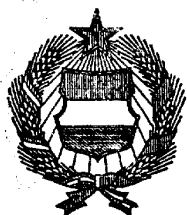


(19) HU

MAGYAR
NÉPKÖZTÁRSASÁG



ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) 185 404

A bejelentés napja: (22) 81. 01. 26.

(21) (164/81)

A bejelentés elsőbbsége:

(33)
JP

(32)
80. 09. 12

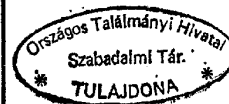
(31)
(127825/80)

A közzététel napja: (41) (42) 84. 03. 28.

Megjelent: (45) 87. 02. 25.

Nemzetközi
osztályjelzet:
(51) NSZO₄:

A 61 K 39/10;
C 12 P 21/00



Feltaláló(k): (72)

Syukuda Yukio, állatorvos, Watanabe Hideo, állatorvos, Matsuyama Shigeo, állatorvos, Hikari, Yamaguchi, JP

Szabadalmaz: (73)

Takeda Chemical Industries, Ltd., Osaka, JP

(54)

ELJÁRÁS PERTUSSZISZ TOXOID ELŐÁLLÍTÁSÁRA

(57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás pertusszisz toxoid előállítására.

A találmány értelmében úgy járnak el, hogy valamely *Bordetella pertussis* I törzs, előnyösen *Bordetella pertussis* Tokama I (IFO-14073) törzs tenyészetének dializált vagy dializálatlan felülúszójából vagy annak koncentrátumából fajsúly- vagy molekulasúly különbségen alapuló módszerekkel eltávolítják az endotoxint, és az

így kapott folyadékot formaldehiddel keverik úgy, hogy a formaldehid koncentrációja 0,1 és 0,6 térfogat% között legyen, majd az elegyet 32 °C és 42 °C közötti hőmérsékleten az exotoxin detoxifikálódásáig, előnyösen 3–14 napig inkubálják, és ilyen módon a pertusszisz exotoxint flokkulálják, és kívánt esetben a flokkulált exotoxint tartalmazó szuszpenziót dializálják, és kívánt esetben a dializált vagy dializálatlan, a flokkulált exotoxint tartalmazó szuszpenziót előnyösen ultrahangos kezeléssel diszpergálják.

A találmány tárgya eljárás pertusszisz toxoid előállítására.

A számarköhögés fertőző betegség, melyet a *Bordetella pertussis* nevű baktérium okoz, és melynek komoly következményei vannak, különösen gyerekeknél.

A betegség megelőzésére vakcinát alkalmaznak. Ezek a vakcinák azonban — mivel a kórokozó baktérium teljes sejtjeiből állítják elő — lázat és más mellékhatásokat okoznak.

Számos kísérletet végeztek már arra nézve, hogy a *Bordetella pertussis* I törzsből csak a hatásos komponens izolálják és vakcinává alakítsák, az ajánlott eljárásoknak azonban egyike sem volt sikeres. Mivel M. Pittmann: „Reviews of Infectious Diseases” 1, 401-412 irodalmi helyen közöltek szerint a *Bordetella pertussis* által okozott fertőzést a baktérium által termelt exotoxin okozza, felvetődött annak lehetősége, hogy a megelőzést pertusszisz toxoiddal végezzék. Arra vonatkozó híradás azonban, hogy megfelelő pertusszisz toxoidot sikerült volna így előállítani, még nem ismeretes.

A technika állása szerint a jelen találmány feltalálójának sikerült először pertusszisz toxoidot detoxifikálási eljárással előállítani.

A találmány tárgya a fentiek alapján eljárás olyan pertusszisz toxoid előállítására, amely kevésbé toxikus, immunizáló hatása azonban igen jó.

A találmány értelmében úgy járunk el, hogy a tenyésztet felülszójából vagy annak koncentrátumából eltávolítjuk az endotoxint, és a keletkezett folyadékot formaldehiddel kezeljük a pertusszisz exotoxin flokkulálása céljából, mialatt bázikus aminosav nincs jelen.

