Octrooiraad

(10)A **Terinzagelegging** (11) **8120080**

Nederland (19) **NL**

(54) **Virusremmende stof en werkwijze voor de bereiding daarvan.**

(51) Int.Cl³.: A61K 35/23, A61K 35/50, C12P 1/00.

(71) Aanvrager: Fumiaki Taguchi te Sagamihara, Japan.

(74) Gem.: Ir. C.M.R. Davidson c.s.
Octrooibureau Vriesendorp & Gaade
Dr. Kuyperstraat 6
2514 BB 's-Gravenhage.

(21) Aanvrage Nr. 8120080.

(86) Aanvraagnummer oorspronkelijke internationale aanvrage: PCT/JP81/00062.

(22) Ingediend 25 maart 1981.

(32) Voorrang vanaf 26 maart 1980.

(33) Land van voorrang: Japan (JP).

(31) Nummer van de voorrangsaanvrage: 37494/80 .

(62) - -

(43) Ter inzage gelegd 1 februari 1982.

(87) Publicatiedatum oorspronkelijke internationale aanvrage: 1 oktober 1981.

(87) Publicatienummer oorspronkelijke internationale aanvrage: WO81/02674.

Deze octrooiaanvrage werd ingediend als internationale octrooiaanvrage onder de bepalingen van het Verdrag tot samenwerking inzake octrooien (PCT). De aan dit blad gehechte stukken zijn een afdruk van een Nederlandse vertaling van de oorspronkelijk in een andere taal ingediende beschrijving met conclusie(s) en tekening(en). De Nederlandse octrooiaanvrage wordt geacht te zijn ingediend op de indieningsdatum van de internationale octrooiaanvrage.

Virusremmende stof en werkwijze voor de bereiding daarvan.

Deze uitvinding betreft een nieuw interferon en ook een werkwijze voor het bereiden daarvan. Meer in het bijzonder betreft deze uitvinding een interferon uit menselijke epitheelcellen (hierna soms "HE-IF" genoemd) die in menselijke epitheelcellen een bijzonder sterke antivirale werking vertonen, welk interferon gevormd wordt in menselijke cellen zoals die van het amnion, de nier en de amnionvloeistof, alsmede een werkwijze voor het bereiden daarvan.

Het interferon volgens deze uitvinding wordt geacht in brede zin tot het Type I te behoren, maar het is een nieuw interferon, dat verschilt in zijn reactiviteit met antilichamen tegen interferon uit menselijke leukocyten en uit menselijke fibroblasten.

In brede zin kunnen de interferonen opgedeeld worden in Type I en Type II. Als interferonen van het Type I zijn bekend het fibroblasten-interferon (hierna aangeduid als "HF-IF") dat door fibroblasten gevormd wordt, en het leukocyten-interferon (hierna aangeduid als HL-IF) dat door bloedcellen zoals leukocyten, lymfocyten en lymfoblasten gevormd wordt. Het interferon van Type II is instabiel en kan alleen in lage opbrengst bereid worden, en om die reden zijn de eigenschappen van het interferon Type II nog niet voldoende opgehelderd. In tegenstelling daarmee heeft het interferon Type I, zoals hierboven aangeduid, de aandacht getrokken als nuttig voor therapeutische doeleinden. Vermeld is dat HL-IF doeltreffend kan werken tegen lymfoblasten van Burkitt's-lymfoom, en ook doeltreffend tegen cellen van het osteosarcoom.

Maar er zijn nooit vermeldingen of suggesties geweest die het bestaan voor cellen van een interferon dat uitstekende werking kan vertonen op epitheelcellen, welke

over het gehele lichaamsoppervlak voorkomen en tussen andere celpopulaties inzitten, waaronder bloedcellen, spiercellen, substantieve cellen van diverse organen en epitheelcellen.

Deze uitvinder heeft onderzoekingen gedaan om een interferon uit epitheelcellen te ontdekken dat specifiek in epitheelcellen antivirale werking zou vertonen. Daardoor is nu gevonden dat een nieuw interferon door amnion-epitheelcellen, nier-epitheelcellen en epitheelcellen uit de amnionvloeistof bereid kan worden dat specifiek in sterke mate de vermenigvuldiging van virus in epitheelcellen kan remmen en toch antigene eigenschappen heeft die verschillen van die van HL-IF en van HF-IF, en dat dus een nieuwe naam moet hebben. Zuivering van karakterisering van dit interferon werden ook aangevoerd om zijn nieuwheid te bevestigen.

Zo wordt het nieuwe interferon volgens deze uitvinding in menselijke epitheelcellen gevormd, vertoont het een sterke werking tegen virussen in menselijke epitheelcellen, en wordt het van het interferon uit menselijke leukocyten en van HF-IF onderscheiden door zijn reacties met antilichamen.

Het kenmerk van de werkwijze voor het bereiden van het nieuwe interferon volgens de uitvinding bestaat uit het in contact brengen van menselijke epitheelcellen met een interferon-uitlokker en het dan kweken van deze epitheelcellen in een medium in aanwezigheid of afwezigheid van serum waardoor een interferon gevormd wordt met een zeer sterke antivirale werking in menselijke epitheelcellen.

Het interferon HE-IF volgens deze uitvinding is zeer stabiel, sterk in het remmen van virusgroei en heeft ook een specifieke werking die anders is dan die van de gebruikelijke interferonen van het Type I wat de sterke antivirale werking speciaal in menselijke epitheelcellen betreft. Met andere woorden, het interferon HE-IF vertoont in epitheelcellen een veel sterkere antivirale werking dan in fibroblasten. Verder kan in vitro de werking veel sneller en sterker in epitheelcellen aangetoond worden dan in fibroblasten, wat aan-

geeft dat dit interferon eigenschappen heeft die niet gevonden worden in de reeds bekende interferonen. Wegens deze eigenschappen kan het interferon verwacht worden uitstekende farmacologische effecten te vertonen, vooral wat ziekten zoals virus-infecties, kwaadaardige gezwellen, enz. betreft, waarvan de oorzaak in vivo in epitheelcellen gezocht moet worden.

Een ander voordeel van deze uitvinding is dat het menselijke epitheel, dat als uitgangsmateriaal voor de bereiding van het interferon volgens de uitvinding moet dienen, betrekkelijk gemakkelijk verkrijgbaar is.

Korte beschrijving van de hierbij behorende tekeningen.

