(19) DANMARK

(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 163062 B

Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 3968/84

(22) Indleveringsdag: 17 aug 1984

(41) Alm. tilgængelig: 20 feb 1985

(44) Fremlagt: 13 jan 1992

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 19 aug 1983 US 524953

(51) Int.Cl.5 C 07 K 15/28
A 61 K 39/012
C 07 K 15/04

(71) Ansøger: *AMERICAN CYANAMID COMPANY; Wayne, New Jersey, US

(72) Opfinder: Robert Harris *Schenkel; US, Rosie Bick-Har *Wong; US, Pallaiah *Thammana; US

(74) Fuldmægtig: Budde, Schou & Co. A/S

(54) Antigen, immunogen, proteinholdig vaccine imod coccidiose

(56) Fremdragne publikationer

---

(57) Sammendrag

3968-84

Monoklone antistoffer mod Eimeria-arters merozoitter fås ved anvendelse af hybridomteknik ved fusion af celler fra en musemyelomlinie og miltceller fra mus immuniseret med Eimeria tenella-merozoitter, og hybridomkulturer anvendes til at producere monoklone antistoffer. Disse specifikke merozoitantigener anvendes som vacciner til forebyggelse og behandling af coccidiose.

DK 163062 B

Den foreliggende opfindelse angår en antigen, immunogen, proteinholdig vaccine, som er ejendommelig ved det i den kendetegnende del af krav 1 angivne.

I den her omhandlede vaccine indgår et antigen for monoklonale antistoffer, der reagerer specifikt mod merozoitter og sporozoitter af parasitten Eimeria tenella, og eventuelt tillige en stabilisator og/eller et pharmaceutisk acceptabelt adjuvans herfor. Disse antistoffer er opnået ved hjælp af hybridomateknologi, nemlig ved hjælp af hybridomakulturer, der frembringer antistoffer mod E. tenella, samt merozoitantigener. Disse antigener er sammen med visse, monoklonale antistoffer effektive til forebyggelse og behandling af coccidiose. Vaccinen ifølge opfindelsen er derfor anvendelig mod coccidiose.

Coccidiose er en sygdom hos dyr, der fremkaldes af en række forskellige parasitiske protozoer. Fuglecoccidiose er en ødelæggende fjerkræsygdom, der forårsages af arter af slægten Eimeria. Denne sygdom har en kompliceret cyklus, der omfatter både kønnede og ukønnede stadier. Kyllinger inficeres til at begynde med med lidelsen efter indtagelse af fritlevende oocyster, der i reglen findes i forbindelse med fækalier. Oocyster udvikler sig til invaderende, ukønnede sporozoitter i kyllingens mavetarmkanal. Sporozoitterne inficerer epithelceller og udvikles til flerkernestrukturer, der kaldes schizonter. Hver schizont modnes og frigør efterhånden mange invaderende, ukønnede strukturer, der kaldes merozoitter. Disse merozoitter forlader de inficerede celler og invaderer igen andre epithelceller. De mangfoldige, invaderende, ukønnede stadier, der omfatter sporozoitter og merozoitter, er ansvarlige for meget af coccidiosens patologi. Coccidioses kønnede cyklus begynder, når merozoitterne diffenrentierer til gametocytter. Der sker befrugtning, og produkterne heraf, der kaldes oocyster, frigøres i fæces. Parasittens livscyklus er således sluttet. Hos kyllinger afsluttes cyklussen for Eimeria tenella, der er en repræsentativ art, i løbet af ca. 7-9 døgn.

