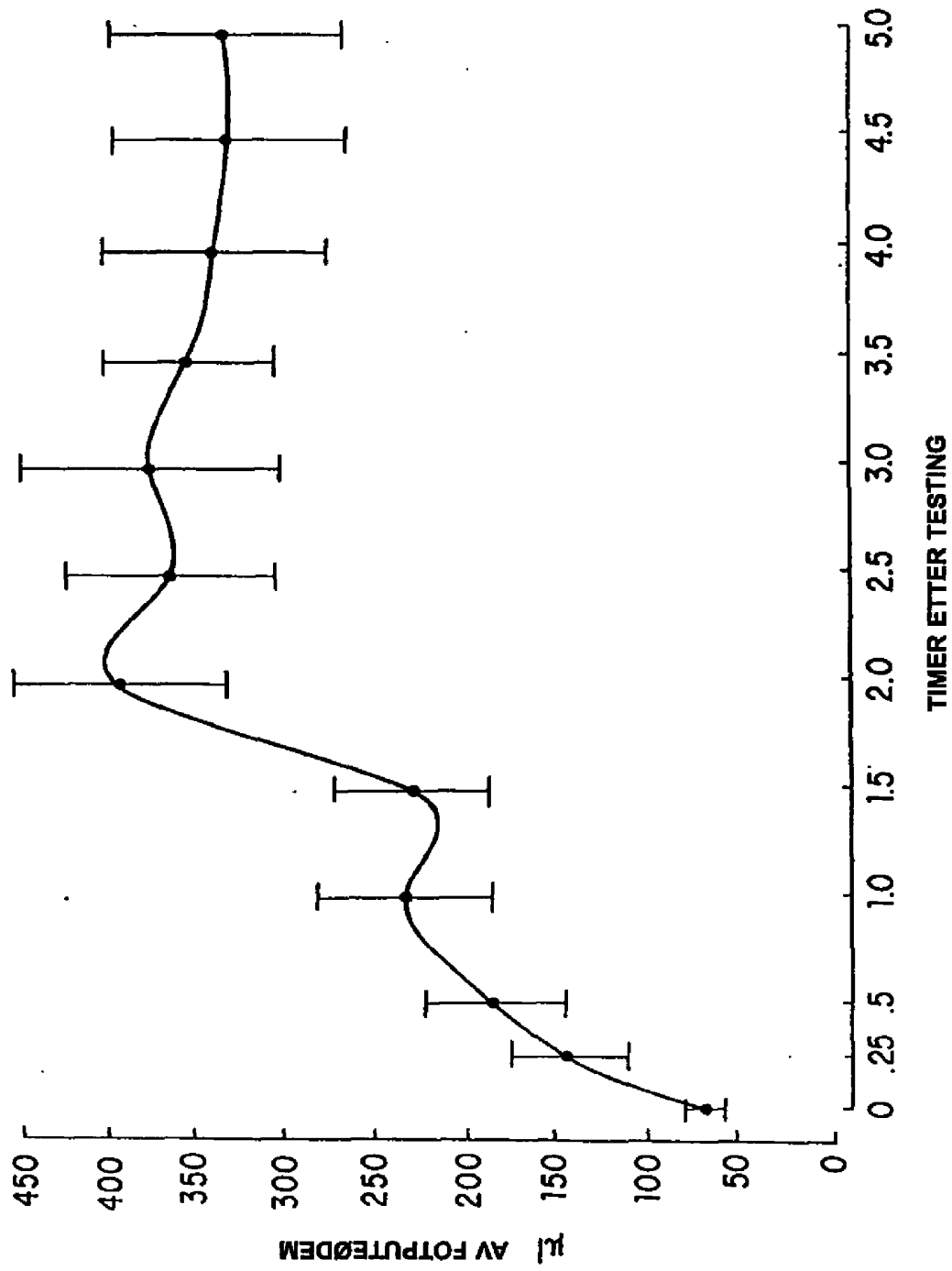


FIG. 16

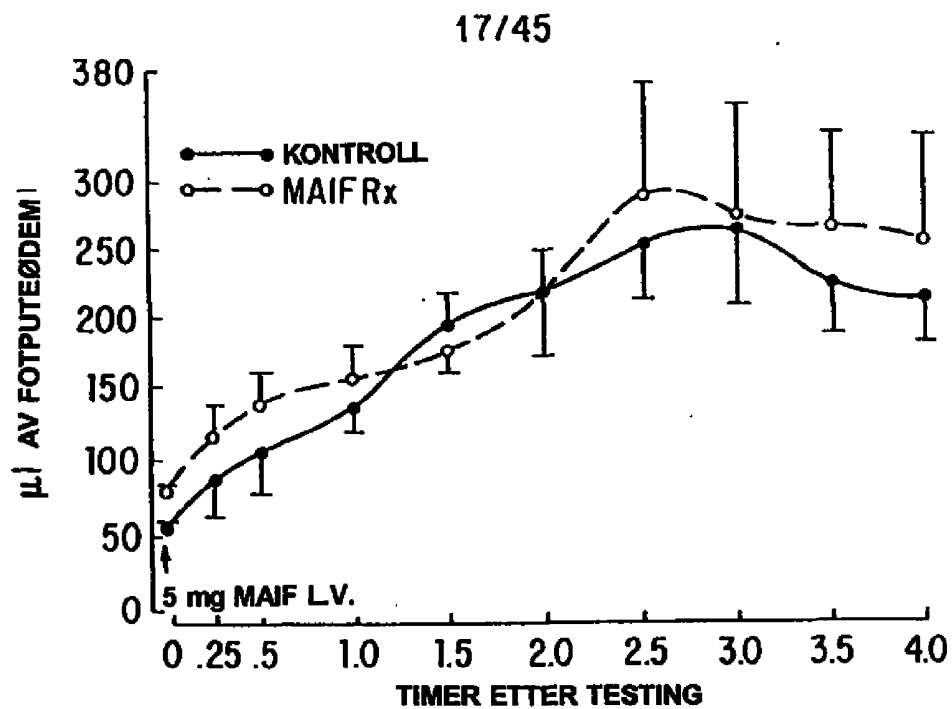


FIG. 17A

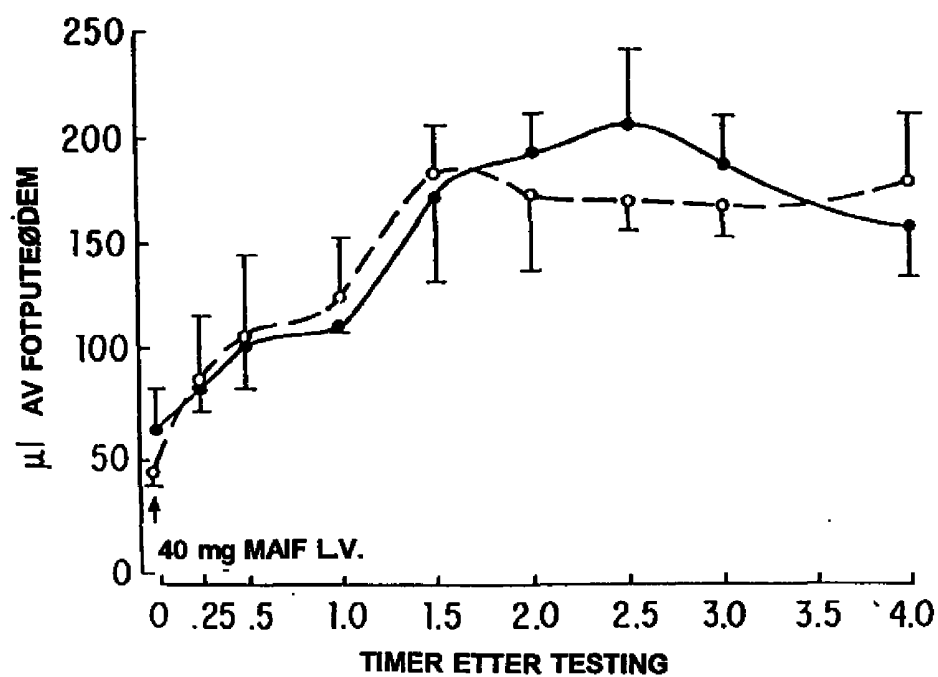
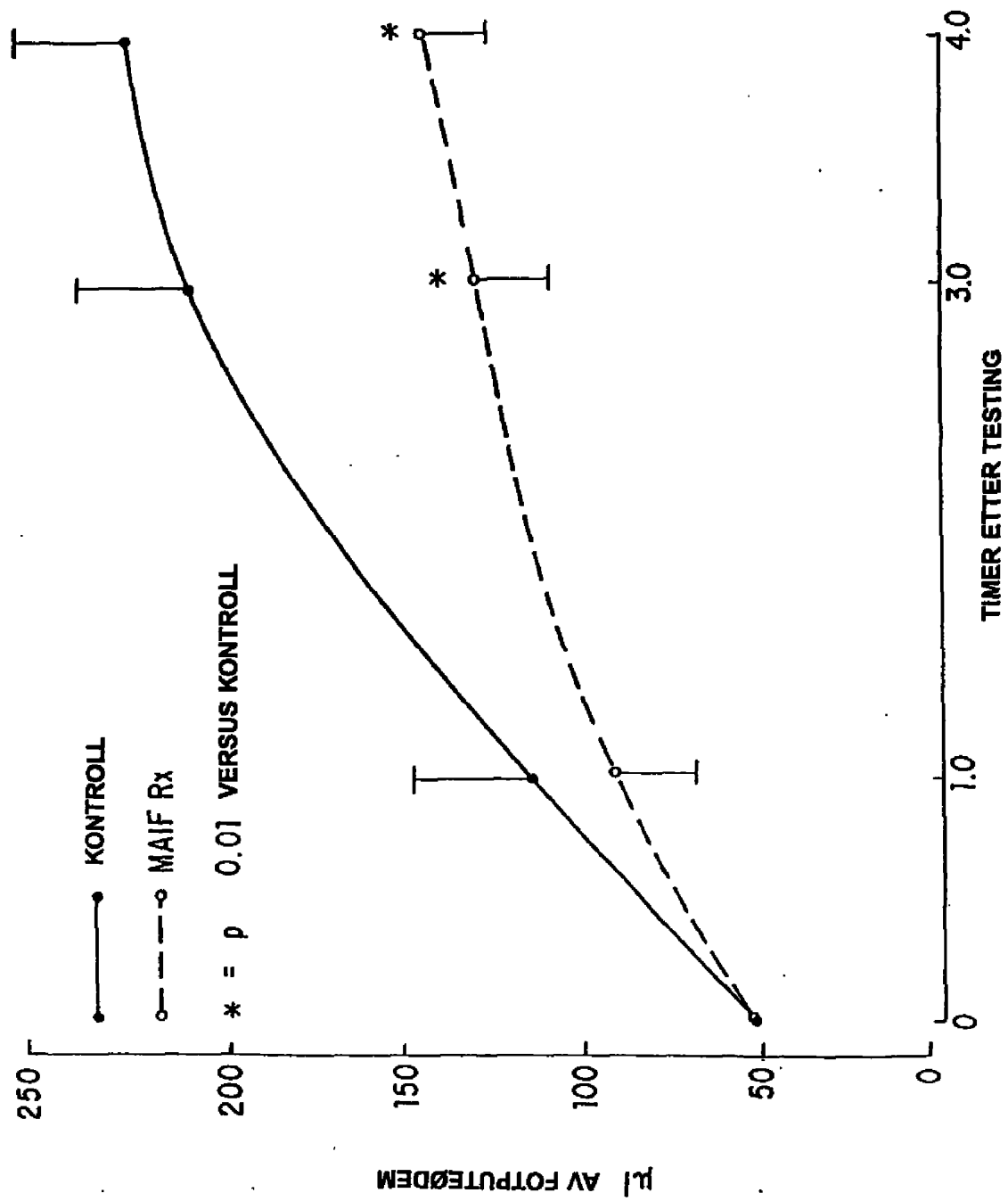