A találmány szerinti eljárásához *Bordetella pertussis* I törzs tenyésztetének felülszóját vagy annak koncentrátumát használjuk. A *Bordetella pertussis* I törzs tenyésztését önmagában ismert módon végezzük. Így például a törzset folyékony táptalajon (Cohen-Wheeler táptalaj, [összetételét l. I. példában], Stainer and Scholte táptalaj [összetételét l. J. of General Microbiol. (1971) 63, 211-220], stb.) 35-37 °C-on 5-7 napig tenyésztjük. A kapott tenyésztet felülszóját szűréssel vagy centrifugálással választjuk el. Vagy magát a folyékony felülszót vagy annak koncentrátumát használhatjuk az utána következő lépésben, amikor az endotoxint elválasztjuk. A koncentrátumot ismert módon kisózással készíthetjük. Így például 10 l felülszóhoz 2-5 kg ammónium-szulfátot adunk, és keverés után a képződött csapadékot alkalmas módszerrel, pl. szűréssel vagy centrifugálással elválasztjuk. A csapadékot feloldjuk alkalmas mennyiségű 1 mól nátrium-kloriddal kiegészített 0,05 mól foszfátpufferben és a felülszót centrifugálásos ülepítéssel vagy ehhez hasonló módszerrel nyerjük ki.

A találmány szerinti eljárással a fent leírt felülszót vagy annak koncentrátumát az endotoxin eltávolítása céljából kezelésnek vetjük alá. Az endotoxin eltávolítását szacharóz fajsúly-gradiens centrifugálással, kálium-tartarát fajsúly-gradiens centrifugálással, cézium-klorid fajsúly-gradiens centrifugálással, géliszűréssel vagy más módszerrel végezzük. Különösen előnyös módszer a fent leírt felülszót vagy annak koncentrátumát 0 és 60 súly% közötti szacharóz fajsúly-gradiensnél 62 000 és 122 000 g közötti gyorsulással 10-24 óra hosszát centrifugálni.

A találmány szerinti eljárás leglényegesebb lépése a pertusszisz exotoxin flokkulálása. Ezt úgy végezzük, hogy a fent leírt módon nyert pertusszisz exotoxint tartalmazó folyadékot formaldehiddel kezeljük bázisos

aminosav jelenlétének teljes hiánya mellett, így az exotoxint lényegében véve detoxifikáljuk és pertusszisz toxoidot nyerünk. Így a kicsapott és tisztított vakcina, amely az így detoxifikált toxoidot tartalmazza és a kicsapott és tisztított pertusszisz-diftéria-tetanusz kombinált vakcina, amely szintén detoxifikált toxoidot tartalmaz, kevésbé toxikus, de nagy az immunizáló hatása. Ilyen hatást nem lehet elérni olyan pertusszisz toxoiddal, melyet úgy állítottak elő, hogy a pertusszisz exotoxint tartalmazó folyadékot formaldehiddel kezelték bázikus aminosav, különösen L-lizin jelenlétében.

A szokásos baktérium exotoxinok esetében mint például a diftéria toxin esetén általában csak gyenge kötések képződnek a toxin molekulák és a formaldehid között, és így lehetetlen stabil polimerizátumot kapni anélkül, hogy egy adalékanyagot, például bázikus aminosavat, azaz L-lizint ne adnánk az oldathoz. A pertusszisz exotoxin esetén azonban nem várt módon azt találtuk, hogy a formaldehides detoxifikálás ilyen bázikus aminosav hiányában elősegíti az exotoxin polimerizációját és így antigén flokkulátumot nyerünk. Ez elősegíti az immunitás-kompetens molekulaméret növekedést, fokozza az immunogenitást és így lehetővé teszi a nagyhatású pertusszisz toxoid előállítását.