In figuur 1 ziet men de remming van de opbrengst aan vaatstomatitis-virus (afgekort tot VSV) door HE-IF, waarbij de titer van het HE-IF op de abscis tegen de vermindering van de opbrengst aan VSV op de ordinaat. Daarin is
1-1 het geval waarin een cellijn van longfibroblasten uit menselijk embryo (afgekort tot "HEL-R66 cellen") 5 minuten met HE-IF behandeld en dan met het virus geïnfecteerd worden,
1-2 het geval waarin HEL-R66 cellen 360 minuten met HE-IF behandeld en dan met het virus geïnfecteerd worden,
2-1 het geval waarin primaire menselijke amnion-cellen (afgekort tot "PHA cellen") 5 minuten met HE-IF behandeld en dan met het virus geïnfecteerd worden, en
2-2 het geval waarin PHA cellen 360 minuten met HE-IF behandeld en dan met het virus geïnfecteerd worden.

Figuur 2 toont de vermindering van de opbrengst aan VSV als het beënten met VSV en de behandeling met HE-IF tegelijkertijd gebeuren, daarin is
1 het geval waarin HEL-R66 gebruikt werd,
2 het geval waarin longfibroblasten uit menselijk embryo (afgekort tot "HEL cellen") gebruikt werden, en
3 het geval waarin PHA cellen gebruikt werden.

De beste uitvoeringsvorm van de uitvinding.

1. Bereiding van het interferon.

Het interferon volgens deze uitvinding wordt gevormd door eerst menselijke epitheelcellen met een interferon-uitlokker in contact te brengen en dan die epitheelcellen in een medium in aanwezigheid of afwezigheid van serum te kweken.

1) Bron van menselijke epitheelcellen.

Als menselijke epitheelcellen kunnen diverse soorten epitheelcellen gebruikt worden. Voorbeelden hiervan zijn de cellen uit amnion, amnion-vloeistof en nieren. Daaronder geniet het amnion de voorkeur wegens zijn verkrijgbaarheid en gemakkelijke hanteerbaarheid, en ook omdat het een massa cellen is die IF van hogere titer kan vormen.

2) Interferon-uitlokker.

Als stof die op levende cellen inwerkt en daarin interferon doet ontstaan, een interferon-uitlokker dus, zijn virussen, bacteriën, bestanddelen van schimmels en bacteriën, nucleïnezuren, polysacchariden,enz. bekend. Bij deze uitvinding is het mogelijk elke geschikte soort te gebruiken die het effect van deze uitvinding vertoont (het uitlokkende effect verschilt met het ontvangende soort).

Een typische interferon-uitlokker bij toepassing in deze uitvinding is een virus. Als zo'n virus is het mogelijk elke paramyxo- of ortho-myxovirus te gebruiken. Geschikte bij deze uitvinding te gebruiken virussen zijn die van de Newcastle-ziekte (hierna afgekort tot NDV), de Sendai-ziekte, influenza, enz.

Ook kan men een virus gebruiken dat door ultraviolette straling of door hitte geïnactiveerd is.

3) Het uitlokken van het interferon.

Menselijke epitheelcellen kunnen met een der bovengenoemde interferon-uitlokkers in contact gebracht worden op elke wijze die tot vorming van interferon leidt.

Hoe dat in contact brengen precies gaat is afhankelijk van de gebruikte uitlokker (en van de toegepaste epitheelcellen). Als de uitlokker een virus is is het gebruikelijk een dispersie van het virus met de epitheelcellen te schud-

den, bijvoorbeeld met amnion dat tot kleine stukjes versneden is, zodat het virus daarop kan adsorberen. De epitheelcellen kunnen zowel afzonderlijke cellen zijn als in de vorm van een membraan dat gesuspendeerd is in het medium dat men bij de volgende stap gebruikt. De contacttemperatuur en de tijd kunnen elke waarde hebben die geëigend is voor het uitlokken van het interferon, en de precieze waarden daarvan kunnen gemakkelijk door de vakman gekozen worden aan de hand van hierna te geven voorbeelden.

4) Kweekmedium en incubatie-omstandigheden.

Als basismedium voor het aanhouden van menselijke epitheelcellen en voor het bereiden van HE-IF kan een in de handel verkrijgbaar compleet synthetisch medium gebruikt worden dat sacchariden, aminozuren, vitaminen en anorganische zouten bevat, bijvoorbeeld het minimum-medium van Eagle (MEM), medium 1640 van het Roswell Park Memorial Institute (RPMI) het medium M199, enz. Zie E.H. Lennette & N.J. Schmidt "Diagnostic Procedures for Viral and Rickettsial Infections" (4^{e} druk, 1969) Am. Public Health Assoc. N.Y., U.S.A.).

In het algemeen wordt toevoeging van serum onmisbaar geacht bij de bereiding van interferon, maar bij deze uitvinding is het ook mogelijk een medium te gebruiken waaraan geen serum toegevoegd is.

De kweekomstandigheden kunnen geschikt voor de interferon-bereiding volgens deze uitvinding gekozen worden. De kweektemperatuur is in het algemeen $37^{o}C$, waarbij men 38 tot 58 uur kweekt, waarna de kweektemperatuur tot $27 \pm 2^{o}C$ verlaagd wordt, waardoor de opbrengst aan interferon in belangrijke mate verhoogd kan worden. De kweekduur kan in ieder geval tussen 2 en 4 dagen liggen.

5) Versneller van de interferon-vorming.

Behalve de basisomstandigheden voor de vorming van HE-IF zoals hierboven aangegeven heeft de uitvinder ook het effect van diverse toeslagen onderzocht. Met voortgaand speurwerk werd gevonden dat de opbrengst aan HE-IF

door de toevoeging van toeslagen met meer dan 300 % verhoogd kan worden, waarvan in de techniek nog geen eerdere melding was, en daaronder vallen hypofyse-hormonen zoals ACTH, xanthine-derivaten zoals caffeïne, theofylline, theobromine, enz., alloxaan, indool, indoolazijnzuur, barbituraat, amantadine, imidazool, carbazool, enz., en ook insuline waarvan vermeld was dat het een zwak verhogend effect op de vorming van het HF-IF heeft.

Het effect van deze toeslagen bleek nog sterker uitgesproken te zijn als ze in geschikt gekozen stadia toegevoegd worden. Bijvoorbeeld wordt insuline bij voorkeur toegevoegd nadat de kweek 12 tot 36 uur geduurd heeft en de temperatuur tijdens de gehele kweek op 37°C gehouden wordt, maar bij voorkeur wordt het aan het begin van de kweek toegevoegd als de temperatuur 48 uur op 37°C gehouden en daarna tot 27°C verlaagd wordt.