FIG. 17B

FIG. 18



19/45

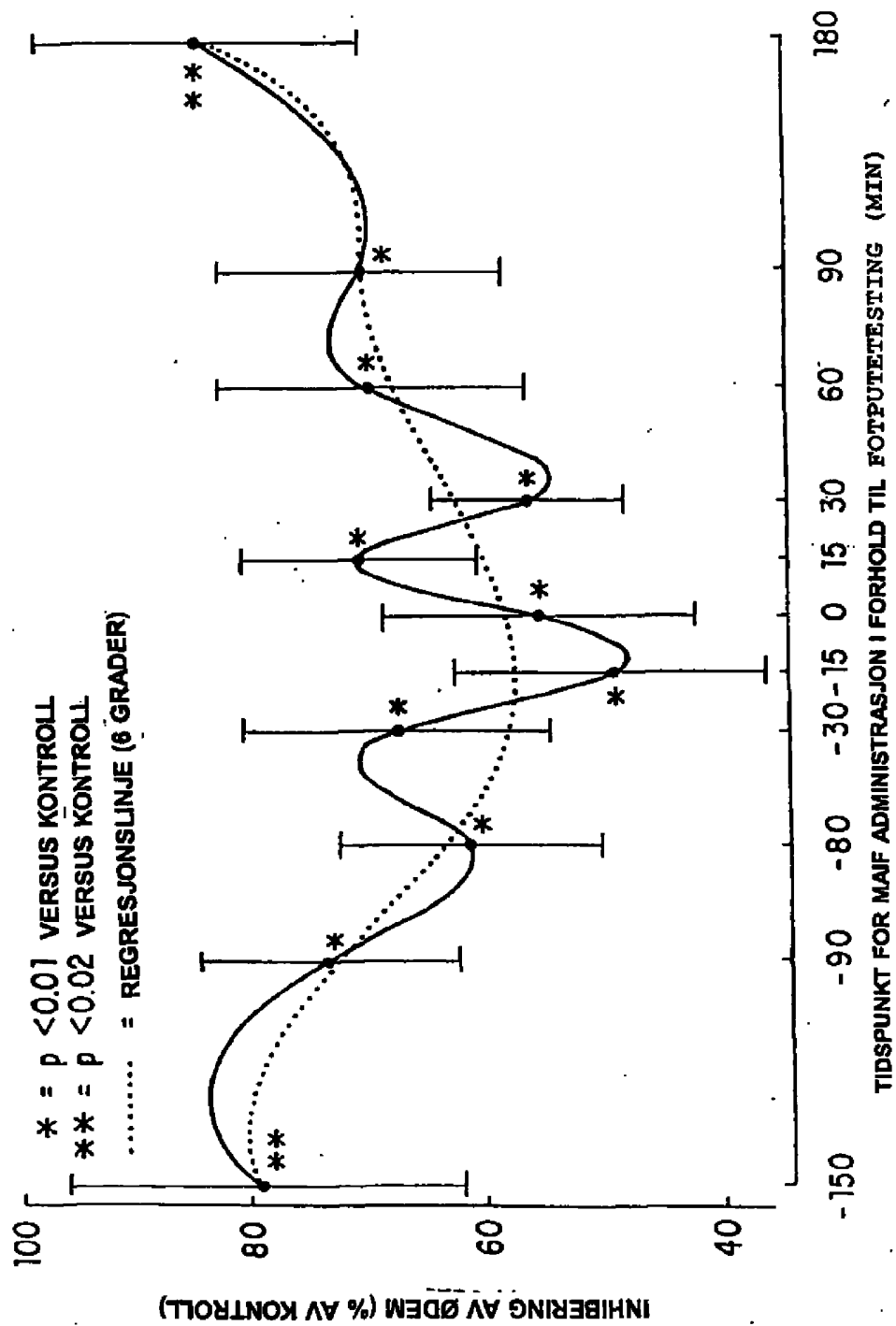


FIG. 19

20/45

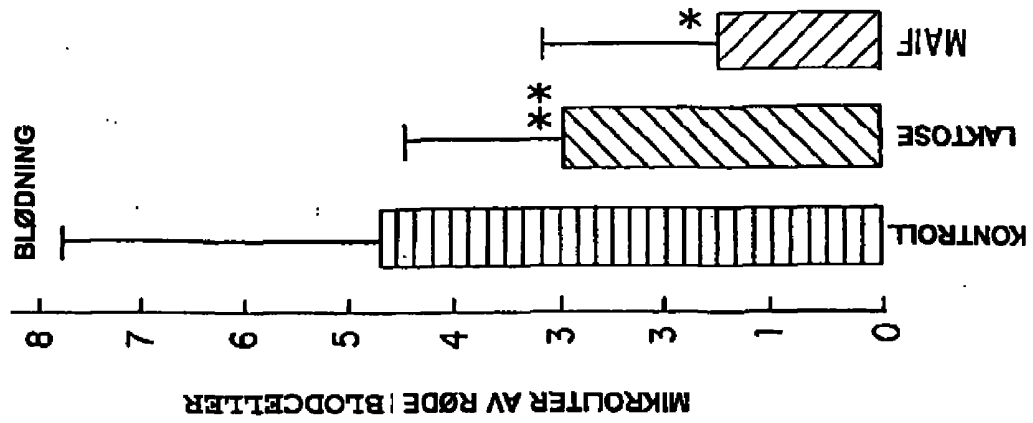


FIG. 20C

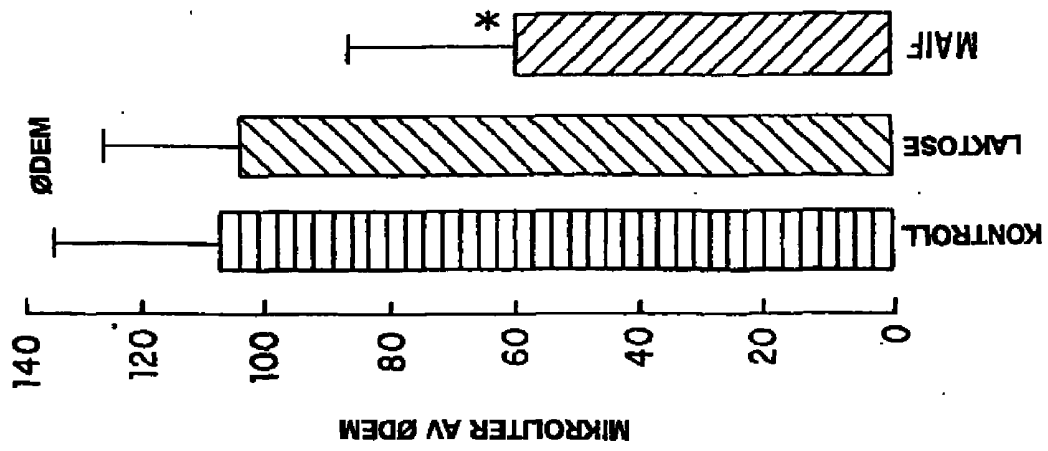


FIG. 20B

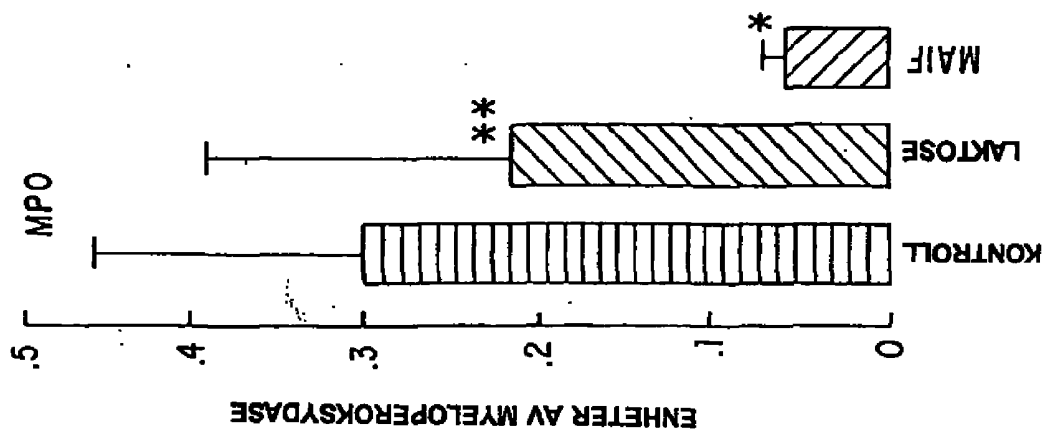


FIG. 20A

21/45

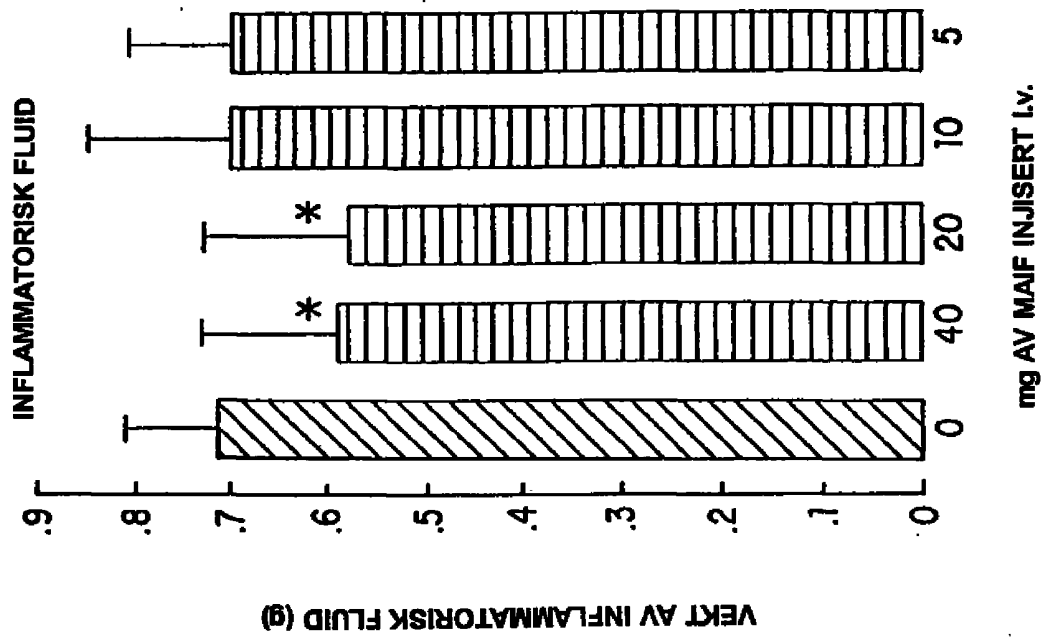


FIG. 21B

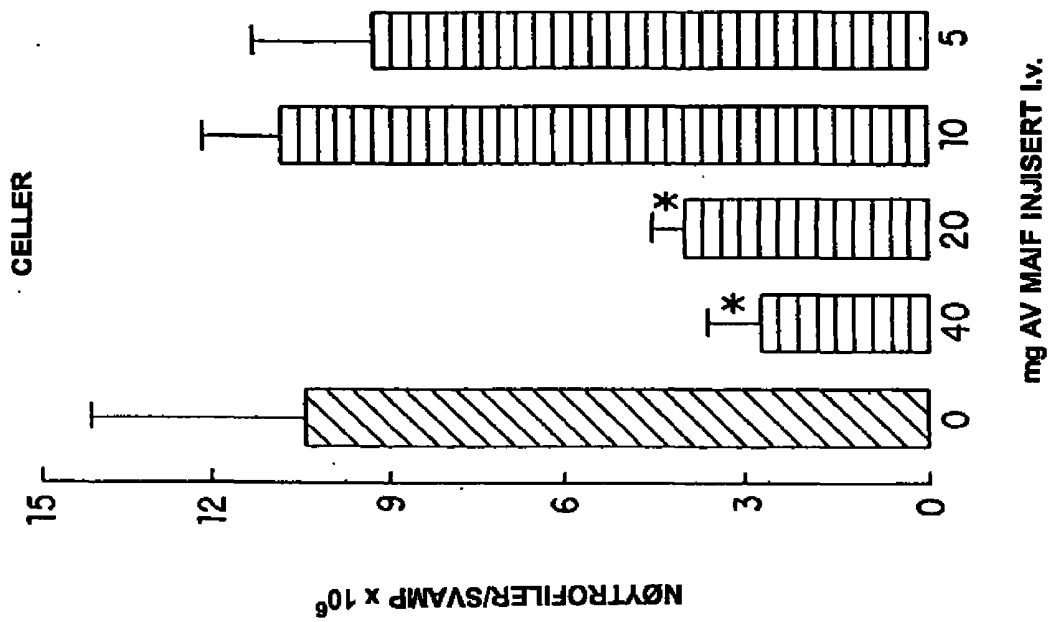


