
Octroiraad



⑫A **Terinzagelegging** ⑪ **9002314**

Nederland

⑲ NL

- ⑤4 **Immunogene complexen, in het bijzonder iscoms.**
- ⑤1 Int.Cl.⁵: A61K39/385, C07G3/00.
- ⑦1 Aanvrager: De Staat der Nederlanden, vertegenwoordigd door de Minister van Welzijn, Volksgezondheid en Cultuur te Rijswijk.
- ⑦4 Gem.: Ir. L.C. de Bruijn c.s.
Nederlandsch Octrooibureau
Scheveningseweg 82
2517 KZ 's-Gravenhage.

-
- ②1 Aanvraag Nr. 9002314.
- ②2 Ingediend 23 oktober 1990.
- ③2 --
- ③3 --
- ③1 --
- ⑥2 --

-
- ④3 Ter inzage gelegd 18 mei 1992.

De aan dit blad gehechte stukken zijn een afdruk van de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en).

Immunogene complexen, in het bijzonder iscoms.

De uitvinding heeft betrekking op immunogene complexen zoals tweedimensionale lamellen met honingraatstructuur en in het bijzonder
5 driedimensionale iscoms, welke opgebouwd zijn uit tenminste een sterol, een saponine en in het geval van een iscom eveneens een fosfolipide alsook eventueel tenminste één, een immuunreactie opwekkend antigeen.

Uit de EP-A- 87.200.035.1 is een werkwijze voor het bereiden van immunogene complexen bekend, waarbij men een antigeen eiwit of peptide
10 in opgeloste of gesolubiliseerde vorm in aanraking brengt met een oplossing, die een detergens, een glycoside met een hydrofoob en een hydrofiel gedeelte, in tenminste de kritische micel-vormende concentratie (CMC), alsmede een sterol bevat, vervolgens het detergens verwijdt en het gevormde immunogene complex zuivert. Indien het gevormde immunogene
15 complex een "iscom"-vorm, d.w.z. een uit subeenheden opgebouwde kooiachtige structuur met een diameter van ca. 35 nm en groter dient te bezitten, dient zich in de bovenvermelde oplossing van het detergens, glycoside en sterol tevens een fosfolipide te bevinden.

Bij de werkwijze volgens deze EP-A past men als glycoside met
20 voordeel saponinen toe, zoals saponinen uit Quillaja saponaria Molina, Aesculus hippocastanum of Gypsophilia struthium. Bij voorkeur past men het produkt "Quil A" toe, zijnde een wateroplosbaar extract uit de bast van Quillaja saponaria Molina (K. Dalsgaard: Saponin Adjuvants III, Archiv für die gesamte Virusforschung 44, 243-254 (1974)). Meer in het
25 bijzonder is Quil A een mengsel van saponinen van de triterpeenklasse. Alhoewel Quil A lipide-complexen e.d. als effectieve antigeen-adjuvantia, in hoofdzaak voor amfifatische antigenen worden beschouwd, wordt de wijze van toediening van dergelijke complexen sterk door de toxiciteit van Quil A beperkt. In dit verband wordt naar voren gebracht, dat name-
30 lijk de toxiciteit van Quil A-houdende immunogene complexen bij toediening via o.a. de intraperitoneale (i.p.) route ongewenst hoog wordt geacht. Deze aan Quil A verbonden toxiciteit is naar alle waarschijnlijkheid tot de hemolytische activiteit van dit produkt terug te voeren.

Uit WO 90/03184 zijn iscom-matrices met een immunomodulerende
35 activiteit bekend. Meer in het bijzonder heeft deze WO-aanvraag betrekking op matrices, welke uit tenminste één lipide en tenminste één saponine zijn opgebouwd. Met voordeel wordt cholesterol als lipide toegepast. Voorbeelden van saponinen zijn in het bijzonder triterpeensaponines, bij voorkeur Quil A of een of meer componenten van Quil A,
40 welke met de aanduidingen B4B, B2 en B3 worden aangegeven. Ten aanzien

9 0 0 2 3 1 4

van de bovenvermelde drie Quil A componenten wordt in de WO 90/03184 vermeldt, dat B⁴B, dat een molgewicht van 1862 bezit, weliswaar met cholesterol iscom-structuren kan vormen maar evenwel geen adjuvans-activiteit bezit, terwijl de B²- en B³-componenten, (molgewichten 1988 resp. 5 2150) welke wel een adjuvans-activiteit bezitten, met cholesterol wel een binding aangaan, maar daarmee geen iscom-achtige structuur vormen; onder adjuvans-activiteit wordt verstaan, dat het middel de antilichaamrespons en/of celgemedieerde immuunrespons bevordert. Derhalve dient volgens deze WO 90/03184 voor het bereiden van een iscom-structuur met 10 cholesterol, welke een adjuvans-activiteit bezit, hetzij totaal Quil A hetzij zowel B⁴B als B² of B³ te worden toegepast.

Daar, zoals bovenstaand reeds vermeld, Quil A een zekere toxische activiteit bezit en de uit WO 90/03184 bekende Quil A componenten niet zowel een iscom-structuur met cholesterol kunnen vormen als een adjuvans-activiteit bezitten heeft aanvraagster naar andere saponinen 15 gezocht, welke een ten opzichte van Quil A sterk afgenomen toxiciteit bezitten alsook een iscom-structuur met adjuvans-activiteit kunnen vormen.

Verrassenderwijs heeft aanvraagster gevonden, dat ondanks de 20 ontmoedigende gegevens van WO 90/03184 er bepaalde Quil A componenten zijn welke aan de bovenbeschreven eisen voldoen.

De uitvinding heeft derhalve betrekking op immunogene complexen zoals tweedimensionale lamellen en in het bijzonder driedimensionale iscoms, welke een adjuvans-activiteit bezitten en opgebouwd zijn uit 25 tenminste een sterol, tenminste een Quil A component zoals onderstaand gedefinieerd en in het geval van een iscom eveneens een fosfolipide alsook eventueel tenminste een, een immuunreactie opwekkend antigeen. Van de onderstaand vermelde Quil A componenten bezit de met QA3 aangeduide Quil A-component de voorkeur, omdat deze zowel een ten opzichte 30 van Quil A sterk verminderde toxiciteit ofwel sterk verminderde hemolytische activiteit bezit alsook in staat is met de uit de stand der techniek bekende algemene bereidingstechnieken de bovenaangeduide tweedimensionale lamellen en iscom-structuren met een adjuvans-activiteit te vormen.

35 In het kader van de uitvinding worden duidelijkheidshalve onder
(a) een tweedimensionale lamel een tweedimensionale structuur met een honingraatopbouw verstaan, welke ten minste opgebouwd is uit een sterol, een saponine en eventueel een antigeen en onder
(b) een iscom een driedimensionale bolvormige kooiachtige structuur met 40 een diameter van 35-200 nm, welke ten minste opgebouwd is uit een

9 0 0 2 3 1 4

sterol, een saponine, een fosfolipide en eventueel een antigeen.

Bij het aan de uitvinding ten grondslag liggende onderzoek van aanvraagster is uitgegaan van gelyofiliseerd Quil A van de firma Iscotec AB, Lulea, Zweden. Dit produkt is op semi-preparatieve schaal in een 23-
5 tal frakties gescheiden. Bij de toegepaste chromatografische methodiek werden de meer lipofiele componenten later in het chromatogram geëluëerd. In het kader van het onderzoek werden deze frakties op hun hemolytische aktiviteit, suikersamenstelling, adjuvans-werking en de capaciteit voor het vormen van "lege" iscoms onderzocht. Tevens werd de
10 adjuvans-werking van PIC3-iscoms (PIC3 = porie-eiwit I van de *Neisseria gonorrhoeae* stam C3) of PIC3-iscom-achtige structuren met een of meer Quil A frakties volgens de uitvinding bepaald.

Uit het onderzoek kwam naar voren, dat de 23 Quil A frakties een stabiel chromatografisch gedrag bezaten. Alhoewel in alle gevallen een
15 enkele hoofdpiek werd verkregen, bleek bij een opnieuw uitgevoerde chromatografische bepaling in een analytische kolom met de aanvankelijk toegepaste stationaire fase/mobiele fase uit de piekvorm, dat in nagenoeg alle frakties waarschijnlijk een of meer bijcomponenten aanwezig waren.

20 Met betrekking tot het uitgevoerde chromatografische onderzoek wordt naar voren gebracht, dat de polaire verbindingen, welke bij het begin van de scheiding elueren en slechts een gering percentage van het totaal vormen, een sterk afwijkend UV-spectrum bezaten ten opzichte van de voornaamste pieken. Derhalve is geen verder onderzoek gepleegd naar
25 de frakties, welke door deze pieken werden aangegeven.

De suikersamenstelling alsook het aglycongedeelte van de Quil A frakties vertonen geen belangrijke verschillen. Anderzijds varieert de relatieve hemolytische aktiviteit sterk. Zoals onderstaand zal blijken varieert deze van 5% tot 150% vergeleken met het totale Quil A produkt.

30 De adjuvans-aktiviteit van de Quil A frakties vertoont geen verband met de polariteit of met de suikersamenstelling. Alle frakties bezitten een adjuvans-aktiviteit. De laagste (QA7) en de hoogste (QA6) waarden van de adjuvans-werking verschillen bijna met een faktor 5.

