

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 143383 B

DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET

- (21) Ansøgning nr. 5715/74 (51) Int.Cl.³ A 61 K 39/08
(22) Indleveringsdag 1. nov. 1974
(24) Løbedag 1. nov. 1974
(41) Alm. tilgængelig 4. maj 1975
(44) Fremlagt 17. aug. 1981
(86) International ansøgning nr. -
(86) International indleveringsdag -
(85) Videreførelsesdag -
(62) Stamansøgning nr. -
(30) Prioritet 3. nov. 1973, 2355094, DE

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

(72) Opfinder Torsten Bertil Helting, DE.

(74) Fuldmægtig Ingeniørfirmaet Budde, Schou & Co.

(54) Fremgangsmåde til fremstilling af
et atoksisk, immunogent produkt
ud fra tetanus-toksin.

Den foreliggende opfindelse angår en hidtil ukendt fremgangsmåde til fremstilling af et atoksisk, immunogent produkt ud fra tetanus-toksin ved hjælp af en proteinase.

Tetanus-toksin er som bekendt højtoksisk over for pattedyr og skal afgiftes til sin anvendelse som immuniserende middel. Det er kendt at afgifte tetanus-toksin ved, at man behandler det med formaldehyd.

Et på denne måde afgiftet tetanus-toksin - det såkaldte tetanus-toksoid - har imidlertid den ulempe, at det ved sin anvendelse som vaccine kan føre til vaccinationsreaktioner. Man har derfor også allerede forsøgt at inaktivere tetanus-toksinet og spalte det fremkomne tetanus-toksoid med

pepsin på et yderligere fremgangsmådetrin, jfr US-patentskrift nr. 3.542.920.

Det har nu vist sig, at man kan fremstille et atoksisk, immunogent produkt ud fra tetanus-toksin, hvilket produkt ikke fremkalder nogen eller i det mindste fremkalder ringere vaccinationsreaktioner ved sin anvendelse som vaccine, idet man behandler toksinet med en proteinase. Reaktionsproduktet kan oparbejdes til en vaccine på kendt måde, eventuelt under anvendelse af et hjælpemiddel.

I overensstemmelse hermed er den her omhandlede fremgangsmåde ejendommelig ved, at man behandler tetanus-toksin med en proteinase, hvorefter reaktionsproduktet renses til opnåelse af et atoksisk, immunogent produkt, som udvindes.

På tale som proteinaser i opfindelsens forstand kommer alle proteinspaltende enzymer, men det foretrækkes ifølge opfindelsen, at der som proteinase anvendes et sådant enzym, der i den videnskabelige litteratur er kendt under navnet en peptid-peptidohydrolase, specielt papain, trypsin, bakterieproteinaserne ud fra *B. subtilis* og pronase, en proteinaseblanding af visse mikroorganismer, f.eks. *Streptomyces griseus*. Ganske særlig fordelagtigt ved den her omhandlede fremgangsmåde er det, at der som proteinase anvendes papain.

Ved behandlingen af tetanus-toksinet med en proteinase skal der tages hensyn til, at tetanus-toksin er labilt og tilbøjeligt til aggregering og udfældning. Derfor må omsætningen gennemføres i et miljø, der med henblik på proteinderivatet tetanus-toksin ikke fører til nogen irreversibel denaturering. Af denne grund foretages omsætningerne i et svagt surt, neutralt til svagt alkalisk pH-værdiområde, dvs. ved en pH-værdi på mellem 5 og 10.

Under hensyntagen til dette sker behandlingen af tetanus-toksinet med proteinasen under de for en fagmand kendte betingelser, ved hvilke det enzym, der anvendes, udfolder sin bedste - i det mindste en tilstrækkelig god - virkning, nemlig en så hurtig reaktion mellem tetanus-toksin og proteinase, at toksinkoncentrationen formindskes så drastisk, at den bliver for lav til udfældning. Denne virkning opnås med størst sikkerhed med de ovenfor specifikt nævnte proteinaser.

Hvis der f.eks. anvendes papain som proteinase, foretrakkes det ifølge opfindelsen, at der til 1 mg tetanus-toksin anvendes

0,5-2 U, fortrinsvis 1 U, papain, at omsætningen sker ved 40-60°C, fortrinsvis 53-55°C, og ved en pH-værdi på mellem 5 og 8, fortrinsvis 6,5, og at papain-behandlingen udføres i nærværelse af en forbindelse, der indeholder (en eller flere) sulfhydrylgrupper, f.eks. cystein-hydrochlorid. Under disse betingelser udøver proteinasen sin virkning ved behandling i nogle timer hensigtsmæssigt 1-10 timer.

