



PATENTDIREKTORATET  
TAASTRUP

- (21) Patentansøgning nr.: 0935/84  
(22) Indleveringsdag: 23 feb 1984  
(24) Løbedag: 01 jul 1983  
(41) Alm. tilgængelig: 23 feb 1984  
(44) Fremlagt: 21 maj 1991  
(86) International ansøgning nr.: PCT/US83/01007  
(86) International indleveringsdag: 01 jul 1983  
(85) Videreførelsesdag: 23 feb 1984  
(30) Prioritet: 06 jul 1982 US 395743

(51) Int.Cl.<sup>5</sup> A 61 K 39/385  
A 61 K 39/02

- (71) Ansøger: \*Connaught Laboratories Inc.; Swiftwater; PA 18370, US  
(72) Opfinder: \*Lance K. Gordon; US

(74) Fuldmægtig: Ingeniørfirmaet Budde, Schou & Co.

(54) **Fremgangsmåde til fremstilling af et vandopløseligt covalent polysaccharid-diphtheria-toxoid-konjugat samt haptent, i det væsentlige frit for protein og nucleinsyre, til anvendelse ved fremgangsmåden**

(56) Fremdragne publikationer

US pat. nr. 4210641, 4220717, 4307080  
Andre publikationer. Prog. Clin. Res. (1980), 77-94  
J. of Exp. Med, vol 152 (1980), 361-376  
Chem. Abs., vol 98 (1983) 123.940n

(57) Sammendrag:

935-84

Et vandopløseligt covalent polysaccharid-exotoxoid-konjugat med en molekylstørrelse mellem 140.000 og 4.500.000 Dalton og et ribose/protein-forhold mellem 0,25 og 1,00, og som er i stand til at producere T-celle-afhængig antistofreaktion mod polysaccharid fra H. influenza b, fremstilles ved at blande et derivatiseret diphtheria- eller tetanustoxoid i en hovedsagelig cyanogen-halogenid-fri opløsning med et cyanogen-halogenid-aktiveret kapsuleret H-influenza-b-polysaccharid-haptent bestående af tilnærmelsesvis ækvimolære mængder ribose, ribitol og fosfat, hvilket polysaccharid i forvejen er blevet størrelsesreguleret med varme, indtil mere end 60% har fået en molekylstørrelse mellem 200.000 og 2.000.000 Dalton.

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til fremstilling af et vandopløseligt covalent polysaccharid-diphtheria-toxoid-konjugat, der er i stand til at frembringe T-celle-afhængig antistofreaktion mod polysaccharid fra *Haemophilus influenzae b*, med en molekylvægt mellem 140.000 og 4.500.000 Dalton og med et ribose/protein-forhold mellem 0,25 og 1,0, og denne fremgangsmåde er ifølge opfindelsen ejendommelig ved, at man

a) opvarmer et kapsulært polysaccharid af *Haemophilus influenzae b* bestående af tilnærmelsesvis ækvimolære mængder ribose, ribitol og fosfat, indtil mere end 60% af polysaccharidet har en molekylvægt mellem 200.000 Dalton og 2.000.000 Dalton,

b) aktiverer det fremkomne størrelsesregulerede polysaccharid med cyanogenbromid,

c) fjerner i det væsentlige alt uomsat cyanogenbromid, og

d) omsætter det aktiverede produkt med et adipinsyrehydrazid derivatiseret diphtheriatoxoid.

Opfindelsen angår også et haptent, i det væsentlige frit for protein og nucleinsyre, til anvendelse ved den nævnte fremgangsmåde, og dette haptent er ejendommeligt ved, at det er fremstillet ud fra kapsulært *Haemophilus influenzae b*-polysaccharid, bestående af tilnærmelsesvis ækvimolære mængder ribose, ribitol og fosfat, ved opvarmning, indtil mindre end 20% af polysaccharidet har en molekylvægt under 200.000 Dalton, og mindre end 20% har en molekylvægt over 2.000.000 Dalton med dekstranstandard som reference ved gelpermeeringschromatografi.

Polysaccharidet er fortrinsvis til stede som natriumsalt.

Det aktiverede polysaccharid blandes grundigt med et exotoxoid, diphtheria-toxoid, til udvirkning af konjugation. Exotoxoidet derivatiseres ved som afstandsstykke at anvende en bro på 4-8 C-atomer, nemlig med adipinsyrehydrazidderi-

vatet af diphtheria-toxoid (D-AH). Exotoxoidet er knyttet til adskillige AH-enheder.