Wanneer in zijn algemeenheid vaccins parenteraal worden toegediend
35 bestaan deze bij voorkeur uit colloïdale deeltjes, d.w.z. deeltjes met een grootte van minder dan 200 nm. Met deeltjes van een dergelijke grootte is op het einde van het produktieproces op relatief eenvoudige wijze een steriele filtratietrap uitvoerbaar. Bovendien zijn dergelijke suspensies stabiel, zodat een reproduceerbaar effect kan worden gegaran-
40 deerd. Met de algemeen bekende standaard-iscom-bereidingsprocedures

9002314

worden veelal complexen met een gemiddelde grootte van minder dan 200 nm bereid. Verscheidene preparaten met QA-frakties volgens de uitvinding zijn heterogeen, zoals bepaald door elektronenmicroscopie en dynamische lichtverstrooiing, maar al deze preparaten bezaten kleine complexen met
5 een grootte van 50-200 nm. Hieruit kan worden afgeleid, dat het op relatief eenvoudige wijze mogelijk zal zijn meer homogene dispersies met kleine complexen te produceren wanneer het bereidingsproces zelve of de lipidecompositie worden gevarieerd of twee of meer Quil A componenten volgens de uitvinding worden toegepast.

10 De uitvinding heeft in het bijzonder betrekking op de Quil A component QA₃, die een zeer lage hemolytische activiteit bezit en daarboven met sterolen en fosfolipiden in staat is iscoms te vormen. Dergelijke iscoms bezitten een lage hemolytische activiteit en de immunogeniteit ervan is vergelijkbaar met die van conventionele iscoms
15 (d.w.z. totaal Quil A iscoms).

Zoals uit de stand der techniek kan worden afgeleid dienen de saponinen bij de werkwijze volgens de uitvinding in tenminste de kritische micelvormende concentratie (CMC) te worden gebruikt. Aangenomen wordt dat deze concentratie voor Quil A-componenten niet sterk afwijkt
20 van de CMC van Quil A, zijnde ca. 0,03 gew.%.

De sterolen, die in de immunogene complexen volgens de uitvinding kunnen worden gebruikt, zijn de bekende sterolen van dierlijke of plantaardige oorsprong zoals cholesterol, lanosterol, lumisterol, stigmasterol en sitosterol. Bij voorkeur wordt volgens de uitvinding chole-
25 sterol als sterol toegepast.

Als fosfolipiden, die bij de bereiding van iscoms worden toegepast, kunnen fosfatidinezuur en esters daarvan worden gebruikt, zoals fosfatidylcholine en in het bijzonder fosfatidylethanolamine.

Voor de vorming van immunogene complexen, welke van een antigeen
30 eiwit of peptide zijn voorzien, dient dit antigeen eiwit of peptide in water te worden opgelost of daarin te worden gesolubiliseerd. In het algemeen kan men hiervoor niet-ionische, ionische of zwitterionische detertentia toepassen. Met voordeel kan men als detergens octylglucoside en MEGA-10 (decanoyl-N-methylglucamide) gebruiken, doch ook alkylfenyl-
35 polyoxyethyleenethers zijn geschikt, in het bijzonder een polyethyleenglycol p-isooctylfenylether met 9 à 10 oxyethyleengroepen, dat bijvoorbeeld onder de merknaam Triton X-100^R in de handel is.

In de immunogene complexen volgens de uitvinding kunnen willekeurige antigeen eiwitten of peptiden worden opgenomen. Deze eiwitten of
40 peptiden kunnen membraaneiwitten of membraanpeptiden zijn, geïsoleerd

uit virussen, bacteria, mycoplasma's, parasieten of dierlijke cellen. De eiwitten of peptiden kunnen ook synthetisch of met behulp van recombinant DNA-technieken bereid zijn en kunnen ook in gezuiverde vorm in de immunogene complexen worden ingebouwd. Voor de zuivering van een anti-
5 geen eiwit of peptide van natuurlijke oorsprong wordt gewoonlijk naast een ultracentrifugering of dialyse een verdere zuiveringstrap uitgevoerd, bijvoorbeeld een chromatografische zuiveringstrap, zoals op een kolom met DEAE-Sephadex of door middel van immunoaffiniteitschromatografie. Indien de antigene eiwitten of peptiden geen hydrofobe delen
10 bevatten, dienen deze chemisch gekoppeld te worden aan een verbinding met een hydrofoob gedeelte, zoals bijvoorbeeld een lipide e.d..

De bereiding van de immunogene complexen volgens de uitvinding wordt in zijn algemeenheid op zodanige wijze uitgevoerd, dat het opgeloste of gesolubiliseerde antigeen in aanraking wordt gebracht met een
15 oplossing, die het saponine in tenminste de kritische micelvormende concentratie, een sterol en in het geval van een iscom eveneens een fosfolipide bevat. Daarna wordt het detergens verwijderd en het gevormde immunogene complex gezuiverd.

Voor het verwijderen van het detergens kan men in het algemeen de
20 bekende methoden toepassen, zoals dialyse, gradiëntcentrifugering of chromatografie. Bij toepassing van gradiëntcentrifugering en chromatografische methoden, bijvoorbeeld gelfiltratie voor het verwijderen van het detergens, wordt het immunogene complex tevens verregaand van andere stoffen bevrijd, zoals overmaat glycoside en sterol. In het algemeen is
25 een dialyse niet voldoende voor het zuiveren van de immunogene complexen, hoewel door verwijdering van het detergens door dialyse de immunogene complexen wel worden gevormd.

De verkregen oplossingen van de immunogene complexen kunnen desgewenst worden gelyofiliseerd bij aanwezigheid van een cryoprotectant
30 zoals trehalose of lactose. De gelyofiliseerde preparaten kunnen dan voor gebruik door toevoeging van water weer worden gereconstitueerd.

De uitvinding heeft voorts betrekking op farmaceutische preparaten, welke met behulp van de onderhavige uitvinding verkregen immunogene complexen bevatten. Deze preparaten kunnen worden verkregen
35 door de immunogene complexen in een voor parenterale of orale toediening geschikte vorm te brengen. In het algemeen bevatten farmaceutische preparaten, welke parenteraal zullen worden toegediend, de immunogene complexen in een waterig, fysiologisch aanvaardbaar milieu, dat desgewenst een buffer en/of een zout, zoals natriumchloride bevat, ter aan-
40 passing van de osmotische druk.

9 0 0 2 3 1 4

De farmaceutische preparaten volgens de uitvinding vertonen, in het bijzonder bij het toepassen van QA 3 als saponine, een sterk verminderde hemolytische activiteit ten opzichte van de bekende farmaceutische preparaten, waarin het totale Quil A als component aanwezig is.

5

LEGENDA

Fig. 1: Chromatogram van de semi-preparatieve scheiding van Quil A op Supelcone LC-18 semi-prep-kolom. Hierbij stellen de cijfers 1-23 de 23 QA-componenten voor Quil A voor. De aan QA1 voorafgaande pieken worden als verontreinigingen beschouwd. De in deze figuur aangeduide letters A, B, C en D stellen de componenten QA3 (A), QA20 (B) en een tweetal verontreinigingen (C,D) voor; van deze vier componenten worden in Fig. 2a-d het UV-spectrum geïllustreerd.

10

15

Fig.2a-d: UV-spectra van de in Fig.1 weergegeven componenten A, B, C en D.

Fig. 3: Gaschromatogram van het gemethanolyseerde, gesilyleerde QA3-cholesterolmengsel in een CP Sil SCB-kolom (17 m x 0,25 m) (Chrompack, Nederland).

20

25

Fig. 4: Massaspectrum van piek bij 21 min. 6 sec. weergegeven in Fig.3.

Fig. 5: CAD-MS/MS-spectrum van de voornaamste component in de gemethanolyseerde, gesilyleerde QA3-fraktie. Het geselecteerde ion is het geprotoneerde moleculaire ion van de overeenkomstige verbinding in de GC-piek bij 21 min. 6 sec.

30

Fig. 6: Massaspectrum van de piek met een retentietijd van 20 min. 51 sec. weergegeven in Fig.3.

De uitvinding wordt aan de hand van het onderstaand beschreven onderzoek nader toegelicht.

MATERIALEN EN METHODEN

5 Scheidingsprocedure

Gelyofiliseerd Quil A (Iscotec AB, Lulea, Zweden) werd in water (50 mg/ml) gesolubiliseerd. Het mengsel werd op een Supelcosil LC-18 semi prep kolom (Supelco, Bellefonte, PA) (250 x 10 mm) gescheiden. De mobiele fase bestond uit acetonitril in water, dat gebufferd was met 10 mM ammoniumacetaat, pH 6,0. De acetonitrilconcentratie nam in 60 min. van 24 tot 44 vol.% toe. Het debiet bedroeg 2,5 ml/min. De pieken werden bij 206 nm gedetecteerd en automatisch met een Frac 100 fractie-collector (Pharmacia LKB, Uppsala, Zweden) verzameld. De monstergrootte bedroeg 500 µl. Er werden ongeveer 40 scheidingen uitgevoerd, waarbij de overeenkomstige pieken werden verzameld en gevriesdroogd. Het watergehalte van 2 gelyofiliseerde fracties werd met een MCI model VA-05 (Mitsubishi) bepaald. Voor het nagaan van de zuiverheid en stabiliteit van de verzamelde fracties werden alle preparaten opnieuw op een analytische (150 x 4,6 mm) Supelcosil LC-18 kolom gechromatografeerd met dezelfde mobiele fase.

