

(19) DANMARK



DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENEN



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 143317 B

(21) Ansøgning nr. 5865/75

(51) Int.Cl.³ A 61 K 39/10

(22) Indleveringsdag 22. dec. 1975

(24) Løbedag 22. dec. 1975

(41) Alm. tilgængelig 25. jun. 1976

(44) Fremlagt 10. aug. 1981

(86) International ansøgning nr. -

(86) International indleveringsdag -

(85) Videreførelsesdag -

(62) Stamansøgning nr. -

(30) Prioritet 24. dec. 1974, 2461439, DE

(71) Ansøger BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT, Marburg/Lahn, DE.

(72) Opfinder Torsten Bertil Helting, DE.

(74) Fuldmægtig Ingeniørfirmaet Budde, Schou & Co.

(54) Fremgangsmåde til udvinding af et antigen fra Bordetella pertussis.

DK 143317 B

0

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangs-
måde til udvinding af et antigen fra Bordetella pertussis.

De traditionelle Pertussis-podestoffer til aktiv
immunisering imod kighoste indeholder for det meste dræbte
5 kim fra Bordetella pertussis. Det er kendt, at Pertussis-
kimene ved vaccination hyppigt forårsager lokale smerter og
betændelser på vaccinationsstedet, men også feber og i
sjældne tilfælde desuden neurologiske komplikationer som den
frygtede encephalitis.

10 Det er derfor allerede blevet forsøgt, at erstatte
den kimholdige vaccine med en ekstraktvaccine for at opnå en
bedre forenelighed. Den flere gange beskrevne fremstilling af
ekstrakter fra Pertussiskim ved hjælp af saltopløsninger før-
rer ganske vist til en opløsning af en lille del af antigen-
15 komplekset, men udbytterne er relativt lave, og ekstrakterne
består ligesom kimene af adskillige komponenter, som til dels
er toksiske og ikke fører til nogen forbedring af vaccinenes
forenelighed ved vaccination.

En yderligere rensning af salteksrakterne er
20 stærkt begrænset på grund af det antigene materiales poly-
dispersitet. Ved de sædvanlige biokemiske rensningsmetoder
opnås i det væsentligste en fordeling af den antigenaktivitet
i flere fraktioner, uden at den specifikke aktivitet derved
kan forhøjes væsentligt.

25 Til forbedring af udbytterne er det også allerede
blevet forsøgt at åbne Pertussiskimene med f. eks. ultralyd
og underkaste det herefter isolerede cellevægsmateriale en
ekstraktion med natrium- eller kaliumchlorid (jvf. tysk
fremlæggelsesskrift nr. 1.617.605) eller et alkalimetalsalt
30 af desoxycholsyre (jvf. USA-patentskrift nr. 3.395.219).
Bortset fra det forøgede apparative forbrug er disse frem-
gangsmåder ligeledes utilfredsstillende, fordi problemet
med at opnå en højere renhed af antigenet dermed ikke kunne
løses.

35 Det er her værd at nævne, at Pertussiskimenes så-
kaldte histaminsensibiliserende faktor kan udvindes ved
behandling med en vandig kogsaltopløsning, som indeholder
4 mol urinstof. Alligevel har det ikke været muligt at fjerne

0

urinstoffet uden aktivitetstab med hensyn til histaminsensibiliseringen. Det kan diskuteres, om den histaminsensibiliserende aktivitet helt eller delvis svarer til antigenet.

5

Ved siden af henvisninger til at det drejer sig om forskellige komponenter, har Y. Sato i Symp. Series Immunobiol. Standard., Vol 13, s. 214-220, beskrevet, at behandlingen af et 22 S-Pertussisantigen med urinstof fører til en ødelæggelse af dets aktivitet.

10

Formålet med den foreliggende opfindelse er at udvinde et antigenkompleks i opløst form fra Pertussiskim med større udbytter og eventuelt i højere renhed end tidligere og at anvende det rensede antigen som en væsentlig virksom del i Pertussisvacciner.

