



(19) DANMARK



(12) **FREMLÆGGELSESSKRIFT** (11) **148828 B**

DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENEN

(21) Patentansøgning nr.: 4759/78

(51) Int.Cl.⁴: **C 12 P 19/04**

(22) Indleveringsdag: 26 okt 1978

C 08 B 37/00

(41) Alm. tilgængelig: 28 apr 1979

(44) Fremlagt: 14 okt 1985

(86) International ansøgning nr.: –

(30) Prioritet: 27 okt 1977 FR 7732416

(71) Ansøger: *ROUSSEL–UCLAF S.A.; Paris, FR.

(72) Opfinder: Claudine *Brossard; FR, Martine *Henry; FR, Denis *Raichvarg; FR.

(74) Fuldmægtig: Patentbureauet Magnus Jensens Eftf.

(54) **Fremgangsmåde til fremstilling af polysaccharider med antigen og immunostimulerende virkning**

Opfindelsen angår en fremgangsmåde til fremstilling af hidtil ukendte polysaccharider som angivet i krav 1's indledning.

Polysaccharider ekstraheret fra visse stammer af *Haemophilus influenzae* er beskrevet i litteraturen.

Således beskriver en artikel fra 1971 i *Journal of Immunology* (bd. 107, nr. 4, oktober 1971, side 1071-1080) fremstillingen af sådanne polysaccharider ud fra bakterielle kapsler af en stamme af *Haemophilus influenzae* af serotype b. Ifølge denne offentliggørelse skal størstedelen af de virkninger, som forårsages af *Haemophilus influenzae*, såvel hos voksne som hos børn, og navnlig i tilfælde af meningitis skyldes tilstedeværelsen af et toxin af polysaccharidkarakter, som er til stede i kapslerne af *Haemophilus influenzae* af serotype b.

Genstanden for denne offentliggørelse er således at fremstille en kapsulær ekstrakt og derefter fra denne ekstrakt at eliminere endotoxinet og de pyrogene stoffer ved deproteinerings med henblik på at finde et middel til de førnævnte reaktioner.

Til udførelse af en sådan fremstilling søger forfatterne overvejende at fremstille den kapsulære form af *Haemophilus influenzae* for deraf at isolere det søgte produkt. Schematisk går de frem ved formaldehydbehandling efterfulgt af en fældning med ethanol og derefter en søjleeluering.

Ifølge angivelserne i den nævnte artikel udgøres det opnåede polysaccharid af et polyribosephosphat med glycosidbindinger mellem C₁- og C₄-atomerne i furanosidformen af D-ribose.

Ifølge denne artikel har det opnåede polysaccharid mistet sine toksiske egenskaber, medens det har bevaret sine specifikke antigene og immuniserende egenskaber over for *Haemophilus influenzae*.

Det har nu vist sig, at man ikke mere ud fra kapsler af *Haemophilus influenzae*, men ud fra cellerne selv kan isolere et detoxificeret toxin af polysaccharidkarakter, som frembyder antigene og immunostimulerende egenskaber samt en god tolerance, og som kan benyttes i behandlingen eller forebyggelsen af lidelser fremkaldt af *Haemophilus influenzae* samt i behandlingen af

forskellige åndedrætslidelser eller bronchitis. Disse hidtil ukendte polysaccharider har en tilsyneladende molekylvægt over 200.000 og er i hovedsagen opbygget af gallactose, glucose og mannose.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendommelig ved det i krav 1's kendetegnende del anførte.

Den tilsyneladende molekylvægt er molekylvægten bestemt ved hjælp af en porøs gel, som er standardiseret ved hjælp af kendte makromolekylære opløsninger.

Blandt standardiserede porøse geler, som tillader molekylær sortering, kan nævntes Sephadex (indregistreret varemærke) (Sephadex G 200) og agarosegeler (Sepharose 4B, indregistreret varemærke).

Betegnelsen polysaccharider bestående i hovedsagen af gallactose, glucose og mannose angiver, at disse polysaccharider indeholder mindst 40-50% af disse hexoser, især omkring 44,5% (bestemt efter den korrigerede orcinolmetode).

Polysacchariderne, som fås ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen indeholder desuden en lille mængde hexosaminer, især glucosamin.