Ved hjælp af denne metode fås der en konjugatvaccine, der fremkalder en T-celle-afhængig reaktion mod polysaccharidet fra *Haemophilus influenzae* b.

Et sådant konjugat er særlig værdifuldt til anvendelse ved forebyggelse af *Haemophilus*-infektioner hos børn og spædbørn.

Schneerson et al. omtaler i *New Developments with Human and Veterinary Vaccines, Progr. Clin. Res.*, 77-94 (1980) fremkaldelsen af forøget immunogenitet af *Haemophilus influenzae* (Hib) kapsulært polysaccharid ved subcutan injektion af en saltopløsning af Hib-polysaccharid covalent bundet til proteinkonjugater. Der fremstilles adipinsyre-hydrazid-derivater af albumin, hæmocyandin og diphtheria-toxin.

Schneerson et al. omtaler i artiklen *Protein-Polysaccharide Conjugate Vaccines*, side 265-272 (1982) anvendelsen af flere proteiner, herunder diphtheria-toxin, til fremstilling af konjugater med forskellige bakterielle kapsulære polysaccharider til anvendelse som "T-celle-afhængige" antigener til subcutan saltopløsningsinjektion i laboratoriedyr. Ca. 85% af proteinet omdannes til konjugatet, og ca. 30% af polysaccharidet bindes i det tomme volumen efter passage af konjugatet gennem en 4B Sepharose<sup>®</sup>-søjle. Cyanogenbromid-aktivering af Hib-polysaccharidet og adipinsyre-dihydrazid-derivatisering af proteinet anvendes.

Schneerson et al. angiver i *Bacterial Capsular Polysaccharide Conjugates* i L. Weinstein og B.N. Fields (ed.), *Seminars in Infections Disease, Vol. 4, Bacterial Vaccines*, New York, 311-321 (1982), en metode til covalent binding af Hib-kapsulært polysaccharid til proteiner til forøgelse af polysaccharidets immunogenitet. AH-derivater af BSA, HSA, diphtheria-toxin og hæmocyandin anvendes som bærerproteiner.

I *Journal of Exp. Med.* 152, 361-376 (1980) beskrives en metode til covalent binding af *Haemophilus influenzae* type b - kapsulært polysaccharid til flere proteiner, idet

der anvendes adipinsyre-dihydrazid som afstandsstykke mellem det kapsulære polysaccharid og bærerproteinet.

Ifølge de ovennævnte artikler anvendes der i intet tilfælde toxoider, og der er ikke tale om anvendelsen af et trin til regulering af haptens molekylvægt, undgåelse af anvendelsen af calcium, fjernelse af overskud af cyanogenhalogenid til undgåelse af excessiv tværbinding og et udbytte på 70-100% baseret på udgangspolysaccharid. Den fra artiklerne kendte teknik afviger således væsentligt fra den foreliggende opfindelse, såvel med hensyn til udøvelsen deraf som med hensyn til resultatet.

Schneerson et al. har ifølge Prog. Allergy 33, 144-178 (1982) undersøgt fremstillingen og virkningen af vaccine sammensat af polysaccharid covalent bundet til et "T-celleafhængigt" bærerprotein. Adipinsyre-hydrazidderivaterne af diphtheria-toxiner eller tetanus-toxoid blev covalent omsat med cyanogenbromid-behandlet Hib-polysaccharid, og produktet blev dialyseret, ledt gennem en 4B Sepharose<sup>®</sup>-søjle, sterilfiltreret og opbevaret som en steril saltopløsning.

Chu et al. beskriver i Infection and Immunity, 245-256 (1983) fremstillingen af konjugater ved kobling af AH-derivater af Hib-polysaccharider med tetanus-toxoid eller hæmocyanin. Polysaccharidet aktiveres med CNBr, omsættes med AH og dialyseres, efterfulgt af gelfiltrering og frysetørring. AH-polysaccharidderivatet og proteinet kobles derefter. Udbyttet af Hib-tetanus-toxoid-konjugater er 62%, når reaktanterne udgør 30 mg/ml.

