



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT  
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

① CH 666 285 A5

⑤ Int. Cl. 4: C 12 Q 1/70  
G 01 N 33/68

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein  
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

// (C 12 Q 1/70, C 12 R 1:91)

⑫ PATENTSCHRIFT A5

⑲ Gesuchsnummer:	2898/85	⑦③ Inhaber: Damon Biotech, Inc., Needham Heights/MA (US)
⑳ Anmeldungsdatum:	05.07.1985	
⑳ Priorität(en):	06.07.1984 US 628612	⑦② Erfinder: Pang, Roy H. L., Medway/MA (US)
㉔ Patent erteilt:	15.07.1988	
④⑤ Patentschrift veröffentlicht:	15.07.1988	⑦④ Vertreter: A. Braun, Braun, Héritier, Eschmann AG, Patentanwälte, Basel

⑤④ Verfahren zur Bestimmung von Interferon Epsilon in einer Probe.

⑤⑦ Es werden Verfahren zur quantitativen und qualitativen Bestimmung von Interferon Epsilon, einer neuen Substanz mit selektiver antiviraler Aktivität in Bezug auf Epithelzellen, in einer Probe beschrieben. Das qualitative Verfahren umfasst das Inkubieren eines Präparates, von dem man annimmt, dass es Interferon Epsilon enthält, mit menschlichen Keratinozytenzellen und mit menschlichen Fibroblastenzellen, gefolgt von einer Viruschallenge. Das Vorhandensein von Interferon Epsilon wird angezeigt, wenn das Präparat antivirale Aktivität in Bezug auf die Keratinozyten, aber keine nachweisbare Aktivität in Bezug auf die Fibroblasten hat. Der Titer des Präparates kann im quantitativen Verfahren bestimmt werden, indem man es der Reihenverdünnung unterwirft, die Verdünnung mit Subkulturen von Keratinozyten inkubiert, die Subkulturen einer Challenge mit einem Virus unterwirft, die Lebensfähigkeit der Zellen in den Kulturen beobachtet und die Resultate mit einem Standard vergleicht.

### PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Interferon Epsilon in einer Probe, dadurch gekennzeichnet, dass man Epithelzellen mit der Probe inkubiert, die inkubierten Zellen einem Virus exponiert, das die Zellen zu infizieren vermag, und die Lebensfähigkeit der exponierten Zellen mit einem Standard vergleicht.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Epithelzellen Keratinozytenzellen sind.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Inkubationsdauer im Bereich von 2 Stunden bis 2 Tagen liegt.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass man die inkubierten Zellen einem Vesicular-Stomatitis-Virus exponiert.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass man zusätzlich die Probe der Reihenverdünnung unterwirft, getrennte Kulturen der Epithelzellen mit der der Reihenverdünnung unterworfenen Probe inkubiert und jede der Kulturen mit dem Virus exponiert.

6. Verfahren zur qualitativen Bestimmung von Interferon Epsilon in einer Probe, dadurch gekennzeichnet, dass man Epithelzellen mit der Probe inkubiert, die inkubierten Zellen einem Virus exponiert, die Probe mit Fibroblastenzellen inkubiert, die inkubierten Fibroblastenzellen einem Virus exponiert, das die Fibroblastenzellen zu infizieren vermag, und die Lebensfähigkeit der Fibroblastenzellen beobachtet, wobei der Tod der genannten Fibroblasten in Gegenwart der Probe in Kombination mit dem Schutz der Epithelzellen ein Anzeichen für das Vorhandensein von Interferon Epsilon ist.

7. Verfahren nach Anspruch 6, bei dem die Probe ein verunreinigendes Interferon enthält, dadurch gekennzeichnet, dass man zusätzlich die Probe vor dem Inkubieren der Zellen neutralisiert, indem man sie überschüssigem typspezifischem Antikörper gegen mindestens einen bekannten Interferontyp aussetzt.

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass der Antikörper aus Alpha-Interferon-Antikörper, Beta-Interferon-Antikörper, Gamma-Interferon-Antikörper und Gemischen davon gewählt ist.

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass der Antikörper ein Gemisch von Alpha- und Beta-Interferon-Antikörpern ist.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Epithelzellen junge Keratinozytenzellen sind.