De nævnte, foretrukne behandlingsbetingelser har vist sig at repræsentere det bedste kompromis mellem optimale betingelser for papain-behandlingen og optimale udbytter af atoksisk produkt.

Ved anvendelsen af trypsin anvendes 10-1000, fortrinsvis 50-200, enheder pr. mg tetanus-toksin, og inkubationen gennemføres ved en temperatur på 30-50°C, fortrinsvis 40-45°C, i et neutralt til svagt alkalisk pH-værdiområde, fortrinsvis ved en pH-værdi på 7,5-8,5, i 1-10 timer, fortrinsvis 5-7 timer.

Proteinaseblandingen ud fra *B. subtilis* eller pronasen anvendes derimod i et forhold på 0,06 - 6 enheder, fortrinsvis 0,3 - 3 enheder, pr. mg tetanus-toksin. Temperatur og reaktionsvarighed svarer omtrentligt til de ved trypsin angivne værdier.

Ved anvendelse af andre proteinaser skal reaktionsbetingelserne varieres på en sådan måde, at der almindeligvis sikres en god til optimal virkning af enzymet.

Som udgangsmateriale til udførelsen af den her omhandlede fremgangsmåde anvendes tetanus-toksin, der fremstilles på kendt måde ved dyrkning af tetanusbaciller og påfølgende isolering som kulturfiltrat. Om ønsket kan det forrenses, idet rensningsprocessen hensigtsmæssigt føres på den måde, at det rensede toksin foreligger som opløsning i 0,15 M vandigt natriumchlorid. Et sådant tetanus-toksin har en koncentration på 2.200 til 3.000 Lf pr. mg nitrogen toksin, idet "Lf" anvendes for *Limes flocculationis*. Ved dette udtryk forstås den mængde antigen, der udflokkulerer en international Lf-enhed antiserum.

Til fremstilling af et immunogent produkt, der er særlig egnet til videreforarbejdningen til en vaccine, kan man blande det forrensede tetanus-toksin f.eks. i 0,15 M natriumchloridopløsning med det samme eller det flerdobbelte volumen af en svagt sur, neutral eller svagt alkalisk puffer med en pH-værdi på mellem 5 og 8, i hvilken virksomheden af den proteinase, der skal anvendes, er

sikret tilstrækkeligt, eventuelt tilsætte de for det enkelte enzym kendte, aktiverende stoffer, såsom metalioner, chelatdannere, oxiderende eller reducerende forbindelser, og inkubere dem sammen med proteinasen. Ved anvendelsen af papain som proteinase arbejder man hensigtsmæssigt i en 0,1 M fosfatpuffer med en pH-værdi på 5 - 8, fortrinsvis 6,5, hvilken puffer yderligere indeholder 0,001 M kompleksdanner, f.eks. ethylendiamintetraacetat (EDTA). Som yderligere tilsætning kan der til denne opløsning sættes en sulfhydrylforbindelse, f.eks. cysteinhydrochlorid, i en koncentration på fra 0,0005 til 0,005, fortrinsvis 0,001 M.

Proteinaserne er tilgængelige i handlen i opløselig form eller for en dels vedkommende også bundet til en uopløselig bærer. Aktiviteten af papainet bestemmes med α -N-benzoyl-L-argininethylester (BAEE). En enhed papain (1 U) hydrolyserer 1 μ mol BAEE pr. minut ved en pH-værdi på 6,2 og 25°C [Kimmel, J.L. og Smith, E.L., J. Biol. Chem. 207, 515 (1954)].

Trypsinets aktivitet bestemmes ligesom papainets aktivitet med substratet BAEE. Som en trypsinenhed angives den mængde enzym, der er nødvendig til at forøge opløsningens optiske tæthed, målt ved en bølgelængde på 253 nm, med 0,001 pr. minut ved en pH-værdi på 8,0 [Schwert, G.W. og Takenaka, Y., Biochim. Biophys. Acta 16, 570 (1955)].

De ud fra *Streptomyces griseus* og ud fra *B. subtilis* fremstillede proteinaser defineres ved hjælp af PUK-enheder. En PUK-enhed er den mængde enzym, der er nødvendig til tilvejebringelse af en optisk tæthed af opløsningen på 1,0 ved en bølgelængde på 660 nm, 40°C og en pH-værdi på 7,4, bestemt ved Casein-Folin-metoden [Nomoto, M., Narahashi, Y. og Murakami, M., J. of Biochem. (Japan) 48, 593 (1960)].

