



SUOMI-FINLAND
(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(B) (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLAGGNINGSSKRIFT

80600

C (15) Patenti myöntöty
Patentgranskning 10 07 1980
(51) Kv.1k.5 - Int.cl.5

A 61K 39/00

(21) Patenttihakemus - Patentansökning	833748
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	14.10.83
(24) Alkuperäpäivä - Löpdag	14.10.83
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	19.04.84
(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	30.03.90
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	
18.10.82 SE 8205892	

(71) Hakija - Sökande

1. Morein, Bror, Krokusvägen 14, Järfälla, Sverige, (SE)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Morein, Bror, Krokusvägen 14, Järfälla, Sverige, (SE)

(74) Asiamies - Ombud: Oy Kolster Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä immunogeenisen proteiini- tai peptidikompleksin valmistamiseksi
Förfarande för framställning av immunogent protein- eller peptidkomplex

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

EP A 37931 (C 12 N 7/00), EP A 58021 (A 61 K 39/35), GB C 1083815 (A 61 K 3/00)

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö koskee menetelmää immunogeenisen kompleksin valmistamiseksi, joka kompleksi sisältää tällöin viruksista, mykoplasmaasta, bakteereista, parasiiteista tai eläinsoluista saatuja tai synteettisesti tai hybridi- DNA-tekniikalla valmistettuja antigeenisia proteiineja tai peptidejä sekä glykosidin. Menetelmässä proteiinit ja peptidit, mikro-organismit tai eläinsolut sekoitetaan liuottavan aineen kanssa puskuroidussa, mahdollisesti suolapitoisessa liuoksessa, jolloin kompleksi muodostuu varattujen, monomeeristen antigeeniproteiinien tai -peptidien sekä liuottavan aineen välille, jonka jälkeen varatut, monomeeriset antigeeniproteiinit tai -peptidit erotetaan liuottavasta aineesta glykosidi-liuoksen läsnäollessa tai ne erotetaan liuottavasta aineesta ja viedään glykosidiliuokseen, joka sisältää yhden tai useampia glykosideja, joissa on hydrofobisia ja hydrofiilisiä alueita, vähintään kriittisen misellikonsentraation konsentraationa, jolloin muodostuu proteiinikompleksi, joka eristetään ja puhdistetaan.

Uppfinningen avser förfarande för framställning av ett immunogent komplex innehållande antigena proteiner eller peptider från virus, mykoplasma, bakterier, parasiter eller djurceller eller framtällda syntetiskt eller med hybrid DNA-teknik och en glykosid, varvid proteinerna eller peptiderna, mikroorganismerna eller djurcellerna blandas med solubiliseringsmedel i buffrad eventuellt salthaltig lösning, varvid komplex bildas mellan laddade monomera antigena proteiner eller peptider och solubiliseringsmedel, varefter de laddade monomera antigena proteinerna eller peptiderna separeras från solubiliseringsmedel i närvaro av en glykosidlösning eller separeras från solubiliseringsmedel och direkt överföres till en glykosidlösning, som innehåller en eller flera glykosider med hydrofoba och hydrofila regioner i en koncentration av minst den kritiska micellära koncentrationen, varvid ett proteinkomplex bildas, som isoleras och renas.

Menetelmä immunogeenisen proteiini- tai peptidikompleksin valmistamiseksi

5 Esillä oleva keksintö koskee menetelmää immunogeenisen kompleksin, joka sisältää antigeenisia proteiineja tai peptidejä, joissa on hydrofobisia alueita, jolla kompleksilla on avoin pallomainen rakenne, jonka muodostavat pyöreät alayksiköt tai pallomaisen rakenteen osat, ja jolla kompleksilla yleensä on alempi sedimentaatiovakio kuin
10 vastaavilla miselleillä ja suurempi sedimentaatiovakio kuin proteiinin tai peptidin vastaavalla monomeerisellä muodolla, valmistamiseksi amfipaattisista proteiineista tai peptideistä tai niitä sisältävistä viruksista, bakteereista, mykoplasmoista, parasiiteista tai eläinsoluista.

15 Glukosidien sekä viruksista, mykoplasmaista, bakteereista, parasiiteista tai eläinsoluista peräisin olevien proteiinien ja peptidien välinen keksinnön mukaisesti valmistettu immunogeeninen kompleksi on ns. "iskomi". Sitä voidaan käyttää immuunimekanismia stimuloivana aineena
20 sekä rokotteenä.

On tunnettua, että tapetuilla viruksilla, esimerkiksi influenssaviruksilla on hyvä antigeenivaikutus. Ne ovat kuitenkin pyrogeenejä myös korkeatasoisen puhdistuksen jälkeen. Eristämällä komponentteja, jotka ovat tärkeitä
25 suojaavan immunitetin aikaansaamisessa, on vältetty pyrogeenivaikutus, mutta immunogeenisuus ei useinkaan ole riittävän voimakas. Siksi rokotteeseen täytyi sisällyttää immuunivasteen lisäämiseksi sopivaa adjuvanttia, joka sisältää eristettyjä antigeenejä (alayksiköitä). Toisaalta
30 tehokas adjuvantti aiheuttaa siten käytettynä kuin sitä on tähän mennessä käytetty, kielteisiä sivuvaikutuksia. Adjuvanttipitoinen rokote ei ole siksi parempi kuin rokote, joka pohjautuu koko virukseen, kun on kysymys pyrogeenisista vaikutuksista.

Immunogeenisuuden lisäämiseksi on valmistettu detergenttipitoisia membraaniproteiineja, jotka on sijoitettu liposomeihin tai kiinnitetty liposomien pintaan (EPC-hakemus 794 008 30.0). Detergenttejä sisältämättömiä membraaniproteiineja liposomeissa kuvataan US-patenttijulkaisussa 4 148 876. Adjuvantin liittämistä sellaisiin detergentittömiin yksikerroksisiin liposomituotteisiin mainitaan US-patenttijulkaisussa 4 196 197 (selvittämättä sen vaikutusta). US-patenttijulkaisussa 4 117 113 kuvataan negatiivisesti varattuja liposomeja sisältäviä virusantigeenejä. Adjuvantin, mykobakteerien soluseinämien liittäminen liposomeihin, jotka sisältävät influenssahemagglutiinimia ja neuramidaasia johtaa parempaan immuunivasteeseen. Saadaan myös parempi immuunivaste, kun adjuvantti, kuten tapettu Mycobacterium tuberculosis tai Bortedella pertussis ja saponiineja viedään sellaisiin negatiivisesti varattuihin liposomeihin, jotka sisältävät difteritoksidia (US-patenttijulkaisu 4 053 585). Kaikki edellä mainitut lipidipitoiset membraaniproteiinituotteet ovat kuitenkin epästabiileja pitempään säilytettäessä, jäähdytyskuivauksen yhteydessä tai varomattomasti käsiteltäessä esimerkiksi korkeassa lämpötilassa.

Rokotteeksi on myös valmistettu proteiinimisellejä, jotka ovat lipidittömiä ja joissa ei ole detergenttejä. On osoitettu, että Semliki Forest-viruksen (SFV) membraaniproteiinien misellit stimuloivat kiertävien SFV:n vasta-aineiden muodostumista sekä antavat hiirellä suojaa SFV:n kuolettavaa infektiota vastaan. Toisaalta eivät sellaiset parainfluenssa-3-viruksen membraaniproteiinimisellit olleet tehokkaita, kun oli kysymys vasta-aineen muodostuksen stimuloimisesta lampaalla tai keuhkokuumeen aiheuttavan PI-3-kannan annoksen vastaisesta suojasta, ellei öljyadjuvanttia oltu sekoitettu misellien kanssa. Öljyadjuvantti antaa useimmiten sivuvaikutuksia, jotka ilmenevät paikallisten reaktioiden muodossa injektio kohdassa (EPC-hakemus

811 022 13.6). Kyseessä olevan keksinnön tarkoituksena on välttää näitä haittoja sekä aikaansaada säilytyksen kestävä proteiini- tai peptidikompleksi, jolla on voimakas immunogeenisuus ilman sivuvaikutuksia. Tämä saavutetaan muodostamalla lipiditön kompleksi viruksista, mykoplasma-
5 bakteereista, eläinsoluista tai parasiiteista peräisin olevien proteiinien ja peptidien hydrofobisten alueiden sekä hydrofobisten ryhmien välille, jotka sijaitsevat yhdessä tai useammassa glykosidissa.

10 Keksinnön mukaiselle menetelmälle on tunnusomaista, että sekoitetaan vähintään yksi edellä mainituista komponenteista vähintään yhden liuottavan aineen kanssa, jolloin komplekseja muodostuu amfipaattisten antigeenisten proteiinien tai peptidien ja liuottavan aineen välillä,
15 minkä jälkeen amfipaattiset antigeeniset proteiinit tai peptidit erotetaan liuottavasta aineesta, liuottavan aineen läsnäollessa tai erotettuna liuottavasta aineesta, ja ne siirretään suoraan liuokseen, jossa on vähintään yksi triterpeenisaponiini, jossa on hydrofobisia ja hydro-
20 fiilisiä alueita pitoisuudessa, joka on vähintään kriittinen misellipitoisuus (CMC).

Uudella kompleksilla on toinen morfologinen rakenne elektronimikroskoopissa kuin vastaavalla proteiinimisellillä, joka valmistetaan ilman glykosidilisäystä. Miselleillä on tiivis keskusydin säteittäin järjestynein haarakkein, kun taas keksinnön mukaisesti valmistetuilla
25 komplekseilla on avoin pallomainen rakenne, joka koostuu pyöreistä alayksiköistä tai pallomaisen rakenteen osista. Kompleksilla ja sen osilla on edelleen säännöllisesti
30 alempi sedimentaatiovakio (kts. kuva 2) kuin vastaavilla miselleillä ja korkeampi sedimentaatiovakio kuin proteiinin tai peptidin vastaavilla monomeerimuodoilla.

Kompleksilla, joka on valmistettu glykosidilisäyksen kanssa, on parempi immunogeeniaktiivisuus kuin vastaavilla proteiinimiselleillä, jotka on valmistettu ilman
35

glykosidilisäystä, tai proteiinimolekyylin ja liuottavan aineen välisellä (monomeerimuotojen) kompleksilla tai lipidiin sidotuilla proteiinimolekyyleillä, esim. viroso-meilla; ja se antaa vähemmän sivuvaikutuksia kuin se, että
5 proteiinimisellejä sekoitetaan glykosidien tai uuden adjuvantin kanssa. Täten voidaan membraaniproteiinien annosta vähentää noin 1/10:aan tai enemmän.

Proteiinit tai peptidit, joissa on hydrofobisia alueita, jotka kompleksisidotaan glykosideissa sijaiseviin
10 hydrofobisiin alueisiin, voivat olla:

A) amfipaattisia proteiineja tai peptidejä hydrofiilisin ja hydrofobisin ryhmin, jotka ovat peräisin tai jotka valmistetaan vaipallisten virusten, mykoplasman, bakteereiden, parasiittien tai eläinsolujen membraaniproteiineista tai -peptideistä tai sellaisista proteiineista
15 tai peptideistä;

B) hydrofiilisiä proteiineja tai peptidejä, jotka tehdään amfipaattisiksi kytkemällä niihin hydrofobisia ryhmiä. Nämä proteiinit tai peptidit voivat olla peräisin
20 viruksista, mykoplasmosta, bakteereista tai parasiiteista;

C) amfipaattisia proteiineja tai peptidejä, jotka on saatu siten, että hydrofiilisten proteiinien saavuttamattomissa olevia hydrofobisia osia on kemiallista tietä
25 tehty luoksepäästäviksi. Nämä proteiinit voivat olla peräisin edellä mainituista mikro-organismeista tai soluista.

a) Kun on kysymys kokonaisista soluista tai viruksista peräisin olevista membraaniproteiineista tai -peptideistä, kompleksin valmistus käsittää periaatteessa seuraavat vaiheet: eläinsolujen tai mikro-organismien tai niiden fragmenttien puhdistus tai eristäminen; sekä hydrofobisten proteiinien liuottaminen sekä liuottajan poistaminen, kun samanaikaisesti haluttu antigeeni saatetaan
30

kompleksiin immunogeenimuodossa olevan glykosidin välityksellä (immunogeenikompleksi).

Vaipalla varustettu virus, mykoplasma, bakteerit, parasiitit ja eläinsolut konsentroidaan ja puhdistetaan tunnetulla tavalla (kts. The Tools of Biochemistry, T. G. Cooper, John Wiley & Sons (1977) New York; joka sisällytetään viitteenä) esimerkiksi suodatuksen, ultrasuodatuksen tai elektroforeesin ja erilaisten kromatografisten menetelmien avulla, esimerkiksi geelisuodatuksen tai sokerigradientin kautta suoritetun gradienttisentrifugoinnin tai ontelokuitudialyysin avulla. Kun on kysymys bakteereista, voi olla tarpeellista tai edullista ensin liuottaa tai lyödä soluseinämät rikki (kts. Cota-Robles ja Stein; CRC Handbook of Microbiology, osa II (1973), ss. 833 - 844; joka sisällytetään viitteenä tässä yhteydessä) esimerkiksi ultraääni- tai ranskalaista puristinkäsittelyä käyttäen.