Det efter Elson Morgan bestemte indhold af hexosaminer er for de omhandlede polysaccharider i nærheden af 2%.

Disse forbindelser indeholder desuden spor af pentoser, men indeholder ikke hverken heptoser eller uronsyrer.

Disse produkter indeholder heller ikke diaminopimelinsyre. Fraværet af diaminopimelinsyre i polysacchariderne defineret som ovenfor angiver, at der ikke forekommer nogen forurening med peptidoglycaner fra membranvæggen.

Ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen anvendes fortrinsvis stammer af *Haemophilus influenzae* deponeret i Pasteur-instituttet i Paris under numrene 52.151 og 5481, især den stamme, som er deponeret i Pasteur-instituttet i Paris under nr. 52.151.

Disse stammer tilhører serotype a.

Stammerne af *Haemophilus influenzae* kan navnlig dyrkes i omrørt væskeformet miljø under aerobe betingelser. De benyttede dyrkningsmiljøer er de sædvanlige for disse stammer.

Disse miljøer kan f.eks. omfatte kødekstrakter, caseinpepton, gærautolysater, sojapapainpepton, sukkerarter, uorganiske elementer, hemin, coenzym I og destilleret vand.

Man høster cellerne efter fuldstændig udvikling, dvs. efter ca. 6 timer, ved en temperatur på 37°C.

De mikrobielle celler vaskes derefter.

Ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen udføres ekstraktionen fortrinsvis ved en temperatur i nærheden af 65°C.

Rensningen af det urene råprodukt består fortrinsvis i at fælde nucleinsyrerne med streptomycinsulfat.

Det i den overliggende væske tilstedeværende streptomycinsulfat kan med fordel elimineres ved dialyse på en porøs membran. Den porøse membran kan foreligge i form af en hul fiberpatron såsom fibrene "Hollow fiber" H₁DP₁₀, som har en tærskel for tilbageholdelse af stoffer, hvis molekylvægt er over 10.000.

Det således rensede produkt kan med fordel lyofiliseres.

Den forsigtige hydrolyse af det rensede produkt udføres fortrinsvis i varmen i et vandigt-organisk opløsningsmiddel i nærværelse af en ionbytterharpiks.

Den forsigtige hydrolyse af det rensede produkt kontrolleres ved Schwartzman's reaktion (påvisning hos kaniner af en lokal ikke-specifik hypersensibilitet, som ytrer sig ved en ændring af endothelium af de kutane kar og en leucocytær infiltration af væggen af de små kar).

Den forsigtige hydrolyse af det rensede produkt udføres med fordel ved tilbagesvalingstemperatur i en blanding af vand og chloroform i nærværelse af en ionbytterharpiks som f.eks. Dowex (indregistreret varemærke) 50 W x 8, 200-400 mesh H⁺ nr. 41631.

Den forsigtige hydrolyse standses, når Schwartzman's reaktion bliver negativ. Under forsøgets betingelser bliver denne reaktion negativ efter ca. 15 timers forløb. Det opnåede produkt kan derpå med fordel lyofiliseres.

De ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen fremstillede produkter har meget interessante farmakologiske egenskaber. De har navnlig bemærkelsesværdige antigene og immunostimulerende egenskaber. De har desuden en meget god tolerance.

Disse egenskaber er illustreret nedenfor i den eksperimentelle del.

Disse egenskaber retfærdiggør anvendelsen af de ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen fremstillede polysaccharider som medikamenter.

Disse medikamenter finder f.eks. anvendelse i behandlingen eller forebyggelsen af sygdomme fremkaldt af *Haemophilus influenzae* og i behandlingen og forebyggelsen af åndedrætslidelser, bronchitis og kronisk bronchitis.

Den normale dosis, som varierer efter det benyttede produkt, den behandlede patient og den pågældende lidelse, kan f.eks. være fra 1 til 100 mikrogram pr. dag ad perlingual vej hos mennesker.

Som medikamenter kan de omhandlede polysaccharider inkorporeres i farmaceutiske præparater beregnet til indgift ad fordøjelsesvejen eller parenteralt eller lokalt.

