

(19) DANMARK



DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 145580 B

- (21) Ansøgning nr. 593/77 (51) Int.Cl.³ C 12 N 7/06
(22) Indleveringsdag 11. feb. 1977
(24) Løbedag 11. feb. 1977
(41) Alm. tilgængelig 13. aug. 1977
(44) Fremlagt 13. dec. 1982
(86) International ansøgning nr. -
(86) International indleveringsdag -
(85) Videreførelsesdag -
(62) Stamansøgning nr. -
(30) Prioritet 12. feb. 1976, 2605469, DE

(71) Ansøger BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT, D-3550 Marburg/Lahn, DE.

(72) Opfinder Lothar Gerhard Schneider, DE: Bernhard Dietzschold,
DE: James Hilton Cox, DE.

(74) Fuldmægtig Ingeniørfirmaet Budde, Schou & Co.

(54) Fremgangsmåde til isolering af
et immunologisk aktivt spalt=
ningsprodukt af hundegalskab-virus.

DK 145580 B

0

Opfindelse angår en fremgangsmåde til isolering af et immunologisk aktivt spaltningsprodukt af hundegalskab-virus, ved hvilken man først underkaster viruset en spaltning med et ikke-ionisk overfladeaktivt stof, hvorfra en glycoprotein-fraktion lader sig isolere.

5

Det er kendt at underkaste hundegalskab-virus en spaltning, ved hvilken der opstår en række spaltningsprodukter. Spaltningen udføres ved hjælp af ikke-ioniske overfladeaktive stoffer, f.eks. "Triton"® X 100 (reaktionsprodukt af 1 mol tert.octylphenol og 9-10 mol ethylenoxid). De vigtigste produkter fra denne spaltning, der kan isoleres elektroforetisk, er en nucleoprotein-fraktion (N), en glycoprotein-fraktion (G) og to fraktioner, der hovedsagelig består af membran-proteiner (M_1 og M_2). Det er også kendt at den immunogene virkning efter spaltningen fremkommer i glycoprotein-fraktionen (G). Denne fraktion er hidtil på grund af dens elektroforetiske forhold blevet anset som værende ét stof.

10

15

20

Det har nu vist sig, at G-fraktionen kan undergå en yderligere opspaltning, hvorved den immunogene aktivitet igen kan isoleres i en fraktion, når man underkaster de glycoproteiner, der danner denne fraktion, en selektering hvad angår deres isoelektriske punkter.

25

30

Opfindelsen angår således en fremgangsmåde af den ovenfor angivne art til isolering af et immunologisk aktivt spaltningsprodukt af hundegalskab-virus, og denne fremgangsmåde er ejendommelig ved, at man derefter adskiller glycoprotein-fraktionen ved hjælp af isoelektrisk fokusering, isolerer fraktionen med et isoelektrisk punkt mellem 6,8 og 7,4, dialyserer fraktionen mod destilleret vand og eventuelt lyofiliserer produktet.

35

Udgangsmaterialet til den her omhandlede fremgangsmåde er den ved spaltning med et overfladeaktivt stof fra hundegalskab-viruset opnåede glycoprotein-fraktion. Opfindelsen har til formål at formindske eller helt at overvinde de ulemper, der er forbundet med denne glyco-

0

protein-fraktion, nemlig dens uforenelighed. Hertil kommer der principielt forskellige metoder til adskillelse af proteiner i betragtning, f.eks. chromatografiske adsorptionsmetoder, molekylsigte-fraktioneringer eller metoder, ved hvilke der gøres brug af ladningsforholdene for fraktionens bestanddele. Til de sidstnævnte metoder hører såvel den isoelektriske fokusering som elektroforesen. Da det imidlertid er kendt, at en adskillelse af fraktionen ikke er mulig ad elektroforetisk vej, idet fraktionen netop er blevet anset for ét stof ved elektroforetisk undersøgelse, kunne det næppe forventes, at en adskillelse var mulig ved hjælp af en anden, ligeledes med henblik på ladningsforholdene baseret adskillelelsesmetode. Virkningen af en adskillelse ved hjælp af den isoelektriske fokusering i én aktiv og flere inaktive fraktioner er således overraskende og kunne ikke forventes på baggrund af teknikkens kendte stadi.

