

(19) DANMARK



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT

(11) 157245 B

(21) Patentansøgning nr.: 0898/81

(51) Int.Cl.⁴ C 07 K 15/04

(22) Indleveringsdag: 27 feb 1981

(41) Alm. tilgængelig: 05 okt 1981

(44) Fremlagt: 27 nov 1989

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 04 apr 1980 US 137326

(71) Ansøger: *SMITHKLINE BECKMAN - ANIMAL HEALTH PRODUCTS S.A.; Rue du Tilleul 13; B-1320 Genval (Rixensart), BE

(72) Opfinder: Frans van *Wijnendaele; BE

(74) Fuldmægtig: Firmaet Chas. Hude

(54) Analogifremgangsmåde til fremstilling af E.coli varmestabile enterotoxinderivater

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag: 898-81

E.coli varmestabile (ST) enterotoxinderivater fremstilles ved reaktion af E.coli ST enterotoxin med tværbindingsmidler for proteiner. De fremkomne tværbundne ST enterotoxiner udviser immunogen virkning. De er værdifulde profylaktiske midler til beskyttelse af mennesker og dyr mod diarré sygdomme fremkaldt af E.coli enterotoxin og kan forarbejdes til præparater til intramuskulær, subkutan eller oral administration.

DK 157245 B

Den foreliggende opfindelse angår fremstilling af hidtil ukendte immunogene E.coli varmemestabile enterotoxinderivater.

5 Det er kendt, at Escherichia coli-stammer kan være ansvarlige for diarré-sygdomme hos mennesker og dyr, og ved forskellige undersøgelser (f.eks. Gyles & Barnum, J.Infect.Dis 120, 419-426, 1969) er det blevet påvist, at enteropathogenicitet af E.coli-stamme står i relation til produktionen af enterotoxiner.

15 To enterotoxiner er blevet beskrevet: Et varmelabilt (LT) enterotoxin og et varmemestabilt (ST) enterotoxin, og Smith & Gyles (J.Med.Microbiol. 3, 387-401, 1970) har klassificeret en række enteropathogene E.coli-stammer af forskellige dyriske oprindelser som producenter af enten LT-og ST-enterotoxiner eller af kun ST-enterotoxin. ST-producerende E.coli-stammer af human oprindelse er også blevet beskrevet
20 eller omtalt af forskellige forfattere (f.eks. R.A.Gianella, Infect.Immun. 14, 95-99, 1976). Det varmelabile enterotoxin er under genetisk kontrol af et overførbart plasmid; det ser ud til at bestå af en gruppe bundne peptider med en molekylvægt på ca. 24.000. LT-enterotoxinet adsorberes til gangliosider ved børsteranden i epithel-celler i tyndtarmen, hvor
25 det gennem formidling af en enzymatisk proces forårsager hypersekretion af vand og chlorider i tarmhulrummet og hindrer reabsorption af natrium, således at tarmhulrummet bliver udspilet med væske, der indebærer hypermotilitet og diarré. LT-enterotoxinet er antigen og stimulerer neutraliserende
30 antistoffer i serumet hos personer eller dyr, der tidligere er blevet inficeret med toxinproducerende stammer af E.coli. Det varmemestabile enterotoxin er under genetisk kontrol af en heterogen gruppe af plasmider; det forårsager også diarré, måske ved at stimulere guanidincyklase (J.M.Hughes m.fl.,
35