FIG. 21A

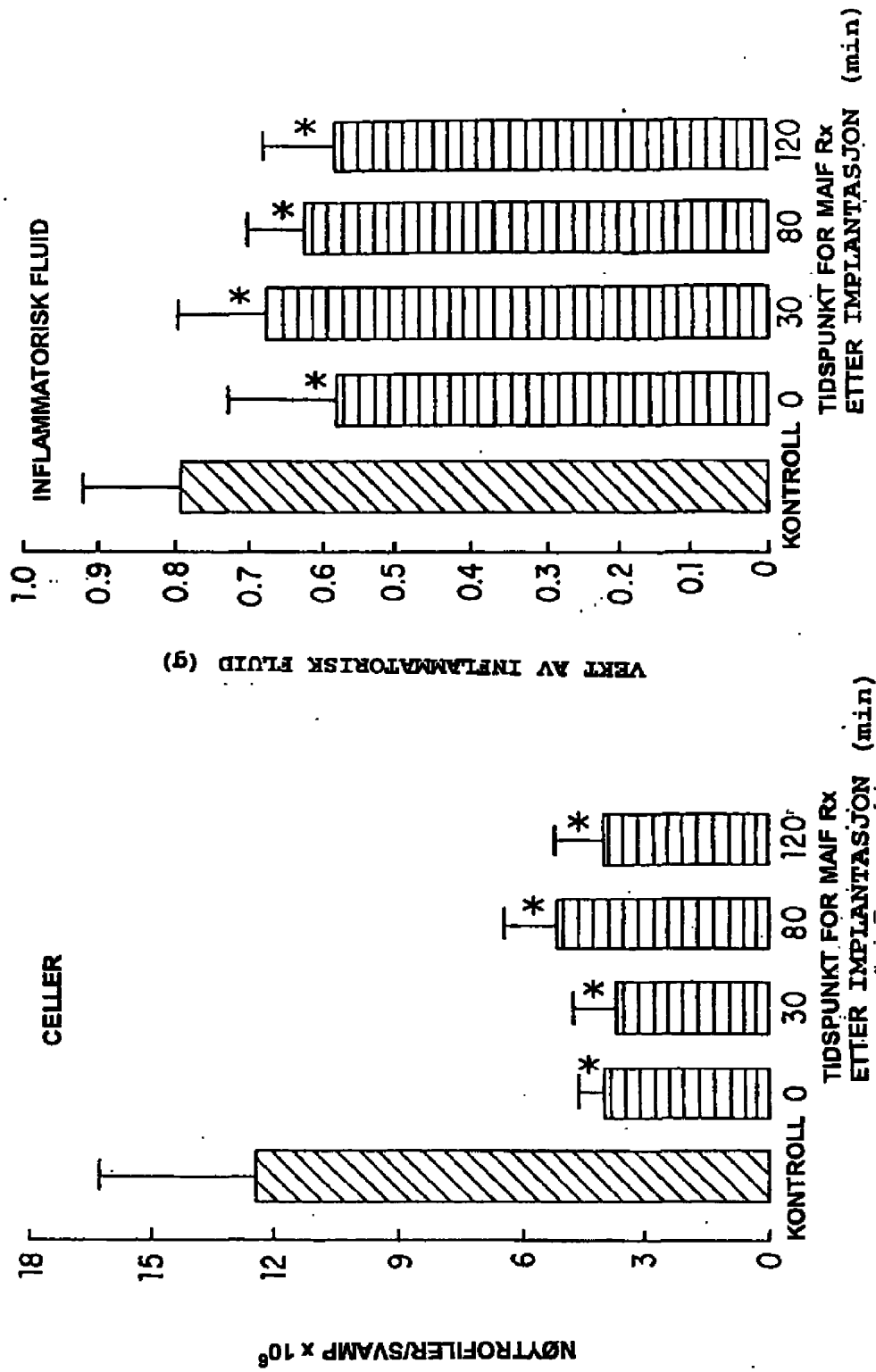


FIG. 22B

FIG. 22A



23/45

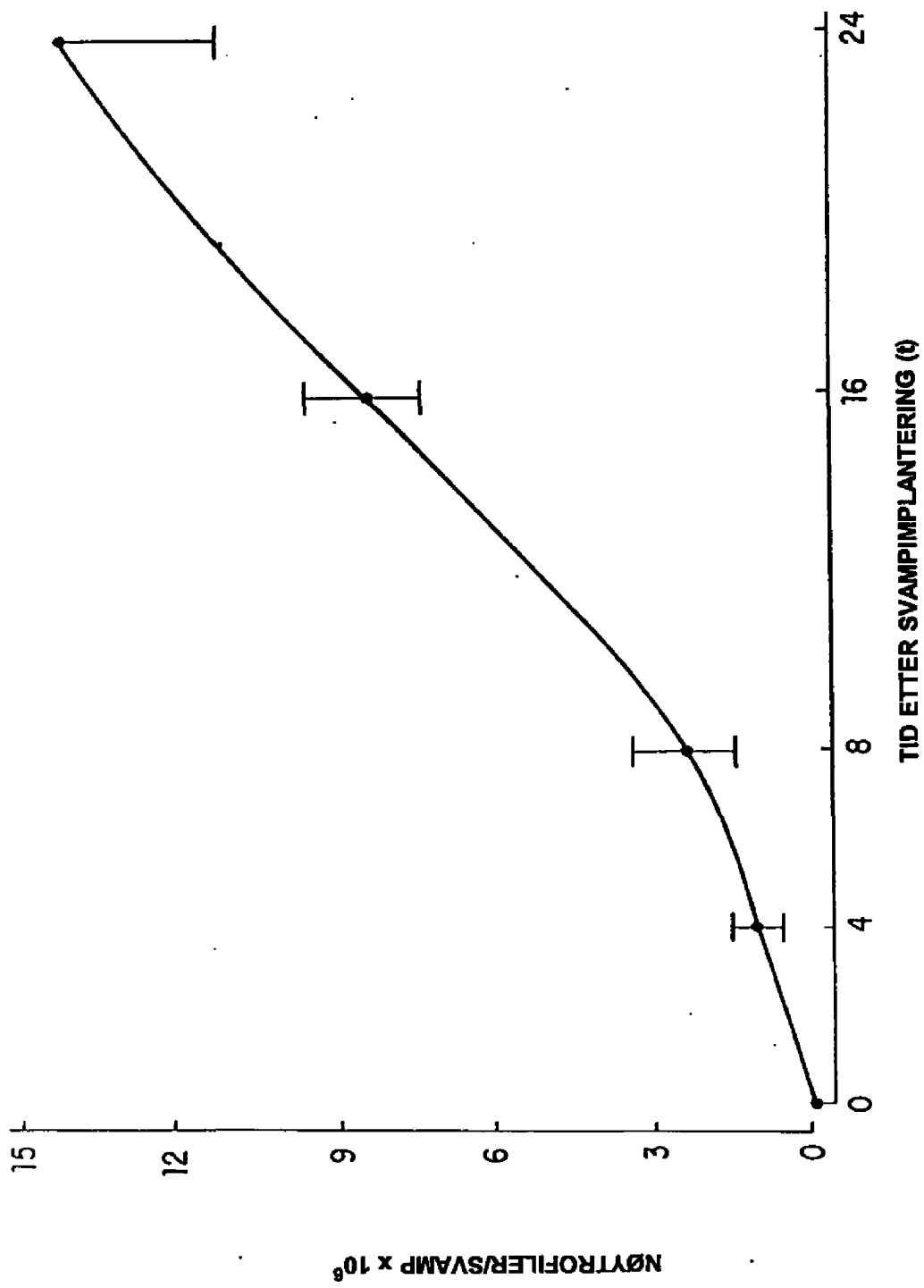


FIG. 23

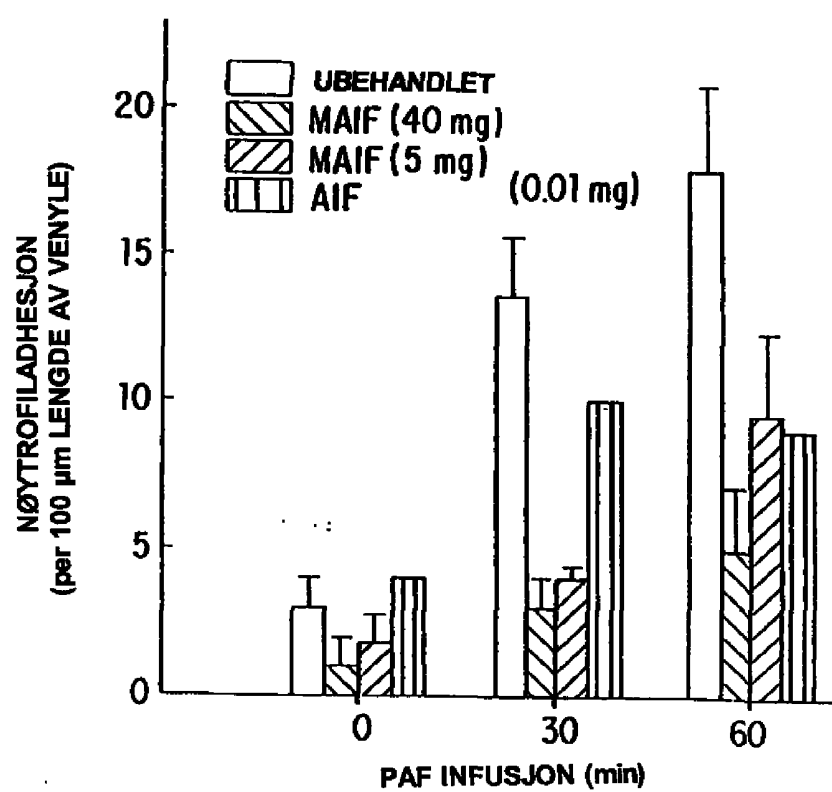


FIG. 24

25/45

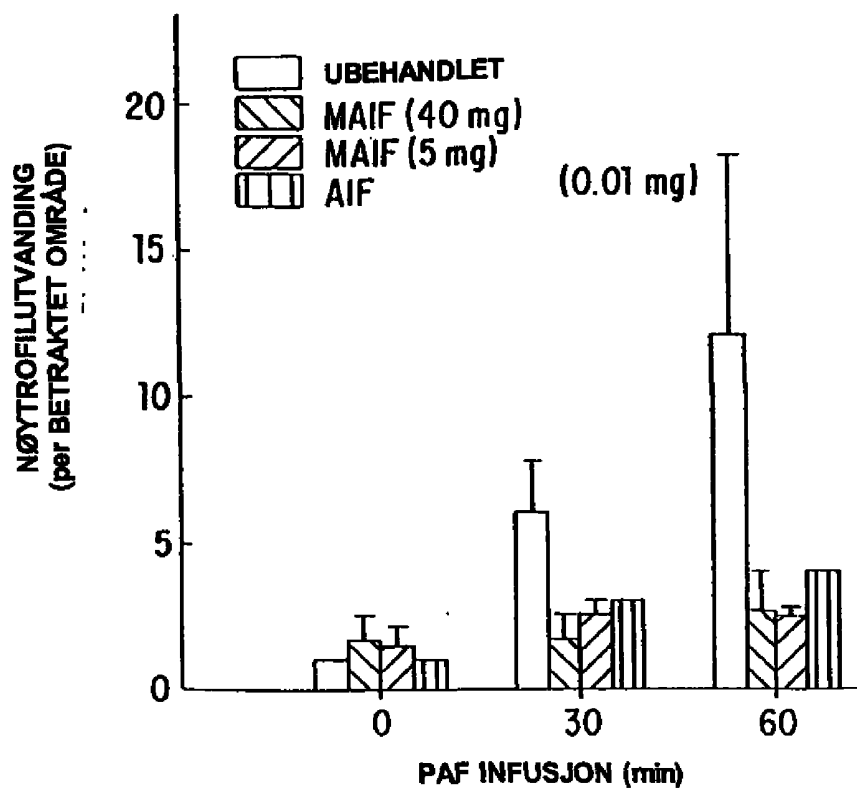


FIG. 25

26/45

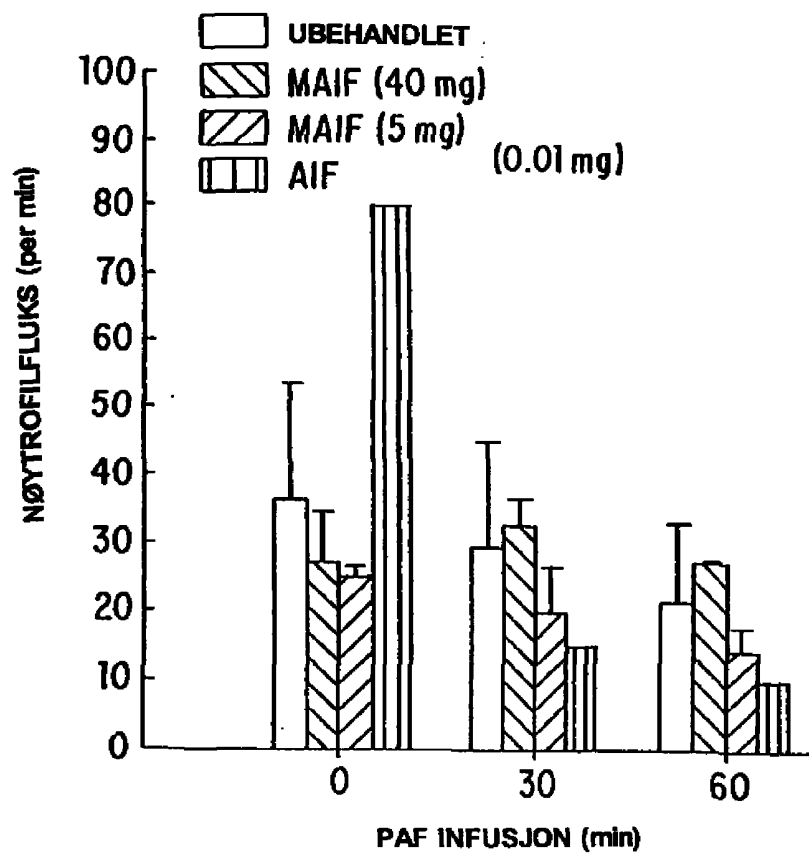


FIG. 26

27/45