På grund af de kolossale økonomiske tab, som fjerkræindustrien påføres af Eimeriaarter, er en vaccine yderst ønskværdig. Imidlertid er det på grund af parasittens komplekse livscyklus og på grund af den varierende mængde antigener, der er til stede i hvert stadium, ikke tidligere blevet påvist, at deaktiverede eller dræbte parasitter har danne tilsvarende immunitet. En løsning på dette problem er at isolere og karakterisere særlige antigener fra parasitten og indgive dem i tilstrækkelig mængde til, at de kan fungere som immuniseringsmiddel. Sådanne antigener vil fortrinsvis yde beskyttelse mod infektion med alle vigtige arter. Man ved, at forskellige Eimeria-arter samt forskellige stadier i denne arts livscyklus har både fælles og specifikke antigener [Z. Cerna, Folia Parasitologica (Prag), 17, 135-140 (1970), Davis m.fl., Immunol. 34, 879-888 (1978), M.E. Rose, Immunol. 2, 112-122 (1959), Rose m.fl., Immunol., 5, 79-92 (1962), og Tanielian m. fl., Acta Parasitol. Yugosl. 7, 79-84 (1976)]. Man ved også, at udvikling af immunitet over for Eimeria er arts-specifik og hos nogle arter tamfjerkræ er der klar stamme-specifik immunitet [T.K. Jeffers,, I P.L. Long m.fl. udg., Avian Coccidiosis, side 57-125, Proc. 13. Poultry Sci. Symp. (1978), L.P. Joyner, Parasitol. 59, 725-732 (1969), P.L. Long Parasitol. 69, 337-347 (1974), og Long m.fl., Parasitol. 79, 451-457 (1979)]. Indtil nu er immunogener af Eimeria-arter, der kan stimulere beskyttende immunitet hos fugle- og pattedyrværter, ikke blevet isoleret eller identificeret. Sådanne Eimeria-immunogener vil sandsynligvis yde en vellykket immunisering mod coccidiose.

Udviklingen af lymphocyt-hybridomteknologi udgør et værktøj til frembringelse af forholdsvis store mængder specifikke antistoffer mod en række forskellige Eimeria-antigener. Ved at sammensmelte specifikt-antistof-producerende celler (miltceller) med celler fra

en myelomtumor, er det muligt at fremstille hybridomceller, der udskiller monoklone antistoffer rettet specifikt mod det oprindelige sensibiliseringsantigen (Köhler & Milstein, Nature (London) 256, 495-497 (1975)]. Hvis der fås monoklone antistoffer mod parasitten, ville det være muligt at fremstille sådanne antistoffer mod inficeret eller modtageligt fjerkræ og således bibringe værtsorganismen et vist omfang af passiv immunitet. Når først sådanne hybridomkulturer, der producerer monoklone antistoffer, er opnået, er det muligt ved hjælp af forskellige metoder at benytte sådanne antistoffer til at isolere og identificere specifikke antigener, der igen kan benyttes som vaccine, så at værtsorganismer får et system af aktiv immunitet. Der kendes en række patentskrifter vedrørende hybridomkulturer og monoklone antistoffer, nemlig USA patentskrifterne nr. 4.172.124, 4.196.265, 4.271.145, 4.361.549, 4.631.550, 4.364.932, 4.364.933, 4.364.934, 4,364,935, 4.364.936, 4.381.292 og 4.381.295.

På baggrund af den ovennævnte omtale af coccidiosens økonomiske virkninger inden for dyrehold og især fjerkræindustrien, er en bekæmpelse af protozoparasitten yderst påkrævet. Det er således opfindelsens formål at angive nye og anvendelige monoklone antistoffer mod merozoitter af parasitten E. tenella. Endvidere er det opfindelsens formål at isolere og identificere specifikkke E. tenella-antigener, der kan anvendes som vaccine til bekæmpelse af fjerkræcoccidiose. Disse formål fremgår klart af den følgende bskrivelse og de medfølgende krav.

Eimeria tenella, den art, der inficerer coecum hos kyllinger, er en særlig ødelæggende parasit, der forårsager svære blødende læsioner hos inficerede dyr. E. tenella har to merozoit-stadier i sin livscyklus, der betegnes hhv. første og anden generationsmerozoitter. Immunitet over for E. tenella, ved man, udvikles

under denne livscyklus' ukønnede merozoitstadier (P. Long, (udg.), The Biology of the Coccidia, University Park Press, Baltimore, Md (1982).

Der anvendes et præparat af E. Teneralla-merozoitter til at immunisere mus, for at de efterhånden kan danne monoklone antistoffer ifølge den nedenfor beskrevne metode. De monoklone antistoffer anvendes til at identificere parasittens antigener. Monoklone antistoffer bedømmes endvidere for at fastslå deres evne til at neutralisere væksten af parasitten in vivo. Antigener, der fremkalder monoklone antistoffer, der reagerer med mindst én Eimeria-art eller med enten merozoitter eller sporozoitter, og udviser neutralisering af parasitvækst, anses for at være beskyttende antigener. Beskyttende antigener anses som mulige kandidater ved udviklingen af en vaccine mod fuglecoccidiose.

