

**NORGE**



**STYRET  
FOR DET INDUSTRIELLE  
RETTSVERN**

**Utlegningsskrift nr. 117493**

Int. Cl. A 61 k 3/62 Kl. 30h-6

Patentsøknad nr. 160.853 Inngitt 10.XII 1965

Løpedag -

Søknaden alment tilgjengelig fra 1.VII 1968

Søknaden utlagt og utlegningsskrift utgitt 18.VIII 1969

Prioritet begjært fra: 11.XII-64 USA,  
nr. 417.828

---

Merck & Co., Inc.,  
126 East Lincoln Avenue, Rahway, New Jersey, USA.

Oppfinner: Irving Millman,  
West Point, Pa., USA.

Fullmektig: Siv. ing. Erling Quande.

Fremgangsmåte ved fremstilling av et antigen av  
Bordetella pertussis.

Foreliggende oppfinnelse angår en ny fremgangsmåte ved fremstilling av et antigen av Bordetella pertussis.

Kikhoste er en akutt, meget overførbar, smittsom sykdom som bevirkes av B. pertussis, som i barn under fire år er farlig og antagelig inntar førsteplassen som årsak til barnedødelighet. Immunisering mot denne sykdom har hittil vært oppnådd ved injeksjon av drept-celle-vaksine eller ekstrahert antigen. Den hyppige inntreden av bireaksjoner, som feber, irritabilitet, inflammasjon og nekrose, og den sjeldne, men nedtrykkende melding om hjernebetennelse har imidlertid utgjort en virksom stimulans for forskning for å finne en bedre vaksine.

Det er også kjent å ekstrahere antigen fra hele B. pertussis-celler med natriumdesoxycholat (J. Immunology 90, 72-80). Herved

ekstraheres imidlertid også giftstoffer som er tilstede i protoplasmaet, og når disse giftstoffer fjernes, senkes utbyttet av antigen.

Foreliggende oppfinnelse bygger på den erkjennelse at det meste av antigenet finnes i selve celleveggen og ikke i det materiale som omsluttet av veggen. Protoplasmaet i cellen, som inneholder hoveddelen av det nitrogenmateriale, har liten eller ingen beskyttende virkning. Protoplasmaet inneholder imidlertid en høy konsentrasjon av giftig protein som kan bevirke død hos laboratoriedyr og uønskede bivirkninger når det er tilstede i vaksiner som administreres klinisk. Ved foreliggende fremgangsmåte utnyttes denne erkjennelse ved å sprengne cellene, kaste innholdet av cellene, beholde celleveggene og ekstrahere antigenet fra de isolerte cellevegger. Da man således ekstraherer et materiale som foruten at det har et høyere innhold av det ønskede produkt, også har et lavere innhold av giftige forbindelser, er det åpenbart at man får et renere produkt i høyere utbytte.

Ved foreliggende fremgangsmåte fremstilles et antigen av *Bordetella pertussis* ved hvilken celler av *B. pertussis* sprenges mekanisk og cellematerialet suspenderes i vann til en suspensjon inneholdende  $100 \times 10^9$  -  $2000 \times 10^9$  celler pr ml, hvorefter pH i suspensjonen innstilles på 8 - 10 og antigenet ekstraheres ved tilsetning av et alkalimetallsalt av desoxycholsyre til en konsentrasjon av 0,1 - 10%, idet fremgangsmåten er karakterisert ved at man efter den mekaniske sprengning av cellene skiller alt celleveggmaterialet fra protoplasmaet og utfører ekstraksjonsbehandlingen bare på celleveggmaterialet.

I henhold til foreliggende fremgangsmåte sprenges den intakte *B. pertussis*-celle og celleveggene isoleres ved sentrifugering eller på annet mekanisk vis. De isolerte cellevegger vaskes så praktisk talt frie for cellemateriale og ekstraheres som ovenfor angitt, fortrinnsvis med natrium- eller kaliumsalt av desoxycholsyre.