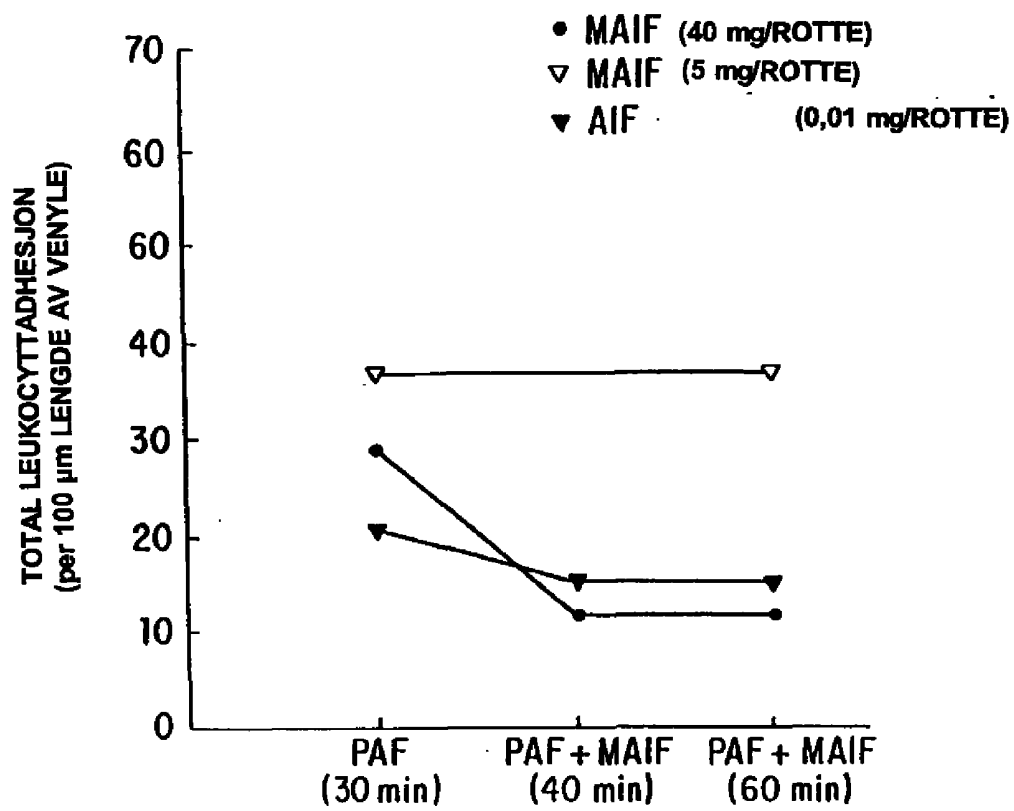


FIG. 27

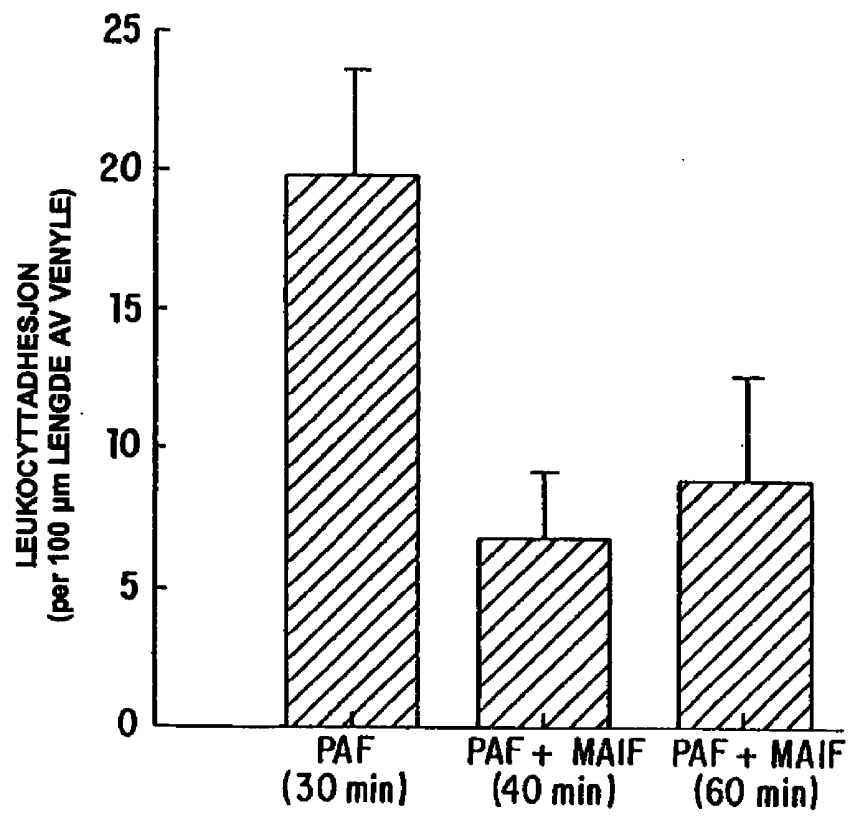


FIG. 27A

29/45

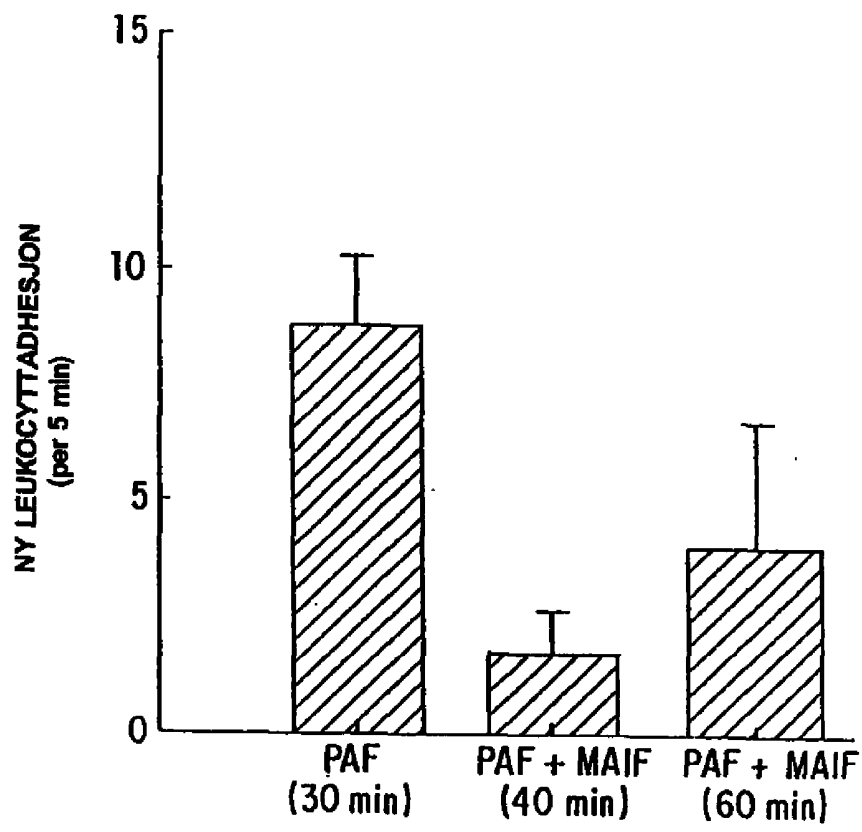


FIG.27B

30/45

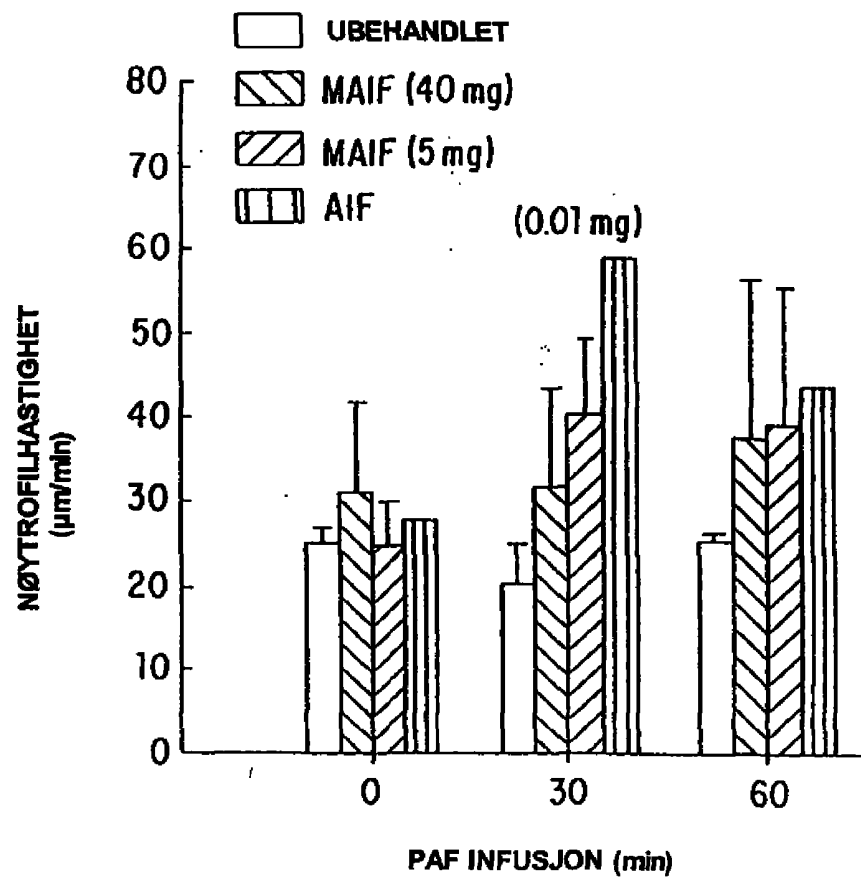


FIG. 28



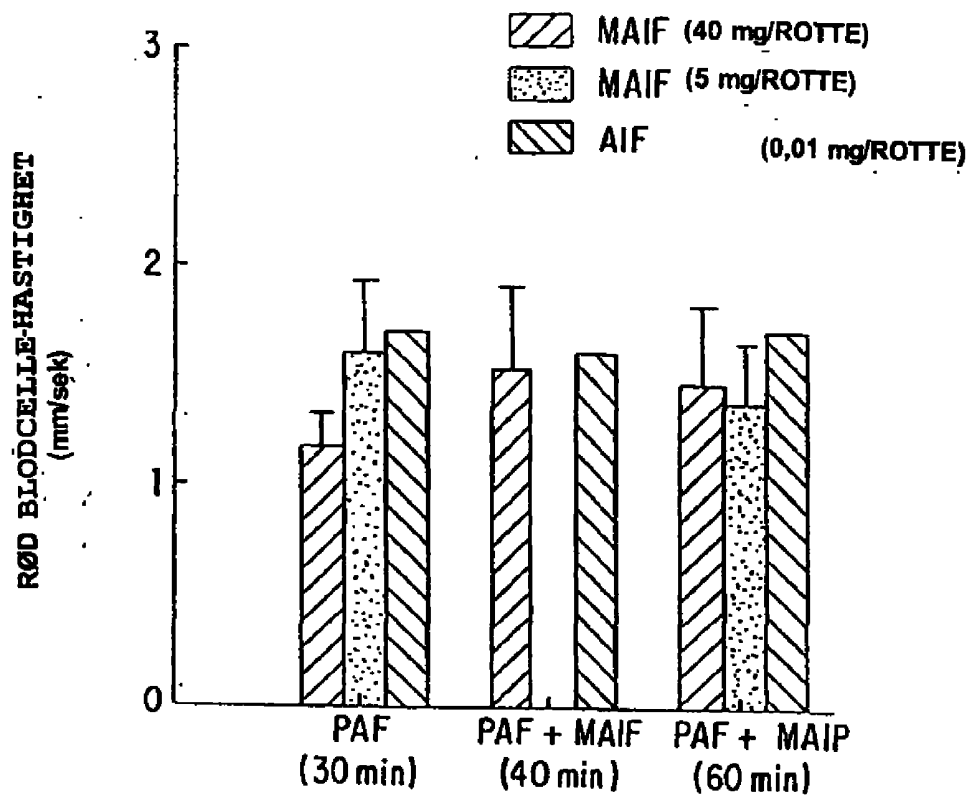


FIG. 29

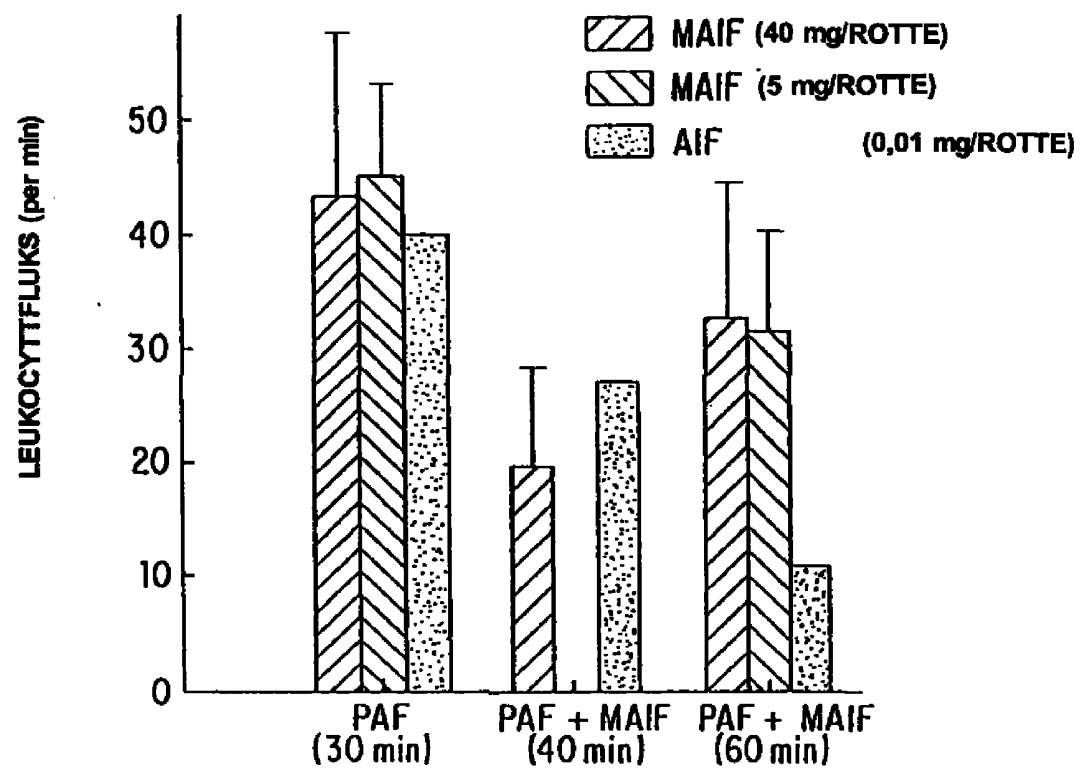
