



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

PATENTSCHRIFT

(19) **DD** (11) **270 657 A1**

4(51) **A 61 K 39/10**
C 12 N 1/20

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP A 61 K / 314 849 h	(22)	18.04.88	(44)	09.08.89
------	-----------------------	------	----------	------	----------

(71)	Staatliches Institut für Immunpräparate und Nährmedien, Klement-Gottwald-Allee 317/321, Berlin, 1020, DD Nikolajewski, Hans-Edmund, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Swidsinski, Sonja, Dr. med.; Liepert, Harald, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Mrasek, Ingrid; Wettig, Gudrun; Kant, Edith, DD
(72)	

(54)	Verfahren zur Züchtung von <i>Bordetella pertussis</i>
------	--

(55) Verfahren, Züchtung, *Bordetella pertussis*, Impfstoffproduktion, Antigenausbeute, Glutaminsäurezusatz, Sauerstoffregulation

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Züchtung von *Bordetella pertussis*. Anwendungsgebiet der Erfindung ist die Impfstoffproduktion. Erfindungsgemäß erfolgt die Züchtung von *Bordetella pertussis* in einem flüssigen Nährmedium unter Zudosierung von Glutaminsäure und synchroner Regulation des Sauerstoffeintrages.

ISSN 0433-6461

5 Seiten

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Züchtung von *Bordetella pertussis* in einem flüssigen Nährmedium, **dadurch gekennzeichnet**, daß man unter Kultivationsbedingungen Glutaminsäure zudosiert und in dazu synchroner Weise den Sauerstoffeintrag reguliert.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Zudosierung von Glutaminsäure in Form von Na-Glutamat entweder komplett vor Beimpfung des Nährmediums mit *B. pertussis* oder in Teilmengen vor und während der Züchtung erfolgt.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß man Glutaminsäure in Mengen zwischen 2–20 g/l Nährmedium zusetzt.
4. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß man Glutaminsäure in Mengen zwischen 3–10 g/l Nährmedium zusetzt.
5. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Belüftung des Nährmediums so reguliert wird, daß ein Sauerstoffeintrag zwischen 15–35 mmol O₂/lh gewährleistet ist.
6. Verfahren nach Anspruch 1 und 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Belüftung des Nährmediums so reguliert wird, daß ein Sauerstoffeintrag zwischen 25–32 mmol O₂/lh gewährleistet ist.
7. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß während der Kultivation auftretender Schaum durch Einsatz mechanisch wirkender Mittel und/oder chemischer Anti-Schaum-Reagenzien bekämpft wird.
8. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß man den pH-Wert des Nährmediums während der Züchtung zwischen 6,5–9,0 einstellt.
9. Verfahren nach Anspruch 1 und 8, **dadurch gekennzeichnet**, daß man den pH-Wert des Nährmediums während der Züchtung zwischen 7,3–8,5 einstellt.
10. Verfahren nach Anspruch 1, 8 und 9, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Regulation des pH-Wertes durch Einleiten von gasförmigem Kohlendioxid (CO₂) erfolgt.
11. Verfahren nach Anspruch 10, **dadurch gekennzeichnet**, daß die pH-Regulation durch CO₂-Gas mit einem Durchsatz von 0,01–0,08 vvm kontinuierlich oder in Intervallen in das Nährmedium erfolgt.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Kultivation von *Bordetella pertussis*-Bakterien zur Herstellung einer pertussisvakzine zur aktiven Immunisierung gegen Keuchhusten und zur Gewinnung von Antigenpräparaten zur Antikörperbestimmung gegen *B. pertussis*. Anwendungsgebiet der Erfindung ist die pharmazeutische Industrie (Impfstoffproduktion).

Charakterisierung des bekannten Standes der Technik

Die herkömmlichen Pertussis-Impfstoffe zur aktiven Immunisierung gegen Keuchhusten enthalten meist abgetötete Keime von *Bordetella pertussis*. Von den Pertussis-Keimen ist bekannt, daß sie beim Impfling häufig lokal an der Impfstelle Schmerzen und Entzündungen, aber auch Fieber und in seltenen Fällen zudem neurologische Komplikationen, wie z. B. Enzephalitis, verursachen.

Die seit einiger Zeit unternommenen Bemühungen zur Entwicklung einer nebenwirkungsfreien oder -armen Pertussis-Vakzine führten zur Aufklärung der Rolle einer Reihe von protektiven Antigenen im Krankheitsverlauf des Keuch Hustens, die von *B. pertussis* produziert werden.

Zu den als wesentlich erkannten protektiven Antigenen von *B. pertussis* gehören die Hämagglutinine FHA (Filamentöses Hämagglutinin) und PT (Pertussis-Toxin).