Puhdistetut eläinsolut, mikro-organismit tai niiden fragmentit sekoitetaan tämän ionittoman, ionisen tai zwit-ter-ionidetergentin tai sappihappojohdannaisen detergentin kanssa, jota käytetään ylimäärin. Tyypillisiä esimerkkejä sopivista, ionittomista detergenteista ovat polyglykoli-esterit ja -eetterit, jotka on muodostettu alifaattisten ja aralyylifaattisten happojen ja alkoholien kanssa. Näistä ovat esimerkkejä alkyyl-, polyoksietyleenieetterit, joiden yleinen kaava on $C_n H_{2n+1} (OCH_2 CH)_x OH$, lyhennettynä $C_n E_x$; alkyylipolyoksietyleenieetterit, joissa on fenyyli-rengas alkyyliryhmän ja polyoksietyleeniketjun välillä, lyhennettynä $C_n \phi E_x$, esim. Triton X-100 = tert.- $C_8 \phi E_{9.6}$ (polyoksietyleenioksidin oktyylifenolieetteri), asyylipolyoksiesterit, asyylipolyoksietyleenisorbitaaniesterit, lyhennettynä C_n -sorbitaani- E_x , esim. Tween 20 tai Tween 80, β -D-alkyyli-glykosidit, esim. β -D-oktyyli-glykosidi. Edellä mainittujen glykosidien rinnalla voidaan käyttää varsinkin saponiinia. Nämä ovat kuitenkin heikkoja detergenttejä, ja niitä tulee käyttää yhdessä muiden de-

tergenttien kanssa. Sopivien ionisten detergenttien tyyppillisiä esimerkkejä ovat sappihappodetergentit, kuten esimerkiksi deoksikolaatti ja kolaatti. Voidaan käyttää myös konjugoituja detergenttejä, kuten esim. taurodeoksikolaattia, glykodeoksikolaattia sekä glykokolaattia. Zwitter-ionisina detergentteinä voidaan mainita lysolesitiini sekä synteettiset lysofosfidit. Voidaan käyttää myös edellä mainittujen detergenttien seoksia.

10 Liuottaminen voidaan suorittaa alkoholien, orgaanisten liuottimien tai pienten amfipaattisten molekyylien, kuten heptaani-1,2,3-triolin, heksaani-1,2,3-triolin, etikkahapon, vesiliukoisten peptidien ja proteiinien tai niiden seosten tai detergenttien kanssa.

15 Liuotinta käytetään ylimäärin suhteessa lipidin ja hydrofobisten proteiinien määrään. Soluja tai mikro-organismeja sekä liuottavaa ainetta sekoitetaan sopivasti painosuhteessa 1:3 - 1:10.

Solut tai mikro-organismit sekä liuotin sekoitetaan puskuroidussa, mahdollisesti suolapitoisessa liuoksessa. 20 Suolaliuoksen molaarisuus on välillä 0,02 ja 0,5 M, etupäässä välillä 0,05 - 0,25 M, edullisesti 0,1 - 0,2 M. Detergentin tulee vaikuttaa noin 1 tunnin ajan huoneen lämpötilassa.

25 Keittosuolaa pidetään edullisena suolana, mutta myös muut suolat voivat tulla kysymykseen, etenkin alkali- ja maa-alkali- sekä ammoniumionien sekä voimakkaiden mineraalihappojen ja orgaanisten happojen, kuten etikkahapon, trikloorietikkahapon, muurahaishapon ja oksaalihapon muodostamat suolat. Puskureiksi soveltuvat kaikki aineet, 30 jotka puskuroituvat pH-alueella 6,5 - 9. Kolaatteja ja deoksikolaatteja käytettäessä pidetään edullisina pH-alueetta 8 - 9 ja ionittomia detergenttejä käytettäessä pH-arvoa 7,4. Käytettäessä orgaanisia happoja proteiinien liuottamiseen, voidaan puskuri jättää pois.

Soluja tai mikro-organismeja liuotettaessa muodostetaan seos liuottimesta ja solu- tai mikro-organismifragmenteista (alla mainitut fragmentit). Fragmenttien joukossa on varattuja, monomeerisiä antigeeniproteiineja, joissa on hydrofobisia alueita liuottimien kanssa muodostetussa kompleksissa. Uusi immunogeenikompleksi valmistetaan siten, että varatut monomeeriset antigeeniproteiinit erotetaan liuottimesta yhden tai usemman glykosidin läsnäollessa tai liitetään suoraan niihin, jolloin glykosideilla tulee olla hydrofobisia ja hydrofiilisiä alueita ja niiden tulee esiintyä konsentraationa, joka on vähintään kriittinen misellien konsentraatio. Muut fragmentit poistetaan ennenkuin kompleksi valmistetaan keksinnön mukaisesti, samalla kun se valmistetaan tai jälkeen päin, mieluummin kuitenkin ennen.

Kompleksi voidaan valmistaa joko siten, että liuotettava aine poistetaan esimerkiksi dialyysin, geelisuodatuksen tai kromatografoinnin avulla seoksesta, jonka muodostavat liuotettava aine, varatut, monomeeriset antigeeniproteiinit, glykosidi sekä mahdollisesti muut fragmentit, tai erottamalla varatut, monomeeriset antigeeniproteiinit mainitusta seoksesta esimerkiksi gradienttisentrifugoinnin, kromatografian tai elektroforeesin avulla. Olennaista keksinnön mukaan on se, että monomeeriset antigeeniproteiinit erotetaan liuottavasta aineesta, siten, että samanaikaisesti on läsnä glykosidi, tai sitten ne erottamisen jälkeen liitetään suoraan glykosidiin, jonka tulee olla misellimuodossa.

Kun monomeeriset antigeeniproteiinit erotetaan liuottavasta aineesta niin, että ne voivat joutua suoraan kosketukseen glykosidin kanssa, muodostuu erikoiskompleksi. Glykosidin misellimuodon oletetaan muodostavan kompleksin, ja oletetaan, että tämä muodostuu glykosidimisellien hydrofobisten alueiden ja membraaniproteiinien hydrofobisten alueiden välisen vetovoiman avulla. Glykosidin

määrä kompleksissa vaihtelee riippuen käytetystä glykosidista ja kompleksiin sidotuista membraaniproteiineista, ja sitä on noin 0,5 - 50 paino-%, erityisesti 0,5 - 25 paino-%, etupäässä 0,5 - 15 paino-%, usein 0,5 - 10 paino-%, erityisesti 2 - 8 paino-%. Jos varatut antigeeniset monomeeriset proteiinit erotetaan liuottavasta aineesta glykosidin poissaollessa, muodostuu sitä vastoin proteiinimisellejä, jotka ovat sen laatuksia kuin hakemuksen EPC 811 022 13.6 mukaan valmistetaan.

10 On sopivaa poistaa muut fragmentit gradienttisentrifugoinnin avulla, koska mainittujen komponenttien sedimentaatiovakiot pienenevät seuraavassa järjestyksessä: solufragmentti, proteiinikompleksi liuottavan aineen tai glykosidin kanssa, monomeeriset proteiinit sekä liuottava aine. Täten voidaan muut fragmentit poistaa gradienttisentrifugoinnin avulla seoksesta, jossa on liuotin, monomeerisiä proteiineja sekä muita fragmentteja, ennen kuin glykosidi lisätään ja liuotin poistetaan esim. dialyysin, geelisuodatuksen tai kromatografian avulla, tai monomeeriset proteiinit erotetaan liuottavasta aineesta esim. elektroforeesin, kromatografian tai gradienttisentrifugoinnin avulla. Jälkimmäisessä menetelmässä on myös mahdollista poistaa muut fragmentit saman gradienttisentrifugoinnin avulla, jona aikana kompleksi muodostuu. On myös mahdollista erottaa muut solukomponentit, sen jälkeen, kun 25 kompleksi muodostetaan edellä esitetyllä tavalla, esim. sentrifugoinnin, affiniteettikromatografian tai geelisuodatuksen avulla.

30 Glykosidi on triterpeenisaponiini. Saponiineja kuvataan R. Tschesche'n ja Wulf'in julkaisussa Chemie und Biologie der Saponine; Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe, julk. W. Herz, H. Grisebach ja G. W. Kirby, nidos 30 (1973). Edullisesti käytetään voimakkaasti polaarisia saponiineja, etupäässä polaarisia triterpeenisaponiineja, esim. saponiiniuutetta, joka on saatu kurillajan 35

kuorien aralosidi A:sta, Chikusetsu-saponiini IV:stä, Calendula-glykosidi C:stä, Chikusetsu-saponiini V:stä, Achyranthes-saponiini B:stä, Calendula-glykosidi A:sta, Aralosidi B:stä, Aralosidi C:stä, Putranjia-saponiini

5 III:sta, Bersama-saponosidista, Putranjia-saponiini IV:stä, Trichosid A:sta, Trichosid B:stä, Saponasid A:sta, Trichosid C:stä, Gyposidista, Nutanosidista, Dianthosid C:stä, Saponasid D:stä, etupäässä aeschiini, joka on saatu Aesculus hippocastanum'ista [T. Patt ja W. Winkler: Der

10 therapeutisch wirksame Prinzip der Rosskastanie (Aesculus hippocastanum), Arzneimittelforsch. 10 (4), (1969), ss. 273 - 275], tai sapoalbiini, joka on saatu Gypsophilla struthium'ista [R. Vochten, R. Joos ja R. Ruyssen: Physi-

15 cochemical properties of sapoalbin and their relation to the foam stability, J. Pharm. Belg. 42, (1968), ss. 213 - 226], etenkin saponiiniuute, joka on saatu Quillaja saponaria Molina'sta, ensisijaisesti DQ-uute, joka valmis-

20 tetaan K. Dalsgaard'in mukaan [Saponin Adjuvants, Bull. Off. Int. Epiz 77 (7 - 9), (1972), ss. 1289 - 1295], sekä Quil A, jota valmistetaan K. Dalsgaard'in mukaan [Saponin Adjuvants III, Archiv für die Gesamte Virusforschung 44, (1974), ss. 243 - 254]. Voidaan myös käyttää glykosidien

25 seoksia. Käytettyjen glykosidien määrän tulee olla vähintään 1 - 3 kertaa niiden kriittinen misellinmuodostamiskonsentraatio (VMC), etupäässä vähintään 5, etenkin vähintään 7 - 12 kertaa tämä määrä. Oletetaan, että glykosidi voidaan siinä tapauksessa sitoa membraaniproteiinien mono-

30 meerimuotoihin ja sulkea niiden sisään. Edullisesti käytetään Quil A:ta, jonka kriittinen misellinmuodostamiskonsentraatio on 0,03 paino-%. Quil A:n määrän tulee olla vähintään 0,02 paino-%, varsinkin 0,05 - 0,5 paino-%, etupäässä 0,2 paino-%. Edellä esitettyjä glykosideja koskevat julkaisut sisällytetään viitteinä.

Varattujen, monomeeristen antigeeniproteiinien erottaminen liuottavasta aineesta on suoritettu sentrifugoinnin, dialyysin, elektroforeesin sekä erilaisten kromatografisten menetelmien avulla.

5 Edellä esitetyllä tavalla valmistetut seokset, joissa on pirstottuja soluja vastaavia mikro-organismeja sekä liuottavaa ainetta, gradienttisentrifugoidaan ja kerrostetaan esimerkiksi liuottavan aineen sisältävän sokeri- tai suolaliuoksen päälle, jonka alla on glykosidin sisäl-
10 tävä gradientti, kuten sokerigradienetti tai glyseroligra-
dientti tai meritseamidi tai raskassuola, esim. CsCl (ts. suhteellisen inerttejä aineita, joilla on sopiva tiheys ja viskositeetti vaikuttaakseen gradienttimateriaalina) esim. jäljempänä sokerigradienentille annettuina konsentraa-
15 tioina.