Opfindelsen vil i det følgende blive nærmere beskrevet ved hjælp af eksempler.

Eksempel 1

Kvantitativ radioimmunanalyse

Til at bedømme antistoffers kvalitet udvikles en kvantitativ radioimmunanalyse. Glutaradehyd-fikserede sporozoitter eller merozoitter (i reglen 2-5 x 10^5 pr. fordybning) centrifugeres på polyvinylchlorid med 96 fordybninger eller "Removawell"®-plader (Dynatech) ved 1400 x G i 10 minutter for at binde organismen til bunden af fordybningerne. Sporozoitter eller merozoitter, der hænger fast på pladens bund, omsættes med serumprøver af mus immuniseret med parasit- eller monoklont antistof i overpå flydende hybridomkultur. Inkubering med antistoffer sker i 16-18 timer ved 4°C eller i to timer ved stuetemperatur. Det bundne antistof påvises med et radioaktivt-mærket andet antistof, 187,1, der er et monoklont rotteantistof, der er specifikt for muse-k-let-kæde. Anti-muse-k-let-kæde-antistoffet mærkes biosynte-

tisk med ^{35}S-methionin [D.E. Yelton m.fl., Hybridoma, 1, 5-11 (1982)]. Radioaktiviteten overvåges ved væske-scintillationstælling. Radioimmunanalysemetoden anvendes derpå på overflade membraner, der fås fra E. tenella-sporozoitter, for at sikre antistoffernes reaktivitet i immune musesera med membranproteiner.

Eksempel 2

Opbygning af hybridomkulturer

Primære kulturer af kyllingenyreceller inficeres med frisk excysterede sporozoitter ved hjælp af kendte metoder. Merozoitter, der er frigjort i mediet fem dage efter infektion, høstes ved centrifugering ved 350 x G i 10 minutter. 18-Uger gamle BALB/c-hunmus immuniseres intraperitonealt (i.p.) med 1 x 10^7 intakte eller framenterede E. tenella-merozoitter i komplet Freund's adjuvans. Dyrene igangsættes med to i.p.-injektioner af merozoitter i medium 199 (Gibco) med to mellemrum på 5 uger efter indledende immunisering. Det serum, der fås tre dage efter hver igangsætning, kontrolleres for tilstedeværelse af antistoffer mod E. tenella-merozoitter ved indirekte immunfluorescensanalyse (IFA) og radioimmunanalyse (RIA). Begge disse analyser udføres på glutaraldehyd-fikserede parasitter.

Hybridomer derivatiseres ved hjælp af gængse metoder [Kwan m.fl. (1980), Genetic Engineering, udg. af J.K. Setlow & A. Hollander, Plenum Publishing Corp., New York, side 31-96]. Miltceller fra to mus, der er immuniseret med E. tenella-merozoitter, sammensmeltes med et ikke-sekreterende klon af P3-myelom, P3-x 63.Ag-8,653 i nærvær af 30% polyethylenglycol (PEG 1000 fra Baker Chemical) i 8 minutter. Sammensmeltede celler fordeles i vævskulturskåle med 96 fordybninger (Linbro) og holdes i HAT selektionsmedium [J.W. Littlefield, Science, 145, 709-710 (1964)]. HAT-Mediet fremstilles i Dulbecco's modificerede Eagle's medium indeholdende 20%

kalvefosterserum (Gibco) og 10% NCTC 10A (Microbiological Associates). Hybrider dyrkes i en inkubator ved 37°C og 10% CO_2.