Forfatterne til de to sidstnævnte artikler omtaler intet trin til regulering af haptens molekylvægt og ej heller undgåelsen af anvendelsen af calcium eller fjernelse af overskud af cyanogenhalogenid til undgåelse af excessiv tværbinding. Den teknik, der er beskrevet i disse artikler, afviger således betydeligt fra den foreliggende opfindelse, såvel med hensyn til udøvelsen deraf som med hensyn til det opnåede resultat.

Der kan således på basis af den foreliggende opfindelse opnås en konjugatvaccine, der er anvendelig til immunisering mod sygdommen diphtheria. Virkningsstyrken hos mennesker af sådanne konjugater er større end den, der er opnåelig med de kendte diphteriapræparater. Fremgangsmåden giver ved omhyggelig kontrol og fjernelse af overskydende aktivator et polysaccharidkonjugat opbygget af adskillige exotoxoidmolekyler knyttet til enkelte polysaccharidmolekyler forbundet gennem et afstandsstykke og i det væsentlige uden tværbundne eller polymere derivater. Formlen kan generelt gengives som PRP- $X_n$ , hvor PRP er polysaccharidet, og X er den toxoide molekylidel, og n er et helt tal under 20, idet et typisk gennemsnit er 7-8. (Diphtheria-toxoid-konjugatet omtales her som PRP-D, uden brug af tallet n).

På tegningen vises immunogeniteten af Haemophilus influenzae b-kapsulært polysaccharid, dvs. anti-PRP-reaktionen. Dette søjlediagram viser de data, der er opnået ifølge tabel I til slut i beskrivelsen (fra eksempel 5).

Udviklingen af stabil humoral immunitet kræver genkendelse af fremmedstoffer mod mindst to separate sæt lymfocytter. Disse sæt er B-lymfocytterne, der er forstadier for antistof-dannende celler, og T-lymfocytterne, der modulerer B-cellernes funktion. Medens nogle antigener, herunder flere polysaccharider, er i stand til direkte at stimulere B-celler til produktion af antistoffer (T-uafhængige antigener), skal de fleste antigener (T-afhængige) præsenteres for B-cellen af en T-lymfocyt. Med hensyn til de her omhandlede vacciner genkendes den exotoxoidale del af vaccinen af T-cellesystemet. Eftersom proteinet bærer både sine egne antigene determinanter og det covalent bundne haptent, bør begge sæt determinanter præsenteres af T-celler for B-cellerne. Resultatet af indgivelsen af dette bærer-haptent-konjugatpræparat er, at PRP præsenteres som et T-afhængigt immunogen. En T-afhængig præsentation af PRP medfører protektiv immunitet hos børn og spædbørn, den del af befolkningen, der er udsat

for den største risiko. Konjugatvaccinen har derfor særlig værdi til småbørn.

Indgivelse af et sådant konjugat til kvinder medfører en høj andel af IgG-antistoffer mod vaccineantigenerne, som gennemtrænger placentabarrieren under svangerskab, og yder således spædbarnet beskyttelse fra fødslen.

T-uafhængige antigener får B-celler til terminalt at differentiere i antistof-afsondrende celler (plasmaceller), medens T-afhængige reaktioner er betydeligt mere komplekse. Efter modtagelsen af en T-afhængig stimulus indgår B-cellebestanden ikke blot i antistofproduktionen, men også i proliferation og i modning. Herved fremkommer en stigning i antallet af B-celler, der fremstiller antistoffer mod PRP, og en forøgelse af antallet af B-celler, der er i stand til at reagere på en udsættelse nr. 2 for PRP. Gentagen immunisering resulterer i yderligere stigninger af antallet af PRP-specifikke B-celler og derfor højere antistoftiters, en booster-reaktion. Kort sagt, medens T-uafhængige reaktioner er begrænset af antallet af reaktionsdygtige B-celler, resulterer T-afhængige reaktioner i en stigning af det samlede antal antigen-reaktive celler.

Den her omhandlede PRP-exotoxoid-vaccine har vist sig at fungere som et T-afhængigt immunogen hos laboratoriedyr. Alle dyr i en gruppe af kaniner immuniseret serievis med en standarddosis PRP-D udviser booster-reaktioner. Desuden viser primære immuniseringer med bærerproteiner, der anvendes i konjugatet, f.eks. diphtheria-toxoid til PRP-D, sig at forøge begyndelsesreaktionen på PRP-komponenten i PRP-exotoxoid-konjugatet. En lignende forøgelse af PRP-reaktion iagttages ikke hos dyr, der er præpareret med et exotoxoid, der er forskelligt fra det, der anvendes i konjugatet.