### BESCHREIBUNG

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf Verfahren zur quantitativen und qualitativen Bestimmung von Interferon Epsilon, einem durch menschliche Epithelzellen erzeugten antiviralen Mittel, in einer Probe, die im Anspruch 1 bzw. im Anspruch 6 definiert sind.

Interferone sind Substanzen, die antivirale Eigenschaften haben. Sie werden durch bestimmte Typen von Zellen erzeugt, die durch Exposition mit einem Virus, bestimmten Nucleinsäuren oder Antigen/Mitogen-Komplexen stimuliert worden sind. Interferone sind extrem hochwirksame Wirkstoffe, die als klinische antivirale Mittel vielversprechend sind.

Menschliche Interferone werden im typischen Falle in drei Typen eingeteilt: Interferon Alpha, das von menschlichen Leukozyten oder lymphoblastoiden Zellen erzeugt wird; Interferon Beta, das von Fibroblasten erzeugt wird; und Interferon Gamma, das von menschlichen T-Lymphozyten

erzeugt wird. Alle drei werden von den betreffenden Zellen sekretiert, nachdem die Zellen durch ein Virus oder eine analoge Exposition stimuliert worden sind.

Kürzlich wurde ein Interferon eines neuen Typs aufgefunden, das Interferon Epsilon genannt wurde.

Interferon Epsilon wirkt auf menschliche Epithelzellen und ist daher vielversprechend für die Verstärkung der ersten Verteidigungslinie des Körpers, z.B. der Haut und anderer epithelialer Oberflächen, gegen Virusbefall. Weil jedoch Interferon Epsilon nur in dem Epithel aktiv ist, sind herkömmliche Tests auf Interferon ungeeignet, um sein Vorhandensein nachzuweisen und es quantitativ zu bestimmen. Somit besteht Bedarf für ein einfaches, wirksames Analyseverfahren zum Nachweis des Vorhandenseins von Interferon Epsilon und zur quantitativen Bestimmung seines Titers. Ein solches Analyseverfahren wäre klinisch sowie bei Qualitätskontrollverfahren bei der Herstellung von Interferon Epsilon für die therapeutische Verwendung nützlich.

Es wurde gefunden, dass das Vorhandensein von Interferon Epsilon leicht quantitativ bestimmt werden kann durch Beobachtung seiner zytopathischen Wirkungen auf Epithelzellen, insbesondere Keratinozytenzellen, die mit Proben behandelt sind, von denen man annimmt, dass sie Interferon Epsilon enthalten. Interferon Epsilon hat antivirale Aktivität in bezug auf menschliche Epithelzellen, aber keine nachweisbare Aktivität in bezug auf menschliche Fibroblasten und ist antigen verschieden von Alpha-, Beta- und Gamma-Interferon. Demgemäß enthält ein Präparat, das antivirale Aktivität in bezug auf Zellen von Epithelursprung, aber keine Aktivität in bezug auf Fibroblasten zeigt, Interferon Epsilon. Diese Beobachtungen bilden die Grundlage sowohl für ein quantitatives als auch für ein qualitatives Analyseverfahren für Interferon Epsilon.

Die quantitative Bestimmung ist ein Challenge-Assay, das mittels analoger Stufen ausgeführt wird, wie sie nach dem Stande der Technik zur Bestimmung des Titers anderer Interferone angewandt werden, mit der Ausnahme, dass Epithelzellen, vorzugsweise Keratinozyten, und insbesondere junge Keratinozyten, anstelle von Fibroblasten verwendet werden. Somit werden die Keratinozyten gezüchtet, in mehrere Subkulturen unterteilt und mit einer Probe behandelt, die eine unbekannte Konzentration an Interferon Epsilon und keine verunreinigenden Interferone enthält. Jede aufeinanderfolgende Zellsukultur wird mit einem Teil der Probe behandelt, die z.B. eine zweifache Verdünnung erfahren hat. Nach einer geeigneten Inkubationsdauer (2 Stunden bis ca. 2 Tage) werden die behandelten Keratinozyten einem Virus-Challenge ausgesetzt. Bei der beispielhaften Ausführungsform ist das Virus ein Vesicular-Stomatitis-Virus (VSV).