*B. pertussis*-cellene som anvendes ved foreliggende fremgangsmåte, kan dyrkes i et hvilket som helst kjent, egnet medium, som det trekull-agar-medium som er beskrevet av Powell et al [Public Health Reports 66:346 (1951)] det flytende medium beskrevet av Verwey et al (J. Bact. 58:127) eller i Cohen-Wheeler-kultur-medium [Amer. J. Pub. Health 36:371 (1946)]. Efter vekstperioden høstes cellene

ved sentrifugering og kan anvendes som høstet ved foreliggende fremgangsmåte eller cellepastaen kan fryses og lagres ved  $-30^{\circ}\text{C}$  inntil den trenges. Om ønskes kan de høstede celler lyofiliseres og derpå lagres inntil de trenges, eller cellene kan drepes med "Thimerosal" eller ved andre metoder som er kjent for å drepe beskyttende antigen fra *B. pertussis*.

Cellene resuspenderes i koldt ( $2 - 5^{\circ}\text{C}$ ) destillert vann og underkastes sprengende dekompresjon i en "Ribi Cell Fractionator" (Ivan Sorvall, Inc., Norwalk, Conn.) ved  $2100 \text{ kg/cm}^2$  og en temperatur på  $20^{\circ}\text{C}$  eller mindre. Skjønt gode resultater fåes ved anvendelse av  $2100 \text{ kg/cm}^2$  trykk, har det vist seg at tilfredsstillende resultater fåes når trykkene ligger mellom  $1050 - 3515 \text{ kg/cm}^2$ . Andre måter for å sprengne cellene og isolere celleveggene kan også anvendes, såsom lydsvingninger, mekanisk maling, etc., men erfaring viser at "Ribi"-trykkcellen gir de høyeste utbytter av rent veggmateriale. Før anvendelse steriliseres den anvendte "Ribi Cell Fractionator" fortrinnsvis ved å utsette alle dens røranordninger for ethylenoxyd i 24 timer og derpå spyle med steril nitrogengass. Trykkcellen steriliseres i en time, fortrinnsvis ved å bringe alle dens deler i kontakt med  $\beta$ -propiolacton (0,5 prosent) og derpå spyle med sterilt destillert vann. Et flerfase bakterietilbakeholdende filter eller annet passende filter forbinder dekompresjonskammeret med en nitrogenbeholder.

*B. pertussis*-cellesuspensjonen mates i kompresjonskammeret i fraksjonatoren hvor de underkastes et trykk på  $1050 - 3515 \text{ kg/cm}^2$  hvilket tvinger cellene inn i dekompresjonskammeret hvor de sprengeksplodt. Dekompresjonskammeret holdes ved  $20^{\circ}\text{C}$  eller derunder med foravkjølet nitrogengass som føres gjennom multifasefilteret og inn i kammeret. Avløpet fra dekompresjonskammeret inneholdende celleveggene og protoplasma oppsamles i en steril beholder neddykket i et isbad.

Avløpet inneholdende det sprenge cellemateriale sentrifugeres, den overstående væske kastes og celleveggmaterialet som er tilbake, kan vaskes med koldt destillert vann for å fjerne meget giftige, oppløselige protoplasmabestanddelene. Enten vaskede eller uvaskede cellevegger suspenderes i en puffer for å få en konsentrasjon mellom ca.  $100 \times 10^9$  celler pr ml til  $2000 \times 10^9$  celler pr ml, skjönt for praktiske formål anvendes i alminnelighet en konsentrasjon på  $200 \times 10^9$  celler pr ml. Det beskyttende antigen ekstraheres

117493

4

så ved å tilsette til celleveggsuspensjonen et salt av desoxy-cholinsyre til en sluttkonsentrasjon på fra 0,1 til 10 prosent, for maksimum ekstraksjon er imidlertid sluttkonsentrasjonen fortrinnsvis 0,25 til 1 prosent. Et pH-område fra ca. 8 til 10 har vist seg meget tilfredsstillende ved ekstraksjon, skjönt lavere eller høyere-alkaliske betingelser kan anvendes med varierende utbytter av beskyttende antigen.

