

Den foreliggende opfindelse angår et rensat Bordetella pertussis antigen, en vaccine indeholdende et sådant antigen og en fremgangsmåde til isolering af et sådant antigen, samt anvendelse af antigenet til fremstilling af en vaccine.

Bordetella pertussis forårsager en alvorlig og svækkende sygdom hos mennesker, idet børn er særlig modtagelige, hvilken sygdom holdes under kontrol i de udviklede lande ved hjælp af stort anlagte immuniseringsprogrammer. Det har vist sig, at immunisering er en meget vigtig faktor ved begrænsningen af sygdommen, og at undladelse af at vaccinere kan føre til forøget forekomst af sygdommen. Praktisk taget alle steder fremkaldes immunisering ved anvendelse af helcelle B. pertussis-vaccine, der har vist sig at være forholdsvis effektiv til forhindring af sygdommen. Man har imidlertid erkendt, at helcellevacciner kan have adskillige ulemper. Således optræder der f.eks. hos ca. 1 ud af hver 10.000 vaccinerede børn kliniske symptomer, som kan omfatte feber, lokale reaktioner og vedvarende skrigen. Endvidere vil det vise sig, at nogle batche af helcellevaccine overhovedet ikke giver nogen beskyttelse, medens de stadig indebærer muligheden for uønskede bivirkninger.

Med den for nærværende ringe forekomst af sygdommen i udviklede lande med immuniseringsprogrammer er nytte/risiko-forholdet dårligt defineret, og mange klinikere mener, at risiciene ved vaccinering vejer tungere end de fordele, der opnås ved immunisering. Som følge heraf vaccineres mange børn ikke, og der er derfor en alvorlig risiko for en pandemi af kighoste. En betydelig forskningsindsats er derfor blevet rettet mod udviklingen af forbedrede pertussis-vacciner og navnlig acellulære vacciner, der ikke indeholder de komponenter, som er forbundet med de toksiske virkninger af de hidtil anvendte helcellevacciner, medens de indeholder de komponenter, der er nødvendige til beskyttelse mod sygdommen.

Eftersøgningen efter en sikrere, effektiv, acellulær B. pertussis-vaccine er tidligere blevet vanskeliggjort af knapheden på oplysninger vedrørende identiteten og virkningsmekanismerne af de patogene, toksiske og beskyttende dele af i helcellevacciner indeholdt B. pertussis. Arbejdet har derfor koncentreret sig om at isolere og rense de 20 eller flere overfladeantigener hos B. pertussis-organismen og karakterisere deres evne til at fremkalde immunreaktioner (se f.eks. J. Am. Med. Soc., 248 (1) 22-23). Som eksempler på antigener, der er blevet foreslået til undersøgelse, kan der nævnes lymfocytosis-fremmende faktor (pertussis toxin/LPF), filamentformet hæmagglutinin (FHA), lipopolysaccharid (LPS), agglutinogener, dermonekrotisk toxin (DNT), varmelabile og varmemestabile toxiner, polymorfonukleær leukocyt-inhibitorfaktor, adenylat-cyclase og andre overfladekomponenter (Pertussis Vaccine Workshop, 11. februar 1982, Bureau of Biologics, U.S.A.). Af andre til undersøgelse foreslåede antigener kan der nævnes trachealt cytotoxin og forskellige ydre membran-proteiner.

En tidlig ekstraktvaccine udvikledes af L. Pillemer (Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (1950) 75, 704-705), hvilken vaccine var baseret på sprængte B. pertussis-celler og viste sig at give beskyttelse, men ikke vandt indpas kommercielt som følge af præparatets toxicitet.

Som eksempler på senere B. pertussis-ekstraktvacciner, der er blevet foreslået, kan der nævnes de i britisk patentbeskrivelse nr. 2.083.358A (Takeda) beskrevne, der indebærer fjernelse af endotoxin fra kultur-supernatanter; de i fransk patentskrift nr. 2.047.886 (Institut Merrieux) beskrevne, der indebærer ekstraktion af en mikrobekvæle med et anionisk overfladeaktivt middel; og de i japansk patentbeskrivelse nr. 58-222032 (Teijin) beskrevne, der omfatter et underenheds-protein baseret på pertussis-toxin (LPF).

Meget af det arbejde, der er udført på acellulære pertussis-vacciner, koncentrerer sig om muligheden for

at basere en sådan vaccine på LPF. Det antages imidlertid, at de fleste af (om ikke alle) de hidtil observerede ugunstige virkninger, der forbindes med pertussisvaccination, står i forbindelse med toxinet. I kombination med tetanus- eller difteri-toxoid og LPS er det i stand til at fremkalde eksperimentel encephalopati hos modtagelige mus (L. Steinman et al., Nature (1982) 299, 738-740; Redhead et al., Workshop on B. pertussis, Nat. Inst. of Biol. Standards & Controls, Holy Hill, Hampstead, London, 1983). LPF kan således muligvis være ansvarligt for hjerneskader, hvis sådanne komplikationer optræder efter vaccination.