So wurde seit 1981 in Japan eine zellfreie Vakzine aus FHA und PT entwickelt, die im Vergleich zur Vollkeim-Vakzine vergleichbare immunologische und deutlich verringerte reaktogene Wirkungen aufweist.

Dazu ist es erforderlich, diese durch *B. pertussis* Phase-I-Stämme produzierten Komponenten in möglichst hoher Ausbeute sowie in hochgereinigter Form zu isolieren.

Beschrieben ist die Herstellung der zellfreien Pertussis-Vakzine durch Beimpfung eines geeigneten Mediums mit *B. pertussis* Phase-I-Bakterien und Kultivation in Roux-Schalen unter „statischen“ Bedingungen für etwa 5 Tage und bei etwa 35°C (Sato, Japan, Patent Nr. 5203/1982).

Für die anschließende Aufarbeitung und Reinigung der Antigene werden eine Vielzahl unterschiedlicher Methoden vorgeschlagen (Y. Sato et al., *Infect. Immun.*, 41 [1], 313–320 [1983]; Y. Sato et al., *Semin. Infect. Diss.*, 4, 371–379 [1982]; A. L. Winters et al., *J. Biol. Stand.*, 14, 261–271 [1986]).

Nachteilig bei dieser Züchtungsmethode ist der dazu notwendige und für eine Großproduktion unakzeptabel hohe Arbeits- und Zeitaufwand.

Weiter wird vorgeschlagen, die Kultivation in Schüttelgefäßen, in denen ein gutes Bakterienwachstum gefunden wurde, durchzuführen. Demgegenüber konnten dabei jedoch nur geringe Hämagglutinationstitere erhalten werden (H. Arai, J. J. Munoz, *Infect. Immun.*, 25, 764–767 [1979]).

Bekannt sind weiterhin Versuche, durch Zusätze (Additive) zum Züchtungsmedium eine Steigerung der Zellausbeute an *B. pertussis* und eine Erhöhung der Ausbeute an FHA und/oder PT zu erzielen. So untersuchte A. G. Lane (Appl. Microbiol., 19, 512-520 [1970]) den Einfluß verschiedener, dem Nährmedium zugesetzter Aminosäuren, insbesondere Glutaminsäure, auf Zellwachstum von *B. pertussis* und biologische Eigenschaften der daraus gewonnenen Vakzine. Die Addition von bis zu 3 g Na-Glutamat pro Liter Nährmedium führte zu einer Steigerung der Zellausbeute um bis zu 43,5%, ohne daß die Protektivität der Vakzine abnahm. Bei Zugaben von mehr als 3 g Na-Glutamat pro Liter Nährmedium wurde eine Inhibition des Wachstums von *B. pertussis* gefunden.

Y. Suzuki et al. (Japan. Patent 54680/1983; 58548/1983; EP 0121249) schlagen den Einsatz von Cyclodextrinen, insbesondere methylierter β -Cyclodextrine, z. B. Heptakis 2,6-O-dimethyl- β -cyclodextrin, als Additiv in Mengen bis zu 10 g pro Liter Nährmedium vor. Nach ihren Angaben kann die Kultivierung von *B. pertussis* in einem Rührfermentor unter Kontrolle von pH-Wert, Schaumentwicklung und Gelöstsauerstoffkonzentration bei Addition von methylierten Cyclodextrinen im Vergleich zur statischen Kultur ohne Cyclodextrin zu einer Erhöhung der Zellausbeute auf das 2,5fache und der Pertussis-Toxinmenge (LPEu/ml) auf das 10-15fache führen. Im Gegensatz dazu wurde bei der Fermentorkultivation in cyclodextrinhaltigen Nährmedien keine Beeinflussung der FHA-Ausbeute gefunden. Nachteilig ist, daß die für den Züchtungszweck als geeignet beschriebenen β -Cyclodextrine nur auf kompliziertem Wege zu synthetisieren sind, wodurch ihr Einsatz beschränkt ist und zu einer erheblichen Erhöhung der Produktionskosten führt.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist die Entwicklung eines einfachen und kostengünstigen Verfahrens zur Kultivierung von *B. pertussis*-Bakterien zur Herstellung einer zellfreien Vakzine zur aktiven Immunisierung gegen Keuchhusten.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, mit Hilfe an sich bekannter und üblicher Kultivierungstechniken, worunter der Einsatz von z. B. Schüttelfermentoren, Blasensäulen- oder Rührfermentoren oder anderen, geeigneten Kultivierungsgefäßen zu verstehen ist, ein Verfahren zur Kultivierung von *B. pertussis* mit hohen Zell- und Antigenausbeuten zu entwickeln. Das erfindungsgemäße Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß man einem üblicherweise für die Kultivierung von *B. pertussis* eingesetzten Flüssig-Nährmedium, z. B. dem Nährboden nach COHEN-WHEELER, Glutaminsäure (als Na-Glutamat) in Konzentrationen von 2-20 g pro Liter Nährmedium, vorzugsweise 3-10 g/l, zusetzt und gleichzeitig den für die Stoffwechseltätigkeit der Bakterien notwendigen Sauerstoffeintrag in das Nährmedium in einer Weise reguliert, daß zwischen 15-35 mmol Sauerstoff pro Liter Nährmedium und Stunde (mmol/lh), vorzugsweise 25-32 mmol O₂/lh in das Nährmedium eingetragen werden. Erfindungsgemäß wird die Glutaminsäure entweder vor der Beimpfung des Nährmediums komplett zudosiert, oder man gibt zunächst eine Teilmenge (z. B. 50%) der Glutaminsäure zum Nährmedium und fügt zu einem oder mehreren späteren Zeitpunkten die restliche Menge an Glutaminsäure zu.