Suikersamenstelling

De algemene suikersamenstelling werd op de in Kamerling J.P. c.s., 1989, Carbohydrates, blz. 175-263, A.M. Lawson (ed.), Clin. Biochem. 1, Mass Spectrometry, W. de Gruyter, New York, beschreven wijze bepaald. Ongeveer 0,5 mg monster werd in 0,5 ml 1,0 M HCl in droge methanol gedurende de nacht bij 85°C gemethanoliseerd. Aan alle monsters werd 100 nmol mannitol als interne standaard toegevoegd. Na de methanololyse werden de monsters met Ag₂CO₃ geneutraliseerd en werd 40 µl azijnzuuranhydride aan de monsters toegevoegd om mogelijk aanwezige N-gedeacetyleerde carbohydraten opnieuw te N-acetyleren. Na 24 uur staan bij kamertemperatuur, waarbij deze van licht afgeschermd waren, werden de monsters gecentrifugeerd, de supernatanten gewonnen en de Ag₂CO₃-pellet twee maal met methanol gewassen. De methanol werd in een Rotavap-distilleerinrichting onder een waterstraalpompp-vacuum bij 35°C verwijderd en de residuen werden gedurende een nacht onder een waterstraalpompp-vacuum bij aanwezigheid van P₂O₅ gedroogd. De suikers werden gesilyleerd door het toevoegen van 100 µl pyridine:hexamethyldisilazaan:chloortrimethylsilaan = 5:1:1 (v/v/v) gedurende een half uur voor de analyse. De monsters werden op een SE 30 WCOT fused-silica capillaire kolom (25 m x

9 0 0 2 3 1 4

0,32 mm) geanalyseerd. Er werd een vlamionisatie-detector toegepast en als draaggas werd stikstof gebruikt. De injectiepoorttemperatuur en detectortemperatuur bedroegen 210°C resp. 230°C. De oventemperatuur nam van 130°C tot 220°C met een snelheid van 4°C/min. toe. Een standaard-
5 mengsel van bekende concentratie werd toegepast voor het bepalen van de aanpassingsfactoren, welke voor de partiële destructie van de suikers corrigeren.

Winnen van het PIC3-eiwit. (PIC3 = porie-eiwit I van de Neisseria
10 Gonorrhoea stam C3).

Op gebruikelijke wijze werd de Neisseria gonorrhoea stam C3 gekweekt. De culturen werden door verwarmen op 56°C gedurende 30 minuten geïnactiveerd. Na centrifugeren werden de geïnactiveerde bacteriën gelyofiliseerd. De isoleringsprocedure voor het porie-eiwit I (PI) was
15 gebaseerd op de procedure, welke door Blake en Gotschlich voor de isolering van porie-eiwit II is gebruikt (J. Exp. Med. 159, blz. 452-462, 1984). De gelyofiliseerde bacteriën werden geëxtraheerd met 2,5 g 3-(N-tetradecyl-N,N-dimethyl-ammonium)-1-propaansulfonaat (Z 3-14) in 0,5 M. CaCl₂ bij pH = 4,0. Na een uur werden intacte cellen en fragmenten door
20 centrifugeren verwijderd (20 min., 20.000 x g). Aan de bovenstaande vloeistof werd ethanol toegevoegd tot een concentratie van 20%. Na 30 minuten werd het neergeslagen materiaal door centrifugeren (20 min., 10.000 x g) verwijderd. De bovenstaande vloeistof werd geconcentreerd door ultrafiltratie (Amicon-holle-vezel-patroon H 10x50); er werd 50 mM
25 Tris. HCl 10 mM EDTA, 0,05% (gew/vol.) Z 3-14, pH = 8,0 (Buffer A) toegevoegd en het volume werd tot de helft gereduceerd. Deze procedure werd vijf maal herhaald om het calciumchloride en de ethanol volledig te verwijderen. Daarna werd de eiwitoplossing op een met buffer A geëquili-
breerde kolom van DEAE-Sepharose gebracht. De eiwitten werden geëluëerd
30 met een lineaire gradiënt van 0,0 tot 0,6 M NaCl in buffer A. De frakties werden geanalyseerd met behulp van SDS-PAGE en de PI bevattende frakties werden samengevoegd. Het gedeeltelijk gezuiverde PI werd op een vooraf met 50 mM Tris. HCl, 200 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0,05% (gew/vol.) Z 3-14, pH = 7,2 geëquilibreerde Sephacryl S-300 kolom gebracht. De PI-
35 bevattende frakties werden samengevoegd. Het verkregen produkt werd als gezuiverd PI aangeduid.

Bereiding van immunogene complexen

Voor het opnemen van PI in iscoms werd de volgende procedure
40 toegepast. Een mengsel van fosfatidylethanolamine type III-A (=PE)

9 0 0 2 3 1 4

(Sigma) en cholesterol in chloroform (gew.verhouding PE:cholesterol = 1:1) werd onder stikstof gedroogd en de verkregen lipidefilm werd vervolgens in een TN-buffer (Tris/NaCl; 10 mM Tris, 140 mM NaCl, pH = 7,4) met 136 mM octylglucoside gesolubiliseerd. Daarna werd PI in de TN-
 5 buffer met 136 mM octylglucoside toegevoegd. De verhouding van lipide (PE + cholesterol) tot proteïne (PI) bedroeg 5:1 (gew/gew). Vervolgens werden totaal Quil A (Iscotec AB, Lulea, Zweden) of de QA-fraktie(s) volgens de uitvinding als een 10%'s oplossing (gew/vol) in water toegevoegd. De verhouding van lipide (PE + cholesterol) tot Quil A of QA-
 10 fraktie bedroeg 1:2 (gew/gew). De lipideconcentratie bedroeg ca. 1 mg/ml. De iscoms werden gevormd door dialyse tegen twee overgangen met een liter TN-buffer gedurende tenminste 24 uur bij 4°C. De iscoms werden van de niet-opgenomen componenten afgescheiden door centrifugeren door een 10 tot 60% sucrosegradiënt in TN-buffer (18 uur, 50.000 x g). Hier-
 15 bij werd de verkregen iscom-band verwijderd.

Voor het bereiden van "lege" iscoms, d.w.z. geen PI-bevattende iscoms, werd de bovenstaande procedure gevolgd, maar met het verschil dat er TN-buffer met 136 mM octylglucoside in plaats van de oplossing van PI in TN-buffer met 136 mM octylglucoside werd toegevoegd.

20

Electronenmicroscop

Er werd een negatieve contrastkleuring uitgevoerd met 2% fosfowolframzuur ($H_3 [P(W_3O_{10})_4]$), dat met KOH op een pH van 5,2 was ingesteld.

25

Proteïnegehaltebepaling

De proteïnegehalten van de iscoms werden via een Bradford-proteïne-assay (Bradford M.M., 1976, Anal. Biochem. 72, blz. 248-254) bepaald. Het proteïne werd door ethanolprecipitatie uit de iscoms afge-
 30 scheiden. Het PIC3 werd in 2% octylglucoside (Sigma Chemical Co., Rockford, Ill, USA) gesolubiliseerd voordat de proef werd uitgevoerd.

Quil A-gehalte-bepaling

35 Quil A en Quil A-frakties werden chromatografisch op een Hypersil ODS 5 μ analysekolom (150 x 4,6 mm) (Shandon, Runcorn, UK) bepaald. De acetonitril-concentratie veranderde van 32% tot 40% in met ammonium-acetaat gebufferd water gedurende de analyse. De pieken werden bij 208 nm gedetecteerd. Een quantificatie werd bereikt door het meten van de
 40 piekhoogte of hoogte van de drie voornaamste pieken in het geval van

9 0 0 2 3 1 4

Quil A. Er werden standaardkrommen opgezet voor calibratiedoeleinden.

Hydrodynamische deeltjesgrootten

Deze deeltjesgrootte werd bepaald door verstrooiing in mono-
5 chromatisch licht met een System 4600 size analyzer (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK).

Hemolytische activiteit

De hemolytische activiteit van Quil A-frakties en iscoms werd
10 bepaald op de in Kersten et al., On the Structure of Immune-stimulating Saponin-lipid Complexes (iscoms), Aangeboden ter publikatie). V-gevormde putjes van een microtiterplaat werden met 100 µl 0,5% (v/v) erythrocyten van Cercopithecus aureus in McIlvain buffer met een pH van 7,2 (13,1 mM citroenzuur, 173,8 mM Na₂HPO₄) gevuld. Daarna werd 100 µl van
15 het monster of de QA-standaard (concentratie oplopend van 0,5 tot 8,0 µg/ml) toegevoegd. Na een incubatie gedurende 3 uur bij 37°C werd de plaat gedurende 5 min. bij 2000 rpm (Hettich Rotixa IKS, Tuttlingen, BRD) gecentrifugeerd en werd 100 µl supernatant in een platbodempicrotiterplaat overgebracht. De extinctie bij 405 nm werd met een micro-
20 titerplaatlezer (Titertek Multiskan MCC, Flow Laboratories, Herts., UK) bepaald.

Adjuvans-activiteit

De adjuvans-activiteit werd in muizen met de gezuiverde porie
25 proteïne I van Neisseria gonorrhoeae (stam C3) (PIC3) als model antigeen onderzocht. PIC3 werd op de hierboven beschreven wijze gezuiverd met de volgende modificaties: vast fenylmethylsulfonylfluoride (Serva, Heidelberg, FRG) werd aan de extractiebuffer toegevoegd, er werd een extra klaringsstap door filtratie met een 1,2 µm filter (RA Milli-
30 pore, Bedford, MA) voor de CaCl₂ verwijderingsprocedure uitgevoerd en een tweede filtratie (0,45 µm) werd voor de DEAE Sephadex chromatografie uitgevoerd. De gelfiltratietrap werd overgeslagen. Mannelijke NIH-muizen (4 of 8 per groep) werden subcutaan met 2,5 µg PIC3 en 20 µg gezuiverd Quil A of 2,5 µg PIC3 in iscoms geïmmuniseerd. Het PIC3 werd
35 als een suspensie gebruikt, welke verkregen was na ethanolprecipitatie en suspenderen van de gedroogde pellet in Tris (10 mM) gebufferde zoutoplossing, pH 7,4, met behulp van een korte ultrasonische behandeling. Vier weken na de primer-immunisatie werden bloedmonsters verzameld en de muizen kregen een booster-injectie. Twee weken na de booster werden de
40 muizen gedood en werd de relatieve IgG spiegel in de sera met behulp van

9 0 0 2 3 1 4

ELISA met PIC3 als antigeen-bekleding bepaald.