Cellevegg-desoxycholol-blandingen omrøres forsiktig kontinuerlig i fra 18 til 48 timer mens temperaturen holdes mellom ca. 2 - 5°C. Materialet sentrifugeres og den overstående væske dialyseres mot puffer (0,01M fosfatpuffer) i et pH-område fra 7 til 7,7 for å eliminere desoxycholol. Det ikke-dialyserbare materiale inneholdende det beskyttende antigen innstilles på pH 7,0 og fortynnes til en konsentrasjon som svarer til standardene foreskrevet av helsemyndighetene. Oppløsningen av beskyttende antigen kan konserveres med en effektiv mengde konserveringsmiddel, såsom "Thimerosal", "Benzethoniumklorid", benzylalkohol, gammapicoliniumklorid eller annet kjent anvendbart konserveringsmiddel, og fortynnes til den ønskede styrke.

Det beskyttende antigen som erholdes ved foreliggende fremgangsmåte, kan anvendes ved fremstilling av en vandig vaksine eller antigenet kan først adsorberes på hjelpemidler, såsom aluminiumhydroxyd eller -fosfat eller felles med alun, og derpå overføres til en vaksine. Da det beskyttende antigen er forlikelig med andre antigener og/eller toksoider, kan det kombineres med disse på konvensjonelt vis for å danne en polyvalent vaksine i enhetsdoseform.

Foreliggende oppfinnelse har en rekke tydelige fordeler. Produktet er fritt for alle protoplasma-bestanddeler hvorav en, det varmelabile toksin, er kjent for å være meget giftig overfor laboratoriedyr, og kan være årsak til noen av bivirkningene på mennesker. Produktet er fritt for næringsmedium, celleavfall og fremmede kjemiske forbindelser. Produktet er forlikelig med andre antigenmaterialer som vanligvis forenes med intakt pertussis-celleantigen. Fremgangsmåten er enkel og lett å utføre og er reproducerbar under dannelse av høye utbytter av aktivt materiale.

Fremgangsmåten er beskrevet i detalj i de følgende eksempler.

Det vil innsees at modifikasjoner kan gjøres i de forskjellige teknikker som anvendes ved utførelse av foreliggende fremgangsmåte, idet det viktige trekk er ekstraksjonen med desoxycholat av det beskyttende antigen fra *B. pertussis*-cellevegger som er isolert fra protoplasma såvel som fra andre fremmedforbindelser.

#### Eksempel 1

Cellene fra en 48 timers kultur av *B. pertussis*, dyrket på Cohen-Wheeler-medium høstes ved å innstille mediet på pH 7,0 med konsentrert saltsyre og sentrifugere i en Sharples sentrifuge. Den erholdte cellepasta resuspenderes i destillert vann, føres gjennom en 200 mesh hylonsikt for å fjerne store partikler og filtratet innstilles på en konsentrasjon av  $500 \times 10^9$  celler/ml. Cellekonsentrasjonen bør fortrinnsvis være i området  $100 \times 10^9$  -  $1000 \times 10^9$  celler/ml ved foreliggende fremgangsmåte.

Cellekonsentratet (1600 ml) mates i en på forhånd sterilisert "Ribi Cell Fractionator" og utsettes for et trykk på  $2100 \text{ kg/cm}^2$ . Cellene under trykk ekstruderes i dekompresjonskammeret som holdes ved  $20^\circ\text{C}$  eller derunder med avkjølt nitrogengass, hvor cellene sprenges eksplosivt. Cellematerialet renner av fra dekompresjonskammeret i et sterilt kar neddykket i et isbad hvorved man får 1600 ml avløpsvæske.

Avløpsvæsken sentrifugeres i et "Spinco 18.000" satsrotorhode ved 16.000 omdreininger pr minutt i tre timer. Annet sentrifugeutstyr kan anvendes såsom for eksempel Sharples sentrifugen. Den overstående væske dekanteres fra rotorhodet og hodet kan så påfylles igjen og roteres en eller flere ganger, eventuelt uten å fjerne residuet. Den overstående væske som fjernes og kastes, inneholder den meget giftige protoplasma-fraksjon av cellekonsentratet.

Residuet eller sedimentet som er tilbake i rotorhodet, fjernes fortrinnsvis ved å tilsette stålkuler til rotorhodet og forsiktig rotere hodet ved å anbringe det på en rullemekanisme. Andre kjente metoder kan også anvendes for å løsne residuet fra rotorhodet.