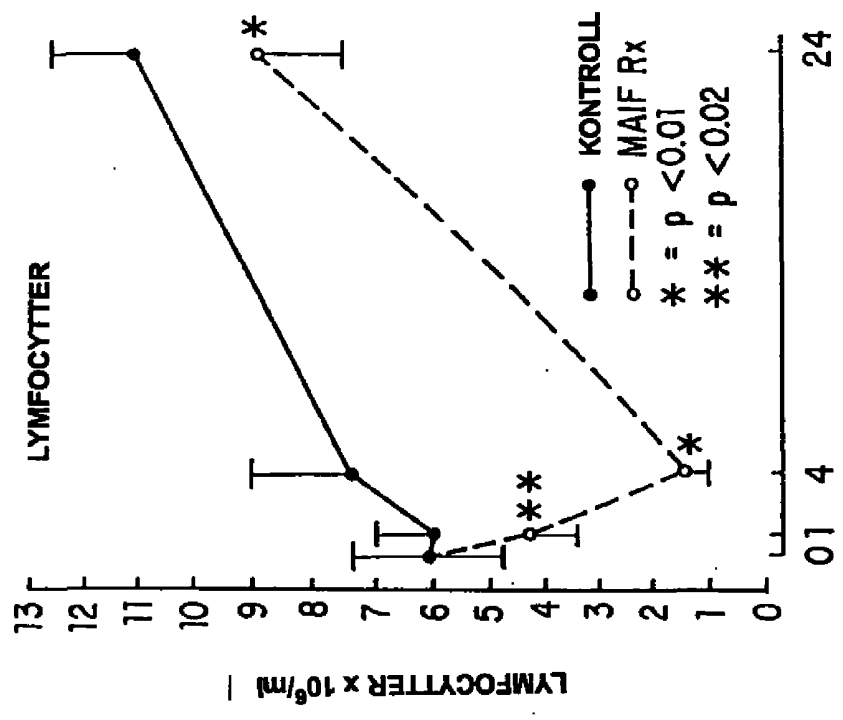
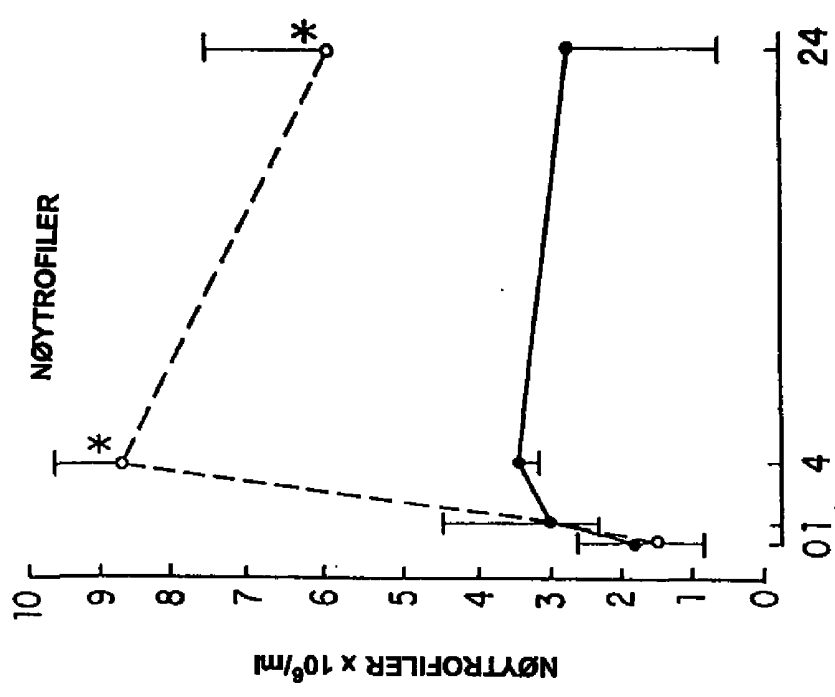


FIG. 30



TIMER ETTER MAIF Rx

FIG. 31B



TIMER ETTER MAIF Rx

FIG. 31A

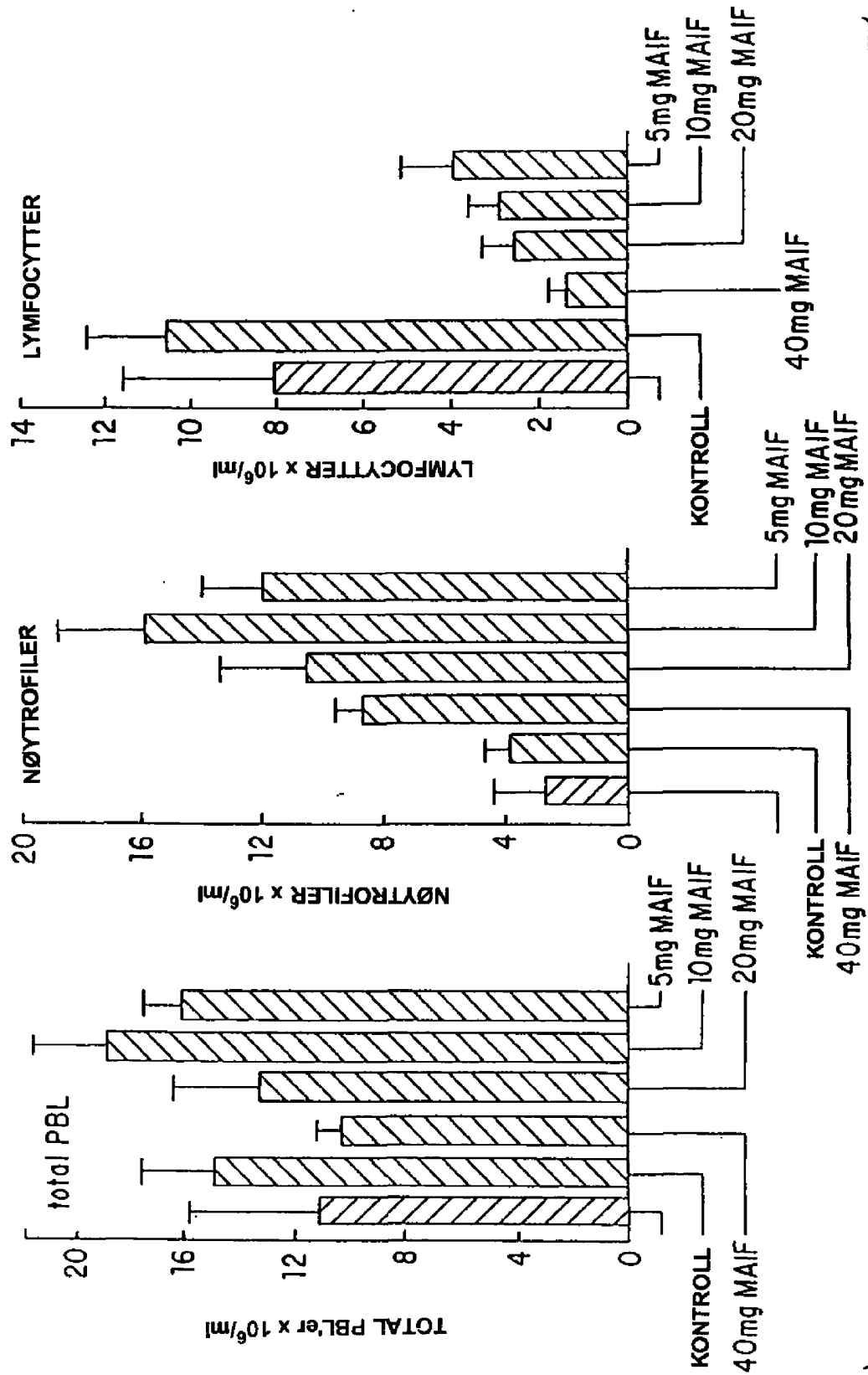


FIG. 32

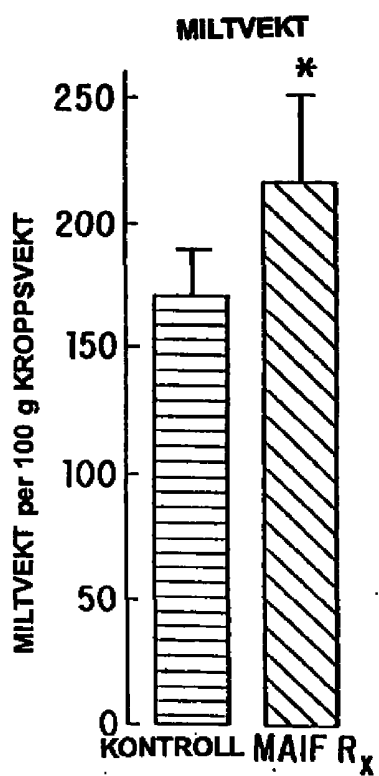
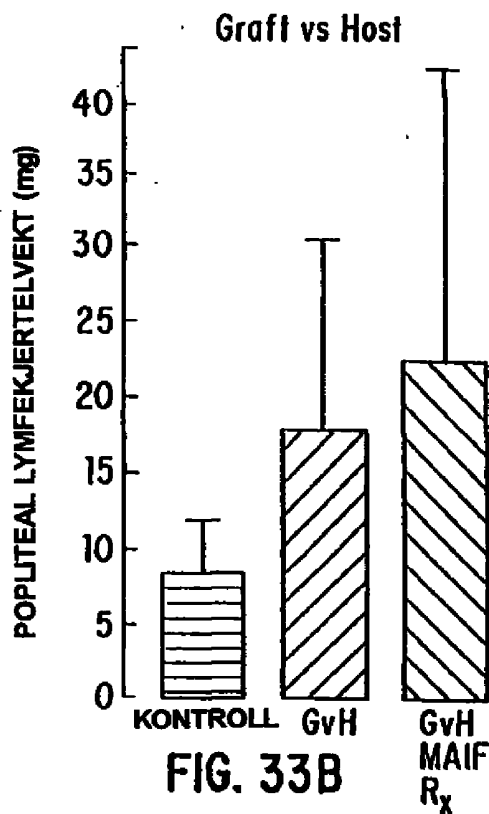
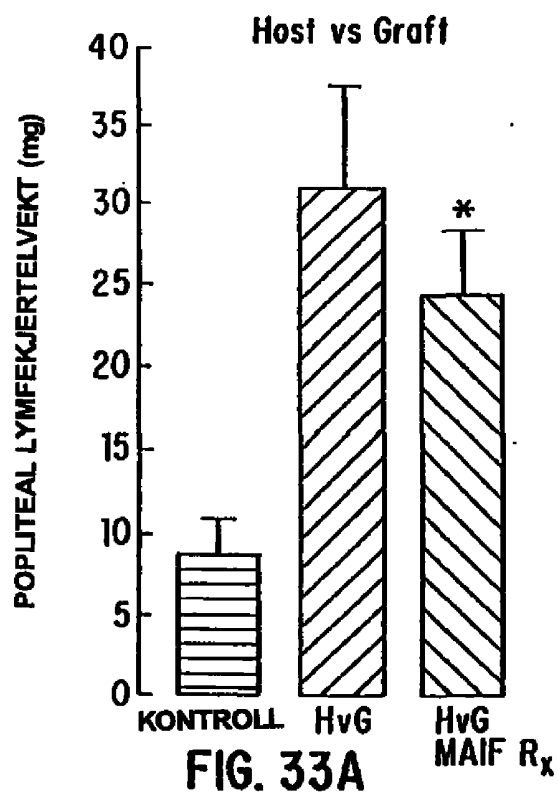