Molecuulmassa's

De molecuulmassa's werden met behulp van een positieve FAB-MS (fast atom bombardment-massa spectrometry) bepaald. De metingen werden
5 uitgevoerd met 2-hydroxyethyl-disulfide als matrix en xenon als ioniserende atomen.

RESULTATEN

Quil A zuivering

10 In Fig.1 wordt het chromatogram van de bovenaangeduide semi-preparatieve scheiding van Quil A geïllustreerd. Initiële proeven lieten zien, dat de pieken in het begin van het chromatogram een zeer gering massapercentage vertegenwoordigden. Derhalve werd dit gedeelte niet meer bij het verdere onderzoek van aanvraagster meegenomen.

15 De eerste piek, welke een aanzienlijke hoeveelheid massa bevatte werd QA 1 genoemd. In totaal werden 23 pieken en piekgroepen geïdentificeerd en verzameld. De daaraan voorafgaande verontreinigingen werden in Fig.1 niet nader aangeduid.

De frakties QA 1 - QA 23 werden gevriesdroogd, wat in alle gevallen resulteerde in een wit, sneeuwachtig poeder. Het restwatergehalte
20 van QA 20 en QA 22 bedroeg 4,2% resp. 4,4%. Van deze restwatergehalten werd aangenomen, dat deze representatief waren voor alle gevriesdroogde monsters. Uit alle frakties werd een oplossing van 1% of 10% (w/v) in water bereid. De oplossingen werden bij -20°C opgeslagen; de gelyo-
25 filiseerde preparaten werden bij 4°C opgeslagen.

Bij opnieuw chromatograferen van de 23 QA-frakties was er altijd slechts één hoofdpijk aanwezig, welke soms van een schouder of een kleine voorafgaande piek vergezeld was.

30 UV-spectra

De spectra van Quil A-frakties (QA), zoals opgenomen met een diode array detector, waren identiek (190-370 nm). De frakties absorberen slechts bij korte golflengten en zijn boven ongeveer 240 nm transparant. De meeste pieken, welke aan QA 1 voorafgaan, bezitten een totaal ver-
35 schillend spectrum met maxima bij 200 nm en 280 nm of 310 nm.

In de bijgaande Fig. 2a-d worden de UV-spectra van QA 3 (Fig.2a), QA 20 (Fig.2b) en van de verontreinigingen C [in Fig.1 aangeduid] (Fig.2c) en D [in Fig.1 aangeduid] (Fig.2d) weergegeven.

40

9 0 0 2 3 1 4

Suikersamenstelling

Er zijn geen belangrijke verschillen in suikersamenstelling van de 23 Quil A-frakties, zoals deze door aanvraagster zijn verzameld (zie Tabel A) vastgesteld. Suikers welke in alle frakties voorkomen zijn rhamnose, fucose, xylose, glucuronzuur en galactose. Bovendien worden in bepaalde frakties arabinose en/of glucose waargenomen. De molverhoudingen variëren vaak van 0, 1 of 2. Dit wordt waarschijnlijk veroorzaakt door verontreiniging met andere componenten, zoals kan worden afgeleid van de piekvormen of door de aanwezigheid van suikers met een identiek gaschromatografisch gedrag. Voorts wordt in dit verband naar voren gebracht, dat geringe hoeveelheden van bijvoorbeeld hemi-cellulose niet geheel kan worden uitgesloten.

TABEL A

Suikersamenstelling (in molverhouding) van Quil A-frakties 1-23 en Quil A totaal

Quil A-fraktie	ara ¹⁾	rham ²⁾	fuc ³⁾	xyl ⁴⁾	glca ⁵⁾	gal ⁶⁾	glc ⁷⁾
1	0,2	2,3	1,1	1,7	1,0	1,0	1,0
2	0,2	2,3	1,1	1,6	1,0	1,0	0,5
3	0,2	2,3	1,1	1,7	1,0	1,0	1,0
4	0,2	2,4	1,1	1,7	1,0	1,0	0,3
5	0,2	1,8	1,1	1,6	1,0	1,0	1,4
6	0,1	2,0	1,1	1,6	1,0	1,0	0,8
7	0,2	1,7	1,1	1,7	1,0	1,0	1,0
8	0,3	1,6	1,1	1,0	1,0	1,0	1,1
9	0,5	1,8	1,1	1,1	1,0	1,0	1,0
10	0,3	2,3	1,1	1,8	1,0	1,0	0,9
11	0,3	2,2	1,1	1,7	1,0	1,0	0,4
12	0,4	2,0	1,1	1,7	1,0	1,0	0,9
13	0,6	1,7	2,1	1,0	1,0	1,0	1,0
14	0,3	1,8	1,1	1,2	1,0	1,0	0,7
15	0,4	1,7	1,1	1,7	1,0	1,0	1,0
16	0,7	1,8	1,1	1,9	1,0	1,0	0,8
17	1,1	2,3	1,1	1,8	1,0	1,0	1,1
18	0,7	1,6	1,1	1,7	1,0	1,0	0,7
19	0,5	1,5	1,0	1,5	1,0	1,0	0,9
20	1,1	1,7	1,1	1,7	1,0	1,0	0,9
21	0,8	1,4	1,1	2,0	1,0	1,0	0,6
22	1,1	1,5	1,1	1,8	1,0	1,0	0,1
23	0,7	1,4	0,9	1,2	1,0	1,0	0,4
QA totaal	0,8	1,7	1,0	1,5	0,9	1,0	0,8

- 1) ara = arabinose of een zich als arabinose gedragende suiker
 2) rham = rhamnose of een zich als rhamnose gedragende suiker
 3) fuc = fucose of een zich als fucose gedragende suiker
 4) xyl = xylose of een zich als xylose gedragende suiker
 5) glca = glucuronzuur
 6) gal = galactose = 1,0 gedefinieerd
 7) glc = glucose of een zich als glucose gedragende suiker

9002314

Hemolytische activiteit

De hemolytische activiteit van de QA 1 t/m QA 23-frakties wordt in Tabel B weergegeven. Uit deze tabel kan worden afgeleid, dat de hemolytische activiteit toeneemt met een afnemende polariteit, d.w.z. de 5 componenten met langere retentietijden. De frakties met de kortste retentietijd bezitten hemolytische activiteiten, welke 10 tot 20 maal geringer zijn dan die van Quil A.

TABEL B

10 Relatieve hemolytische activiteit van Quil A-frakties 1-23 (Quil A totaal = 100%)

15	Quil A fractie	Hemolytische activiteit ten aanzien van Quil A totaal (%)
	1	5
	2	8
	3	8
20	4	14
	5	4
	6	5
	7	5
	8	14
25	9	16
	10	16
	11	22
	12	33
	13	38
30	14	31
	15	15
	16	56
	17	65
	18	36
35	19	72
	20	108
	21	108
	22	147
40	23	103

9002314

Adjuvans-aktiviteit van de Quil A-frakties 1-23

Uit deze tabel kan worden afgeleid, dat alle frakties een adjuvans-aktiviteit bezitten.

TABEL C

5

Adjuvans-aktiviteit van Quil A-frakties 1-23 en Quil A totaal

Quil A fraktie	IgG respons	
	Serum verdunning bij A450 = 0,4 in ELISA	
	primer x 10 ²	booster x 10 ³
1	3,7	2,4
15 2	4,6	4,6
3	6,9	5,5
4	6,6	3,5
5	2,6	2,8
6	1,2	5,8
20 7	< 1,0	1,2
8	4,6	2,6
9	1,9	2,0
10	1,6	1,6
11	2,3	2,5
25 12	8,0	2,7
13	3,9	2,0
14	3,0	4,0
15	3,9	1,6
16	2,9	1,4
30 17	5,0	1,5
18	1,6	2,2
19	3,5	3,4
20	2,7	1,6
21	2,3	4,5
35 22	2,7	2,7
23	2,9	1,8
QA totaal	1,8	2,9
geen adjuv.	< 1,0	0,2

40

Adjuvans-aktiviteit werd in muizen bepaald met porie-eiwit I van *Neisseria gonorrhoeae* stam C als antigeen; adjuvans dosis: 20µg. Per groep werden vier muizen gebruikt

45 Vorming van immunogene complexen

Voor een aantal QA-frakties was het niet direkt mogelijk lipide-QA-komplexen met dimensies te bereiden, welke die van standaard-iscoms, waarbij totale Quil A-monsters zijn toegepast (Tabel D) benaderen.

In de meeste gevallen werd een turbide dispersie verkregen onder toepassing van de bovenvermelde standaard iscom-formatieprocedure. Uit electronenmicroscop-onderzoek bleek echter altijd, dat zich deeltjes met de typische honingraatstructuur hadden gevormd, zoals waargenomen in iscoms. Voorts waren er vaak veel deeltjes met een iscom-grootte aanwezig (Fig.3). De "lege" iscoms, bereid uit de frakties QA 1, 3, 5, 6, 9,

9002314

12-14, 18 en 23 vertoonden een gemiddelde deeltjesgrootte beneden 200 nm.