Beim Vergleich der Lebensfähigkeit von Epithelzellen, die mit einer Probe inkubiert worden sind, in der Interferon Epsilon quantitativ bestimmt werden soll, und die nach der Inkubation einem Virus exponiert worden sind, mit einem Standard wird eine Standardeinheit in der Prüfung definiert als diejenige Menge Interferon Epsilon, die erforderlich ist, um die Hälfte der exponierten Zellen vor der Infektion durch eine Standardviruskonzentration zu schützen. Eine Einheit von Interferon Epsilon kann somit als diejenige Konzentration definiert werden, die erforderlich ist, um die Hälfte einer menschlichen Keratinozytenpopulation vor der Challenge mit einer Standardviruskonzentration zu schützen. Die Anzahl von Einheiten, die in einer gegebenen nicht verunreinigten Probe vorhanden sind, kann demgemäß leicht bestimmt werden.

Wenn Interferon Epsilon durch Stimulieren von Epithelzellen mit einem Virus erzeugt wird, werden oft auch Interferon Alpha und Interferon Beta erzeugt. Diese stören die vorstehende Bestimmung. Wenn Interferon Alpha, Beta oder

Gamma vorhanden ist, sollten sie somit entfernt werden, oder ihre Aktivität sollte neutralisiert werden, ehe die Bestimmung durchgeführt wird.

Die qualitative Bestimmung wird im allgemeinen ausgeführt, indem man zunächst alle verunreinigenden Interferone in der Testprobe entfernt oder in anderer Weise inaktiv macht. Wenn die Probe dann bei der im Anspruch 6 beschriebenen Behandlung antivirale Aktivität in bezug auf Epithelzellen, aber keine nachweisbare Aktivität in bezug auf menschliche Fibroblasten zeigt, enthält sie Interferon Epsilon.

Die Analysenergebnisse müssen natürlich mit einem Standard verglichen werden, um bedeutungsvolle Daten zu erhalten. Ein Standardpräparat von Interferon Epsilon kann hergestellt werden, indem man Epithelzellen, vorzugsweise Keratinozyten, mit einem Virus stimuliert, wie z.B. im einzelnen in der BE-PS Nr. 902 633 offenbart, die überstehende Flüssigkeit erntet, nachdem die Interferone erzeugt und sekretiert worden sind, und dann das Präparat mit Alpha-, Beta- und Gamma-Antikörpern neutralisiert. Das zurückbleibende Präparat enthält Interferon Epsilon. Dieses kann der Reihenverdünnung unterworfen und zu Epithelzellenmikrokulturen zugesetzt werden, bis eine Verdünnung erreicht wird, die die Hälfte der Epithelzellen in der Kultur vor der Challenge mit einer Standardkonzentration (z.B. 1 PFU/Zelle) eines gegebenen Virus, z.B. Vesicular-Stomatitis-Virus, schützt. Diese Verdünnung enthält eine Einheit Interferon Epsilon-Aktivität.

Aufgabe der Erfindung ist es, Verfahren zur quantitativen bzw. qualitativen Bestimmung des Vorhandenseins und der Menge an Interferon Epsilon in Proben, von denen man annimmt, dass sie dieses enthalten, zur Verfügung zu stellen.

Diese und andere Aufgaben und Merkmale der Erfindung gehen aus der folgenden Beschreibung und den unabhängigen Ansprüchen 1 und 6 hervor.

Fig. 1 ist eine graphische Darstellung, die die Elektrophorese des Epithelinterferons zeigt.

Ein Interferon eines neuen Typs wird erzeugt, wenn Zellen von epithelialeem Ursprung, insbesondere Keratinozyten, mittels herkömmlicher Methoden durch ein Virus stimuliert werden. Wenn das neue Material, das als Interferon Epsilon bezeichnet wird, erzeugt wird, werden auch andere Interferone erzeugt, und es war bisher schwierig, das Interferon Epsilon in Gegenwart dieser anderen Substanzen nachzuweisen und quantitativ zu bestimmen.