Gradientti-järjestelmää sentrifugoidaan vähintään 100 000 g. Sokerina voivat olla monosakkaridit tai disakkaridit, kuten laktoosi, maltoosi tai sakkaroosi, mutta myös triooseja, tetrooseja sekä glyseriiniä käytetään.
20 Etupäässä käytetään sakkaroosia. Gradientin sokerikon-
sentraation sopiva alkukonsentraatio on vähintään 5, etupäässä 15 - 25 paino-% (ylinnä gradientissa) ja loppukon-
sentraatio on vähintään 20, etupäässä 45- 60 paino-% (gra-
dientissa alimpana). Gradientti voi koostua esimerkiksi
25 ylemmästä kerroksesta, jonka sokeripitoisuus on 5 - 25
paino-% ja alemmasta kerroksesta, jonka sokeripitoisuus on 20 - 60 paino-%. Kuitenkin gradientissa voi olla myös useampia kerroksia, jolloin erillisten kerrosten kon-
sentraatioerot laskevat vastaavassa asteessa. Sokerigra-
30 dientti sisältää glykosidin tai glykosidien seoksen. Gly-
kosidin määrän tulee olla vähintään 1 - 3, etupäässä vä-
hintään 7 - 12 kertaa CMC, Quil A:lle vähintään 0,02,
etenkin vähintään 0,05 - 0,5, etupäässä vähintään 0,2 pai-
no-%. Tässä glykosidipitoisessa gradientissa erote-

taan liuottava aine, ja kompleksi tämän ja proteiinin välillä muuttuu proteiini-glykosidi-kompleksiksi.

Sokerigradientin yläpuolella on liuoskerros, joka koostuu sokerista tai raskassuolasta ja sisältää liuottavaa ainetta tai sen seosta. Lipidit jäävät tähän kerrokseen. Liuottavan aineen konsentraatio tässä kerroksessa on pienempi tai sama kuin päälle asetetussa mikro-organismien tai solujen sekä liuottavan aineen seoksessa, ja se on sopivasti välillä 0,12 ja 3 paino-%, etupäässä 0,75 - 1,5 paino-%, jolloin 1 paino-% pidetään parempana. Sokeri- ja suolakonsentraatio voi olla sama tai se voi olla pienempi kuin alemman glykosidipitoisen gradientin ylemmän kerroksen konsentraatio.

Sen jälkeen kun on sentrifugoitu vähintään 100 000 g vähintään 16 tunnin ajan, etupäässä 20 tunnin ajan 20°C:ssa, kootaan proteiinipitoiset jakeet ja dialysoidaan ne puskuria vastaan; (0,5 - 0,001 M), etupäässä 0,005 M Tris-HCl, 0,01 M NaCl (pH 7,4) tai 0,2 M ammoniumasetaattipuskuria (pH 7,0) vastaan, ja ne väkevöidään esimerkiksi niin kuin T. G. Cooper kuvaa teoksessa *The Tools of Biochemistry* (kust. John Wiley & Sons, New York, 1974; liitetään tähän viitteenä), esimerkiksi lyofilisoimalla, tyhjödialyysin avulla tai ultrasuodatuksen avulla. Sentrifugoinnin aikana kaikki ainekset sedimentoituvat, jolloin liuottava aine pääsee irti proteiinin kanssa muodostamaan kompleksista ja monomeeriset proteiinit siirretään glykosidille, jonka kanssa ne muodostavat kompleksin. Tätä seuraavan dialyysin avulla poistetaan sokeri. Kompleksi voidaan mahdollisesti edelleen puhdistaa esim. vapaan glykosidin suhteen gradienttisentrifugoinnin avulla, esim. sokerigradientilla, joka sisältää 25 - 60 paino-% sokeria, etupäässä 10 - 40 paino-% sakkaroosia.

Edellä kuvatulla tavalla suoritettun mikro-organis-
mien tai solujen puhdistamisen jälkeen ja sen jälkeen, kun
solut on sekoitettu liuottavan aineen kanssa edellä an-
tussa painosuhteessa, solujen ja liuottavan aineen seok-
seen edellä mainitussa puskurissa voidaan vaihtoehtoisesti
5 suoraan lisätä 1 - 3, etupäässä vähintään 7 - 12 kertaa
CMC:n suuruinen määrä, Quil A:n kohdalla 0,05 - 2 paino-%
glykosidia, etupäässä 0,2 paino-% glykosidia, ja dialysoi-
da puskuria vastaan, jona on 0,5 - 0,001 M, etupäässä
10 0,005 M Tris-HCl, 0,01 M NaCl (pH 7,4) tai etupäässä 0,2 M
ammoniumasetaattipuskuria (pH 7,0). Liuottava aine pois-
tetaan tällöin glykosidin läsnäollessa. Tämän jälkeen val-
mistettu membraabiproteiinikompleksi eristetään sedimen-
taatiogradienttisentrifugoinnin avulla, kuten kuvataan
15 sivun 10 viimeisessä kappaleessa, kuitenkin ilman glykosi-
dilisäystä ja poistetaan muut fragmentit sekä vapaa glyko-
sidi.

Solujen tai mikro-organismien sekä liuottavan ai-
neen seos puskurissa voidaan myös gradienttisentrifugoida
20 ja esim. kerrosta edellä mainittuun puskuriin valmistetun
5 - 60 paino-%:isen sokerigradientin, etupäässä 10 - 20
paino-%:isen sakkaroosigradientin päälle, sekä sentrifu-
goida ainakin 150 000 g vähintään 20 minuutin ajan, etu-
päässä 30 minuutin ajan 250 000 g:lla. Tällöin jäljelle
25 jääneet fragmentit eroavat liuottavan aineen ja proteiinin
muodostamasta kompleksista.

Huippufraktioksi nimitetty, pinnalla sijaitseva
proteiinipitoinen neste poistetaan ja lisätään glykosidia
määrältään vähintään 1 - 3, etupäässä vähintään 7 - 12
30 kertaa CMC, Quil A:n kohdalla 0,05 - 0,5 paino-%, etupääs-
sä 0,2 paino-%, ja dialysoidaan 0,5 - 0,001 M puskuria
vastaan, varsinkin 0,005 Tris-HCl, 0,01 M NaCl (pH 7,4)
tai etupäässä 0,2 M ammoniumasetaattia vastaan. Tällöin
liuottava aine poistetaan glykosidin läsnäollessa. Lisä-
35 puhdistus voidaan suorittaa sedimentaatiogradienttisen tri-

fugoinnin avulla (kts. sivu 10, 2. kappale). Lisäpuhdistus voi tapahtua sentrifugoimalla sokerigradientin läpi, joka sisältää 5 - 60 paino-% sokeria, etupäässä 19 - 40 paino-% sokeria.

- 5 Vaihtoehtoisesti voidaan seos, jossa on fragmentoituja mikro-organismeja tai soluja sekä liuottavaa ainetta tai proteiinipitoista sentrifugaattia (muut fragmentit ja vapaa liuottava aine ovat poissa), joka saadaan, kun tätä seosta gradienttisentrifugoidaan puskuriin valmistetun 5
10 - 60 paino-%:isen, etupäässä 10 - 20 paino-%:isen sokerigradientin läpi, erottaa elektroforeettisesti liuottavasta aineesta ja viedä liuokseen, joka sisältää vähintään 1
- 3, etupäässä vähintään 7 - 12 kertaa CMC, Quil A:n kohdalla 0,05 - 0,5 paino-% glykosidia, edullisesti 0,2 paino-% glykosidia. Tällöin erotetaan varatut, monomeeriset
15 antigeeniproteiinit liuottavasta aineesta. Elektroforeesin avulla suoritettavan erottamisen yhteydessä on sopivaa, ettei liuottava aine-puskuriliuos sisällä ylimääräistä suolalisäystä, joka voi häiritä elektroforeesia ja
20 tuottaa liian korkean lämpötilan.

- Voidaan esimerkiksi käyttää vyöhyke-elektroforeesia kantaja-aineen kanssa tai ilman kantaja-ainetta sekä isotakoforeesia kantaja-aineen kanssa tai ilman sitä. Kantaja-aineina voidaan käyttää tavallisia aineita, kuten esimerkiksi polyakryyliamidia, agaria, pihappogeeliä, tärkkelystä, selluloosaa, polyvinyylidikloridia, ioninvaihtajaa tai seliittiä. Kompleksin eristäminen ja konsentointi suoritetaan sivulla 11, riveillä 20 - 23 kuvatulla tavalla. Katso gradienttisentrifugoinnin avulla suoritettavaa
25 lisäpuhdistusta sivulta 11, riveiltä 28 - 32.

30 Jos lähtöaineessa on hydrofobisia membraaniproteiineja, joilla on erilaiset varaukset tai painot, niin nämä voidaan elektroforeesi- tai sentrifugointimenetelmin erottaa toisistaan ja valmistaa niiden erillisiä komplekseja.

Tämän menetelmän avulla voidaan täten erottaa ja rikastaa erilaatuisia membraaniproteiineja.

Liuotetut proteiinit voidaan mahdollisesti solufragmenteista suoritettun puhdistamisen jälkeen erottaa liuottavasta aineesta kromatografisilla menetelmillä, esimerkiksi geelisuodatuksella, jolloin antigeeniset rakenteet adsorboidaan liukenemattomaan tukiaineeseen (matriisiin), joka voi olla esimerkiksi selluloosaa, agarosia, dekstraania, akryyliamidia ja lasia. Kytetään erilaisia ligandeja matriisirakenteeseen, joka saa tällöin erilaisia ominaisuuksia, joita käytetään eristettäessä hyväksi. Tavallisesti antigeeninen rakenne adsorboituu samanaikaisesti, kun käytetty liuottava aine kulkee matriisin läpi adsorboitumatta siihen. Tämän jälkeen tapahtuu antigeenin irtoaminen. Ennen irtoamisvaihetta tai sen aikana voi tapahtua liuottavan aineen, suolan ja puskuroivan aineen vaihtoa, jolloin liuottava aine voidaan korvata glykosidilla ja kompleksi valmistetaan.

Ioninvaihtokromatografiassa kytetään varattuja ligandimolekyylejä, kuten dietyyliaminoetyyliä (DEAE) matriisiin ja käytetään kationinvaihtajana. Karboksimeytyyli (CM)- tai fosfaattiryhmiä (P) kytetään matriisiin ja käytetään anioninvaihtajana. Käyttämällä antigeenisten rakenteiden ja liuottavan aineen nettovarausten eroa hyväksi, saadaan aikaan näiden molekyylien erottuminen. Tavallisesti liuottava aine on varaukseton ja proteiini on varattu. Eluointi tapahtuu suolagradientin avulla, esim. K- tai NaCl:lla tai sopivalla puskurilla, esimerkiksi fosfaattipuskurilla suoritettun pH:n säädön avulla, liuottavan aineen läsnäollessa (kts. konsentraatio ja esimerkki edellä esitetyn liuottamisen yhteydessä). Eluoinnin yhteydessä voidaan proteiinit puhdistaa, vaihtaa liuottava aine tai muodostaa kompleksi, jos eluointiaineeseen lisätään glykosidi liuottavan aineen sijasta. Suolat poistetaan jälkepäin dialyysin tai geelisuodatuksen avulla.

Geelisuodatuksessa käytetään hyväksi sitä seikkaa, että liuottava aine on kooltaan pienempi kuin antigeenirakenteet ja että se tulee ulos myöhemmissä jakeissa, kompleksin muodostuessa antigeenipitoisten rakenteiden
5 koko kasvaa, ja vyöhykkeet, jotka sisältävät liuottavaa ainetta, kasvavat.

Vasta-aineet voidaan immunoaffiniteettikromatografian avulla sitoa irreversiibelisti edellä mainittuun matriisiin, minkä jälkeen vasta-aineiden ainutlaatuista spesifisyyttä ja affiniteettia käytetään hyväksi halutun
10 antigeenirakenteen puhdistamiseen. Liuottavalla aineella ei ole affiniteettia vasta-aineisiin nähden. Eluointi tapahtuu lievän denaturoinnin avulla, esimerkiksi laskemalla pH noin arvoon 4, sekä liuottavan aineen tai glykosidin
15 läsnäollessa.

Lektiini-kromatografian yhteydessä käytetään hyväksi lektiinejä, erästä proteiinien ryhmää, joka voi reagoida reversiibelisti spesifisten sokeriryhmien kanssa, mikä tekee niille mahdolliseksi sitoa ne esimerkiksi glykoproteiineihin. Lektiini kytketään ligandina esimerkiksi
20 Sepharose'en (Pharmacia, Uppsala) tai ostetaan sopivaan matriisiin valmiiksi kytkettynä, kaupallisena tuotteena. Detergenteillä (liuottavilla aineilla) ei ole affiniteettia kytkettyyn lektiiniin. Adsorboidut antigeenirakenteet
25 irrotetaan tavallisesti lisäämällä metyloituja sokereja, esimerkiksi metyyylimannoksidia, metyyli-glukosidia sekä N-asetyyli-glukosamidia, joka on liuotettu puskuroituun suolaliuokseen liuottavan aineen tai glykosidin läsnäollessa.