Kulturer analyseres med mellemrum for tilstedeværelse af antistof, der er reaktivt med E. tenella-merozoitter ved hjælp af IFA- og RIA-metoder. Positive kulturer flyttes til vævsdyrkningsskåle med 24 fordybninger i et medie uden hypoxanthin, aminopterin og thymidin. Hybridomer klones i blød agarose over et rotte-embryo-fibroblast-tilførselslag [Coffins m.fl., J. Cell Physiol., 79, 429-440, (1972)]. Positive hybridome kloner får et subklonnummer (dvs. en klon 15.84.4 er en subklon nr. 4 af et hybridom betegnet 15.84.). Klasse og underklasse af immunglobulin, der udsondres af vel-beskrevne subkloner, bestemmes ved hjælp af en dobbelt agar-diffusionsmetode. Detergent-(NP-40)-opløselige ekstrakter af hybridomer anvendes sammen med rotte-anti-muse-antistof-reagenser (Meloy).

Eksempel 3

Karakteristik af anti-merozoit-monoklone antistoffer

Kendetegnene på 8 anti-merozoit-monoklone antistoffer er vist i tabel I. Størstedelen af de monoklone antistoffer reagerer med merozoitter samt med sporozoitter ved IFA og RIA. Monoklone antistoffer 1,90 og 4,76 reagerer ikke med sporozoitter ved IFA og lejlighedsvis ved RIA (jfr. * i tabel I). Monoklont antistof 15.84 reagerer ikke med merozoitter ved IFA, men reagerer lige godt med sporozoitter og merozoitter ved RIA. De data, der er anført i tabel I, viser, at alle de monoklone antistoffer, der er afledt ud fra anti-merozoit-fusionen er kryds-reaktive med sporozoitter og merozoitter af E. tenella.

Tabel I

Karakteristik af anti-merozoit-monoklone antistoffer

	Specificitet			
	IFA		RIA	
Monoklont antistof	Mero	Sporo	Mero	Sporo
M1 (1,90)	+	-	+	*
M2 (4,76)	+	-	+	*
M3 (2,03)	+	+	+	+
M4 (13,90)	+	+	+	+
M5 (10,08)	+	+	+	+
M6 (10,84)	+	+	+	+
M7 (8,03)	+	+	+	+
M8 (15,84)	-	+	+	+

Eksempel 4

Anti-merozoit-monoklone antistoffers reaktivitet mod sporozoitter af forskellige arter

De monoklone antistoffer analyseres ved IFA mod sporozoitter afledt ud fra fem fugle-coccidia-parasitarter, der har økonomisk interesse. Data fra disse forsøg findes i tabel II. 6 monoklone antistoffer, der i IFA omsættes med sporozoitter afledt ud fra E. tenella, anvendes til at undersøges arternes kryds-reaktivitet. Resultaterne viser, at 5 monoklone antistoffer krydsreagerer med sporozoitter afledt ud fra E. necatrix og E. maxima, og et monoklont antistof (15,84) reagerer med alle fem afprøvede Eimeria-arter.

Tabel II

Anti-merozoit-monoklones reaktivitet mod sporozoitter af forskellige arter

Monoklont antistof	E. tenella	E.necatrix	E.acervulina	E.maxima	E.brunetti
M3 (2,03)	+	+	-	+	-
M4 (13,90)	+	+	-	+	-
M5 (10,08)	+	+	-	+	-
M6 (10,84)	+	+	-	+/-	-
M7 (8,03)	+	+	-	+	-
M8 (15,84)	+	+	+	+	+

Eksempel 5

In-vivo-neutraliseringanalyse

En in-vivo-metode til analysering af monoklone antistoffer anvendes til at bedømme de monoklone antistoffer. Tre monoklone antistoffer, der reagerer med E. tenella-sporozoitter, bedømmes ved denne prøve. Frisk isolerede sporozoitter inkuberes under sterile betingelser med varme-inaktiveret ascitesvæske afledt ud fra tre forskellige hybridomer. Inkubationstiden er 1 time ved stuetemperatur. Sporotozitterne indføres derpå i 3-uger gamle kyllingers coecum ad kirurgisk vej. Parasitudviklingen får lov at forløbe i 5 dage efter inokulering. Ved afslutningen af dette tidsrum gives læsionerne points for at bedømme infektionens omfang. Resultaterne af disse forsøg udtrykkes som procent beskyttelse, som det monoklone antistof yder, og anføres i tabel III. Disse data viser, at hvert antistof er i det mindste delvis beskyttende under visse betingelser i dette prøvesystem.