Deze nieuwe vondsten betreffende deze versnellers en de genoemde kweektemperaturen kunnen met veel effect gebruikt worden bij de produktie van HE-IF op grote schaal. Bij een in de techniek bekende werkwijze op grote schaal voor de bereiding van interferon is het gehalte aan interferon op zijn maximum ongeveer 10.000 eenheden/ml voor HF-IF en ongeveer 30.000 eenheden/ml voor HL-IF, waarbij de interferon-produktie door één cel 0,15 eenheid of minder bedraagt. Daarentegen kan men met de werkwijze volgens de uitvinding HE-IF bereiden tot een gehalte van ongeveer 2.000.000 eenheden/ml, waarbij de interferon-produktie per cel wel 10 eenheden bedraagt.

6) Zuivering van het verkregen interferon.

De zuivering van het met de werkwijze volgens deze uitvinding gevormde HE-IF kan gebeuren met methoden die in de techniek bekend zijn voor de zuivering van bekende interferonen, waaronder de menselijke interferonen zoals HF-IF, HL-IF en muizen-interferonen. Bijvoorbeeld is het mogelijk een gezuiverd produkt met 10^6 eenheden/mg of meer te verkrijgen door kolomchromatografie over SP Sephadex of Blauw

Sephalose.

HE-IF blijkt bij fysische en chemische behandelingen betrekkelijk stabiel te zijn. In het bijzonder is het interferon, indien bij zijn bereiding geen serum gebruikt werd, vrij van serum, wat voor de bereiding voordelig is vergeleken met de gebruikelijke interferonen.

2. Eigenschappen en werking van het interferon volgens deze uitvinding.

(1) Stabiliteit (vergelijking met HF-IF en HL-IF).

In tabel 1 ziet men de stabiliteit van HE-IF in vergelijking met die van HF-IF en HL-IF. Men kan zien dat het HE-IF stabieler is dan HF-IF.

Tabel 1

Behandeling	HE-IF	HF-IF	HL-IF
pH 2,0-10,0, 4°C twee dagen	Stabiel	Ietsje onstabiel	Stabiel
pH 7,0, 4°C twee dagen	Stabiel	Stabiel	Stabiel
pH 7,0, 37°C, 24 uur	Stabiel	Onstabiel	Stabiel
pH 7,0, 56°C, 30 minuten	Betrekkelijk stabiel (stabiel in aanwezigheid van SDS)	Onstabiel	Stabiel
Een week in de vrieskast bewaard:			
-40°C	Stabiel	Stabiel	Stabiel
-70°C	Stabiel	Stabiel	Stabiel
Bevriezen en ontdooien (-70°C, 3 maal)	Betrekkelijk stabiel	Onstabiel	Betrekkelijk stabiel
Behandeling met trypsine (100 µg/ml)	Onstabiel	Onstabiel	Onstabiel

(2) pH-stabiliteit.

Monsters van 3 ml amnion-interferon met een activiteit van 14.000 eenheden/ml die al dan niet 0,1 % natrium-dodecylsulfaat (hierna afgekort tot NaDS) bevatten werden met 1 N HCl of 1 N NaOH op de bedoelde pH gebracht, 48 uur bij 4°C daarop gelaten, en dan weer op pH 7 teruggebracht. De resterende activiteiten werden op FL-cellen beproefd. De resultaten hiervan staan in tabel 2.

Tabel 2

pH	Resterende activiteit (eenh/ml) (in % op beginwaarde)	
	Geen NaDS toegevoegd	0,1 % NaDS toegevoegd
2,0	2.400 (17,1)	12.000 (85,7)
3,0	3.000 (21,4)	14.000 (100)
4,0	3.000 (21,4)	13.000 (92,9)
7,0	6.800 (48,6)	13.000 (92,9)
9,5	4.600 (32,9)	13.000 (92,9)

Zoals men uit deze resultaten ziet heeft HE-IF bij pH tussen 2,0 en 9,5 een opmerkelijke stabiliteit, welke nog verder verhoogd wordt door toevoeging van 0,1 % NaDS.

(3) Temperatuur-stabiliteit.

De interferon-werking van HE-IF blijkt bijna volledig te verdwijnen bij 1 uur incubatie op 56°C bij pH = 7,0. In aanwezigheid van 0,04 % natriumdodecylsulfaat blijkt echter meer dan 80 % der werking behouden te blijven. De werking werd beproefd op FL-cellen.

Tabel 3

NaDS-concentratie (%)	Resterende werking (eenh./ml)
0	10
0,008	500
0,04	1500
0,2	1100
Blanco (geen NaDS toegevoegd, 4°C)	1800

8120080

(4) Soort-specificiteit.

Tabel 4

Soort cellen	Ontstaan van antivirale werking
Menselijke cellen (FL, HEL, FS, HEL-R66, PHA)	Ja
Apecellen (Vero, $LLCMK_2$, BSC-1)	Ja
Hondecellen (MDCK)	Nee
Konijnecellen (RK-13)	Nee
Muizencellen L, L929, 3T3)	Nee
Hamstercellen (BHK21)	Nee
Kuikenembryocellen (CE)	Nee

Zoals men ziet werkt HE-IF alleen antiviraal in cellen uit mensen en apen.

(5) Antivirale werking in diverse menselijke cellen.

Tabel 5

Cel-lijn	Werking van het HE-IF (eenh/ml)	
	Voorbeeld I	Voorbeeld III
HEL	18*	600*
HEL-R66	100	5000
FL (uit amnion)	400	20.000
PHA	3500	500.000
HEK (niercellen uit menselijk embryo)	3300	350.000

De met * gemerkte waarden waren verkregen met de CPE-remmingsmethode, de overige met de plaque-verminderingsmethode (werking is uitgedrukt in de verdunning van het IF waarbij in elke cel 50 % der VSV plaques onderdrukt wordt).

8120080

Zoals men ziet vertonen FL cellen (die tot de epitheelcellen behoren) viermaal de werking van HEL-R66 cellen (die tot de fibroblasten behoren), terwijl PHA cellen 35 tot 100 maal die werking vertonen, waaruit de speciaal sterke werking van epitheelcellen blijkt.

(6) Remming van de vermenigvuldiging van VSV.

De specifieke affiniteit van HE-IF voor epitheelcellen blijkt ook uit een snellere instelling van de anti-virale toestand in epitheelcellen dan in fibroblasten.