Kovalenttisessa kromatografiassa sidotaan antigeenirakenne tioliryhmän avulla kovalenttisella sidoksella
30 matriisiin. Aktigeenissa sijatseva tioliryhmä sidotaan selektiivisesti aktivoituun tioryhmään, joka on kytketty sopivaan matriisiin tiodiosulfidi-vaihdon avulla. Tämä sidos on reversiibeli ja sen jälkeen kun liuottava aine
35 pestään pois, voidaan tioliryhmän sitovat antigeeniraken-

teet eluoida pelkistämällä disulfididisidos merkaptotoetanollilla tai ditiotreitolilla liuottavan aineen tai glykosidin läsnäollessa.

Hydrofobinen kromatografia: Tässä tekniikassa käytetään hyväksi vuorovaikutusta oktyyli- tai fenyyylityypipisen, liikkumattoman, hydrofobisen ligandin sekä antigeenisten rakenneosien hydrofobisten pintojen välillä. Tämä tekniikka voi vaihtoehtoisesti olla menetelmä liuottavan aineen sitomiseksi seoksesta ligandiin samanaikaisesti kuin adsorboitumattomat antigeeniset rakenteet voidaan saada takaisin esimerkin 4 (dialyysimenetelmä) mukaisesti suoritettavaan jatkotyöskentelyä varten. Muissa olosuhteissa voidaan antigeeninen rakenne sitoa ligandiin, ja liuottavalla aineella ei ole affiniteettia ligandiin, mikä takia jatketaan dialyysimenetelmän mukaan. Sitominen suoritetaan suurta ioninvahvuutta esim. ammoniumsulfaattia käyttäen ja eluoidaan alhaisella ionivahvuudella, esim. vedellä tai etyleeniglykolilla.

Kun kompleksi sisältää bakteereiden membraaniproteiineja, on edullista lyödä soluseinämät ensin rikki ennen kuin solumateriaalia käsitellään edellä esitetyn menetelmän mukaisesti. Esimerkkejä bakteereista, joista voidaan valmistaa hydrofobisia proteiineja, on esimerkiksi *Escherichia*, *Staphylococci*, *Haemophilus*, esim. *H. influenzae*, *Bordetella*, esim. *B. pertussis*, *Vibrio*, esim. *V. cholerae*, *Salmonella*, esim. *S. typhi* ja *S. paratyphi*, etupäässä *collin*, esim. pili K 88, tarttumistekijä sekä *Salmonellan* huokosproteiini tai *B. pertussiksen* sekä *Neisseria meningitidiks*en ulommat membraaniproteiinit.

Esimerkkejä käyttökelpoisista viruksista, joilla on vaippa, ovat *Orthomyxoviridae*, kuten influenssa A, B ja C, *Paramyxoviridae*, etupäässä tuhkarokkivirus, sikotautivirus, parainfluenssa 1, 2, 3 ja 4 virus, penikkatautivirus ja karjaruttovirus, *Rhabdoviridae*, erityisesti vesikauhuvirus, *Retroviridae*, etupäässä kissan leukemia-

virus sekä härän leukemiavirus, Herpesviridae, etupäissä Pseudorabies, Coronaviridae, Togaviridae, kuten EEE, WEE ja VEE (Eastern, Western ja Venezuela equine encephalitis), keltakuumevirus, erityisesti härän virusripuli-virus
5 sekä eurooppalainen sikaruttovirus Arenaviridae Poxviridae, Bunyaviridae, Iridioviridae, erityisesti afrikkalainen sikaruttovirus, sekä luokittelemattomien virusten joukosta ihmisen hepatiitti B-virus ja Marburg/Ebola-virus.

Esimerkkejä parasiiteista, joita voidaan käyttää
10 keksinnön mukaisesti, ovat Protozoa, kuten Toxoplasma, esim. Toxoplasma gondii, Plasmodium, esim. Plasmodium vivax, malariae ja falciparum, Teileria parvum ja ovale sekä Filaroidae, etupäissä Parafilaria ja Ochoocerca, Entamoeba histolytica, erilaiset anaplasmat, Schistosoma,
15 kuten Schistosoma haematobium, mansoni ja japonicum sekä Trypanosoma, esim. Trypanosoma gambiensi, T. brumseoli congolesi.

b) On myös mahdollista lähteä hydrofobisista ei-membraaniproteiineista tai ei-hydrofobisista proteiineista
20 tai peptideistä. Ei-hydrofobisia proteiineja tai peptidejä voidaan muuttaa hydrofobisiksi liittämällä niihin hydrofobisia ryhmiä. Mainitut proteiinit voivat olla peräisin viruksista, joilla on vaippa tai jotka ovat ilman vaippaa, bakteereista, mykoplasmaista tai parasiiteista. Esimerkkejä
25 viruksista, joilla ei ole vaippaa eikä hydrofobisia proteiineja, on Picornaviridae (jolla katsotaan olevan myös hydrofobisia proteiineja), esim. suu- ja sorkkatautivirus, poliovirus, Adenoviridae, Parvoviridae, esim. kissaruttovirus sekä sian parvovirus, Reoviridae, esim. Rota-virus.
30 Esimerkkejä mykoplasmaista ovat M. Pneumoniae, Mycoides, bovis, suis, hyorinos, orale, salivarium, hominis ja termentans.

Nämä proteiinit ja peptidit puhdistetaan kuten kuvataan kohdassa a); puhdistus ja eristys.

Hydrofobiset ryhmät, joita voidaan liittää ei-hydrofobisiin proteiineihin, ovat suoria, haaroittuneita, tyydyttyneitä tai tyydyttämättömiä alifaattisia ketjuja, joissa on 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 tai 8 hiiliatomia, edullisimmin 6, 7 tai 8 hiiliatomia; pieniä peptidejä, joissa on 1, 2, 3, 4 tai 5 aminohappoa, edullisesti 2, 3 tai 4 aminohappoa, jotka ovat Trp, Ile, Phe, Pro, Tyr, Leu ja Val, edullisesti Tyr; kolesteroli johdannainen, kuten koliinihappo tai ursodesoksikoliinihappo.

Näiden hydrofobisten ryhmien tulee olla sidottuja ryhmään, joka voidaan kytkeä ei-hydrofobiseen proteiiniin, kuten karboksyyli-, amino-, disulfidi-, hydroksyyli-, sulfonyyli- ja karbonyyliryhmiin, kuten aldehydiryhtiin.

Hydrofobisiksi kytkentäryhmiksi valitaan etupäässä metaanin, etaanin, propaanin, butaanin, pentaanin, heksaanin, heptaanin tai oktaanin karboksyyli-, aldehydi-, amino-, hydroksyyli- ja disulfidijohdannaisia sekä peptidejä, jotka sisältävät Cys:n, Asp:n, Glu:n, Lys:n etupäässä oktaanalin ja Tyr-Tyr-Tyr-Cys:n, -Asp:n tai -Glu:n. Hydrofobiset ryhmät, joissa on kytkettävissä oleva ryhmä, täytyy liuottaa veteen esim. edellä mainittujen liuottavien aineiden ja detergenttien tai suolahapon, etikkahapon, jää-etikkahapon, lipeän tai ammoniakkin avulla riippuen aineesta, joka tulee liuottaa. Tämän jälkeen pH säädetään neutraalille alueelle aineen saostumatta, jolloin otetaan huomioon, ettei saada pH-arvoa, joka denaturoi proteiinin, johon hydrofobinen ryhmä tulee kytkeä.

Hydrofobisia molekyylejä liitetään ei-hydrofobiseen proteiiniin moolisuhteessa 10:1 - 0,1:1, etupäässä 1:1.

Hydrofobisia ryhmiä, joissa kytkentäryhmä on karboksyyli-ryhmä, voidaan kytkeä proteiineihin vesiliukoisten karbodiimidien tai kokoonpantujen anhydridien välityksellä. Ensimmäisessä tapauksessa aktivoidaan karboksyyli-ryhmä pH-arvossa 5 karbodiimidillä ja sekoitetaan proteiinin kanssa, joka on liuotettu puskuriin, jonka pH on 8 ja jon-

ka fosfaattipitoisuus on korkea. Viimeksi mainitussa tapauksessa pannaan karboksyyhdiste isobutyrylikloroformaatin kanssa trietyyliamiinin läsnäollessa dioksaaniin tai asetonitriiliin ja syntyvä anhydridi lisätään proteiiniin pH-arvossa 8 - 9. On myös mahdollista hydratsiinin avulla muuttaa karboksyyli ryhmä hydratsidiksi, joka aldehydien ja ketonien kanssa, jotka sijaitsevat proteiinin perjodattilla hapetetuissa sokeri-yksiköissä, antaa hydratsonisidoksia.

10 Aminoryhmät voidaan salpietarihappamuuden avulla alhaisessa lämpötilassa muuttaa diatsoniumsuoloiksi, jotka antavat atsosidoksia Tyr:n, His:n ja Lys:n kanssa.

Hydroksyyli ryhmät voidaan muuttaa meripihka-anhydridien avulla hemisukkinaattijohdannaisiksi, jotka voidaan 15 kytkeä karboksyyli ryhmään.

Aldehydi ryhmät voidaan proteiinin aminoryhmien avulla muuttaa Schiff'in emäkseksi.

Monia kytkentäryhmiä ja -menetelmiä kuvataan julkaisuissa Journal of Immunological Methods, 59 (1983), 20 sivut 129 - 143 ja 289 - 299; Methods in Enzymology, osa 93, sivut 280 - 333, ja Analytical Biochemistry 116, (1981), sivut 402 - 407; jotka tässä yhteydessä liitetään viitteinä.

Näin valmistetut proteiinit ja peptidit, jotka ovat 25 saaneet hydrofobisia ryhmiä, sidotaan kompleksiksi glykosidin kanssa, jota kuvataan kohdassa a), jolloin kuitenkin voidaan jättää pois puhdistusvaihe, jossa poistetaan solufragmentit.

c) Voidaan myös lähteä hydrofiilisisistä proteiineista, joiden sisään on suljettu hydrofobisia ryhmiä, ja 30 päästä käsiksi viime mainittuihin denaturoimalla proteiinit miedosti, esimerkiksi alhaisen pH:n avulla, noin pH-arvossa 2,5, 3-M virtsa-aineella tai korkeassa lämpötilassa 70°C:n yläpuolella. Sellaiset proteiinit voivat olla 35 immunoglobuliineja, kuten IgG, IgM, IgA, IgD ja IgE. Im-

munoglobuliineja voidaan käyttää anti-idiotyyppisinä vasta-aineina. Proteiinit puhdistetaan edelleen kuten proteiinit kohdassa b) ja sidotaan sitten kompleksisiksi glykosidiin kuten kuvataan kohdassa a), jolloin puhdistusvaihe
5 solufragmenttien poistamiseksi jätetään pois.

Immunogeenikomplekseja voidaan käyttää spesifiseen immuunijärjestelmän stimulointiin ihmisillä ja eläimillä. Niitä voidaan niin muodoin käyttää rokotteenä sairauksia vastaan, jotka ovat bakteereiden, mykoplasman, virusten
10 ja parasiittien aiheuttamia, sekä kun tutkimuksen tavoitteena halutaan valmistaa vasta-aineita erilaisten eläinsolujen membraaniproteiineja vastaan.

Voidaan myös käyttää erilaisista bakteereista tai viruksista peräisin olevien amfipaattisten proteiinien tai
15 peptidien seoksia, kun halutaan valmistaa rokote useita tauteja vastaan.

Keksinnön mukaisesti valmistettuja komplekseja voidaan käyttää ihmis- ja eläinlääketieteellisiin koostumuksiin, jotka sisältävät iskomia mahdollisesti yhdessä tavomaisten lisä- ja laimennusaineiden kanssa, edullisesti
20 iskomia puskuriliuoksen muodossa esim. sen TN-liuoksessa (kts. esimerkki 1).

Keksintöä kuvataan lähemmin seuraavilla suoritus-esimerkeillä.

25 Koe 1

Vertailu keksinnön mukaisesti Quil A:n kanssa valmistetun membraaniproteiini-kompleksin sekä ilman glykosidilisäystä valmistettujen, vastaavien membraaniproteiinsolujen immunogeenisen vaikutuksen välillä.

30 25 hiirtä (BALB C, Bonhollgard, Tanska; paino noin 20 g) jaettiin 5 ryhmään ja ryhmät immunisoitiin 2 kertaa kolmen viikon välein pelkästään puskuriliuoksella (PBS), 0,1 µg:lla tai 5 µg:lla kompleksia, joka oli valmistettu käyttämällä influenssasta saatuja membraaniproteiineja
35 sekä Quil A:ta, 100 µl:ssa PBS esimerkin 1 mukaisesti sekä

käyttämällä 5 µg membraaniproteiinimisellejä, joissa ei ole glykosidia ja jotka on valmistettu EPC-hakemuksen 811 022 13.6 mukaan.