Den omhandlede vaccine er et PRP-exotoxoid-haptenbærer-konjugat. I sådanne vacciner bidrager det antigene, men svagt immunogene haptenmolekyle (PRP) til en ny antigen-

specificitet over for stærkt immunogene bærermolekyler, såsom diphtheria-(D)-toxoid.

Det rensede diphtheria-toxoid (D), der anvendes som bærer ved fremstillingen, er et i handelen værende exotoxoid, 5 der er modificeret (derivatiseret) ved tilknytning af et 4-8-C-atom-afstandsmolekyle, nemlig adipinsyre-dihydrazid (ADH), ved hjælp af vandopløseligt carbodiimid-kondensationsmetoden. Det modificerede exotoxoid, adipinsyre-hydrazidderivatet X-AH, befries derpå for uomsat ADH. Dette er et opløseligt produkt, der i det væsentlige er uden tværbinding, 10 hvilket bekræftes ved udeblivelse af en væsentlig stigning i molekylstørrelse, bestemt ved gelchromatografi og polyacrylamidgel-elektroforese.

Haemophilus influenzae b's kapsulære polysaccharid 15 fremstilles ud fra kilder, der fås i handelen, således som de anvendes til autoriserede polysaccharidvacciner og fås hos Connaught Laboratories. Medens polysaccharidet imidlertid konventionelt er rensat som et calciumsalt, skal anvendelsen af calciumioner undgås, fordi de griber ind i anvendelsen 20 af carbonatpuffer ved konjugationsproceduren. Polysaccharidets molekylstørrelse justeres derpå ved opvarmning, til den ønskede dimension for haptenet er nået. Typisk er opvarmning af det flydende polysaccharid i 15 minutter ved 100°C tilstrækkeligt til at sikre, at mindre end 20% af 25 molekylerne har en molekylstørrelse, der er mindre end 200.000 Dalton, og mindre end 20% har en molekylstørrelse på over 2.000.000 Dalton. Denne tilpasningsoperation er vigtig for at opnå et rigtigt PRP-D-konjugat.

Det størrelsesjusterede polysaccharid, der således 30 fås, aktiveres med en aktivator for at skabe en elektrofil gruppe på polysaccharidet, såsom et cyanogenhalogenid eller natriumborhydrid. En typisk aktivator, der anvendes, er cyanogenbromid. Uomsat aktivator fjernes fuldstændigt, fordi en væsentlig rest bevirker tværbinding af proteinet i den 35 følgende reaktionsblanding. Det fremkomne tværbundne produkt indfanger polysaccharid, idet der fås et lavere udbytte af

vaccine og et konjugat med større molekylstørrelse, der afviger med hensyn til kemiske egenskaber og opløselighed fra det ifølge opfindelsen fremstillede konjugat, og en vaccine, der ikke har den ønskede andel af den her omhandlede  
5 vaccine.

Det aktiverede PRP og X-AH kombineres derpå og får lov at reagere i kulden. Nogle af hydrazidgrupperne på det derivatiserede exotoxoid reagerer med de aktiverede steder på PRP til dannelse af covalente bindinger. Produktet er  
10 PRP-covalent bundet til derivatiseret exotoxoid via en 4-8 C-atom-bro. Dette reaktionsprodukt renses ved gelpermeeringschromatografi for at fjerne eventuelt uomsat protein og forureninger med ringe molekylstørrelse. Den typiske molekylstørrelse for hovedfraktionen er ca. 675.000 Dalton i  
15 relation til en dekstranstandard. Et typisk interval for relativ molekylstørrelse er 140.000 Dalton til 4.500.000 Dalton.

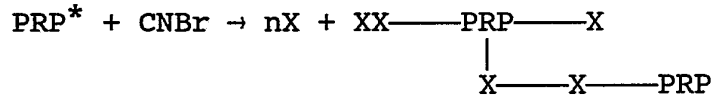
Et konserveringsmiddel, såsom "Thimerosal", tilsættes; når det drejer sig om "Thimerosal", i en slutkoncentration  
20 på 1:10.000. Hovedkoncentratet filtreres gennem et 0,2 $\mu$ m membranfilter og opbevares koldt.