Zur Realisierung der erfindungsgemäßen Lösung ist es notwendig, die Belüftung für das jeweils verwendete Fermentationssystem, z. B. Schüttelfermentor, Blasensäulen- oder Rührfermentor, so zu regulieren, daß ein Sauerstoffeintrag zwischen 15-35 mmol O₂/lh gewährleistet ist.

Zu diesem Zweck wurde für jedes Fermentationssystem die Effektivität des Sauerstoffeintrags in Abhängigkeit von Belüftungsintensität, Zusammensetzung des Gasgemisches und des Nährmediums sowie des Füllvolumens mit Hilfe der Methode der Sulfinoxidation bestimmt (Nikolajewski, Liepert „Gasometric Measurement of Sulfite Oxidation“, Acta Biotechnol. 7, 371-375, 1987).

Insbesondere beim Einsatz eines Blasensäulenfermentors zur Züchtung von *B. pertussis*, bei dem der Eintrag von Luft und Sauerstoff über eine Glassinterplatte am Boden des Gefäßes erfolgt, kann es während der Züchtung infolge starker Schaumentwicklung zum Ausflotieren von Bakterien und damit zu einer Verminderung der Ausbeute an Bakterien und Antigenen kommen. Zur Vermeidung dieses Effektes werden gegebenenfalls mechanisch wirkende Mittel, wie ein interner Sprühkopf (Nikolajewski und Liepert, WP 2997146), ein externer Schaumabscheider mit Rückpumpsystem oder chemisch wirkende Antischaummittel (z. B. Silikonöle vom Typ Antifoam A, Hersteller: Sigma Chemical Company, St. Louis, USA oder Fettsäureester, z. B. Sonnenblumenöl) oder eine Kombination mechanisch bzw. chemisch wirkender Mittel eingesetzt. Weiterhin ist das Verfahren durch die Einhaltung eines pH-Bereiches im Nährmedium während der Kultivierung zwischen 6,5-9,0, vorzugsweise zwischen 7,3-8,5 gekennzeichnet. Die pH-Regulierung erfolgt durch Einleiten von gasförmigem Kohlendioxid (CO₂). So wird während der Züchtung nach Erreichen eines pH-Wertes zwischen 7,5-7,9 steriles CO₂-Gas mit einem Durchsatz von 0,01-0,08 vvm (Gasvolumen in Liter/Volumen Nährmedium in Liter · Minute) kontinuierlich oder in Intervallen in das Nährmedium eingetragen und auf diese Weise der pH während der Züchtung zwischen 7,5-8,5 reguliert.

Wie aus Tabelle 2 (Zeilen 1 und 2) zu entnehmen ist, ist durch die alleinige Zudosierung von Glutaminsäure zum Nährmedium bei unregelmäßigem Sauerstoffeintrag nur eine geringe Zunahme des Zellwachstums und des HA-Titers im Vergleich zum glutaminsäurefreien Nährmedium zu erzielen.

Der Pertussis-Toxintiter weist dabei keine Änderung auf. Andererseits kann zwar durch geregelten Sauerstoffeintrag während der Züchtung von *B. pertussis* im glutaminsäurefreien Nährmedium eine Erhöhung der Zelldichte bis zu 125 · 10⁹ Keime/ml (125 IOU/ml) erreicht werden, eine wesentliche Steigerung der Antigenausbeute ist jedoch sowohl bei HA als auch bei PT nicht nachzuweisen (Tabelle 2, Zeilen 3-5). Nachteilig ist weiterhin die relativ rasch abfallende Aktivität des HA im Nährmedium nach Erreichen eines Maximums (Bild 1 a).