Bij een proef kregen PHA cellen (dat zijn epitheelcellen) en HEL-R66 cellen (dat zijn fibroblasten) elk 7 of 700 eenheden/ml HE-IF. Na 5 minuten of na 360 minuten werden de cellen gewassen om het inteferon te verwijderen en met VSV geïnfecteerd (0,1 PF-eenheid per cel). Hierna volgt de incubatie op 37°C. De bovenstaande vloeistof werd afgescheiden, in het geval van HEL-R66 cellen na 24 uur en in het geval van PHA cellen na 48 uur, en in de bovenstaande vloeistof werd de opbrengst aan VSV met behulp van HEL-R66 cellen bepaald. De verhouding van de infectieuze titer bepaald ten opzichte van de opbrengst aan virus in de blanco zonder toevoeging van HE-IF werd berekend en de "mate van remming van het virus" genoemd. De resultaten zijn weergegeven in figuur 1, waaruit men kan zien dat slechts 5 minuten contact van PHA cellen met HE-IF in wezen evenveel anti-virale werking heeft als 360 minuten contact van HEL-R66 cellen met HE-IF.

Daar HE-IF een hogere affiniteit voor epitheelcellen heeft en zijn werking daarin sneller kan ontplooien werd een merkbare anti-virale werking dus ook vertoond toen het enten met virus tegelijkertijd met het aanbrengen van het HE-IF gebeurde, dus zonder voorafgaand contact met de cellen. PHA cellen, HEL cellen en HEL-R66 cellen werden 1 uur in contact gehouden met een mengsel van VSV (moi = 0,1) en HE-IF (7, 70 en 700 eenheden/ml). Daarna werden de cellen gewassen om HE-IF en niet geadsorbeerd VSV te verwijderen, waarna bij 37°C geïncubeerd werd, 48 uur voor de PHA cellen en 24 uur voor de HEL en de HEL-R66 cellen. De opbrengst aan VSV

in elke bovenstaande vloeistof werd met HEL-R66 bepaald, en de opbrengst aan virus ten opzichte van een blanco waaraan geen HE-IF toegevoegd was werd berekend, waaruit de mate van remming van virusvorming blijkt.

De resultaten zijn weergegeven in figuur 2, waaruit blijkt dat HE-IF de vorming van virus doeltreffend kan remmen, zelfs als de behandeling tegelijkertijd met de virusinfectie door PHA cellen gebeurt.

Bovendien werd zelfs een merkbare antivirale werking waargenomen toen HE-IF na de infectie met virus toegediend werd. PHA cellen, HEL cellen en HEL-R66 cellen werden met VSV beënt (moi = 0,1) en daarna 60 minuten op 37°C gehouden. Toen werden de cellen gewassen om niet geadsorbeerd VSV te verwijderen en werden de cellen in de volgende groepen onder-verdeeld voor een behandeling met 5 of 50 eenheden HE-IF:

1) Directe behandeling met HE-IF gedurende 60 minuten, en daarna uitwassen zodat HE-IF verwijderd werd, waarna 24 uur op 37°C geïncubeerd werd.
2) Nog 60 minuten op 37°C voor een voortgaande virusvermenigvuldiging, daarna 60 minuten behandelen met HE-IF, daarna wegwassen van het HE-IF, en tenslotte 24 uur incuberen op 37°C.
3) Het HE-IF werd direct aan de cellen toegevoegd, en zonder verwijdering daarvan werd 24 uur op 37°C gekweekt.

In elke bovenstaande vloeistof werd de opbrengst aan VSV met behulp van HEL-R66 cellen bepaald, en de opbrengst aan virus ten opzichte van een blanco waaraan geen HE-IF toegevoegd was werd berekend, en hieruit blijkt de mate van remming van virusvermenigvuldiging. De resultaten zijn weergegeven in de volgende tabel, waaruit blijkt dat HE-IF doeltreffend de vermenigvuldiging van het virus kan remmen, zelfs indien het 60 tot 120 minuten na beënting der PHA cellen met virus gebeurde.

Tabel 6

Behandeling met HE-IF (na infectie met VSV)	Eenheden toegediend	Remming van de VSV-vorming ($-^{10}$log PFU/ml)		
		PHA cellen	HEL cellen	HEL-R66 cellen
1) gedurende 60 minuten, direct na de infectie	5	1,3	0	0
	50	2,5	0,1	0
2) gedurende 60 minuten, 60 minuten na de infectie	5	1,4	0	0
	50	2,7	0,1	0,1
3) gedurende 24 uur direct na de infectie	5	1,7	0	0
	50	4,4	1,1	0,7

Dit is een voordelige eigenschap wanneer HE-IF als geneesmiddel gebruikt wordt. Er was tot nog toe geen melding van een interferon met zo'n werking.

(7) Antigene eigenschappen.

De specificiteit van het interferon kan het duidelijkst aangegeven worden door het verschil in antigene eigenschappen. In de volgende voorbeelden werden neutraliseringsproeven uitgevoerd met serums tegen HL-IF en tegen HF-IF. Voor de als antigenen dienende interferon-monsters werden HL-IF uit menselijke leukocyten, HF-IF uit menselijke fibroblasten en HE-IF uit menselijk amnion gebruikt. Anderzijds werden als antisera tegen de verschillende soorten interferon sterk werkende uit konijnen verkregen sera tegen HL-IF, tegen HF-IF en tegen HE-IF gebruikt. De antivirale werking van het interferon werd bepaald door 50 % vermindering van de vorming van VSV-plaques in FL-cellen. Voor de neutraliseringsproeven werden vier series van viervoudige verdunningen van immuun serum (elk 2 ml) aangemaakt. Anderzijds werden de antigenen steeds ingesteld op 10 eenheden/ml, uitgaande van de diverse interferonen. Voor de details van de methode van 50 % vermindering der plaque-vorming wordt verwezen naar William E. Steward II:

"The Interferon System", (Springer-Verlag, Wenen-New York, 1979) en R.R. Wagner: Virology 13 (1961) 323. Bij de verdunningen van elk immuun serum werd HL-IF aan de eerste serie toegevoegd, HF-IF aan de tweede en HE-IF aan de derde serie, en het verdunningsmiddel (MEM-medium met 0,5 % serum) werd met een gelijke hoeveelheid immuun serum gemengd. Daarna werd elk mengsel 60 minuten in een waterbad op 37°C geïncubeerd. De reactiemengsels werden 5 x, 15 x en 45 x verdund en van elke verdunning werd 1 ml aan FL cellen toegevoegd (op een plastic plaat met 12 putjes). Dit werd overnacht in een CO_2-incubator op 37°C gehouden. Daarna werden de reactiemengsels goed uitgewassen en werd met VSV beënt (50 eenheden per putje) en werd er nog 2 dagen op 37°C gekweekt. Na toevoeging van Neutraal Rood werd het aantal plaques geteld en hieruit werd de activiteit van het serum (het aantal malen dat het verdund kan worden) voor het neutraliseren van de anti-virale werking van 10 eenheden interferon berekend. De antigeniciteit van de verschillende types immuun serum werd dus benaderd als de uiteindelijke verdunning van het serum. De resultaten hiervan staan in tabel 7.