PRP-exotoxoid-konjugationsproduktet er varmemodstandsdygtigt og vandopløseligt. Manglen på tværbinding konstateres ved udeblivelsen af en væsentlig stigning i molekylstørrelsen i forhold til udgangspolysaccharidets, bestemt ved gelpermeeringschromatografi og ved polyacrylamid-gelelektroforese. Varmestabiliteten sikrer lang lagerholdbarhed og et stabilt produkt selv under ugunstige klimaforhold.

Reaktionen kan gengives skematisk i to trin:

- 30 (1)  $\text{PRP} + \text{CNBr} \rightarrow \text{PRP}^*$   
(2)  $\text{PRP}^* + n\text{X} \rightarrow \text{PRP}(-\text{X})_n$

Hvis fjernelsen af cyanogenhalogenidet ikke udføres effektivt, opstår der foruden konjugationen af det aktiverede PRP og exotoxoid til dannelse af  $\text{PRP}(-\text{X})_n$  sådanne uønskede  
35 reaktioner som f.eks. dannelse af X-X eller flere forbundne derivater, f.eks.



5 En typisk dosis PRP-exotoxoidkonjugatvaccine til mennesker til subcutan eller intradermal injektion består af 0,5 ml, der indeholder 10 mikrogram ribose eller et tilnærmelsesvis ækvivalent til 40 mikrogram af konjugatproduktet. Der fremstilles ampulopløsninger ved fortynding af  
10 hovedkoncentratet med -phosphatpufret saltvandsopløsning, idet der anvendes "Thimerosal" som konserveringsmiddel.

Produktet fremkalder antistofdannelse hos mennesker over for både PRP- og exotoxoid-komponenten.

Opfindelsen vil i det følgende blive forklaret ved  
15 hjælp af eksempler.

#### Eksempel 1

##### Fremstilling af PRP

A. Organisme. Kapsulært polyribosylribitolphosphat (PRP) af Haemophilus influenza b fremstilles ud fra Eaganstammen. Kulturen overføres gentagne gange, og der fremstilles lyophiliseret podemateriale. Fra dette lyophiliserede podemateriale foretages en yderligere overføring for at fremstille vådarbejdende podemateriale (opbevares v. -60°C). Der fremstilles gæringsanlægportioner af bakterieceller ud  
25 fra det vådarbejdende podemateriale.

Dyrkningsrenhed bestemmes efter følgende kriterier:

1. Gram-negative farvekarakteristika.
2. Vækst på agar indeholdende NAD (diphosphopyridin-nucleotid) og hæmin (okse type I krystallinsk  
30 salt af ferrihæm).
3. Manglende evne til at gro på agar uden NAD eller hæmin.
4. Agglutination ved specifikke antisera (type b Haemophilus influenza b, Hyland Laboratories).

35 B. Dyrkning og medier. Til subdyrkning af bakterien, dvs. forud for inokulering af en gæringsbeholder, anvendes BHI-Agar (pr. liter: 37 g BHI Difco, 15 g Bacto Agar Difco,

0,6 ml 1%'s NAD Sigma-kvalitet III og 6 ml 0,2%'s hæmin (Sigma-okse, type 1). Celler (20 timer) vasket fra en agar-overflade anvendes til at inokulere Haemophilus influenza b (Hib) flydende medie (1 liter alikvote mængder); disse 5 kulturer inkuberes under rystning, indtil bakterien når den logaritmiske fase i sin vækstcyklus. På dette tidspunkt anvendes 2 liter kultur til at inokulere hver 40 liter flydende Hib-medier i en gæringsbeholder, og der tilsættes 300 ml 8%'s "UCON" (Union Carbide smøremiddel). Efter 16-18 10 timer er kulturen i gæringsbeholderen parat til høst.

Sammensætningen af Hib-flydende medier pr. 1000 ml er:

	Gærekstraktdialysat, Difco	5,0	g
	Casaminosyrer, Difco	22,5	g
15	Natriumphosphat, dibasisk	12,4	g
	Dekstrose	5,59	g
	Hæmin	20,0	g
	Ammoniumhydroxid (30%)	0,1534	ml
	NAD 1%	0,6	ml

20 Når en gæringsbeholder høstes, bestemmes kulturenrenheden ved passende Gram-farvning og dyrkningsteknik (se A.1-4 ovenfor). Der tilsættes "Cetavlon" (hexadecyltrimethylammoniumbromid) til kulturen indtil en slutkoncentration på 0,1%. Efter 30 minutter, når bakterierne er blevet inaktiveret, opsamles den faste pasta ved centrifugering. Den 25 våde pasta opbevares ved -70°C indtil videre forarbejdning.