Überraschenderweise ist beim erfindungsgemäßen Verfahren durch das Zudosieren von Glutaminsäure bei dazu synchroner Regulierung der Belüftung des Nährmediums auf einen Sauerstoffeintrag zwischen 15-35 mmol O₂/lh sowohl eine deutliche Steigerung der Zellausbeuten an *B. pertussis* als auch eine Erhöhung des PT-Titers und insbesondere des FHA-Titers zu verzeichnen (Tabelle 2, Zeilen 6-11).

Als weiterer überraschender Effekt des Zusammenwirkens von zudosierter Glutaminsäure und reguliertem Sauerstoffeintrag tritt eine wesentlich verbesserte Stabilität der Aktivität des HA ein (Bild 1 b).

Ausführungsbeispiel

Das erfindungsgemäße Verfahren soll beispielhaft an einer Züchtung von *Bordetella pertussis* in einem 3-l-Schüttelfermentor beschrieben werden. Die für den notwendigen Sauerstoffeintrag erforderliche Belüftungsrate und Schüttelfrequenz wurden zunächst in Vorversuchen ermittelt. Die zur Anzucht verwendeten lyophilisierten *B. pertussis*-Bakterien (Stamm: Tohama I) wurden 72 Stunden auf BORDET-GENGOU-Agar mit 20% Humanblut vermehrt und anschließend auf Kohle-Kasein-Agar überimpft. Nach 48 Stunden Bebrütung bei 36°C legte man eine Subkultur in 200 ml COHEN-WHEELER-Nährmedium (Zusammensetzung s. Tabelle 1) an, welche 28 Stunden bei 36°C geschüttelt wurde und anschließend als Inokulationsmaterial für den 3-l-Schüttelfermentor diente.

Züchtungsbedingungen:

Füllvolumen: 1 l
 Nährmedium: COHEN-WHEELER-Nährmedium
 Einimpfdichte: 8 Mrd. Keime/ml
 Schüttelfrequenz: 184–195/min
 Belüftungsrate: 1 l Luft/min
 Temperatur: 36 °C
 Zusätze: 5 g Glutaminsäure/l
 0,1 ml Sonnenblumenöl/l
 pH-Regulierung: durch Zudosieren von 80 ml CO₂/min für jeweils 1 Minute in Intervallen zwischen 2–10 Minuten

Ergebnisse:

Zelldichte an *B. pertussis*: 140–160 10⁹ Keime/ml
 HA-Titer der Bakteriensuspension: 1:512–1:1024/ml
 PT-Titer der Bakteriensuspension: 1:128 000–1:256 000

Tabelle 1 Zusammensetzung des modifizierten Nährmediums nach COHEN-WHEELER

Komponente	Gehalt
	g/l ml/l
Kaseinhydrolysat, salzsauer	130 mg.-% Aminostickstoff
lösl. Stärke nach ZULKOWSKI	2,2
Nikotinsäure	0,005
Nikotinsäureamid	0,005
KH ₂ PO ₄	0,43
MgSO ₄	0,011
Hefedialysat	
FeSO ₄ (0,5 % wäßr. Lösung)	50
CuSO ₄ (1 % wäßr. Lösung)	0,2
aqua dest	0,3
pH	ad 1 000 ml 6,5–7,0

Additiv

Glutaminsäure (Na-Salz) 2–20

Eingesetzter *Bordetella pertussis*-Stamm: Tohama I

Einimpfdichte: 8 Mrd. Keime/ml (8 IOU)

Anzucht: a) BORDET-GENGOU-Agar, 72 Stunden bei 35 °C

b) Kohle-Kasein-Agar, 48 Stunden bei 35 °C

c) COHEN-WHEELER-Kulturmedium mit 5 g/l Glutaminsäurezusatz

Tabelle 2 Beeinflussung von Zell- und Antigenausbeute¹⁾ durch zusammenwirkenden Effekt von Glutaminsäurezusatz und reguliertem Sauerstoffeintrag

Glutaminsäure- zusatz (g/l)	Sauerstoffeintrag (mmol/lh)	Zelldichte (IOU/ml)	HA-Titer	PT-Titer 10 ³
—	2)	54-92	10-128	48-64
5	2)	57-106	352-576	48-64
—	13,7	96	4	96
—	17,2	112	257	64
—	26,7	125	130	48
5	13,7	139	1280	256
5	17,2	127	1536	256
5	26,7	120-125	3000-4096	48-256
5	31,2	125	3000	256
10	26,7	96	512	96
15	26,7	111	3072	32

1) Kultivationszeit: 23 Stunden

2) ungeregelter Sauerstoffeintrag zwischen 2,5-8,55 mmol O₂/lh