Es wurde gefunden, dass Interferon Epsilon, das nicht durch andere bekannte Interferone verunreinigt ist, eine hohe antivirale Aktivität in Epithelzellen hat und keine nachweisbare Aktivität in bezug auf andere Zelltypen hat, die normalerweise in Interferon-Challenge-Assays verwendet werden. In der Tat hat die Definition einer Aktivitätseinheit, die in herkömmlicher Weise für andere Interferone verwendet wird, das heisst, diejenige Konzentration, die die Hälfte der Zellen in einer menschlichen Fibroblastenzellenkultur vor der Challenge mit einer Standardkonzentration von Vesicular-Stomatitis-Virus schützt, keine Bedeutung, wenn es sich um Interferon Epsilon handelt. Das ist deshalb der Fall, weil eine Konzentration von Interferon Epsilon, die eine signifikante antivirale Aktivität in bezug auf Epithelzellen hat, keine nachweisbare antivirale Aktivität in bezug auf Fibroblasten hat.

Diese ausgeprägte und selektive Wirksamkeit von Interferon Epsilon in menschlichen Epithelzellenkulturen, insbesondere Keratinozyten, kann als Grundlage für den Nachweis und die quantitative Bestimmung desselben dienen. Eine Einheit von Interferon Epsilon kann definiert werden als diejenige Konzentration, die die Hälfte der Zellen in einer menschlichen Keratinozytenzellkultur vor der Challenge mit 1 PFU/Zelle an Vesicular-Stomatitis-Virus schützt.

Wenn man wünscht, das Vorhandensein bzw. die Menge

von Interferon Epsilon in einem Präparat, von dem man erwartet, dass es andere Interferone enthält, nachzuweisen und/oder quantitativ zu bestimmen, so kann die Aktivität der anderen Interferone durch Neutralisation mit Antikörpern gegen Gamma-, Beta- und Alpha-Interferon beseitigt werden, und das Präparat kann dann auf seine Fähigkeit getestet werden, menschliche Keratinozyten oder andere menschliche Zellen von epithelialeem Ursprung vor Virusinfektion zu schützen. Das Vorhandensein von Epsilon-Interferon wird bestätigt, wenn man findet, dass eine zur Entfernung von Alpha-, Beta- und Gamma-Interferon-Aktivität gereinigte Probe antivirale Aktivität in bezug auf Zellen von epithelialeem Ursprung hat, aber keine nachweisbare Aktivität in bezug auf Fibroblasten hat.

Die bevorzugten Epithelzellen für die Verwendung in dem Analysenverfahren sind Keratinozyten, insbesondere junge Keratinozyten, z.B. eine Kultur, die gerade den Zustand erreicht hat, in dem die gezüchteten Zellen das Kulturgefäss ausfüllen und/oder einander berühren. Wenn die Zellen reifen, sammeln sie Keratin an, und dies kompliziert die Analyse offensichtlich, indem der Durchgang des Virus in die Zellen während der Challenge behindert wird.

Die bevorzugten Viren, die für die Challenge verwendet werden, sind diejenigen, von denen man weiss, dass sie gegen Epithelzellen zytotoxisch sind. VSV wirkt gut, aber auch Encephalo-Myocarditis-Virus (EMC), Sendavirus oder andere Viren können verwendet werden. Es wird bevorzugt, dass das gleiche Virus, das in mit dem Standard verglichenen Assays verwendet wird, zur Bestimmung der Standardkonzentration verwendet wird. Im allgemeinen hängt die Empfindlichkeit der Bestimmung von dem speziellen gewählten Virus ab.

Die Bestimmung wird vorzugsweise ausgeführt, indem man zuerst die Aktivität aller verunreinigenden Interferone, die vorhanden sein können, entfernt, die Probe dann der Reihenverdünnung unterwirft und die Reihenverdünnung mehreren Keratinozytenkulturen zusetzt. Vorzugsweise wird eine Verdünnung mit verhältnismässig hoher Konzentration oder ein unverdünnter aliquoter Teil der Testprobe auch zu einer Fibroblastenzellkultur zugesetzt. Die Kulturen können in herkömmlichen Mikrotitrationsplatten enthalten sein, die z.B. 96 Vertiefungen aufweisen. Nach der Inkubation werden die Kulturen mit dem Virus exponiert. Durch Zählen der Anzahl an lebensfähigen Zellen, die in einem bestimmten Zeitpunkt, z.B. wenn eine Vergleichsvertiefung, die nicht mit der Probe behandelt wurde, keine lebensfähigen Zellen enthält, in den Vertiefungen enthalten sind, kann man den IFN-e-Titer bestimmen. Wenn die Fibroblasten enthaltende Vertiefung keine lebensfähigen Zellen enthält, aber mindestens einige der Keratinozyten geschützt worden sind, wird das Vorhandensein von INF Epsilon bestätigt.