Residuet vaskes ut av rotorhodet med kaldt, destillert vann ( $2 - 5^\circ\text{C}$ ) (ca. 800 ml), pH innstilles på 8,5 ved tilsetning av 10 prosentig natriumhydroxyd (ca. 1,0 ml) og sluttvolumet av

117493

6

celleveggsuspensjonen innstilles på 1600 ml med kaldt destillert vann ( $2 - 5^{\circ}\text{C}$ ). En steril 2%ig oppløsning av natriumdesoxycholat fremstilles ved en pH på 8,5 (justert med 1N natriumhydroxyd for varmesterilisering) og 1600 ml av denne oppløsning forenes med vegguspensjonen. Koldt, sterilt, destillert vann tilsettes (800 ml) hvorved man får 4000 ml vegguspensjon med en pertussis-konsentrasjonsekvivalent på  $200 \times 10^9$  celler pr ml og en desoxycholat-konsentrasjon på 1,0%. Konsentrasjonene av cellevegg og ekstraksjonsmateriale kan likeledes innstilles på en pertussis-konsentrasjonsekvivalent på  $100 \times 10^9 - 2000 \times 10^9$  celler pr ml og desoxycholat mellom 0,1 - 10%. Suspensjonen beveges forsiktig i en mekanisk ryster ved en temperatur på  $2 - 5^{\circ}\text{C}$  i 18 - 24 timer, og sentrifugeres så i et "Spinco 18.000" sats-rotorhode (eller annen sentrifuge) ved 16.000 omdreininger pr minutt (gjennomsnittlig 30.100 g) i en time. Den ovenstående væske dekanteres og gjemmes og rotorhodet kan anvendes igjen gjentatte ganger for å sentrifugere ut ytterligere mengder av celleveggsuspensjon uten å fjerne sedimentet.

Porsjonene av overstående væske inneholdende beskyttende antigen og natriumdesoxycholat forenes og dialyseres mot 0,01M fosfatpuffer, pH 7,4 - 7,7, inntil intet desoxycholat kan påvises i dialysatet ved tilsetning av konsentrert saltsyre. Vanligvis inntrer endepunktet for desoxycholat-påvisning ved det fjerde bytte av puffer, idet hvert bytte tilsvare ca. 135 liter puffer som holdes i en periode på 48 - 72 timer. Desoxycholatet kan skilles fra på annet kjent vis, såsom ved å føre de forenede overstående væsker gjennom "Sephadex" gel eller ved ultrafiltrering, skjönt dette kan koste noe aktivitet.

Det ikke-dialyserbare ekstrakt, som nu har et volum på 4500 ml inneholder når det fortynnes til en ekvivalent på  $32 \times 10^9$  celler/ml, 14,7 beskyttende enheter pr ml, sammenlignet med N.I.H. (National Institutes of Health) nr. 6 kontrollprøve med 8 beskyttende enheter pr ml og kan anvendes ved fremstilling av vandige, hjelpe- eller multivalente vaksiner.

Aktiviteten av celleekstraktet og N.I.H. kontrollprøven bestemmes ved å administrere seriefortynninger av ekstraktet og kontrollprøven til adskilte grupper av mus og derpå påvirke dyrene intracranialt med 0,03 ml av en fortynning av kjent virulent B. pertussis inneholdende  $10^5$  organismer/ml. De erholdte resultater er angitt i tabell I.

T a b e l l I

|                    | 0,05 <sup>1)</sup>                 | 0,01 <sup>1)</sup>                | 0,002 <sup>1)</sup>                | ED <sub>50</sub> <sup>2)</sup> | Pålite-<br>lighets-<br>grenser | P.U./<br>ml. <sup>3)</sup> |
|--------------------|------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|----------------------------|
| Eks. 1<br>ekstrakt | 29/32 <sup>4)</sup>                | 8/32                              | 1/32                               | 0,0165                         | 85-118%                        | 14,7                       |
| N.I.H.<br>nr. 6    | <u>0,06</u> <sup>1)</sup><br>25/31 | <u>0,02</u> <sup>1)</sup><br>4/32 | <u>0,002</u> <sup>1)</sup><br>0/32 | 0,0304                         | 85-118%                        | 8                          |

1) fortynning

2) dose som bevirker beskyttelse av 50% av de infiserte dyr

3) beskyttende enheter/ml

4) overlevende dyr/prøvede dyr.