Nature 271, 766-767, 1978). I betragtning af, at antiserum fremstillet mod organismer, der producerer LT og ST, blev påvist at neutralisere LT, men ikke ST, og at antisera fremstillet på lignende måde mod ST ikke havde nogen neutraliserende virkning på ST eller på LT, konkluderede Smith & Gyles (loc.cit.), at ST ikke er antigen. I en artikel med titlen "Purification and Chemical Characterization of the Heat-Stable Enterotoxin Produced by Porcine Strains of Enterotoxigenic Escherichia coli" (Infect.Immun 19, 1021 - 1030, 1978) beskrev J.F.Alderete & D.C.Robertson, at rensset ST "udviste en molekylvægt på 4.400, bestemt ved både natriumdodecylsulfat-gelelektroforese og -gelfiltrering", og at "en molekylvægt på 5.100, repræsenterende 47 rester, blev beregnet af aminosyreanalyse-data"; de viser også, at "antiserum fremkommet af kaniner immuniseret med ST eller ST koblet til okseserumalbumin neutraliserede virkningen af enterotoxinet hos museunger på pattestadiet, men passiv hæmagglutination og hæmolysetiter-bestemmelser antydede, at ST er et dårligt antigen". ST-molekylvægtsbestemmelse af andre forfattere førte til andre og lavere værdier (f.eks. 1.000 - 1.200, 1.500 - 2.000 og 2.500 dalton, som vist af E.V.Lee m.fl., R.Lallier m.fl. og G.L.Madsen m.fl. i American Society of Microbiology Meeting, 1973 abstract M168, 1979 abstract B34 og 1979 abstract P29, og disse uoverensstemmelser skyldes muligvis forskelle i ST-produktionen, isolerings- eller rensningstrinnet samt forskellige enzymatiske forarbejdninger, når enterotoxinet forlader cellen.

Nylige undersøgelser (R.A.Kapitany m.fl., Infect.Immun. 26, 173-177, 1979) berører spørgsmålet om heterogeniteten af ST, men fundet af forskellige typer ST, baseret på aminosyre-sammensætning - som vist af R.A.Kapitany m.fl. (loc.cit.) - varmestabilitetsegenskaber og biologisk aktivitet er uden virkning for den foreliggende opfindelse, som er ubestemt anvendelig på hver aminosyre-sammensætning af de forskellige ST-enterotoxiner.

Forskellige medier og inkubationsmetoder er blevet anvendt af forskellige forskere ved dyrkning af forskellige E.coli ST-producerende stammer. Eksempler på sådanne medier er det komplekse medium ifølge F.G.Evans m.fl. (Infect.Immun. 8, 731-735, 1973) og det minimale definerede medium ifølge J.F.Alderete m.fl. (Infect.Immun. 15, 781-788, 1977) og modifikationer heraf.

I de følgende eksempler fremstilles ST-enterotoxinet af en svine-E.coli-stamme K12, som er deponeret d.13.marts 1980 i American Type Culture Collection (Rockville, Maryland, USA) under deponeringsnummeret ATCC 31621.

E.coli-stammen ATCC 31621 er en mutantstamme afledt af den velkendte E.coli K12-stamme, isoleret af afføringen fra en rekonvalescent difteripatient i 1922 og universelt anvendt til grundlæggende forskning inden for bakteriel genetik og molekular biologi (B.J.Bachmann, Bacteriol.Rev.36,4, 525, 1972). E.coli K12 er en stavformet gramnegativ bakterie, ca. 2 mikron i længden og 1 mikron i diameter. Vækst sker bedst ved 37°C, men stammen vokser også og deler sig ved temperaturer så lave som 20°C. E.coli K12 er en ikke-indkapslet motil bakterie med O⁻:K (?):H48 serotype; den udviser en meget specifik følsomhed over for lambda-fagen.

E.coli-stammen ATCC 31621 udviser ovennævnte typiske egenskaber af E.coli K12, og den har desuden auktotrofe behov for phenylalanin, tryptophan, histidin og prolin og forgærer ikke lactose, sandsynligvis på grund af en lac y mutation (den danner hvide kolonier på McConkey's lactose-medium). E.coli-stammen ATCC 31621 huser et rekombinerende plasmid med et 2,1 x 10⁶ dalton DNA-fragment, fremkommet ved restriktions-endonuklease -fordøjelse af et plasmid DNA, der oprindeligt er afledt af en patogen svinestamme af E.coli, og som bærer et gen, der koder for syntese af varme-stabilt enterotoxin. Stammen er chloramphenicol-resistent (25 µg pr. ml).

