



NORGE

[NO]

**STYRET
FOR DET INDUSTRIELLE
RETTSVERN**

[B] (11) ÚTLEGNINGSSKRIFT

Nr. 153692

(51) Int. Cl.⁴ C 12 N 7/06, A 61 K 39/245

(21) Patentsøknad nr. 783143

(22) Inngitt 18.09.78

(24) Løpedag 18.09.78

(41) Alment tilgjengelig fra 20.03.79
(44) Søknaden utlagt, utlegningskrift utgitt 27.01.86
(30) Prioritet begjært 19.09.77, USA, nr. 834598

(54) Oppfinnelsens benevnelse **FREMGANGSMÅTE VED FREMSTILLING AV EN ANTIGEN,
IMMUNOGEN SUBENHET AV HERPES SIMPLEX TYPE 1
(HSV1) ELLER TYPE 2 SUBENHET (HSV2).**

(71)(73) Søker/Patenthaver **MERCK & CO., INC.,
126 East Lincoln Avenue,
Rahway, NJ 07065,
USA.**

(72) Oppfinner **VIVIAN LARSON,
Harleysville, PA,
ERNEST DALE LEHMAN,
North Wales, PA,
USA.**

(74) Fullmektig **Tandbergs Patentkontor A-S, Oslo.**

(56) Anførte publikasjoner **Chemical Abstracts 75 (1971) 16540 k,
Chemical Abstracts 78 (1973) 13591 d.**

Foreliggende oppfinnelse angår en fremgangsmåte ved fremstilling av en antigen, immunogen subenhet av herpes simplex type 1 (HSV1) eller type 2 subenhet (HSV2), hvilken fremgangsmåte er kjennetegnet ved at man

- a) infiserer cellene av en vevkultur med et herpes simplex virus type 1 (HSV1) eller type 2 (HSV2) som er i stand til å vokse i vevkulturen,
 - b) inkuberer den infiserte vevkultur inntil en vesentlig del av cellene oppviser cytopatisk virkning,
 - c) bringer de infiserte celler i kontakt med et ikke-ionisk eller anionisk overflateaktivt middel for å erholde et ekstrakt,
 - d) hydrolyserer i det vesentlige alt intakt dobbeltstrenget DNA i ekstraktet, og
 - e) fraksjonerer ekstraktet ved ionebytter- eller affinitets-kromatografi og at når det 1) anvendes herpes simplex type 1, fåes en antigen, immunogen HSV1 subenhet som inneholder to grupper av viralrettede, membranbundne glycoproteiner som er oppløselige i nærvær av et ikke-ionisk eller anionisk overflateaktivt middel, hvor den første gruppe har molekylvekt på 123.000 dalton og den andre gruppe på 60.000 dalton, og hvor subenheten er fri for påvisbart DNA og i stand til å fremkalle nøytraliserende antistoff, eller når det 2) anvendes herpes simplex type 2, fåes en antigen, immunogen HSV2 subenhet som inneholder tre grupper av viralrettede, membranbundne glycoproteiner som er oppløselige i nærvær av et ikke-ionisk eller anionisk overflateaktivt middel, hvor den første gruppe har molekylvekt på fra 110.000 til 130.000 dalton, den andre gruppe på fra 83.000 til 90.000 dalton, og den tredje på fra 55.000 til 60.000 dalton, og hvor subenheten er fri for påvisbart DNA og i stand til å fremkalle nøytraliserende antistoff.
- De resulterende produkter er nyttige som HSV1 og HSV2 vaksiner.

Herpesvirus er ubikvitære av natur idet naturlige verter innbefatter frosk, kylling, mus, marsvin, katt, hund, svin, kveg, hest, ape og menneske. Menneske er den naturlige vert for Herpes simplex type 1 og 2, vannkopper/helvetesild, cytomegalovirus og Epstein-Barr virus (EBV) og kan være en temporær vert for herpes B virus i aper med alvorlige konsekvenser. Klinisk sykdom bevirket av herpesvirus utgjør et betydelig helseproblem overfor hvilket en effektiv behandling ikke er tilgjengelig. Herpes simplex type 1 og 2 er antigenisk relatert, men fremkaller generelt infeksjoner på forskjellige steder. Herpes simplex type 1 (HSV1) overføres oralt-respiratorisk og er som oftest forbundet med orale lesjoner. Herpes simplex type 2 (HSV2) overføres venerisk og er vanligvis ansvarlig for herpes genitalis og neonatal herpes. Den rolle disse virus spiller ved kronisk sykdom er ikke blitt fastslått. Imidlertid er HSV2 implisert i genitalcancer på basis av: (a) seroepidemiologiske observasjoner, (b) påvisning av herpesvirusantigener eller viral nucleinsyre i neoplastisk vev, og (c) in vitro-overføring av et utall av celler, innbefattende humane celler, ved bestrålt virus.

Medlemmer av herpesvirusgruppen er relativt store omhyllede ether-følsomme DNA virus. Herpes simplex type 1 virus har karakteristisk vist seg å inneholde to dominerende molekylvektgrupper av omhyllende glycoproteiner, mens type 2 virus har karakteristisk vist seg å utvise tre dominerende molekylvektgrupper av omhyllende glycoproteiner. Enkelte av disse glycoproteiner er blitt isolert og har vist seg å fremkalle nøytraliserende antistoff i dyr.

Herpesvirus skaper særpregede og individuelle problemer når det gjelder vaksineutvikling, spesielt for anvendelse i mennesker. Generelt fremstilles virale vaksiner, enten disse er levende svekkede vaksiner eller drepte inaktiverede vaksiner, fra virus inneholdt i dyreverv-væsker eller cellekultur-væsker eller virale konsentrater avledet derfra. Imidlertid

er herpesvirus generelt tilbøyelig til å være mer celle-assosiert enn mange andre virus, dvs. de er ikke tilbøyelig til å spre seg ut i væskene, og spesielt enkelte medlemmer av gruppen vil ikke formere seg til et tilstrekkelig høyt nivå av virioner som er nødvendig for fremstilling av vaksine i stor målestokk. I tillegg er visse herpesvirus slik som HSV2 og EBV, mistenkt for å være onkogenisk for mennesker. Fremstilling av vaksiner fra slike virus utgjør et spesielt problem ved at vaksinen må være fri for enhver viral genetisk informasjon som er i stand til å fremkalle cancer. Selv inaktiverede helvirusvaksiner betraktes som potensielt farlige i slike tilfeller fordi de inneholder viral nucleinsyre. Nylig er det gjort anstrengelser for å tilveiebringe forbedrede virale vaksiner, og dette har ført til utvikling av subenhet- eller "splitt"-vaksiner for å redusere eller fjerne uønskede vert- eller viralkomponenter i vaksinene. Et eksempel er fremstilling av influensa-viral-subenhetvaksine fra infisert kyllingegg-allantoinvæske for å redusere toksisiteten og pyrogenisiteten, slik som beskrevet i US patentskrift 3 962 421.