1 mg tetanus-toksin svarer til 320 - 400 Lf-enheder. Behandlingen af tetanus-toksinet med papain sker hensigtsmæssigt ved forhøjet temperatur i flere timer. En forbehandling ved en noget lavere temperatur er særlig fordelagtig. Ved en særlig foretrukken udførelsesform for opfindelsen inkuberes reaktionsblandingen ved en temperatur på 40 - 60°C, fortrinsvis 53 - 55°C, i 1 - 5 timer, fortrinsvis 2 timer efter en forinkubation ved 40 - 45°C i 1 time - forinkubationen gennemføres fortrinsvis ved små volumener.

Efter afkølingen og - hvis der anvendes et bærerbundet papain - efter fraskillelsen af papainet, f.eks. ved centrifugering, adskilles reaktionsblandingen i forskellige komponenter ved

en molekylsigtefremgangsmåde. Til dette formål foretrækkes det ifølge opfindelsen, at reaktionsproduktet til yderligere rensning chromatograferes på en molekylsigte, som kan fraskille produktet med molekylvægte mellem ca. 20.000 og 60.000.

Særlig egnede hertil er tværbundne dextraner, f.eks.

"Sephadex[®] G-100" eller "Sephadex[®] G-200" samt "Bio-gel[®] P-100".

Der anvendes fortrinsvis en "Sephadex G-100"-søjle, f.eks. med målene 10 x 100 cm. Til eluering anvendes de til dette formål kendte elueringsmidler, især pufferopløsninger, f.eks. 0,10 M tris-(oxymethyl)amino-methan-saltsyrepuffer med en pH-værdi på 8,0, der kan indeholde natriumchlorid i en omtrentlig koncentration på 0,1 - 1 mol. Ved elueringen samles de fraktioner separat, der viser absorption ved 280 nm. Der dannes fire fraktioner, og den anden udgør det ønskede produkt. Efter koncentreringen af den anden fraktion, f.eks. ved lyøfilisering, kan man opnå en yderligere rensning ved en gentagen chromatografi under samme betingelser. Derved fjernes de sidste rester af toksiske stoffer.

I stedet for den gentagne chromatografi eller som yderligere foranstaltning kan produktet underkastes en behandling med aldehyder til fjernelse af de sidste rester af toksiske stoffer. Det er kendt, at proteinkemiske adskillelsesfremgangsmåder kun i de sjældneste tilfælde fører til en fuldstændig fraskillelse af uønskede proteiner. Dette gælder især i teknisk målestok. På grund af den høje toksicitet af det native tetanus-toksin skal man derfor regne med, at de toksiske bestanddele ikke kan fjernes fuldstændigt på denne måde.

Behandlingen med aldehyder sker ved, at det ved hjælp af proteinaser fremstillede produkt før eller efter chromatograferingen i en proteinkoncentration på ca. 1 mg protein pr. ml eller derunder i en pufferopløsning ved en molaritet af pufferopløsningen på 0,01-0,2 M behandles med aldehyd, og ifølge opfindelsen opnås en effektiv rensning ved, at produktet ved en pH-værdi på 6,0-8,5, fortrinsvis 7,8, behandles ved 20-37°C i 14-28, fortrinsvis 14-18, dage med 0,015-0,3 M af et alifatisk mono- eller dialdehyd med 1-6 carbonatomer, ifølge opfindelsen fortrinsvis formaldehyd.

Til yderligere rensning kan produktet om ønsket underkastes en 10 - 20 timers, fortrinsvis 15 timers, dialyse mod 0,15 M natriumchlorid og/eller sterilfiltreres. Til fremstilling af en vaccine blandes produktet hensigtsmæssigt yderligere med et hjælpemiddel, f.eks. aluminiumhydroxid. Ved fortynding med 0,15 M natriumchloridopløsning indstilles koncentrationen på den ønskede Lf-værdi.

Den på denne måde fremstillede tetanusvaccine tåles fortrinligt.

Toksiciteten af denne vaccine bestemmes på marsvin. 5 grupper med to marsvin i hver får subcutant 0,5 ml af en opløsning af det ifølge opfindelsen fremstillede produkt, idet der anvendes fortyndinger med 25, 50, 100, 200 og 400 Lf/ml. Marsvinene, der kontrolleres i 4 dage efter injektionen, bliver ved at være sunde og har en normal vægtforøgelse. Fremgangsmådeproduktets virkning konstateres ved et beskyttelsesforsøg med marsvin. 10 dyr får hver 2 ml af fremgangsmådeproduktet med 0,75 Lf/ml. Efter 4 uger får de en belastningsinjektion af 20 dlm tetanus-toksin, idet dlm betydet dosis letalis minima. Marsvinenes overlevelsesrate ved immuniseringen med fremgangsmådeproduktet er 100%.