Ifølge opfindelsen angives en analogifremgangsmåde til fremstilling af E.coli varmostabilt enterotoxin-derivat, hvilken fremgangsmåde omfatter reaktion af E.coli varmostabilt enterotoxin med et ugiftigt bifunktionelt tværbindingsmiddel for proteiner og udvinding af det derved fremkomne E.coli varmostabile enterotoxinderivat. Enterotoxinderivatet er således inter- eller intramolekulært tværbundet ST enterotoxin, der udviser væsentlig højere molekylvægt end ST enterotoxin selv. Det udviser immunogen virkning og er et værdifuldt profylaktisk middel til at beskytte mennesker og dyr mod diarrésygdomme fremkaldt af E.coli enterotoxin.

Ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen får ST enterotoxin lov til at reagere med et ugiftigt bifunktionelt tværbindingsmiddel for proteiner, der virker enten som et homofunktionelt eller som et heterofunktionelt reagens til dannelse af et tværbundet ST enterotoxin, og eksempler på bifunktionelle protein-tværbindende midler, der virker som homofunktionelle reagenser, er dialdehyder, diketoner, carbodiimider, diisocyanater, diisothiocyantater, aryldiazider, acyldiazider, aryl (aktiveret)-difluorider, aryldisulfonyl(aktiveret)-chlorider eller -bromider, dicarboxylsyre(aktiveret)-azider, chlorider eller estere, dialpha-halogenketoner, polymethylen (n=3-12)-diimidsyreestere, bis-(maleidomethyl)-ethere, gem-bis-diazoacetylalkaner, bis-diazoaren og N,N'-arylen-dimaleinsyreimider, og eksempler på heterofunktionelle reagenser er dem, der har to forskellige, men forenelige funktionelle grupper af de ovennævnte tværbindende midler, specielt isocyanato- og isothiocyantatoarener, (aktiveret) fluor- og azidoarener, (aktiveret) azido- og fluorarener, (aktiveret) azido-aryl-alpha-halogenalkylketoner, chlor- eller bromacetimidsyre lavere alkylestere, chlormyresyre lavere alkylestere og epihalogenhydriner.

De bifunktionelle tværbindingsmidler til proteiner, der er omtalt i den foreliggende beskrivelse, er velkendte. For eksempel er en oversigt over kunstige tværbindinger i proteiner blevet offentliggjort af Rosa Uy & Finn Wold i kapitel 9 i *Advances in Experimental Medicine and Biology* med titlen "Protein Crosslinking (Biochemical and Molecular Aspects)", redigeret af Mendel Friedman, Plenum Press, New York.

Blandt disse forskellige tværbindingsmidler er de, der mest almindeligt anvendes af praktiske grunde, homofunktionelle reagenser såsom glutaraldehyd, difluordinitrobenzen, isocyanat-og isothiocyant-forbindelserne, carbodiimiderne og diimidsyreesterne.

E.coli ST enterotoxinet, der anvendes som udgangsmateriale til fremgangsmåden ifølge opfindelsen, kan fås af enhver *E.coli* ST enterotoxin-producerende stamme.

Det fremkomne ST enterotoxin, der findes i kulturens overliggende væske, bliver så i reglen ekstraheret og renses ved at fjerne nogle af forureningerne, f.eks. ved ultrafiltrering, gelfiltreringskromatografi, ionbytningskromatografi, ekstraktion med ethanol eller polyacrylamidgelpladeelektroforese. En beskrivelse af nogle af disse fremgangsmåder kan findes i en artikel, der er offentliggjort af Y.Takeda m.fl. i *Infect.Immun.* 25, 978-985, 1979.

Da ST enterotoxinet er ret resistent over for temperatur, kan fremgangsmåden ifølge opfindelsen finde sted inden for et bredt temperaturinterval, omend det i praksis foretrækkes at arbejde ved en temperatur under 37°C og specielt ved stuetemperatur, d.v.s. 20 - 25°C.