Det har nu vist sig, at et vist proteinmateriale, der er forbundet med adenylat-cyclase-aktivitet som beskrevet i det følgende, og som findes i kulturer af B. pertussis, er i stand til at give beskyttelse mod angreb af B. pertussis, når det administreres til forsøgsdyr. Denne erkendelse, at det med adenylat-cyclase-aktivitet sædvanligvis forbundne proteinmateriale er et vigtigt beskyttende antigen mod B. pertussis, muliggør fremstillingen af vaccineformuleringer omfattende antigenet præparater, der er fri for, eller indeholder reducerede mængder af, andre kendte B. pertussis-komponenter, der kan være ansvarlige for de toksiske bivirkninger, som helcellevacciner udviser.

Udtrykket "med adenylat-cyclase-aktivitet forbundet proteinmateriale" (i det følgende forkortet til "ACAP") anvendes heri som betegnelse for proteinmateriale, der ekstraheres sammen med adenylat-cyclase-aktivitet, når ekstraktionen af adenylat-cyclase-aktiviteten udføres under anvendelse af en vandig, sur (pH 3) opløsning af glycin (0,25 M). Adenylat-cyclase-aktiviteten bestemtes ved den metode, der er beskrevet af Hewlett, E., og Wolff, J. (J. Bacteriol. (1976) 127, 890-898).

Ifølge den foreliggende opfindelse tilvejebringes der et rensat Bordetalle pertussis antigen, som eks-

4

traheres sammen med adenylat-cyclase-aktivitet, når ekstraktion af aktiviteten udføres under anvendelse af en vandig, pH 3 opløsning af 0,25 M glycin, hvilket antigen er ejendommeligt ved følgende træk:

- 5 en relativ molekylvægt på 67.000-73.000 som bestemt ved 12% (vægt/vægt) polyacrylamidgel-elektroforese og et forhold mellem prolin og glutaminsyre på i det væsentlige 1:1 som bestemt ved aminosyreanalyse, hvorhos antigenet er i det væsentlige fri for intracel-
- 10 lulært B. pertussis materiale.

Antigenet kan yderligere karakteriseres ved at have følgende aminosyresammensætning:

	Rester
15 Asparaginsyre (+asparagin)	48
Threonin	33
Serin	33
Glutaminsyre (+glutamin)	62
Prolin	60
20 Glycin	77
Alanin	82
Valin	54
Methionin	4
Isoleucin	22
25 Leucin	50
Tyrosin	7
Phenylalanin	11
Histidin	13
Lysin	19
30 Arginin	37

Aminosyreanalyse har desuden vist, at ACAP indeholder en usædvanlig høj andel af prolin, således at prolin:glutaminsyre-forholdet er ca. 1:1, og dette ka-

rakteristiske træk tjener til at skelne ACAP fra andre B. pertussis-proteiner. Et yderligere karakteristisk kendetegn for ACAP er den omstændighed, at det ikke kan påvises ved radio-iodering af dets tyrosinrester hverken 5 ved chloramin-T- eller iodogen-metoden.

Antigenet ifølge den foreliggende opfindelse kan desuden karakteriseres ved at have et isoelektrisk punkt på 4,5-6,0 under analytiske isoelektriske betingelser under anvendelse af en agarosegel i nærværelse af 10% 10 sorbitol. Antigenet kan karakteriseres ved at være syrelabilt under en pH-værdi på ca. 3.

ACAP'et i de ovennævnte præparater har almindeligvis en relativ molekylvægt på ca. 67.000 til 73.000, især 69.000, og et isoelektrisk punkt på 7,0-7,4 under 15 præparative betingelser som beskrevet nedenfor. Med "relativ molekylvægt" menes den tilsyneladende molekylvægt som bestemt ved 12% (vægt/vægt) polyacrylamidgellelektroforese og standardmolekylvægtmarkører. Molekylvægten for de antigene proteiner ifølge opfindelsen kan 20 således bekvemt bestemmes ved de metoder, der er beskrevet af U. K. Laemmli, Nature, 1970, 227, 680-685. Af passende standardmolekylvægtmarkører kan der f.eks. nævnes okseserumalbumin, chymotrypsinogen A og ribonuclease.

Nærmere angivet kan ACAP'et påvises ved isoelektrisk 25 fokusering som to bånd, det ene med et isoelektrisk punkt (pI) på ca. 7,0, det andet (diffuse) bånd med et isoelektrisk punkt på 7,2-7,4. Adenylat-cyclaseaktiviteten var næsten fuldstændig forbundet med det neutrale bånd (pI = 7,0), men monoklonale antistoffer 30 mod ACAP bandt begge bånd stærkt.