Tabel III

In-vivo-neutaliseringsprøve med E. tenella-sporozoitter og anti-merozoit-monoklone

Behandling	Antal dyr	% beskyttelse Ingen	Delvis	Fuld
I. Let infektion (200 sporozoitter/dyr)				
Kontrol	14		65	35
M6 (10,84)	13		15	85
M8 (15,84)	18	5	17	78
II. Svær infektion (1000 sporozoitter/dyr)				
Kontrol	7	100		
M4 (13,90)	9	89		11
M6 (10,84)	8	75	25	
M8 (15,84)	9	33	44	23
III. Svær infektion (3000 sporozoitter/dyr)				
Kontrol	7	100		
M6 (10,84)	7	86		14
M8 (15,84)	4	100		

Eksempel 6

Antigenkarakteristik

E. tenella-antigener, der genkendes af monoklone antistoffer, identificeres ved SDS-polyacrylamid-gelelektrophorse (PAGE) efterfulgt af en nitrocelluloseaftræksmetode [Towbin m.fl., Proced. Natl. Acad. Sci. (USA), 76, 4350-4354]1979)].

E. tenella-sporozoitter og -merozoitter lyses og ekstraheres med 1% "Nonidet P-40" (Bethesda Research Laboratory), i 10 mmolær tris puffer (pH 7,5) indeholdende 155 mmolær NH_4Cl, 1,5 mmolær $MgAc_2$ med protease-inhibitorerne leupeptin og antipain ved 30 µg/ml, 4 mmolær phenylmethylsulfonylfluorid og aprotinin (2 tryp-

sin-inhiberende enheder/ml). Denne lysemetode omfatter inkubation i 30 minutter ved $0^{o}C$ efterfulgt af centrifugering ved 2.500 x G i 30 minutter. Pellet'en kasseres, og det opløseliggjorte materiale anvendes derpå til gel-elektrophorese. SDS-Polyacrylamid-gelelektrophorse af prøver, reduceret med 2-mercaptoethanol udføres i et diskontinuerligt tris-glycinsystem på 7-15% polyacrylamid-gradientgeler.

De ved SDS PAGE fraskilte proteiner overføres til et nitrocellulose filter elektrophoretisk i 45 minutter. Nitrocellulosefilteres omsættes derpå enten med ascitesvæsken (1-100 fortynding) eller brugt dyrkningsvæske fra hybridomer i 16-18 timer ved $4^{o}C$. Normal kaninserum medtages i en koncentration på 10% i alle inkubationer med antistoffer. Det bundne monoklone antistof påvises med omsætning med et ^{125}I-mærket kanin-antimuse-IgG-antistof (New England Nuclear). Reaktionen med det andet antistof varer i reglen 3-4 timer ved stuetemperatur. Det ubundne andet antistof fjernes ved vask. Nitrocellulosefiltrene eksponeres derpå med Kodak røntgenfilm XAR-5 eller SB-5.

Alternativt udvikles pletterne ved en ELISA-metode, hvorved der anvendes peberrodsperoxidase-koblet kanin-antimuse-IgG (Miles) og chlornaphthol (Aldrich) og H_2O_2 (Baker) som substrater. Proteinantigenernes molekylvægt bestemmes i forhold til molekylvægtstandarder.

De antigener, der genkendes af det monoklone antistof 15,84 er illustrerende. Monoklont antistof 15,84 reagerer med en dublet med en omtrentlig molekylvægt på 130 $\pm$ 20 kD. Imidlertid er beregningen af proteiners molekylvægt i størrelsesordenen 100 kD underkastet variation afhængigt af de anvendte molekylvægt-standarder. Foruden 130 $\pm$ 20 kD-arterne reagerer 15,84 også med et bånd, der har en tilsyneladende molekylvægt på 300 $\pm$ 50 kD. Det største molekylevægt-bånd udgør ca. 15-20% af antigenet og er måske enten et aggregat

eller en polymer form af 130 ± 20 kD-arterne. Et kontrolforsøg med et monoklont antistof, som man ved reagerer med proteinantigener, anvendes til at bevise anti-merozoit-antistofernes specificitet. Desuden viser andre kontrolforsøg, at de monoklone antistoffer er parasit-specifikke og ikke reagerer med det værts-specifikke protein.