15

Det har overraskende vist sig, at dette kan opnås ved en fremgangsmåde, hvorved den ovennævnte åbning af Pertussiskimene undlades, og disse direkte behandles med opløsninger indeholdende denaturerende midler, kimene fraskilles, og det opløste materiale enten straks eller efter yderligere rensning i et denatureret miljø udfældes, eventuelt på et vandopløseligt adsorptionsmiddel, ved fraskillelse af denatureringsmidlet.

20

Opfindelsen angår følgelig en fremgangsmåde til udvinding af et antigen fra Bordetella pertussis, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved, at kim fra Bordetella pertussis blandes med en vandig opløsning af et denatureringsmiddel i form af urinstof, guanidin eller deres vandopløselige salte og et neutralt salt, den ovenstående væske skilles fra kimremanensen, hvorpå denatureringsmidlet skilles fra den vandige suspension af antigenet.

25

30

Ifølge en fordelagtig udførelsesform for opfindelsen tilsættes der et vandopløseligt adsorptionsmiddel før fraskillelsen af denatureringsmidlet. Herved bindes antigenet til adsorptionsmidlet ved udfældningen, og en aktivitetsformindskelse som følge af aggregation undgås.

35

Behandlingen af Pertussiskimene med den nævnte vandige opløsning, som bevirker en ekstraktion af kimene,

0

sker på nemmeste måde ved henstand af de i opløsningen mest muligt homogent suspenderede kim. Ved denne foranstaltning må der imidlertid regnes med de længste ekstraktionstider. Allerede en langsom bevægelse af kimene, der kan
5 opnås ved simpel omrøring, forbedrer ekstraktionens virkningsgrad. Apparater, som kendes til homogeniseringsformål, kan med fordel anvendes til forhøjelse af udbytterne og til forkortelse af tiden. Alt efter det anvendte bevægelsesmiddel udgør ekstraktionstiden 0,5-48 timer. I gennemsnit må der
10 regnes med en ekstraktionsvarighed på 18 timer.

Ekstraktionstemperaturen udgør hensigtsmæssigt 1-40°C. Temperaturer under stuetemperatur, f. eks. i området mellem 1 og 10°C, foretrækkes.

Blandingen holdes under ekstraktionstiden ved en
15 pH-værdi på mellem 6 og 10, fortrinsvis ved en pH-værdi på 8. Såfremt denne pH-værdi ikke indstilles af sig selv, kan den opnås ved tilsætning af egnede pufferopløsninger.

Adskillelsen af ekstrakt og kimremanens sker hensigtsmæssigt ved centrifugering. Også filtreringsapparater,
20 som formår at tilbageholde mikroorganismer, er egnede til udvinding af den cellefrie ekstrakt.

Det har overraskende vist sig, at antigenet i en opløsning, som indeholder denatureringsmidler, fremviser et relativt ensartet opbygget stofs egenskaber. Dets
25 yderligere rensning kan derfor fordelagtigt gennemføres i nærværelse af denatureringsmidlet. En egnet foranstaltning hertil er f. eks. gelkromatografi, ved hvilken der kan opnås en adskillelse af toksiske komponenter fra antigenet, når udviklingen foretages med en puffer indeholdende denaturerings-
30 midler. Som medium til gelkromatografien egner sig især: med epichlorhydrin tværbundet dextran, i handelen som "Sephadex" [®], fra firmaet Pharmacia, Uppsala, eller copolymere af acrylamid og methylenbisacrylamid, i handelen som "Bio-Gel P" [®], fra firmaet Bio-Rad Laboratories, Richmond, U.S.A.

