

---

**Octrooiraad**



⑫ A **Terinzagelegging** ⑪ **8901975**

**Nederland**

⑲ **NL**

---

⑤4 **Werkwijze voor de bereiding van tegen kinkhoest-beschermende antigenen.**

⑤1 Int.Cl<sup>5</sup>: A61K 39/10.

⑦1 Aanvragers: Medicinska Akademia te Sofia, Bulgarije en Nauchno-Issledovatelski Institute po Epidemiologia i Microbiologia 'N.F. Gamalea' te Moskou, U.S.S.R.

⑦4 Gem.: Drs. A. Kupecz c.s.  
Octrooibureau Los en Stigter B.V.  
Postbus 20052  
1000 HB Amsterdam.

---

②1 Aanvraag Nr. 8901975.

②2 Ingediend 31 juli 1989.

③2 - -

③3 - -

③1 - -

⑥2 - -

---

④3 Ter inzage gelegd 18 februari 1991.

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

---

Werkwijze voor de bereiding van tegen kinkhoest-beschermende antigenen.

De onderhavige uitvinding heeft betrekking op een werkwijze voor de bereiding van tegen kinkhoest-beschermende lichaamsantigenen ten gebruike bij de bereiding van geadsorbeerd DPT-vaccin, toe te passen op medisch terrein.

5           Een werkwijze voor de bereiding van tegen kinkhoest-beschermende lichaamsantigenen is bekend, welke werkwijze daarin bestaat, dat kinkhoestmicroben worden gekweekt in de eerste stap bij 36°C in een milieu van caseïne-agar en koolstof of in een vloeibaar voedingsmedium, gevolgd door  
10   uitwassen van de microbe-massa van het medium met caseïne-agar en koolstof door middel van de isotonische oplossing van natriumchloride, waarna de microbe-massa uit het vloeibare voedingsmedium wordt neergeslagen door centrifugeren of met zoutzuur, gevolgd door centrifugeren, decanteren van de  
15   hypersedimentaire vloeistof, verdunnen van het precipitaat met een gebufferde isotonische oplossing van natriumchloride, verhitting van de oplossing tot 56°C (of onder verhitting), behandeling met merthiolaat gedurende 10 - 14 dagen en tot 4 maanden toe (1).

20           Een andere werkwijze voor de bereiding van tegen kinkhoest-beschermende lichaamsantigenen is bekend, waarbij de microbe-suspensie op dezelfde wijze wordt verkregen als volgens de eerste methode, doch waarbij de suspensie wordt behandeld met formaldehyde gedurende 20 - 24 uur bij kamer-  
25   temperatuur. Dan wordt de suspensie gecentrifugeerd ten einde de concentratie van vrij formaldehyde te verminderen, waarna de suspensie wordt verdund met een isotonische oplossing van natriumchloride met daarin merthiolaat als conserveermiddel (2).

30           Het nadeel van de bekende methode voor de bereiding van tegen kinkhoest-beschermende lichaamsantigenen bestaat daarin, dat de gebruikte chemische middelen een nadelige uitwerking hebben op de proteïnen van microbiële cellen (formaldehyde reageert met hun aminogroepen onder teweegbren-  
35   gen van denaturering en coagulatie, terwijl de mercuri-ionen

van merthiolaat met sulfohydrylgroepen reageren) met als resultaat dat de beschermende eigenschappen van tegen kinkhoest-beschermende lichaamsantigenen afnemen. Bovendien gaan de gebruikte methoden gepaard met een lange bewaar-  
5 periode en contact van de microben met het inactiverende middel (van 10 dagen tot 4 maanden) hetgeen resulteert in het verlagen van zijn concentratie. De toegepaste thermische behandeling doet tot op zekere hoogte het vernietigen van de microben versnellen, doch tegelijkertijd vermindert de ther-  
10 mische behandeling de beschermende activiteit en stabiliteit van het vaccin.

Een belangrijk nadeel van het verkrijgen van tegen kinkhoest-beschermende lichaamsantigenen uit een vloeibaar voedingsmedium is het gedwongen centrifugeren voor het afzon-  
15 deren van de microbe-massa en het voedingsmedium. Bij het vervangen van het neerslaan van de biomassa met zoutzuur voor het centrifugeren zijn de beschermende eigenschappen vermindert en tegelijkertijd de toxiciteit en de reactiviteit in geval van kinderen van de antigenen verhoogd.