De farmaceutiske præparater fremstilles efter gængse metoder og kan f.eks. være faste eller flydende og foreligge i de i den humane medicin gængs benyttede farmaceutiske former såsom f.eks. uoversukrede eller oversukrede tabletter, gelatinekapsler, granulater, stikpiller og injektionspræparater. De fremstilles efter gængse metoder. Den eller de aktive bestanddele kan inkorporeres deri sammen med i disse farmaceutiske præparater normalt benyttede tilsætningsstoffer såsom talkum, gummi arabicum, lactose, stivelse, magnesiumstearat, kakaosmør, vandige eller ikke-vandige bærestoffer, fedstoffer af animalsk eller vegetabilsk oprindelse, paraffinderivater, glycoler og diverse fugte-, dispergerings- eller emulgeringsmidler samt konserveringsmidler.

Nedenstående eksempel illustrerer fremgangsmåden ifølge opfindelsen.

Eksempel

Trin A: Dyrkning

Ved simpel blanding af de forskellige bestanddele fremstiller man et næringsmiljø efter recepten:

- kødekstrakt	5	g
- natriumchlorid	5	g
- caseinpepton	5	g
- gærautolysat	5	g
- dikaliumphosphat	3,5	g
- monokaliumphosphat	1,5	g
- sojapapainpepton	20	g
- destilleret vand	ad 1000	ml

Man indstiller pH-værdien på 7,4-7,6 og steriliserer miljøet. Man poder miljøet ved hjælp af en stamme af *Haemophilus influenzae* (Pasteur-instituttet serotype a nr. 52.151) og tilsætter 10 g glucose, 1 mg hemin og 1,5 mg coenzym I. Man holder ved 37°C i varmeskab i 24 timer.

Man indfører det ovenfor opnåede podemateriale i 10 liter næringsmiljø med samme sammensætning som angivet ovenfor og indeholdende de samme tilsætningsstoffer.

Efter 16 timer ved 37°C får man en forkultur, som man benytter til podning af 80 liter af et næringsmiljø med samme sammensætning som angivet ovenfor, hvorpå man tilsætter 800 g glucose, 120 mg hemin og 160 mg coenzym I samt 2,8 liter moderopløsning med følgende sammensætning for 10 liter: 1 liter gær-ekstrakt, 400 g glucose i 1 liter vand, vand ad 10 liter, pH-værdi indstillet på 8.

Man lader fermentere i 6 timer, hvorpå man centrifugerer kontinuerligt ved 30.000 omdrejninger pr. minut. Man får 130 g fugtige celler.

Trin B: Ekstraktion af cellerne

Til 100 g fugtige celler opnået ovenfor sætter man 870 ml afmineraliseret vand opvarmet til 68°C og 870 ml 90%'s phenol ligeledes opvarmet til 68°C. Man omrører ved 2000 omdrejninger pr. minut og lader blandingen henstå ved 68°C i 30 minutter.

Man opbevarer blandingen 12 timer ved 4°C, skiller phenol- og vandfasen fra hinanden ved kontinuerlig centrifugering (på Westfalia-centrifuge) og klarer derpå den vandige fase.

Man foretager en anden ekstraktion af phenolfasen, idet man tilsætter det ved ovenstående centrifugering opnåede slam og afmineraliseret vand til opnåelse af samme rumfang som ved

den første ekstraktion. Man omrører som ovenfor 30 minutter ved 68°C, lader henstå 12 timer ved 4°C og centrifugerer.

Man får de to vandige faser .hidrørende fra ekstraktionerne og dialyserer dem i 4 dage til eliminering af phenolet. Efter elimineringen af phenolet forener man de vandige faser, inddamper dem på Amicon-membran (membran H₁DP₁₀ med en tærskel for tilbageholdelse af stoffer, hvis molekylvægt er over 10.000), idet man reducerer rumfanget til 3,5 liter.

Man centrifugerer ved 4°C ved 12.000 omdrejninger pr. minut i 20 minutter, samler den vandige fase og lyofiliserer.

Der fås 6 g af et råprodukt, som foreligger i form af et fnugagtigt hvidt pulver.

Trin C: Rensning af råproduktet

Til 1200 ml af en opløsning indeholdende 5 mg/ml råprodukt fremstillet ovenfor sætter man langsomt i løbet af ca. 45 minutter og under kraftig omrøring 240 ml af en 2,5%'s opløsning af streptomycinsulfat. Man fælder således nucleinsyrerne.