Som pufferstoffer indenfor rammerne af den her omhandlede fremgangsmåde kommer de ved biokemiske arbejder, til
35 stabilisering af opløsningens pH-værdi, anvendte kemiske forbindelser på tale, fortrinsvis de, som er beskrevet i Hand-

0 book of Biochemistry, Cleveland (Ohio), 2nd Edition, side
J 238, f. eks. tris-(hydroxymethyl)-aminomethan. Det har vist
sig hensigtsmæssigt at sætte små mængder, 1-20 mmol af
såkaldte chelat- eller kompleksdannere, f. eks. ethylendiamin-
5 tetraacetat (EDTA) til de anvendte pufferopløsninger.

I det tilfælde hvor der anvendes et adsorptionsmiddel,
retter valget deraf sig i det væsentligste efter det ønskede
anvendelsesformål for antigenet. Til en Pertussisvaccines fore-
trukne anvendelsesområder foretrækkes som adsorberende mid-
10 del et i vaccinefremstillingen prøvet immunologisk tilsætnings-
stof. Dette kan være af uorganisk oprindelse, såsom calcium-
phosphat eller aluminiumoxid, fortrinsvis anvendes $AlPO_4$ og/
eller $\gamma-AlO(OH)$ i en slutkoncentration (faststofkoncentration
i det færdige produkt) på 0,05% til 0,4% (vægt/vol.). Imidler-
15 tid kommer også organiske polymere, især polyanioniske til-
sætningsstoffer, på tale, som i de foreliggende denaturerings-
midlers opløsninger er uopløselige, f. eks. derivater af
polyacrylsyren. Er en indgivelse til mennesker og dyr ikke
påtænkt, kan et hvilket som helst adsorberende middel, anvendt
20 til adsorption af proteiner, sættes til opløsningen af anti-
genet.

Fjernelsen af denatureringsmidlet sker hensigts-
mæssigt ved dialyse. Da antigenet i det fysiologiske miljø
ikke kan træde gennem dialysemembranen, udfældes det even-
25 tuelt på et adsorberende middel, ved denatureringsmidlets til-
tagende udtræden gennem membranen.

Såfremt der ønskes et sterilt præparat, kan op-
arbejdningen fra ekstraktionen til det færdige, eventuelt ad-
sorberede materiale ske under sterile betingelser. Som al-
30 ternativ foretages en kimfrifiltrering før fjernelsen af
denatureringsmidlet og eventuelt før tilsætningen af det ad-
sorberende middel. Den yderligere oparbejdning må derpå ske
under sterile betingelser.

Denatureringsmidlerne anvendes fortrinsvis i koncen-
35 trationer på 2-6 mol/liter, især på 4-6 mol/liter, beregnet
på den samlede opløsning, da der herved opnås de bedste re-
sultater ved ekstraktionen.

0 Af neutralsalte foretrakkes de vandopløselige alka-
limetalhalogenider, såsom NaCl eller KCl, og det i en koncentra-
tion på 0,5-3 mol/liter, fortrinsvis på 1 mol/liter, beregnet
på den samlede opløsning. Denatureringsmidler og neutralsalte
5 har ved ekstraktionen af antigenet en synergistisk virkning.

Som udgangsmateriale til den her omhandlede frem-
gangsmåde anvendes Bordetella pertussiskim. De formeres på kendt
måde f.eks. ved dyrkning i Cohen-Wheeler-næringsopløsning ved
ca. 35°C under omrøring, og udvindes ved syreudfældning, ved
10 udfældning med organiske opløsningsmidler eller ved centrifuge-
ring. Til formeringen af kimene gås der således frem, at Bor-
detella pertussis-fermenteringskulturen underkastes en sur
fældning ved en pH-værdi på 3-5, fortrinsvis ved en pH-værdi
på 4. Til syrefældningen er alle mineralsyrer egnede, for-
15 trinsvis 1 N saltsyre, endvidere organiske syrer, f. eks.
eddikesyre. Kim, som er skilt fra kulturmediet ved centrifu-
gering, egner sig ligeså godt som ved hjælp af acetone eller
syre udfældet kim. Kimene anvendes fortrinsvis i vandig su-
sension. Koncentrationen kan udgøre $50 \cdot 10^9 - 1000 \cdot 10^9$,
20 fortrinsvis $100 \cdot 10^9 - 400 \cdot 10^9$ per ml.