C. Renset polysaccharid. Ekstraktion og efterfølgende rensning af PRP udføres ved hjælp af følgende procedure:

1. Dissociering ud fra detergent.

30 For hvert g af pastaens vådvægt tilsættes 10 ml 0,4 molær NaCl. Suspensionen blandes i en blandemaskine, som fås i handelen, i 30 sekunder. Blandingen centrifugeres i 15 minutter ved 17.000 G i kulde (4°C). Den ovenpå flydende væske opsamles, og der tilsættes ethanol indtil en koncentration på 25%. Dette materiale centrifugeres derpå i 2 timer 35 ved 17.000 G (4°C), og den ovenpå flydende væske gemmes.



En termogravimetrisk analyse (TGA) anvendes til bestemmelse af fugtighedsindholdet. Yderligere analyser beregnes på tørvægtbasis.

Kriterierne for godkendelse omfatter:

- 5 (a) Analyse for ribose (Orcinolmetode): over 30%.  
(b) Analyse for protein (Lowry's metode): under 1%.  
(c) Analyse for nucleinsyrer (U.V. absorbens): under 1%.  
10 (d) Fældning med specifikke immunsera (modimmunelektroforesemetode).

Desuden bestemmes molekylstørrelsen ved passende gelpermeeringschromatografi. Polysaccharidet overvåges for endotoxin ved hjælp af Limulus-lysatsprøve og ved feberfremkaldende prøve på kaniner.

15 En typisk portion har følgende karakteristika:

- (a) Proteinindhold 0,5%.  
(b) Indhold af nucleinsyre 0,35%.  
20 (c) Residualokseantigener: ingen forurening af det rensede PRP med okse RNA-ase og DNA-ase, der anvendes til fremstilling af polysaccharidet som målt ved radioimmunanalyse.  
(d) Endotoxinindhold måles ved hjælp af Limulus amoebocyt/lysatsanalyse (LAL): 200 ng/mg PRP.  
25 (e) Kd på CL-4B-"Sephacrose"<sup>®</sup>: 0,40. En værdi på 0,30 svarer til en tilnærmelsesvis molekylvægt på 1.125.000 i forhold til dekstranstandarder.

D. Fremstilling af polysaccharid(PRP)reagens. Polysaccharidet renses således som en væske, men der anvendes ikke calcium ved rensningsproceduren. (Gængs polysaccharidrensning giver et calciumsalt, men calcium kan kombinere med carbonatpufferen, der anvendes nedenfor, under konjugation, så at der dannes et bundfald).

Polysaccharidets størrelse justeres ved opvarmning ved 100°C i et tidsrum, der er proportionalt med graden af 35 den nødvendige størrelsesændring. Polysaccharidets størrelse justeres, så at mindre end 20% eluerer fra en CL-4B "Sepha-

rose<sup>®</sup>-kolonne i mellemrumsvoluminet, og mindre end 20% eluerer med et Kd på over 0,5. Hovedfraktionen har en molekylstørrelse på 200.000 til 2.000.000 Dalton.

#### Eksempel 2

##### 5 Aktivering af PRP

A. Polysaccharidet afkøles på isbad til 4°C i en reaktionsbeholder udstyret med magnetisk omrører. PRP's begyndelsesvolumen ved en koncentration på 25 mg/ml (20-30 mg/ml-interval) i destilleret vand noteres. Derpå tilsættes  
10 natriumchlorid til en koncentration på 0,85%.

B. pH i den fremkomne opløsning af polysaccharidets natriumsalt hæves til 10,5-11,0 ved tilsætning af 1N natriumhydroxid. (Dette interval vælges, fordi ved lavere pH sker der mindre reaktion med cyanogenbromid, og ved højere pH  
15 nedbrydes polysaccharidet).

C. Tørt cyanogenbromid opløses i 0,005 N natriumbicarbonatpuffer med pH 10,5-11,0 og sættes straks (inden for 10 minutter efter fremstillingen) til reaktionsbeholderen i et forhold på 0,4 mg/mg PRP.

20 D. Blandingens pH justeres til og holdes ved 10,5-11,0 i 6 minutter ved tilsætning af natriumhydroxid.

E. pH sænkes derpå til 6,0 med 1N HCl. (Surt pH stabiliserer de aktiverede steder, der er dannet på polysaccharidet med cyanogenbromid. Yderligere sænkning af pH resulterer  
25 i hydrolyse af PRP).