A flokkulálási kezelést úgy végezzük, hogy a pertusszisz exotoxint tartalmazó folyadékhoz formalint, (azaz formaldehidnek 37 súly/térf. %-os vizes oldatát) vagy vízzel hígított formalint adunk lényegében véve bázikus aminosav, például L-lizin jelenléte nélkül (azaz 10 mmól-nál kisebb koncentrációban lehet jelen). Az elegyet addig inkubáljuk, míg a pertusszisz exotoxin lényegében véve detoxifikálódik. Előnyösen úgy járunk el, hogy a formalint vagy hígított formalint elkeverjük az exotoxint tartalmazó folyadékkal anélkül, hogy bázikus aminosavat adnánk hozzá, olyan mennyiségben, hogy az elegy formalin koncentrációja 0,1 és 0,6 térf.% között legyen. Az elegy formalin koncentrációját az inkubálás alatt esetleg adagolt további formalinnal a fenti értéktartárok között tartjuk, és az inkubálást 32 °C és 42 °C között 3-14 napig folytatjuk.

A fenti kezeléssel a pertusszisz exotoxint flokkulálva detoxifikáljuk, és egy flokkulált pertusszisz toxoidot tartalmazó szuszpenziót nyerünk. A keletkezett flokkulált toxoidot tartalmazó szuszpenziót valamilyen alkalmas módszerrel diszpergáljuk, például ultrahanggal 10-50 kHz-nél és így folyékony toxoidot kapunk.

A találmány szerinti eljárásban a fenti lépések közé egy dializálási kezelés iktatható be. A dialízis önmagában ismert módon hajtjuk végre.

Ugyanúgy, mint a számarköhögés vakcina teljes sejtjeiből való előállításakor, az így nyert pertusszisz toxoid folyadék is felhasználható kicsapott tisztított pertusszisz vakcina vagy kicsapott tisztított pertusszisz-diftéria-tetanusz kombinált vakcina előállítására és embereken való alkalmazására.

A találmány szerinti eljárást a következő példákkal illusztráljuk az oltalmi kör korlátozása nélkül.

A találmány szerinti eljárásban felhasznált *Bordetella pertussis* Tohama I törzsének tulajdonságait például az „Infection and Immunity” 6, 899-904 (1972) irodalmi hely ismerteti. A törzset a National Institute of Health, Tokio, Japan (NIHJ) tartja fenn, és az Institute for Fermentation, Osaka, Japan IFO-14073 szám alatt van depónálva.

1. példa

Bordet-Gengou táptalajt, melyet burgonya, pepton nátrium-klorid, agar és szarvasmarha vérből készítettünk (pontos összetételt l. Ann. Inst. Pasteur, 1906, 20, 731), beoltottuk *Bordetella pertussis* Tohama I törzssel, és 32 °C-on 2 napig inkubáltuk, majd az áttetsző kerek kolóniákat leszedtük, és a K agglutinációs antitest aktivitású kolóniákat újra Bordet-Gengou táptalajon tenyésztettük, és így nyertük az oltótenyészetet. A tenyésztő-táptalajt úgy készítettük, hogy Cohen-Wheeler táptalajt (összetételt lásd később 1. táblázatban) 121 °C-on 60 percig sterilizáltunk autoklávbán, gyorsan lehűtöttük 40 °C-ra. A táptalajt 37 °C-on tároltuk.