CA 75: 16540 k (1971) beskriver behandling av herpes simplex virus som resulterer i tap av membranbundne glycoproteiner. Tapet av disse glycoproteiner resulterer i et produkt som ikke er i stand til å fremkalle dannelsen av nøytraliserende antistoff på grunn av at de omhyllende glycoproteiner er de antigener som er ansvarlige for å fremkalle dannelsen av virusnøytraliserende antistoffer. De virale nucleokapsider som dannes ved behandlingen beskrevet i den motholdte publikasjon, er ikke noen subenhet fordi de omhyllende glycoproteiner som er ansvarlige for å fremkalle dannelsen av virusnøytraliserende antistoff, er blitt fjernet.

CA 78: 13591 d (1973) beskriver isolering av forskjellige virale proteiner ved ekstraksjon av infiserte, humane tumorceller med NP-40.

Ekstraktet elektroforesebehandles i acrylamidgeler, antigen-antistoff-komplekser dannes ved å føre de oppløseliggjorte proteiner over en immunoabsorberende kolonne, og de absorberte

radioaktivt merkede glycoproteiner elueres med 8M urea og 0,15% SDS (natriumdodecylsulfat). Det er ikke vist at antigenene er immunogene. De strenge betingelser som anvendes, dvs. 8M urea og 0,15% SDS, vil i realiteten denaturere proteinene og resultere i tap av biologisk aktivitet.

Figur 1 i de medfølgende tegninger illustrerer polypeptidsammensetning av HSV2 antigen isolert ved *Lens culinaris* lectin-Sepharose[®] affinitetskromatografi. Elektroforese ble utført som beskrevet i Courtney, McCombs og Melnick, *Virology* 43, 356-365 (1971). Polypeptider ble farvet med "Coomassie blue", og densitometerkurven ble beholdt ved sveiping av gelen ved en bølgelengde på 540 nm. Tallene på toppene er molekylvekter.

Figur 2. Glycopolypeptidsammensetning av HSV2 antigen isolert ved *Lens culinaris* lectin-Sepharose affinitetskromatografi. De virale glycoproteiner ble merket in vitro ved å tilsette (³H)glucosamin til de infiserte celler 4 timer etter infisering. Elektroforese ble utført som beskrevet i figur 1, og den radioaktive profil ble beholdt ved å skjære gelen i 2 mm segmenter, oppløse polyacrylamidet i 30%-ig hydrogenperoxyd og undersøke på radioaktivitet i et scintillasjonsspektrometer.

Figur 3. Polypeptidsammensetning av HSV1 antigen isolert ved con A-Sepharose[®] (concanavalin A covalent bundet til Sepharose[®]) affinitetskromatografi. Elektroforese ble utført som beskrevet i figur 1.

Figur 4. Glycopolypeptidsammensetning av HSV1 antigen isolert ved con A-Sepharose[®] affinitetskromatografi. Analysen ble utført som beskrevet i figur 2.

I henhold til foreliggende oppfinnelse er utgangsmaterialet herpesvirusinfiserte celler formert i en cellekultur. For HSV1 og HSV2 vaksiner for mennesker er f.eks. et egnet cellekultursystem primære hønsefosterceller formert som monoskikt i rulleflasker ved alminnelig kjente metoder. Cellene infiseres med HSV1 eller HSV2 vira ved en lav multiplisitetsinfeksjon (MOI, dvs. antallet viruspartikler pr. celle), som en MOI på fra 0,001 til 1,0, fortrinnsvis

ca. 0,01, ved metoder vanligvis anvendt i faget, og kulturene inkuberes inntil viral cytopatogen virkning observeres i en stor del av cellene, typisk ca. 75% av cellene. Ved enden av inkubasjonsperioden fjernes cellekulturmediet, og celle-monoskiktet vaskes eventuelt med en balansert saltoppløsning. Alternativt kan cellene samles fra kulturkaret ad mekanisk vei, vaskes med en balansert saltoppløsning, sprenses ved metoder som lydbehandling, og den erholdte sprenge celleduspensjon klares i en lavhastighets-sentrifuge eller lignende. Fremgangsmåten for å oppløse og ekstrahere viral-rettet membran-bundne glycoproteiner fra virusinfiserte celler kan anvendes like effektivt på de ovenfor beskrevne intakte celler i monoskikt som på de sprenge celle-ekstrakter. Direkte kjemisk ekstraksjon av de intakte monoskikt-cellekulturer byr på en betraktelig praktisk fordel ved vaksinefremstilling i stor målestokk da den ikke krever mekanisk fjernelse av cellene fra cellevekstflaten. Den har også vist seg å gi et høyere proteinutbytte ved å nedsette fysikalske tap involvert i mekanisk høstning av celler, og den tillater eliminering av lyd-behandlingstrinnet og lavhastighets-sentrifugeringstrinnet. Under riktig regulerte betingelser forbedrer denne metode antigenrenheten ved selektiv ekstraksjon av antigener, dvs. mindre DNA ekstraheres sammenlignet med den mekaniske høstning og lydbehandlingsmetode.

Det overflateaktive middel som anvendes for ekstraksjon kan tilhøre den ikke-ioniske eller anioniske kategori. Det anvendte ikke-ioniske overflateaktive middel kan være f.eks. ett eller flere av de følgende typer:

1. Aryletheraddukter av ethylenoxyd som polyoxyethylen-alkylfenoler. Spesifikke eksempler på denne type er polyoxyethylen-octylfenol (Triton[®] X-100, Nonidet[®] P-40, "Beloid EMP"), polyoxyethylen-9-9,5-nonylphenol (Renex[®] 698), polyoxyethylen-9-10-nonylphenol (Triton[®] N101) og polyoxyethylen-10,5-nonylphenol (Tergitol[®] NPX).