Sammenfattende kan det anføres som foretrukket, at det ovennævnte ACAP er et proteinmateriale, der er karakteriseret ved at have en eller flere af følgende egenskaber:

- (i) et forhold mellem prolin og glutaminsyre på i det væsentlige 1:1,
 - (ii) tyrosinresterne er ikke ioderbare,
 - (iii) det er i det væsentlige fri for intracel-
5 lulært B. pertussis-materiale,
 - (iv) en relativ molekylvægt på 67.000 til 73.000,
 - (v) et isoelektrisk punkt på 7,0 til 7,4, og
 - (vi) det er syrelabilt under en pH-værdi på ca. 3.
- Ifølge opfindelsen tilvejebringes der desuden en
10 vaccine som angivet i krav 2 og 3-6.

Opfindelsen angår desuden et antigen ifølge opfindelsen til anvendelse til terapi eller profylakse hos mennesker.

Opfindelsen angår endvidere en fremgangsmåde til
15 isolering af antigenet ifølge opfindelsen, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved, at man behandler en kultur af B. pertussis-celler med en vandig aminosyre-puffer med pH 3,0-3,5 og indeholdende en hypertonisk koncentration af nævnte aminosyre med hensyn til
20 cellerne, skiller cellerne fra den fremkomne supernatant og isolerer antigenet fra supernatanten.

Hensigtsmæssige udførelsesformer for fremgangsmåden ifølge opfindelsen er anført i krav 9-12.

Baseret på den foreliggende opfindelse kan der
25 tilvejebringes en vaccineformulering til beskyttelse mod B. pertussis, hvilken formulering omfatter et antigen ifølge opfindelsen, der eventuelt er toxoideret f. eks. under anvendelse af formalin, glutaraldehyd eller β -propiolacton, sammen med en farmaceutisk
30 acceptabel bærer herfor.

Den ovennævnte vaccineformulering kan om ønsket indeholde mindre mængder end andre antigene forbindelser, foruden ACAP'et, f.eks. materialer opnået sammen med det fra B. pertussis-organismen ekstraherede ACAP.
35 Sådanne materialer kan omfatte fragmenter af LPS og

LPF, der som følge af deres mulige skadelige bivirkninger kræver toxoidering, f.eks. med formalin. Antigenet er imidlertid fortrinsvis i det væsentlige fri for andre antigene komponenter.

5 Den ved den overfor beskrevne fremgangsmåde til isolering af antigenet anvendte puffer giver fortrinsvis en pH-værdi på ca. 3 og indeholder fordelagtigt en minralsyre, fortrinsvis saltsyre, som den sure komponent i pufferen og enten glycin
10 eller alanin som aminosyren. Behandlingen af cel-

lerne med pufferen foretages fortrinsvis ved en temperatur på 5 til 50°C, fortrinsvis 30 til 45°C, ideelt 37°C, fordelagtigt i 1 til 24 timer, fortrinsvis 10 til 20
15 timer, med en aminosyrekoncentration på 0,1-1M, fortrinsvis 0,25M. ACAP'et er syrelabilt og kan ødelægges, hvis pH-værdien falder til under 3 under ekstraktionen.

Efter inkubering af cellerne med pufferen bortkastes cellerne, og supernatanten, der opnås efter cen-
20 trifugering, f.eks. ved ca. 100.000 g (til fjernelse af alt partikelformet materiale), underkastes om ønsket precipitation, f.eks. under anvendelse af ammoniumsulfat, koldt ethanol eller acetone.

Den opnåede supernatant-ekstrakt afprøvedes ved
25 Kendrick-testen, som beskrevet nedenfor, og viste sig at give beskyttelse hos mus mod intracerebrale angreb af B. pertussis. Kontrolvacciner, der ikke indeholdt adenylatcyclase-aktivitet, viste sig at give kun ringe eller ingen beskyttelse mod angreb af B. pertussis, hvilket ty-
30 der på, at ACAP faktisk kan være den vigtigste faktor med hensyn til immunitet. Analyse af batcher af ikke-beskyttende helcellevaccine har desuden vist, at ikke-be-

skyttelse viser tilbøjelighed til at være forbundet med manglende tilstedeværelse af adenylat-cyclase-aktivitet, hvilket yderligere tyder på, at ACAP kan være det nøgleantigen, der er nødvendigt til fremkaldelse af en immun-
5 respons mod B. pertussis.

Den ved Kendrick-testen anvendte supernatant-ekstrakt kan imidlertid også indeholde ACAP'et i små mængder i kompleksforbindelse med andre proteiner, herunder fragmenter af LPS, i hvilke tilfælde det kan være ønske-
10 ligt at rense materialet til anvendelse i vaccineformuleringerne ifølge opfindelsen yderligere. Således kan yderligere rensning f.eks. foretages ved ionbytningschromatografi og/eller ved præparativ isoelektrofokusering til eliminering af som kompleksforbindelser fore-
15 liggende materiale. Alternativt kan de to rensningsmetoder kombineres, dvs. det materiale, der ikke tilbageholdes af DEAE-gelen (dvs. det ikke-komplekserede materiale), kan underkastes elektrofokusering. Rensningsmetoden kan også omfatte chromatofokusering. Efter de ovenfor
20 beskrevne rensningstrin kan ACAP'et om ønsket renses yderligere, f.eks. ved at passere materialet gennem en immunosorbenskolonne indeholdende et passende monoklonalt antistof mod ACAP'et.