A fenti oltótenyészetet beoltottuk a tenyésztő-táptalajt oly módon, hogy a sejtkoncentráció 200–300 millió sejt/ml legyen, alaposan elkevertük és Roux palackokba adagoltuk 0,2 l-es részletekben, majd 37 °C-on inkubálva tenyésztettük. Az inkubálás ideje a sejtek növekedési ütemétől függött. A maximális sejtnövekedés az ötödik napon volt megfigyelhető, amikor a tenyészet csirke eritrociták elleni hemagglutinációs titere szintén maximális értéken volt [az „Infection and Immunity”, 7, 992-999 (1978) irodalmi helyen ismertetett módszer szerint mérve]. Ezért a tenyészeteket összegyűjtöttük és centrifugáltuk, majd 20,2 súly/térf.-os ammónium-szulfátot adtunk a felülúszóhoz. Jól elkevertük és az elegyet állni hagytuk 4 °C-on. 7 nap után leszívtuk a felülúszót, az üledéket összegyűjtöttük és percnkénti 8000 fordulattal 10 percig centrifugáltuk. A felülúszót elöntöttük. Az üledékhez térfogata tizedrészének megfelelő mennyiségű 1 mólos nátrium-klorid – 0,05 mólos foszfátpuffer (pH = 8,0) elegyet adtunk és jól elkevertük. Az elegyet újra állni hagyjuk 4 °C-on 7 napig, majd centrifugáltuk és a felülúszót összegyűjtöttük (1. extraktum). Ennek a felülúszónak nagy volt a leukocitózis gyorsító faktor (a továbbiakban LPF), hisztamin szenzitizáló faktor (a továbbiakban HSF) és sejt nélküli endotoxin tartalma. (A mérési módszert lásd később.) Az I. extraktumot újra koncentráltuk, azonos térfogatú telített ammóniával pH = 8,0-ra beállított ammónium-szulfátot adtunk hozzá, és az elegyet állni hagyjuk 4 °C-on. 7 napi állás után percnkénti 10 000 fordulattal 20 percig centrifugáltuk, az üledéket összegyűjtöttük és térfogata háromezred (1/300) részének megfelelő mennyiségű 1 mólos nátrium-klorid – 0,05 mólos foszfátpuffert (pH = 8,0) adtunk hozzá. Alapos elkeverés után féláteresztő membrán dialízis csövekbe helyeztük az ammónium-szulfát eltávolítása céljából, külső folyadékként pH = 8,0-as 1 mólos nátrium-klorid oldatot használtunk. A dializált koncentrátumot azután a következő szacharóz fajsúly-gradiens centrifugálásnak vetettük alá.

Az előzőleg sterilizált 1700 ml-es centrifuga forgórészét záróberendezéssel együtt alacsony fordulatszámmal forgattuk, és gradiens szivattyú segítségével 1300 ml 5 és 30 súly/térf.% közötti szacharózoldatot juttattunk bele. Azután 100 ml fenti dializált koncentrátumot és 300 ml fedőfolyadékot (0,5 mólos nátrium-klorid-oldat, pH = 8,0) adagoltunk. A forgórészt 98 400 g-vel 18,5 óra hosszat forgattuk.

Centrifugálás után 34 súly/térf.%-os szacharózoldatot adagoltunk alacsony fordulatszám mellett, és a forgórészben levő folyadékot 50–100 ml-es frakciókba gyűjtöttük (frakciók gyűjtése). A frakciók szedését az alacsony fajsúlyú szacharóz oldatoktól kezdtük, és a nagy

hemagglutinációs titerű (HA) (több mint 20 titer/ml, előnyösen 500 titer/ml) és endotoxinszegény frakciókat gyűjtöttük. Az endotoxin hiányát nyulakon végzett pirogenitási próba alapján ítéltük meg. Ezt úgy végeztük, hogy minden frakcióból vett mintát 100 °C-on melegítettünk 3 percig és 20 HA-titer/ml-re hígítottuk fiziológiai sóoldattal. Ezt a hígított oldatot intravénásan beadtuk nyulaknak 1 ml/testsúly kg dózisban. Azokat a frakciókat, amelyek 3 órán belül nem okoztak lázat, elkülönítettük és összegyűjtöttük mint exotoxin tartalmú folyadékokat.