5 Seerumi kerättiin hiiriltä joka viikko kokeen loppuun saakka. Seerumin immuunivaste mitattiin ELISA-tekniikalla (Voller, Bidwell ja Bartlett 1980, Enzymelinkes Immunosorbent Assay, sivut 359 - 371; Manual of Clinical Immunology, American Society for Microbiology, Washington, USA).

10 Tulos esitetään kuvassa 6. Siitä ilmenee, että Quil A:n kanssa valmistettu antigeenikompleksi antaa paremman immuunivasteen kuin vastaavat proteiinimisellit ilman Quil A:n lisäystä. 0,1 µg Quil A:n kanssa valmistettua proteiinimembraanikompleksia aikaansaa korkeamman immuunivasteen
15 kuin 5 µg proteiinimisellejä, joihin ei ole lisätty glykosidia.

Koe 2

Quil A:n kanssa keksinnön mukaisesti valmistetun membraaniproteiinikompleksin sekä glykosidin kanssa sekoitettujen vastaavien membraaniproteiinimisellien immunogeenisen vaikutuksen sekä sivuvaikutusten vertailu niiden toimiessa adjuvanttilisänä.

Kokeessa käytetään 30 marsua, jotka ovat (Valtion eläinlääketieteellisen laitoksen) SVA:n kasvattamia. Ne on jaettu 5 ryhmään, joissa kussakin on 6 eläintä, ja rokotettu influenssaviruksesta (kanta Solvalla) saaduilla proteiinimiselleillä (P) tai samasta influenssaviruksesta peräisin olevalla membraaniproteiinikompleksilla, joka on valmistettu glykosidi Quil A:n (GP) kanssa taulukon 1 mukaisesti. Esimerkin 2 mukainen valmistus. 6 marsua oli
30 rokottamattomina kontrolleina. GP-kompleksi on vapautettu vapaasta glykosidista sakkaroosigradienttisentrifugoinnin avulla. Tulokset käyvät ilmi taulukosta 1. P-misellit samoin kuin GP-kompleksi antavat vähimmäisreaktioita ja PG-kompleksi antaa selvästi korkeampia vasta-ainevasteita
35

- kuin P-misellit. Seos, jossa on 10 µg vapaata glykosidia sekä P-misellejä, saa aikaan lieviä reaktioita, mutta ei mitään adjuvanttivaikutusta. 100 µg:n lisäys vapaata glykosidia antaa voimakkaita paikallisia reaktioita punoituk-
- 5 sen ja turvotuksen muodossa sekä suuremman vasta-ainevas-
- teen kuin P-misellirokote ilman vapaata Quil A:ta.

Taulukko 1

- Immuunivaste influenssavirusta vastaan marsun seerumissa hemagglutinaatioinhibitio (HI)-testillä mitattuna kahden, 4 viikon välein suoritettun rokotuskerran jälkeen. Seerumi on otettu 10 päivän kuluttua toisesta rokotuksesta.

- P = 1 µg proteiinimiselliä, joka koostuu influenssaviruspeplomeereistä (H ja N)

P + 10 = 1 µg proteiinimisellejä + 10 µg vapaata glykosidia

P + 100 = 1 µg proteiinimisellejä + 100 µg vapaata glykosidia

- GP = 1 µg proteiinikompleksia, joka on valmistettu glykosidin kanssa, joka sisältää < 0,1 µg glykosidia

- ei reaktiota

+ heikko punoitus

++ kohtalainen punoitus

- +++ voimakas punoitus ja kuolioita

HI-tiitteri ($^2\log/1$)

	P	P + 10	P + 100	GP
M ± SD 6 eläintä	7,9±2,3	7,5±1,5	10,3±3,1	9,7±0,6
Paikallinen reaktio	-	+	+++	-

- 30

[(Rokottamattomilla marsuilla tiitterit olivat 2 (6 eläintä)]

- 35

Koe 3

Membraaniproteiinikomplekseja, jotka oli valmistettu esimerkin 1 mukaisesti ja edelleen puhdistettu sentrifugoimalla 10 - 40-%:isen sakkaroosigradientin kautta, tutkittiin immunogeenisen vaikutuksen suhteen. Tässä valmisteessa ei ole osoitettavissa olevia määriä vapaata Quil A:ta ($< 0,02$ paino-%) mitattuna menetelmällä, joka perustuu Quil A:n soluja hajottavaan aktiivisuuteen. Soluja hajottava aktiivisuus tutkittiin härän punaisilla verisolulla. Verisolut oli valettu agarosigeeliin $0,05$ %:n konsentraationa. Agarosigeeli asetettiin elektroforeettiseen järjestelmään, jossa Quil A liikkuu anodia kohti ja liuottaa verisolut. Liuenneella vyöhykkeellä on raketin muoto ja glykosidin määrä on verrannollinen raketin pituuteen, ja se tehdään näkyväksi Coomassie Brilliant'illa suoritettun proteiinivärjäyksen avulla. Tämä menetelmä voi määrittää $0,02$ % tai sitä suuremman konsentraation glykosidia [Sundqvist et al., Biochemical and Biophysical research communications, osa 114 (1983), sivut 699 - 704].

Sedimentaatioanalyysissä lisäpuhdistetulla materiaalilla on sama sedimentaatiovakio kuin puhdistamattomalla materiaalilla. Elektronimikroskopian avulla havaitaan partikkeleita, joilla on sama morfologia (kts. kuvat 2 ja 3). Hiiren rokotuksen yhteydessä materiaali oli yhtä aktiivista kuin puhdistamaton materiaali vasta-aineiden stimuloimisen yhteydessä. Yhdessä kokeessa $1 \mu\text{g}$ tai $0,1 \mu\text{g}$ influenssavirusproteiinikompleksin kompleksia, joka oli valmistettu Quil A-lisäyksen kanssa ja puhdistettu kahden gradienttisentrifugoinnin avulla edellä kuvatulla tavalla, oli yhtä tehokasta kuin vastaava, edelleen puhdistamaton materiaali. Edellä esitetty tulos osoittaa, että kompleksit ovat stabiileja ja tehokkaita immunogeeneja ilman, että niissä on osoitettavia määriä vapaata Quil A:ta.

Koe 4

3 erilaista rokotetta, joissa oli Hepatitis Bs (HBs) antigeeni, tutkittiin kukin 4 hiirellä käyttäen 5 µg:n annosta HBs-antigeenia. Nämä 3 rokotetta olivat: iskomeja, jotka oli valmistettu esimerkin 14 mukaisesti; 22 nm:n suuruisia, eheitä partikkeleita, jotka vastaavat kaupallisesti saatavissa olevaa rokotetta, sekä kokeellista rokotetta, jossa vastaavat HBs-proteiinit ovat misellin muodossa EPC-hakemuksen 811 022 13.6 mukaan valmistettuna. Vasta-ainevaste on arvioitu ELISA-menetelmällä.

Taulukko 2

Hiiren seerumin vasta-ainevaste HBs-antigeenia kohtaan ELISA:lla mitattuna

15

	<u>Iskomit</u>	<u>22 nm:n partikkelit</u>	<u>misellit</u>
	1,343	0,603	0,569
	1,788	0,598	0,240
	1,841	0,888	0,273
20	1,884	0,892	-

ELISA:n ekstinktioarvot on luettu 495 nm:ssä

25 Taulukosta 2 käy ilmi, että iskomeilla immunisoidut hiiret johtivat merkittävästi suurempiin vasta-ainetiti-tereihin kuin HBs-rokotteet, jotka sisälsivät eheitä, 22 nm:n suurusia partikkeleita tai misellejä.

Koe 5

30 Patogeenisella vesikauhukannalla (CVS) aiheutetun koeinfektion avulla hiirellä suoritettussa rokotuskokeessa on tutkittu esimerkin 4 mukaan valmistetut isomeerit, jotka sisältävät vesikauhuvirusten vaippaproteiineja.

Hiiret rokotettiin kerran taulukon 3 mukaisella annoksella. Hiirille aikaansaatiin koeinfektio 14 päivää myöhemmin hiirelle patogeenisen CVS-kannan avulla käyttäen annosta, jonka suuruus oli 40 kertaa LD_{50} .

5

Taulukko 3

Rokotusannos (μ g)	Elävien/kuolleiden eläinten lukumäärä
4,2	18/19
0,84	15/18
0,17	10/20
-	0/20

15

Taulukosta käy ilmi, että iskomirokote saa aikaan suojaavan immuniteetin.

20

Keksinnön mukaisesti valmistettuja uusia antigeenikomplekseja voidaan varastoida lyofilisoituina valmisteina tai vesisuspensioina. Annostelua varten ne ovat sopivasti jossain liuottimessa, kuten esim. fysiologisessa keittosuolaliuoksessa. Etupäässä käytetään 0,1 M NaCl-liuosta (pH 7,2 - 7,6); pH-arvo säädetään 0,05 M Tris-HCl:lla. Muita puskureita voidaan kuitenkin myös käyttää.

25

30

Uusilla proteiinikomplekseilla on voimakkaampi immunogeeninen vaikutus (noin 10-kertainen tai usein suurempi) kuin proteiinimiselleillä, joita ei ole valmistettu glykosidin kanssa ja joita ei ole sekoitettu minkään adjuvantin kanssa. Jos vastaavien proteiinimisellien tulee saada samat immunogeeniset vaikutukset samalla proteiiniannoksella, ne täytyy sekoittaa sellaisen glykosidin tai muun adjuvantin määrän kanssa, etteivät sivuvaikutukset tule liian suuriksi.

Keksinnön mukaisesti valmistettua proteiinikompleksia ei tarvitse sekoittaa minkään adjuvantin kanssa ja sillä tavalla vähennetään sivuvaikutuksia. Uudet kompleksit ovat edelleen stabiileja erotuksena liposomeihin sidottuihin antigeenisiin proteiineihin nähden.

Koe 6

5 mg:aan Mycoplasma gallisepticum liuotettuna 5 ml:aan TN-puskuria (pH 7,4) lisättiin 10 mg MEga-10. Seos inkuboitiin yön yli huoneen lämpötilassa jatkuvasti sekoittaen. Tämän jälkeen näytteeseen lisättiin 5 mg Quil A:ta ja seos dialysoitiin vaihtaen nestettä useasti TN-puskuria vastaan (huoneen lämpötilassa 12 tunnin ajan ja sitten +4°C:ssa). Lopetetun dialyysin jälkeen eristetään iskomeja, jotka sisältävät membraaniantigeneja, ajamalla pohjaan solujätteet ultrasentrifugoinnin jälkeen.

EM-tutkimus osoittaa, että näytteessä on iskomeja.

Immuunivasteen osoittamiseksi M. gallisepticum'ia vastaan käytettiin 2 kananpoikaryhmää. Kumpikin ryhmä käsitti 10 eläintä, jotka kokeen alussa olivat 5 viikon ikäisiä ja joiden keskipaino oli 480 g. Ensimmäinen ryhmä inokuloitiin ihonalaisesti iskomeilla, jotka sisälsivät 20 µg proteiinia, ja toinen ryhmä jätettiin käsittelemättä kontrolliryhmäksi. 14 päivää myöhemmin kaikki kananpoikaset infektoitiin M. gallisepticum'illa oikeaan ilmapussiin 0,1 ml:lla 2×10^7 cfu siirrostetta kohti. 6 päivän kuluttua kananpoikaset lopetettiin ja tutkittiin patologistesti ilmapussin vaurioita etsien.

Iskomirokotteella inokuloidussa ryhmässä vauroitusindeksi pieneni merkittävästi kontrolliryhmän indeksiin verrattuna.

Yhteenveto: Iskomirokote aikaansai suojaavan immunitetin kokeellista infektiota vastaan, ja aikaansai merkitseviä HI-tiittereitä M. gallisepticum'ia vastaan.

Ryhmä Rokote Vaurioitu- 2xt-testi HI-tiitteri t-testiPC
misindeksi

	1	iskomi	9	0,001	758	0,01
5	2	kontrolli	27	-	13	-

Esimerkki 1

Parainfluenssa-3-virus U 23, eristetty Uumajassa, Ruotsissa, puhdistetaan sentrifugoimalla 30 paino-%:isen sakkarroosin lävitse 100 000 g, tunnin ajan 4°C:ssa. Pohjaan laskeutunut erä liuotetaan noin 10 mg/ml:n konsentraatioon 0,05 Tris-HCl:ssa (pH 7,4) ja 0,1 M NaCl:ssa (TN). 1 - 5 mg/ml PI-3-virusta, joka on samassa puskurissa (TN), liuotetaan 2 paino-%:iin (loppukonsentraatio) Triton X-100 yhdessä ³H-merkatun viruksen kanssa, jota käytetään noin 10⁵ pulssia/minuutti [A. Luukkonen, C. Gamberg ja E. Renkonen (1979), Virology 76, sivut 55 - 59; joka sisällytetään viitteenä]. Noin 200 µl:n suuruinen näytetilavuus kerrostettiin 300 µl:n päälle 15-%:ista sakkarroosia, joka sisälsi 1 % Triton X-100 TN:ssä, sekä 12 ml:n päälle 20-50-paino-%:ista sakkarroosigradienttia TN:ssä, joka sisälsi 0,2 paino-% Quil A:ta. Sentrifugointi suoritettiin 250 000 g:llä 22 tunnin ajan 20°C:ssa. Sentrifugoinnin jälkeen koottiin 500 µl:n suuruiset jakeet alhaaltapäin ja näytteet (20 - 50 µl) mitattiin radioaktiivisuuden suhteen. Radioaktiiviset proteiini-jakeet yhdistettiin ja dialysoitiin 0,005 M Tris-HCl, 0,01 M NaCl (pH 7,4) vastaan, annosteltiin 10 ml:n suuruisiin pulloihin ja väkevöitiin lyofilisoimalla 18 tunnin ajan Edward'in pakastuskuivauslaitteessa.