FIG. 33C

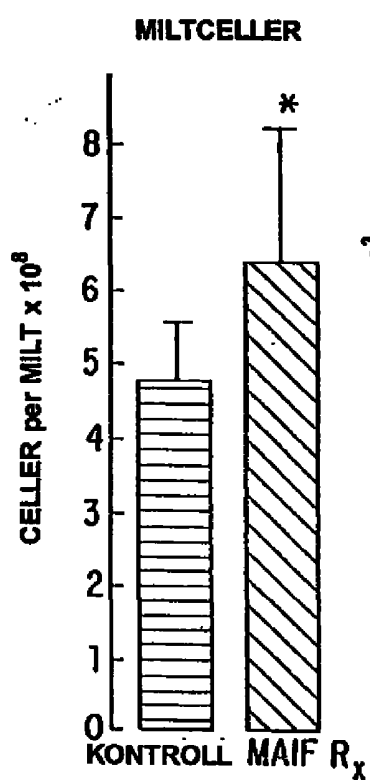


FIG. 33D

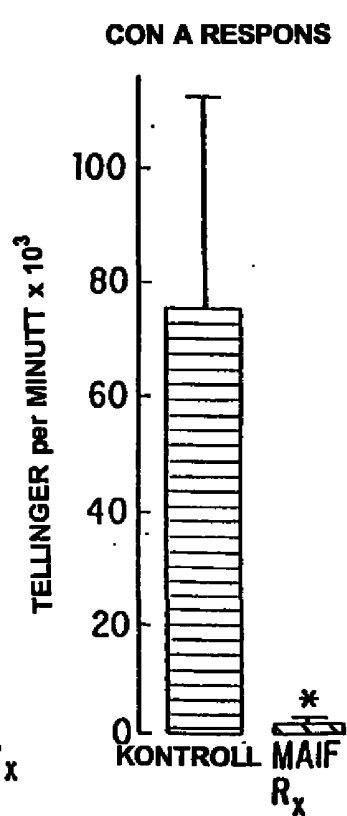


FIG. 33E



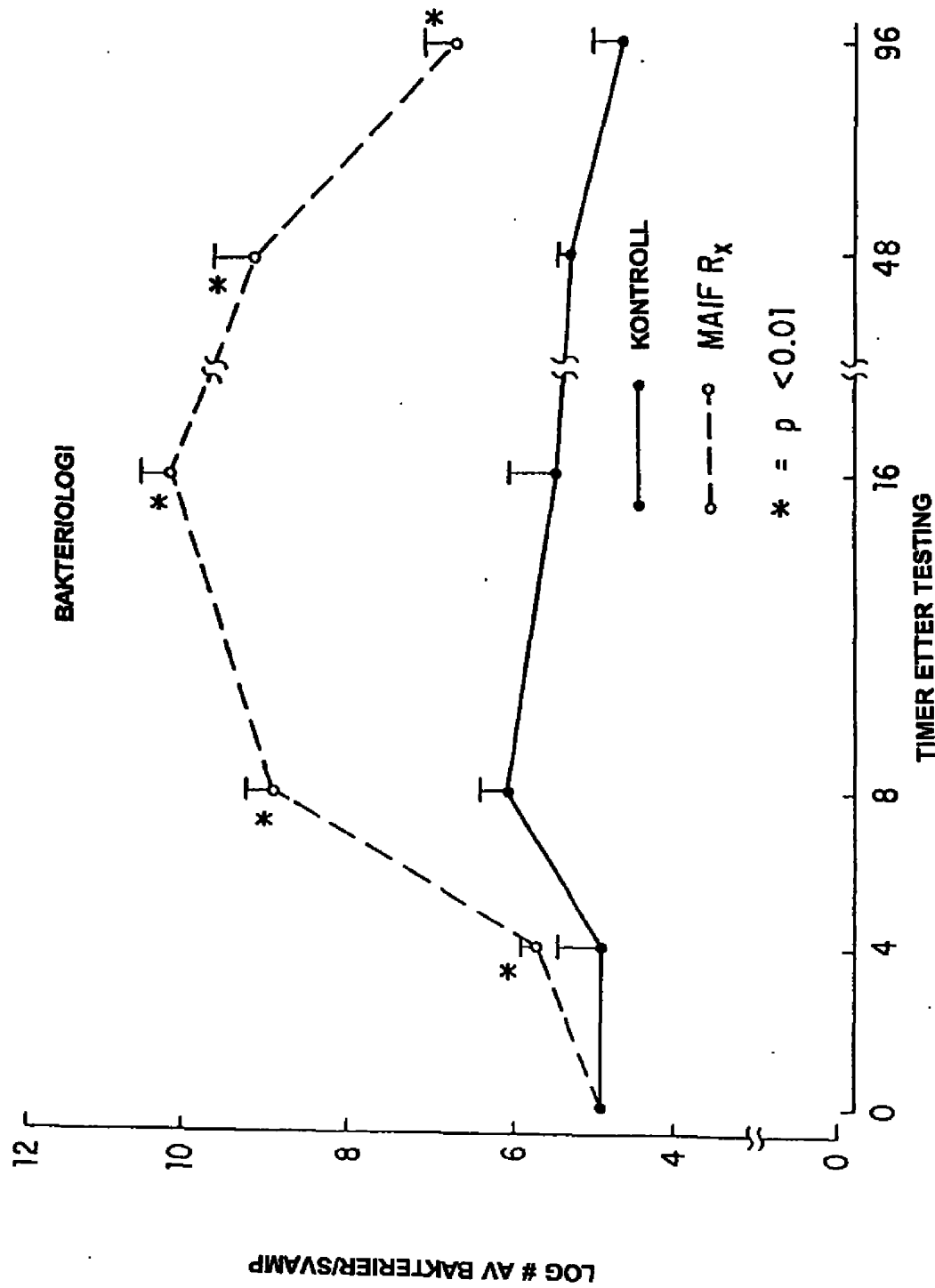
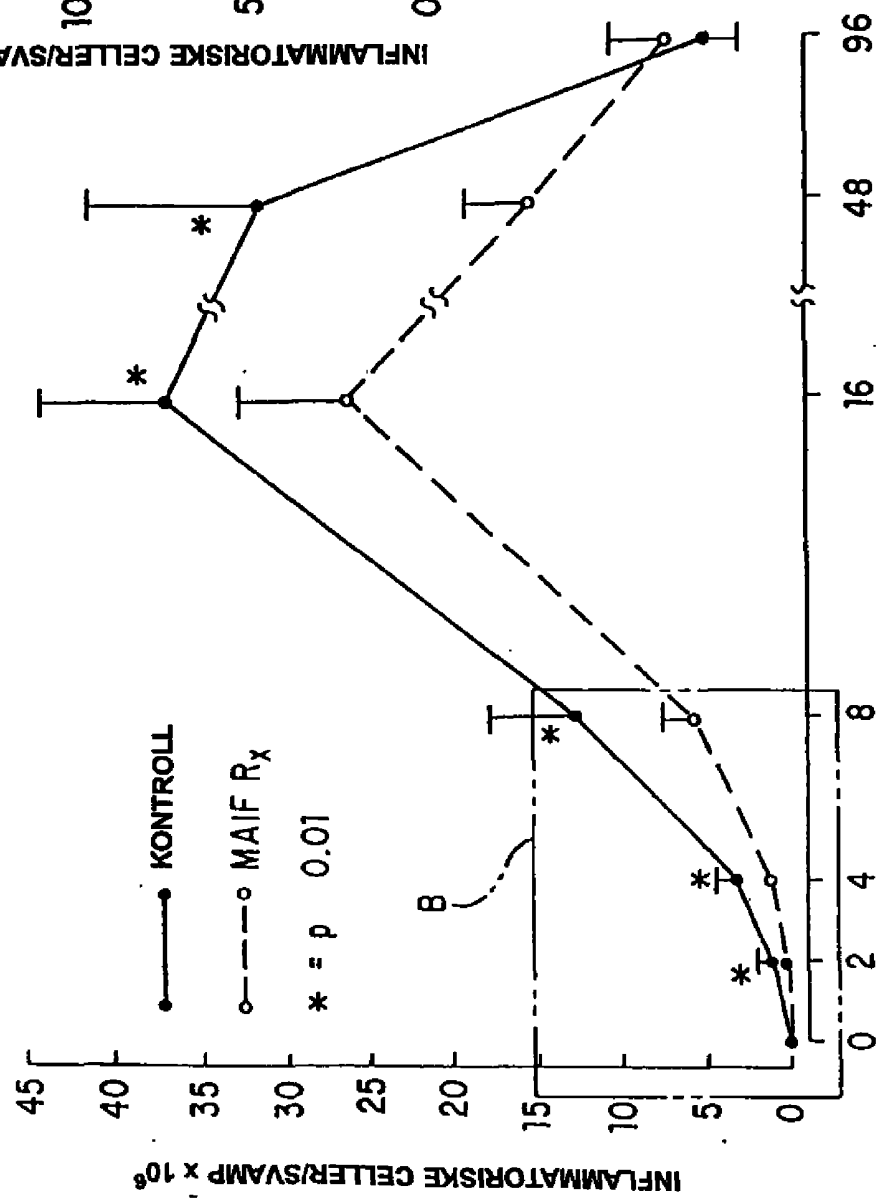
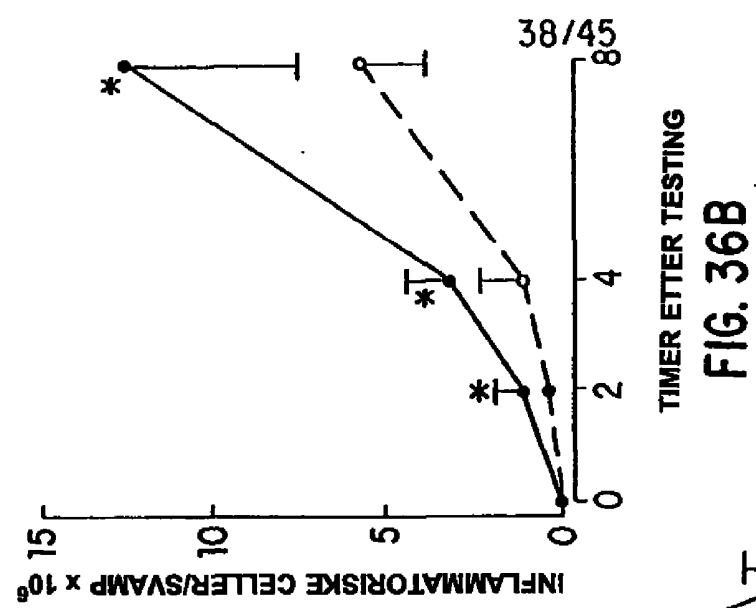