Az exotoxin tartalmú folyadékot 1/250 mólos foszfáttal pufferolt sóoldattal (pH = 7,0) mintegy 50 µg/ml fehérjeeredetű nitrogéntartalomig hígítottuk. Ebben a lépésben zselatint, Tween 80-at (polioxietilén-szorbitán-monooleát, Kao-Atlas, Japan) és tiomerzált adtunk hozzá olyan mennyiségben, hogy a zselatinkoncentráció 0,02 súly/térf.%, a Tween 80 koncentráció 0,05 térf.% és a tiomerzál koncentráció 0,01 súly/térf.% legyen. Ehhez a folyadékhoz 39 °C-os inkubátorban, bázikus aminosav hozzáadása nélkül annyi formalint adtunk, hogy annak koncentrációja az elegyben 0,2 térf.% legyen. Alapos keverés után egy napig inkubáltuk 39 °C-on, majd további formalint adtunk hozzá, a formalinkoncentrációt 0,3 térf.%-ra állítottuk be. Alapos elkeverés után 2 napig inkubáltuk, majd további formalin adagolásával 0,4 térf.%-ra állítottuk be a koncentrációt, alaposan elkevertük és tovább inkubáltuk. A teljes inkubálás 5 napig tartott. A keletkezett flokkulált toxoidot tartalmazó szuszpenziót 0,01 térf.%-os formalinos fiziológiai sóoldattal mint külső folyadékkal szemben dializáltuk. A fenti szuszpenzió dialízisét egy membrán dialízis csőben végeztük, és 12,5-szeres belső folyadékot használtunk a fent említett külső folyadékhöz képest. A dialízist 4 °C-on 2 napig végeztük, mialatt a külső folyadékot állandóan kevertük. A külső folyadékot 2 nap után frissel cseréltük ki és a dialízist megismételtük. A dializált flokkulátum-szuszenziót különböző pertussisz vakcinák ellenőrzésére szolgáló tesztekkel vizsgáltuk. A végső térfogatra való beállítás előtt a flokkulált toxoid szuszpenziót 10 kHz-es ultrahangos kezelésnek vetettük alá 5 percig, majd 400-as lyukméretű szűrőn szűrtük, és így a végső pertussisz toxoidot tartalmazó folyadékot kaptuk. Kontrollként a külső folyadékot formalinnal kezeltük 0,05 mól L-lizin hozzáadása mellett, majd a fenti kezelésnek vetettük alá, így kaptuk a kontroll folyadékot.

A fenti módon kapott pertussisz toxoidot tartalmazó folyadékot és a kontroll folyadékot Levine módszerével kezeltük (Reo Levine, Joseph L. Stone and Louise Wyman: Factors affecting the efficiency of aluminium adjuvant in diphtheria and tetanus toxoid. J. Immunology 75, 301-307, 1975). Eszerint mindkét folyadékot 1/250 mólos 7,0-es pH-jú foszfáttal pufferolt sóoldattal hígítottuk, 20 µg/ml vagy ennél kisebb fehérjeeredetű nitrogéntartalom értékig. Azután alumínium-kloridot adtunk az oldathoz, melynek koncentrációját 0,18 súly/térf.%-osra állítottuk be. Az elegyet alaposan elkevertük és pH-ját sósavval vagy nátrium-hidroxiddal 7,0-re állítottuk be. Így alumíniummal kicsapott vakcinát kaptunk, melynek koncentrációja 0,2 mg alumínium/ml-ben kifejezve. Ennek a terméknek a tulajdonságait a 2. táblázatban foglaltuk össze. Statisztikai értékelés után azt találtuk, hogy az LPF érték akkor elfogadható, ha annak értéke nem több mint 0,5 LP-egység/ml (LP-egység:

leukocitózis gyorsító egység, a „Medicine and Biology”, 83, 117-123 irodalmi helyen ismertetett módszer szerint meghatározva), és nem elfogadható, ha ettől eltérő. Hasonlóan, HSF érték elfogadható, ha nem több mint 0,8 HS-egység/ml (HS-egység: hisztamin szenzitizáló egység a „Journal of Biological Standardization”, 7, 21-29, 1979 irodalmi helyen ismertetett módszer szerint meghatározva) és nem elfogadható, ha ettől eltérő. Az egérvédési hatás (az Am. J. Public health 37, 803-810, 1947 irodalmi helyen ismertetett módszer szerint mérve), hasonlóan statisztikai értékelés után, akkor elfogadható, ha értéke legalább 8 nemzetközi egység milliliterenként vagy ennél több (3 héttel az immunizálás után), és nem elfogadható, ha ettől eltérő.