20 Het doel van de uitvinding is het verschaffen van een werkwijze voor de bereiding van tegen kinkhoest-beschermende lichaamsantigenen, die de toename van beschermende eigenschappen van deze antigenen mogelijk maakt, hun toxiciteit doet afnemen en de voor hun bereiding benodigde tijd  
25 vermindert.

Dit doel wordt bereikt volgens een werkwijze voor de bereiding van tegen kinkhoest-beschermende lichaamsantigenen, waarbij de microben worden gekweekt, een microbe suspensie wordt bereid, d.w.z. deze wordt geïnactiveerd door  
30 itaconzuur, waarna het daarop volgend neerslaan van de microbe-massa de hypersedimentaire vloeistof wordt gedecanteerd en het bacteriële precipitaat wordt verdund met een isotonische oplossing van natriumchloride.

Deze werkwijze wordt uitgevoerd met behulp van ge-  
35 kweekte microben in een vast of vloeibaar voedingsmedium. De microbe-massa wordt met een isotonische oplossing van natriumchloride uitgewassen. De aldus verkregen microbe-suspensie wordt geïnactiveerd door toevoeging van itaconzuur in een

eindconcentratie van 3,75 - 13 mg/ml bij een pH van 3,7 - 4,2. De inactivering vindt plaats gedurende 1 - 4 uur. Tijdens de behandeling slaat de microbe-massa uit zichzelf neer. Na decanteren van de hypersedimentaire vloeistof wordt  
5 het neerslag verdund met een isotonische oplossing van natriumchloride.

De voordelen van deze methode volgens de uitvinding zijn als volgt: er worden tegen kinkhoest-beschermende lichaamsantigenen bereid met een hoger beschermende activi-  
10 teit en lagere toxische eigenschappen; de voor het verkrijgen van het eindpreparaat benodigde tijd is verminderd; verwarming en centrifugeren blijven achterwege, hetgeen betekent, dat er geen speciale apparaten dienen te worden toegepast.

15 De uitvinding wordt thans aan de hand van de volgende Voorbeelden nader toegelicht:

#### VOORBEELD I

Kinkhoestmicroben werden in fase 1 gekweekt in een voedingsmedium met caseïne-agar en koolstof, waarna de micro-  
20 be-massa met een isotonische oplossing van natriumchloride werd uitgewassen en vervolgens werd verdund tot een concentratie van 50 - 80 IUO/ml, gevolgd door toevoeging van een oplossing van itaconzuur tot een eindconcentratie van 3,75 mg/ml bij een pH van 3,7 - 4,2; het mengsel werd vervolgens  
25 geschud, terwijl men de suspensie gedurende 4 uur liet staan bij kamertemperatuur en dan gedurende de nacht bij 5 - 10°C.

Tijdens dit laten staan ontstond er op de microben een cellulaire neerslag, dat gemakkelijk opengebroken kon worden. Op de volgende dag werd de hypersedimentaire vloeistof gedecanteerd en het cellulaire precipitaat opnieuw  
30 gesuspenderd en met een isotonische oplossing van natriumchloride verdund tot zijn aanvangsconcentratie (cellulair), terwijl de pH op een waarde van 7,0 - 7,2 werd gebracht. De aldus bereide microbe-suspensie was een preparaat dat ge-  
35 schikt is als preparaat van tegen kinkhoest-beschermende antigenen.

#### VOORBEELD II

De microbe-suspensie voor de bereiding van tegen kinkhoest-beschermende lichaamsantigenen werd op de in Voor-

beeld I beschreven wijze verkregen, waarbij zijn infectiviteit werd geïnactiveerd bij het concentreren van itaconzuur 6,5 mg/ml bij een pH van 3,7 - 4,2, te bewaren bij kamertemperatuur gedurende 2 - 3 uur en dan bij 5 - 10°C, 5 waarna de hypersedimentaire vloeistof op dezelfde dag of de volgende morgen werd gedecanteerd en daarna werd het precipitaat verdund met een isotonische oplossing van natriumchloride, waarna de pH op een waarde van 7,0 - 7,2 werd gebracht.