Tabel 7

	Neutralisering van de antilichamen tegen diverse types immuun serum	
	serum tegen HL-IF	serum tegen HF-IF
HL-IF	30.000	<250
HF-IF	<250	20.000
HE-IF	<250	1000

Zoals men uit deze resultaten ziet heeft HE-IF een reactiviteit met antilichamen die anders is dan die van de bekende interferonen HL-IF en HF-IF.

(8) Fysicochemische eigenschappen.

Het molecuulgewicht van HE-IF bereid volgens deze uitvinding bleek bij bepaling volgens de gelfiltratie-methode ongeveer 25.000 te bedragen, wat in hoofdzaak

gelijk is aan dat van chymotrypsinogeen. Toen het isoëlektrische punt door elektroforese bepaald werd bleek dit 6,0 te bedragen.

(9) Adsorptie-eigenschappen.

Het HF-IF wordt sterk aan glaswerk geadsorbeerd en als een oplossing die HF-IF bevat herhaaldelijk in nieuwe glazen vaten overgeschonken wordt gaat veel van de werking door adsorptie aan het glas verloren. Daarentegen blijkt dit verschijnsel bij HE-IF niet op te treden.

Tabel 8

Aantal malen overschenken	Resterende activiteit van het HE-IF (eenheden per ml)
0	1500
1	1500
2	1500
4	1500
6	600

3. Kwantitatieve titratie van het interferon volgens de uitvinding.

Om de sterke virusremming van het nieuwe interferon HE-IF volgens deze uitvinding te bevestigen heeft uitvinder dezes een extra gevoelige methode voor de kwantitatieve bepaling van HE-IF met behulp van primaire amnion-cellen ontwikkeld.

Volgens de bekende techniek worden voor de kwantitatieve bepaling van menselijke interferonen FL-cellen (uit het amnion) of FS-cellen (fibroblasten uit de menselijke voorhuid) gebruikt, zonder aandacht voor de specificiteit van het interferon op deze cellen. In geen enkel geval werd voor een meer kwantitatieve bepaling een celsysteem gebruikt dat specifiek met dat interferon reageerde.

Uitvinder dezes heeft gedurende lange tijd uitgebreid onderzoek verricht om een celsysteem te vinden dat geschikt is voor de kwantitatieve bepaling van de

werking van HE-IF. Daardoor is nu gevonden dat primaire menselijke amnioncellen (hierna afgekort tot "PHA-cellen"), bereid door het kweken van afzonderlijke cellen die verkregen waren door amnion met trypsine te behandelen, een celsysteem vormen dat een verrassend hoge gevoeligheid voor HE-IF vertoont. Als virus werd VSV gebruikt. Hoewel er nooit enige vermelding van de bruikbaarheid van PHA-cellen voor het bepalen van interferon geweest is kunnen ze bij de nieuwe methode voor de kwantitatieve bepaling van het interferon volgens de uitvinding gebruikt worden. Deze kwantitatieve methode wordt nu in detail beschreven.

Een vers amnion wordt tot stukjes van geschikte grootte versneden, die op gebruikelijke wijze met 0,25 % trypsine-oplossing behandeld worden en daardoor in afzonderlijke cellen overgaan. Deze cellen worden afgescheiden door 10 minuten centrifugeren op 1000 rpm, en dan op een concentratie van 10^6 cellen per ml ingesteld met behulp van een kweekmedium voor M 199 waaraan 20 % kalverserum toegevoegd is. Dan wordt de celsuspensie verdeeld in porties van 1 ml over een plastic plaat (bijvoorbeeld de "Multi-well plate" met 12 platbodemputjes van de Linbro Sci. Co.). De plaat wordt 4 tot 5 dagen in een CO_2-incubator op 37°C gehouden, waardoor monolagen ontstaan. Het kweekmedium wordt dan afgezogen en het residu royaal met Hanks-oplossing uitgewassen. Vervolgens wordt in elk putje 1 ml interferon-oplossing (verdund met M 199 medium dat 2 % kalverserum bevat) gebracht, en men laat de reactie zich bij 37°C voltrekken. Na verwijdering van het interferon-monster door afzuigen wordt in elk putje 0,5 ml VSV-suspensie gebracht. In deze suspensie is het VSV zodanig met M 199 medium verdund dat men per putje 50 plaques zal krijgen. Nadat men het VSV 60 minuten bij 37°C heeft laten adsorberen wordt het VSV door uitwassen verwijderd, en wordt in elk putje 1 ml M 199 medium (pH = 7,2) dat 2 % kalverserum en 1,0 % agar bevat gebracht, en daarna wordt 2 dagen bij 37°C geïncubeerd. Dan wordt op elk putje 1:10.000 Neutraal Rood-oplossing gebracht, en telt men het aantal plaques. Hieruit berekent men het aantal malen verdunnen dat het aantal plaques ten opzichte van de blanco tot

50 % terug brengt.

Als de antivirale werking van HL-IF of HF-IF op deze wijze bepaald wordt vindt men een toename van de antivirale werking van slechts 1,8 tot 2,3 maal bij gebruik van FL-cellen of HEL-cellen (longfibroblasten uit menselijk embryo). Maar als anderzijds voor deze bepaling PHA-cellen gebruikt worden vindt men voor dit HE-IF 35 tot 100 maal zo hoge waarden als bij gebruik van HEL of HEL-R66 cellen (cellijn van longfibroblasten uit menselijk embryo) en ook 8 tot 20 maal zo hoog als bij gebruik van FL-cellen.

Deze methode kan dus gezegd worden een geschikte methode voor de kwantitatieve bepaling van HE-IF te zijn.

De uitvinding wordt nu nader toegelicht door de volgende specifieke voorbeelden.

Voorbeeld I

Een vers menselijk amnion werd tot stukjes van ongeveer 10 cm^2 verknipt en in contact gebracht met een NDV-suspensie, met een verhouding van 5 ml vloeistof per gram amnion. De gebruikte NDV-suspensie bevatte 160 tot 320 HA-eenheden/ml. Door 90 minuten schudden op 37°C werd het NDV aan de amnion-stukjes geadsorbeerd. Daarna werden de stukjes amnion naar een kweekmedium overgebracht, waarvan per gram amnion 10 ml gebruikt was. De incubatie gebeurde bij 37°C.