G. Der tilsættes et lige så stort volumen saltvandsopløsning, pH 6,0, i forvejen afkølet til 4°C.

H. Cyanogenbromid/polysaccharidblandingen overføres til et inddampningsapparat og inddampes til det oprindelige  
30 volumen i trin A.

I. Trin G og H gentages ialt 10 gange. Således fjernes ca. 99,9% af det uforbrugte cyanogenbromid, medens polysaccharidkoncentrationen holdes på 25 mg/ml. Hvis cyanogenbromidet ikke fjernes, reagerer det med diphtheria-exotoxoidet,  
35 der anvendes nedenfor.

Eksempel 3Fremstilling af D-AH-bærer

A. I handelen værende diphtheria-exotoxoid (D) i destilleret vand inddampes til 20-40 mg/ml, typisk 35 mg/ml, over en membran, der tilbageholder molekyler på over 10.000 Dalton, i en omrørt fordamper med positivt tryk.

B. En tør blanding af 8 mg adipinsyre-dihydrazid (ADH) pr. mg protein og 0,75 mg 1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)carbodiimid (EDAC) pr. mg protein anbringes i en reaktionsbeholder udstyret med en effektiv omrører og en pH-sonde, der tillader overvågning og regulering af pH.

C. Derpå tilsættes diphtheria-exotoxoidet til reaktionsbeholderen, så at forholdet mellem reaktanterne bliver

diphtheria exotoxoid	= 35 mg protein/ml
ADH	= 8,0 mg/mg protein
EDAC	= 0,75 mg/mg protein

(Anvendelsen af acetatpuffer på tilsætningen af først ADH og derpå EDAC resulterer i et vedvarende fnugget bundfald. Reaktanterne har tilstrækkelig pufningskapacitet i sig selv).

D. pH justeres straks til 4,7 og holdes på  $4,7 \pm 0,2$  i mindst 2 timer.

1. Forløbet af den kemiske reaktion kan følges på pH-kontrollens registrator. Om nødvendigt får reaktionen lov at forløbe i mere end 2 timer, indtil pH har været stabilt i mindst 15 minutter (dvs. 15 minutter, uden at det er nødvendigt at tilsætte HCl til regulering af pH).

2. Den forbrugte mængde HCl noteres som kontrol af processen.

3. Temperaturændringer i reaktionsbeholderen overvåges ligeledes.

E. Reaktionsproduktet dialyseres ved  $4^{\circ}\text{C}$  mod to ændringer af saltvandsopløsning, et minimum på 100 volumendele og 8 timer pr. ændring.

F. Produktet dialyseres derpå mod to ændringer af phosphatpufret saltvandsopløsning, minimumvolumen, tid og temperatur som i trin E.

G. Produktet (D-AH) inddampes tilbage til 25 mg/ml protein med et apparat med positivt tryk og en 10.000 molekylvægt-membran.

H. Koncentratet filtreres sterilt ( $0,2 \mu$ ) og opbevares ved  $4^{\circ}\text{C}$ .

Analyse af en prøve af en typisk portion af en sådan D-AH-bærer viser et forhold på 38,3 mikrogram ADH/mg D. Chromatografi af den samme prøve viser en Kd-værdi på CL-4B "Sephacryl"® på 0,75, hvilket svarer til en tilnærmelsesvis molekylvægt på 139.000 i forhold til proteinstandarder.

#### Eksempel 4

15 Dannelsen af det covalente polysaccharid/diphtheria-toxoid-konjugat (PRP-D)

A. Diphtheria-toxoid-adipinsyre-hydrazidbæreren (D-AH) i eksempel 3 behandles ved en koncentration på 25 mg/ml med natriumbicarbonat til en koncentration på 0,5 molær, og pH justeres til 8,5. (Udtalt lavere saltkoncentrationer resulterer i dannelsen af en gel i den endelige reaktionsblanding med aktiveret polysaccharid).

B. I reaktionsbeholderen, der kan tillukkes, tilsættes en lige så stor mængde af den vaskede PRP-opløsning, der blev fremstillet i eksempel 2, og pH skal ligge stabilt på 8,4-8,6. (Hvis CNBr ikke er fjernet, vil pH hurtigt glide nedad, og der vil dannes et rigeligt bundfald. Denne reaktion indtræffer, selv når der ikke er polysaccharid til stede. Der må ikke forekomme en klar ændring af reaktanternes fysiske udseende efter kombinationen).