Tåleligheden afprøves på marsvin. 5 marsvin får hver subcutant på tre forskellige steder på kroppen 0,1 ml af et tetanus-antiserum, der indeholder 1,0, 0,3 eller 0,1 internationale enheder pr. ml tetanus-antitoksin. [1 international enhed (IE) af et tetanus-antiserum er den mængde, der i sin virksomhed svarer til virksomheden af 0,03384 mg af den af WHO (World Health Organization) angivne tetanus-antitoksin-standard (Biological Substances - WHO-Veröffentlichung Genf 1972, side 14)]. Dette antiserum udvindes ved immunisering af marsvin med et kendt podestof. Samtidig får hvert dyr på tre forskellige injektionssteder 0,1 ml af et andet tetanusserum, der ligeledes indeholder 1,0, 0,3 eller 0,1 IE/ml tetanus-antitoksin. Dette andet tetanus-antiserum udvindes ved immunisering af marsvin med det her omhandlede produkt. Efter 2 timer får dyrene intravenøst indgivet 1 ml af et traditionelt tetanus-fluid-podestof med 100 Lf/ml, i hvilket der yderligere er iblandet 0,5% af farvestoffet "Evans Blue". Efter 30 minutter aflives dyrene, og den blåfarvning, der er dannet på grund af den passive hud-anafylaksi, måles. Det antiserum, der er udvundet i det kendte podestof, viser en tydelig anafylaksi. Det antiserum, der er frembragt med fremgangsmådeproduktet, er imidlertid frit for tegn på en anafylaksi.

Den hidtil ukendte vaccine kan anvendes alene, men også i kombination med andre vacciner. Egnede til kombination er især difteritoksoid, pertusisimmunogen, poliomyelitisvira eller mæslinge-vira.

Eksempel 1

450.000 Lf tetanus-toksin i 15 ml af en 0,15 M natriumchloridopløsning (med 2.200 Lf/mg nitrogen) fortyndes med 15 ml 0,1 M fosfatpuffer med en pH-værdi på 6,5, der indeholder 0,001 M EDTA, der tilsættes 1.500 U opløseligt papain i 5 ml 0,15 M natriumchloridopløsning, og 3 mg cysteinhydrochlorid tilsættes derpå.

Efter gennemblanding holdes denne blanding ved 45°C i 1 time og dernæst ved 53°C i 2 timer, den påføres efter afkøling på en "Sephadex G-100"-søjle (10 x 100 cm) og chromatograferes med en pufferopløsning ud fra 0,1 M opløsning af tris(oxymethyl)-aminomethan i 1 M natriumchloridopløsning, der er indstillet på en pH-værdi på 8 med saltsyre ("tris-saltsyre-puffer pH 8"), under kontinuerlig måling af absorptionen i bølgelængdeområdet 280 nm. De fraktioner, der viser absorption i dette område, opfanges separat. Der dannes fire fraktioner, idet den første fraktion repræsenterer en dobbeltspids. Den anden fraktion underkastes chromatografi endnu en gang under de samme betingelser, og den derudfra fremstillede 2. fraktion dialyseres i 15 timer mod 0,15 M natriumchlorid, sterilfiltreres, og produktets koncentration indstilles på 26 Lf/ml med 0,15 M natriumchlorid, og der blandes med aluminiumhydroxid til en koncentration på 0,2% Al(OH)₃.

Udbyttet andrager 90%, beregnet på Lf-enheder. Den specifikke flokkuleringsaktivitet bestemmes med 6.800 Lf/mg nitrogen. Marsvinenes overlevelsesrate ved beskyttelsesforsøget beløber sig til 100%.

Produktets sedimentationskonstant er 3 S, målt som 1%'s opløsning i 0,15 M natriumchloridopløsning, over for 6,4 S for udgangsproduktet, og molekylvægten er ca. 44.000[±]10% over for 140.000 for udgangsproduktet.

Eksempel 2

15 ml sterilt kulturfiltrat (100.000 Lf), der er udvundet ved dyrkning af tetanusbaciller og påfølgende isolering, fortyndes med 15 ml 0,1 M fosfatpuffer, pH-værdi = 6,5, der indeholder 0,001 M

EDTA, får tilsat 300 U opløseligt papain i 1 ml 0,15 M natriumchloridopløsning, og der tilsættes 3 mg cysteinhydrochlorid. Inkubationen og oparbejdningen gennemføres på den i eksempel 1 beskrevne måde. Udbyttet andrager 50%, beregnet på Lf-enheder.