Als kweekmedium werd M 199 uit de handel gebruikt, waaraan geen serum toegevoegd was. In dit eerste voorbeeld werd medium met diverse toevoegingen vergeleken met een blanco waaraan niets toegevoegd was. Sommige toeslagen werden toegevoegd bij het begin van de incubatie, waarbij na 24 uur of na 48 uur monsters uit het kweekmedium getrokken werden, terwijl de toeslagen in andere gevallen 24 uur of 48 uur na het begin van de incubatie toegevoegd werden, met bemonstering van het kweekmedium na 48 uur of 72 uur.

In het kweekmonster werd de pH met 1N zoutzuur op 2,0 ingesteld, en dit werd 2 dagen op 4°C bewaard om het NDV te inactiveren. Daarna werd de pH met 1N NaOH op

7,0 ingesteld, en werd het monster bevroren en bij -70°C bewaard. De bevroren monsters werden vlak voor het meten ontdooid, wat een ruw monster HE-IF gaf, waarop dan de eerder beschreven activiteitbepaling toegepast werd. De resultaten zijn weergegeven in tabel 9.

Tabel 9

Toeslag	Concentratie	Tijd van toevoegen	Interferon-activiteit (eenh/ml) na 24 uur kweken	na 48 uur kweken	na 72 uur kweken
Niets			$1,5 \times 10^5$	$2,5 \times 10^5$	$2,2 \times 10^5$
Caffeïne	20 µg/ml	Bij het begin	$7,5 \times 10^5$		
Xanthine	10^{-1} mM	idem	$8,4 \times 10^4$	$1,1 \times 10^6$	$3,8 \times 10^5$
Alloxaan	10^{-1} mM	idem	$3,8 \times 10^5$	$8,4 \times 10^5$	$9,3 \times 10^5$
Indool-azijnzuur	10^{-2} mM	idem	$9,3 \times 10^4$	$9,2 \times 10^5$	$6,5 \times 10^5$
Indool	10^{-2} mM	idem	$4,1 \times 10^5$	$9,3 \times 10^5$	$9,0 \times 10^5$
		na 24 uur		$1,3 \times 10^6$	$3,8 \times 10^5$
Barbital	10^{-1} mM	Bij het begin	$2,8 \times 10^5$	$7,0 \times 10^5$	$3,0 \times 10^5$
Imidazool	10^{-1} mM	idem	$2,2 \times 10^5$	$3,8 \times 10^5$	$7,1 \times 10^5$
Carbazool	10^{-1} mM	idem	$2,3 \times 10^5$	$9,5 \times 10^5$	$2,0 \times 10^5$
Amantadine	10^{-1} mM		$2,2 \times 10^5$	$1,4 \times 10^6$	$5,3 \times 10^5$
ACTH	1 IE/ml	idem		$7,5 \times 10^5$	
Insuline	1 IE/ml	na 24 uur		$1,5 \times 10^6$	

Voorbeeld II

Toen stukjes amnion, die net als in voorbeeld I met NDV behandeld waren, 48 uur bij 37°C geïncubeerd waren, en vervolgens 72 uur bij 27°C, bleek de titer van het gevonden HE-IF hoger te zijn. De resultaten hiervan staan in tabel 10. Maar geen noemenswaard effect werd waargenomen na 24 uur incubatie op 37°C en vervolgens 72 uur op 27°C.

8120080

Tabel 10

Incubatie-temperatuur	Incubatietijd (uur)	Interferon-activiteit (eenh/ml) na 24 uur	na 48 uur	na 72 uur
37°C	0-72	$1,6 \times 10^5$	$2,8 \times 10^5$	$2,1 \times 10^5$
27°C	0-72	$2,1 \times 10^4$	$1,4 \times 10^4$	$2,1 \times 10^4$
37°C	0-48	$1,4 \times 10^5$	$2,8 \times 10^5$	-
27°C	48-72	-	-	$1,3 \times 10^6$
37°C	0-24	$1,6 \times 10^5$	-	-
27°C	24-72	-	$1,3 \times 10^5$	$3,0 \times 10^4$

Toen deze incubatie uitgevoerd werd onder toevoeging van stoffen zoals insuline, indool, alloxaan, indoolazijnzuur, barbituraat, amantadine, imidazool, carbazool, enz. bleek de titer van het HE-IF nog hoger te liggen; de resultaten hiervan staan in tabel 11. De incubatie was 48 uur bij 37°C en daarna bij 27°C.

Tabel 11

Toeslag (conc.)	Toegevoegd na ...uur	Interferon-activiteit (eenh./ml) na 24 uur	na 48 uur	na 72 uur
Niets		$1,4 \times 10^5$	$2,8 \times 10^5$	$1,3 \times 10^6$
Insuline	0	$1,9 \times 10^5$	$3,8 \times 10^5$	$2,9 \times 10^6$
(1 U/ml)	24	-	$4,3 \times 10^5$	$2,8 \times 10^6$
Indool	0	$4,0 \times 10^5$	$7,5 \times 10^6$	$9,0 \times 10^5$
(10^{-2} mM)	24	-	$3,1 \times 10^6$	$6,3 \times 10^5$

Voorbeeld III

Een vers amnion werd tot stukjes van geschikte grootte gesneden, die daarna op gebruikelijke wijze met 0,25 % trypsine-oplossing behandeld werden zodat ze tot afzonderlijke cellen gedispergeerd werden.

De cellen werden door 10 minuten centrifugeren op 1000 rpm verzameld en dan gesuspendeerd in kweek-

8120080

media die uit het in de handel verkrijgbare MEM medium van Eagle (zonder serum) bestonden waaraan 20 µg/ml caffeïne of niets toegevoegd was, tot concentraties van 4 x 10^7 cellen per ml.

Aan deze celsuspensies werden gelijke hoeveelheden NDV-suspensie (160 tot 320 HA-eenheden per ml) toegevoegd. Elk mengsel werd daarna 60 minuten langzaam geschud zodat het NDV en de amnion-cellen kon absorberen.