Amint a 2. táblázatból kitűnik, a találmány szerinti detoxifikálási eljárással dolgozva 14 egymást követő eljárásban nem kaptunk el nem fogadható LPF, HSF és egérvédési hatás-értékű terméket, az átlagos érték 13,5 nemzetközi egység volt milliliterenként. Ezzel szemben, amikor L-lizint adtunk az elegyhez, 23 termelési ciklus terméke esetén 4 esetben az LPF érték, 8 esetben a HSF érték és 10 esetben az egérvédési hatás érték nem volt megfelelő, az átlagos elfogadhatósági érték $6/23=26\%$ volt.

1. táblázat

A használt Cohen–Wheeler táptalaj összetétele

5	Oldható keményítő	225 g
	NaCl	375 g
	K H ₂ PO ₄	75 g
	MgCl ₂ ·6H ₂ O	750 ml (8 súly/térf.%-os oldat)
	CaCl ₂	75 ml (2 súly/térf.%-os oldat)
10	CuSO ₄ ·5H ₂ O	112,5 ml (0,1 súly/térf.%-os oldat)
	Nátrium-L-glutamát	30 g
	Nikotinamid	4,5 g
	Kazein	1800 g
15	Cisztein-hidroklorid	4,5 g
	Tris-puffer	12,5 l

A táblázatban szereplő anyagokat desztillált vízzel 150 l-re hígítottuk, pH-ját 7,0 és 7,2 közötti értékre állítottuk be és sterilizáltuk, majd a következő anyagokat adtuk hozzá:

	Glutation (redukált forma)	50 ml (1 súly/térf.%-os oldat)
20	FeSO ₄ ·7H ₂ O	50 ml (1 súly/térf.%-os oldat)
25		

2. táblázat

Találmány szerinti eljárás			Detoxifikálás L-lizin hozzáadásával					
LPF	HSF	Egérvédési hatás	LPF	HSF	Egérvédési hatás	LPF	HSF	Egérvédési hatás
0	0	8,0	x	x	4,2 ^Δ	0	0	3,0 ^Δ
0	0	14,5	x	x	6,9	0	0	3,0 ^Δ
0	0	12,8	0	x	11,3	0	0	7,0
0	0	10,0	0	x	10,0	0	0	5,0
0	0	12,0	0	x	10,2	0	0	2,2 ^Δ
0	0	15,0	0	x	1,5 ^Δ	0	0	8,4
0	0	13,0	x	x	8,0	0	0	2,0 ^Δ
0	0	18,0	x	0	7,5	0	0	3,0 ^Δ
0	0	11,0	0	x	14,1	0	0	1,8 ^Δ
0	0	12,2				0	0	4,5 ^Δ
0	0	15,2				0	0	4,5 ^Δ
0	0	14,3				0	0	8,0
0	0	18,1				0	0	7,7
0	0	15,5				0	0	5,9
Átlagérték 13,5			Átlagérték: 8,2			Átlagérték: 4,7		
LPF 0: Kevesebb, mint 0,5 LPegység/ml-nek megfelelő x: más mint 0 (nem elfogadható)			HSF 0: Kevesebb mint 0,8 HS egység/ml-nek megfelelő x: más mint 0 (nem elfogadható)			Egérvédési hatás: nemzetközi egység/ml ^Δ : nem megfelelő hatás (nem elfogadható)		

2. példa

Szabadalmi igénypontok

Az 1. példában leírt módon nyert pertusszisz toxoidot tartalmazó folyadékot, a Japanese Biological Products Standard-nak megfelelő diftéria toxoidot tartalmazó folyadékot és ugyanolyan minőségű tetanusz toxoidot az 1. példában leírt módon kicsapós kezelésnek vetettünk alá, és így kicsapott tisztított kombinált pertusszisz-diftéria-tetanusz vakcinát állítottunk elő. A kombinált vakcina összetétele a következő volt:

Pertusszisz toxoid: fehérje eredetű nitrogéntartalom:

	kb. 15 µg/ml
Diftéria toxoid:	kb. 30 Lf/ml
Tetanusz toxoid:	kb. 5 Lf/ml
Alumínium:	kb. 0,2 mg/ml
Tiomerzál:	0,01 súly/térf. %.