Tämän valmisteen sedimentaatiovakio on 24 S. Kompleksin lisäpuhdistus suoritettiin sentrifugoimalla kompleksiksi 10 - 40 paino-%:isen sakkarroosigradientin läpi.

Esimerkki 2

Esimerkin 1 mukainen menetelmä toistettiin, mutta käytettiin hevosen influenssavirusta (Solvalla; eristetty Solvallassa, Tukholma, Ruotsi). Koe toistettiin lisäämättä glykosidia (ts. periaatteessa EPD-hakemuksen 811 022 13.6 mukaisesti), ja näin saadut proteiinikompleksit sekä glykosidin kanssa valmistettu proteiinikompleksi käytettiin sedimentaatio-gradienttisentrifugointiin, joka suoritettiin 10 - 40 paino-%:isen sokeriliuoksen läpi 280 000 g:ssä 4 tunnin ajan +4°C:ssa.

Tulos käy ilmi kuvasta 1, joka esittää myös standardina toimineen tyroglobuliinin sedimentaatiovakion (nuolella merkitty, 19 S). Käy ilmi, että proteiinimise-
lien sedimentaatiovakio on 30 S ja glykosidiproteiinimise-
selleille se on 19 S. (Virusglykoproteiini leimattiin galaktosi-oksidaasi-³H-boorihydridi-menetelmällä.)

Esimerkki 3

Esimerkin 1 mukainen menetelmä toistettiin käyttämällä tuhkarokkovirusta parainfluenssa-3-viruksen tilalla. Saadaan kompleksi, jolla elektronimikroskopian perusteella oli luonteenomainen rakenne, kuten käy ilmi kuvasta 2.

Esimerkki 4

Rabiesvirus, valmistettu RIV, Bilthoven'issa menetelmällä, jonka ovat kuvanneet Van Wezel et al.; Develop. Biol. Standard (1978), 41, sivuilla 159 - 158; konsentroidiin 2 mg/ml:ksi TN:ssä. 1 mg virusta liuotettiin 100 mM kanssa oktyyli-β-D-glykosidia ja sitä inkuboitettiin 45 minuutin ajan 20°C:ssa. Näyte kerrostettiin 50 paino-%:isen sokeriliuoksen päälle ja sentrifugoitiin 250 000 g:llä 45 minuutin ajan +4°C:ssa. Sentrifugaatti otettiin talteen ja lisättiin Quil A:ta 0,2 paino-%:iin saakka.

Näyte suljettiin selluloosaletkuun ja dialysoitiin +20°C:ssa 0,15 M ammoniumasetaattipuskuria vastaan 1 000 ml:n tilavuudessa, puskuri vaihdettiin 3 kertaa 72 tunnin aikana; jona aikana sekoitettiin jatkuvasti. Dialysoitu

aine sisältää rabiesvirus-kompleksia. Osa materiaalista puhdistettiin edelleen sentrifugoimalla 10 - 40 paino-%:isen sokeriliuoksen läpi 280 000 g:llä 4 tunnin ajan +4°C:ssa.

- 5 Elektronimikroskopiassa saadaan rakenne, joka käy ilmi kuvasta 3.

Esimerkki 5

- Esimerkin 4 mukainen menetelmä toistettiin tuhkarokkoviruksen avulla. Saadulla kompleksilla oli sama rakenne kuin esimerkin 3 mukaan valmistetulla kompleksilla.

Esimerkki 6

- Parainfluenssa-3-virus (U 23) puhdistettiin sakkarosigradianttisentrifugoinnin avulla ja näin saatu puhdistettu virus liuotettiin 10 mg/ml:n konsentraationa
- 15 0,02 M barbitonipuskuriin (pH 8,0), jossa oli 0,24 M glukosia (BG), 1 - 5 mg/ml PI-3-virusta, joka oli BG-puskurissa, liuotettiin 2 %:n kanssa Triton X-100 sekä noin 10^5 ^3H pulssia/minuutti leimattua virusta [Luukkonen et. al., 1977) viitteen mukaisesti] BG-puskurissa. 1 ml:n koetilavuus kerrostettiin 1-%:iselle agarosigeelille, joka sisälsi 0,02 M barbituraattipuskuria (pH 8,0), sekä 0,02
- 20 paino-% Quil A:ta. Agarosigeeli oli suljettuna putkeen, jonka pinta-ala oli 85 mm² ja korkeus oli 25 mm. Putken ylä- ja alaosa liitettiin kumpikin 0,02 M barbituraattipuskuriin (pH 8,0). Yläastiaan kytkettiin negatiivinen
- 25 elektrodi. Elektroforeesi suoritettiin 5V/cm:llä 4 tunnin ajan. Näytteet kerättiin geelin anodipuolelle ja mitattiin radioaktiivisuuden suhteen. Näyte dialysoitiin 0,15 M ammoniumasetaattia vastaan (pH 7,0) ja väkevöitiin lyofilisoimalla.

- 30 Tämän valmisteen sedimentaatiovakio on noin 20 S samalla tavalla mitattuna kuin esimerkissä 2.

- Kompleksin lisäpuhdistus suoritettiin sentrifugoimalla kompleksi 10 - 40 paino-%:isen sakkarosigradientin
- 35 lävitse.

Esimerkki 7

Toxoplasma gondii (saatu Tage Waller'ilta, Valtion eläinlääketieteellinen laitos) puhdistettiin suodattamalla pumpulin läpi ja sentrifugoimalla 30 paino-%:isen sakkaroosin kautta 100 000 g:llä 20 minuutin ajan 4°C:ssa. Puhdistettu valmiste liuotettiin 5 mg/ml:n konsentraatioon 0,05 M Tris-HCl:iin (pH 7,4), joka oli 0,1 M NaCl:n suhteen (TN).

10 1 mg Toxoplasma gondii'ta liuotettiin 5-%:iseen oktyyli-β-D-glykosidiin ja 5-%:iseen saponiiniin seuraavan julkaisun mukaisesti: "An investigation of the antigenic structure of Toxoplasma gondii", Parasite Immunology 1981, 3, sivut 235 - 248; yhdessä ³H:lla merkatun toksoplasman kanssa, noin 10⁵ pulssia/minuutti (Luukkonen et al., 1977)

15 TN-puskurissa. Noin 200 µl:n näytetilavuus kerrostettiin 300 µl:n päälle 15-%:ista sakkaroosia, joka sisälsi 1 % Triton X-100 TN:ssä, sekä 12 ml:n päälle sakkaroosigradienttia, jossa oli 20 - 50 paino-% sakkaroosia ja 0,2 paino-% Quil A:ta TN:ssä. Sentrifugointi suoritettiin

20 250 000 g:llä 20°C:ssa noin 18 tunnin ajan. Sentrifugoinnin jälkeen gradientti jaettiin 500 µl:n jakeisiin ja 20 - 50 µl:n suuruiset näytteet mitattiin radioaktiivisuuden suhteen. Voitiin havaita kaksi erilaista radioaktiivista huippua. Eri huippujen jakeet, kunkin huipun erikseen,

25 yhdistettiin, dialysoitiin ja konsentroitiin pakastuskuvauksen avulla esimerkissä 1 kuvatulla tavalla. Quil A:n kanssa muodostuneella kompleksilla oli alhaisempi sedimentaatiovakio kuin samasta parasiitista valmistetuilla proteiinimiselleillä.

30

Esimerkki 8

E. coli-bakteereita, joissa oli plasmidi pili K88, ravistettiin mekaanisesti ja saostettiin 3 kertaa isoelektrisessä pisteessä. Sen jälkeen materiaalia käsiteltiin samalla tavalla kuin on kuvattu esimerkissä 1. Saa-

tiin kompleksi, jolla oli luonteenomainen rakenne, kuten esitetään kuvissa 2 ja 3.

Esimerkki 9

5 Toistettiin esimerkin 8 mukainen menettely salmone-
nellalla, jossa on huokosproteiini. Saadaan kompleksi,
jolla on tunnusomainen rakenne, joka esitetään kuvissa 2
ja 3.

Esimerkki 10

10 Kissan munuaisten epiteelisoluja, jotka oli infek-
toitu kissan leukemiaviruksella, käsiteltiin esimerkin 1
menetelmän mukaisesti. Saatiin kompleksi, jolla oli tun-
nusomainen rakenne, joka käy ilmi kuvista 2 ja 3.

Esimerkki 11

15 Munuaisen epiteelisoluja, joita on transformoitu
härän leukemiaviruksella, käsiteltiin esimerkin 1 menetel-
män mukaisesti. Saatiin kompleksi, jolla oli luonteenomai-
nen rakenne, joka käy ilmi kuvista 2 ja 3.

Esimerkki 12

20 Parainfluenssa-3-virus U 23 puhdistettiin ja protei-
inikompleksi valmistettiin esimerkissä 1 esitetyn mene-
telmän mukaisesti, sillä erotuksella, että sakkaroosigra-
dientti TN:ssä, jossa oli 20 - 50 paino-% sakkaroosia,
sisältää muun saponiinin kuin Quil A.

25 Tutkittiin 2 kaupallisesti saatavaa saponiinia,
nimittäin Merck "Weiss", rein 514 0023 sekä Sc. Lickardt
"S", Schuchart, München. (Saponiinit ovat puhtaita. Val-
mistaja ei ilmoita tuotteen laatua. Ne eroavat ohutlevy-
kromatografiassa Quil A:sta).

30 Saadaan kompleksi, jonka sedimentaatiovakio on 24
S ja joka osoittaa samaa rakennetta kuin esimerkin 3 mu-
kaan valmistettu kompleksi.

Esimerkki 13a

35 Tuhkarokkovirus (RIV, Bilthoven) liuotettiin esi-
merkin 3 mukaisesti. Virus-liuotusaineseosta sentrifugoi-
ttiin 2 tuntia 1 000 g:llä. Saatu supernatantti dialysoi-

tiin pienen suolapitoisuuden omaavaa fosfaattipuskuria vastaan (10 mM fosfaattia, 50 mM NaCl, pH 7,2) ja siirrettiin DEAE-Sefaros-anioninvaihtajaan, joka oli tasapainotettu 10 mM fosfaattipuskurilla (pH 7,2), jossa oli 50 mM NaCl ja 0,05 % Triton X-100. Absorboimaton materiaali pestiin pois samalla puskurilla. Pylväs tasapainotettiin sen jälkeen 10 mM fosfaattipuskurilla, joka sisälsi 50 mM NaCl ja 0,1 % Quil A:ta. Absorboitu aines eluoiitiin samalla puskurilla, joka sisälsi 300 mM NaCl.

10 Eluoitu aines sisälsi kompleksin, jonka luonteenomainen rakenne ilmenee kuvasta 2.

Esimerkki 13

5 mg esimerkin 3 mukaista tuhkarokkovirusta pantiin DEAE-selluloosatyyppiseen anioninvaihtajaan. Ioninvaihtaja säilytettiin 20 ml:n pylväässä, ja se tasapainotettiin 15 0,01 M fosfaattipuskurilla (pH 7,2), jossa oli 0,5 paino-% oktyyli- β -D-glykosidia. Näytemateriaali pantiin ioninvaihtajaan, ja adsorboitumaton materiaali pestiin pois huuhtomalla 5 pylvään tilavuudella 0,01 M fosfaattipuskuria (pH 7,2), jossa oli 0,5 paino-% oktyyli- β -D-glykosidia, jonka jälkeen adsorboitunut materiaali eluoiitiin 20 lisäämällä pylväaseen suolagradientti, joka oli 0 - 0,5 M NaCl liuotettuna 0,01 M fosfaattiin (pH 7,2), jossa oli 0,5 paino-% oktyyli- β -D-glykosidia. Jakeet, joista identifioitiin 25 tuhkarokkomembraaniproteiini, koottiin yhteen ja niihin lisättiin 0,1 paino-% Quil A:ta ja ne dialysoitiin 0,05 M ammoniumasetaattia (pH 7,0) vastaan. Saatiin kompleksi, jolla oli luonteenomainen rakenne, kuten käy ilmi kuvista 2 ja 3.