15

Til udvinding af spaltningsproduktet går man hensigtsmæssigt ud fra en cellekultur af dyrket hundegalskab-virus. Karakteren af virus-stammen spiller ingen afgørende rolle. Også karakteren af den til dyrkningen anvendte cellekultur er af underordnet betydning. Ved et stort antal forsøg har en ERA-hundegalskab-virusstamme i en kultur af BHK 21-celler vist sig særlig egnet. Dyrkningen af hundegalskab-virus i cellekulturer er kendt.

20

Spaltningen af viruset med et ikke-ionisk overfladeaktivt stof er ligeledes kendt. Arten af dens gennemførelse er ikke afgørende for udvindingen af den glycoprotein-fraktion, der skal videreforarbejdes ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, hvis blot den fører til en tilstrækkelig spaltning af viruset. Fortrinsvis sker spaltningen ved indvirkning af en opløsning, der indeholder 0,2-5% af et ikke-ionisk overfladeaktivt stof, ved en temperatur på 5-35°C i løbet af fra 10 minutter til 6 timer.

25

30

Isoleringen af glycoprotein-fraktionen fra spaltningsblandingen kan f.eks. ske ad elektroforetisk vej. Nucleoproteidet kan imidlertid også fraskilles ved centrifugering ved høj g-værdi, og den ovenstående væske kan umiddel-

35

0

bart derefter underkastes den efterfølgende adskillelse efter isoelektriske punkter. Hensigtsmæssigt underkastes denne ovenstående væske først en dialyse for at fraskille lavmolekylære bestanddele.

5

Den således fremkomne glycoprotein-fraktion, der foreligger som en 0,05-0,4% 's vandig dispersion, opdeles derpå i fraktioner med forskellige isoelektriske punkter ved hjælp af den som "isoelektrisk fokusering" kendte arbejdsmetode, ved hvilken der i en væskesøjle ved hjælp af egnede zwitterioniske forbindelser, såsom polyamino-polycarboxy-alkaner (ampholiter), opbygges en pH-gradient og i denne en adskillelse af den til søjlen satte blanding sker.

10

Søjlen til isoelektrisk fokusering fyldes med en 0,2-5% 's opløsning af en zwitterionisk forbindelse, hensigtsmæssigt i en massefyldegradient, f.eks. en sådan på 0-50% af en ikke-ionisk vandopløselig forbindelse, såsom en polyhydroxyforbindelse, fortrinsvis et polysaccharid. Fokuseringen sker i et sådant system under en elektrisk spænding, der svarer til søjlens optimale spænding, i løbet af ca. 24 timer til ca. 8 dage.

15

20

I tilslutning til den isoelektriske fokusering adskilles søjleindholdet i fraktioner. Bestanddelene i G-fraktionen koncentrerer sig i 3 områder omkring pH-værdierne 4,5, 7,0 og 8,0. Fraktionen svarende til en pH-værdi (isoelektrisk punkt) på mellem 6,8 og 7,4 opfanges adskilt. Den indeholder i ren form det her omhandlede spaltningsprodukt fri for andre højmolekylære bestanddele. Til adskillelse af de ved den isoelektriske fokusering og de ved den forudgående operation anvendte hjælpestoffer kan fraktionen underkastes en yderligere rensning, f.eks. ved dialyse, sedimentation, chromatografi eller centrifugering.

25

30

Fraktionen indeholdende det her omhandlede spaltningsprodukt kan umiddelbart anvendes som vaccine mod hundegalskab. I forhold til de på kendt måde ud fra intakt virus udvundne vacciner udmærker det sig ved en omtrent lige

35

0

så stor antigen aktivitet med mindre bivirkninger.

5

Fraktionen indeholdende spaltningsproduktet kan for at forøge dens holdbarhed eller virkning tilsættes kendte hjælpestoffer og stabilisatorer og/eller kan lyofiliseres.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen belyses nærmere i det følgende eksempel.

Eksempel

10

En hundegalskab-virus-kultur (ERA-stamme) blev i form af BHK-21-celler udvalgt til videre formering ("Kloning") på basis af en enkelt koloni ("plaque").

15

Virusformeringen blev foretaget i rullekulturer på BHK-21-C-13-celler. Kulturbetingelserne er beskrevet i Schneider, L.G., M. Horzinek og H.D. Matheka, 1971, "Purification of rabies virus from tissue culture", Arch. ges. virusforsch. 34:351-359. Den infektiøse cellekulturvæske og de inficerede celler blev høstet, efter at en tydelig cytopathologisk virkning (CPE) var åbenbar.