Die Erfindung wird nun im Zusammenhang mit bestimmten Ausführungsbeispielen beschrieben. Es sollte jedoch klar sein, dass der Fachmann verschiedene Änderungen und Modifizierungen ausführen kann, ohne vom Geist oder vom Rahmen der Erfindung abzuweichen. Z.B. kann die Bestimmung mit entweder gereinigten oder ungereinigten Proben ausgeführt werden. Wenn gereinigte Proben von Interferon Epsilon verwendet werden sollen, kann die Verwendung von Glasperlen mit definierten Poren, wie sie in dem oben erwähnten, am gleichen Tag eingereichten schweizerischen Patentgesuch beschrieben ist, in dem Reinigungsprozess brauchbar sein.

Obleich Platten mit Vertiefungen und die visuelle Beobachtung als bevorzugte Vorrichtung und bevorzugtes Verfahren zur Ausführung der Bestimmung beschrieben worden sind, sollte es ausserdem klar sein, dass verschiedene andere Zellkulturvorrichtungen und Nachweismethoden angewandt

werden können. Eine automatisierte Analyse kann z.B. im Zusammenhang mit der Erzeugung von Interferon Epsilon in grossem Massstab bevorzugt werden. Obgleich junge Keratinozyten als bevorzugte Zellen für die Bestimmung von Interferon Epsilon angegeben werden, können überdies auch andere Epithelzellen sich als brauchbar erweisen. Auch andere Viren können verwendet werden, sofern sie menschliche Epithelzellen zu infizieren vermögen.

Beispiel 1

Eine Epithelzellenkultur von epidermalem Ursprung (Keratinocyten), die von dem Laboratorium von Dr. Howard Green am Massachusetts Institute of Technology erhalten wurde, wurde bis zu einer Dichte von 1 bis  $2 \times 10^5$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  gezüchtet und verwendet, um Interferon Epsilon unter Anwendung der Newcastle-Disease-Virus-(NDV)-Induktionsmethode (Baron und Issacs, l.c.) zu erzeugen. Das verwendete Virus war der Bankowski-Stamm von NDV, der von den Poultry Health Laboratories, Davis, California, erhältlich ist. Vier Proben von je 1 ml eines «minimum essential medium» (MEM, Gibco), das 2% durch Wärme inaktiviertes fötales Kälberserum («HIFCS») und NDV enthielt, mit Viruskonzentrationen von 0 bis 250 Virus-PFU pro Zelle in den Testproben wurden hergestellt und inkubiert. Die Zellkulturen wurden 24 Stunden lang inkubiert. Das Medium wurde dann geerntet, mit 0,1-normaler HCl bis pH = 2 angesäuert und 5 bis 6 Tage lang bei 4 °C aufbewahrt, um das NDV zu inaktivieren. Dieses rohe Interferonpräparat wurde nach Neutralisation von Interferon Alpha, Interferon Beta und Interferon Gamma mit in bezug auf jeden der drei bekannten Interferontypen spezifischen Antikörpern auf seine antivirale Aktivität geprüft. Die Neutralisationstiterationen der einzelnen Interferone wurden unter Verwendung von Anti-IFN-alpha (NIH), Anti-IFN-beta (NIH und Y.H. Tan, Calgary University, Calgary, Alberta, Canada), Anti-IFN-gamma (S. Baron) und Gemischen dieser Antiseren ausgeführt. Die zurückbleibenden neutralisierten Präparate wurden dann auf Fibroblastenkulturen (Human-FS-4) und Epithelkulturen (Human-AR) getestet. Die Resultate zeigten, dass Interferon Epsilon keine nachweisbare antivirale Aktivität in bezug auf Fibroblasten hatte, aber Aktivität gegen Viren in Epithelzellen zeigte.

Die folgende Tabelle gibt eine komplette Batterie von Tests der Neutralisation und der antiviralen Aktivität wieder.