10                    VOORBEELD III

De microbe-suspensie werd op dezelfde wijze bereid als in de Voorbeelden I en II, waarbij echter inactivering werd verkregen met itaconzuur - 13 mg/ml, pH = 3,7 - 4,2 en gedurende 1 - 2 uur laten staan. De doorzichtige 15 persedimentaire vloeistof werd op dezelfde dag of de volgende dag gedecanteerd, waarna het neerslag werd verdund met een isotonische oplossing van natriumchloride tot een cellulaire concentratie van 50 - 80 IUO/ml bij een pH van 7,0 - 7,2.

20                    VOORBEELD IV

Kinkhoestmicroben in fase 1 werden gekweekt in een vloeibaar halfsynthetisch medium van Coen en Viller (er werden eventueel ion-uitwisselende harsen toegevoegd) gedurende 48 uur. De hars werd door filtreren afgezonderd, waarna de 25 concentratie aan microben in de suspensie werd bepaald (het is gewoonlijk 40 - 50 IUO/ml) waarna een oplossing van itaconzuur werd toegevoegd tot een eindconcentratie van 5 mg/ml bij een pH van 3,7. Het inactiveren van de infectiviteit van de suspensie werd uitgevoerd bij kamertemperatuur gedurende 30 3 -4 uur, gevolgd door het bewaren van de suspensie gedurende de nacht bij een temperatuur van 5 - 10°C. De cellen vormden een neerslag, dat gemakkelijk kon worden opgebroken. De doorzichtige hypersedimentaire vloeistof werd afgezonderd en het cellulaire neerslag werd verdund tot de vereiste 35 microbe-concentratie met een gebufferde isotonische oplossing van natriumchloride met een pH van 7,2.

VOORBEELD V

De microbe-suspensie voor de bereiding van tegen

kinkhoest-beschermende lichaamsantigenen werd verkregen op de in Voorbeeld IV beschreven wijze, waarbij echter de infectiviteit werd geïnactiveerd met itaconzuur met een eindconcentratie van 10 mg/ml bij een pH van 4,2 en bij het 5 laten staan bij kamertemperatuur gedurende 2- 3 uur. Voorts werd de behandeling van de microbe-suspensie uitgevoerd op de in Voorbeeld IV beschreven wijze.

Het aldus verkregen preparaat van tegen kinkhoest-beschermende lichaamsantigenen (geïnactiveerde microbe sus-  
10 pensies) werd gecontroleerd op zijn inactiviteit (specifieke steriliteit) en zuiverheid (afwezigheid van begeleidende microflora) door kweken in de desbetreffende voedingsmedia en op onschadelijkheid door subcutane injectie in muizen. Bovendien waren de toxische en beschermende eigenschappen 15 onderzocht in proeven met muizen volgens de methoden voor kinkhoest en geadsorbeerd DPT-vaccin (1, 2).

Alle preparaten van tegen kinkhoest-beschermende lichaamsantigenen, verkregen in de vijf voorgaande Voorbeelden, waren homogene microbe suspensies met een melkwitte 20 kleur, die bij het laten staan een gemakkelijk uiteenvallend neerslag vormden. De microbe cellen hadden typische morfologische en tinctuureigenschappen, zij behielden hun specifieke agglutineerbaarheid en hun vermogen hemagglutinatie van schapen en menselijke erythrocyten teweeg te brengen.

25 De effectiviteit van de bactericide-werking van itaconzuur werd bepaald met behulp van microbe-suspensies uit diverse stammen met verschillende pH's bij temperaturen van 5 - 10°C en 20 - 22°C als een functie van zuurconcentratie en blootstellingstijd. Het kweken van de verdunde  
30 bacteriesuspensies vond plaats na verloop van 1, 2, 3, 4, 16 en 18 uur op een petrischaal voorzien van een voedingsmedium met caseïne-agar en koolstof, welk medium voorts 5% menselijk bloed bevatte. De resultaten waren na 5 dagen gecontroleerd. Tijdens de proeven werd vastgesteld, dat bij be-  
35 paalde condities het proces van celvernietiging beëindigd kon worden gedurende 1 - 4 uur. Het neerslaan van de cellen bij een concentratie van itaconzuur van 10 - 13 mg/ml en een pH van 3,7 stopt gewoonlijk na 3 - 4 uur. In geval van lage

concentratie was deze periode langer (de suspensie wordt tot de ochtend bewaard bij een temperatuur van 5 - 10°C. Onder de verschillende bacteriestammen waren enige kleine verschillen waargenomen ten aanzien van de tijdslimieten voor de vorming van de neerslagen.