Virkningen af Pertussisvacciner undersøges ved
dyreforsøg ifølge en af Kendrick, 1947, angiven fremgangsmåde
(P.L. Kendrick, G. Eldering, M.K. Dixon og J. Misner, Amer.
J. Publ. Health 37 803 (1947) og Fed. Reg. 33 Nr. 118, 8818,
25 paragraf 73.404 (1968)).

Herved immuniseres 18 mus i tre fortyndingstrin med
Pertussisantigenet, og den belastningsdygtige immunitet un-
dersøges efter 13 dage ved en intracerebral infektion med
200 LD₅₀ levende kim fra Bordetella pertussis. Som standard-
30 præparat medføres altid en vaccine med kendt beskyttelses-
værdi. Den i dette forsøg fundne beskyttelsesværdi er en
målestok for vaccinenes beskyttende virkning i mennesker
(jvf. hertil Medical Res. Council Brit. Med. J. Nr. 5128,
994 (1959)).

35 Ved ekstraktion af Pertussis-kimsuspensioner med
en kimtæthed på $100 \cdot 10^9$ kim per ml, alt efter de ved den her
beskrevne fremgangsmåde anvendte betingelser, fremkom vær-

0 dier fra 25 til 75 IE/ml. En vaccine med mindst 8 IE/ml anerkendes alment som en virksom vaccine.

Toksiciteten bestemmes efter retningslinierne fra U.S. Department of Health, Education and Welfare.

5 lo mus får 0,5 ml af den 1:2 fortyndede Pertussisvaccine, der skal undersøges. Ifølge kravene fra National Institutes of Health (NIH) i Federal Reg. 33, Nr. 188, 8818, (1968), paragraf 73,403, kræves der vægtstigninger fra 3 g/7 dage. Ved et ved den her omhandlede fremgangsmåde fremstillet Pertussisantigen udgør dyrenes gennemsnitlige vægtstigning efter 72 timer 1-3 g og efter 7 dage 5-6 g. Det indeholder følgelig ingen toksiske andele af Pertussiskimene og har en god forenelighed.

15 De her omhandlede Pertussis-vacciner, der skal fremstilles, egner sig til parenteral og oral indgivelse.

20 Til opløsningen eller suspensionen af antigenet kan der sættes antimikrobielle konserveringsmidler, såsom natrium-timerfonat. Til fremstilling af en polyvalent vaccine kan Pertussisantigenet blandes med andre antigener og/eller toxoider på sædvanlig måde.

25 Den her omhandlede opfindelse udgør et væsentligt fremskridt ved fremstillingen af Pertussisantigenet eller Pertussisvacciner. Fremgangsmåden er enkel. Den opnåede beskyttelsesaktivitet af det adsorberende ekstrakt-antigen er overraskende høj, i betragtning af tidligere fra litteraturen kendte data. Det høje udbytte i ekstrakten tydeliggøres også ved at kim, som er blevet underkastet en 6 mol-urinstofekstraktion, havde mistet 80% eller mere af deres antigenaktivitet. Ved saltekstraherede kim fremkommer efter fraskillelse af ekstrakten imidlertid kun et tab på 10-20% af antigenaktiviteten. Fordi antigen-ekstrakten i et denaturerende miljø ikke fremviser nogen væsentlig polydispersitet, er en fraskillelse af toksiske komponenter mulig. Derefter kan der forventes en betydelig stigning i antigenets forenelighed ved dets anvendelse hos mennesker, især børn.

Fremgangsmåden forklares i de følgende eksempler.