30 Esimerkki 14

22 nm:n suuruisia Hepatiitti B-viruspartikkeleita, jotka oli saatu London School of Tropical Medicine and Hygien'istä (Englanti), liuotettiin uudelleen 1 mg/ml:n konsentraationa TN:iin. 0,3 mg proteiinia, jonka partik-

kelikoko oli 22 nm, liuotettiin 2 tilavuus-%:lla Triton X-100, 0,5 M NaCl, ja inkuboitiin 16 tunnin ajan +37°C:ssa. Yhä edelleen toistetaan esimerkin 1 mukaista menetelmää.

5 Saadun kompleksin sedimentaatiovakio oli 20 S.

Saadulla kompleksilla oli elektronimikroskooppisessa tutkimuksessa rakenne, joka käy ilmi kuvasta 4. Tämä rakenne poikkeaa kuvassa 2 esitetystä rakenteesta siinä suhteessa, että se koostuu tämän rakenteen osista.

10 Esimerkki 15

3 mg härän ripulivirusta (diarrévirus, BDV) TN:ssä liuotettiin lisäämällä Triton X-100 1 tilavuus-%:iin saakka. Seosta sekoitettiin 2 tunnin ajan huoneen lämpötilassa. Näin liuotettu virus pantiin lektiinipylvääseen, joka
15 koostui lektiini Lentilistä, joka oli kytketty Sepharose 4B:hen (Pharmacia, Uppsala). Pylväs tasapainotettiin TN:llä ja sen jälkeen kun virusmateriaali oli viety pylvääseen, se pestiin 5 pylvään tilavuudella TN, joka sisältää 0,1 tilavuus-% Triton X-100, sekä sen jälkeen 10 pylvään tilavuudella TN. Viruksen vaippaproteiinit vapautetaan adsorptiosta siten, että kolonniin viedään eluointipuskuria, joka koostuu 0,2 M metyyli- α -D-mannosidista ja 0,5 paino-%:sta oktyyli- β -D-glykosidia TN:aan liuotettuna. Jakeet, jotka sisältävät viruksen vaippaproteiineja, kootaan ja niihin lisätään Quil A:ta 0,1 paino-%:iin saakka.
25 Seosta dialysoidaan 0,05 M ammoniumasetaattia (pH 7,0) vastaan +4°C:ssa 3 vuorokauden ajan vaihtaen 1 litran suurista puskurin määrää 3 kertaa.

Lopputuote lyofilisoidaan ja elektronimikroskopian
30 avulla nähdään (kompleksi) rakenteita, joita kompleksin osat muodostavat kuvana 4. Tämän valmisteen sedimentaatiovakio on 20 S.

Esimerkki 16

Puhdistettu, tapettu poliovirus, valmistettu RIV, Bilthoven'issa menetelmällä, jonka ovat kuvanneet Van Wezel et al. [Develop. Biol. Standard (1978), 41, sivut 159 - 168], liuotettiin sopivaan puskuriin, esim. TN, joka sisälsi liuottavan aineen, esim. 2 % SDS (natriumdodekyyllisulfaatti), inkuboimalla 37°C:ssa 2 tunnin ajan. Virus-

5 kapsidiproteiinit erotettiin elektroforeettisesti preparatiivisessa 10-%:isessa polyakryyliamidigeelissä, joka sisälsi 0,1 % SDS. Proteiinien sijainti geelissä selvitet-

10 tiin, minkä jälkeen geelistä leikattiin sopivia vyöhykkeitä, ja proteiinit eluoitiin elektroforeettisesti. VP3, jonka molekyylipaino on noin 26 kilodaltonia, on eräs kapsidiproteiini. VP3-pitoiseen liuokseen lisättiin Triton

15 X-100 2 %:n loppukonsentraatioksi. Seos käytettiin proteiinikompleksin (iskomin) valmistamiseen esimerkin 1 mukaisella sentrifugointimenetelmällä.

Elektronimikroskooppisessa tutkimuksessa ilmeni valmisteen luonteenomainen rakenne, joka käy ilmi kuvasta

20 3.

Esimerkki 17

Puhdistettu, tapettu poliovirus, valmistettiin RIV Bilthoven'issa, liuotettiin 67 tilavuus-%:iseen etikkahappoon, joka sisälsi 0,1 M $MgCl_2$. Tämän jälkeen virusmateriaalia ultrasentrifugoitiin 1 tunnin ajan 100 000 g:llä,

25 ja supernatantti, joka sisälsi yksinomaan virusproteiineja otettiin talteen ja dialysoitiin siten, että läsnä oli 0,1 paino-% Quil A:ta, 0,01 M Tris, 0,14 M NaCl (pH 7,4) vastaan.

30 Saadulla kompleksilla oli sama rakenne kuin esimerkin 3 mukaan valmistetulla kompleksilla.

Esimerkki 18

Neisseria meningitidiksien ulompia membraaniproteiineja saatiin jäähdytyskuivattuina National Institute of Health'ista (Hollanti) ja ne liuotettiin TN:ään, joka sisälsi 2 paino-% oktyyli- β -D-glykosidia ja 0,1 paino-% Quil A:ta, ja sitä käsiteltiin samalla tavalla kuin esimerkissä 4. Saatiin kompleksi, jonka sedimentaatiovakio oli 20 S mitattuna samalla tavalla kuin esimerkissä 2.

Esimerkki 19

Hydrofobisia aminohappoja sisältävä peptidi.
Suu- ja sorkkatauti-peptidi 144 - 159 O Kaufbenren.
Käytettiin VP1, joka oli syntetisoitu 0, 1, 2, 3 tai vastaavasti 4 tyrosiinin avulla, yhdistämällä ne toisesta päästä (kaupallisesti saatu). Peptidi liuotetaan vähimmäismäärään 67 tilavuus-%:ista etikkahappoa, neutraloidaan 25-%:isella ammoniakilla ja sekoitetaan 0,5 M ammoniumasetaattiin tislattun veden kanssa (detergenttiä 2 %:n lopulliseen konsentraatioon saakka). Lisätään 0,1 % glykosidia ja seosta dialysoidaan 0,05 M ammoniumasetaattia (pH 7,0) vastaan (dialyysiletku Spectra Por 6 MWCO 1 000).

Hiiriä rokotettiin kaksi kertaa 50 μ g:lla 2 viikon välein.

25	Peptidi/tyrosiinin lukumäärä	ELISA-arvo (vasta-aineita) toinen näyte
----	------------------------------	---

30	0	0,005
	1	0,217
	2	0,311
	3	0,347
	4	0,346

Kompleksin muodostuminen voidaan osoittaa elektronimikroskoopin avulla (kts. kuva 5), jossa nähdään pallomainen, elektronitiheä partikkeli, jonka pituus on 20 - 40 nm ja leveys on 10 nm. Nähtävissä on myös poikkeavia kokoja.

Kuvassa 5a näkyy elektronimikroskooppikuva peptidistä, joka on kytketty kolmeen tyrosiiniin ja kuvassa 5b on elektronimikroskooppikuva peptidistä, joka on kytketty neljään tyrosiiniin.

Esimerkki 20

Hiiren IgG, joka on puhdistettu tunnetuin menetelmin [M. Van der Branden, J. L. de Coen, L. Kanarek ja Ruyshaert; Molecular Immunology 18, (1981), sivut 621 - 637] tai se on rikastettu ammoniumsulfaattiliuoksen avulla [J. E. Conradie, M. Govender ja L. Visser; Journal of Immunological Methods, osa 59 (1983), sivut 289 - 299; julkaisut sisällytetään viitteinä]; ja dialysoidaan kylmähuoneessa yön yli 1 litraa vastaan 0,15 M fosfaattisitraattia (PC), joka on puskuroitu pH-arvoon 2. Tämän jälkeen lisätään 2 % detergenttiä (esim. oktyyli- β -D-glykosidia). Jos käytetään detergenttiä, jolla on alhainen kriittinen misellaarinen konsentraatio (CMC), täytyy detergentin vaihdon tapahtua ennen kuin dialyysi alkaa. Seos dialysoidaan PC:tä vastaan pH-arvossa 7. Tunnin kuluttua lisätään Quil A:ta, kunnes saadaan 0,05 5:n loppukonsentraatio, ja dialyysiä jatketaan PC:tä vastaan ja pH-arvossa 7 yhden vuorokauden ajan kylmähuoneessa.

Kompleksin muodostuminen osoitetaan sentrifugoimalla 5 - 30-%:isen sakkaroosigradientin kautta 3,3 tunnin ajan 40 000 kierroksella minuutissa Beckman SW-60 roottorissa. Kompleksi havaitaan gradientilla ELISA-tekniikan avulla.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä immunogeenisen kompleksin, joka sisältää antigeenisistä proteiineja tai peptidejä, joissa on hydrofobisia alueita, jolla kompleksilla on avoin pallomainen rakenne, jonka muodostavat pyöreät alayksiköt tai pallomaisen rakenteen osat, ja jolla kompleksilla yleensä on alempi sedimentaatiovakio kuin vastaavilla miselleillä ja suurempi sedimentaatiovakio kuin proteiinin tai peptidin vastaavalla monomeerisellä muodolla, valmistamiseksi amfipaattisista proteiineista tai peptideistä tai niitä sisältävistä viruksista, mykoplasmoista, parasiiteista tai eläinsoluista, t u n n e t t u siitä, että sekoitetaan vähintään yksi edellä mainituista komponenteista vähintään yhden liuottavan aineen kanssa, jolloin komplekseja muodostuu amfipaattisten antigeenisten proteiinien tai peptidien ja liuottavan aineen välillä, minkä jälkeen amfipaattiset antigeeniset proteiinit tai peptidit erotetaan liuottavasta aineesta, liuottavan aineen läsnäollessa tai erotettuna liuottavasta aineesta, ja ne siirretään suoraan liuokseen, jossa on vähintään yksi triterpeenisisaponiini, jossa on hydrofobisia ja hydrofiilisiä alueita pitoisuudessa, joka on vähintään kriittinen misellipitoisuus (CMC).

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että käytetään triterpeenisisaponiineja, jotka on valittu ryhmästä, johon kuuluu Quillaja saponaria Molina.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että käytetään peptidejä, jotka on valittu ryhmästä, joka käsittää amfipaattiset peptidit ja ei-hydrofobiset peptidit, jolloin ei-hydrofobiset peptidit on tehty hydrofobisiksi liittämällä hydrofobisia ryhmiä, tai amfipaattiset peptidit, jotka sisältävät saa-

vuttamattomissa olevia hydrofobisia ryhmiä, jotka on tehty tavoitettaviksi miedon denaturoinnin avulla.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että käytetään membraaniproteiine-
5 ja, jotka on valittu ryhmästä, johon kuuluu Orthomyxoviri-
dae, Paramyxoviridae, Retroviridae, Rhabdoviridae, Togavi-
ridae, Herpesviridae, hepatiitti-B-virus, toksoplasman
membraaniproteiinit ja Picornaviridae.

10 5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä immuno-
geenisen kompleksin valmistamiseksi, t u n n e t t u
siitä, että käytetään liuosta, joka sisältää liuottavaa
ainetta ja sokeria, jolloin sokerin konsentraatio ei ole
suurempi kuin konsentraatio triterpeenisaponiinipitoisen
sokerigradientin ylemmässä osassa, ja liuottavan aineen
15 konsentraatio pidetään 0,25 - 3 paino-%:ina.

20

25

30

35

Patentkrav

1. Förfarande för framställning av ett immunogent komplex innehållande antigena proteiner eller peptider med
5 hydrofoba regioner, vilket komplex har en öppen sfärisk struktur bestående av cirkulära underenheter eller delar av den sfäriska strukturen, och vilket komplex vanligen har lägre sedimentationskonstant än motsvarande miceller och högre sedimentationskonstant än den motsvarande monomera formen av protein eller peptid, ur amfipatiska proteiner eller peptider eller ur sådana innehållande virus, bakterier, mykoplasma, parasiter eller djurceller,
10 k ä n n e t e c k n a t därav, att man blandar minst en av ovannämnda komponenter med minst ett solubiliseringsmedel, varvid komplex bildas mellan amfipatiska antigena proteiner eller peptider och solubiliseringsmedlet, varefter de amfipatiska antigena proteinerna eller peptiderna separeras från solubiliseringsmedlet, i närvaro av eller separerat från solubiliseringsmedlet, och överföres direkt
20 till en lösning innehållande minst en triterpensaponin med hydrofoba och hydrofila regioner i en koncentration av minst den kritiska micellkoncentrationen (CMC).