Det ovenfor beskrevne antigen, herunder
25 det ved den ovenfor beskrevne fremgangsmåde ifølge opfindelsen fremstillede, kan inkorporeres i en vaccineformulering til fremkaldelse af immunitet mod kighoste hos mennesker. En vaccine ifølge den foreliggende opfindelse omfatter derfor et antigen ifølge opfindelsen i
30 blanding med en farmaceutisk acceptabel bærer.

Farmaceutisk acceptable bærere er i dette tilfælde flydende medier, der er egnede til anvendelse som vehikler til indføring af antigenet i patienten. Et eksempel på en sådan bærer er saltopløsning. Det antigene
35 protein kan være i opløsning eller suspenderet som et fast stof i bæreren.

Vaccineformuleringen kan også indeholde et adjuvans til stimulering af immunresponsen og dermed forøgelse af virkningen af vaccinen. Passende adjuvanser til anvendelse ved den foreliggende opfindelse omfatter
5 f.eks. aluminiumhydroxid og aluminiumphosphat.

Vaccineformuleringerne præsenteres passende således, at de indeholder en slutkoncentration af antigenprotein i området fra 0,01 til 5 mg/ml, fortrinsvis 0,03 til 2 mg/ml, mest foretrukket 0,3 mg/ml. Efter formulering
10 ring kan vaccinen inkorporeres i en steril beholder, som derefter lukkes tæt til og opbevares ved lav temperatur, f.eks. 4°C, eller den kan frysetørres.

Til fremkaldelse af immunitet hos mennesker mod kighoste kan der administreres en eller flere doser af
15 den passende formulerede vaccine. Det anbefales, at hver dosis er 0,1 til 2 ml, fortrinsvis 0,2 til 1 ml, mest foretrukket 0,5 ml vaccine.

Den foreliggende opfindelse omfatter også anvendelsen af et antigen ifølge opfindelsen til fremstilling
20 af en vaccine til anvendelse ved fremkaldelsen af immunitet mod kighoste hos mennesker.

Vaccinerne ifølge den foreliggende opfindelse kan administreres ved en vilkårlig konventionel fremgangsmåde til administrering af vacciner, herunder oral indgivelse og parenteral (f.eks. subkutan eller intramuskulær) injektion. Behandlingen kan bestå i en enkelt
25 dosis vaccine eller flere doser over et vist tidsrum.

Vacciner ifølge den foreliggende opfindelse kan også omfatte en eller flere andre antigener, f.eks. passende toxoiderede typhoid- og difteri-toxiner, eller andre B. pertussis-antigener, såsom toxoideret LPF, til formindskelse af sandsynligheden for at mutantstammer af B. pertussis undgår den ledsagende immunrespons.

Opfindelsen belyses nærmere ved hjælp af de efterfølgende eksempler.
35

Eksempel 1

Sur glycin-hydrolyse og fremstilling af rå ydre-membran-proteiner.

5 Cellerne høstede efter 3/4 af vejen gennem den eksponentielle fase og centrifugeredes ved 8000 g (Sorvall, GSA vinkelhoved) i 20 minutter ved 4°C. Supernatanten fjernedes ved hjælp af en hævert, og cellerne blev straks forsigtigt resuspenderet i destilleret vand
10 til en densitet på 20-30 mg/ml celledørvægt. En tredjedel af dette volumen af 1M glycin-HCl-puffer, pH 3,0, tilsattes under forsigtig omrøring til opnåelse af en slutkoncentration på 250 mM glycin. Glycinopløsningen indeholdt EDTA (til opnåelse af 5 mM i den endelige
15 blanding) til standsning af enzymatisk aktivitet. pH-værdien kontrolleredes og genindstillede om nødvendigt til pH 3,0 under anvendelse af 1-2 M HCl. Blandingen omrørtes forsigtigt i et 37°C vandbad, indtil der var opnået temperaturligevægt, og inkuberedes derefter natten
20 over (18 timer) ved 37°C (uden omrøring). pH-værdien indstillede derefter på 7,2-7,4 ved anvendelse af 10M NaOH, der tilsattes langsomt for at undgå lokalt overskud. Cellerne sedimenteredes ved 5000 g i 20 minutter ved 5°C, supernatanten fjernedes ved hjælp af en hævert
25 og afkølede i et is-vand-bad til 1-2°C, og der tilsattes langsomt 2 rumfang af forafkølet acetone (-20 til -40°C) for at undgå, at temperaturen steg over 1-2°C. Blandingen holdtes derefter ved -20°C i 3-5 timer, og precipitatet opsamlede i et forafkølet (-10°C) vinkel-
30 hoved ved 4000 g i 20 minutter. Supernatanten fjernedes ved hjælp af en hævert og bortkastedes. Det sedimenterede precipitat opløste i isafkølet destilleret vand til ca. 1/20 af det oprindelige rumfang af celled suspension. Opløsningen befriedes derefter for uopløselige
35 stoffer og småblærer ved centrifugering ved 50000 g i 90-120 minutter ved 5°C. Supernatanten opsamlede og