Eksempel 3

450.000 Lf tetanus-toksin i 15 ml af en 0,15 M natriumchloridopløsning (med 2.200 Lf/mg nitrogen) fortyndes med 15 ml 0,1 M fosfatpuffer, pH-værdi 6,5, der indeholder 0,001 M EDTA, får tilsat 1.500 U bærerbundet papain i 5 ml 0,15 M natriumchloridopløsning, og der tilsættes 3 mg cysteinhydrochlorid.

Efter inkubation som beskrevet i eksempel 1 fjernes det bærerbundne papain ved centrifugering, og den ovenstående væske oparbejdes ifølge eksempel 1.

Udbyttet af og egenskaberne ved fremgangsmådeproduktet svarer til udbyttet og egenskaberne ifølge eksempel 1.

Eksempel 4

15 ml tetanus-toksin (700 mg protein) blandes med 135 ml 0,1 M tris-HCl-puffer, pH-værdi 7,8, indeholdende 0,005 M CaCl_2 og inkuberes med 10 mg pronase og derpå ved 45°C i 1 time og dernæst ved 55°C i yderligere 2 timer. Efter fjernelse af et ringe bundfald indstilles reaktionsblandingen på en pH-værdi på 6,0, koncentrerer i et ultrafiltreringsapparat, og opløsningen påføres en søjle (5 x 100 cm) af "Sephadex^(R) G 100", og elueres derpå med 0,1 M tris-acetatpuffer, pH-værdi 6,0, indeholdende 1 M NaCl. Udvingningen af den ønskede fraktion gennemføres ifølge eksempel 1.

Eksempel 5

30 ml tetanus-toksin (0,5 g protein) fyldes op til 200 ml ved fortynding med 0,1 M tris-HCl-puffer, pH-værdi 8,0, indeholdende 0,001 M EDTA. Efter tilsætning af 10 mg krystallinsk trypsin holdes opløsningen ved 45°C i 6 timer. Den påfølgende chromatografi sker efter indstilling af pH-værdien på 6,0 på "Sephadex^(R) G 100", 5 x 100 cm, med 0,1 M tris-acetat-puffer, pH-værdi 6,0, indeholdende 1 M NaCl som i eksempel 1.

P a t e n t k r a v .

1. Fremgangsmåde til fremstilling af et atoksisk, immunogent produkt ud fra tetanus-toksin, k e n d e t e g n e t ved, at man behandler tetanus-toksin med en proteinase, hvorefter reaktionsproduktet renses til opnåelse af et atoksisk, immunogent produkt, som udvindes.
2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at der som proteinase anvendes en peptid-peptidohydrolase.
3. Fremgangsmåde ifølge krav 2, k e n d e t e g n e t ved, at der som proteinase anvendes papain, trypsin, bakterieproteinase ud fra *B. subtilis* eller pronase.
4. Fremgangsmåde ifølge krav 3, k e n d e t e g n e t ved, at der som proteinase anvendes papain.
5. Fremgangsmåde ifølge krav 4, k e n d e t e g n e t ved, at der til 1 mg tetanus-toksin anvendes 0,5-2 U papain.
6. Fremgangsmåde ifølge krav 4, k e n d e t e g n e t ved, at omsætningen sker ved 40-60°C.
7. Fremgangsmåde ifølge krav 4, k e n d e t e g n e t ved, at omsætningen sker ved en pH-værdi på mellem 5 og 8.
8. Fremgangsmåde ifølge krav 4, k e n d e t e g n e t ved, at papain-behandlingen udføres i nærværelse af en forbindelse, der indeholder sulfhydrylgrupper.
9. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at reaktionsproduktet til yderligere rensning chromatograferes på en molekylsigte, som kan fraskille produkter med molekylvægte mellem 20.000 og 60.000.
10. Fremgangsmåde ifølge krav 1-9, k e n d e t e g n e t ved, at produktet ved en pH-værdi på 6,0-8,5 behandles ved 20-37°C i 14-28 dage med 0,015-0,3 M af et aliphatisk mono- eller dialdehyd med 1-6 carbonatomer.
11. Fremgangsmåde ifølge krav 10, k e n d e t e g n e t ved, at der som aldehyd anvendes formaldehyd.

Fremdragne publikationer:

Dansk patent nr. 102142
Dansk patentansøgning nr. 4572/75
Britisk patent nr. 1111738
Svensk fremlæggeskrift nr. 303567
Tysk fremlæggeskrift nr. 1617568
USA patent nr. 3542920
Kirk-Othmer: Encyclopedia of Chemical Technology, bind 5 (1950),
The Interscience Encyclopedia Inc., New York, side 758.