FIG. 35

INFLAMMATORISK CELLEAKKUMULERING



TIMER ETTER TESTING  
FIG. 36A



TIMER ETTER TESTING  
FIG. 36B



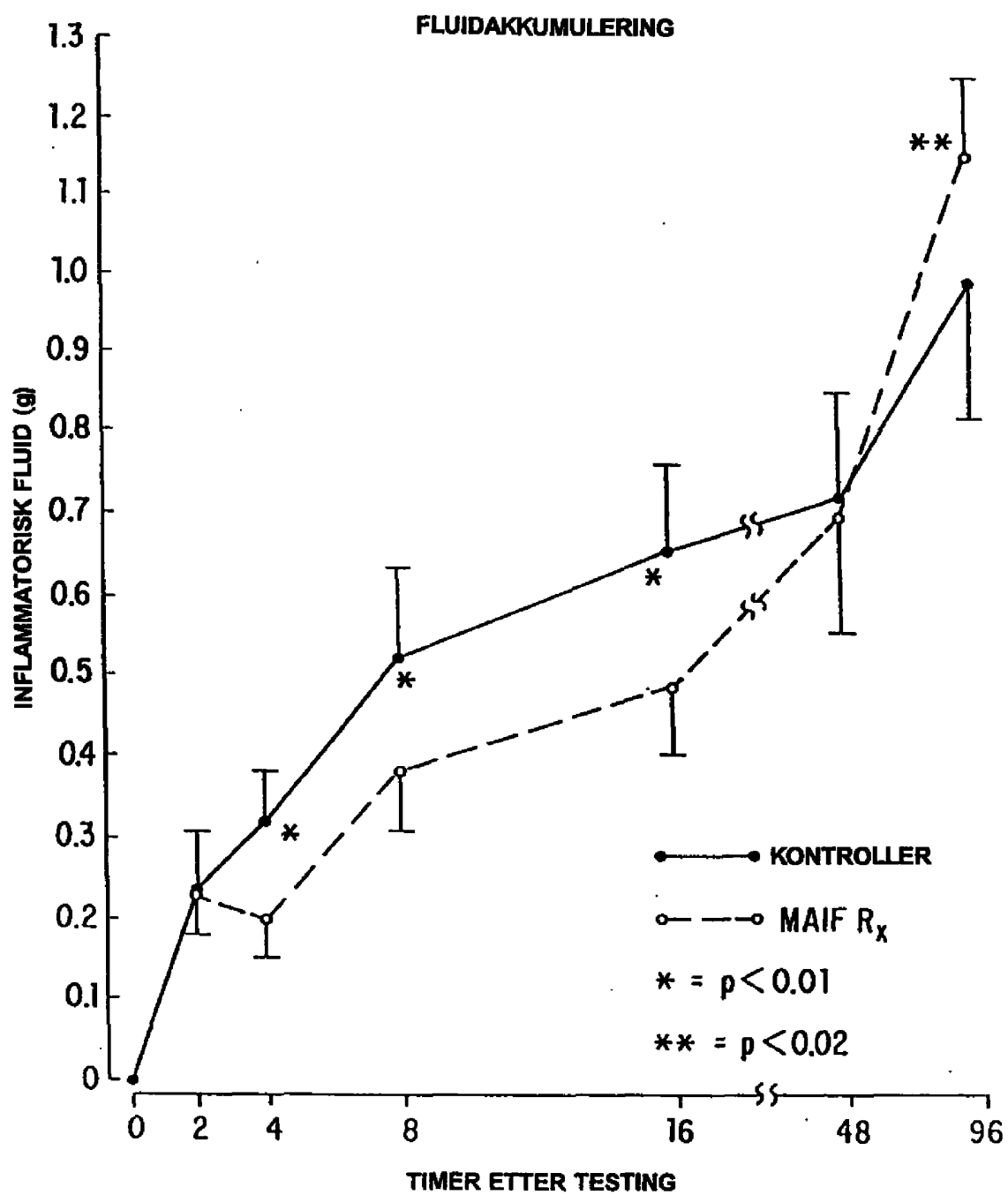


FIG. 37

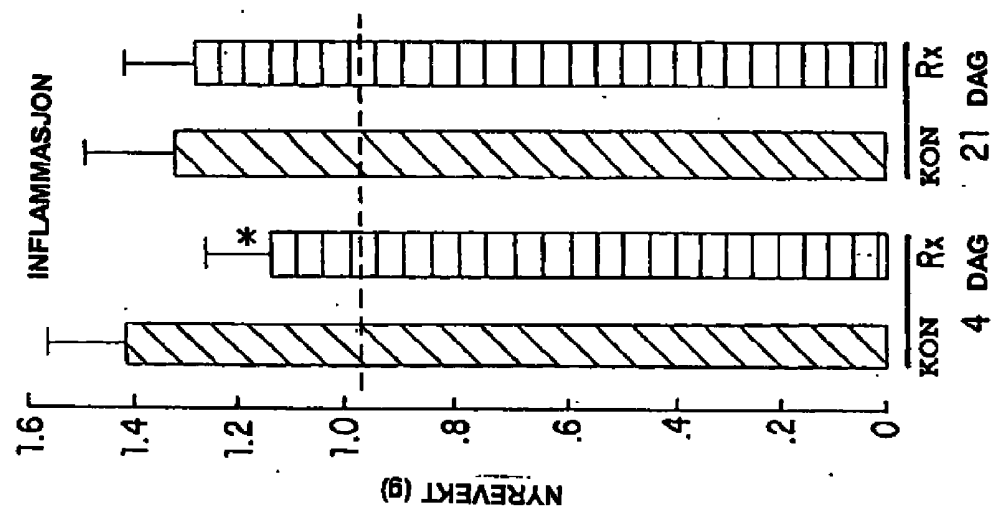


FIG. 38A

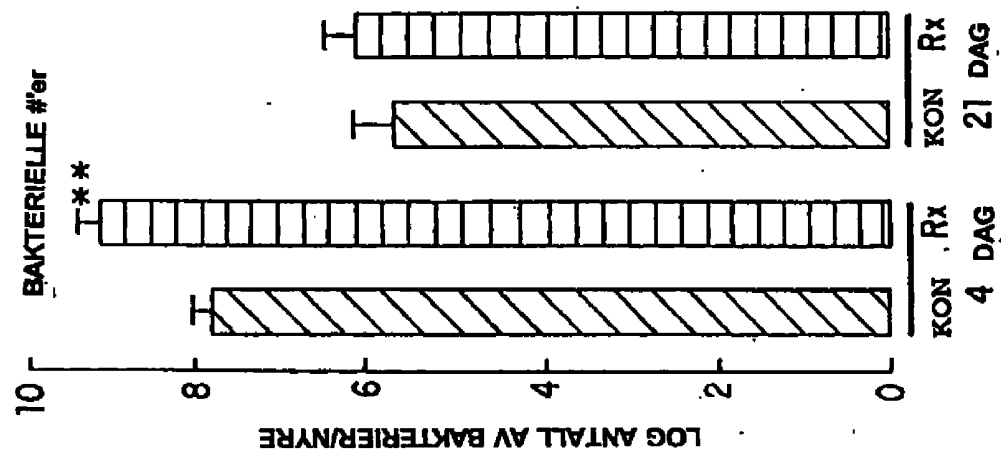


FIG. 38B

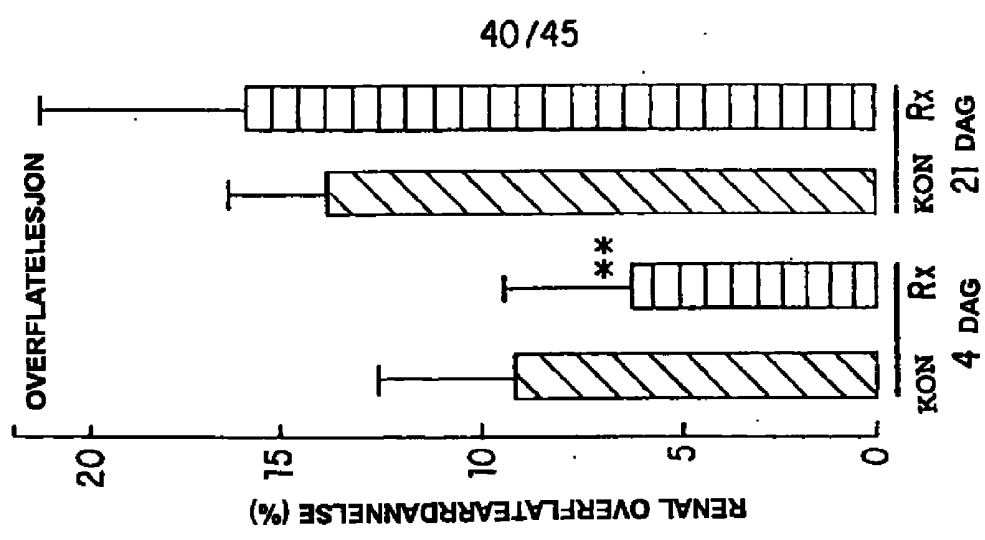


FIG. 38C

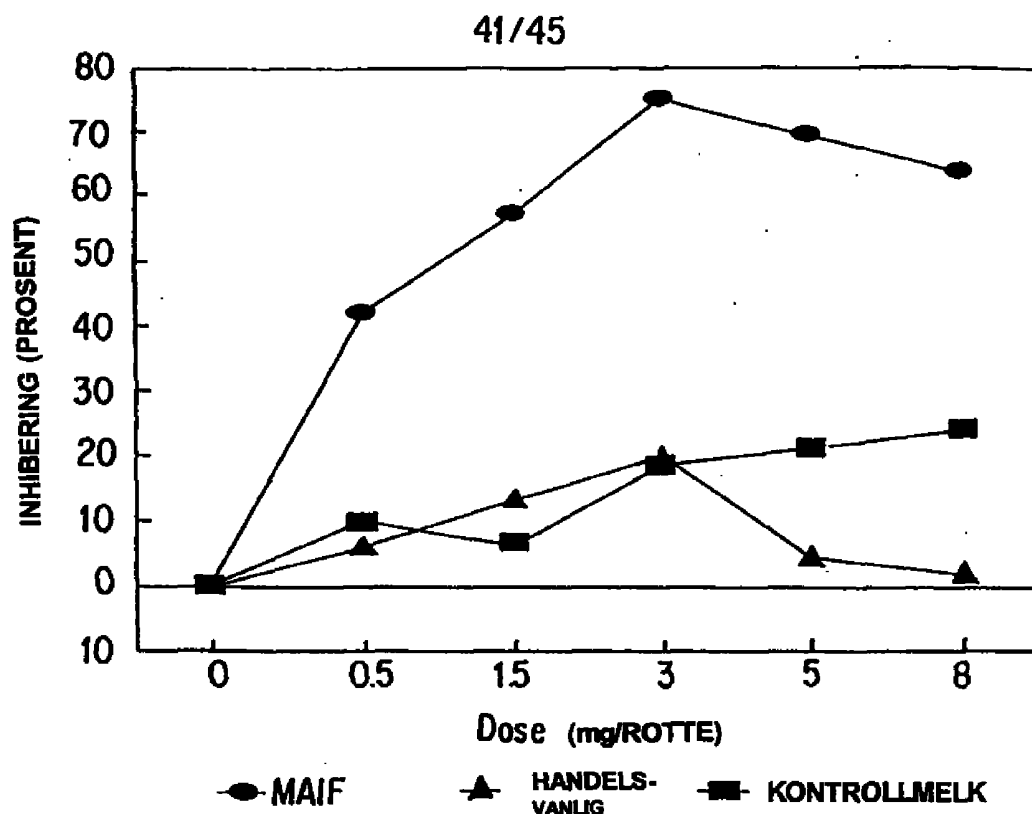