holdtes nedfrosset eller frysetørredes. Der tilsattes 1 vægt/vol-% mannitol før frysetørring. Der opnåede 40-80 mg protein pr. gram celletørvægt.

5

Eksempel 2

(a) Fraskillelse af de rå ydre-membran-proteinpræparater ved DEAE-trisacryl-chromatografi.

En DEAE-trisacryl-kolonne, 3 x 16 cm, ækvilibre-
redes med 0,025 M TRIS, 0,035 M NaCl-puffer, pH 8,8, og
10 det i eksempel 1 opnåede materiale (op til 1 g protein)
dialyseredes mod den ækvilibrerende puffer og pumpedes
med 60 ml/time gennem kolonnen. Fraktionerne (99 dråber
pr. rørglas, ca. 5 ml) hældtes sammen i puljer 1-13. En
del af det totalt anvendte protein (ca. 1/4) forsinkes
15 ikke af gellejet, og vil blive opsamlet som en stor top
(0,035 M). Det tilbageholdte materiale elueredes derefter
under anvendelse af 0,1, 0,2, 0,3 og 1,0 M NaCl
i 0,025 M tris-puffer (pH 8,8). Fraktionerne hældtes
sammen og overførtes til en SDS-PAGE-plade for at iværk-
20 sætte adskillelsen af proteiner. ACAP'et var til stede i
det af kolonnen ikke-forsinkede materiale, som eftervist
ved SDS-PAGE, men var også til stede i det forsinkede
materiale, der elueredes med 0,2 M NaCl.

25 (b) Præparativ fladlags-isoelektrofokusering i granule-
ret gel (IEF).

Denne operation udførtes i overensstemmelse med
LKB-rekommanderingerne (anvendelsesnote 198, LKB-Produ-
cter AB, Bromma, Sverige). En suspension af 4 g Ultrodex
30 (en granulær gel af en modificeret glucosepolymer)
(LKB) og 5 ml forblandet ampholin (puffer, handelsbeteg-
nelse), pH 3,5-9,5, suspenderedes i destilleret vand til
et slutrumfang på 100 ml, hældtes ud i en vandret bakke
10,8 x 24,3 cm og inddampedes under en lufstrøm til den
35 anbefalede grænse. I lag samledes strimler af tre pa-
pirsvæge (LKB, 2117-106), gennemvædet i en 1:20-fortyn-

ding af det samme ampholin i destilleret vand, anbragtes i hver ende af bakken. Materialet fra eksempel 2a indlejredes i gelen under anvendelse af en indføringskabelon (2 x 9,4 cm), som pressedes ind i gelen ved 1/3 til 5 1/4 af afstanden langs dens længde fra den anodiske ende, den indesluttede gel fjernedes, overførtes til en 10 ml engangssprøjte, suspenderedes i 3 ml af det nævnte materialet fra eksempel 2a (indeholdende op til 500 mg protein) og sprøjtedes til sidst tilbage i det tomme rum 10 dannet ved dens fjernelse. Gelen udglattedes derefter med en spatel, hvis det var nødvendigt, og man lod den henstå til ækvilibrering i 20 minutter. I mellemtiden gennemblødttes én papirsvæge i en 1:100-fortynding af phosphorsyre (vægtfylde 1,75 g/cm³) og føjedes til 15 strimlerne ved den anodiske ende, og en anden gennemvædedes i 1 M NaOH og anbragtes ved den katodiske ende. Bakkeunderstøtningen i fladlags-IEF-apparatet (Pharmacia type FBE-3000) afkøledes ved hjælp af rindende ledningsvand (15°C) under operationen. Gelen underkastedes ope- 20 rationen ved konstant 8 watt.

ACAP'et kunne påvises som to bånd, det ene ved pI 7,0, og det andet (diffuse) bånd ved pI 7,2-7,4. Adenylat-cyclase-aktiviteten var næsten fuldstændigt forbundet med det centrale bånd (pI 7,0), men monoklonale antistoffer mod ACAP bandt begge bånd stærkt. 25

Under anvendelse af en metalskabelon deltes gellaget derefter i 30 parallelle felter, og gelen blev skrabet af hvert felt under anvendelse af en spatel og overførtes til reagensglas indeholdende 1 ml destilleret 30 vand. pH-Værdien af hver fraktion målttes på dette stade. Gelsuspensionerne overførtes derefter til små plastkolonner og elueredes med 2 ml 0,2 M ammoniumhydrogencarbonatpuffer, pH 7,0, og de gelfri eluater blev nedfrosset (-40°C).