2. Alifatiske etheraddukter av ethylenoxyd, som polyoxyethylen-alifatiske alkoholer. Spesifikke eksempler på denne type er polyoxyethylen-10-oleylalkohol ("Brij 96"); polyoxyethylen-7-trimethylen-7-lineær alkohol C₁₁-C₁₅ (Tergitol[®] 15-S-7).

3. Esteraddukter av ethylenoxyd, som polyoxyethylenfettsyrer. Et spesifikt eksempel på denne type er polyethylen-glycol 400 monolaurat ("Cithrol 4ML 400").

4. Aminaddukter av ethylenoxyd som polyoxyethylenfettaminer. Spesifikke eksempler på denne type er polyoxyethylen-15-stearylamin (Ethomeen[®] 18/25), polyoxyethylen-15-kokosfettaminer, gjennomsnittlig molekylvekt 860 (Ethomeen[®] C/25), og polyoxyethylen-5-soyafettaminer (Ethomeen[®] S/15).

Det anioniske overflateaktive middel anvendt for ekstrahering, kan være et gallesalt som f.eks. natrium-deoxycholat, natriumcholat eller natriumtaurocholat.

For ekstraksjon er en foretrukken type av ikke-ionisk overflateaktivt middel en polyoxyethylen-alkylfenol hvor alkylgruppen har fra ca. 6 til ca. 12 carbonatomer, f.eks.

Triton[®]X-100 eller Nonidet[®]P-40. Behandling med det ikke-ioniske overflateaktive middel ekstraherer virale glycoproteiner, mens behandling med det ikke-ioniske overflateaktive middel eventuelt i nærvær av salt, typisk fra 0,1M opptil ca. 2M salt avhengig av viruset, øker ekstraksjon av virale glycoproteiner. Saltet kan være et alkalisalt, et jordalkalisalt eller et salt av en treverdige kation. Eksempler på slike salter er KCl, NaCl, NH₄Cl, MgCl₂ eller CaCl₂. Ekstraksjonen finner fortrinnsvis sted ved nøytral pH, og en puffer, f.eks. Tris-HCl, kan anvendes for å innstille pH om nødvendig. En proteolytisk inhibitor, f.eks. fenyl-methyl-sulfonyl-fluorid (PMSF), er eventuelt tilstede. Ekstraksjonen kan finne sted ved kjøleskapstemperatur opptil inkubatorstemperatur, dvs. fra 4°C til 37°C i fra ca. 15 minutter til flere dager. Ekstraksjonstiden kan strekke seg opptil den tid ved hvilken nedbrytning av det ønskede antigenholdige materiale inntreffer. Det er imidlertid i alminnelighet ingen fordel ved en ekstraksjonstid på mere enn noen få timer. Typisk utføres ekstraksjonen i 2% Triton[®]X-100, 0,15M - 1M NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 og 2 mM PMSF ved 20-23°C i 1 - 4 timer.

Efter ekstraksjon sentrifugeres ekstraktmediet for å fjerne uoppløselige stoffer: celleavfall, cellekjerner og virale nucleocapsider. Sentrifugeringen kan utføres ved fra ca. 50.000 x g til høyere i fra 15 minutter til flere timer, typisk

ved ca. 100.000 x g i ca. 1 time. Det oppløselige ekstrakt er ikke-infiserende, men inneholder noe gjenværende intakt (dobbelstrenget) DNA og RNA. Dobbelstrenget (nativ) DNA og RNA måles ved ethidiumbromidbestemmelsen ifølge Karsten et al., Anal. Biochem., 46, 135-148, 1972. Bestemmelsen påviser DNA i mengder så lave som 50 ng og RNA i mengder så lave som 100 ng. Total DNA (enkelt- og dobbelstrenget DNA, og DNA-fragmenter) måles ved metoden ifølge Kissane et al., J. Biol. Chem., 233, 184-188, 1958, som påviser mengder så lave som 50 ng.

Eventuelt kan det oppløselige materiale som fåes fra ekstraksjonen, behandles på dette trinn eller senere under fremgangsmåten, med DNase for å hydrolysere eventuelt gjenværende DNA og gi et produkt som er i det vesentlige fritt for intakt (dobbelstrenget) DNA (under 50 ng/100 µg protein).

Det oppløselige materiale som fåes fra ekstraksjonsbehandlingen med det ikke-ioniske overflateaktive middel, er særlig egnet som utgangsmateriale for kromatografisk rensning av membranbundet herpesvirus-glycoproteiner. Kromatografisk fraksjonering i nærvær av det overflateaktive middel resulterer i anrikning av de virale glycoproteiner, fjernelse og/eller reduksjon av DNA-fragmenter, RNA og andre uønskede proteiner. Fraksjonering av det oppløselige materiale kan utføres ved anionbyttekromatografi ved kjente metoder. Anionbytte mediet kan være f.eks. DEAE-cellulose. Hvis DNase-oppslutningen sløyfes, er produktet fra DEAE-cellulosekromatografi i det vesentlige fritt for dobbelstrenget DNA (< 50 ng/100 µg protein), men kan inneholde gjenværende total DNA (1 µg/100 µg protein). Hvis DNase-oppslutning utføres før kromatografering, er produktet i det vesentlige fritt for all DNA (< 50 ng/100 µg protein). Mere fordelaktig kan det oppløselige materiale fraksjoneres ved affinitetskromatografi på et immobilisert lectin ved kjente metoder. Lectiner er celleagglutinerende proteiner som forekommer meget alminnelig i frø av belgplanter, men de finnes også i andre deler av plantene, i andre planter enn belgplanter, og i dyr. Lectiner bevirker agglutinerings ved binding til carbohydrater på celleoverflater, og det er denne spesifisitet som gjør lectiner nyttige ved isoleringen og rensningen av carbohydratholdige makromolekyler som glycoproteiner.

Ved deres anvendelse som glycoproteinrensende reagenser blir lectinene vanligvis uoppløseliggjort og immobilisert ved at de bindes covalent til en inert matriks som f.eks. dextraner, agarose, cellulose og lignende. Fortrinnsvis immobiliseres lectinet på en kolonne.