TABEL D

5

Deeltjesgrootte van proteïnevrije structuren, gevormd na een iscom-bereidingsprocedure

10	Quil A fraktie	Gemiddelde deeltjesgrootte lege iscom-structuur (nm)
	1	150
	2	> 1000
15	3	145
	4	> 1000
	5	148
	6	160
	7	> 1000
20	8	> 1000
	9	95
	10	> 1000
	11	> 1000
	12	124
25	13	106
	14	166
	15	> 1000
	16	> 1000
	17	> 1000
30	18	97
	19	> 1000
	20	> 1000
	21	> 1000
	22	838
35	23	67
	QA totaal	53

40

PIC3-bevattende iscoms werden met een zestal Quil A-frakties (QA 3, 17, 18, 20, 22 en 23) bereid. Na een gradiënt-purificatie en analyse (zie Tabel E) werd de immunogeniteit ervan vastgesteld. In dit verband
 45 was het zeer verrassend, dat PIC3-iscoms met de Quil A-fraktie QA 3 uitmuntende resultaten te zien gaf.

TABEL E

5

Analyse en immunogeniciteit van PIC3 bevattende iscom-achtige structuren, bereid met 6 Quil A fracties.

10	Preparaat	Proteïne (mg/ml)	Quil A (mg/ml)	Hemolytische aktiviteit overeenkomend met x mg/ml vrij Quil A totaal	Grootte (nm)	IgG respons ¹⁾ Serum dilutie bij A ₄₅₀ = 0,4 in ELISA	
15						primer x10 ³	booster x10 ³
	QA 3 iscom	32	299	10	111	1,6	19,2
	QA 17 iscom	122	1070	9	>1000	1,6	6,4
20	QA 18 iscom	43	430	13	>1000	0,9	4,5
	QA 20 iscom	50	775	171	>1000	1,3	17,9
	QA 22 iscom	92	2150	339	>1000	1,6	7,3
	QA 23 iscom	52	883	11	>1000	0,6	22,3
25	QA totaal iscom	28	470	168	65	0,5	19,2

1) acht muizen per groep

Molecuulmassa's

30 In de onderstaande Tabel F worden de molecuulmassa's van de MH⁺ ionen van het overgrote deel van de QA-frakties volgens de uitvinding weergegeven. Deze bepaling van de molecuulmassa werd uitgevoerd met een positieve FAB-MS-methode. Door aanvraagster wordt aangenomen, dat er een natriumion is ingesloten in het suikerdeel, gebonden aan het koolstof-
35 atoom 28 van het aglyconskelet. Derhalve dienen met aan zekerheid grenzende waarschijnlijkheid de in Tabel F vermelde waarden met 23 te worden verminderd.

9 0 0 2 3 1 4

TABEL F

	Fraktie	MH ⁺ a)
5	QA 1	1744
	QA 2	1592
	QA 3	1887
	QA 4	1723
10	QA 5	1811
	QA 6	1649, 1693
	QA 7	1797
	QA 8	1448, 2190
	QA 9	1364, 1500, 2335
15	QA 10	1927
	QA 11	1765
	QA 12	1972
	QA 13	2057, 2189
	QA 14	-b)
20	QA 15	1781
	QA 16	-b)
	QA 17	2319
	QA 18	-b)
25	QA 19	2041
	QA 20	2173
	QA 21	2011, 2083
	QA 22	-b)
	QA 23	2053

30 a) In alle frakties, behalve QA 10 en QA 13 is ook MH⁺ + 14 aanwezig in verschillende verhoudingen met MH⁺. Dit is de methylester van glucuronzuur.

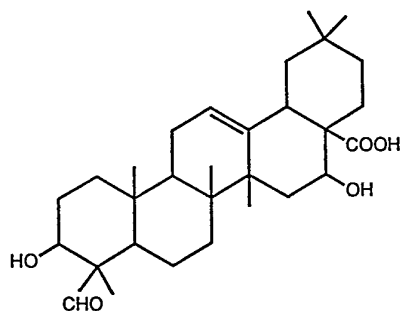
b) Vele massa's aanwezig.

35

Gezien de interessante eigenschappen van de Quil A-fraktie, aangeduid met QA 3, is er een massaspectrometische analyse van het voornaamste aglycon uitgevoerd; de saponinen in Quil A zijn glycosiden, welke uit een aglycon en een of meer suikerstaarten zijn opgebouwd.

40 Het voornaamste aglycon van saponinen, welke verkregen zijn uit de bast van Quillaja saponaria Molina wordt quillajazuur geacht.

45



50

9002314

Het aglycon-gedeelte van de Quil A-fraktie QA 3 werd met behulp van GC-MS geanalyseerd.

Een mengsel van 0,5 mg gevriesdroogd QA 3 en 0,1 mg cholesterol (Sigma, St.Louis, MO) werd in 0,5 ml droge methanol, dat 1,0 M HCl 5 bevatte, opgelost. De methanolysen werd 24 uur bij 85°C uitgevoerd. Het monster werd bij 40°C onder een stroom stikstof gedroogd. Aan het gedroogde residu werd 100 µl silyleringsmiddel toegevoegd (bis-(trimethylsilyl)-trifluoraceetamide:N-trimethylsilylimidazool:trimethylchloorsilaan = 3:3:2) (gew/gew/gew). Het monster werd grondig gemengd 10 en bij -20°C in een glazen buis opgeslagen tot de analyse werd uitgevoerd. De suikers en het aglycon werden op een CP Sil SCB-kolom (17 m x 0,25 mm) (Chrompack, Middelburg, Nederland) met een filmdikte van 0,14 µm gescheiden. De injectortemperatuur bedroeg 275°C en de kolomtemperatuur nam met 10°C/min. van 70°C tot 310°C toe. Het injectievolume 15 bedroeg 1,0 µl. De pieken werden op een Autospec mass spectrometer (VG, Manchester, U.K.) gedetecteerd. De ionisatie vond plaats d.m.v. electron impact (70 eV electronen, ionen-bron temperatuur: 250°C). De "trap"-stroom bedroeg 100 µA en de resolutie was 1000 (10% valley). De scan-parameters waren: magnetische scan van 100 tot 1000 massa-eenheden 20 bij 2 sec/decade. De cyclustijd was 2,5 s. Het gesilyleerde aglycon werd verder geanalyseerd met botsings-geïnduceerde fragmentatie tandem massa spectrometrie (CAD-MS/MS) op een HX110/HX110 massaspectrometer (JEOL, Tokyo, Japan). Positieve FAB werd toegepast voor de desorptie/ionisatie van het monster door toepassing van het JEOL Xe 25 atoom kanon, toegepast bij 6 kV. Het instrument werd bij een 10 kV accelererende potentiaal gebruikt. Als matrix werd glycerol/thioglycerol (1/1) (gew/gew) toegepast. Hoge energie-botsings geïnduceerde MS/MS spectra werden verkregen door het introduceren van He-gas in de collisiecél bij grondpotentiaal, zodat de ionen-energie in het botsings-30 gebied 10 keV bedroeg. De druk van het botsingsgas werd zodanig ingesteld, dat de respons van het precursor-ion op de eind-detector werd gereduceerd tot 1/4 van de niet-botsingsgeïnduceerde respons. Het scantraject bedroeg 55-650 atomaire massa-eenheden en de cyclustijd bedroeg 1 min 52.8 sec.

35 Ter bevestiging van het monsterpreparaat en de GC-MS-analyse werd een in de handel verkrijgbaar saponine β-esceïne (Sigma), met een bekende chemische structuur geanalyseerd. Volgens het label was het produkt 90-95% zuiver. Het gaschromatogram van gemethanoliseerd, gesilyleerd β-esceïne vertoonde verscheidene pieken met retentietijden, welke langer 40 waren dan die van cholesterol. De massa van de component in de hoofdpijk

9002314

werd op 488 berekend (dit is zonder de TMS (trimethylsilyl) groepen). Dit is de gerapporteerde massa van de lactonvorm van het aglycon van β -esceïne.

Het gaschromatogram van het QA 3-cholesterol-mengsel wordt in Fig. 3 weergegeven. De piek met de retentietijd van 17 min. 45 sec. is cholesterol (massaspectrum niet geïllustreerd). De pieken, welke cholesterol voorafgaan, zijn suikerderivaten. Het massaspectrum van de piek bij 21 min. 6 sec. wordt in Fig. 4 geïllustreerd. Het moleculaire ion heeft een m/z van 644,3. De moleculaire isotoopcluster geeft de aanwezigheid van 2 TMS-groepen aan. De exacte massa van de MH^+ ion is $645,4371 \pm 0,0028$ atomaire massa-eenheden. De elementsamenstelling, welke het beste met deze massa overeenkomt is $C_{37}H_{65}O_5Si_2$, aannemende dat slechts C,H,O en 2 Si atomen in het molecuul aanwezig zijn. De berekende massa van $C_{37}H_{65}O_5Si_2$ is 645,4370 atomaire massa-eenheden. Het molgewicht van het molecuul zonder de 2 TMS groepen is $644 - (2 \times 72) = 500$ atomaire massa-eenheden ($C_{31}H_{48}O_5$). Quillajazuur ($C_{30}H_{46}O_5$) bezit een molecuulgewicht van 486. Daar het aglycon door methanololyse verkregen wordt kan de verbinding met de massa van 500 de methylester van quillajazuur zijn. Dit wordt bevestigd door een tandem-massaspectrometrische analyse van het gesilyleerde aglycon (Fig. 5), wat het verlies van methanol illustreert (Tabel G).

TABEL G

25 Interpretatie van het MS/MS spectrum van gemethanoliseerd gesilyleerd QA 3, met MS 2 op 645 atomaire massa-eenheden.

	m/z	interpretatie
30	645	MH^+
	615	-30 (formaldehyde)
	613	-32 (methanol)
35	601	-44 (ethanol of propaan)
	585	-60 (methylester van mierzuur)
	569	-44-32
	555	-90 (HOTMS)
	541	-60-44
40	523	-32-90
	511	-44-90

9 0 0 2 3 1 4

De estervorming verklaart ook waarom slechts 2 TMS-groepen na de silylering aanwezig zijn. Het GC-MS-spectrum (Fig.4) toont het verlies van 117 atomaire massa-eenheden, wat een COOTMS-groep (Tabel H) kan voorstellen.