Det beskyttende antigenekstrakt (P.A.) i eksempel 1 ble funnet å være ikke-giftig i henhold til N.I.H. standard som krever at der, ved intraperitoneal injeksjon av 0,5 av en enkelt menneskedose i mus, ikke er noe vekttap i tre dager, en netto økning på 3 gram i syv dager og ikke mere enn 5% dødelighet hos dyrene anvendt ved undersøkelsen. Ved I.P.-injeksjon av 0,25 ml beskyttende antigenekstrakt fra eksempel I i ti mus, ble der iaktatt en gjennomsnittlig vektøkning på 2,1 g etter tre dager, og en gjennomsnittlig økning på 6,5 g etter syv dager, uten noen dødsfall ved slutten av forsøksperioden.

Ekstraktet fra eksempel 1 besto også dyresikkerhetsprøven, idet ingen dødsfall og ingen symptomer inntrådte når 0,5 av en enkelt menneskedose ble injisert i hver av to 20 g mus og tre ganger en enkelt menneskedose ble injisert i hver av to 350 g marsvin.

Konvensjonelle sterilitetsprøver viste at ekstraktet var fritt for mugg og bakterier.

Elektroforetisk- og ouchterloni-analyse viste at ekstraktet fra eksempel 1 manglet den vesentlige mengde av protoplasma og veggantigen-materialer andre enn det beskyttende antigen. Sluttvaksinen inneholdt en tredjedel eller mindre av det totale nitrogen som finnes i konvensjonelle vaksiner.

**117493**VaksinefremstillingVandig vaksine

Det beskyttende antigenekstraktkonsentrat fra eksempel 1 ble innstilt med pufferet saltlake (pH 7,2) inneholdende "Thimerosal" 1:10.000 til en sluttkonsentrasjon på  $32 \times 10^9$  celler pr ml eller derunder. Denne vaksine forblir stabil ved lagring ved 2 - 5°C.

Hjelpevaksine

Til 4600 ml beskyttende antigenkonsentrat fra eksempel 1 tilsettes 500 ml steril 10%ig kalialun og pH innstilles på 7,3 med kold (2 - 5°C) 10%ig natriumhydroxydoppløsning. Materialet lagres ved 2 - 5°C i 24 timer og sentrifugeres så ved 2000 omdreininger pr minutt i ca. 15 minutter i en "International" sentrifuge holdt ved 2 - 5°C. Den overstående væske kastes. Sedimentet resuspenderes i pufferet saltlake, pH 7,2 til et sluttvolum på 3000 ml med en konsentrasjon på  $267 \times 10^9$  celler pr ml ekvivalent. Vaksinekonsentrasjonen kan innstilles på  $32 \times 10^9$  celler pr ml ekvivalent eller mindre ved tilsetning av steril saltlake, pH 7,2, eller 0,3M glycin puffer. "Thimerosal" tilsettes som konserveringsmiddel i en mengde tilstrekkelig til å gi en konsentrasjon på 1:10.000 når det er for-  
tynnet. Denne vaksine forblir stabil ved lagring ved 2 - 5°C.

Multivalente vaksiner

Toxoider, såsom difteri- og tetanus toxoider, kan tilsettes til ovenstående vandige eller hjelpe-vaksiner for å få en multivalent vaksine hvori toxoidene er tilstede i konsentrasjoner som vanligvis anbefales.

P a t e n t k r a v

Fremgangsmåte ved fremstilling av et antigen av Bordetella pertussis ved hvilken celler av B. pertussis sprenges mekanisk og cellematerialet suspenderes i vann til en suspensjon inneholdende  $100 \times 10^9$  -  $2000 \times 10^9$  celler pr ml, hvorefter pH i suspensjonen innstilles på 8 - 10 og antigenet ekstraheres ved tilsetning av et alkalimetallsalt av desoxycholsyre til en konsentrasjon av 0,1 - 10%, k a r a k t e r i s e r t v e d at man efter den mekaniske sprengning av cellene skiller alt celleveggmaterialet fra protoplasmaet og utfører ekstraksjonsbehandlingen bare på celleveggmaterialet.

Anførte publikasjoner:

J. Immunology 90, 72-80 (1963)