Man lader henstå 15 minutter og centrifugerer ved 12.000 omdrejninger pr. minut i 20 minutter ved 4°C. Man samler den vandige fase, eliminerer streptomycinsulfatet fra den overliggende væske ved dialyse på porøs membran (Hollow fiberpatron H₁DP₁₀) med en tærskel for tilbageholdelse af stoffer, hvis molekylvægt er over 10.000.

Man lyofiliserer derpå det således opnåede rensede produkt og får 1,3 g af det rensede produkt.

Analyse: C% 40,26 H% 6,84 N% 6,53

Indhold af:

- proteiner	(Lowry's metode)	9,5%
- neutrale hexoser	(orcinolmetode)	41 %
- neutrale hexoser	(korrigeret orcinolmetode)	35 %
- uronsyrer	(korrigeret carbazol)	6,8%
- hexosaminer	(Elson Morgan's metode)	5,6%
- pentoser	(Bial's metode)	1 %

Trin D: Hydrolyse

I 650 ml vand opløser man de 1,3 g ovenfor opnåede rensede produkt, omrører ved 4°C i 12 timer og centrifugerer derpå i 20 minutter.

Man samler den overliggende væske, tilsætter 650 ml chlorofom og 310 g Dowex-harpiks (50 W x 8 200-400 mesh H⁺) frasuget på Büchner-tragt.

Man opvarmer blandingen til tilbagesvaling i 15 timer, hvilket er den fornødne tid til opnåelse af, at Schwartzman's reaktion bliver negativ, eliminerer chloroformet ved inddampning under vakuum ved 40°C og lyofiliserer derpå.

Der fås 0,65 g polysaccharider ekstraheret fra mikrobielle enheder af Haemophilus influenzae.

Analyse: C% 40,02 H% 6,53 N% 0,90

Indhold af:

- | | | |
|-----------------|----------------------------|-------------------|
| - proteiner | (Lowry's metode) | 1 % (ca. 1,9%) |
| - neutrale oser | (korrigeret orcinolmetode) | 44,5% (ca. 83,4%) |
| - uronsyrer | (korrigeret carbazol) | 0 % |
| - osaminer | (Elson Morgan's metode) | 2 % (ca. 3,7%) |
| - pentoser | (Bial's metode) | 0,8 % (ca. 1,5%) |
| - heptoser | (Dische's metode) | 0 % |
- undersøgelse for diaminopimelinsyre: negativ
 - identifikation af neutrale hexoser (ved chromatografi på celluloseacetat, silicagel, papir): tilstedeværelse af gallactose, glucose, mannose
 - identifikation af hexosamin ved elektroforese: tilstedeværelse af glucosamin.

De i parentes angivne procentværdier er omregnet i forhold til en sum på 100% med et fugtighedsindhold på ca. 9,3%.

Farmakologisk undersøgelse

I. Bestemmelse af antigen aktivitet

Den antigene aktivitet af det opnåede produkt påvises over for et anti-(Haemophilus influenzae type a)-serum.

Denne påvisning udføres gennem i immunologien gængs benyttede undersøgelser, nemlig gennem en "ringtest", gennem passiv hemagglutination, ved agglutination af kim, ved Ouchterlony's teknik og ved tilvejebringelse af fældningskurve.

Ved disse forskellige undersøgelser har det fremstillede produkt givet værdier for passiv hemagglutination indtil 1/128 og 1/256.

II. Påvisning af immunogen styrke

Kaniner af racen Fauve de Bourgogne deles i 6 hold. Hvert hold modtager ad interkostal og intravenøs vej en dosis af produktet fra trin D lig med 1, 10 og 100 mg/kg. En serie på 3 kaniner modtager produktet fra trin D uden hjælpestof. Den anden serie immuniseres ved hjælp af produktet fra trin D plus komplet Freund's hjælpestof. En injektion af produktet foretages hver 30. dag. Der foretages blodudtagning på tidspunkterne:

t_0 - t_{+38} dage $-t_{+47}$ dage $-t_{+74}$ dage $-t_{+76}$ dage $-t_{+101}$ dage $-t_{+105}$ dage $-t_{+130}$ dage.

Tilstedeværelsen af specifikke antistoffer detekteres fra og med den 38. dag og forøges efter gentagelserne, idet de efter denne immunisering fundne værdier for hemmagglutination er 1/128 og 1/256. Serum undersøges ved "ringtest"-teknikken, ved agglutinationsteknikken og ved den kvantitative fældnings teknik.