(c) Analytisk isoelektrisk fokusering.¹³

- 5 (i) Der anvendtes den samme procedure som for 2(b) ovenfor, men der anvendtes en 12% polyacrylamid-gel i nærværelse af 8M urinstof. Der opnåedes de samme resultater som for 2(b).
- 10 (ii) Den samme metode, men under anvendelse af en agarosegel i nærværelse af 10% sorbitol, viste 4 immuno-reaktive bånd ved pI 4,5-6,0. Båndet ved pI 4,0 tilbageholdt størstedelen af adenylat-cyclase-aktiviteten.

Eksempel 3

Rensning af ACAP under anvendelse af en monoklonal-immunsorbens-kolonne.

- 15 Museascitesvæske indeholdende et for ACAP specifikt monoklonalt immunoglobulin underkastedes precipitering ved stuetemperatur ved tilsætning af 2 rumfang 27 vægt/vol-% Na₂SO₄ og henstilledes i 2-4 timer, før den underkastedes sedimentering (2000 g i 15 minutter). Se-
- 20 dimentet genopløstes og dialyseredes mod PBS. 500 mg af dette protein (UV-bestemmelse) kobledes til 70 ml pakket CNBr-Sepharose[®] CL4B efter fabrikantens instruktioner (Pharmacia). Sephadex[®] G-50 (medium) hældtes på en 500
- 25 mm x 25 mm kolonne til en laghøjde på 220 mm. Efter vaskning af kolonnen med elueringspuffer (0,2 M ammoniumhydrogencarbonat, pH 7,0, indholdende 0,01% thiomersal) hældtes et 5 mm tykt lag af nr. 12 Ballotini glas-
- 30 knuser. En suspension af bakterie- eller gærceller sættes f.eks. til glasperlerne, og perlerne rystes for at bryde cellerne itu. Efter yderligere vaskning hældtes immunosorbensgelen på Ballotini-glasperlelaget, idet
- 35 dette var adskilt fra Sephadex[®]-laget, hvilket muliggjorde fraskillelse af begge. Kolonnen vaskedes yderligere med elueringspuffer, og til sidst anbragtes der

endnu et Ballotini-glasperlelag ovenpå det 100 mm høje immunosorbenslag til beskyttelse af toppen af kolonnen.

Til fraskillelse af ACAP'et på immunosorbenskolonnen tilførtes 180 ml af det ikke-tilbageholdte eluat
5 fra DEAE-trisacryl-adskillelsen (eksempel 2) indeholdende 1 mg/ml protein (Lowry) ved 5°C til immunosorbenskolonnen med 0,25 ml/min., vaskedes med elueringspuffer (0,2 M ammoniumhydrogencarbonat, pH 7, 0,01 vægt/vol-% thiomersal), og, efter at basislinien havde stabiliseret
10 sig, tilførtes der 50 ml 6M urinstof i elueringspuffer til kolonnen til eluering af det adsorberede materiale. Anbringelsen af immunosorbensmaterialet over et Sephadex[®] -G-50-lag muliggjorde den samtidige fraskillelse af proteinet fra urinstoffet under operationen.

15

Eksempel 4

Dyrkning af B. pertussis.

Det til organismens vækst anvendte definerede medium var baseret på den formel, der er angivet af
20 Steiner og Scholte (J. Gen. Microbiol. 63, 211-220, 1971) som tidligere beskrevet (Novotny og Brookes, J. Biol. Stand. 3, 11-29, 1975). Alle kulturer dyrkedes ved 36-37°C. De flydende kulturer, i løst tilkapslede rystekolber (500 ml konisk kolbe med 200 ml medium), podedes
25 med en kultur dyrket i 48 timer på Cohen-Wheeler-medium (dette medium er beskrevet i Novotny og Brookes, J. Biol. Stand. 3, 11-29, 1975) med 2% agar og 5% hesteblood og omrørtes til opnåelse af en gasudskiftningshastighed på 20-40 $\mu\text{M O}_2/\text{time}$. Sådanne flydende kulturer anvendtes
30 til at pøde mediet i 5 liter eller 70 liter fermentere fremstillet helt i glas, medens pH-værdien holdtes på 7,6 ved reguleret tilsætning af 2M HCl, og mætningen med opløst oxygen holdtes på 5-10% ved omrøring med en bladorrør. Kulturerne høstede før afslutningen af den
35 eksponentielle fase, dvs. efter ca. 36 timers inkubering (Novotny og Cownley, "Effect of growth conditions

on the composition and stability of the outer membrane of Bordetella pertussis" i Manclark and Hill (editors), International Symposium on Pertussis, U.S. Government Printing Office, Washington D.C., 1979, 99-123).