Daarna werd elk proefmedium bijgeregeld zodat het nu 5 x 10^6 cellen per ml bevatte, en het kweken bij 37°C onder langzaam schudden werd 24 uur voortgezet. Door afcentrifugeren werden de bovenstaande vloeistoffen afgescheiden en deze werden op dezelfde wijze als in voorbeeld I geïnactiveerd, en dan in bevroren toestand bewaard. In deze produkten werd de interferon-werking op de hierboven beschreven wijze bepaald, en daarbij bleek de activiteit 6 x 10^4 eenheden/ml te bedragen in kweekvloeistof zonder toeslag en 4,5 x 10^5 eenheden/ml in kweekstof met toeslag.

Voorbeeld IV

Op de in voorbeeld II beschreven wijze werd een suspensie van amnioncellen aangemaakt. De afzonderlijke cellen werden door 10 minuten centrifugeren op 1000 rpm verzameld, en daarna tot een concentratie van 3 x 10^6 cellen/ml gesuspendeerd in een medium bestaande uit in de handel verkrijgbaar M 199 medium (pH = 7,0) waaraan 20 % kalverserum toegevoegd was. De vaatjes werden met rubberstoppen afgesloten en het kweken gebeurde gedurende 5 dagen bij 37°C, zodat monolagen ontstonden. Nadat het medium door afzuigen verwijderd was werden de cellen beënt met 5 ml NDV-suspensie (160 tot 320 HA-eenheden/ml) en men liet de mengsels 60 minuten op 37°C staan zodat het NDV aan de amnioncellen kon adsorberen. Na verwijdering van de NDV-suspensie werd 70 ml uit de handel verkrijgbaar M-199 medium (pH = 7,2) toegevoegd dat of geen serum of 10 % kalverserum bevatte, en het kweken werd 24 uur bij 37°C voortgezet. De kweekmedia werden nu verzameld en onder koelen 10 minuten op 1000 rpm gecentrifugeerd, zodat de cellen ver-

wijderd werden. Dit werd gevolgd door inactivering van het NDV zoals beschreven in voorbeeld I. Bepaling van de interferon-werking op de eerder beschreven methode gaf als resultaat $7,5 \times 10^3$ eenheden/ml voor het medium zonder serum en $1,0 \times 10^5$ eenheden/ml voor het medium met 10 % kalverserum.

Voorbeeld V

Van een kweekmedium bereid zoals beschreven in voorbeeld I werd 100 ml geadsorbeerd aan een kolom gevuld met 1 ml SP-Sephalose (Pharmacia, Inc.), en na uitwassen met water werd dit geëlueerd met een oplossing die 0,01 M $NaHPO_4$ en 0,135 M NaCl bevatte (pH = 8,3). De werkzame fracties werden opgevangen en de interferon-activiteit van het kweekmedium bleek 10^4 eenheden/ml te bedragen, zoals bepaald met de methode van 50 % verlaging van de VSV-plaque-vorming bij gebruik van FL-cellen. De specifieke activiteit van het kweekmedium, dat 700 µg/ml aan eiwitten bevatte, was $1,4 \times 10^4$ eenheden per mg eiwit, wat in het eluaat opgevoerd kan worden tot $2,1 \times 10^5$ eenheden per mg eiwit, dus 15 maal zo hoog.

Voorbeeld VI

Van het in voorbeeld IV verkregen kweekmedium werd 100 ml geadsorbeerd aan een kolom die gevuld was met 1 ml Blauw Sephalose (Pharmacia, Inc.) en dit werd geëlueerd met een mengsel van gelijke hoeveelheden 0,02 M $NaHPO_4$ en 1,0 M NaCl in water en ethyleenglycol, met pH = 7,2. Deze elutie werd gevolgd door opvangen van de werkzame fracties. Door deze bewerking werd de specifieke activiteit met een factor 70 verhoogd, te weten tot $1,0 \times 10^6$ eenheden per mg eiwit (bepaald op dezelfde wijze als in voorbeeld IV).

Industriële toepasbaarheid.

Zoals uit het voorafgaande duidelijk zal zijn is het uit menselijk amnion afkomstige interferon volgens deze uitvinding zeer stabiele en heeft het bovendien een hoge werking bij het remmen van virusgroei, en dus heeft men hoge verwachten betreffende de toepasbaarheid, vooral tegen ziekten zoals virusinfecties en kwaadaardige gezwellen, waarvan de oorzaken in de epitheelcellen gezocht moeten worden. Een

typisch voorbeeld van menselijke epitheelcellen, namelijk het amnion, is betrekkelijk gemakkelijk verkrijgbaar en kan gebruikt worden voor de produktie van interferon met hoge titer.

8120080

Conclusies

1. Een nieuw interferon dat in menselijke epitheelcellen gevormd wordt, in menselijke epitheelcellen een zeer sterke anti-virale werking vertoont en zich onderscheidt van het interferon uit menselijke leukocyten en menselijke fibroblasten door zijn reactiviteit met bekende antilichamen.

2. Interferon volgens conclusie 1, dat in menselijke amnion-cellen, epitheelcellen van menselijke amnionvloeistof of epitheelcellen van menselijke nieren gevormd wordt.

3. Werkwijze voor de bereiding van een interferon, bestaande uit het in contact brengen van menselijke epitheelcellen met een interferon-uitlokker en het dan incuberen van deze epitheelcellen in een kweekmedium in aanwezigheid of afwezigheid van serum, waardoor een intereferon met een zeer hoge anti-virale werking in menselijke epitheelcellen gevormd wordt.

4. Werk-wijze voor het bereiden van een interferon overeenkomstig conclusie 3, waarbij de menselijke epitheelcellen menselijke amnioncellen, epitheelcellen uit menselijke amnionvloeistof of epitheelcellen uit menselijke nieren zijn.

5. Werkwijze voor het bereiden van een interferon volgens conclusie 3, waarbij de interferon-uitlokker een virus is.

6. Werkwijze voor het bereiden van een interferon volgens conclusie 3, waarbij aan het medium een hypofyse-hormoon, insuline, een xanthine-derivaat, alloxaan, indool, indoolazijnzuur, barbituraat, amantadine, imidazool of carbazool toegevoegd wordt.

7. Werkwijze voor het bereiden van een interferon volgens een der conclusies 3 t/m 6, waarbij de incubatie 38 tot 58 uur bij 37°C gebeurt en daarna bij 27 $\pm$ 2°C.

19 NOV 1981

Verbetering van errata in de beschrijving behorende bij de octrooiaanvrage Reg.No. 116.601 voorgesteld door aanvrager dd. 19 NOV. 1981

Vervang in blz. 1, regel 22 "in lage opbrengst" door "met lage werking".

Voeg in blz. 4, regel 16 achter "bestanddelen" in "of produkten".

Voeg in blz. 6, regel 36 achter "krijgen door" in "éénmalige".