Az előállított kombinált vakcina alapvető tulajdonságai a következők: pH = 7,0; pirogenitás nyúlón (50-szeresre hígítva, fiziológiás sóoldattal, intravénásan 1 ml/testsúly kg dózisban adagolva) negatív; egér testsúly csökkenés kevesebb mint 10 BWDU/ml (BWDU = testsúly csökkentési egység, a J. Med. Sci. Biol. 21, 115-135 irodalmi helyen ismertett módszer szerint mérve); egér leukocitózis gyorsító aktivitás kevesebb mint 0,5 LPU/ml; egér hisztamin szenzitizáló aktivitás kevesebb mint 0,8 HSU/ml; pertusszisz toxoid tartalom 8 nemzetközi egység/ml; diftéria toxoid tartalom 45 nemzetközi egység/ml; tetanusz toxoid tartalom 30 nemzetközi egység/ml.

A kombinált vakcinát embereknek lehet adagolni például a következő ütemezés szerint:

3-48 hónapos gyerekeknek 0,5 ml vakcinát adunk be szubkután úton 3-szor 2-8 hetes időközönként. 12-18 hónappal az utolsó oltás után további 0,5 ml vakcinát adunk be szubkután úton minden gyermeknek.

1. Eljárás pertusszisz toxoid előállítására, *azzal jellemezve*, hogy valamely *Bordetella pertussis* I törzs, előnyösen *Bordetella pertussis* Tokama I (IFO-14073) törzs tenyészetének dializált vagy dializálatlan felülúszójából vagy annak koncentrátumából fajsúly- vagy molekulásúly különbségen alapuló módszerekkel eltávolítjuk az endotoxint, és az így kapott folyadékot formaldehiddel keverjük úgy, hogy a formaldehid koncentrációja 0,1 és 0,6 térfogat% között legyen, majd az elegyet 32 °C és 42 °C közötti hőmérsékleten az exotoxin detoxifikálódásáig, előnyösen 3-14 napig inkubáljuk és ilyen módon a pertusszisz exotoxint flokkuláljuk, és kívánt esetben a flokkulált exotoxint tartalmazó szuszpenziót dializáljuk, és kívánt esetben a dializált vagy dializálatlan, a flokkulált exotoxint tartalmazó szuszpenziót előnyösen ultrahangos kezeléssel diszpergáljuk.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás foganatosítási módja, *azzal jellemezve*, hogy az endotoxin eltávolítását úgy végezzük, hogy a tenyészet felülúszóját vagy annak koncentrátumát 0 és 60 súly% közötti szacharóz fajsúly-gradiens mellett 62000 és 122000 g közötti értéknél 10-24 óra hosszat centrifugáljuk.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás foganatosítási módja, *azzal jellemezve*, hogy a flokkulált anyagot ultrahangos kezeléssel diszpergáljuk a képződő szuszpenzióban.

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás foganatosítási módja, *azzal jellemezve*, hogy egy dializáló kezelést iktatunk a megfelelő lépések közé.

5. Az 1. igénypont szerinti eljárás foganatosítási módja, *azzal jellemezve*, hogy a tenyészet felülúszójának koncentrátumát oly módon készítjük, hogy a felülúszót ammónium-szulfáttal kisózzuk.

5. Az 1. igénypont szerinti eljárás foganatosítási módja, *azzal jellemezve*, hogy *Bordetella pertussis* I törzsként *Bordetella pertussis* Tohama I (IFO-14073) törzset használunk.

Ábra nélkül

Kiadja az Országos Találmányi Hivatal
A kiadásért felel: Himer Zoltán osztályvezető
Megjelent: a Műszaki Könyvkiadó gondozásában

COPYLUX Nyomdaipari és Sokszorosító Kiszövetkezet