Spesifikke lectiner er f.eks. *Lens culinaris* lectin, Concanavalin A (*Canavalia ensiformis* lectin), soyabønne-agglutinin (*Glycine max* lectin), hvetespire-agglutinin, *Dolichos biflorus* lectin, *Lotus tetragonolobus* lectin, *Phaseolus lunatus* lectin, *Phaseolus vulgaris* lectin (havebønne-lectin), jordnøtt-lectin, *Pisum sativum* lectin (sukkerert-lectin), *Vicia graminea* lectin, *Robinia pseudoacacia* lectin (storrobinia-lectin), *Vicia faba* lectin (bønnevikke-lectin), *Ulex europeus* lectin (gulltorn-lectin), *Vicia cracca* lectin (fuglevikke-lectin), *Solanum tuberosum* lectin (potet-lectin), *Abrus precatorius* lectin, *Triticum vulgare* lectin (hvete-lectin), *Momordia charantia* lectin, *Agaricus campestris* lectin (marksjampinjong-lectin), *Sesamum indicum* lectin, *Helix pomatia* lectin (vingårdsnegl-lectin), *Wisteria floribunda* lectin, *Laburnum alpinum* lectin, *Sophora japonica* lectin, *Phaseolus limensis* lectin og *Limulus polyphemus* lectin, (hesteskokrabbe-lectin). For HSV2 er et foretrukket lectin *Lens culinaris*, og for HSV1 er et foretrukket lectin concanavalin A. Produktet erholdt fra lectin-affinitets-kromatografi er i det vesentlige fritt for dobbeltstrenget og total DNA (< 50 ng/100 μ g protein) selv uten DNase-behandling og inneholder intet påvisbart RNA (< 100 ng/100 μ g protein).

Eventuelt kan den virale subenhet isolert ved adsorpsjon på det immobiliserte lectin behandles med et materiale som er i stand til å adsorbere lectiner som kan ha løsnet fra adsorpsjonsmidlet. Et slikt materiale kan være et polymerisert dextran, som en av Sephadex[®]-gelene.

De viral-rettede glycoproteiner isolert ved enten ionebytting eller affinitetskromatografi kan eventuelt renses ytterligere og skilles ved adsorpsjon på calciumfosfatholdige adsorpsjonsmidler, f.eks. brushit ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) eller heller hydroxylapatit [$(\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2)$]. Adsorpsjonskromatografi utføres i nærvær av et overflateaktivt middel ved kjente fremgangsmåter.

Det virale subenhetsantigen som fåes ved behandling med enten anionbytteharpiksen eller det immobiliserte lectin, er fritt for påvisbart dobbeltstrenget DNA og kan anvendes som en vaksine for å bevirke nøytralisering av antistoff eller cellebevirkede immunresponser og for å beskytte laboratoriedyr mot paralyse og død bevirket av herpesvirus. Den virale subenhet isolert ved lectinadsorpsjon inneholder ikke noe påvisbart DNA eller RNA bestemt ved de ovenstående metoder, mens den virale subenhet isolert ved adsorpsjon på anionbyttemedium inneholder ca. 1,0% totale DNA-fragmenter eller RNA.

Den virale subenhetsvaksine kan sterilfiltreres og eventuelt behandles med inaktiveringsmidler, som f.eks. varme, UV, DNase, formalin eller thimerosal for å garantere sikkerhet. Den immuniserende virkning av den virale subenhetsvaksine kan forsterkes ved å adsorbere det virale subenhetsantigen på alun eller ved å anvende andre immunologiske hjelpestoffer. For anvendelse som en vaksine må de virale subenhetsantigener være i det vesentlige frie for overflateaktivt middel. Adsorpsjonen av antigenet på alun gir en særlig bekvem måte for å fjerne eventuelt ubundet gjenværende overflateaktivt middel.

De immunogene antigener fremstilt ifølge foreliggende oppfinnelse kan fremstilles for vaksineanvendelse ved forening med et fysiologisk godtagbart preparat, som f.eks. PBS, saltvann eller destillert vann og sterilfiltrering. Et antimikrobielt konserveringsmiddel, f.eks. thimerosal, kan eventuelt være tilstede. Likeledes kan et inaktiveringsmiddel, f.eks. formaldehyd, være tilstede for å drepe eventuelt gjenværende levende virus, og for å inaktivere eventuell enkeltstrenget nucleinsyre.

Vaksinen ifølge foreliggende oppfinnelse kan anvendes, om ønskes, sammen med vaksinestabilisatorer og vaksinehjelpestoffer. Typiske stabilisatorer er f.eks. gelatin, casein og albumin. Et eksempel på et hjelpestoff er alun. Et hjelpestoffpreparat kan fremstilles fra jordnøttolje, isomannid-monooleat og aluminium-

monostearat. Vaksinen kan lagres i kjøleskap eller i frossen eller lyofilisert form. Disse antigener er immunogene i pattedyrarter og er nyttige som vaksiner basert på induksjon av anti-stoff i marsvin, marmosett og Cebus aper, katter og basert på beskyttelse mot letale, homologe virusinfeksjoner i mus.

De følgende eksempler belyser foreliggende oppfinnelse.

Eksempel 1

Curtis-stammen av HSV2 ble mottatt fra dr. A. J. Nahmias ved Emory University, Atlanta, Georgia, med en passasjehistorie på 3 passasjer i primær kaninnyre. Dette virus ble passert ytterligere 3 ganger i kaninnyreceller og derpå avpasset til hønsefosterceller ved 8 seriepassasjer.

Hønsefostere fra 11 dager gamle befruktete egg fra en leucosis-fri flokk trypsiniseres, og den erholdte enkeltcellesuspensjon plantes i rulleflasker i medium 199 inneholdende 2% kalvefosterserum og 50 µg/ml neomycin og inkuberes ved 36°C på en rulle mølle.

På den fjerde dag infiseres monoskiktskulturene med HSV2 virus ved en MOI på 0,01 med en begynnelsesadsorpsjonsperiode på 2 timer. De infiserte kulturer inkuberes ved 34°C på rulle møller inntil cytopatisk virkning iakttaes i ca. 75% av cellene, ved ca. 44-48 timer.

Det overstående vekstmedium kastes, og monoskiktskulturene vaskes forsiktig (3 x 50 ml) med PBS under rotering på rulle møllen for å fjerne gjenværende kalvefosterserum. Etter vasking tilsettes et ekstraktivt medium inneholdende 2% Triton[®]X-100, 1M NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 2 mM fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) og 4,75% ethanol til flaskene under rotering på møllen ved en temperatur på 20 - 23°C, og ekstraksjonen får lov til å fortsette i ca. 30 minutter. Ekstraksjonsmediet oppsamles, karene vaskes med ytterligere ekstraksjonsmedium, og vaskevæsken tilsettes til det opprinnelige ekstraksjonsmedium. De forenede celleekstrakter holdes ved en temperatur på 20 - 23°C i en totaltid på ikke under 1 time fra tidspunktet for den første tilsetning av ekstraksjonsmedium til cellekulturflaskene og sentrifugeres så ved 105.000 g i 1 time ved 20 - 23°C.