Vervang in blz. 8, regel 25 "interferon-" door "antivirale".

Voeg in blz. 8, regel 29 toe "De uitkomsten staan in tabel 3".

Verander in blz. 11, regels 29-30 "volgende tabel" in "tabel 6".

Vul in blz. 13, regel 6 "serum" aan tot "kalverserum".

Vul in blz. 13, regel 10 "putjes" aan tot "platbodem-putjes".

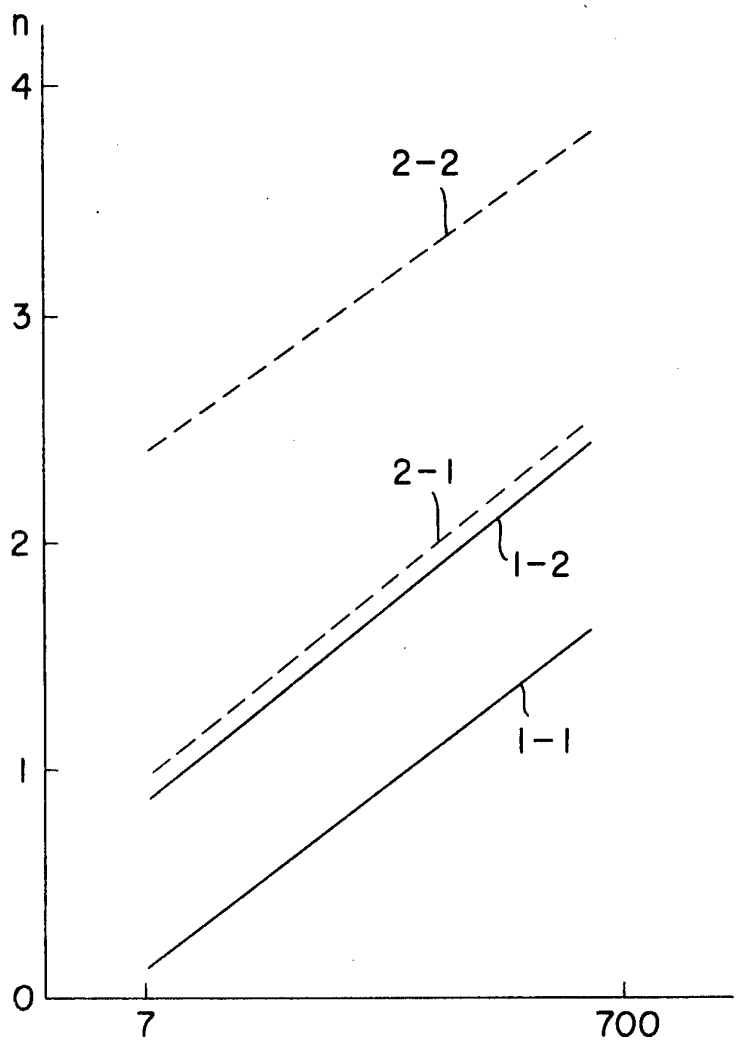
Vervang in blz. 15, regel 2 "hierna" door "hier meestal".

Schrap in blz. 16, regels 5-6 "(longfibroblasten uit menselijk embryo)" en in blz. 16, regels 8-9 "(cellijn van longfibroblasten uit menselijk embryo)".

Vervang in blz. 19, regel 32 "70" door "7,0".

JKr/JvdB

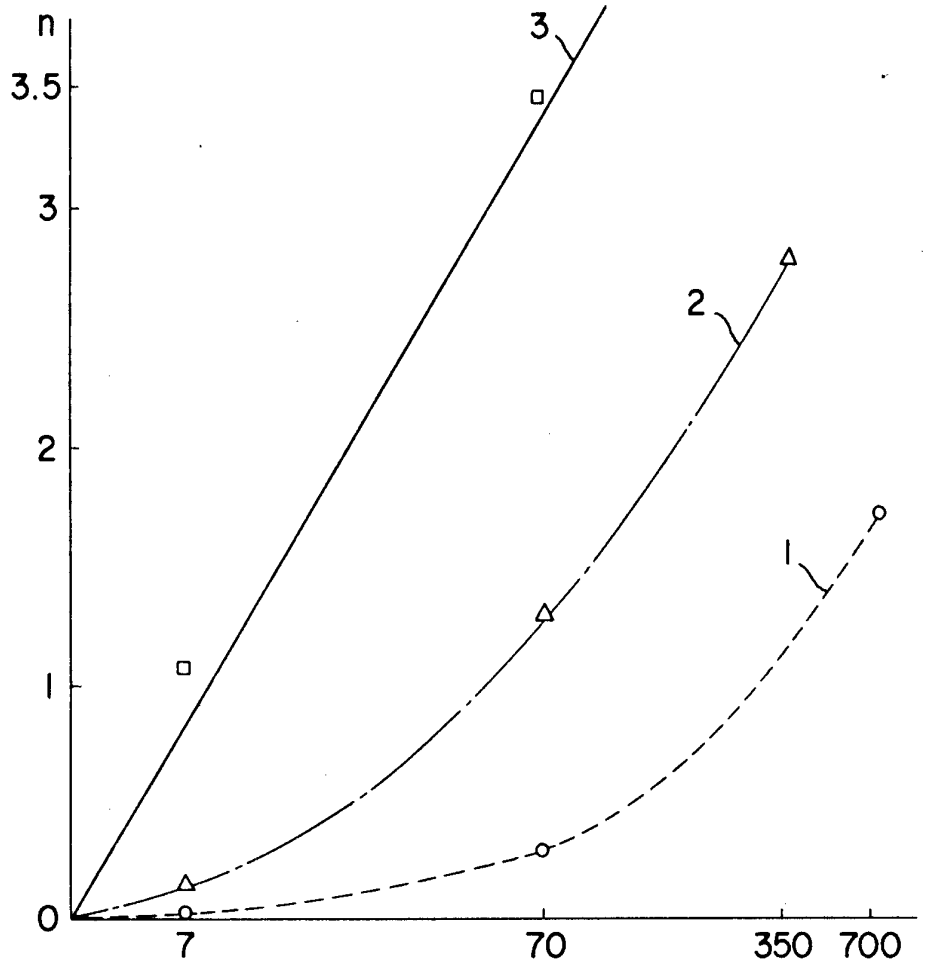
FIG. 1



Taguchi Fumiaki, Sagamihara-Shi, Japan

8120080

FIG. 2



Taguchi Fumiaki, Sagamihara-Shi, Japan

8120080