Reaktionen finder sted i vandigt og fortrinsvis pufret medium ved en pH-værdi, der afhænger af karakteren af tværbindingsmidlet: For eksempel, hvor det drejer sig om dialdehyder eller diketoner, er pH-værdien af reaktionen
5 ikke af afgørende betydning, og en egnet pH-værdi ligger fra ca. 4 til ca. 8; idet en pH-værdi på ca. 5 foretrækkes, og meget lave pH-værdier undgås for at reducere en mulig selvkondensation af aldehydet. En pH-værdi på 5 er også egnet til tværbindingsmidlerne carbodiimid og isocyanat,
10 men til epihalogenhydrinet er en svagt alkalisk pH-værdi (f.eks. ca. 8) egnet.

Når et dialdehyd eller en diketon anvendes til tværbinding af ST enterotoxin, der findes i lav koncentration i mediet, kan tværbindingsreaktionen forbedres ved at udfælde ST ved
15 udsaltningssteknik, f.eks. ved tilsætning af natriumsulfat, før tværbindingsreagenset tilsættes.

Opløseligheden af det fremkomne ST enterotoxinderivat påvirkes af de forskellige mulige grader af tværbinding.

ST enterotoxinderivaterne fremstillet ifølge opfindelsen kan
20 forarbejdes til farmaceutiske eller veterinære præparater til intramuskulær eller oral administration ved tilsætning af en anvendelig bærer til sådan administration. Egnede bærere indbefatter isotoniske saltopløsninger eller stødpudeopløsninger og andre materialer af velkendt art.

25 Afhængende af vandopløseligheden af ST enterotoxinderivatet kan det administrerede farmaceutiske eller veterinære præparat være enten en opløsning eller en suspension, men alligevel inkluderes i praksis en adjuvant såsom Freund's fuldstændige adjuvant (til veterinært brug), aluminiumhydroxid

eller lignende, idet præparatet lagres i frysetørret form, og opløsningen (eller suspensionen) rekonstitueres på bestilling, f.eks. ved tilsætning af Freund's fuldstændige adjuvant. En enhedsdosis af ST enterotoxinderivat ifølge opfindelsen vil indeholde f.eks. 0,1 mg tværbundet TS pr. 5 kg legemsvægt.

ST enterotoxinderivaterne fremstillet ifølge opfindelsen kan også tjene andre formål, f.eks. til let fremstilling af anti ST antisera, der er nyttige til immunbestemmelse.

10 EKSEMPEL 1.

E.coli-stammen ATCC 31621 rehydratiseres med sterilt saltvand og inkuberes i 18 timer ved 37°C i petri-skåle, der hver indeholder 20 ml selektiv LB agar fastmedium (et produkt fremstillet og forhandlet af Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA) suppleret med 25 mcg chloramphenicol pr. ml og forud opvarmet i 45 minutter til 115°C. 15

Et flydende kulturmedium (betegnet PP3) fremstilles så ved at opløse proteose-pepton nr. 3 (et produkt fremstillet og forhandlet af Difco Laboratories) (30 g), gærekstrakt (4 g) og dextrose (5 g) i en liter vand ved 60°C. Efter afkøling tilsættes 5 g NaCl, 5,05 g Na₂HPO₄ og 1,2 g KH₂PO₄. Mediet, hvis pH-værdi er 6,9 - 7,0, filtreres på Seitz EKS filter, og portioner på 30 ml fordeles i 250 ml kulturkolber. 20

Disse kulturkolber podes med de glatte kolonier fremkommet i petri-skåle, idet der anvendes fire kolonier pr. 30 ml PP3 flydende medium, og inkuberes i 7 timer ved 37°C under rystning på rystehylder (20 - 30 rystninger pr. minut). 25