De toxische eigenschappen van de preparaten van tegen kinkhoest-beschermende lichaamsantigenen, verkregen na de voorgestelde methode, werden 10 - 30 dagen na de bereiding bepaald en wel volgens de volgende proeven: een toename in lichaamsgewicht bij muizen en na de lymfocytose-stimuleringsactiviteit door het tellen van het aantal lymfocyten in het perifere bloed na inspuiting van het preparaat.

Bij de proeven werden muizen gebruikt met een gewicht van 140 - 160 g. Tegen kinkhoest-beschermende lichaamsantigenen werden intraperitoneaal ingespoten in 10 IUO in een volume van 0,5 ml, d.w.z. dat er een enkelvoudige dosering voor een kind werd toegediend. Bij controlemuizen was een isotonische oplossing van natriumchloride ingespoten. De muizen werden dagelijks gedurende 7 dagen gewogen.

In overeenstemming met de vereisten van de WHO na het inspuiten van elke muis met tenminste de helft van de enkelvoudige immuniserende dosering voor kindervaccin bleek het totale gewicht van de groep van muizen op de derde dag hetzelfde te zijn als het aanvangsgewicht, terwijl op de 7de dag niet meer dan 60% minder was vergeleken met het gewicht van de controlemuizen. De vernietiging was niet meer dan 5%.

Inspuiten van tegen kinkhoest-beschermende lichaamsantigenen, verkregen na inactivering met itaconzuur van microben gekweekt op een medium met caseïne-agar en koolstof in een vloeibaar voedingsmedium bleek zelfs in geval van de toepassing van grotere injectiedoses geen gewichtsafname bij de muizen plaats te vinden gedurende de eerste 2 dagen, waarbij de toename van het lichaamsgewicht op de 7de dag lag in het traject van 68,9% - 91,8% (zie bijgaande Tabel). Geen dode muizen konden worden waargenomen. Deze gegevens lieten zien, dat reeds op de 11de tot aan de 30ste dag de aldus bereide tegen kinkhoest-beschermende lichaamsantigenen niet alleen bevredigend zijn, doch dat ze bovendien

de vereisten van WHO overtreffen omtrent de toxiciteit (2, 3).

De aldus bereide tegen kinkhoest-beschermende lichaamsantigenen bezitten een lage lymfocytose-stimulerende werking en bij sommige preparaten blijkt dit lager te zijn dan die van een vaccin, dat is bereid volgens een methode, waarbij precipitatie wordt verkregen met behulp van zoutzuur (zie de Tabel). De beschermende eigenschappen van tegen kinkhoest-beschermende lichaamsantigenen worden bepaald volgens de ED<sub>50</sub>-dosis, waarbij 50% van de aan het onderzoek onderworpen muizen overleefden. Voor dit doel werden de muizen geïmmuniseerd met 3 oplossingen, waarvan elk 5 keer is verdund, van de bestudeerde preparaten na intraperitoneale toediening, terwijl zij na 14 dagen zijn geïnfecteerd in de hersenen met levende virale kinkhoestmicroben (bij een dosering van niet minder dan 100 LD<sub>50</sub>). Bij elke proef heeft men gebruik gemaakt van vaccins, die zijn bereid volgens de in de beschrijvingsinleiding vermelde methoden uit dezelfde microbe-suspensies als deze waaruit ze bereid zijn en de tegen kinkhoest-beschermende lichaamsantigenen.

De tegen kinkhoest-beschermende lichaamsantigenen, bereid volgens de voorgestelde werkwijze bezitten een hogere beschermende werking vergeleken met vaccins, bereid met formaldehyde of merthiolaat. De ED<sub>50</sub> van het preparaat overtreft gewoonlijk de ED<sub>50</sub> van de genoemde vaccins 2,3 - 5,3 keer (zie de Tabel).

