NORGE
(19) [NO]

STYRET FOR DET
INDUSTRIELLE RETTSVERN

[B] (12) UTLEGNINGSSKRIFT (11) Nr. 163668

(51) Int. Cl.⁵ A 61 K 39/00, C 07 K 15/12

(21) Patentsøknad nr. 833769
(22) Inngivelsesdag 17.10.83
(24) Løpedag 17.10.83
(62) Avdelt/utskilt fra søknad nr.

(86) Internasjonal søknad nr. -
(86) Internasjonal inngivelsesdag -
(85) Videreføringsdag -
(41) Alment tilgjengelig fra 24.04.84
(44) Utlegningsdag 26.03.90

(71)(73) Søker/Patenthaver BROR MOREIN,
Krokusvägen 14,
S-175 74 Järfälla,
SE.

(72) Oppfinner Søkeren.

(74) Fullmektig Bryns Patentkontor A/S, Oslo.

(30) Prioritet begjært 18.10.82, SE, nr. 8205892.

(54) Oppfinnelsens benevnelse FREMGANGSMÅTE FOR FREMSTILLING AV IMMUNOGENT KOMPLEKS.

(57) Sammendrag

Fremgangsmåte for fremstilling av et immunogent kompleks inneholdende antigene proteiner eller peptider fra virus, mykoplasma, bakterier, parasitter eller dyreceller eller fremstilt syntetisk eller med hybrid DNA-teknikk, og glykosid, idet proteinene eller peptidene, mikroorganismene eller dyrecellene blandes med solubiliseringsmiddel i bufferet, eventuelt saltholdig oppløsning, idet kompleks dannes mellom ladede monomere antigene proteiner eller peptider og solubiliseringsmiddel, hvoretter de ladede monomere antigene proteiner eller peptider separeres fra solubiliseringsmiddelet i nærvær av, eller separeres fra solubiliseringsmiddel og direkte overføres til, en glykosidoppløsning som inneholder en eller flere glykosider med hydrofobe og hydrofile regioner i en konsentrasjon på minst den kritiske micellære konsentrasjon, idet det dannes et proteinkompleks som isoleres og renses.

(56) Anførte publikasjoner K. Dalsgaard: Saponin Adjuvants, Archiv fuer die gesamte virusforshung, Bind 44, pp 243-254, 1974.

Foreliggende oppfinnelse vedrører fremgangsmåte til fremstilling av et immunogent kompleks inneholdende antigene proteiner eller peptider med hydrofobe regioner.

Det er kjent at døde virus, eksempelvis influensavirus har god antigen effekt. De er imidlertid pyrogene også etter høygradsrensning. Ved isolering av komponenter, som er viktige for induksjon av beskyttende immunitet, har den pyrogene effekt forsvunnet, men immunogenisiteten er ofte ikke tilstrekkelig sterkt. Derfor må egnet adjuvans (hjelpestoff til legemidler) innføres i de vaksiner som inneholder de isolerte antigener (subenheter) for å øke immunsvaret. På den annen side, forårsaker effektive adjuvans på den måte som det hittil er blitt anvendt, negative bieffekter. Adjuvansholdig vaksine er derfor ikke bedre enn vaksine basert på hele virus, når det gjelder den pyrogene effekt.

For å øke immunogenisiteten har man fremstilt detergentholdige membranproteiner som innleires i eller bindes til overflaten av liposomer (EPC-søknad 79400830.0). Detergentfrie membranproteiner i liposomer omtales i US-patent 4 148 876. Inkorporering av adjuvans i slike detergentfrie unilaminære liposomprodukter omtales i US-patent 4 196 191 (uten at effekten derav påvises). I US-patent 4 117 113 omtales negativt ladete liposomer inneholdende virusantigen. I slike liposomer inneholdende influensahemaglutinin og neuraminidaser medfører inkorporering i liposomene av et adjuvans, mykobakteriecellevegger, et bedre immunsvar. Bedre immunsvar ble også oppnådd når adjuvans som død Mycobacterium tuberculosis, Bordetella pertussis og saponiner ble innført i slike negativt ladede liposomer inneholdende diferitoksoid (US-patent 4 053 585).

Alle de ovennevnte lipidholdige membranproteinproduktene er imidlertid ustabile ved lengre tids lagring, frysetørking eller uvøren behandling som f.eks. ved høy temperatur.

Man har også fremstilt detergent- og lipidfrie proteinmiceller som vaksine. Man har vist at miceller av membranproteiner av Semliki Forest virus (SFV) stimulerer til dannelse av sirkulerende antistoffer mot SFV, og gir en beskyttelse for mus mot dødlig infeksjon av SFV. På den andre siden var slike membranproteinmiceller av parainfluensa-3-virus ikke effektive når det gjaldt å stimulere antistoffdannelsen på lam eller å beskytte mot en dose av PI-3-stamme som forårsaker pneumoni, såvidt ikke et oljeadjuvans var blandet med micellene. Oljeadjuvans gir for det meste bieffekter i form av lokale reaksjoner i injeksjonsstedet. (EPC-søknad 81102213.6).

Hensikten med oppfinnelsen er å unngå disse ulemper og å tilveiebringe et lagringsstabilt protein- eller peptidkompleks med høy immunogenisitet og uten bivirkninger. Dette oppnås med lipidfrie kompleks mellom hydrofobe regioner i proteiner og peptider fra virus, mykoplasma, bakterier, dyreceller eller parasitter, og hydrofobe grupper i en eller flere glykosider.

De nye kompleks har en annen morfologisk struktur ved elektronmikroskopi enn tilsvarende proteinmicell, som fremstilles uten glykosidtilsetning. Micellene har en kompakt sentral kjerne med radielt anordnet utskudd idet komplekset ifølge oppfinnelsen har en åpen sfærisk struktur, bestående av sirkulære underenheter eller deler av den sfæriske struktur. Komplekset og delene herav har videre valigvis en lavere sedimentasjonskonstant (se fig. 1), enn tilsvarende miceller og høyere sedimentasjonskonstant enn tilsvarende monomere form av protein eller peptid.

Fremstilling av et immunogent kompleks inneholdende antigene proteiner eller peptider med hydrofobe regioner, idet komplekset har en åpen sfærisk struktur bestående av sirkulære underenheter eller delvis av den sfæriske struktur, idet komplekset og delene herav vanligvis har en lavere

sedimentasjonskonstant enn tilsvarende miceller og høyere sedimentasjonskonstant enn tilsvarende monomer form av protein eller peptid, karakterisert ved at det oppnås ved å blande minst en del av gruppen bestående av mikroorganismer inneholdende amfipatiske proteiner eller peptider med hydrofile og hydrofobe grupper eller slike proteiner eller peptider, eller dyreceller infisert med slike mikroorganismer, idet det dannes komplekser mellom amfifatiske antigene proteiner eller peptider, og solubiliseringsmidler, hvoretter de amfifatiske antigene proteiner eller peptider adskilles fra solubiliseringsmidlet i nærvær av eller er adskilt fra solubiliseringsmidlet og direkte overført til en oppløsning inneholdende minst et glykosid med hydrofobe og hydrofile regioner i en konsentrasjon på minst den kritiske micellekonsentrasjon, idet komplekset kan fremstilles ved at

(a) mikroorganismene, cellene eller hydrofobe peptider eller proteiner blandes med solubiliseringsmiddel valgt blant et ionisk, ikke-ionisk, switter-ionisk, gallesyredetergent, alkoholer, små amfifatiske molekyler, vannoppløslige peptider eller proteiner og blandinger herav i bufret, eventuelt saltholdig oppløsning, blandingen helles over en solubiliseringsmiddelholdig sukkergradient, som ligger over en glykosidholdig sukkergradient, hvorved den solubiliseringsmiddelholdige sukkergradienten inneholder sukker med en konsentrasjon lik eller lavere enn konsentrasjonen i den glykosidholdige sukkergradients øvre sjikt, fortrinnsvis 5-25 vekt-%, spesielt 15 vekt-%, og solubiliseringskonsentrasjonen holdes ved 0,25-3 vekt-%, fortrinnsvis 0,75-1,5 vekt-%, spesielt 1 vekt-%, og den glykosidholdige sukkergradient hvis begynnelseskonsentrasjon er ved minst 5 vekt-%, fortrinnsvis 15-25 vekt-% og sluttkonsentrasjonen er minst 20 vekt-%, fortrinnsvis 45-60 vekt-%, gukosidinneholdet er ved minst 5, fortrinnsvis minst 7-12 ganger CMC, og sentrifugeres ved minst 100.000 g, den proteinholdige fraksjon isoleres, dialyseres mot bufferoppløsningen,

(b) eller at mikroorganismene, cellene eller proteinene eller peptidene etter at de er blandet med solubiliserings-

midlet i bufret saltoppløsning tilføres glukosid og dialyseres mot fortrinnsvis ammoniumacetatbuffer eller has direkte over på en gradient og sentrifugeres ved minst 100.000 g, hvoretter de proteinholdige fraksjoner oppbevares, tilføres glukosid og dialyseres mot buffer, fortrinnsvis ammoniumacetat eller en blanding av mikroorganismer, celler eller proteiner eller peptider, og solubiliseringsmiddel i bufret eller den proteinholdige toppfraksjon som fås når blandinger av mikroorganismer, celler og proteiner og peptider og solubiliseringsmiddel i bufret saltoppløsning sentrifugeres gjennom en gradient, separeres elektroforetisk eller

(c) kromatografisk fra solubiliseringsmimdlet oppsamles i en oppløsning inneholdende glukosidet, hvoretter det dannede proteinkompleks eventuelt konsentreres f.eks. ved lyofilisering, vakuumdialyse eller ultrasentrifugering eller renses ytterligere ved gradientsentrifugering.

Det således fremstilte kompleks med glykosidtilsetning har en bedre immunogen aktivitet enn tilsvarende proteinmiceller, som fremstilles uten glykosidtilsetninger eller kompleks mellom et proteinmolekyl og solubiliseringsmiddel (monomerformer) eller proteinmolekyler bundet til lipid, f.eks. virosomer, og gir mindre bivirkninger enn når proteinmicellene blandes med glykosidene eller annen adjuvans. Således kan dosen av membranproteiner minskes til ca. 1/10 eller mer.

De proteiner eller peptider med hydrofobe regioner som kobles til hydrofobe regioner på glykosidene kan være:

A) amfifatiske proteiner eller peptider med hydrofile og hydrofobe grupper som kommer fra eller utgjøres av membranproteiner eller -peptider fra hylsterutstyrte vira, mykoplasma, bakterier, parasitter eller dyreceller, eller av slike proteiner eller peptider fremtilt med hybrid-DNA-teknikk eller syntetisk fremstilte molekyler.

B) Hydrofile proteiner eller peptider som er gjort amfifatiske ved påkobling av hydrofobe grupper. Disse proteiner eller peptider kan komme fra virus, mykoplasma, bakterier, parasitter, være fremstilt eller oppnådd ved hybrid-DNA-teknikk.

C) Amfifatiske proteiner eller peptider oppnådd ved at utilgjengelige hydrofobe deler i hydrofile proteiner er gjort tilgjengelige på kjemisk måte. Disse proteiner kan komme fra overnevnte mikroorganismer eller celler eller fåes ved hybrid-DNA-teknikk eller være syntetisert.

Fremstilling av kompleks

a) Når det gjelder membranproteiner eller -peptider fra hele celler omfatter fremstillingen av komplekset prinsipielt tre trinn, rensning eller isolering av dyreceller eller mikroorganismer eller fragment derav, solubilisering av hydrofobe proteiner samt bortskaffing av solubiliseringsmidler under samtidig overføring av ønsket antigen i kompleks ved hjelp av glykosid i en immunogenform (immunogent kompleks).

Rensning og isolering

Virus med hylster, mykoplasma, bakterier, parasitter og dyreceller konsentreres og renses på kjent måte, (se The Tools of Biochemistry T. G. Cooper, John Wiley & Sons (1977) New York som inkorporeres som referanse) eksempelvis ved gelfiltrering eller sentrifugering gjennom en sukkergradient eller gradientsentrifugering gjennom percol eller med hulfiberdialyse. Når det gjelder bakterier kan det være nødvendig eller fordelaktig først å lysere eller å knuse celleveggene (for referanse se Cota-Robles and Stein, CRC Handbook of Microbiology Vol II (1973) side 833-844) med f. eks. ultralyd- eller French pressbehandling.

Solubilisering

De rensede dyrecellene resp. mikroorganismer eller fragment av disse, blandes deretter med ikke-ionisk, ionisk eller zwitterionisk detergent eller detergent på basis av en gallesyre som anvendes i overskudd. Typiske eksempler på egnede ikke-

ioniske detergenter er polyglykolestere og -etere, med alifatiske og aralylfatiske syrer og alkoholer. Eksempel på disse er alkylpolyoksyetyleneter med den generelle formel $C_nH_{2n+1}(OCH_2CH_2)_xOH$ forkortet C_nE_x, alkylfenylpolyoksyetylenetere inneholdende en fenylring mellom alkylgruppen og polyoksyetylenkjeden, forkortet $C_n\phi E_x$, f. eks. "Triton X-100" = tert.- - $C_8\phi E_{9,6}$ (oktylfenoleter av polyetylenoksyd), acylpolyoksyetylenestere, acylpolyoksyetylensorbitanetere forkortet C_n dorbitan E_x, f. eks. "Tween 20, Tween 80", β-D-alkylglykosider, f. eks. β-D-oktylglukosid. Også de nedenfor nevnte glykosidene kan anvendes spesielt sapponin. Disse er imidlertid svake detergenter og bør anvendes sammen med annen detergent. Typiske eksempler for egnede ioniske detergenter er gallesyredetergenter som f. eks. deoksycholat og cholat. Også konjugerte detergenter som f. eks. taurodeoksycholat, glykodeoksycholat og glykocholat kan anvendes. Som Zwitterioniske detergenter kan nevnes lysolecitin og syntetiske lyso-fosfolipider. Også blandinger av overnevnte detergenter kan anvendes.

Solubiliseringen kan også utføres med alkoholer, organiske oppløsningsmidler eller små amfifatiske molekyler, som heptan- 1,2,3,-triol, heksan-1,2,3-triol, eddiksyre, vannoppløselige peptider og proteiner eller blandinger herav med detergenter.

Solubiliseringsmidlet anvendes i overskudd i forhold til mengden lipid og hydrofobe proteiner. Hensiktsmessig blander man celler eller mikroorganismer og solubiliseringsmiddel i vektforhold 1:3 til 1:10.

Celler eller mikroorganismer og solubiliseringsmiddel blandes i bufret eventuelt saltholdig oppløsning, saltoppløsningens molaritet ligger mellom 0,02 og 0,5 M, fortrinnsvis mellom 0,05 og 0,25 M. 0,1 - 0,2 M foretrekkes. Detergenter bør virke 1 time ved værelsestemperatur.

Som salt foretrekkes kokesalt, men også andre salter kan komme på tale, spesielt salter med alkali- og jordalkalioner og ammoniumioner som sterke mineralsyrer og organiske syrer, som eddiksyre, trikloreddiksyre, maursyre og oksalsyre. Som buffer er alle stoffer egnet som buffer i pH-intervallet 6,5 - 9.

Ved anvendelse av cholater og deoksycholater foretrekkes pH 8-9, og ved anvendelse av ikke-ioniske detergenter pH 7,4.

Fremstilling av immunogent kompleks

Når celler eller mikroorganismer er blitt solubilisert dannes en blanding av solubiliseringsmiddel og celle- eller mikroorganismefragment (nedenfor kalt fragment). Blant fragmentene gjenfinnes ladede monomer antigene proteiner med hydrofobe regioner i kompleks med solubiliseringsmiddel. Det nye immunogene kompleks ifølge oppfinnelsen fremstilles ved at de ladede monomere antigene proteiner separeres fra solubiliseringsmidlet i nærvær av, eller direkte overføres til en eller flere glykosider som skal ha hydrofobe og hydrofile bindinger og forekomme i konsentrasjon av minst en kritisk micellær konsentrasjon. De øvrige fragmenter fjernes før komplekset fremstilles, enten under fremstillingen, eller etterpå, men fortrinnsvis før.

Komplekset kan fremstilles enten gjennom at solubiliseringsmidlet fjernes, f.eks. ved dialyse, gelfiltrering, kromatografering fra blandingen av solubiliseringsmiddel, ladede monomere antigene proteiner, glykosid og eventuelt øvrig fragment, eller ved at de ladede monomere antigene proteiner separeres fra den nevnte blandingen, f.eks. ved gradientsentrifugering, kromatografering eller elektroforese.

Det er vesentlig ved oppfinnelsen at de monomere antigene proteiner separeres fra solubiliseringsmidlet, samtidig i nærvær av glykosidet eller etter separeringen direkte overføres til glykosidet, hvorav micellformen bør forekomme. Når de monomere antigene proteinene separeres fra solubiliseringsmidlet, således at de direkte kan komme i kontakt med glykosid, dannes det spesielle komplekset. Det antas at micellformen av glukosidet utgjør vekstgrunnen for danning av komplekset og at dette dannes ved attraksjon mellom hydrofobe regioner på glykosidmicellene og hydrofobe regioner på membranproteinene. Mengden glykosid i komplekset varierer

avhengig av det anvendte glykosid, og de kompleksbundne membranproteiner og ligger mellom 0,5 og 50 vekt-%, spesielt mellom 0,5 og 25 vekt-%, fortrinnsvis mellom 0,5 og 15, ofte mellom 0,5 og 10 vekt-%, spesielt mellom 2 og 8 vekt-%. Hvis de ladede antigene monomere proteinene separeres fra solubiliseringsmidlet i fravær av glukosider, dannes derimot proteinmiceller av den type som fremstilles ifølge EPC-søknad 81102213.6.

Det er hensiktsmessig å fjerne øvrige fragment ved gradientsentrifugering, da sedimentasjonskonstanten for de berørte komponentene avtar i følgende rekkefølge: Cellefragment, proteinkompleks med solubiliseringsmiddel eller ifølge oppfinnelsen med glykosid, monomere proteiner og solubiliseringsmiddel. Således kan øvrige fragment fjernes med gradientsentrifugering fra blanding av solubiliseringsmiddel, monomere proteiner og øvrige fragment før glukosidet tilsettes og solubiliseringsmidlet fjernes. f. eks. ved dialyse, gelfiltrering, kromatografi, eller de monomere proteinene seprareres fra solubiliseringsmidlet. f. eks. ved elektroforese, kromatografi eller gradientsentrifugering. Ved den senere metode er også mulig å fjerne de øvrige fragmenter under samme gradientsentrifugering, hvorunder komplekset dannes. Det er også mulig å separere øvrige cellekomponenter etter at komplekset er dannet i henhold til overnevnte, f. eks. ved sentrifugering, affinitetskromatografi, molekylærsiktning eller gelfiltrering.

Glykosidet kan være et hvilket som helst glykosid med hydrofobe og hydrofile regioner. Fortrinnsvis anvendes de saponiner som omtales i R. Tschesche og Wulf, Chemie und Biologie der Saponine i Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe utgitt ved W. Herz. H. Grisebach, G. W. Kirkby vol. 30 (1973) spesielt de sterkt polare saponinene, i første rekke de polare triterpensaponinene som de polare sure bisdesmosidene, f. eks. saponinekstrakt fra Quillajabark Aralosid A, Chikusetsusaponin IV, Calendula-glykosid C, Chikusetsusaponin V, Achyranthes-saponin B, Calendula-glykosid A, Aralosid B, Aralosid C, Putranjia-saponin III, Bersamasaponosid, Putranjia-saponin IV, Trichosid A, Trichosid B, Saponasid A, Trichosid C, Gyposid, Nutanosid, Dian-

tosid C, Saponasid D, fortrinnsvis aescin fra Aesculus hippocastanum (Patt, T og W. Winkler, Das therapeutisch Wirksamme Prinzip der Rosskastanie (Aesculus hippocastanum). Arzneimittelforsch. 10(4), 273 - 275 (1960)) eller sapoalbin fra Gypsophilla struthium (Vochten R, P Joos og R. Ruyssen: Physicochemical-properties of sapoalbin and their relation to the foam stability, J. Pharm. Belg. 42 213 - 226 (1968), spesielt saponinekstrakt fra Quillaja saponaria Molina, i første rekke DQ-ekstraktet som fremstilles ifølge K. Dalsgaard: Saponin Adjuvans. Bull. Off. int. Epiz 77 (7 - 8), 1289 - 1295 (1972) og Quill A som fremstilles ifølge K. Dalsgaard: Saponin Adjuvans III, Archiv für die Gesamte Virusforschung 44, 243 - 254 (1974). Også blandinger av glykosider kan anvendes. Mengden anvendt glykosid bør være minst 5 ganger deres kritiske micelldannelseskonsentrasjon (CMC), spesielt minst 7 - 12 ganger denne. Det antas at glykosidene i så fall kan bindes ved å fange opp monomere former av membranproteinene. Fortrinnsvis anvendes Quill A som har en kritisk micelldannelseskonsentrasjon på 0,03 vekt%. Mengden Quill A bør da være minst 0,02 vekt%, spesielt 0,05 - 0,5 vekt%, fortrinnsvis 0,2 vekt%. Overnevnte publikasjoner med hensyn til glykosidene inkorporeres som referanse.

Separeringen av de dannede monomere antigene proteiner fra solubeliseringsmidlet er utført med sentrifugering, dialyse, elektroforese og forskjellige kromatografiske metoder.

Sentrifugemetoder

De i henhold til overnevnte fremstilte blandinger av fragmenterte celler resp. mikroorganismer og solubiliseringsmiddel,gradientsentrifugeres og sjiktes, f. eks. over en sukker- eller saltoppløsning inneholdende solubiliseringsmiddel, hvorpå det dannes en gradient inneholdende glykosider, såsom en sukkergradient eller en gradient av glyserol eller metrizeamid, eller et tungt salt, f. eks. CsCl (dvs. relativt inerte stoffer som har egnet tetthet, viskositet til å virke som gradientmaterial) f. eks. med nedenstående for sukkergradient angjeldende konsentrasjoner.

Gradientsystemet sentrifugeres ved minst 100 000 g. Som sukker kan det anvendes monosakkarider, disakkarider, så som sakkarose, laktose, maltose, men også trioser, tetroser, samt glyserol. Fortrinnsvis anvendes sakkarose. Sukkerkonsentrasjonen i gradienten er hensiktsmessig minst 5, fortrinnsvis 15-25 vekt-%, som begynnelseskonsentrasjon (øverst i gradienten), og sluttkonsentrasjonen minst 20, fortrinnsvis 45-60 vekt-% (nederst i gradienten). Gradienten kan eksempelvis bestå av et øvre sjikt med 5 - 25 vekt% sukkerinnhold og et nedre sjikt med 20 - 60 vekt% sukkerinnhold. Imidlertid kan også flere sjikt foreligge idet konsentrasjonsforskjellene mellom de forskjellige sjikt senkes i tilsvarende grad. Sukkergradientene inneholder et glykosid eller en blanding av glykosider. Mengden glykosid bør være minst 5, fortrinnsvis minst 7 - 12 ganger CMC, for Quil A minst 0,02, spesielt minst 0,05 - 0,5, fortrinnsvis minst 0,2 vekt%. I denne glykosidholdige gradient separeres solubiliseringsmidlet, og komplekset mellom dette og proteinet overgår til protein-glykosid-kompleks.

Oppå sukkergradienten foreligger et sjikt av en oppløsning av sukkeret eller tungt salt som inneholder solubiliseringsmiddel eller en blanding derav. I dette sjikt forblir lipidene. Konsentrasjonen av solubiliseringsmidlet i dette sjikt er mindre enn eller samme som i den påsatte blanding av mikroorganismer eller celler, og solubiliseringsmiddel som ligger hensiktsmessig mellom 0,25 og 3 vekt%, fortrinnsvis mellom 0,75 og 1,5 vekt%, idet 1 vekt% foretrekkes. Sukker- og saltkonsentrasjonen kan være samme eller mindre enn konsentrasjonen i den nedre glykosidholdige gradients øvre sjikt.

Etter sentrifugering ved minst 100 000 g i minst 16 timer, fortrinnsvis i 20 timer ved 20°C, oppsamles de proteinholdige fraksjoner og dialyseres mot puffer (0,5 M til 0,001 M) fortrinnsvis 0,005 M tris-HCl, 0,01 M NaCl, pH 7,4, eller 0,2 M ammoniumacetatpuffer, pH 7,0 og konsentreres f. eks. som omtalt i The Tools og Biochemistry av T. G. Cooper edit. John Wiley & sons (New York 1974, f. eks. ved lyofilisering, vakuumdialyse og ultrafiltrering. Under sentrifugeringen sedimenterer alle bestanddeler idet solubiliseringsmidlet slipper fra komplekset derav med proteinene, og de monomere proteinene overføres til glyko-

sidet og danner kompleks med dette. Ved den etterfølgende dialyse, fjernes sukkeret. Komplekset kan eventuelt ytterligere renses, f. eks. fra fri glykosid ved gradientsentrifugering, f. eks. gjennom en sukkergradient, inneholdende 25 - 60 vekt% sukker, fortrinnsvis 10 - 40 vekt% sakkarose.

Dialysemetoden

Etter resningen av celler resp. mikroorganismene som omtalt ovenfor, og etter at de er blandet med solubiliseringsmiddel i ovenfor angitt vektforhold, kan blandingen av celler og solubiliseringsmiddel i ovenfor angitt buffer alternativt direkte utstyres med minst 5, fortrinnsvis minst 7 - 12 ganger CMC, for Quil A 0,05 - 2 vekt% glykosid, fortrinnsvis 0,2 vekt% glykosid og dialyseres mot buffer som 0,5 - 0,001 M, fortrinnsvis 0,005 M tris-HCl, 0,01 molar NaCl, pH 7,4, spesielt 0,2 molar ammoniumacetatpuffer, pH 7,0. Herved fjernes solubiliseringsmidlet i nærvær av glykosidet. Deretter kan det fremstilte membran proteinkompleks isoleres med sedimentasjonsgradientsentrifugering som omtalt ovenfor, imidlertid ekskluderes glykosidtilsetningen og befries fra øvrige fragmenter og fri glykosid.

Blandingen av celler resp. mikroorganismer og solubiliseringsmiddel i buffer kan også gradientsentrifugeres og f. eks. sjiktes på en 5 - 60 vekt% i sukkergradient i overnevnte buffer, fortrinnsvis en 10 - 20 vekt%-ig sakkarosegradient, og sentrifugeres ved minst 150 000 g i minst 20 minutter, fortrinnsvis i 30 minutter ved 250 000 g. Herved separeres øvrige fragment fra solubiliseringsmiddel-proteinkomplekset.

Den proteinholdige overvæsken kalt toppfraksjon utvinnes og glykosidet tilsettes i en mengde på minst 5, fortrinnsvis minst 7 - 12 ganger CMC, for Quill A 0,05 - 0,5 vekt%, fortrinnsvis 0,2 vekt%, og dilayseres mot bufferes 0,5 - 0,001 molar, spesielt 0,005 M tris-HlC, 0,01 molar HCl, pH 7,4, fortrinnsvis 0,2 M ammoniumacetat. Herved fjernes solubiliseringsmidlet i nærvær av glykosidet. Ytterligere rensning kan utføres ved en sedimentasjonsgradientsentrifugering (se ovenfor). Ytterligere rensning kan foregå ved sentrifugering gjennom en sukkergradient inneholdende 5 - 60 vekt% sukker, fortrinnsvis 19 - 40 vekt% sukker.

Elektroforesemetoden

Alternativt kan blandingen av fragmenterte mikroorganismer eller celler og solubiliseringmiddel eller den proteinholdige overvæsken (øvrige fragment og fritt solubiliseringsmiddel er borte) som fåes når denne blanding gradient sentrifugeres, f. eks. gjennom en 5 - 60 vekt%, fortrinnsvis 10 - 20 vekt% sukkergradient i puffer, separeres elektroforetisk fra solubiliseringsmiddelet og øverføres i en oppløsning inneholdende minst 5, fortrinnsvis minst 7 - 12 ganger CMC, for Quill A 0,05 - 0,5 vekt% glykosider, fortrinnsvis 0,2 vekt% glykosid. Herved separeres de ladede monomere antigene proteiner fra solubiliseringsmiddelet. Ved separering med elektroforese er det hensiktsmessig at solubiliseringsmiddel-buffertoppløsningen ikke inneholder ekstra tilsatt salt, som kan interferere med elektroforesen og frembringe for høy temperatur. Man kan f. eks. anvende soneelektroforese med eller uten bærer, og isotakoforese med eller uten bærer. Som bærer kan det anvendes de vanlige stoffer som polyalkylamid, agar, kiselgel, stivelse, cellulose, polyvinylklorid, ioneveksler, celite. Isolering og konsentrering av kompleks utføres som beskrevet ovenfor. Ytterligere rensning ved gradientsentrifugering se også ovenfor.

Hvis hydrofobe membranproteiner med forskjellig ladning resp. foreligger i utgangsmateriale, så kan man med elektroforese resp. sentrifugemetodene separere disse fra hverandre, og fremstille separate kompleks av dem. Med disse fremgangsmåter kan man således separere og anrike kompleks av forskjellige membranprotein.

Kromatografiske metoder

De solubiliserte proteiner kan eventuelt etter rensning fra cellefragment separeres fra solubiliseringsmidlet med kromatografiske metoder, idet den antigene struktur adsorberes til et uoppløselig støttestoff (matriks) som kan bestå av eksempelvis cellulose, agarose, dekstran, alkylamid og glass. Forskjellige ligander kobles til matriksstrukturen som da får spesifikke egenskaper som utnyttes under separeringen. Vanligvis absorberes den antigene struktur samtidig som det anvendte

solubiliseringsmiddel passerer uadsorbert gjennom matriksen. Deretter foregår en desadsorbering av antigenet. Under det adsorbsjonstrinnet kan det forekomme en utbytning av solubiliseringsmiddelsalt og pufferstoff, idet solubiliseringsmidlet kan erstattes med glykosidet og komplekst fremstilles.

Ved ionebytterkromatografi kobles ladede ligandmolekyler som dietylaminoetyl (DEAE) til matriks og anvendes som kationbytter. Karboksymetyl (CM) eller fosfatgrupper (P) kobles til matriks og utnyttes som anionbytter. Ved anvendelse av forskjeller i nettoladning mellom antigene strukturer og solubiliseringsmiddel tilveiebringes en separering av disse molekyler. Generelt er solubiliseringsmidlet uladet og proteinet ladet. Eluering foregår med saltgradient for eksempel K- eller NaCl eller pH-justering med fosfatpuffer i nærvær av et solubiliseringsmiddel (konsentrasjon og eksempel se under solubilisering ovenfor). Ved elueringen kan proteinene renses, solubiliseringsmidlet utveksles, eller komplekset dannes hvis glykosidet tilsettes elueringsmiddel i stedet for solubiliseringsmiddel. Saltet fjernes etterpå ved dialyse.

Ved gelfiltrering utnyttes at solubiliseringsmidlet er mindre enn de antigene strukturer, og kommer ut i senere fraksjoner.

Med immunoaffinitets-kromatografi kan antistoffer irreversibelt bindes til overnevnte matriks, hvoretter den unike spesifisiteten og affiniteten hos antistoffer utnyttes for rensning av ønsket antigenstruktur. Solubiliseringsmiddelet har ikke affinitet til antistoffer. Eluering foregår med mild denaturering, f. eks. pH-senkning til ca. 4, og i nærvær av solubiliseringsmiddel eller glykosid.

Ved lektin-kromatografi utnyttes lektiner, en gruppe proteiner som har evnen til å reagere reversibelt med spesifikke sukkergrupper, som gjør det mulig for dem å binde f. eks. glykoproteiner. Lektinet kobles som ligand til eksempelvis "Sepharose", eller innkjøpes kommersielt ferdigkoblet til egnet matriks. Detergenter (solubiliseringsmiddel) har ikke affinitet til den immobiliserte lektin. Den adsorberte antigene strukturen desadsorberes vanligvis ved til-

setning av metylert sukker som eksempelvis metylmannosid,metylglukosid og N-acetylglykosamin oppløst i buffret saltoppløsning i nærvær av solubiliseringsmiddelet eller glykosid.

Ved kovalent kromatografi bindes en antigen struktur med tiolgruppe med en kovalent binding til matriks. Tiolgruppen i antigenet bindes selektivt til en aktivert tiogruppe koblet til egnet matriks ved tio-diosulfidutveksling. Denne binding er reversibel og etter at solubiliseringsmiddelet er bortvasket kan den tiolbærende antigene strukturen elueres ved reduksjon av sulfidbindingen med merkaptoetanol eller diotiotrietol i nærvær av solubiliseringsmiddel eller glykosid.

Hydrofob kromatografi. Denne teknikk utnytter interaksjonen mellom en immobilisert hydrofob ligand, av typen oktyl, fenyl, og de hydrofobe overflater på den antigene struktur. Denne teknikk kan alternativt være en metode til fra blandingen å binde solubiliseringsmiddelet til liganden samtidig som antigene struktur uadsorbert kan gjenvinnes for fortsatt bearbeiding i henhold til eksempel 4 (dialysemetoden). Under andre forhold kan den antigene struktur bindes til liganden, og solubiliseringsmiddelet har ikke affinitet til liganden, hvorfor man fortsetter ifølge dialysemetoden. Man immobiliserer ved høy ionestyrke med f. eks. ammoniumsulfat og eluerer ved lav ionestyrke med vann eller etylenglykol.

Når et kompleks inneholder membranproteiner fra bakterier er det fordelaktig å først knuse celleveggene før cellematerialet behandles med overnevnte fremgangsmåte. Eksempel på bakterier hvorfra hydrofobe proteiner kan fremstilles er f. eks. Escherichia, Staphylococci, Haemaophilus, f. eks. H. influenzae, Bordetella, f. eks. B. pertussis, Vibrio, f. eks. V. Cholerae, Salmonella, f. eks. S. Typhi, S. paratyphi, fortrinnsvis adherensfaktor hos Coli, f. eks. pili K 88 og porinprotein hos f. eks. Salmonella eller ytre membranproteiner fra B. pertussis og Neisseria meningitidis.

Eksempel på anvendbare virus med hylster er Orthomyksoviridae som influensa A, B, C, Paramyxoviridae, spesielt meslingvirus, magesykevirus, parainfluensa 1, 2, 3 og 4-virus, hvalpesykevirus, og storfepestvirus, Rhabdoviridae, spesielt

rabiesvirus, Retroviridae, spesielt felin leukemivirus og bovint leukemivirus, Herpesviridae, spesielt Pseudorabies, Coronaviridae, Togaviridae som EED, WEE, VEE (eastern, western and Venezuela equine encephalitis), gulfeber-virus, spesielt bovint virusdiarevirus og europeisk svinepestvirus, Arenaviridae Poxviridae, Bunyaviridae, Iridioviridae spesielt afrikansk svinepestvirus, samt blandt uklassifisert virus human hepatitis B-virus og Marburg/Ebolavirus.

Eksempler på parasitter som kan anvendes er Protoza, som Toxoplasma, f.eks. Toxoplasma gondii, Plasmodium, f. eks. Plasmodium vivax, malaria, flaciparium, Teileria parvum, ovale, samt Filarodiae, fortrinnsvis Parafilaria og Onchocerca, Entamöba histolytika, anaplasma av forskjellig type Schistosoma som Schistosoma haematobium, mansoni, japonicum, og Trypanosoma, f. eks. Trypanosoma gambiense, T. brusei eller congolesi.

b) Det er også mulig å gå ut ifra ikke hydrofobe proteiner eller peptider og til disse å koble hydrofobe grupper. De ikke hydrofobe proteinene kan komme fra virus med eller uten hylster, bakterier, mykoplasma, parasitter. Eksempler på ikke-hylsterutrustede vira med ikke hydrofobe proteiner, er Picornaviridae, f. eks. munn- og klovsykevirus, poliovirus, Adenoviridae, Parvoviridae, f. eks. kattepestvirus og svineparvovirus, Reoviridiae, f. eks. Rotavirus. Eksempel på mykoplasma er M. pneumoniae, mycoides, bovis, suis, hyorinos, orale, salivarium, hominis og termentans.

Disse proteiner eller peptider renses frem som omtalt under a) rensning og isolering.

De hydrofobe grupper som kan kobles til de ikke hydrofobe proteiner, er rettlinjede, forgrenede, mettede eller umettede alifatiske kjeder med 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 og 8 karbonatomer, helst 6, 7, og 8 karbonatomer, små peptider med 1, 2, 3, 4, eller 5 aminosyrer, fortrinnvis 2, 3, 4, valgt blandt Trp, Ile, Phe, Pro, Tyr, Leu, Var, spesielt Tyr, cholinsyre, cholestrolderivater som cholinsyre, ursodesoksycholinsyre.

Disse hydrofobe grupper må være bundet til en gruppe som kan kobles til det ikke hydrofobe protein, som karboksyl-,

amino-, disulfid-, hydroksyl-, sulfhydryl- og karbonylgrupper som aldehydgrupper.

Som hydrofobe koblingsbare grupper velges fortrinnsvis karboksyl-, aldehyd-, amino-, hydroksyl-, og disulfidderivat av metan, etan, propan, butan, pentan, heksan, heptan, oktan samt peptider inneholdende Cys, Asp, Glu, Lys, fortrinnsvis oktanal og Tyr-Tyr-Tyr-Cys, -Asp, - eller - Glu. De hydrofobe grupper med koblingsbare grupper må oppløses i vann ved hjelp av f. eks. det overnevnte solubiliseringsmiddel, og detergenter eller saltsyre, eddiksyre, iseddik, lut, ammoniakk, avhengig av hvilket stoff som skal oppløses. Deretter pH-justeres mot den nøytrale side uten at stoffene faller ut, idet man iakttar at man ikke får en pH-verdi som denaturerer det protein som den hydrofobe gruppe skal kobles til.

Det hydrofobe molekyl settes til det ikke-hydrofobe protein, i et molforhold på 10:1 - 0,1:1, fortrinnsvis 1:1.

Hydrofobe grupper med en karboksylgruppe som koblingsmolekyl kan kobles til proteinet via vannoppløselig karbodiimider eller sammensatte anhydrider. I det første tilfellet aktiveres karboksylgruppen ved pH 5 med karbodiimid, og blandes med proteinet oppløst i buffer pH 8 med høyt fosfatinnhold. I sistnevnte tilfelle omsettes karboksyforbindelsen med isobutylkloroformat i nærvær av trietylamin i dioksan eller acetonitril, og det dannede anhydrid settes til proteinet ved pH 8 - 9. Det er også mulig ved hydrazin å omdanne karboksylgruppen til hydrazin som med aldehyder og ketoner i perjodatoxiderede sukkerenheter i proteinet gir hydrazonbindinger.

Aminogruppene kan med salpetersyrling ved lav temperatur omdannes til diazoniumsalter som gir azobindinger med Tyr, His eller Lys.

Hydroksylgruppene kan med ravsyreanhydrid omdannes til hemisuccinatderivat, som kan kobles med karboksylgrupper.

Aldehydgrupper kan omsettes med aminogrupper i proteiner til en Schiffsk base.

Flere koblingsgrupper og metoder er beskrevet i Journal of Immunological Methods 59 (1983) 129 - 143, 289 - 299, Methods in Enzymology Vol. 93 side 280 - 333 og Analytical Biochemistry 116, 402 - 407 (1981).

De således fremstilte proteiner eller peptider, som har fått hydrofobe grupper, kompleksbindes deretter med glykosid som omtalt under a), idet man imidlertid kan uteslutte de rensningstrinn der cellefragment fjernes.

c) Man kan også gå ut fra hydrofile proteiner som har innesluttede hydrofobe grupper og gjøre sistnevnte tilgjengelig ved å denaturere proteinene svakt, f. eks. med lav pH ca. 2,5, 3M urinstoff eller høy temperatur over 70°C. Slike proteiner kan være immunoglobuliner, som Ig G, Ig M, Ig A, Ig D og Ig E og visse virusproteiner som poliovirusprotein. Immunoglobulinene kan anvendes som antibiotypiske antilegemer. Proteinene renses som proteinene under b) og kompleksbindes deretter til glykosid som omtalt under a), idet rensningstrinnet for å få bort cellefragment utelukkes.

De immunogene komplekser kan anvendes for spesifikke immunstimulering hos mennesker og dyr. De kan således anvendes som vaksine mot sykdommer forårsaket av bakterier, mykoplasma, virus og parasitter, som når man for forskningsformål ønsker å fremstille antistoffer mot membranproteiner fra forskjellige dyreceller.

Også blandinger av alifatiske proteiner eller peptider fra forskjellige bakterier eller virus, kan anvendes når man vil fremstille vaksinen mot flere opphav.

Human- og veterinærmedisinske preparater inneholder iscom eventuelt sammen med vanlig tilsetnings- og drøyemidler, fortrinnsvis i form av en bufferoppløsning av iscom i f. eks. en TN-oppløsning (se eksempel 1) herav.

Oppfinnelsen skal forklares nærmere ved hjelp av noen eksempler.

Eksempel 1

Parainfluensa-3-virus U23, isolert i Umeå, renses ved hjelp av sentrifugering ved 30 vekt% sakkarose ved 100 000 g i 1 time ved 4°C. Bunnavsetningen ble oppløst til en konsentrasjon på ca. 10 mg/ml i 0,05 molar tris-HCl, pH 7,4, og 0,1

molar NaCl (TN). 1 - 5 mg/ml PI-3-virus i samme buffer (TN) ble solubilisert med 2 vekt% (sluttkonsentrasjon) "Triton X-100" sammen med ca. 10^5 tellinger/minutt ^{3}H-merket virus (Luukkonen A, C. Gamberg, E, Renkonen (1979), Virology 76 side 55 - 59) i TN-buffer. Et prøvevolum på ca. 200µl ble plassert ovenfor 30 - 15 % sakkarose inneholdende 1 % "Triton X-100" i TN og en 12 ml sakkarosegradient i TN fra 20 til 50 vekt% inneholdende 0,2 vekt% Quil A. Sentrifugeringen ble utført ved 250 000 g i 22 timer ved 20°C. Etter sentrifugeringen ble det oppsamlet fraksjoner rundt 500 µl nedenifra og prøver (20 - 50 µl) ble målt med hensyn til radioaktivitet. De radioaktive proteinfraksjonene ble slått sammen og dialysert mot 0,005 mol tris-HCl, 0,01 mol NaCl, pH 7,4 dosert til 10 ml flasker, og konsentrert ved lyofilisering i 18 timer i et Edwards frysetørkningsapparat.

Denne tilberedning hadde en sedimentasjonskvotient på 24 S.

Ytterligere rensning av komplekset ble utført ved sentrifugering av komplekset gjennom en 10 - 40 vekt%-ig sakkarosegradient.

Eksempel 2

Fremgangsmåten ifølge eksempel 1 ble gjentatt men med anvendelse av hesteinfluensavirus (Solvalla, isolert fra Solvalla, Stockholm). Forsøket ble gjentatt uten at glykosidet ble tilsatt (dvs. prinsipiert ifølge EPC-søknad 81102213.6) og de således oppnådde proteinmycellene og med glykosid fremstilte proteinkomplekset ble utsatt for sedimentasjons-gradientsentrifugering, gjennom en 10 - 40 vekt% sukkeroppløsning ved 280 000 g i 4 timer ved 4°C. Resultatet fremgår av figur 1 som også viser sedimenasjonskoeffisienten for tyroglobulin som standard (19 S ved pilen). Det fremgår av sedimentasjonskoeffisienten for proteinmycellene er 30 S og for glykosidproteinmycellene 19 S. (Virusglykolproteinet ble merket med galaktoseoksudas-^{3}H-borhydridmetoden).

Eksempel 3

Fremgangsmåten ifølge eksempel 1 ble gjentatt med meslingvirus i steden for parainfluensa-3-virus. Det ble oppnådd et kompleks som ved elektronemikroskopering viste en kara-

kteristisk struktur som fremgår av fig. 2.

Eksempel 4

Rabiesvirus oppnådd fra Bilthoven (Holland) ble renset ved gelsjiktining på "Sephacryl S300" og virus resuspenderes til en konsentrasjon på 2 mg/ml i TN. 1 mg virus ble oppløsliggjort med 100 nM oktyl-β-D-glukosid og inkubert i 45 minutter ved 20°C. Prøven ble plassert over en 50 vekt%-ig sukkeroppløsning og sentrifugert ved 250 000 g i 45 minutter ved +4°C. Overløsningen ble oppbevart og Quil A tilført til 0,2 vekt%.

Prøven ble innesluttet i en celluloseslange og satt på dialyse ved 20°C mot 0,15 molar ammoniumacetatbuffer i et volum på 1000 ml hvilket ble byttet tre ganger under 72 timers konstant omrøring. Det dialyserte material inneholder rabiesviruskomplekset. En del av materialet ble ytterligere renset ved sentrifugering gjennom en 10 - 40 vekt% sukkeroppløsning med 280 000 g i 4 timer ved 4°C. Ved elektronmikroskopering fremkom den struktur som fremgår av fig. 3.

Eksempel 5

Fremgangsmåten ifølge eksempel 4 ble gjentatt med meslingvirus. Det dannede kompleks hadde samme struktur som det ifølge eksempel 3 fremstilte kompleks.

Eksempel 6

Parainfluensa-3-virus (U-23) ble renset med sakkarosegradient-sentrifugering og således renset virus ble oppløst til en konsentrasjon på 10 mg/ml i 0,02 molar barbitonbuffer, pH 8,0, 0,24 M glukose (BG). 1 - 5 mg/ml Pi-3-virus i BG-buffer ble oppløseliggjort med 2 % "Triton X-100" sammen med ca. 10^5 ^{3}H-tellinger/minutt-merket virus (i hht. ref. Luukkonen et al., 1977) i BG-buffer. Et prøvevolum rundt 1 ml ble plassert over en 1 % agarosegel inneholdende 0,02 molar barbitonbuffer, pH 8,0 og 0,02 vekt% Quil A. Agarosegelen fantes innesluttet i et rør med en overflate på 85 mm^3 og en høyde på 25 mm. Overdelen og underdelen av røret ble hver tilsluttet til elektroforesebuffer av 0,02 M barbitonbuffer, pH 8,0. Overkaret ble tilknyttet til en negativ elektrode og underkaret til en positiv elektrode. Elektroforesen ble utført ved 5 V/cm i 4 timer. Prøven ble opp-

samlet på anodesiden av gelen og det måltes med hensyn på radioaktiviteten. Prøven ble dialysert mot 0,15 molar ammoniumacetatbuffer, pH 7,0 og konsentrert ved lyofilisering.

Denne tilberedning hadde en sedimentasjonskoeffisient på ca. 20 S, målt på samme måte som eksempel 2.

Ytterligere rensning av komplekset ble utført ved sentrifugering av komplekset gjennom en 10 - 40 vekt%-ig sakkarosegradient.

Eksempel 7

Toxoplasma gondii (oppnådd fra Tage Waller, Statens veterinærmedisinske anstalt), ble renset ved hjelp av filtrering gjennom bomull og sentrifugert med 30 vekt% sakkarose ved 100 000 g i 20 minutter ved 4°C. Det rensede preparat ble oppløst til en konsentrasjon på ca. 5 mg/ml i 0,05 molar Tris-HCl, pH 7,4 og 0,1 molar NaCl (TN), 1 mg av toxoplasma gondii ble solubilisert i 5 % oktyl-β-D-glykosid og 5 % saponin ifølge "An investigation of the antigenic structure of Toxoplasma gondii", Parasite Immunology 1981, 3, 235 - 248),sammen med ca. 10^5 tellinger/minutt ^{3}H-merket toxoplasma (Luukkonen et al 1977) i TN-buffer. Et prøvevolum på ca. 200 µl ble plassert over 300 µl sakkarose inneholdende 1 % "Triton X-100" i TN og en 12 ml sakkarosegradient i TN fra 20 til 50 vekt% inneholdende 0,2 vekt% Quil A. Sentrifugeringen ble overført ved 250 000 g ved 20°C i ca. 18 timer. Etter sentrifugeringen tappes gradienten i fraksjonene rundt 500 µl og prøver rundt 20 - 50 µl ble målt med hensyn til radioaktivitet. To forskjellige radioaktive topper kunne påvises. Fraksjonen innen de forskjellige toppene ble slått sammen, hver topp for seg, dialyseres og konsentreres ved frysetørkning som angitt under eksempel 1. Komplekset med Quil A hadde en lavere sedimentasjonskoeffisient enn protein-myceller fremstilt fra samme parasitt.

Eksempel 8

Bakterier E. Coli og plasmid pili K 88 ble rystet mekanisk og utfelt tre ganger ved de isoelektriske punkt. Deretter ble materialet behandlet på samme måte som omtalt i eksempel 1. Man fikk kompleks med den karakteristiske struktur som vist på fig. 2 og 3.

Eksempel 9

Fremgangsmåte ifølge eksempel 8 ble gjentatt med Salmonella som bærer porinprotein. Man fikk kompleks med den karakteristiske struktur som er vist på fig. 2 og 3.

Eksempel 10

Epitelnyreceller fra katt, som er infisert med felint leukemivirus behandles med fremgangsmåten ifølge eksempel 1. Man fikk kompleks med den karakteristiske struktur som fremgår av fig. 2 og 3.

Eksempel 11

Epitelnyreceller som var blitt transformert med bovint leukemivirus ble behandlet ved fremgangsmåten ifølge eksempel 1. Man fikk kompleks med den karakteristiske struktur som fremgår av fig. 2 og 3.

Eksempel 12

Parainfluensa-3-virus U 23 ble renset og proteinkomplekset fremstilt ifølge fremgangsmåten i eksempel 1, med den forskjell at sakkarosegradienten TN fra 20 til 50 vekt% inneholder annen saponin enn Quil A. To kommersielt tilgjengelige saponiner ble undersøkt, Merck "Weiss", rein 5140023 og Sc. Lickardt "S", Schuchardt, München. (Saponiner i ren form. Fabrikanten vil ikke oppgi produktets type. De adskiller seg ved tynnsjiktkromatografi fra Quil A). Et kompleks ble dannet som hadde en sedimentasjonskoeffisient på 24 S, som hadde samme struktur som det ifølge eksempel 3 fremstilte kompleks.

Eksempel 13

5 mg meslingvirus ble oppløseliggjort i henhold til eksempel 3, og applisert på ionebyttere av typen DEAE cellulose. Ionebyttere ble oppbevart i en kolonne rundt 20 ml, og ble justert med 0,01 fosfatbuffer, pH 7,2, 0,5 vekt% oktyl-β-D-glykosid. Prøvematerialet ble applisert i ioneutbytteren og ikke-adsorbert materiale bortvasket etter gjennomskylling av 5 pelarvolum 0,01 molar fosfatbuffer, pH 7,2, 0,5 vekt% oktyl-β-D-glykosid, hvorpå adsorbert material ble eluert etter tilsetning til kolonnen av en saltgradient mellom 0 og 0,5 molar NaCl oppløst i 0,01 molar fosfat, pH 7,2, 0,5 vekt% oktyl-β-D-

glykosid. Fraksjoner hvori meslingmembranproteinet ble identifisert ble slått sammen og ble tilsatt Quil A til 0,1 vekt%, ble dialysert mot 0,05 molar ammoniumacetat, pH 7,0. Man fikk komplekser med den karakteristiske struktur som fremgår av fig. 1 og 2.

Eksempel 14

22 nm partikler av Hepatitis B-virus oppnådd fra London School of Tropical medicine and Hygiene (England) ble resuspendert til en konsentrasjon på 1 mg/ml i TN. 0,3 mg protein av 22 nm partikler ble oppløseliggjort i 2 volum-% "Triton X-100", 0,5 molar NaCl og inkubert i 16 timer ved 37°C. Fortsetningsvis gjentas fremgangsmåten ifølge eksempel 1. Det dannede kompleks hadde en sedimentasjonskoeffisient på 20 S. Det ble oppnådd et kompleks som ved elektronmikroskopets undersøkelse viste en struktur slik det fremgår av fig. 4. Denne struktur avviker på den på fig. 1 viste struktur ved at den består av deler av denne struktur.

Eksempel 15

3 mg borint diarrevirus (B DV) oppløst i TN ble oppløseliggjort ved tilsetning av "Triton X-100" til 1 volum-%. Blandingen ble omrørt i 2 timer ved værelsestemperatur. Slik solubilisert virus ble applisert på en lektinkolonne bestående av lektinet "Lentil" immobilisert til "Sepharose 4 B" (Pharmacia, Uppsala). Kolonnen ble justert med TN og etter at virusmaterialet ble innført i kolonnen vasket med 5 pelarvolum TN inneholdende 0,1 volum% "Triton X-100" etterfulgt av 10 pelarvolum TN. Virushylseproteinet deadsorberes fra kolonnen tilføres elueringsbuffer bestående av 0,2 molar metyl-α-D-mannosit, 0,5 vekt% oktyl-ß-D-glykosid oppløst i TN. Fraksjonene inneholdende virushylseproteiner ble samlet samt tilført Quil A til 0,1 vekt%. Blandingen ble dialysert mot 0,05 molar ammoniumacetat, pH 7,0 ved 4°C i 3 døgn med 3 bufferbytter rundt 1 liter.

Sluttproduktet ble lyofilisert og ved elektronmikroskopering ble det oppnådd "komplekse" strukturer som utgjøres av deler av komplekset på fig. 4. Denne tilberedning hadde en sedimentasjonskoeffisient på 20 S.

Eksempel 16

Poliovirus avlives med formalin og renses med kjent metodikk, eksempelvis ved ultrasentrifugering etterfølgende av gelkromatografi i "Sepharose" (Pharmacia Uppsala, Sverige), og endelig en tetthetssentrifugering i cesiumklorid.

Virus solubiliseres i en egnet buffer, f. eks. TN som inneholder et solubiliseringsmiddel f. eks. 2 % SDS (sodium dodecyl sulfat) som ble oppvarmet til 90°C i 2 minutter. Virusproteinene ble separert elektroforetisk i en 13 % polyakrylamidgel inneholdende 0,1 % SDS. Proteinet i gelen ble identifisert etter fargning med Coomassie Blue R 250, VP-3 er et av virusproteinene med en molekylvekt på ca. 26 000 dalton. Dette virusproteinbånd ble skåret av geleen og ekstrahert fra gelen med transversell elektroforese.

Det ekstraherte material ble oppløst i TN inneholdende solubiliseringsmiddelet 2 % "Triton X-100". Denne blanding ble deretter anvendt for å fremstille proteinkomplekset (iscomer) i henhold til sentrifugeringsmetodens eksempel 1. I elektronemikroskopisk undersøkelse har preparatet den karakteristiske struktur som fremgår av fig. 3.

Eksempel 17

Renset poliovirus som er avlivet med formalin ble oppløst i 67 volum % eddiksyre inneholdende 0,1 mol $MgCl_2$. Virusmaterialet ble ultrasentrifugert deretter i 1 time ved 100 000 g, og supernantanten som inneholdt bare virusproteiner ble oppbevart og dialysert i nærvær av 0,1 vekt% Quil A mot 0,01 molar tris, 0,14 molar NaCl, pH 7,4.

Det dannede kompleks har samme struktur som de ifølge eksempel 3 fremstilte kompleks.

Eksempel 18

Ytre membranproteiner av Neisseria meningitidis ble oppnådd frysetørket fra National Institute of Helath, Nederland og oppløst i TN inneholdende 2 vekt% oktyl-β-D-glykosid og 0,1 vekt% Quil A og behandlet på samme måte som i eksempel 4. Man fikk kompleks med en sedimentasjonskoeffisient på 20 S, målt på samme måte som i eksempel 2.

Eksempel 19

Peptid med hydrofobe aminosyrer. Munn- og klovsykepeptid 144 - 159 O kalvbenren. VP 1 fremstilles med 0,1,2,3 respektiv 4 tyrosin påkoblet på den ene enden (oppnådd kommersielt) ble anvendt. Peptidet ble oppløst i minimal mengde 67 volum% eddiksyre, nøytralisert med 25 % ammoniakk og fortynnet til 0,5 molar ammoniumacetat, med Ag. dest. (detergent til 2 % sluttkonsentrasjon). 0,1 % glykosid ble tilsatt og blandingen dialysert mot 0,05 molar ammoniumacetat, pH 7 (dialyseslange Spectra Por 6 MWCO 1000).

Mus ble vaksinert 2 ganger med 50 µg, 2 ukers mellomrom.

Peptid/antall dyr	Elisa-verdi (antistoffer) andre tapping
0	0,005
1	0,217
2	0,311
3	0,347
4	0,346

At kompleks er dannet kan vises ved elektronmikroskopi (se fig. 5) der en sfærisk elektrontett partikkel er sett med lengden 20 - 40 nm og bredden 10 nm. Avvikende størrelser sees også.

På fig. 5a vises EM-bildet av peptidet koblet til tre tyrosin og på fig. 5b EM dannet av peptidet koblet til fire tyrosin.

Eksempel 20

IgG fra mus renset i henhold til kjente metoder (Van den Branden, M. de Coen, JL, Kanarek, L og Ruyschaert (1981) og Molecular Immonology 18, side 621 - 631 (1981)) eller E anriket med ammoniumsulfatoppløsning (Conradie J. E. Govender M, Visser L, J. of Immunological Methods, vol. 59, side 289 - 299. 1983) ble dialysert natten over mot 1 liter 0,15 molar fosfatsitrat (PC) buffer, pH 2 i kjølerom. Deretter ble det tilsatt 2 % detergent (f. eks. oktyl-β-D-glukosid). Anvendes en detergent som har en lav kritisk micellær konsentrasjon (CMC) bør detergentbytte

skje i dialysens start. Blandingen dialyseres mot PC pH 7. En time deretter tilsettes Quil A ved en sluttkonsentrasjon på 0,05 %, og dialysen fortsettes mot PC, pH 7 i 1 døgn i kjølerom.

Blandingen av kompleks påvises ved sentrifugering gjennom en 5 - 30 %-ig sakkarosegradient 3,3 timer ved 40 000 omdreininger pr. minutt i en Beckmann SW-60 rotor. Komplekset detekteres i gradienten ved hjelp av en Elisa-teknikk.

Eksperiment 1.

Sammenligning mellom den immunogene effekt hos membranproteinkompleks fremstillet med Quil A ifølge oppfinnelsen og tilsvarende membranproteinceller fremstilt uten glykosid-tilsetning.

25 mus (BALB C, Bomhollgard, Danmark, vekt ca. 20 g) ble oppdelt i 5 grupper og gruppene immunisert to ganger med tre ukers intervall med resp. bare bufferoppløsning (PBS) 0,1 µg, 0,5 µg resp. 5 µg av komplekset fremstillet ved membranproteinet fra influensa Quil A i 100 µl PBS i henhold til eksempel 1 samt med 50 µg membranproteinmiceller unten glykosid, fremstilt ifølge EPC-søknad 81102213.6.

Serum ble oppsamlet hver uke fra mus til forsøkets avslutning. Immunsvaret måltes i serum med Elisa-teknikk. Voller, Bidwell og Bartlett 1980 Enzym-linkes Immunosorbent Assay side 359 - 371. I manual of Clinical Immunology, American Society of Microbiology, Washington.

Resultatet fremgår av fig. 6. Det fremgår at det med Quil A fremstilt antigenkomplekset gir bedre immunsvar enn tilsvarende proteinmiceller uten tilsetning av Quil A. 0,1 µg av det med Quil A fremstilte proteinmembrankompleks induserer et høyere immunsvar enn 5 µg av proteinmicellene uten tilsetning av glykosidet.

Eksperiment 2.

Sammenligning mellom immunogen effekt og bivirkning hos membranproteinkompleks fremstilt med Quil A ifølge oppfinnelsen og tilsvarende membranproteinmiceller blandet med glykosidet som adjuvans-tilsetning.

30 marsvin fra SVA-oppdrett (Statens veterinærmedisinske anstalt) har inngått i forsøket. De er fordelt på fem grupper og 6 dyr, og ble vaksinert med proteinmiceller (P) fra influensavirus (stamme Solvalla) resp. membranproteinkompleks fra samme influensavirus fremstillet med glykosid Quil A (GP) i henhold til tabell 1. Fremstillingen ifølge eksempel 2. Seks marsvin inngikk som uvaksinerte kontroller. GP-komplekset var befridd fra fri glykosid ved sakkarosegradient-sentrifugering. Resultatet fremgår av tabell 1. P-miceller liksom GP-kompleks gir minimale reaksjoner og PG-kompleks påtagelig høyere antilegemesvar enn T-miceller. Blanding av 10 µg fri glykosid med P-miceller gir grunn til svake reaksjoner men ingen adjuvanseffekt. Tilsetning av 100 µg fri glykosid gir sterke lokale reaksjoner i form av rødming og svulming og en høyere antistoffsvar enn P-micellvaksine uten fri Quil A.

Tabell 1

Immunsvaret mot influensavirus i marsvinserum målt med hemmagglutinasjonsinhibisjon (HI)-prøve etter to vaksinasjoner med 4 ukers intervall. Sera er tatt 10 dager etter andre vaksinering.

P = 1 g proteinmicell bestående av influensavirus-peplomerer (H og N).

P + 10 = 1 g proteinmiceller + 10 g fri glykosid.

P + 100 = 1 g proteinmiceller + 100 g fri glykosid.

GP = 1 g proteinkompleks fremstillet med glykosid inneholdende under 0,1 g fri glykosid.

\- ingen reaksjon

\+ svak rødming

\+ + måtlig rødming

+++ sterk rødming og nekroser.

HI-titer (^{2}log/1)	P	P + 10	P ± 100	GP
M ± SD 6 dyr	7,9 ± 2,3	7,5 ± 1,5	10,3 ± 3,1	9,7 ± 0,6
Lokal reaksjon	-	+	+++	-

1) Ikke vaksinerte marsvin hadde titer 2 (6 dyr).

Eksperiment 3.

Membranproteinkompleks fremstilt i henhold til eksempel 1 og ytterligere renset med sentrifugering gjennom en 10 - 40 %-ig sakkarosegradient ble undersøkt på immunogen effekt. Dette preparat har ingen påvisbare mengder av fri Quil A (under 0,02 vekt%) målt med en metodikk basert på Quil A lytiske aktivitet. Den lytiske aktivitet ble undersøkt på bovine røde blodlegemer. Blodlegemene var innstøpt i en agarosegel med en konsentrasjon på 0,05 %. Agarosegelen ble plassert i et elektroforetisk system hvor Quil A beveger seg mot anoden og lyserer blodcellene. Den lyserede sone hadde formen av en rakett og mengden glykosid er proporsjonalt med lengden på raketten og gjorde synlig ved proteininnfargning med Coomasie Brilliant Blue. Denne metode kan bestemme en konsentrasjon på 0,02 % glykosid eller mer (Sundquist et al, Biochemical and Biophysical research communications, vol. 114, side 599 - 704, 1983).

Ved sedimentasjonshastighetsanalyse har det ytterligere rensede material samme sedimentasjonskoeffisient som ikke renset materiale. Ved elektronemikroskopering iakttoks partikler med samme morfologi (se fig. 2 og 3). Ved vaksinering av mus var det materialet like aktivt som ikke-renset material ved stimulering av antistoffets svar. I et eksperiment var 1 µg resp. 0,1 µg kompleks av influensavirusproteinkomplekset fremstillet med Quil A tilsetning, renset gjennom to gradientsentrifugeringer i henhold til det overnenvte, like effektivt som tilsvarende ikke ytterligere renset materiale. Ovenstående resultat viser at kompleksene er stabile, og effektiv immunogene uten påvisbare mengder av fri Quil A.

Eksperiment 4.

Tre forskjellige vaksiner med Hepatitis Bs (HBs) antigen ble undersøkt hver og en på 4 mus med en dose rundt 5 µg HBs antigen. De tre vaksinene var iscomer fremstilt i henhold til eksempel 14, intakte 22 nm partikler som tilsvarte et kommersielt tilgjengelig vaksine og en eksperimentell vaksine hvor tilsvarende HBs-proteiner foreligger i micellform, fremstilt i henhold til EPC-søknad 81102213,6. Antistoffsvaret er utvurdert med Elisametodikk.

Tabell 2

Antistoffsvar i museserum mot HBs antigen målt med Elisa.

Iscomer	22 nm partikler	miceller
1,343	0,603	0,569
1,788	0,598	0,240
1,841	0,888	0,273
1,884	0,892	---

Elisa-ekstinksjonsverdi ble avlest ved 495 nm.

Av tabell 2 fremgår at mus immunisert med iscomer svarte med betydelig høyere antistofftitrer enn HBs vaksiner inneholdende intakte 22 nm partikler eller miceller.

Eksperiment 5.

I et vaksinasjonsforsøk med prøveinfeksjon av en patogen rabiesstamme (CVS) har iscomer blitt fremstilt i henhold til eksempel 4 inneholdende hylsterproteiner fra rabiesvirus prøvet på mus. Musene ble vaksinert en gang med dosene i henhold til tabell 3. Musene prøveinfisertes 14 dager senere med den musepatogene CVS-stamme i en dose 40 ganger LD_{50}.

Tabell 3

Vaksinasjonsdose (µg)	overlevende/totalt antall dyr
4,2	18/19
0,84	15/18
0,17	10/20
---	0/20

Av tabellen fremgår av iscomvaksine gir grunn til beskyttende immunitet.

De nye antigene komplekser ifølge oppfinnelsen kan lagres som lyofiliserte tilberedninger eller som vannsuspensjoner. Før administrering foreligger de hensiktsmessig i et oppløsningsmiddel som f. eks. fysiologisk kokesaltoppløsning. Fortrinnsvis anvendes 0,1 molar NaCl-oppløsning, pH 7,2 - 7,6. pH-verdien ble justert med 0,05 M tris-HCl. Andre buffere kan imidlertid også anvendes.

De nye proteinkomplekser ifølge oppfinnelsen har en sterkere immunogen effekt, ca. 10 ganger og ofte mer enn proteinmiceller som ikke fremstilles med glykosid, og som ikke er blandet med noe adjuvans. Hvis tilsvarende proteinmiceller skal få samme immunogene effekt ved samme proteindose må de

blandes med så meget glykosid eller annen adjuvans at bieffektene ble alt for stort.

Proteinkomplekset ifølge oppfinnelsen behøver ikke blandes med noe adjuvans, og derved nedsettes bieffektene. De nye komplekser er videre stabile til forskjell fra antigene proteiner bundet til liposomer.

Patentkrav

1.

Fremgangsmåte til fremstilling av et immunogent kompleks inneholdende antigene proteiner eller peptider med hydrofobe regioner idet komplekset har en åpen sfærisk struktur bestående av sirkulære underenheter eller deler av den sfæriske struktur, idet komplekset og delene herav vanligvis har en lavere sedimentasjonskonstant enn tilsvarende miceller og høyere sedimentasjonskonstant enn tilsvarende monomer form av protein eller peptid, karakterisert ved at det oppnås ved å blande minst en del av gruppen bestående av mikroorganismer inneholdende amfipatiske proteiner eller peptider med hydrofile og hydrofobe grupper eller slike proteiner eller peptider, eller dyreceller infisert med slike mikroorganismer, idet det dannes komplekser mellom amfifatiske antigene proteiner eller peptider, og solubiliseringsmidler, hvoretter de amfifatiske antigene proteiner eller peptider adskilles fra solubiliseringsmidlet i nærvær av eller er adskilt fra solubiliseringsmidlet og direkte overført til en oppløsning inneholdende minst et glykosid med hydrofobe og hydrofile regioner i en konsentrasjon på minst den kritiske micelle-konsentrasjon, idet komplekset kan fremstilles ved at

(a) mikroorganismene, cellene eller hydrofobe peptider eller proteiner blandes med solubiliseringsmiddel valgt blant et ionisk, ikke-ionisk, Zwitter-ionisk, gallesyredetergent, alkoholer, små amfifatiske molekyler, vannoppløselige peptider eller proteiner og blandinger herav i bufret, eventuelt saltholdig oppløsning, blandingen helles over en solubiliseringsmiddelholdig sukkergradient, som ligger over en glykosidholdig sukkergradient, hvorved den solubiliseringsmiddelholdige sukkergradienten inneholder sukker med en konsentrasjon lik eller lavere enn konsentrasjonen i den glykosidholdige sukkergradients øvre sjikt, fortrinnsvis 5-25 vekt-%, spesielt 15 vekt-%, og solubiliseringskonsentrasjonen holdes ved 0,25-3 vekt-%, fortrinnsvis 0,75-1,5 vekt-%,

spesielt i vekt-%, og den glykosidholdige sukkergradient hvis begynnelseskonsentrasjon er ved minst 5 vekt-%, fortrinnsvis 15-25 vekt-% og sluttkonsentrasjonen er minst 20 vekt-%, fortrinnsvis 45-60 vekt-%, glukosidinnholdet er ved minst 5, fortrinnsvis minst 7-12 ganger CMC, og sentrifugeres ved minst 100.000 g, den proteinholdige fraksjon isoleres, dialyseres mot bufferoppløsningen,

b) eller at mikroorganismene, cellene eller proteinene eller peptidene etter at de er blandet med solubiliseringsmidlet i bufret saltoppløsning tilføres glukosid og dialyseres mot fortrinnsvis ammoniumacetatbuffer eller has direkte over på en gradient og sentrifugeres ved minst 100.000 g, hvoretter de proteinholdige fraksjoner oppbevares, tilføres glukosid og dialyseres mot buffer, fortrinnsvis ammoniumacetat eller en blanding av mikroorganismer, celler eller proteiner eller peptider, og solubiliseringsmiddel i bufret eller den proteinholdige toppfraksjon som fåes når blandinger av mikroorganismer, celler og proteiner og peptider og solubiliseringsmiddel i bufret saltoppløsning sentrifugeres gjennom en gradient, separeres elektroforetisk eller

c) kromatografisk fra solubiliseringsmidlet oppsamles i en oppløsning inneholdende glukosidet, hvoretter det dannede proteinkompleks eventuelt konsentreres f.eks. ved lyofiliser-ing, vakuumdialyse eller ultrasentrifugering eller renses ytterligere ved gradientsentrifugering.

2.

Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t av e d at det anvendes glukosid fra triterpensaponiner.

3.

Fremgangsmåte ifølge krav 2, k a r a k t e r i s e r t v e d at det anvedes triterpensaponiner valgt fra gruppen Quillaja saponaria Molina, Aesculus hippocastanum eller Gypsophilla struthium.

4.

Fremgangsmåte til fremstilling av et immunogenkompleks ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at det anvendes oppløsning inneholdende solubiliseringsmiddel og sukker, sukker ved en konsentrasjon ikke høyere enn konsentrasjonen i det øvre lag av den triterpensaponinholdige sukkergradient og konsentrasjonen av solubiliseringsmidlet holdes ved 0,25-3 vekt-%.

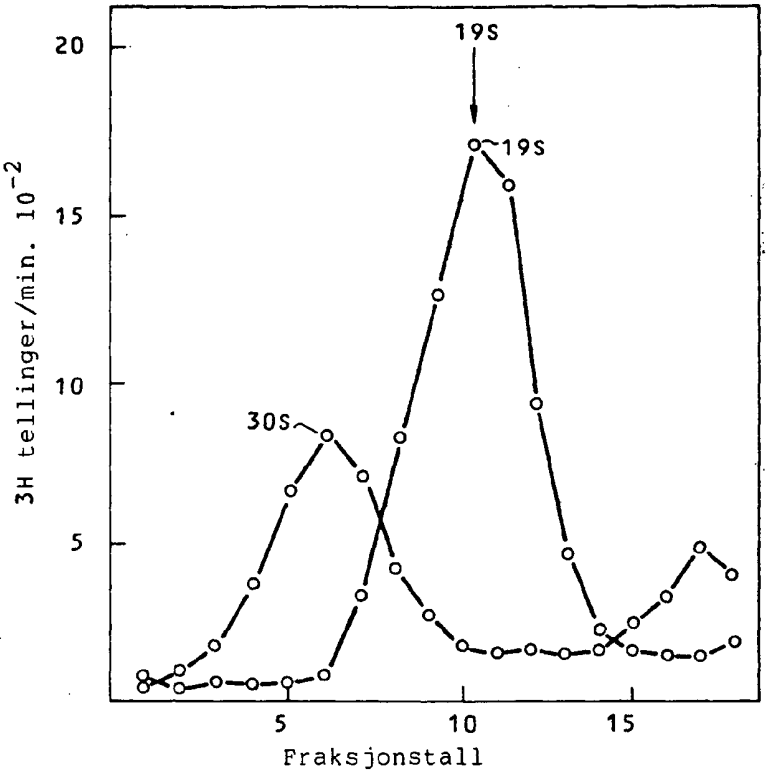

19S
19S
30S
20
15
10
5
3H tellinger/min. 10^{-2}
5
10
15
Fraksjonstall

FIG.1

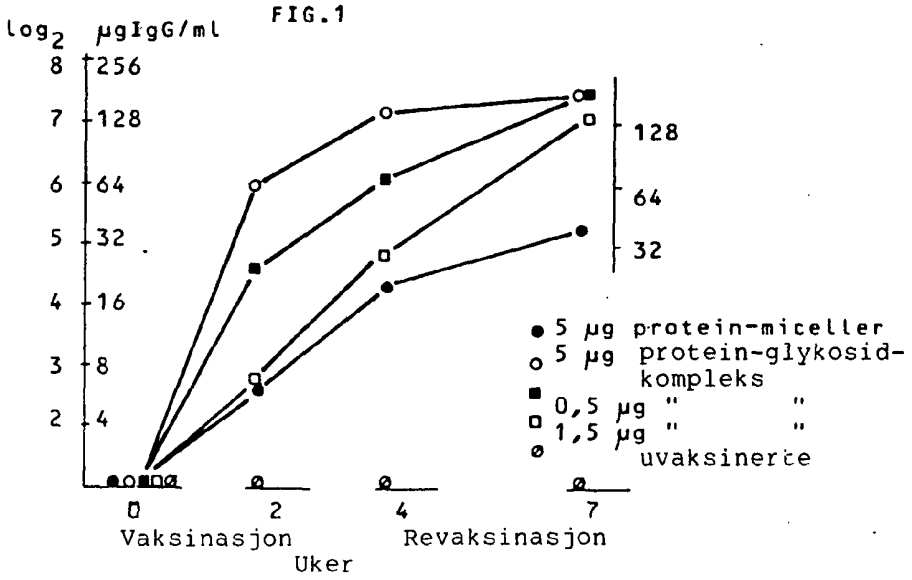

$\log_2$ µgIgG/ml
8 256
7 128
6 64
5 32
4 16
3 8
2 4
128
64
32
● 5 µg protein-miceller
○ 5 µg protein-glykosid-kompleks
■ 0,5 µg " "
□ 1,5 µg " "
ø uvaksinerte
0
2
4
7
Vaksinasjon
Revaksinasjon
Uker

FIG. 6

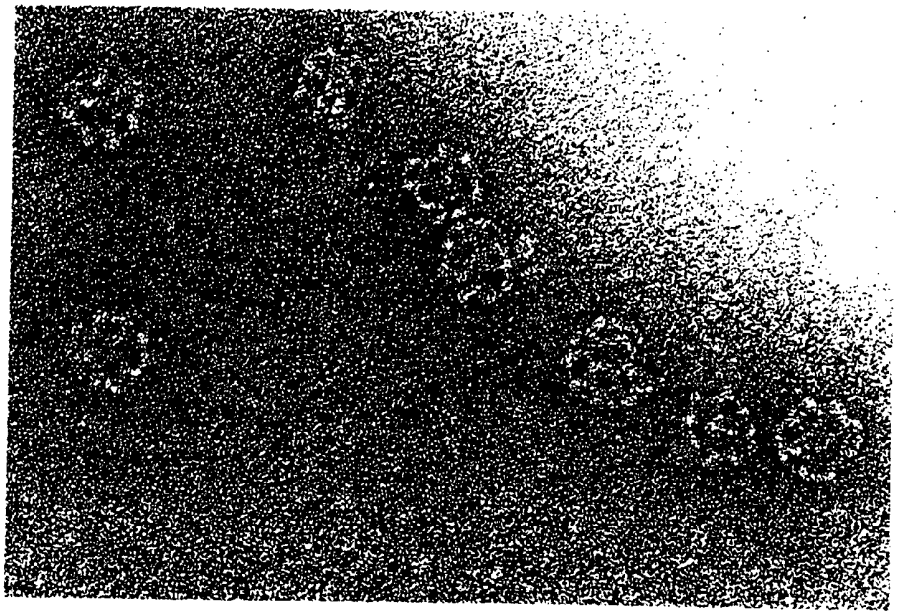
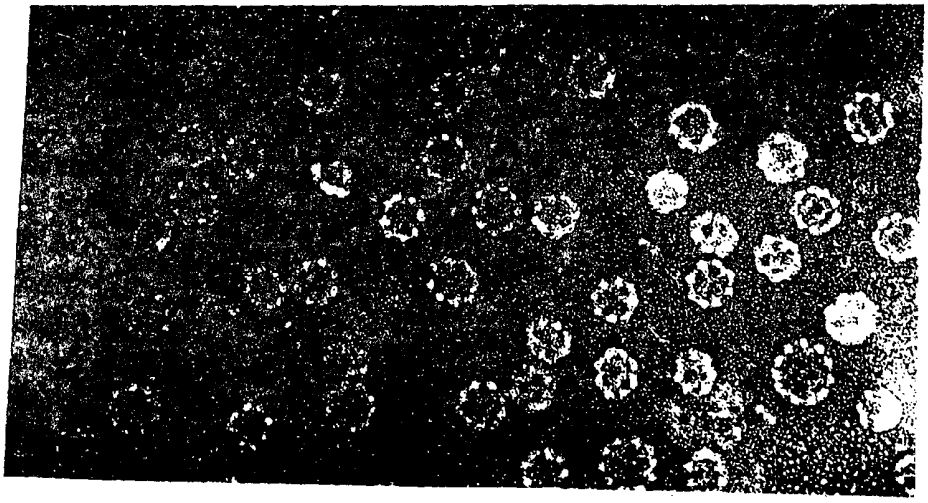


FIG. 2

FIG. 3



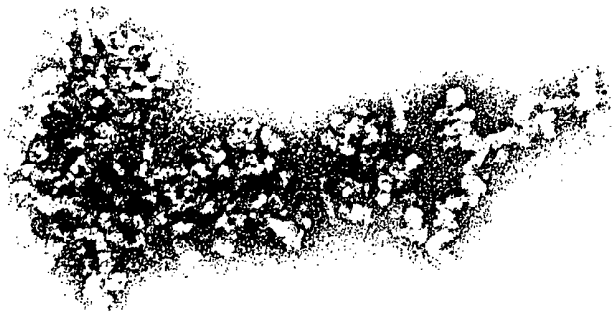


FIG.4



FIG.5A

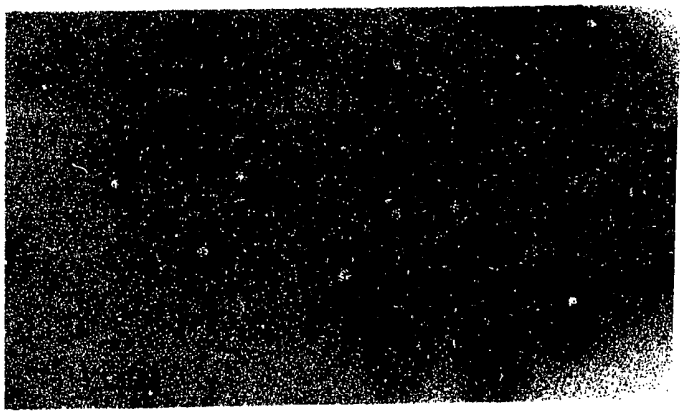


FIG.5B