Der foretages så en anden passage (i en periode på 16 timer) i 800 ml PP3 medium indeholdt i en 6 l konisk kolbe under anvendelse af 5% (v/v) podemateriale fra den første passage. 30

Den fremkomne forkultur anvendes som podemateriale (5% v/v) til produktionstrinet, der udføres i en forgæringsbeholder indeholdende 80 l modificeret Alderete medium (8,71 g K_2HPO_4 , 2,35 g NaCl, 1,0 g NH_4Cl , 1,8 g tricin, 50 mg $MgSO_4$, 5 7H₂O, 4,95 mg $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ og 4,9 mg $FeCl_3$ i en liter vand), der er steriliseret i 30 minutter ved 121°C og derpå suppleret med 1,42 g l-prolin, 0,87 g l-asparaginsyre, 0,39 g l-alanin, 0,69 g l-serin, 0,05 g l-phenylalanin, 0,05 g l-histidin, 0,05 g l-tryptophan og 5 g casaminosyrer (et produkt frem- 10 stillet og forhandlet af Difco Laboratories, Detroit 1, Michigan, USA) til en liter endelig opløsning, idet aminosyrebestanddelene fremstilles separat som 10 gange koncentreret opløsning indstillet til pH 7,5 og steriliseret i 30 minutter ved 121°C, før de inkorporeres i den førstnævnte 15 opløsning.

Produktionsmediet inkuberes aerobt under omrøring ved 36°C i en periode på 10 - 15 timer, d.v.s. når pH-værdien når 8,2 - 8,4, og når oxygenforbruget nærmer sig 0.

Efter endt produktionstrin bringes suppen op på 60°C i 30 minutter og centrifugeres ved 6000 g, og den overliggende væske filtreres på Seitz EKS1 filter. 20

ST enterotoxin koncentrerer så og renses ved en proces i tre trin som følger:

I det første trin bliver en portion på 40 liter filtreret 25 fermentationsmedium koncentreret op til et rumfang på 5 liter ved filtrering på Pellicon PTAC-membran, der har en afskæring ved 1.000 (Pellicon PTAC er varemærket for en ultra-membran af blandede celluloseestere, fremstillet og forhandlet af Millipore Corporation, Bedford, Massachusetts, 30 USA), efterfulgt af dialyse på samme Pellicon PTAC-membran, indtil ledningsevnen er faldet til 500 mikrosiemen. Den tilbageholdte fraktion koncentrerer så yderligere op til en liter og lyofiliseres. Det frysetørrede produkt kaldes ST-MP.

I det andet trin bliver en portion på 3 g ST-MP opløst i 150 ml vand, og opløsningen afkøles til 0 - 4°C. Kold acetone (1,5 liter) tilsættes dråbevis under omrøring, som opretholdes i 30 minutter efter fuldstændig tilsætning af acetonen. Blandingen centrifugeres ved 3.000 g, og den overliggende væske koncentrerer under reduceret tryk til et rumfang på 30 ml, hvortil der sættes 180 ml af en blanding af methanol og chloroform 2:1 (v/v). Efter kraftig rystning tilsættes 42 ml vand, og det øvre lag fraskilles, inddampes til tørhed under reduceret tryk og frysetørres. Det frysetørrede produkt omtales i den foreliggende beskrivelse som ST-ACF-D.

I det tredje trin bliver en portion på 200 ml ST-ACF-D opløst i 2 ml vand og påført foroven på en afkølet søjle (2,5 x 30 cm) indeholdende 50 g Servachrom-8 (Servachrom-8 er varemærket for en kromatografisk kvalitet af polyacrylmethylester, forhandlet af Serva G.m.b.H & Co., Heidelberg, Vesttyskland), der er bragt i ligevægt med vand. Eluering foretages med vand. Efter eluering af en første fraktion fortsættes elueringen med methanol/vand 6:4 (v/v) for at eluere den ST-holdige fraktion. ST isoleres ved afdampning af opløsningsmidlet, og den fremkomne remanens betegnes ST-PAE.