Opgemerkt dient te worden, dat het itaconzuur, dat gebruikt wordt voor het inactiveren van de microbe suspensie een organisch zuur is, dat een neutraal tussenprodukt van het celmetabolisme van dieren en planten is en dat betrokken is in de celcyclus van tricarbonszuren. Deze stof is alleen toxisch voor kinkhoestmicroben.



TABEL

Toxische en beschermende eigenschappen van  
tegen kinkhoest-beschermende lichaamsantigenen.

| Berei-<br>ding nr. | eigenschappen<br>van het preparaat |                                         | toxiciteit       |                  | beschermende<br>eigenschappen |                         |
|--------------------|------------------------------------|-----------------------------------------|------------------|------------------|-------------------------------|-------------------------|
|                    | stam <sup>1</sup> nr.              | concentra-<br>tie itacon-<br>zuur mg/ml | WGT <sup>2</sup> | LPF <sup>3</sup> | ED <sub>50</sub>              | relatieve<br>activiteit |
| 10                 | <u>Kweek uit vloeibaar medium</u>  |                                         |                  |                  |                               |                         |
|                    | 1.                                 | 222                                     | 10               | 91,6             | 1,38                          | -                       |
|                    | 2.                                 | 41405                                   | 10               | 68,8             | 1,64                          | 0,018                   |
|                    | 3.                                 | 41405                                   | 10               | 81,3             | 1,19                          | 0,031                   |
|                    | 4.                                 | 41405                                   | 5                | 76,7             | 1,8                           | 0,62                    |
| 15                 | 5.                                 | 41405                                   | HCL+thiomersal   | 62,5             | 2,3                           | 0.087                   |
|                    | <u>Kweek uit vast medium</u>       |                                         |                  |                  |                               |                         |
|                    | 6.                                 | 41405                                   | 13               | 74,5             | 2,4                           | 0,06                    |
|                    | 7.                                 | 41405                                   | formaldehyde     | 70,5             | 2,7                           | 0,08                    |
|                    | 8.                                 | 41405                                   | 6,5              | 65,9             | 2,1                           | 0,029                   |
| 20                 | 9.                                 | 41405                                   | formaldehyde     | 75,3             | 1,7                           | 0,13                    |
|                    | 10.                                | 38                                      | 13               | 78,1             | 1,95                          | 0,0165                  |
|                    | 11.                                | 38                                      | 6,5              | 85,4             | 2,76                          | 0,011                   |
|                    | 12.                                | 38                                      | formaldehyde     | 75,5             | 1,34                          | 0,06                    |

Opmerkingen:

- 25 1. Stammen:
- Nr. 41405 is van het Bulgaarse type Kweekcollec-  
tie-Instituut voor Staatscontrole van Genees-  
middelen, Bulgarije
- Nr.222 en 38 zijn van het type Kweekcollectie  
30 van Tarassevich State Research Institute voor  
het standaardiseren en controle van medisch  
biologische preparaten, Sovjetunie
2. WGT staat voor "muisgewicht toenameproef"
3. LPF staat voor Leucocytose-bevorderende factor.

35 Literatuur

1. Zakharova, M.C. -"Associated pertussis-difteria-  
tetanus vaccine. Manual on vaccine and serum" - Moskou,  
Publishing House "Medezina", blz. 164.

8901975.

2. Comité van WHO experts op standaardiseren van biologische preparaten, technische rapporten - 638, paper 30, 1982, blz. 65, WHO.

3. Minimale vereisten voor biologische produkten,  
5 Ministerie van Gezondheid en Welvaart, Japanse regering,  
1982, blz. 123-125.

CONCLUSIE

Werkwijze voor het bereiden van tegen kinkhoest-  
beschermende lichaamsantigenen, waarbij microben worden  
gekweekt, een microbe-suspensie wordt bereid, die wordt  
geinactiveerd, gevolgd door het precipiteren van een microbe  
5 massa, waarna de hypersedimentaire vloeistof wordt gedecan-  
teerd en het precipitaat wordt verdund met een isotonische  
oplossing van natriumchloride, m e t h e t k e n m e r k ,  
dat het inactiveren wordt uitgevoerd met itaconzuur met een  
eindconcentratie in de microbe suspensie van 3,75 - 13  
10 mg/ml, bij een pH van 3,7 - 4,2 en bij een blootstellings-  
periode van 1 - 4 uur.