Man noterer ingen forskel mellem dyrene, som er vaccineret med produktet fra trin D alene, og dem, der er vaccineret med produktet fra trin D plus Freund's hjælpestof.

III. Opsoniner

Denne teknik har til formål ved kalorimetermetoden at påvise leucocytternes evne til at phagocyttere bakterier.

Man antager ved denne bestemmelse, at 0% opsonisering er lig med en optisk tæthed på 0,050, og at 100% opsonisering er lig med en maksimal optisk tæthed på 0,250.

Efter at have foretaget beregningen, konstaterer man, at opsoniseringsprocenten hos dyr, der er immuniseret med produktet fra trin D, varierer mellem 50 og 70%, idet opsoniseringsprocenten hos kontroldyrene er 0.

IV. Påvisning af baktericid evne af serum

Kaninserum immuniseret med produktet fra trin D bringes i kontakt med en kultur af Haemophilus influenzae i forskellige fortyndinger. Efter podning på et gelosemiljø og dyrkning konstaterer man antallet af levende kolonier med følgende kontrol:

- kanin før immunisering $t = 0$
(positiv kontrol = 0% dødelighed for bakterierne)
- serum af kanin vaccineret med kimene af *Haemophilus influenzae*
(negativ kontrol = 100% dødelighed).

Man kan notere en meget regulær forøgelse af den baktericide evne som en funktion af tiden.

t_0	= 0% dødelighed af bakterierne
t_{38} dage	= 0%
t_{47} dage	= 0%
t_{52} dage	= 80% dødelighed af bakterierne
t_{74} dage)
)
t_{76} dage) mellem 75 og 80%
t_{101} dage	= 83%
t_{130} dage	= 100%

Kontrol: anti-H.i.-serum = 100%.

Denne undersøgelse viser den specifikke aktivitet af det ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen fremstillede produkt.

V. Neutralisation af den endotoxiniske aktivitet lokalt

Produktet fra trin D indgivet på kaniner antagoniserer den lokale aktivitet af *Haemophilus influenzae* ved at neutralisere aktiviteten af et produkt, som udløser en lokal reaktion (Schwartzman's reaktion).

VI. Undersøgelse af akut toksicitet

Den akutte toksicitet bestemmes på et hold på 10 mus. Efter indgift ad intraperitoneal vej er den letale dosis 50, DL_{50} , af produktet fra trin D mellem 65 og 110 mg/kg.

P a t e n t k r a v

1. Fremgangsmåde til fremstilling af polysaccharider med antigen- og immunostimulerende virkning og med en tilsyneladende molekylvægt over 200.000 og i hovedsagen bestående af galactose, glucose og mannose, k e n d e t e g n e t ved, at man på fast eller i flydende miljø dyrker en stamme af *Haemophilus influenzae*, serotype a, at man efter komplet udvikling høster bakteriecellerne, at man foretager en ekstraktion af de vaskede bakterieceller med en phenol-vand-blanding og fra den vandige fase isolerer et urent råprodukt, som man renser, hvorpå man foretager en forsigtig hydrolyse af det således opnåede rensede produkt med henblik på eliminering af de kombinerede fede syrer, og at man isolerer de ønskede polysaccharider.
2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at ekstraktionen af de vaskede bakterieceller ved hjælp af en vandig phenolopløsning udføres ved en temperatur i nærheden af 65°C.
3. Fremgangsmåde ifølge krav 1-2, k e n d e t e g n e t ved, at rensningen af det urene råprodukt består i at udfælde nucleinsyrerne ved hjælp af streptomycinsulfat.
4. Fremgangsmåde ifølge krav 1-3, k e n d e t e g n e t ved, at den forsigtige hydrolyse af det rensede produkt udføres i varmen i et vandigt-organisk opløsningsmiddel i nærværelse af en ionbytterharpiks.
5. Fremgangsmåde ifølge krav 1-4, k e n d e t e g n e t ved, at man benytter stammer deponeret i Pasteur-instituttet i Paris under numrene 52.151 og 5481, fortrinsvis nr. 52.151.

Fremdragne publikationer:

GB patent nr. 725938.