TABEL H

Interpretatie van het massa-spectrum in Fig. 4

m/z	interpretatie
644	M
629	M-15 15 = CH ₃
586	M-58 58 = Si(CH ₃) ₂
554	M-90 90 = HO-TMS ¹
527	M-117 117 = COOTMS
496	M-(90 + 58)
464	M-(2 x 90)
437	M-(117 + 90)

1) TMS = Si(CH₃)₃

Dit is onverenigbaar met de methylestervorm van quillajazuur. Het fragment wordt niet in het MS/MS-spectrum gedetecteerd. Mogelijkerwijs is de aanwezigheid van een co-eluerende verontreiniging de oorzaak.

M/z 305 is een welbekend OTMS-fragment van sacchariden. Het stelt het OTMS-derivaatfragment bij C₂-C₃-C₄ voor. Het is echter onwaarschijnlijk, dat in dit geval m/z 305 van een suikerdeel afkomstig is. Waarschijnlijk stelt het fragment een deel van het aglucon voor.

Een vergelijking van de GC-piek bij 21 min. 6 sec. met een spectrum van de smalle voorafgaande GC-piek bij 20 min. 56 sec. vertoont een opmerkelijke overeenkomst (Fig.6). De spectra zijn soortgelijk vanaf m/z 629, wat een grote overeenkomst in beide verbindingen aangeeft. Het verschil is slechts in het moleculaire ion-gebied gelegen; dit bedraagt 74 atomaire massa-eenheden. Het verschil kan worden verklaard door aan te nemen, dat een C=O groep in de verbinding van de hoofdpiek tot een OH-groep is gereduceerd in de verbinding van de smallere piek, waarbij 2 amu in molgewicht wordt gewonnen. Deze OH-groep is omgezet in een O-TMS-groep tijdens de derivatisatie-procedure, waarbij 72 atomaire massa-eenheden extra wordt gewonnen. Derhalve is het waarschijnlijk, dat de GC-pieken bij 20 min. 56 sec. en 21 min. 6 sec. twee verbindingen weergeven, waarbij de ene de gereduceerde vorm van de andere is.

9 0 0 2 3 1 4

CONCLUSIES

1. Immunogeen complex, in het bijzonder een iscom, opgebouwd uit ten minste een sterol, een saponine, en in het geval van een iscom
5 eveneens een fosfolipide, gekenmerkt doordat het saponine tenminste een of meer door middel van hydrofobe interactie-chromatografie van Quil A afgeleide frakties met de aanduidingen QA 1 t/m 23 is, zoals weergegeven in Fig.1 met de cijfers 1 t/m 23.

2. Immunogeen complex, in het bijzonder een iscom volgens
10 conclusie 1, gekenmerkt doordat het saponine tenminste een of meer van Quil A afgeleide frakties met de aanduidingen QA 1 t/m 20 en 23 is.

3. Immunogeen complex, in het bijzonder een iscom volgens
conclusie 2, gekenmerkt doordat het saponine tenminste een of meer van Quil A afgeleide frakties met de aanduidingen QA 1, 3, 5, 6, 9, 12, 13,
15 14, 18, 20 en 23 is.

4. Immunogeen complex, in het bijzonder een iscom volgens
conclusie 3, gekenmerkt doordat het saponine tenminste een of meer van Quil A afgeleide frakties met de aanduidingen QA 3, 17, 18, 20 en 23 is.

5. Immunogeen complex, in het bijzonder een iscom volgens
20 conclusie 4, gekenmerkt doordat het saponine tenminste de van Quil A afgeleide fraktie met de aanduiding QA 3 en/of QA 23 is.

6. Immunogeen complex, in het bijzonder een iscom volgens een of
meer der conclusies 1-5, gekenmerkt doordat het immunogene complex tevens tenminste een antigeen eiwit of peptide met een al dan niet
25 kunstmatig aangebracht hydrofoob gedeelte bevat.

7. Immunogeen complex, in het bijzonder een iscom volgens
conclusie 6, gekenmerkt doordat het antigeen eiwit of peptide, membraan-eiwitten of membraanpeptiden zijn, welke uit virussen, bacteriën, mycoplasma's, parasieten of diercellen zijn geïsoleerd dan wel gesynthetiseerde peptiden.
30

8. Werkwijze voor het bereiden van QA-frakties uit Quil A, geschikt voor gebruik bij de bereiding van een immunogeen complex, in het bijzonder een iscom volgens een of meer der conclusies 1-7, met het kenmerk, dat men

- 35 - Quil A oplost in water;
- het Quil A in de verkregen oplossing in een semi-preparatieve hydrofobe interactiekolom scheidt met als mobiele fase een acetonitril/water-oplossing, gebufferd op een pH van 6; en
- de gescheiden frakties wint.

40 9. Quil A-fraktie met de aanduiding QA 3, welke een via FAB/MS

9002314

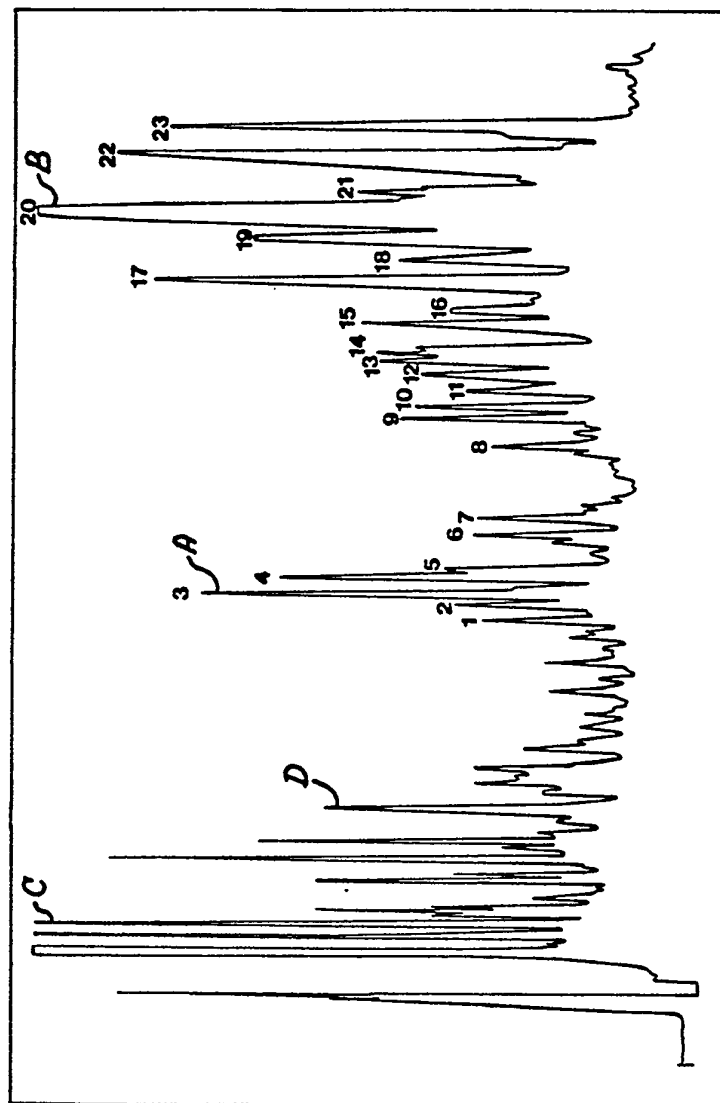
bepaald MH^+ -gewicht van 1887 bezit.

10. Vaccin, ten minste omvattende een immunogeen complex, in het bijzonder een iscom volgens conclusie 6 of 7.

11. Kit, ten minste omvattende enerzijds een immunogeen complex,
5 in het bijzonder een iscom volgens een of meer der conclusies 1-5 en
anderzijds een of meer antigene eiwitten of peptiden met een al dan niet
kunstmatig aangebracht hydrofoob gedeelte.