Den overstående væske innstilles på pH 7,0, magnesiumklorid tilsettes til en sluttkonsentrasjon på 0,005M, og deoxyribonuclease fra kveg-pancreas (1 mg/ml i avionisert, destillert vann) tilsettes for å få en sluttkonsentrasjon på 50 µg/ml. Blandingen inkuberes ved 20 - 23°C i 4 timer. Blandingen er nu i det vesentlige fri for intakt (dobbelstrengt) DNA.

Blandingen fraksjoneres på en *Lens culinaris* lectin-affinitetskolonne. *Lens culinaris* lectin-Sepharose[®] affinitetsadsorbenten fremstilles ved kovalent binding av *Lens culinaris* lectin til CNBr-aktivert Sepharose[®] 4B eller aktivert CH-Sepharose[®] 4B ved kjente metoder. Adsorbenten suspenderes i 0,1% Triton[®] X-100, 1,0M NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 (utgangspuffer) og helles i en kromatografikolonne. Sluttdimensjonene på det adsorberte lag er 2,6 cm (innvendig diameter) x 10 cm (53,1 ml lagvolum). Adsorbenten vaskes med 250 ml 0,2M α -methyl-D-mannosid i utgangspuffer, og dette følges av minst 5 kolonnevolum utgangspuffer. Strømningshastigheten i kolonnen holdes ved 100 ml/h med en peristaltisk pumpe.

Blandingen pumpes på den adsorberende kolonne, og kolonnen vaskes derpå med 5 kolonnevolum utgangspuffer. Derpå desorberes de viral-rettede glycoproteiner fra kolonnen med 5 kolonnevolum 0,2M α -methyl-D-mannosid i utgangspuffer. Den glycoprotein-anrikede fraksjon inneholder 6 hoved- og 5-8 mindre polypeptider som vist på figur 1 som innbefatter 3 grupper viral-rettede glycoproteiner: ca. 110.000 - 130.000 dalton; ca. 83.000 - 90.000 dalton; og ca. 55.000 - 60.000 dalton som vist på figur 2. Denne fraksjon inneholder under 50 ng DNA og under 100 ng RNA pr. 100 µg protein. Ingen intakte eller sprevte virus eller nucleocapsider er påvisbare ved elektronmikroskopi, og ingen levende virus isoleres ved vevkulturmetoder.

Glycoproteinfraksjonen fra *Lens culinaris* lectin-Sepharose[®] kolonnen kromatograferes på en liten kolonne av polymerisert dextran, dvs. Sephadex[®] G-50 for å fjerne eventuell lectin som kan være lekket fra affinitetsadsorbentene, og den uadsorberte fraksjon oppsamles. Behandlingen er valgfri og kan sløyfes.

Den uadsorberte HSV2 glycoproteinfraksjon sterilfiltreres gjennom et 0,2 μ porøsitetets "Nucleopore"-filter og fortynnes til protein-bruksnivået med steril pyrogenfri fysiologisk godtagbar fosfatpufret saltvann. Eventuelt tilsettes formalin til en konsentrasjon på 100 μ g/ml, og blandingen inkuberes i 72 timer ved 36°C for ytterligere sikring mot muligheten for nærvær av gjenværende infiserende HSV2 virus og for å inaktivere eventuelt gjenværende enkeltstrenget DNA.

For anvendelse som en vaksine adsorberes HSV2 subenhet-antigenet på alun, og det ubundne Triton[®]X-100 fjernes ved følgende metode. Antigenet innstilles på det ønskede protein-bruksnivå, og 10%-ig $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (alun) tilsettes for å få en endelig alunkonsentrasjon på 8,5 mg/ml. Under tilsetningen av alun anvendes 1N natriumhydroxyd for å opprettholde en pH på 5,2 - 6,0. Etter omrøring ved værelsetemperatur i 1 time sentrifugeres blandingen i 10 minutter ved 270 g. Den overstående væske fjernes, og proteinet måles (Lowry) i både den overstående væske og alunvaksinen for å bestemme den adsorberte mengde. Alunet resuspenderes til et volum likt den opprinnelige antigen-oppløsning i steril fysiologisk saltvann (pyrogenfri) eller i saltvann inneholdende 1:20.000 thimerosal. Den alunadsorberte vaksine kan vaskes en eller to ganger med saltvann for å redusere Triton[®]X-100-konsentrasjonen til minimale mengder før resuspending. Den alunadsorberte vaksine lagres ved 4°C.

Eksempel 2

Fremgangsmåten i eksempel 1 gjentas unntatt at de infiserte celler fjernes mekanisk fra kulturkarene og vaskes med fosfatpufret saltvann (PBS), dvs. 0,15M NaCl, 0,0063M natriumfosfat, pH 7,2. De vaskede celler resuspenderes i pyrogenfritt, destillert vann for å få en cellekonsentrasjon på ca. $1-2 \times 10^7$ celler/ml og sprenes ved strømningslydbehandling (3 cykler ved 150 ml/min) med en varmeveksler for å opprettholde temperaturen på ca. 4°C. De sprenge celler sentrifugeres ved 800 g i 20 minutter ved 4°C, og de overstående væsker forenes. Den overstående væske innstilles på en sluttkonsentrasjon på 2% Triton[®]X-100, 1,0M NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 2 mM PMSF, 4,75% ethanol (for å oppløse

PMSF), og en Lowry-protein-konsentrasjon på ca. 2 mg/ml. Blandingen suspenderes med en vev-homogenisator og inkuberes ved 20 - 23°C i 1 time under intermitterende homogenisering, og sentrifugeres så ved 105.000 g i 1 time ved 20 - 23°C. Den overstående væske oppsamles og behandles videre som beskrevet i eksempel 1.