ST-PAE udviser en rensningsfaktor på 1.000 - 4.000 sammenlignet med den oprindelige portionsaktivitet, og den specifikke aktivitet af ST-PAE-produktet varierer mellem 5,5 og 15 nanogram fra parti til parti.

Den biologiske aktivitet af fraktionerne bestemmes ved prøven med museunger ifølge den fremgangsmåde, der er beskrevet af A.G.Dean (J.Infect.Dis. 125, 407-411, 1972). 48 - 72 timer gamle babymus podes derfor intragastrisk med 0,025 ml toxinopløsning, og akkumuleringen af væske i tarmen måles 2 timer senere. Forholdet $\frac{\text{tarmvægt}}{\text{legemsvægt}}$ er et mål for den biologiske aktivitet af toxinet. Værdier højere end eller lig med 0,09 anses for positive. Den specifikke aktivitet af en ST-fraktion udtrykkes så som den mængde ST (i nanogram ly-

ofiliseret produkt), som giver en $\frac{\text{tarmvægt}}{\text{legemsvægt}}$ -værdi på 0,100 ved prøven med museunger.

EKSEMPEL 2.

5 10 mg ST-PAE opløses i 0,25 ml acetat-stødpude (pH 5,1) og udfældes deraf ved tilsætning af 0,25 ml af en 36% opløsning (w/v) af natriumsulfat i samme stødpude. Vandig glutaraldehyd (20 mikroliter af en 25% v/v opløsning) tilsættes, og reaktionen får lov at forløbe i 2 timer ved stuetemperatur. Efter denne reaktionstid fraskilles over-

10 skydende reagens ved centrifugering og vask med vand, og bundfaldet frysetørres.

Det frysetørrede produkt består af immunogen tværbundet ST med forøget molekylvægt sammenlignet med umodificeret ST anvendt som udgangsmateriale, bestemt ved gelkromatografi på Sephadex G-100 (Sephadex er varemærket for en kromatografi-kvalitet af dextran, fremstillet og forhandlet af Pharmacia, Uppsala, Sverige).

15

For at demonstrere molekylvægt-forøgelsen opløseliggøres det frysetørrede produkt delvis ved tilsætning af en ml vand og omrøring af blandingen i 2 timer ved stuetemperatur. Den opløseliggjorte fraktion repræsenterer fra 30 til 50% af den uopløselige fraktion og udviser en hovedtop ved 10.000, medens udgangs-ST-PAE-materialet under samme betingelser udviser en hovedtop ved 4.000 (top bag ved Vt på Sephadex G-100; Vt er søjlens leje-rumfang).

20

25

EKSEMPEL 3.

20 mg ST-PAE opløses i en ml vand, og der tilsættes en opløsning af 200 mg 1-ethyl-3(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid hydrochlorid. Blandingen får lov at henstå ved 25°C i 12 timer, hvorunder tværbindingsreaktionen forløber. Det opløselige reaktionsprodukt dialyseres på PM-10 Amicon mem-

30

bran (Amicon er varemærket for en ultramembran, fremstillet og forhandlet af Amicon Corporation, Lexington, Massachusetts, USA) for at fjerne ureageret ST, og den tilbageholdte fraktion (13 mg) frysetørres. Molekylvægten af denne tværbundne ST er ca. 10.000 (mod 2.000 for udgangsmaterialet), når den bestemmes ved gelkromatografi på Sephadex G-100, som vist i eksempel 2. Absorptionsspektret af denne tværbundne ST er også forskellig fra absorptionsspektret af den ST-PAE fraktion, der blev anvendt som udgangsmateriale.

EKSEMPEL 4.