9 0 0 2 3 1 4

fig-1



9002314

(QA 3) fig-2a

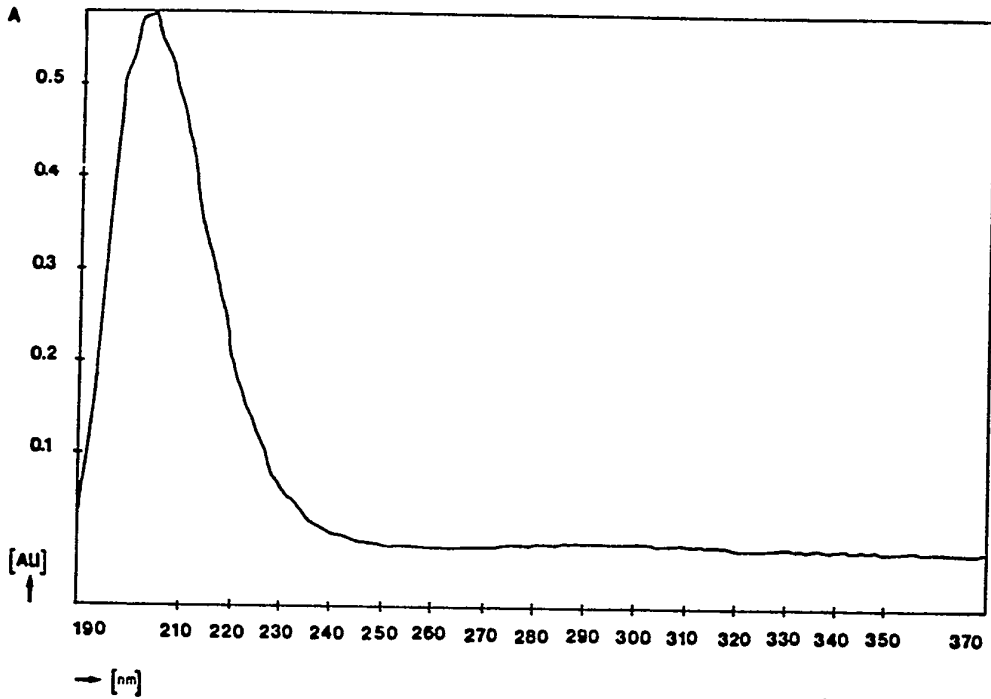
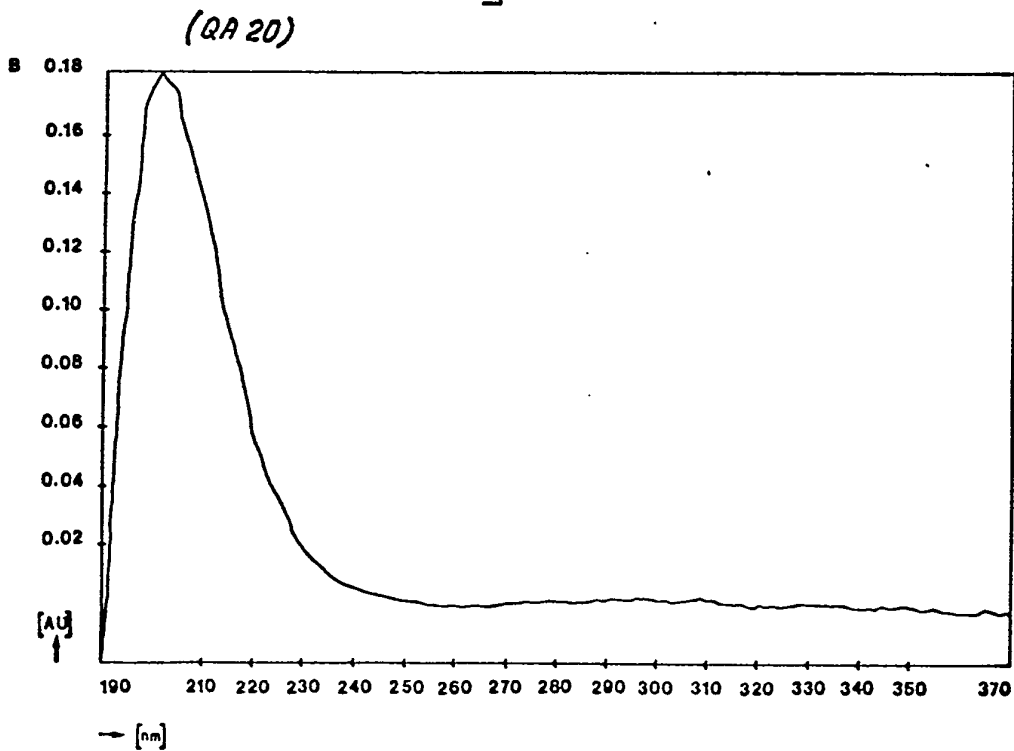


fig-2b



9002314

fig-2c

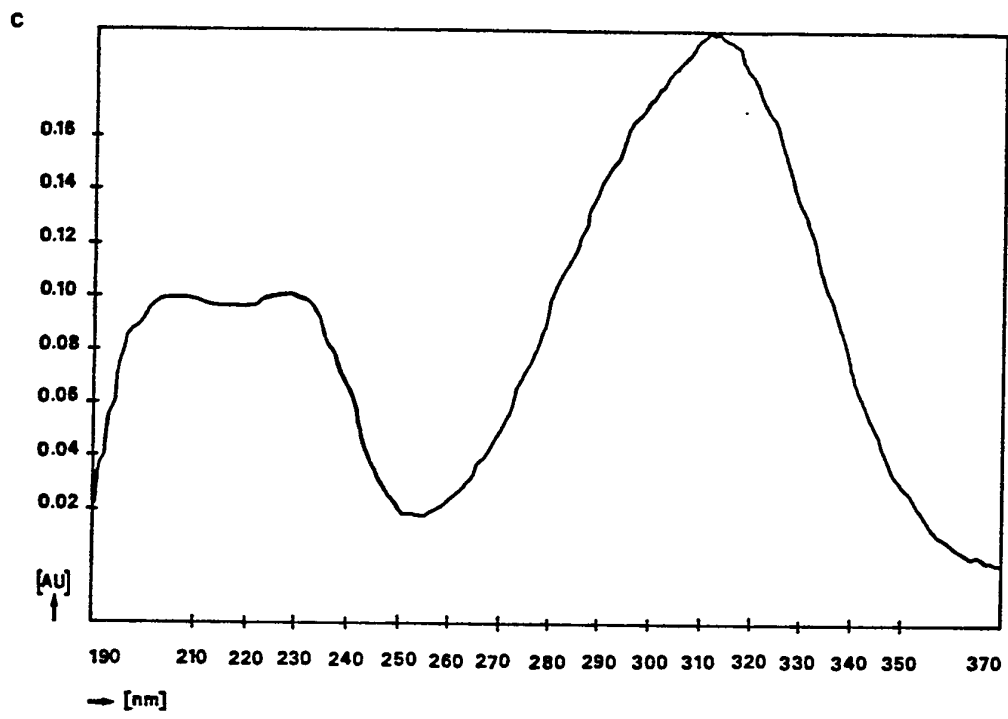
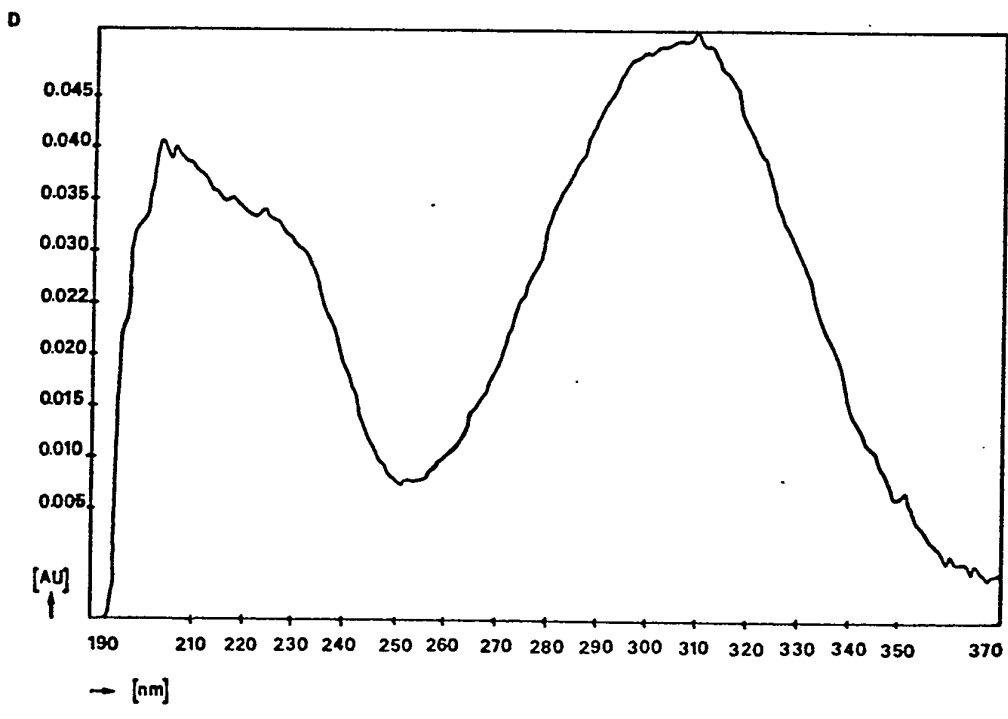