Tabelle I  
Antivirale Wirkung von Interferonpräparaten auf Human-FS-4- und -AR-Zellen

Probe	Behandlung <sup>1</sup>			Interferontiter <sup>2</sup> (Einheiten/ml)	
	Anti-α	Anti-β	Anti-γ	Human-FS-4	Human-AR
IFN-ε	-	-	-	128	64
IFN-ε	+	-	-	48	32
IFN-ε	-	+	-	24	32
IFN-ε	-	-	+	192	32
IFN-ε	+	+	-	<4	32
IFN-ε	+	+	+	<4	32
IFN-α	-	-	-	64	4
IFN-β	-	-	-	128	16
IFN-α/β	-	-	-	512	16
IFN-γ	-	-	-	32	16
IFN-α/β/γ	-	-	-	384	64
IFN-α/β/γ	+	-	-	128	48
IFN-α/β/γ	-	+	-	256	16
IFN-α/β/γ	-	-	+	N.D.	16
IFN-α/β/γ	+	+	-	<4	<4
IFN-α/β/γ	+	+	+	<4	<4

<sup>1</sup> Die Proben wurden mit überschüssigem Antiserum, wie angegeben, 1 Stunde lang bei 37 °C inkubiert, bevor sie auf Interferonwirkung geprüft wurden.

<sup>2</sup> Der Interferontiter wurde durch einen viralen zytopathischen Test bestimmt.

<sup>3</sup> N.D. = Keine Daten

Es ist aus den Daten ersichtlich, dass Interferon Alpha und Interferon Beta gleichzeitig mit Interferon Epsilon erzeugt wurden. Es ist festzuhalten, dass die Neutralisation mit α-Antikörper allein oder β-Antikörper allein die Interferonaktivität sowohl in den Fibroblasten- als auch in den Keratinozytenkulturen reduzierte. Die Neutralisation mit beiden Antikörpern und mit einem Gemisch aus α-, β- und γ-Antikörpern zerstörte alle antivirale Aktivität des Präparates in bezug auf Fibroblasten, während eine Aktivität von 32 Einheiten pro ml in den Keratinozytenzellen zurückblieb. Dies beweist das Vorhandensein von Interferon Epsilon und bestätigt, dass dieses eine selektive Aktivität auf Epithelzellenkulturen hat. Dieses rohe Präparat enthielt 32 Einheiten Interferon Epsilon.

Beispiel 2

Die Wirkung des Kulturalters von Keratinozyten und der Viruskonzentration des induzierenden Virus auf die Erzeugung von Epsilon-Interferon wurde untersucht. Die Interferon-Epsilon-Titer wurden wie oben dargelegt bestimmt. Die Resultate sind unten in Tabelle II zusammengefasst.

Tabelle II  
Wirkung von Kulturalter und Viruskonzentration auf die Erzeugung von IFN-ε

M.O.I. <sup>1</sup> (Virus-PFU/Zelle)	Interferontiter <sup>2</sup> (Einheiten/10 <sup>6</sup> Zellen)		
	14 Tage	21 Tage	27 Tage
0	<6	<3	<4
0,1	10	<3	<4
1	53	2	8
2	79	6	16
5	210	6	16
10	157	6	16
20	210	18	32
50	210	9	32
70	ND <sup>3</sup>	12	32
90	ND	9	32
100	79	ND	ND
250	79	ND	ND

<sup>1</sup> Viruskonzentration

<sup>2</sup> Die Interferonproben wurden mit überschüssigen Interferon-α- und -β-Antiseren inkubiert, bevor sie auf ihre Wirkung auf Keratinozyten geprüft wurden.

<sup>3</sup> ND = Keine Daten

Tabelle II zeigt, dass mindestens bei Epithelzellen vom Keratinozytentyp jüngere Zellen, das heisst 14 Tage alte Zellen, mehr Interferon Epsilon erzeugen als ältere Zellen.

Beispiel 3

Epithel-Interferonmaterialien, die gemäss Beispiel 1 hergestellt worden waren, wurden teilweise gereinigt. Die Proben wurden der Molekulargewichtsanalyse unter Anwendung der SDS-Gelelektrophorese nach der Methode von Lamelli unterworfen. Die Proben wurden bei Raumtemperatur in Gegenwart von 1,0% SDS, 0,05molarem Tris-HCl-Puffer (pH = 6,8), 10 Vol.-% Glycerin und 0,001% Bromphenolblau eine Stunde lang inkubiert, auf 12,5% Polyacrylamidgele aufgebracht und