5 mg ST-PAE opløses i 0,5 ml 0,1 M borat-stødpude ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7/\text{NaOH}$), pH 8,0, og der tilsættes 100 mikroliter 0,02 M difluordinitrobenzen i ethanol. Tværbindingsreaktionen får lov at forløbe under omrøring i 4 timer ved stuetemperatur. Efter denne reaktionstid kasseres ureageret ST ved dialyse gennem et Spectrapor dialyserør, der har en afskæring ved 14.000 (Spectrapor er varemærket for et dialyserør, der fremstilles og forhandles af Spectrum Medical Industries, New York, USA).

Ved gelkromatografi på Sephadex G-100 (som vist i eksempel 2) bestemmes molekylvægten af denne opløselige tværbundne ST til 50.000 (mod 2.000 for udgangs-ST-PAE). Absorptionsspektret af den tværbundne ST udviser også en yderligere top ved 350 nanometer til forskel fra absorptionsspektret af udgangs-ST-PAE.

EKSEMPEL 5.

Frysetørret ST enterotoxinderivat (100 mg), som fremkommet i slutningen af eksempel 2, suspenderes i 0,5 liter fysiologisk saltopløsning og 0,5 liter Freund's fuldstændige adjuvant, og blandingen fordeles i glasflasker indeholdende hver en effektiv dosis af tværbundet ST enterotoxin til vete-

rinær administration. Flaskerne tillukkes så tæt og holdes ved 4°C.

EKSEMPEL 6.

5 Frysetørret ST enterotoxinderivat (100 mg), som fremkommet i slutningen af eksempel 2, suspenderes i en liter fysiologisk saltopløsning og 10 g alhydrogel (et produkt fremstillet og forhandlet af Superfos Export Company, København, Danmark), og blandingen fordeles i glasflasker, der hver indeholder en effektiv tværbundet ST enterotoxin til human
10 administration. Flaskerne tillukkes så tæt og holdes ved 4°C.

EKSEMPEL 7.

Et præparat, som fremstillet i eksempel 5, blev administreret subkutant til tre kaniner (A, B og C) med en enheds-
15 dosis på 0,1 mg pr. dyr, og samme subkutane administration blev gentaget 21 dage senere. Blodprøver (d.v.s. antiserum) blev taget den 28. dag efter første administration.

Seraene af de immuniserede kaniner blev afprøvet for deres styrke til at neutralisere (in vitro, 2 timer ved 37°C),
20 en fast mængde ST, som bestemt ved museunge-prøven (A.G.Dean, loc.cit.). Til kontrollen blev anvendt enten fosfatstødpude med saltopløsning eller normal serum i stedet for antiserum.

Resultaterne af seroneutralisations-prøven er anført i følgende tabel I, hvor
25

PBS betyder en stødpude-opløsning bestående af 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,15 g Na₂HPO₄, 0,2 g KH₂PO₄ i destilleret vand op til 800 ml, blandet med en opløsning af 100 mg MgCl₂·6H₂O i 100 ml destilleret vand, og derefter til en
30 opløsning af 0,1 g CaCl₂ i 100 ml destilleret vand.

Værdier af gw/bw mindre end 0,09 er indikation for ST-neutralisation.

Hver gw/bw-værdi er gennemsnitsværdien af tre bestemmelser, og hver af dem repræsenterer gw/bw af en gruppe på fire museunger.

ST-rumfang refererer til en ST-opløsning indeholdende 1,4 mcg toxin af ST-ACF-D-kvalitet pr. ml.

TABEL I.

	Skema	Antiserum fortynding	gw/bw
10	Kontrol 0,5 ml ST + 0,5 ml PBS	-	0,102
	Kanin A 0,5 ml ST + 0,5 ml antiserum	1/16 1/32 1/128	0,064 0,087 0,097
	Kanin B 0,5 ml ST + 0,5 ml antiserum	1/4 1/8	0,059 0,100
15	Kanin C 0,5 ml ST + 0,5 ml antiserum	1/8 1/16	0,098 0,098

Resultaterne demonstrerer immunogeniciteten af den tværbundne ST.