5

Eksempel 5

Kendrick-test.

Denne test udførtes i overensstemmelse med W.H.O-kravene til pertussisvaccine under anvendelse af 10 MF1 eller NIH-mus (OLAC, kategori 3, fri for de fleste patogener indbefattet *B. bronchiseptica*) af en vægt på 14-16 g. Antigenet, i 0,5 ml rumfang, indpodedes intraperitonealt og omfattede en topfortynding og tre firefold seriefortyndinger. Efter to ugers forløb udsattes 15 musene for intracerebrale angreb under anvendelse af den anbefalede angrebsstamme 18-323 (100-200 LD₅₀). Antallet af overlevende dyr i hver gruppe anvendtes til beregning af ED₅₀ og af den relative styrke i forhold til British Pertussis Reference Vaccine 66/84 under anvendelse af et 20 program med parallellinie-probitanalyse. Der udførtes også en sammenligningstest under anvendelse af en kombineret FHA- og LPF-vaccine. Resultaterne er anført i tabel 1.

Til nærmere forklaring af hvad tabel 1 angiver, 25 skal der anføres følgende. Gruppen af mus injiceredes med graduerede doser som ovenfor anført af testmaterialet. Som ovenfor anført udsattes musene efter et vist tidsrum for intracerebrale angreb, og antallet af overlevende dyr i hver gruppe registreredes. Procenttallene 30 med hensyn til overlevende dyr i hver gruppe (udtrykt som probits) afsattes mod log-fortyndinger af de ved testen anvendte doser. På basis heraf beregnedes en dosis, efter hvilken 50% af dyrene overlevede, dvs. ED₅₀ (= 50% effektiv dosis). Ved sammenligning af ED₅₀ for 35 testmateriale og referencepræparatet kan der bestemmes en "relativ styrke", dvs. hvor meget af testmaterialet

der har samme styrke som referencematerialet. Dette kan udtrykkes direkte i internationale enheder (= I.E.) (næstsidste kolonne i tabel 1) og, idet man kender den til beskyttelse nødvendige dosis, ved den sandsynlige 5 mængde af testmateriale, der udgør en enkelt human dosis (sidste kolonne i tabel 1).

17

Tabel 1

Beskyttende styrke af Bordetella pertussis-fraktioner ved musebeskyttelsestesten mod intracerebralt angreb af B. pertussis 18-323 ("Kendrick-test").

5	Materiale	ED ₅₀ µg	Relativ styrke I.E./µg protein	4 I.E.i µg pro- tein (= enkelt human dosis)
10	Råt glycin- hydrol. af B.pertussis hydrolyseret ved 37°C	20	0,02	190
15	Råt glycin- hydrol. af B.pertussis hydrolyseret ved 4°C	77	0,003	1333
	Hydrolyseret ved 37°C	20	0,011	363
25	Hydrolyseret ved 53°C	149	0,001	4000
30	B.pertussis immunorensset adenylat- cyclase	19	0,011	364
	FHA/LPF vaccine	77	0,003	1333

Eksempel 6

Aminosyreanalyse af ACAP.

Aminosyreanalysen udførtes under anvendelse af en Rank Hilger Chromaspek aminosyreanalysator. Prøver fremstilledes ved tilsætning af 250 µl af 6N HCl (fortyndet ud fra BDH Aristar-kvalitet) indeholdende 0,1% (vægt/vol) phenol til det tørrede prøvemateriale i et tykvæget Pyrex-reagensglas (7,5 x 1,2 cm). Rørene blev derefter trukket ud i en af oxygen og naturgas frembragt blæselampeflamme til frembringelse af en snæver åbning. Efter frysning af indholdet i et fast-CO₂-ethanol-bad blev hvert reagensglas forbundet gennem en manifold og fælde til en højvakuumpumpe, og man lod det stå i 10 minutter til fjernelse af luft. Reagensglassene blev derefter lukket tæt til og anbragt i en ovn ved 110°C til hydrolyse. De hydrolyserede prøver tørredes i en vakuumekssikkator over natriumhydroxidperler. Den tørrede remanens opløstes i 250 µl aminosyreanalysator-startpuffer til automatisk analyse.

De i tabel 2 anførte aminosyreværdier er gennemsnitstal af resultaterne opnået fra dobbelte 24, 48 og 68 timers hydrolyser, undtagen i tilfældene med valin og isoleucin, hvor der anvendtes 68 timers hydrolyseværdierne.

Værdier for cystin, cystein og tryptophan kunne ikke bestemmes ved denne metode.