annäherungsweise 16 Stunden lang laufen gelassen. Nach der Elektrophorese wurden die Zonen, die die Molekulargewichtsstandards enthielten, angefärbt. Die Interferon enthaltenden Zonen wurden in 3-mm-Scheiben zerteilt und durch Schütteln mit 0,5 ml PBS, die 0,5% SDS enthielten, 20 Stunden lang bei Raumtemperatur extrahiert. Analysen dieser Fraktionen wurden ausgeführt unter Anwendung des herkömmlichen Challenge-Assays unter Verwendung von Fibroblasten und mittels des erfindungsgemässen Verfahrens nach Neutralisation mit  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Antikörper. Das Molekulargewicht des Hauptaktivitätsspeaks, der mit Interferon Epsilon verbunden war, wurde durch Vergleich seiner Stellung auf

dem Gel mit den Molekulargewichtsstandards berechnet. «SDS» bedeutet «Natriumdodecylsulfat», und «PBS» bedeutet «phosphatgepufferte Kochsalzlösung».

In Fig. 1 wird die Interferon-Epsilon-Aktivität klar in AR-5 Epithelzellen (Keratinocyten) gezeigt. Das der epithelialen Aktivität entsprechende Protein hat ein scheinbares Molekulargewicht von ca. 20 000, und seine Aktivität wird durch Behandlung mit  $\beta$ -Mercaptoethanol auch dramatisch reduziert.

In einem separaten Experiment wurde festgestellt, dass Interferon Epsilon keine antivirale Aktivität in Mäuse- oder Rinderfibroblastenzellenkulturen hatte.

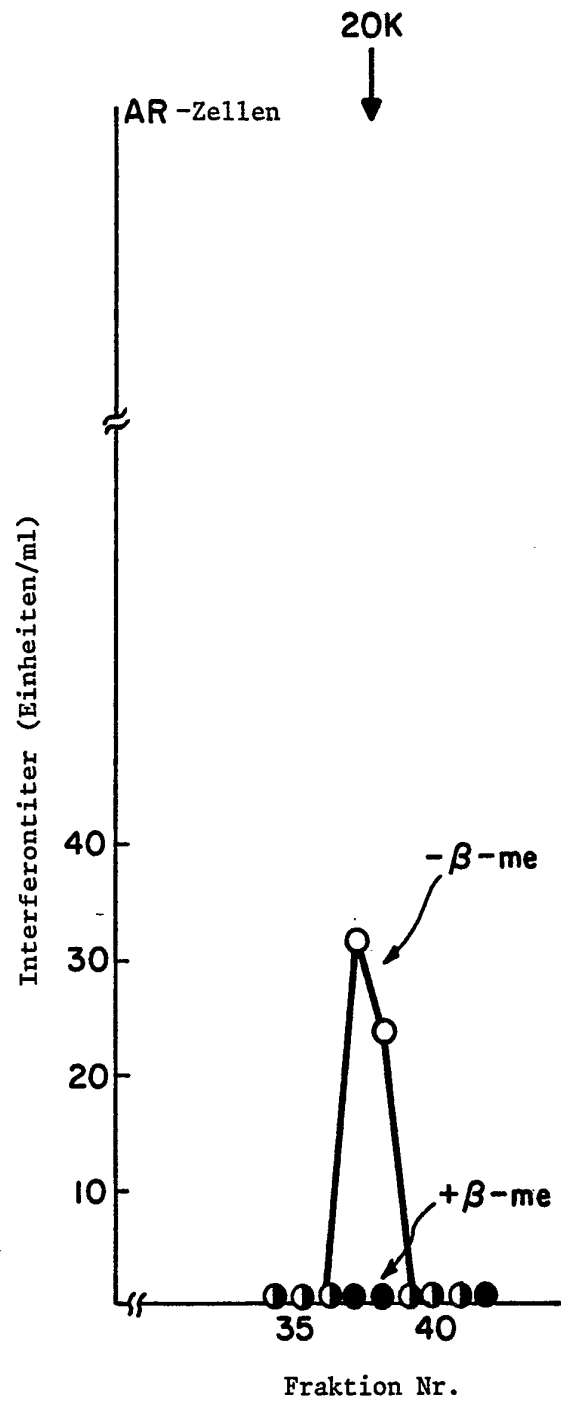


FIG. 1