20 EKSEMPEL 8.

Et præparat fremstillet i eksempel 5, men med tværbundet toxin som fremstillet i eksempel 3 (opløselig fraktion med molekylvægt over 10.000) blev administreret subkutant til tre kaniner (K, L og M) med en enhedsdosis på 0,1 mg pr. dyr, og samme subkutane administration blev gentaget 21 dage senere.

Blodprøver (d.v.s. antiserum) blev taget den 28.dag efter første administration, og seroneutralisationsprøverne blev udført som i eksempel 7, men under anvendelse af normal serum i stedet for PBS.

- 5 Resultaterne er vist i tabel II og viser immunogeniciteten af den tværbundne ST i ét dyr ud af tre.

TABEL II.

	Skema	Antiserum fortynding	gw/bw
10	Kontrol 0,5 ml ST + 0,5 ml serum	-	0,129
	Kanin L 0,5 ml ST + 0,5 ml anti- serum	1/1	0,060
15	Kanin K 0,5 ml ST + 0,5 ml anti- serum	1/1	0,100
	Kanin M 0,5 ml ST + 0,5 ml anti- serum	1/1	0,111

EKSEMPEL 9.

- 20 Et præparat fremstillet i eksempel 5, men med tværbundet toxin som fremstillet i eksempel 4 (opløselig fraktion med molekylvægt over 14.000) blev administreret til tre kaniner (H, I og J) med en enhedsdosis på 0,5 mg pr. dyr, og samme subkutane administration blev gentaget 21 dage senere. Blodprøver
- 25 (d.v.s. antiserum) blev taget den 28.dag efter første administration, og seroneutralisationsprøverne blev udført som i eksempel 7.

Resultaterne er anført i følgende tabel III, der viser immunogeniciteten af tværbundet ST.

TABEL III.

	Skema	Antiserum fortynding	gw/bw
	Kontrol 0,5 ml ST + 0,5 ml PBS	-	0,114
5	Kanin H 0,5 ml ST + 0,5 ml antiserum	1/1	0,078
	Kanin I 0,5 ml ST + 0,5 ml antiserum	1/1	0,073
	Kanin J 0,5 ml ST + 0,5 ml antiserum	1/1	0,061

10 EKSEMPEL 10.

Et præparat fremstillet i eksempel 5 blev administreret subkutant til tre pattegrise (20 kg legemsvægt) med en enhedsdosis på 0,5 mg (dag 0), 0,5 mg (dag 21) og 5 mg (dag 46) til grisene A og B og 0,1 mg (dag 0), 1 mg (dag 21) og 5 mg (dag 46) til gris C. Blodprøver (d.v.s. antiserum) blev taget på dag 61, og seroneutralisationsprøver blev udført, som beskrevet i eksempel 7.

Resultaterne er vist i følgende tabel IV, der viser immunogeniciteten af tværbundet ST.

TABEL IV.

	Immuniseringsskema	Antiserum fortynding	gw/bw
	Kontrol		
	0,5 ml ST + 0,5 ml PBS	-	0,111
5	Gris A	1/32	0,054
	0,5 ml ST + 0,5 ml antiserum	1/64	0,062
		1/28	0,920
	Gris B	1/8	0,065
	0,5 ml ST + 0,5 ml antiserum	1/16	0,076
		1/32	0,108
10	Gris C	1/16	0,055
	0,5 ml ST + 0,5 ml antiserum	1/32	0,059
		1/64	0,095

P a t e n t k r a v .

1. Analogifremgangsmåde til fremstilling af varmemstabil enterotoxinderivat, kendetegneth ved reaktionen af E.coli varmemstabil enterotoxin med et ugiftigt bifunktionelt tværbindende middel for proteiner og udvinding af det derved fremkomne E.coli varmemstabil enterotoxinderivat.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, kendetegneth ved, at det bifunktionelle tværbindingsmiddel er et dialdehyd, en diketon, et carbodiimid, et isocyanat, et epihalogenhydrid eller et difluorid.