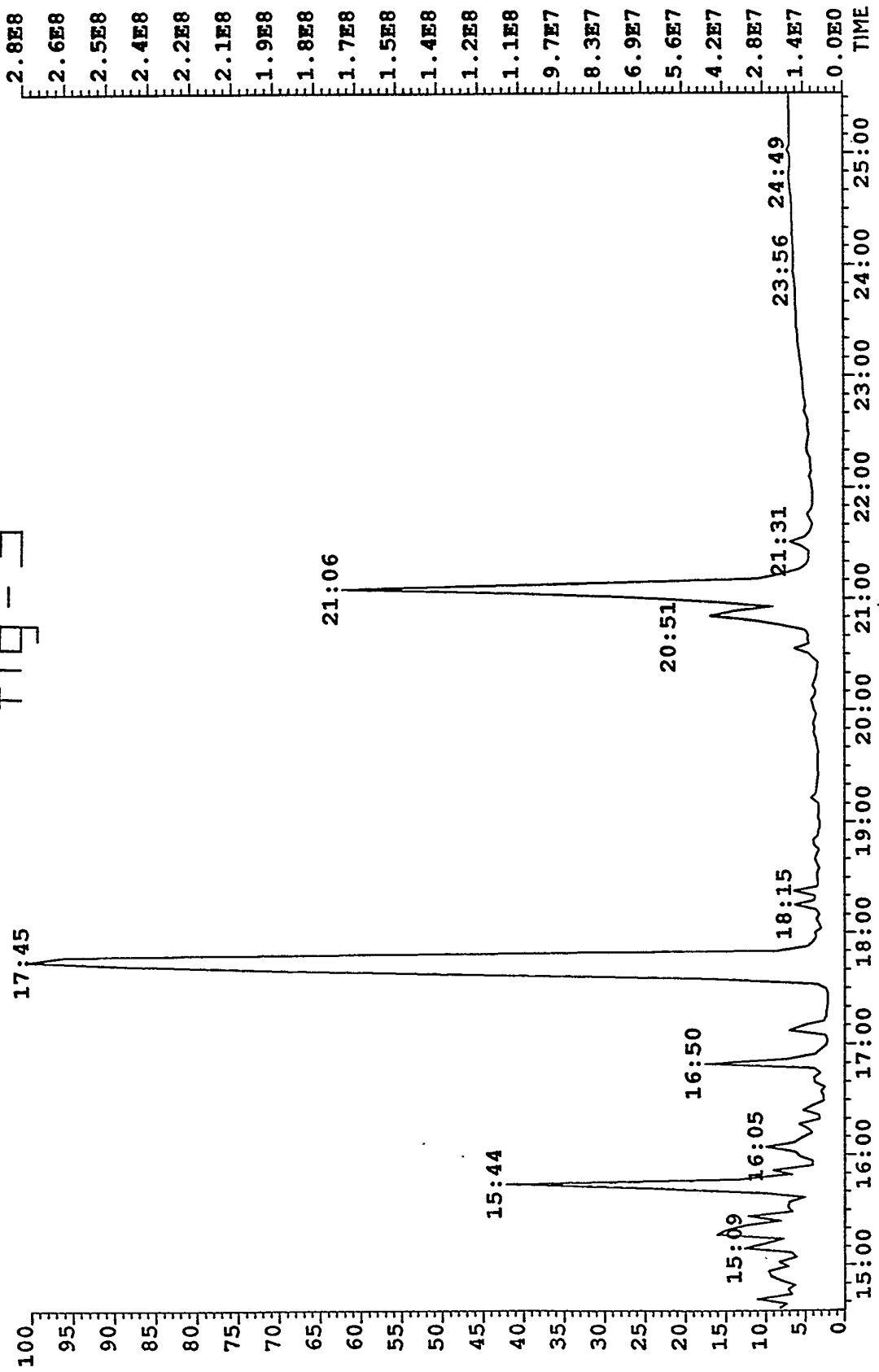
fig-2d



9002314

9002314

fig-3



9002314

fig-4

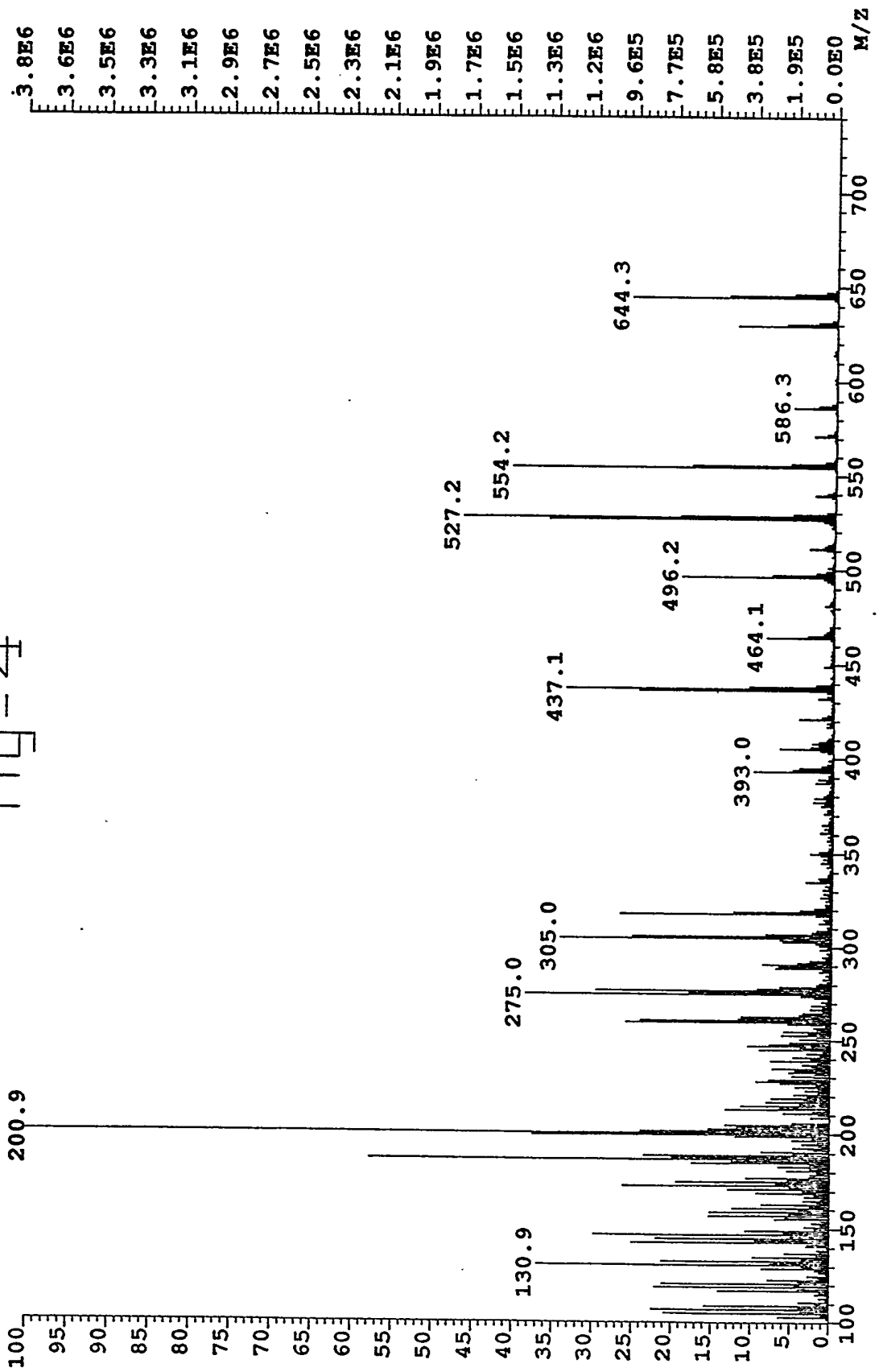
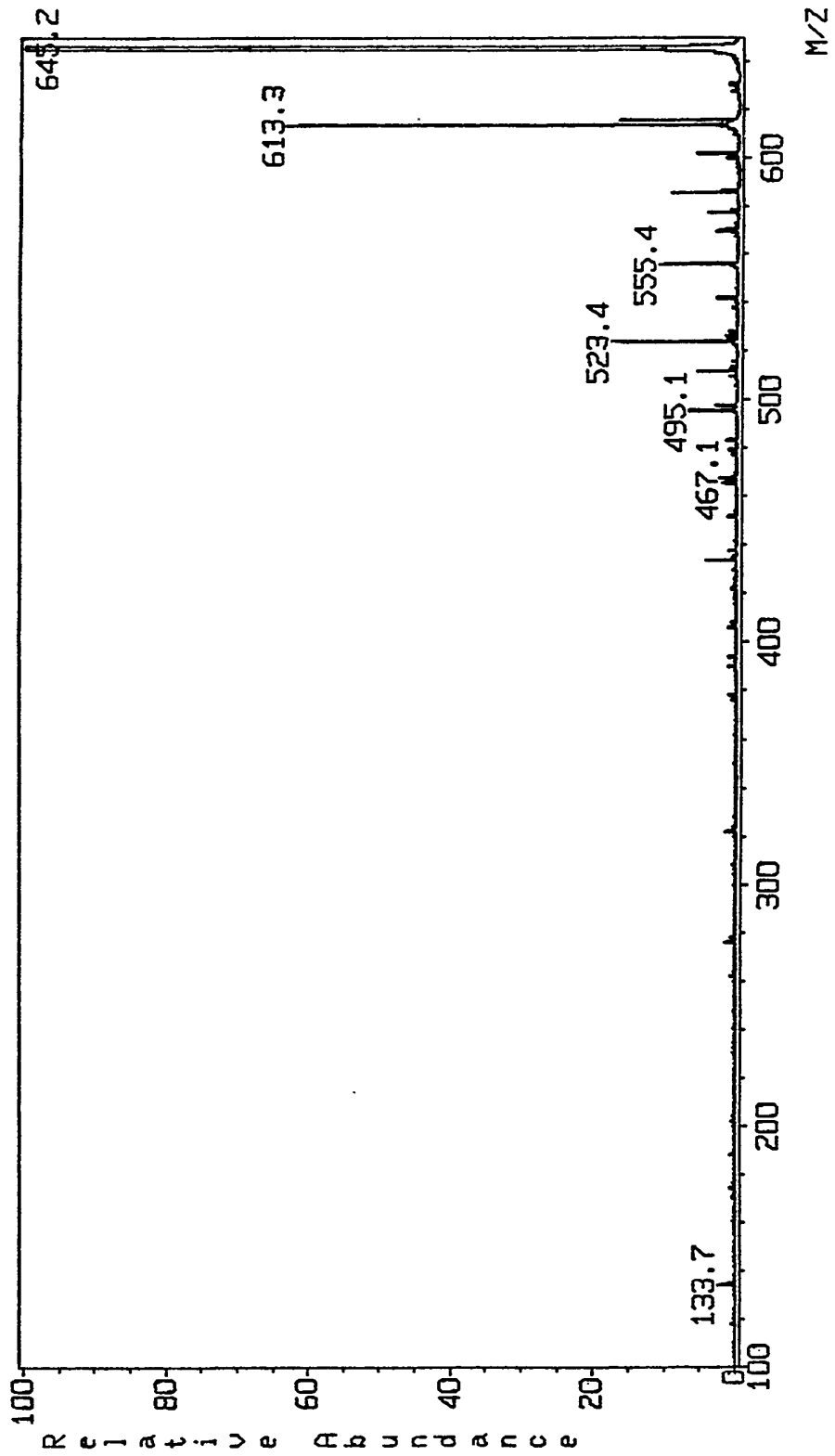


fig-5



9002314

9002314

fig-6