Eksempel 3

Fremgangsmåten i eksempel 1 og eksempel 2 gjentaes unntatt at DEAE-cellulose-kromatografi anvendes istedenfor Lens culinaris lectin-affinitetskromatografi og Sephadex[®] G-50 -kromatografi sløyfes. Den overstående væske av Triton[®] X-100 -ekstraktet dialyseres mot 1% Triton[®] X-100, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 (utgangspuffer) ved 4°C. Det dialyserte ekstrakt påføres på en DEAE-cellulosekolonne brakt i likevekt i begynnelsespuffer og kromatograferes ved 4°C. Etter at hele prøven har gått inn i kolonnen, vaskes den med utgangspuffer for å fjerne uadsorberte proteiner og adsorberte proteiner elueres med en 0 - 0,6M NaCl-gradient i utgangspuffer. 25 - 200 mM NaCl-fraksjonene, som er rikest på virale glycoproteiner, forenes. Denne forenede oppløsning er fri for påvisbar dobbeltstrenget DNA, men inneholder ca. ca. 1% enkeltstrenget DNA eller DNA-fragmenter og 1 - 2% RNA. Der er over 30 polypeptider varierende i molekylvekt fra lik eller under 17.000 til lik eller over 322.000. Fraksjonene inneholder også 3 grupper av viral-rettede glycoproteiner: ca. 110.000 - 130.000 dalton; ca. 83.000 - 90.000 dalton; og ca. 55.000 - 60.000 dalton. Ingen intakte eller sprenge virus eller nucleocapsider er påvisbare i fraksjonen ved elektronmikroskopi, og ingen levende virus isoleres ved vevkulturmetoder.

Eksempel 4

Herpes simpleks type 1 (HSV1) infiserte celler fremstilles i det vesentlige som beskrevet i eksempel 1 unntatt at HSV1 anvendes istedenfor HSV2. De infiserte celler høstes og ekstraheres i det vesentlige som beskrevet i eksempel 2 unntatt at den lavhastighets-overstående væske fra de lydbehandlede celler sentrifugeres ved 105.000 g i 1 time ved 4°C for å konsentrere viruset, og Triton[®] X-100 -ekstraksjonsmediet hvori pelleten resuspenderes,

inneholder 0,15M NaCl istedenfor 1,0M som anvendt for HSV2. Det erholdte ekstrakt fraksjoneres på lectin concanavalin A som beskrevet nedenfor.

Affinitetsadsorbenten, Con A-Sepharose[®] (concanavalin A covalent bundet til Sepharose[®]), erholdt fra en kommersiell kilde, suspenderes i 1% Triton X-100, 0,15M NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 (utgangspuffer). Den anbringes i en 1,6 cm (innvendig diameter) kromatografikolonne og får lov til å avsette seg til en høyde på 3,3 cm. Adsorbenten vaskes (20 ml/h) med 20 ml 0,2M α -methyl-D-mannosid i utgangspuffer, fulgt av 2M NaCl i utgangspuffer og vaskes til slutt med 4 lagvolum utgangspuffer.

Ekstraktet pumpes på adsorbenten, og adsorbenten vaskes med 20 ml utgangspuffer. Glycoproteinfraksjonen elueres fra adsorbenten med 30 ml 0,2M α -methyl-D-mannosid i utgangspuffer. Den adsorberte fraksjon inneholder tre hoved- og seks mindre polypeptider som vist i figur 3, blant hvilke de hoved-viral-rettede glycoproteiner med 123.000 og 60.000 molekylvekt er vist i figur 4. Ingen intakte eller sprevte virus eller nucleocapsider er påvisbare ved elektronmikroskopi, og ingen levende virus isoleres ved vevkulturmetoder.

P a t e n t k r a v

1. Fremgangsmåte ved fremstilling av en antigen, immunogen subenhet av herpes simplex type 1 (HSV1) eller type 2 subenhet (HSV2), k a r a k t e r i s e r t v e d a t m a n

a) infiserer cellene av en vevkultur med et herpes simplex virus type 1 (HSV1) eller type 2 (HSV2) som er i stand til å vokse i vevkulturen,

b) inkuberer den infiserte vevkultur inntil en vesentlig del av cellene oppviser cytopatisk virkning,

c) bringer de infiserte celler i kontakt med et ikke-ionisk eller anionisk overflateaktivt middel for å erholde et ekstrakt,

d) hydrolyserer i det vesentlige alt intakt dobbeltstrenget DNA i ekstraktet, og

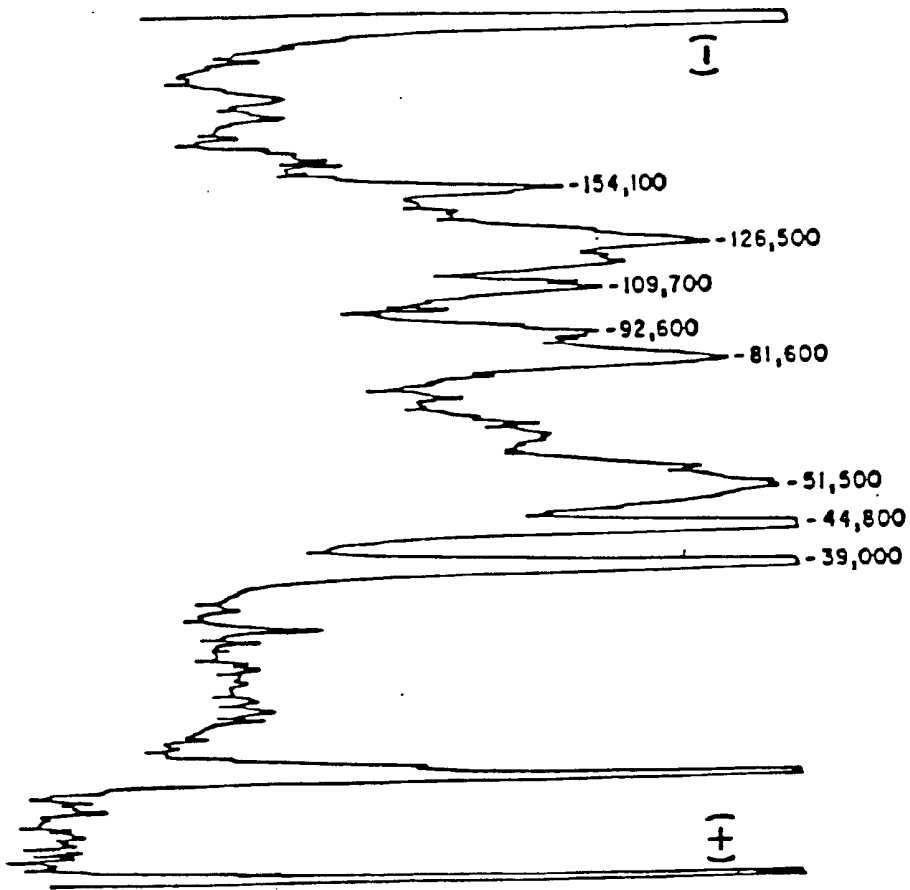
e) fraksjonerer ekstraktet ved ionebytter- eller affinitets-kromatografi og at når det 1) anvendes herpes simplex type 1, fåes en antigen, immunogen HSV1 subenhet som inneholder to grupper av viralrettede, membranbundne glycoproteiner som er oppløselige i nærvær av et ikke-ionisk eller anionisk overflateaktivt middel, hvor den første gruppe har molekylvekt på 123.000 dalton og den andre gruppe på 60.000 dalton, og hvor subenheten er fri for påvisbart DNA og i stand til å fremkalle nøytraliserende antistoff, eller når det 2) anvendes herpes simplex type 2, fåes en antigen, immunogen HSV2 subenhet som inneholder tre grupper av viralrettede, membranbundne glycoproteiner som er oppløselige i nærvær av et ikke-ionisk eller anionisk overflateaktivt middel, hvor den første gruppe har molekylvekt på fra 110.000 til 130.000 dalton, den andre gruppe på fra 83.000 til 90.000 dalton, og den tredje på fra 55.000 til 60.000 dalton, og hvor subenheten er fri for påvisbart DNA og i stand til å fremkalle nøytraliserende antistoff.