FIG.39

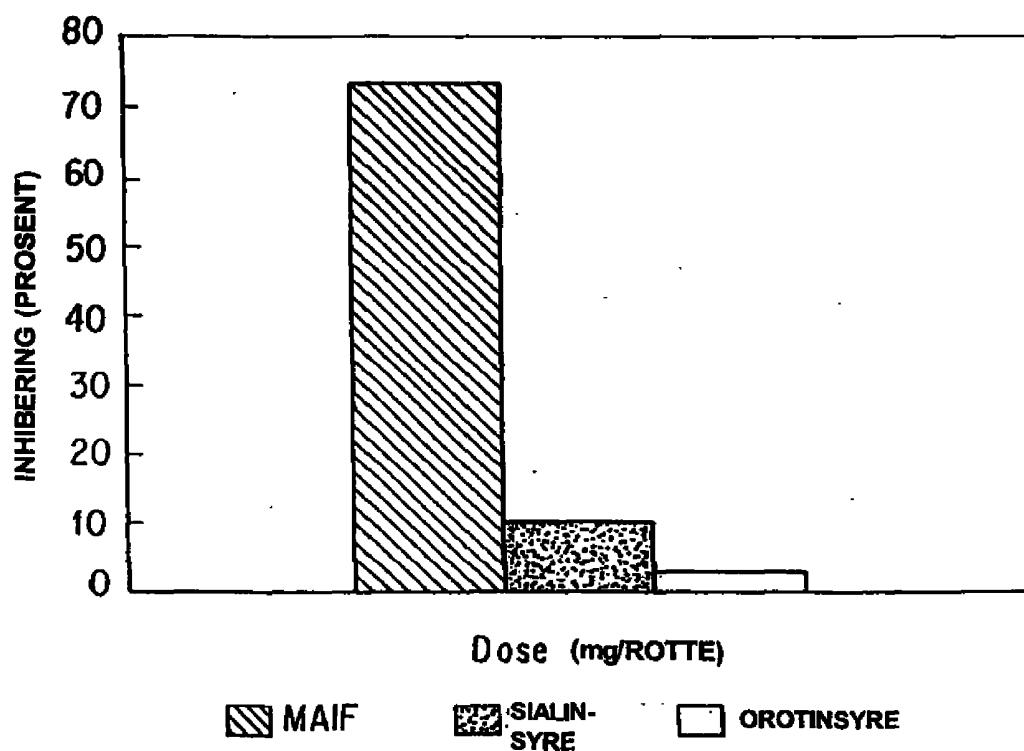


FIG. 40

42/45

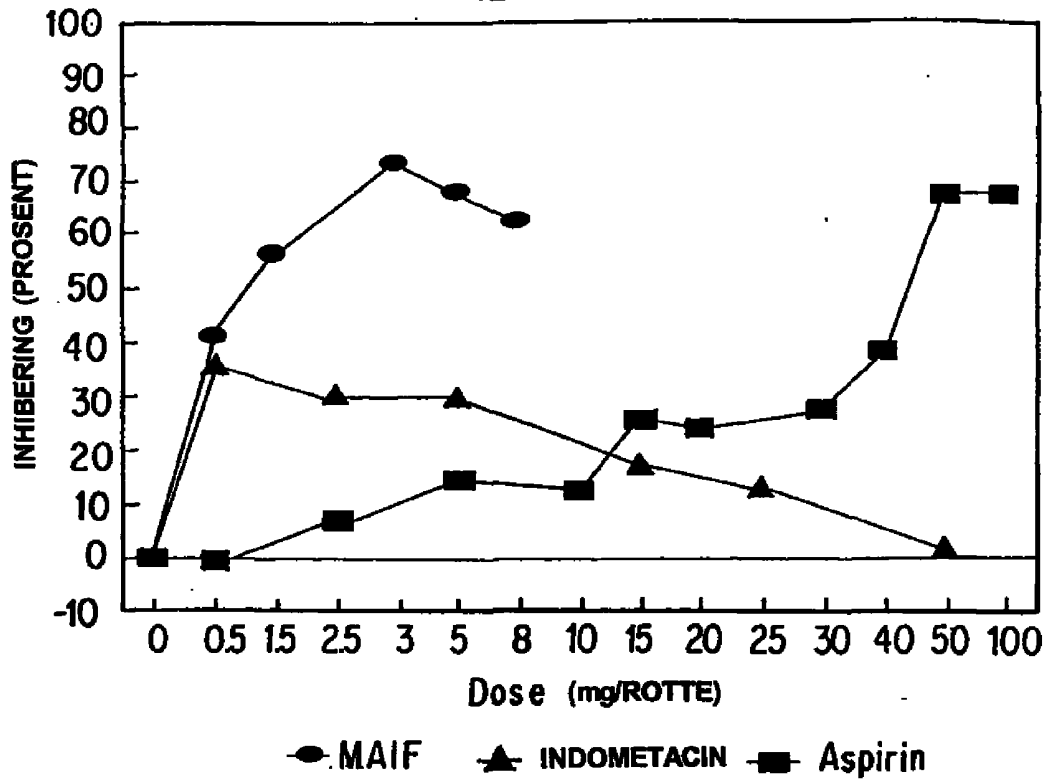


FIG. 41

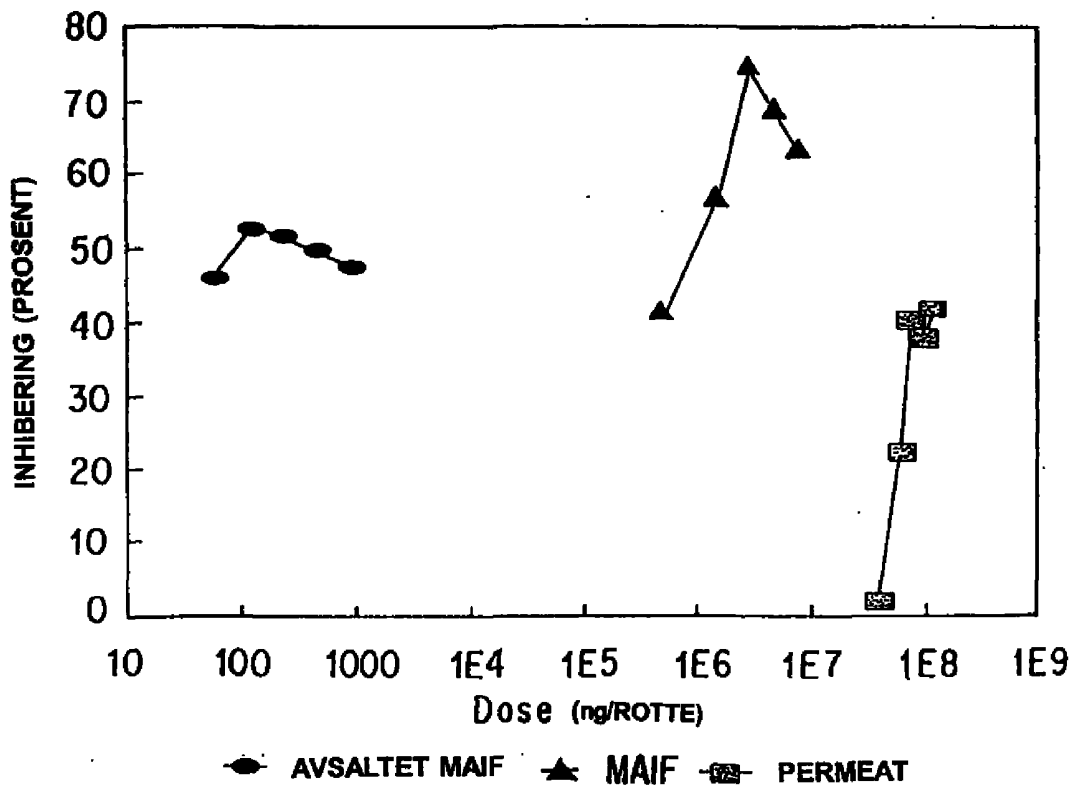


FIG. 43

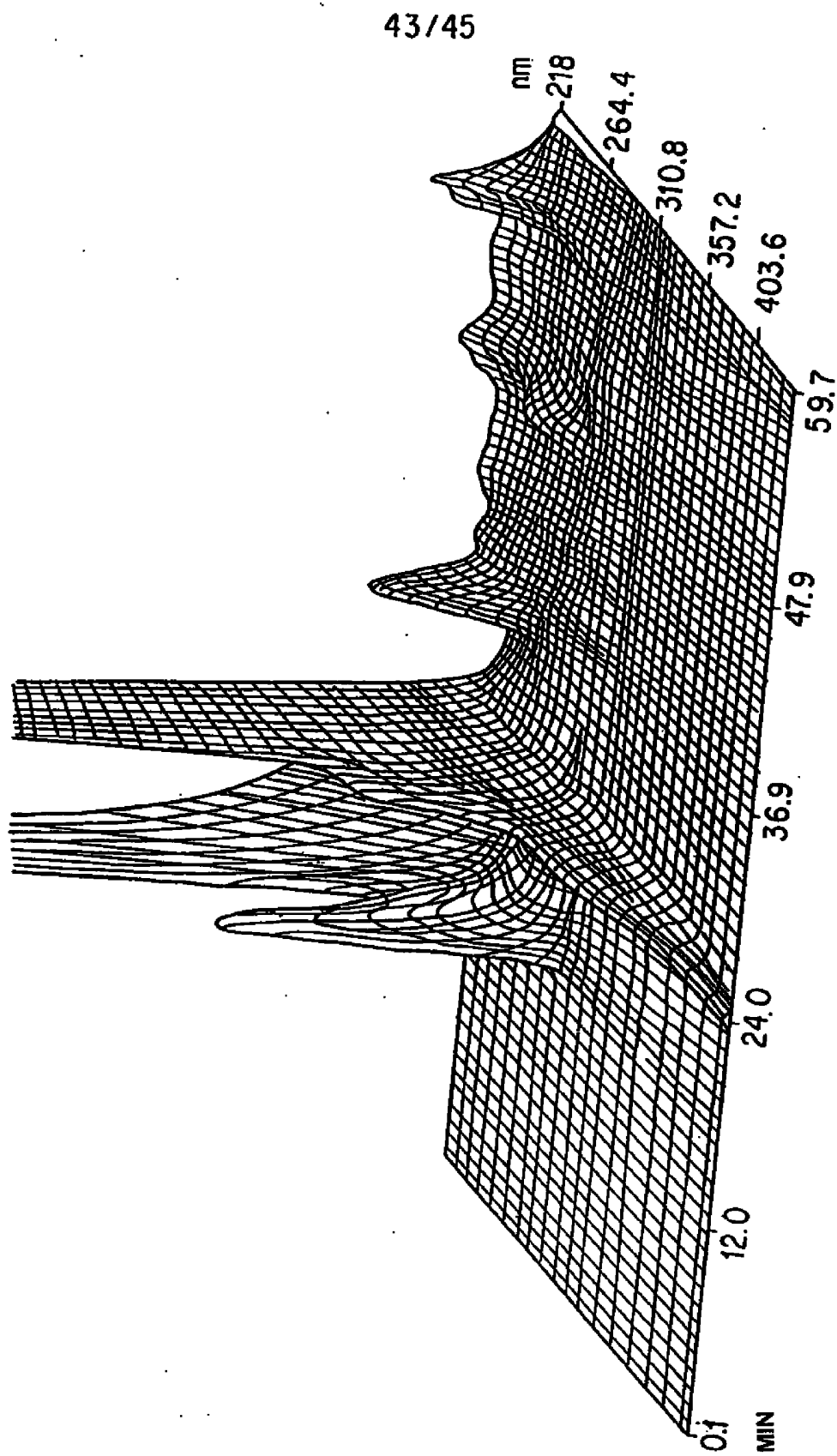


FIG. 42

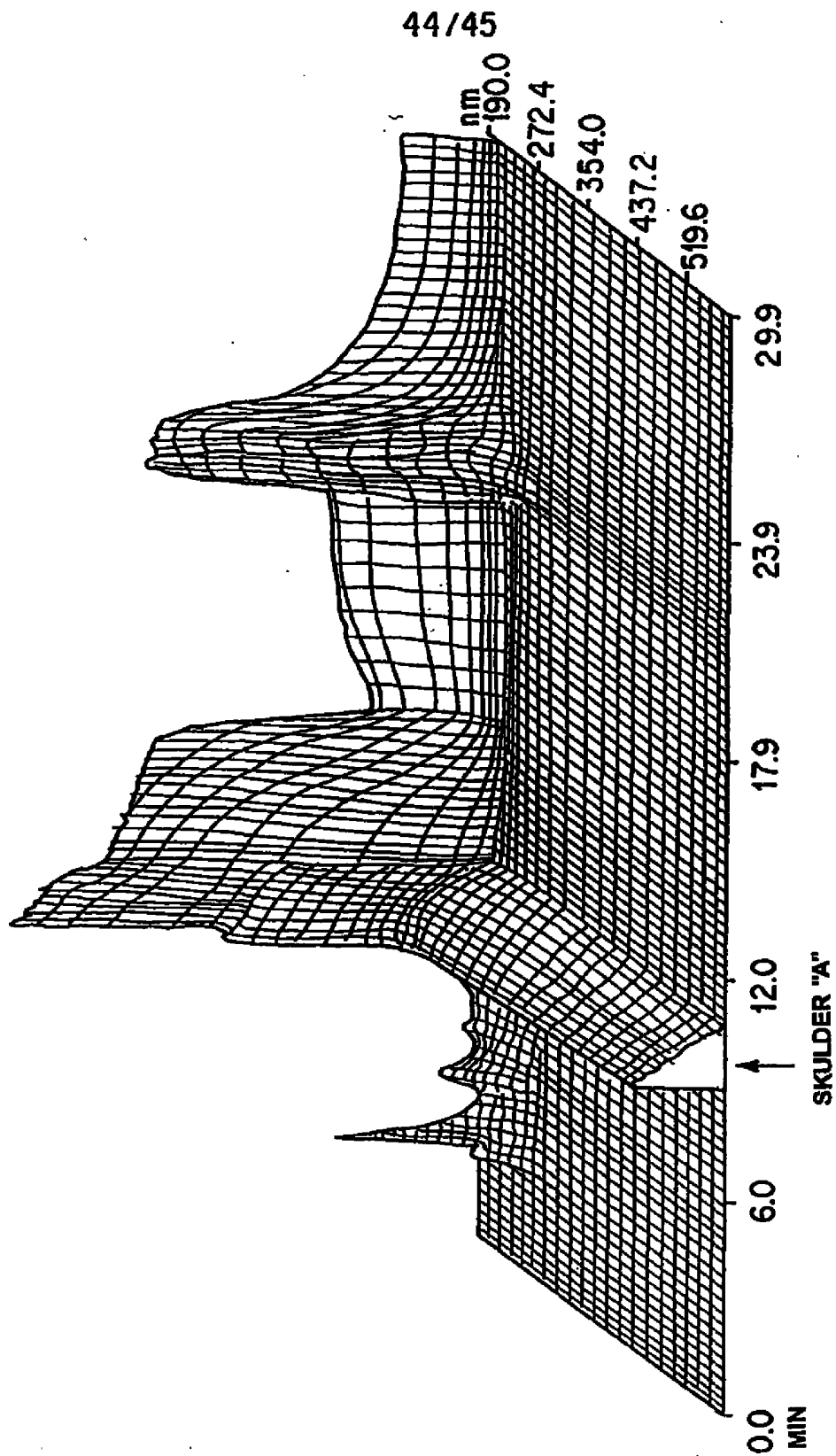


FIG. 44A

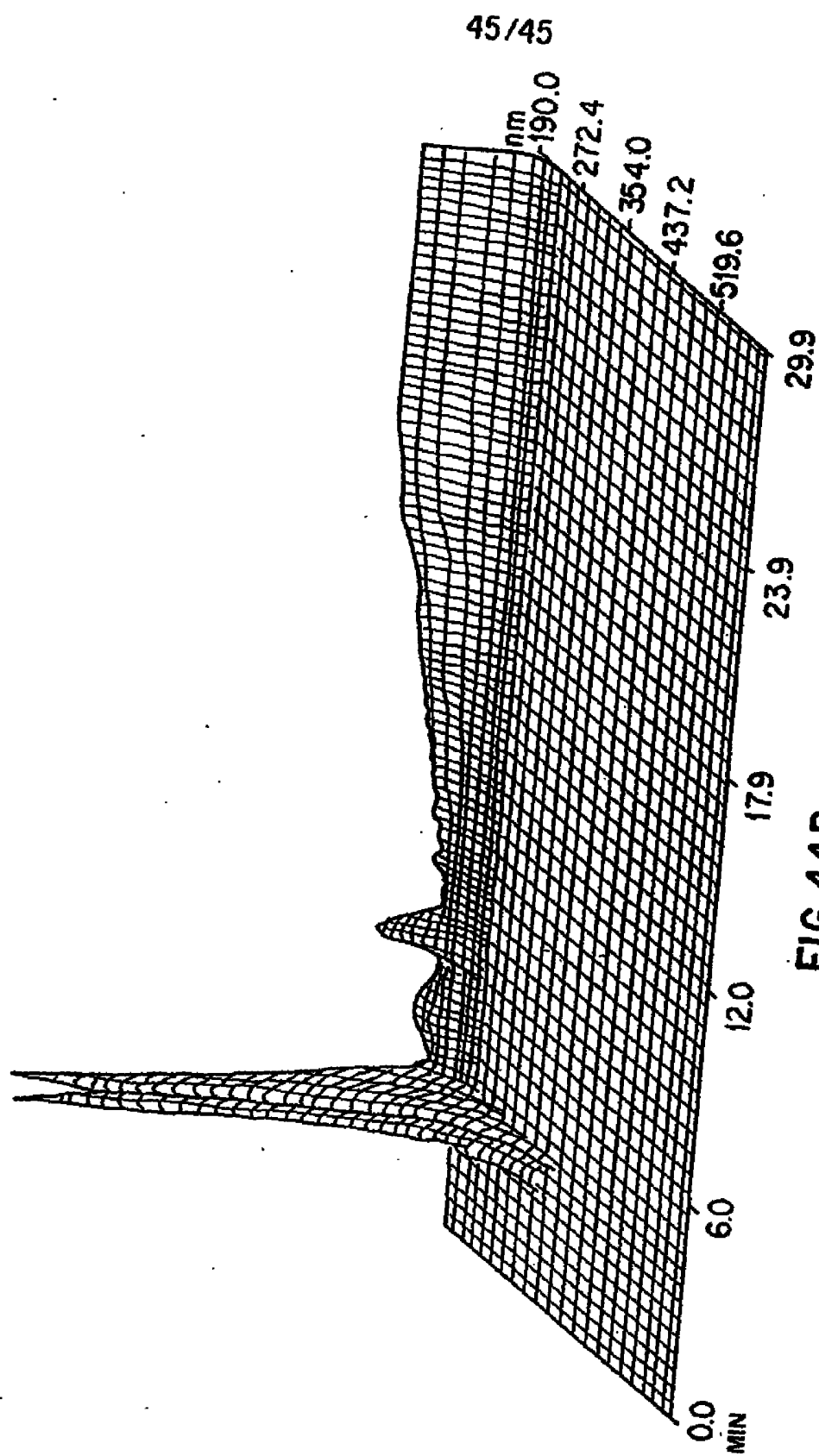


FIG.44B