Tabel 2

	Rester
Asparaginsyre (+asparagin)	48
Threonin	33
5 Serin	33
Glutaminsyre (+glutamin)	62
Prolin	60
Glycin	77
Alanin	82
10 Valin	54
Methionin	4
Isoleucin	22
Leucin	50
Tyrosin	7
15 Phenylalanin	11
Histidin	13
Lysin	19
Arginin	37

20

Eksempel 7

Vaccineformuleringer.

Vacciner til anvendelse ved immunisering kan fremstilles ved konventionelle metoder med følgende bestanddele:

- 25 a) Difteri-, tetanus- og pertussis-vaccine i simpel opløsning.

Hver 1 ml vaccine indeholder:

	Difteri-toxoid	>60 I.E.
	Tetanus-toxoid	>120 I.E.
	Pertussis-antigen ifølge opfindelsen	>0,363 mg
	Natriumborat	<10,03 mg
5	Ravsyre	<3,10 mg
	Thiomersal	0,04-0,2 mg
	Natriumchlorid	<8,5 mg
	Vand	til 1 ml

10 b) Adsorberet difteri-, tetanus- og pertussis-vaccine.

Difteri-, tetanus- og pertussis-komponenterne adsorberes til aluminiumhydroxidgel ved hjælp af standardmetoder.

Hver 1 ml vaccine indeholder:

15	Difteri-toxoid	>60 I.E.
	Tetanus-toxoid	>120 U.L.
	Antigen ifølge opfindelsen	>0,363 mg
	Uopløselige aluminiumsalte	<ækvivalent med 0,093 mmol (2,5 mg) Al.
20	Natriumborat	<8,01 mg
	Ravsyre	<2,48 mg
	Thiomersalt	0,04-0,2 mg
25	Natriumchlorid	<6,8 mg
	Vand	til 1 ml

c) Pertussis-vaccine.

Hver 1 ml vaccine indeholder:

30	Antigen ifølge opfindelsen	>0,363 mg
	Thiomersal	0,04-0,2 mg
	Natriumchlorid	<8,5 mg
	Vand	til 1 ml

P A T E N T K R A V

1. Renset Bordetella pertussis antigen, som ekstraheres sammen med adenylat-cyclase-aktivitet, når ekstraktion af aktiviteten udføres under anvendelse af en vandig, pH3 opløsning af 0,25 M glycin, og som er
5 k e n d e t e g n e t ved følgende træk:
en relativ molekylvægt på 67.000-73.000 som bestemt ved 12% (vægt/vægt) polyacrylamidgel-elektroforese og et forhold mellem prolin og glutaminsyre på 1 i det væsentlige 1:1 som bestemt ved aminosyreanalyse,
10 hvorhos antigenet er i det væsentlige fri for intracellulært B. pertussis materiale.

2. Vaccine, k e n d e t e g n e t ved, at den omfatter et antigen ifølge krav 1 i blanding med en farmaceutisk acceptabel bærer.

15 3. Vaccine ifølge krav 2, k e n d e t e g n e t ved, at antigenet er til stede i en mængde på fra 0,01 til 5 mg/ml.

4. Vaccine ifølge krav 3, k e n d e t e g n e t ved, at antigenet er til stede i en mængde på fra 0,03
20 til 2 mg/ml.

5. Vaccine ifølge et vilkårligt af kravene 2-4, k e n d e t e g n e t ved, at den yderligere indeholder en farmaceutisk acceptabel adjuvans.

6. Vaccine ifølge et vilkårligt af kravene 2-5,
25 k e n d e t e g n e t ved, at den yderligere indeholder et eller flere andre antigener.

7. Antigen ifølge krav 1 til anvendelse til terapi eller profylakse hos mennesker.

8. Fremgangsmåde til isolering af et antigen
30 ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at man behandler en kultur af B. pertussis-celler med en vandig aminosyrepuffer med pH 3,0-3,5 og indeholdende en hypertonic koncentration af nævnte aminosyre med hensyn til cellerne, skiller cellerne fra den fremkomne supernatant

og isolerer antigenet fra supernatanten.

9. Fremgangsmåde ifølge krav 8, k e n d e t e g -
n e t ved, at aminosyren er glycin.

5 d e t e g n e t ved, at den nævnte isolering fra super-
natanten omfatter anvendelse af ionbytningschromatogra-
fi.

10 11. Fremgangsmåde ifølge krav 8 eller 9, k e n -
d e t e g n e t ved, at den nævnte isolering fra super-
natanten omfatter anvendelse af præparativ isoelektrisk
fokusering.

15 12. Fremgangsmåde ifølge krav 8 eller 9, k e n -
d e t e g n e t ved, at den nævnte isolering yderligere
omfatter passage af det isolerede materiale gennem en
immunoabsorptionskolonne indeholdende et passende mono-
klonalt antistof mod antigenet.

13. Anvendelse af et antigen ifølge krav 1 til
fremstilling af en vaccine til anvendelse ved fremkal-
delsen af immunitet mod kighoste hos mennesker.