2. Fremgangsmåte ifølge krav 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det som overflateaktivt middel anvendes et aryloxyetheraddukt av ethylenoxyd.

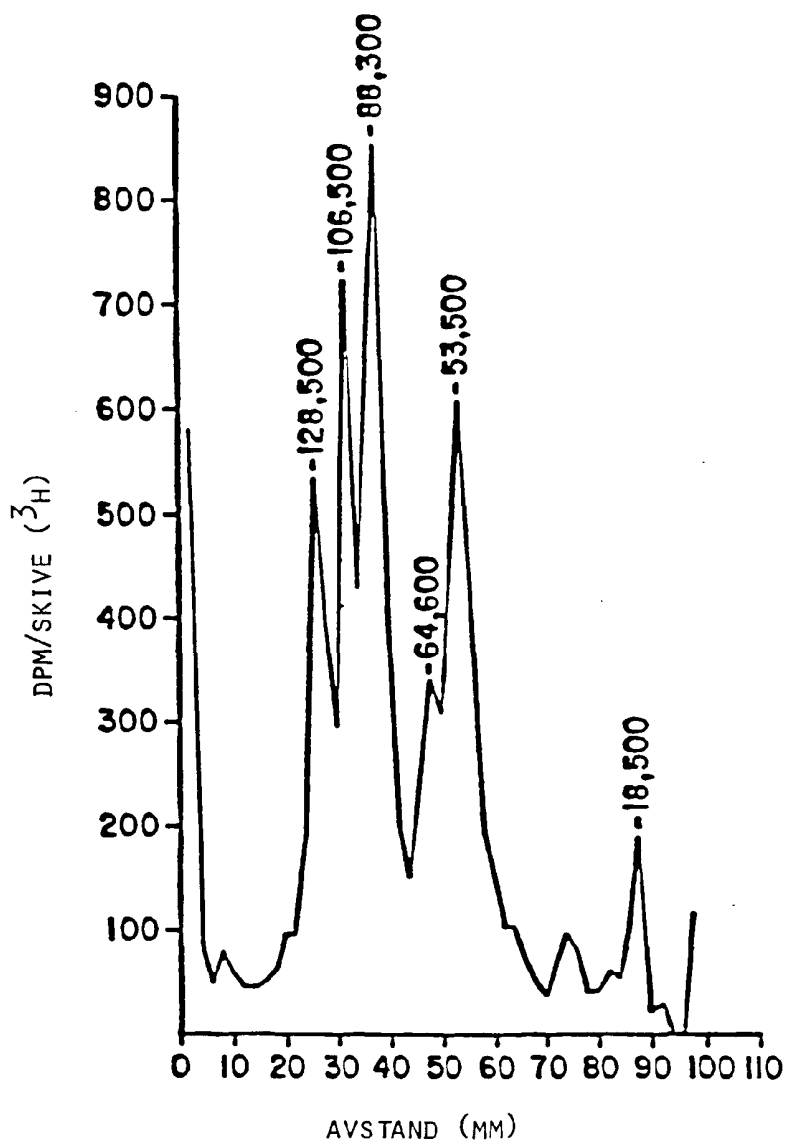
3. Fremgangsmåte ifølge krav 1 - 2,
k a r a k t e r i s e r t v e d at ekstraksjonen utføres i nærvær av salt, fortrinnsvis i en konsentrasjon på fra 0,1 til 2 molar.