20

Viruset blev fracentrifugeret fra den klarede ovenstående væske i 120 minutter ved 4°C i en Beckman-R-10-Rotor ved 19000 omdrejninger pr. minut. Den ovenstående væske blev kastet bort, og pillen blev natten over elueret med en ringe mængde 0,15M NaCl, 0,01M Tris-HCl med en pH-værdi på 7,5 og 0,001 EDTA-(STE)-puffer (STE = Saline-Tris-EDTA), altså en pufferblanding af 0,5M NaCl, 0,01M Tris-HCl med pH = 7,5 og 0,001M EDTA-opløsning. Eluatet blev klaret ved langsom centrifugering, blev fyldt på en på forhånd dannet 10-50%'s (vægt/rumfang) sucrose-gradient og blev centrifugeret i 90 minutter ved 4°C i en Beckman-SW-27-Rotor ved 25.000 omdrejninger pr. minut. Virusbåndene blev samlet og rigeligt dialyseret mod en STE-puffer. Behandlingen af hundegalskab-virus med "Triton"® X-100 blev i princippet foretaget som beskrevet af Helenius og Söderlund "Stepwise dissociation of the semliki forest virus membrane with Triton X-100", Biochem. Biophys. Acta 307: 287-300. Til en suspension af 5 mg hundegalskabvirus

35

0

i 5 ml ST-puffer (ST = Saline-Tris-puffer) blev der sat "Triton"[®] X-100 til en slutkoncentration på 1% (protein:-Triton-forhold 1:10). Blandingen blev holdt ved stuetemperatur i 20 minutter og blev derpå afkølet i et isbad. Den endnu uklare opløsning blev centrifugeret 60 minutter ved 4°C i en Beckman SW 65-rotor ved 45.000 omdrejninger pr. minut. Den ovenstående væske blev holdt tilbage, og pillen blev suspenderet i en ST-puffer (ST = Saline-Tris-puffer), der indeholdt 2M LiCl og 5 mg/ml digitonin. Suspensionen blev inkuberet i 30 minutter ved stuetemperatur og blev i 60 minutter ved 4°C centrifugeret i en Beckman-SW 65-rotor ved 45.000 omdrejninger pr. minut. Den ovenstående væske blev opbevaret, og pillen blev kastet bort.

5

10

15

20

25

30

35

Den efter centrifugering ved 120.000 x g udvundne ovenstående væske af med "Triton"[®] X-100 behandlet virus blev grundigt dialyseret mod en 1%'s (vægt/rumfang) glycin og 1%'s (vægt/rumfang) glycerol i destilleret vand. Efter tilsætning af 1% "Ampholine"[®], pH 3,5-10, (LKB, Uppsala, Sverige) blev "Triton"[®] X-100-ekstrakten klaret i 10 minutter ved 5.000 x g, og en prøve på 5 ml blev sat til en 5-40%'s (vægt/rumfang) sucrose-gradient, der indeholdt 0,1% "Triton"[®] X-100 og 1% "Ampholine"[®] med en pH-værdi på 3,5-10. ("Ampholine"[®] består af en blanding af polyamino-polycarboxylsyrer med forskellige PI-værdier (isoelektriske punkter) i pH-området fra 2,5 til 11). Tilberedningen blev i 72 timer elektrofokuseret i en LKB-søjle på 110 ml som beskrevet af Friesen, A.D., J.C. Jamieson og F.E. Ashton, 1971, "Effect of nonionic detergent on fractionation of proteins by isoelectric focusing", Anal. Biochem. 41:149-157. Derpå blev gradienten fraktioneret. pH 7-fraktionen blev opsamlet og dialyseret grundigt i 2 dage mod destilleret vand, for at fjerne "Triton"[®] X-100-koncentrationen og at fjerne "Ampholine"[®] og sucrose, og blev endelig lyofiliseret.

0

P a t e n t k r a v .

Fremgangsmåde til isolering af et immunologisk aktivt spaltningprodukt af hundegalskab-virus, ved hvilken man først underkaster viruset en spaltning med et ikke-ionisk overfladeaktivt stof, hvorfra en glycoprotein-fraktion lader sig isolere, k e n d e t e g n e t ved, at man derefter adskiller glycoprotein-fraktionen ved hjælp af isoelektrisk fokusering, isolerer fraktionen med et isoelektrisk punkt mellem 6,8 og 7,4, dialyserer fraktionen mod destilleret vand og eventuelt lyofiliserer produktet.

5

10

Fremdragne publikationer:
