



AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP A 61 K / 261 092 6	(22)	21.03.84	(44)	07.08.85
------	-----------------------	------	----------	------	----------

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, 1086 Berlin, Otto-Nuschke-Straße 22/23, DD

(72) Grimmecke, Hans-Dieter, Dr. rer. nat.; Grabert, Anton, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem., DD

(54) Verfahren zur Herstellung von Zelloberflächen-Antigenen aus Pilzen

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung hochwirksamer Antigene der Pilze zum sicheren Nachweis humoraler und zellulärer Antikörper im Blutserum und zur Gewinnung toxinfreier Impfstoffe gegen generalisierte Pilzinfektionen. Durch die Erfindung können die kommerziellen Testsysteme verbessert, d. h. empfindlicher und sicherer gestaltet werden. Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt erstmals eine Optimierung zwischen Antigenausbeute und Wirksamkeit und ist zur Gewinnung aller Pilzantigene anwendbar. Zelloberflächen-Antigene aus Pilzen werden in serodiagnostischen Laboratorien der Kliniken und Krankenhäuser benötigt.

Titel

Verfahren zur Herstellung von Zelloberflächen-Antigenen aus Pilzen

Anwendungsgebiet der Erfindung

- 5 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Antigenherstellung zum serologischen Nachweis von Mycose-Antikörpern im Blutserum sowie eines Impfstoffes gegen generalisierte Pilzinfektionen und ist in die IPK A 61 k einzuordnen.

10 Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Die bisher als Reagentien hergestellten Antigene sind aus nachfolgend genannten Gründen für serodiagnostische Zwecke ungeeignet:

1. Der Gehalt an wirksamen Antigenen ist zu gering.
- 15 2. Der Gehalt an wirksamen Antigenen ist sehr unterschiedlich in den Chargen auch bei Anwendung nur eines Extraktionsverfahrens.

3. Verschiedene Extraktionsverfahren liefern unterschiedlich zusammengesetzte Antigenchargen.
4. Proteine werden bei allen bisherigen Verfahren modifiziert und denaturiert.
- 5 Die Reproduzierbarkeit zur Gewinnung brauchbarer Antigenchargen ist schlecht und die Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen klinischen Einrichtungen wegen Verwendung unterschiedlicher Pilzstämme und Extraktionsverfahren nicht gegeben.
- 10 Die wichtigsten Verfahren zur Gewinnung von polysaccharidhaltigen Pilzantigenen sind:
 1. -Naphthol- bzw. Phenol-Extraktion
DD-WP 113843
 2. Extraktion mit Wasser bzw. Puffern unter Erwärmung
 - 15 NAKAJIMA, T. u. BALLOU, C.E.: J. Biol. Chem. 249
(1974) 7679-7684
 3. Alkalische Extraktionsverfahren
BISHOP, C.T., BLANK, F. u. GARDNER, P.E.: Can. J. Chem. 38 (1960) 869-881
 - 20 4. Desintegration der Biomasse und Gewinnung wasserlöslicher Antigene (Zellinhaltsantigene, somatisches Antigen)
BIGUET, J., TRAN VAN KY, P., FRUIT, J. u. ANDRIEU, S.: Mycopathol. et Mycol. Appl. KEVI (1964) 241-256
 - 25 5. Ausfällung von löslichen Antigenen aus dem Kulturfiltrat (metabolisches Antigen)
HEARN, V.M., WILSON, E.V., PROCTOR, A.G. u. MACKENZIE, D.W.R.: J. Med. Microbiol. 13 (1960) 451-458

Die unter den Punkten 1 und 5 genannten Verfahren liefern zwar häufiger brauchbare Chargen, jedoch gestatten die Ausbeuten von durchschnittlich 0,3% bzw. 1 - 10 mg/l Kulturfiltrat keine Gewinnung in größeren Mengen.

Alle weiteren Verfahren liefern aufgrund geringer Selektivität größere Mengen an Antigenen, jedoch werden die Proteinanteile denaturiert (Verfahren 2 und 3) und es sind Nukleinsäuren und andere unerwünschte Stoffe enthalten (2 und 4).

Ein Verfahren, welches die Gewinnung großer Mengen an Antigen gestattet, beruht auf der Ausnutzung der Kreuzreaktivität der Immunseren mit Antigenen gleichen Serotyps unter Verwendung eines apathogenen Stammes, DD-WP 137403.

Ein Impfschutz gegen generalisierte Pilzinfektionen (z.B. gegen *Candida albicans*) ist gegenwärtig noch nicht möglich. Jedoch gibt es erste Fortschritte durch die Anwendung von *Candida albicans*-Ribosomen im Tierexperiment (SEGAL, E. u. SANOVSKY-LOSTICA, H.: *Sabouraudia* 19 (1981) 267-273).

Ziel der Erfindung

Die Erfindung hat das Ziel, mit geringem Aufwand hochantigene Zelloberflächenmaterialien von Pilzen zu gewinnen. Diese Antigene müssen für serodiagnostische Zwecke frei sein von den nicht-antigen wirksamen und störenden Zellinhaltsstoffen; für Impfzwecke dürfen keine toxischen Stoffe enthalten sein.

Wesen der Erfindung

Aufgabe der Erfindung ist es, ein Verfahren zu entwickeln, mit welchem man durch spezielle Verfahrensschritte Zelloberflächenantigene von der Zelloberfläche ablöst, ohne dabei die Zelle zu zerstören.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß man die Biomasse, welche auf Agarnährböden bzw. in Flüssigkultur gebildet wurde, erntet, falls erforderlich wäscht, in wäßriger Lösung suspendiert und
5 anschließend mechanisch beansprucht. Diese mechanische Beanspruchung erfolgt durch Energieeintrag mittels Ultraschall, durch Vibration, durch Schütteln mit Glaskügelchen, durch Rührung u.ä. Überraschenderweise wurde gefunden, daß durch Steuerung dieses Pro-
10 zesses einerseits selektiv hochantigene nichttoxische Stoffe von der Zellwand der Organismen abgelöst wurden, andererseits die Viabilität der Organismen kaum beeinträchtigt wird. Durch Verwendung von Salzen, Detergentien, Lösungsmitteln und anderen chemischen
15 Zusätzen kann dieser Prozeß zusätzlich gesteuert werden. Nach Abtrennen der Mikroorganismen durch z.B. Zentrifugation werden niedermolekulare Verbindungen von hochmolekularem Antigen abgetrennt, das Antigen durch Ausfällen mit wassermischbaren organischen Lö-
20 sungsmitteln, die Nichtlöser für das Antigen sind, bzw. durch Gefriertrocknung u.ä. gewonnen. Das Verfahren erlaubt erstmals eine Optimierung zwischen Ausbeute und Wirksamkeit der Antigene und ist generell zur Gewinnung von Pilzantigen anwendbar.
25 Die erfindungsgemäß hergestellten Antigene unterscheiden sich von den durch herkömmliche Extraktionsmethoden gewonnenen Antigenen sowohl hinsichtlich ihres Protein- und Phosphatgehaltes als auch hinsichtlich ihrer Zuckerszusammensetzung. So enthält ein aus *Candida*
30 *albicans* durch Citratextraktion gewonnenes Produkt 1,1% P und 46% Protein, das aus einem Teil des gleichen Ausgangsmaterials erfindungsgemäß gewonnene Antigen dagegen 1,6% P und 11,6% Protein. Hinsichtlich der Zuckerszusammensetzung der beiden Antigene ergibt sich folgendes Bild:

	Mannose	Galaktose	Glucose
Citratextrakt	39,7%	-	1,7%
erfindungsge- mäßes Antigen	67,2%	4,7%	3,0%

- 5 Einen ähnlichen Unterschied findet man auch bei der Auftrennung der beiden Antigene mittels Ultradünnschichtisoelektrofokussierung. Während das durch Citratextraktion gewonnene Antigen mehrere Protein- bzw. Glucoproteinbanden bei unterschiedlichen iso-
- 10 elektrischen Punkten liefert, zeigt das Antigen, das gemäß dem beschriebenen Verfahren aus dem gleichen Ausgangsmaterial gewonnen wurde, praktisch nur eine Bande, die sich in der Densitometrie als weiter aufspaltbar erweist.
- 15 Das erfindungsgemäß hergestellte Antigen erwies sich bei Immunisierungsuntersuchungen an Mäusen im untersuchten Bereich als nichttoxisch.
- Die Erfindung wird in den nachfolgenden Beispielen näher beschrieben.

20 Beispiel 1:

- 10 g Feuchtbiomasse der Hefe *Candida albicans* werden in 30 ml 0,15 M Kochsalzlösung suspendiert. In diese Suspension wird in einem Glasgefäß Ultraschall einer Leistung von 200 W 1 bis 2 Minuten bei 0 °C eingetra-
- 25 gen, wobei die Temperatur während der Beschallung 5 °C nicht übersteigen darf. Anschließend werden die Zellen in einer Kühlzentrifuge abgetrennt und der erhaltene klare Überstand im Kühlraum bis zur Kochsalzfreiheit gegen destilliertes Wasser dialysiert.

Anschließend wird das salzfreie Material im Vakuumrotationsverdampfer bei einer Badtemperatur von 20 °C auf 10 ml eingeengt und anschließend lyophilisiert. Es werden 120 mg hochwirksames Zelloberflächenantigen erhalten.

Beispiel 2:

Eine Suspension aus 10 g Feuchtbiomasse der Hefe *Candida albicans* und 20 ml physiologischer Kochsalzlösung, die mit 0,1 M Phosphatpuffer auf pH 7,2 eingestellt wurde, wird in einem Edelstahlgefäß eines Vibrationshomogenisators gerade mit soviel Glaskügelchen (0,1 bis 0,5 mm Durchmesser) versetzt, daß die gesamte Suspension von den Glaskügelchen aufgenommen wird. Man trägt unter Kühlung auf 4 °C 30 Minuten 30 W mittels eines Vibrationshomogenisators in die Zellsuspension ein. Anschließend werden die Glaskügelchen auf einer groben Glasfritte von der Zellsuspension abgetrennt und mit 0,15 M Kochsalzlösung nachgewaschen.

Zur Abtrennung der Hefezellen wird die Suspension 10 Minuten bei 3000 x g zentrifugiert, der klare Überstand abgetrennt und im Kühlraum gegen destilliertes Wasser bis zur Kochsalzfreiheit dialysiert.

Man engt auf ca. 10 ml im Vakuumrotationsverdampfer ein und füllt das hochmolekulare Antigen durch Zugabe des 5-fachen Volumens an Ethanol aus. Das ausgefällte Antigen wird abgetrennt, erneut in destillierten Wasser (ca. 10 bis 15 ml) aufgenommen und durch Eingießen der Lösung in die 10-fache Menge an Ethanol lyophil gefällt. Man saugt ab und trocknet. Es werden 105 mg des Zelloberflächenantigens erhalten.

Beispiel 3:

Eine Suspension von 10 g Feuchtbio­masse der Hefe *Candida albicans* in 100 ml 1 M Harnstofflösung wird unter Kühlung auf 7 °C in einem Becherglas mit einem Labor­rührwerk mittels eines starren Flügelrührers bei 500 U/min gerührt. Im Anschluß daran wird die Biomasse ab­zentrifugiert und der klare Überstand durch Dialyse gegen destilliertes Wasser vom Harnstoff befreit. Die harnstofffreie Lösung des Zelloberflächenantigens wird durch Ultrafiltration auf ca. 10 ml eingengt und lyophilisiert. Es werden 90 mg Zelloberflächenantigen erhalten.

Erfindungsanspruch

1. Verfahren zur Herstellung von Zelloberflächenantigenen aus Pilzen für den klinisch-diagnostischen Gebrauch, dadurch gekennzeichnet, daß man durch Eintrag mechanischer Energie in die wäßrige Suspension der Mikroorganismen hochwirksames Zelloberflächenantigen freisetzt und dieses in bekannter Weise weiter reinigt und gewinnt.
2. Verfahren nach Punkt 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Freisetzung der Zelloberflächenantigene in Gegenwart von Puffersubstanzen, Salzen, Harnstoff oder mit Wasser mischbaren organischen Lösungsmitteln erfolgt.