I tabel IV findes anført molekylevægtdata for antigener, der genkendes af forskellige antistoffer. Det signifikante træk er tilstedeværelsen af immungenetiske antigener med en molekylvægt i enten $\leqslant$20 kD- eller $>$ 100 kD-interval i E. tenerella-merozoitter.

Tabel IV

Molekylevægtdata

Anti-merozoit-monoklont antistof	Antigens omtr. molekylevægt
M1 (1,90)	300 ± 50 kD.
M2 (4,76)	
M6 (10,84)	130 ± 20 kD.
M8 (15,84)	
M3 (2,03)	18 ± 3 kD.
M4 (13,90)	
M5 (10,08)	
M7 (8,03)	

Monoklont antistof 15,84 betragtes som et neutraliserende antistof, og antigenet, der genkendes, anses for et beskyttende antigen. Desuden er 15,84-antistoffet kryds-reaktivt med merozoitter og sporozoitter af E. tenella samt sporozoitter isoleret fra E. maxima, E. necatrix, E. acervulina og E. brunetti.

De nye monoklone antistoffer 1,90, 15,84, 13,90, 10,84, 8,03 og 2,03, der er isoleret ovenfor, er blevet deponeret i the American Type Culture Collection (ATTC) i Rockville, Maryland, og er blevet indlemmet i

den permanente samling. Nr. 1,90 har fået tildelt nummeret HB8336, nr. 15,84 har fået tildelt nummeret HB8335, nr. 13,90 har fået tildelt nummeret HB8337, nr. 10,84 har fået tildelt nummeret HB8387, nr. 8,03 har fået tildelt nummeret HB8388, og nr. 2,03 har fået tildelt nummeret HB8389. Antistofferne er tilgængelige under den prioritetsbærende ansøgnings behandling for enhver, der godkendes af Commissioner of Patents and Trademarks som værende berettiget dertil under 37 C.F.R. 1,14 og 35 U.S.C. 122, og alle restriktioner med hensyn til tilgængelighed for offentligheden til HB8333, BH8336, HB8337, HB8388 og HB8389 vil uigenkaldeligt blive ophævet, når der er udstedt patent i nærværende ansøgnings prioritetsansøgning.

Nr. 1,90 HB8336, 15,84 HB8335 og 13,90 HB8337 blev deponeret hos ATCC 16. august 1983. Nr. 10,84 HB 8287, 8,03 HB8388 og 2,03 HV8389 blev deponeret hos ATCC 20. oktober 1983.

P A T E N T K R A V

1. Antigen, immunogen, proteinholdig vaccine, k e n d e t e g n e t ved, at den er opløselig i nærvær af en detergentholdig puffer og indeholder et antigen for Eimeria tenella-merozoitter, hvilket antigen har en omtrentlig molekylvægt på 300 ± 59 kD og er specifikt reaktivt med antimerozoit-monoklonale antistoffer, der udskilles af hybridomakloner 1.90 (ATCC HB8336) og 4.76, eller har en omtrentlig molekylvægt på 130 ± 20 kD og er specifikt reaktivt med anti-merozoit-monoklonale antistoffer, der udskilles af hybridomakloner 10.84 (ATCC HB8387) og 15.84 (ATCC HB8335), eller har en omtrentlig molekylvægt på 18 ± 3 kD og er specifikt reaktivt med anti-merozoit-monoklonale antistoffer udskilt af hybridomakloner nr. 10.08, 8.03 (ATCC HB8388), 2.03 (ATCC HB8389), 13.90 (ATCC HB 8337).

2. Vaccine ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at den yderligere omfatter en stabilisator og/eller et pharmaceutisk acceptabelt adjuvans herfor.

3. Antigenvaccine ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at den er fremstillet ved, at

(a) sporozoitter og/eller merozoitter i E. tenella er ekstraheret og opløseliggjort,

(b) det opløseliggjorte materiale er adskilt ved gængse isolations- og rensningsmetoder omfattende, men ikke begrænset til chromatografi og affinitetskolonnemetoder til opnåelse af renset antigen.