Eksempel 1

0

Til 40 liter af en Pertussis-kimsuspension med $100 \cdot 10^9$ kim/ml sættes 6 liter 1 mol tris(hydroxymethyl)-aminomethan-HCl-puffer med en pH-værdi på 8,0 og indeholdende 50 mmol EDTA. Efter sammenblandingen tilsættes 14,4 kg urinstof og 3,48 kg NaCl, rumfanget indstilles med vand til et rumfang på 60 liter og suspensionen omrøres natten over med en magnetomrører. Efter at kimene er blevet fjernet ved centrifugering (Sharpless-gennemløbscentrifuge) tilsættes 3 liter af en 2% suspension af AlPO_4 i blanding med en suspension af 1% $\text{Al}(\text{OH})_3$. Urinstoffet fjernes derpå ved dialyse mod sterilt 0,15 mol NaCl i et Hollow-Fiber-apparat fra fa. Amicon. Efter adsorbatets udfældning indstilles det samlede volumen med en isotonisk kogsaltopløsning til 40 liter. Et således fremstillet immunogen udviste i beskyttelsesforsøget efter Kendrick 25 IE/ml.

10

En ekstrakt fremstillet ud fra det samme udgangsmateriale ved behandling af kimene med 0,5 mol NaCl udviste i beskyttelsesforsøget kun 4,5 IE/ml.

20

Toksiciteten målt hos mus: 3. dag + 3,2 g;
7. dag + 5,8 g.

Eksempel 2

Ved en ekstraktionsfremgangsmåde efter eksempel 1, imidlertid gående ud fra $200 \cdot 10^9$ kim/ml og en vandig opløsning på 6 mol guanidin-hydrochlorid + 1 mol NaCl, målttes ekstraktens beskyttelsesværdi til 76 IE/ml.

25

Toksiciteten målt hos mus: 3. dag +1,0 g;
7. dag + 5,2 g.

30

Eksempel 3

Ekstrakten udvundet ifølge eksempel 1, imidlertid med 9,6 kg urinstof i stedet for 14,4 kg, koncentrerer på et ultrafilter til 2 liter og påføres en søjle af "Sephadex"® G-150, ækvilibreret med ekstraktionspufferen (indeholdende 4 mol

35

0

urinstof). Den koncentrerede ekstrakt viste før kromatografien i et til $80 \cdot 10^9$ kim/ml ækvivalent volumen, 8,25 IE/ml, svarende til 130 IE/mg protein. Materialet, svarende til søjlens tilbageholdelsesvolumen, samles til en molekylvægt på ca. 90.000, og urinstoffet fjernes ved dialyse mod 0,15 mol kogsaltopløsning. Den efter kromatografien udvundne fraktion koncentreredes til et volumen ækvivalent med en kimtæthed på $360 \cdot 10^9$ kim/ml og viste i beskyttelsesforsøget 84,3 IE/ml, svarende til 525 IE/mg protein.

5

P a t e n t k r a v .

0

1. Fremgangsmåde til udvinding af et antigen fra Bordetella pertussis, k e n d e t e g n e t ved, at kim fra Bordetella pertussis blandes med en vandig opløsning af et denatureringsmiddel i form af urinstof, guanidin eller deres

5 vandopløselige salte og et neutralt salt, den ovenstående væske skilles fra kimremanensen, hvorpå denatureringsmidlet skilles fra den vandige suspension af antigenet.

10

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at et vanduopløseligt adsorptionsmiddel tilsættes før fraskillelsen af denatureringsmidlet.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1-2, k e n d e t e g - n e t ved, at den ovenstående væske renses i nærværelse af denatureringsmidlet.

15

4. Fremgangsmåde ifølge krav 1-3, k e n d e t e g - n e t ved, at denatureringsmidlet anvendes i en koncentration på 2-6 mol/liter.

Fremdragne publikationer:

Dansk patent nr. 95749

Dansk patentansøgning nr. 4572/75

Tysk fremlæggeskrift nr. 1617605

USA patent nr. 3395219.