153692

FIGUR 1

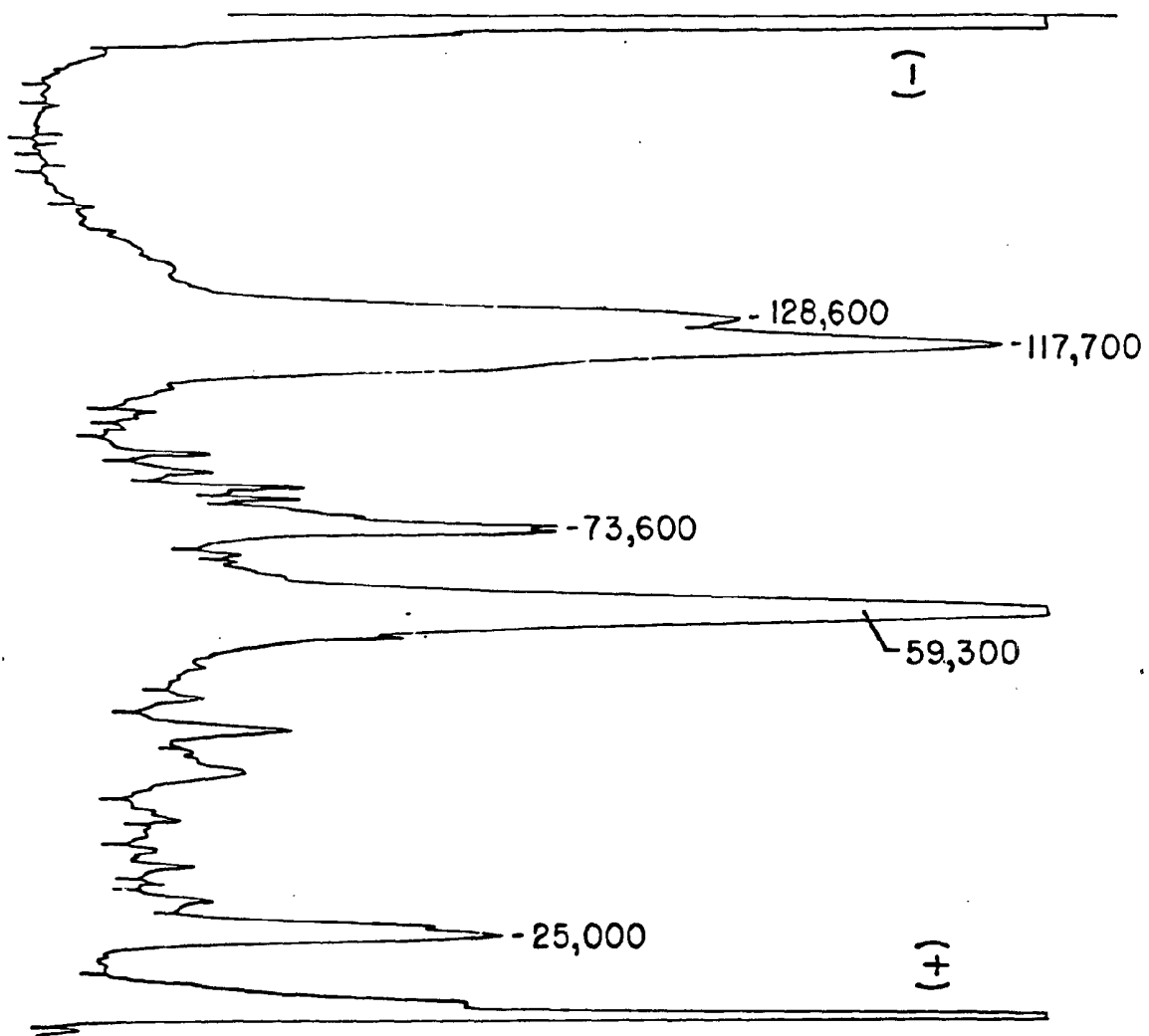


153692



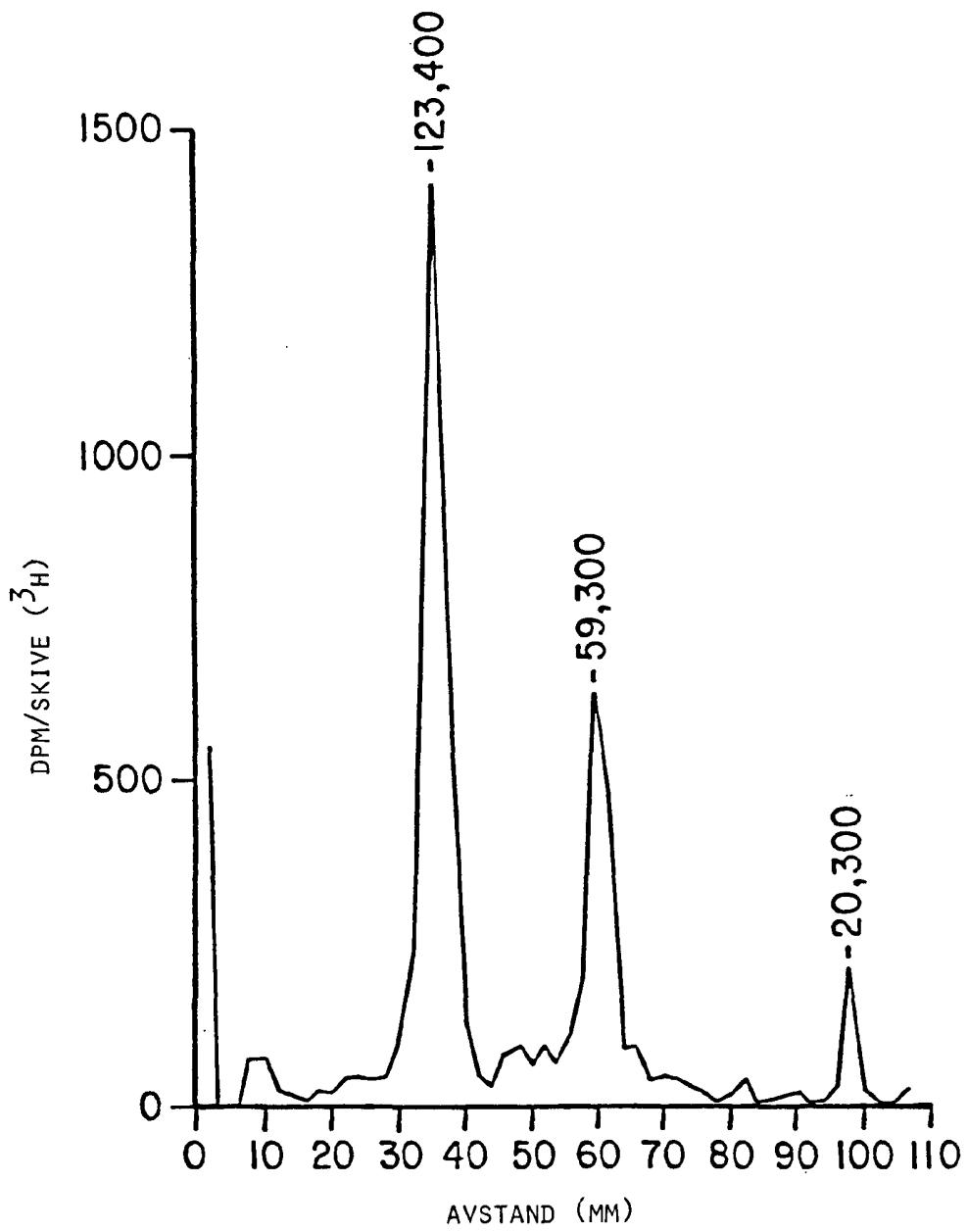
FIGUR 2

153692



FIGUR 3

153692



FIGUR 4