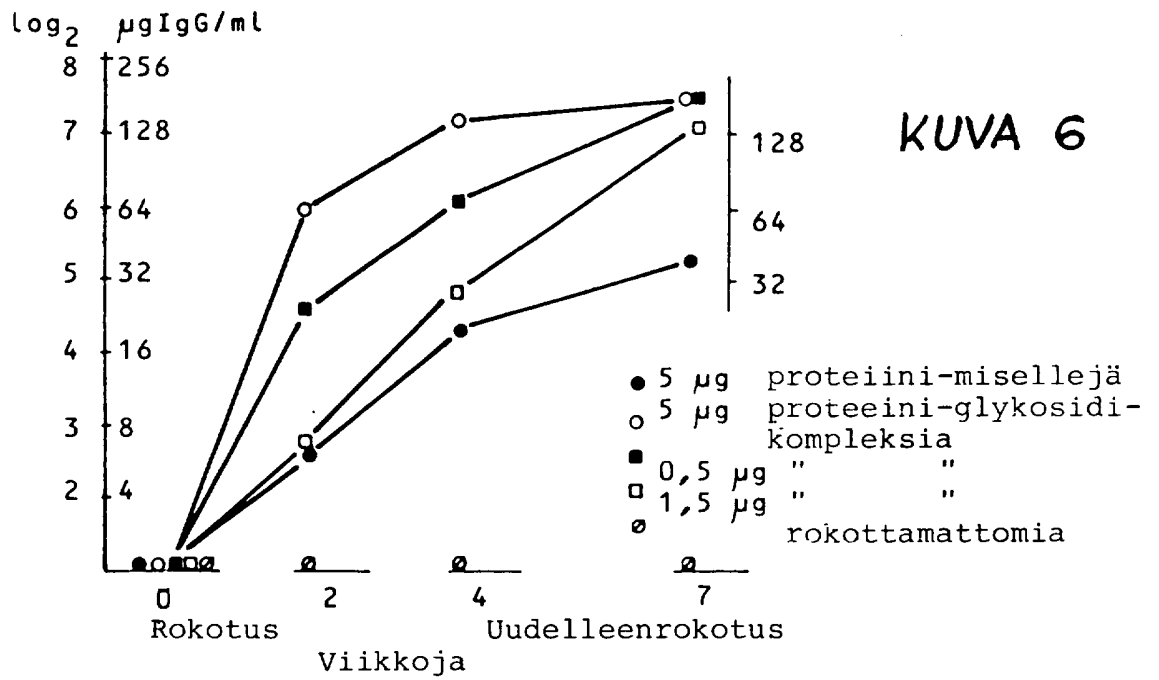
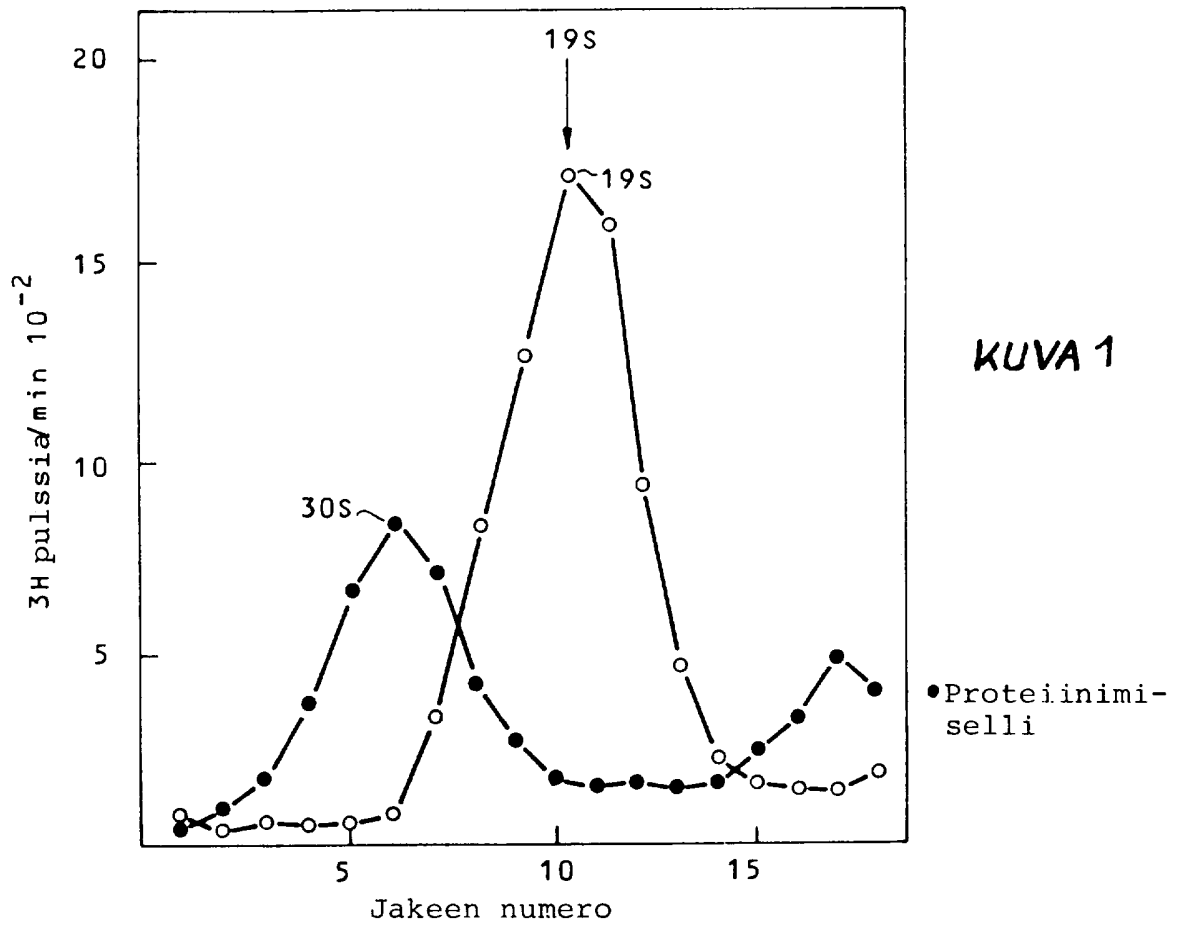
2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att man använder sig av triterpensaponiner valda från gruppen Quillaja saponaria Molina.
25

3. Förfarande enligt patentkravet 1 eller 2, k ä n n e t e c k n a t därav, att man använder sig av peptider valda från gruppen bestående av amfipatiska peptider och icke-hydrofoba peptider, varvid icke-hydrofoba
30 peptider gjorts hydrofoba genom koppling till hydrofoba grupper, eller amfipatiska peptider innehållande icke-tillgängliga hydrofoba grupper som gjorts tillgängliga genom svag denaturering.

4. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att man använder sig av membranpro-
teiner valda från gruppen bestående av Orthomyxoviridae,
Paramyxoviridae, Rhabdoviridae, Togoviridae, Herpesviri-
5 dae, hepatit B-virus, membranproteiner från toxoplasma och
Picornaviridae.

5. Förfarande för framställning av ett immunokomp-
lex enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t där-
av, att man använder sig av lösning innehållande solubili-
10 seringsmedel och socker, varvid sockret har en koncentra-
tion icke högre än koncentrationen i det övre delen av den
triterpensaponinhaltiga sockergradienten och koncentra-
tionen av solubiliseringsmedelt hålles vid 0,25 - 3
vikt-%.

80600



80600

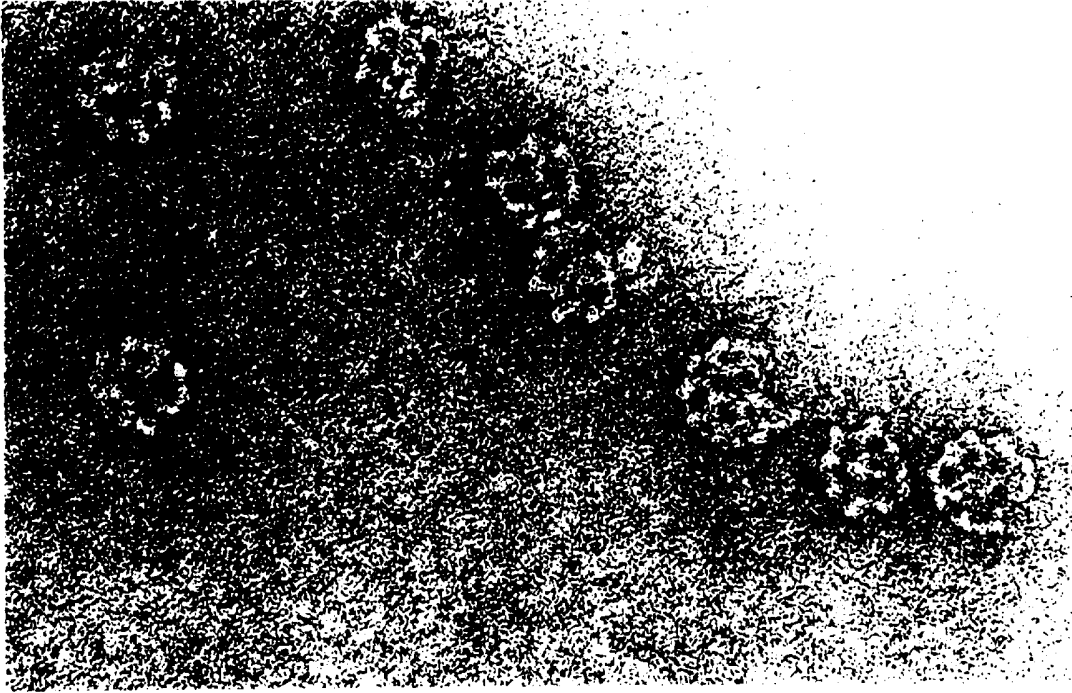


FIG.2

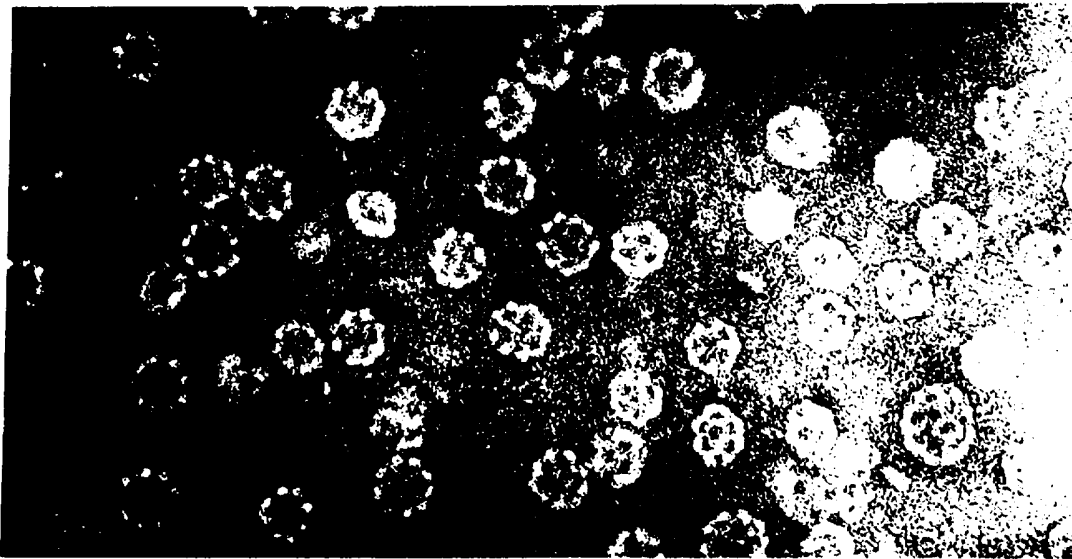


FIG.3



FIG. 4

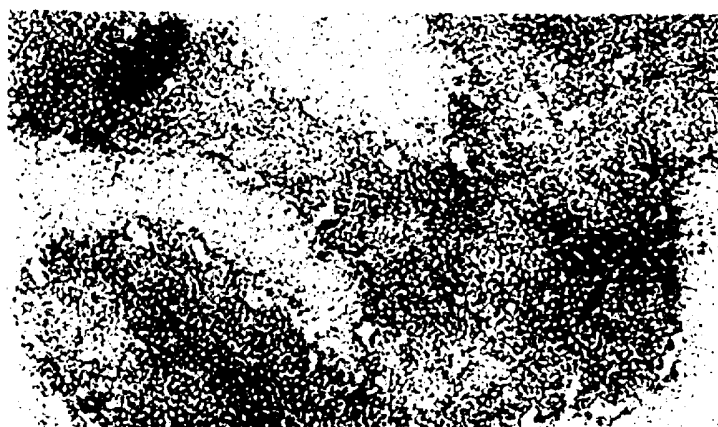


FIG. 5A



FIG. 5B