C. Reaktionsblandingen omtumles i 15-18 timer ved  $4^{\circ}\text{C}$ .

D. Konjugatet renses ved gelpermeeringschromatografi på "Sephacryl"®-300 i ligevægt i phosphatpufret saltvandsopløsning for at fjerne uomsat protein og materiale med en molekylstørrelse under 140.000 Dalton. (Hvis udgangspoly-

saccharidet har for ringe størrelse, vil det ikke være muligt at adskille konjugatet fra frit protein på denne måde).

E. Prøver af det rensede konjugat udtages til kemisk analyse, der beskrives i det følgende afsnit af det foreliggende eksempel.

F. Der tilsættes "Thimerosal" til det rensede konjugat indtil en koncentration på 1:10.000, og produktet opbevares ved 4°C, indtil det analyseres.

G. Produktet filtreres 0,2 µ sterilt. (Hvis polysaccharidet ikke er størrelsesjusteret som beskrevet i eksempel 1(D), dvs. hvis det er for stort, kan det fremstillede konjugat ikke filtreres).

#### Analyse

Der udføres prøver på koncentratmassen i eksempel 4, og disse giver følgende resultater:

a) Riboseindhold: 156,5 mikrogram/ml.

(Til beregning af PRP-værdien i eksempel 5 anvendes en omregningsfaktor på 2 til udregning af en nominal polysaccharidkoncentration baseret på den empirisk bestemte ribosekoncentration).

b) Proteinindhold: 330 mikrogram/ml.

c) Ribose/protein-forhold: 0,47 (grænser 0,25-1,0).

d) Chromatografisk analyse på "Sephacrose"® CL-2B giver en chromatografisk profil, der viser homogen fordeling af konjugatmolekyler som en enkelt spids.

e) Kd (polysaccharid): 0,36 med "Sephacrose"® Cl-4B, 0,77 med Cl-2B.

Bestemt ved hjælp af individuel fraktionsriboseanalyse med hensyn til PRP. En værdi på 0,36 på Cl-4B svarer til en tilnærmelsesvis molekylstørrelse på 674.000 i forhold til dekstranstandarder.

f) Kd (protein): 0,34 med Cl-4B, 0,71 med Cl-2B.

Bestemt ved individuel Lowry fraktionsanalyse med hensyn til protein. Ændringen i diphteria-exotoxidets Kd-værdi fra 0,75 til 0,34 på Cl-4B viser, at proteins konjuga-

tion med polysaccharid danner et molekyle, der er chromatografisk forskelligt fra begge råmaterialer.

g) Frit protein: mindre end 5%.

Frit protein repræsenterer derivatiseret diphtheria-bærerprotein, der ikke er blevet bundet til PRP. Det bestemmes ved at sammenligne den mængde protein, der eluerer i en diphtheria-exotoxoid-prøves stilling i forhold til det totale eluerede protein.

h) Endotoxinindhold: 1  $\mu\text{g/ml}$ .

Endotoxin mængdebestemmes ved Limulus Amøbocyt/lysatanalyse (LAL). Endotoxinindholdet beløber sig til 64 ng pr. 10  $\mu\text{g}$  ribose dosis PRP-D til mennesker.

i) Pyrogenicitet: Koncentratmassen opfylder USA-standarder for ikke-pyrogenicitet, når der anvendes en vægtækvalivalent (til mennesker) dosis på 0,15  $\mu\text{g}$  ribose pr. ml pr. kg legemsvægt af kanin.

j) Polyacrylamid-gel-elektroforese (PAGE):

PAGE-analyse foretages for at få yderligere bevis på renhed og covalent binding mellem polysaccharid og protein. Medens fri bærer bindes lige over halvvejen i gelsøjlen, omtrent ved katalases stilling (molekylvægt 60.000), er PRP-D-konjugatet ikke i stand til at komme ind i gelen (før thyroglobulins stilling, molekylvægt 330.000). PRP-D udviser et enkelt bånd ved begyndelsen.

k) Cyanogenbromid:

Medens der anvendes cyanogenbromid (CNBr) i de første trin før fremstillingen af et PRP-D-konjugat, udelukkes det derefter fra produktet. Flere trin i fremgangsmåden bidrager til reduktion af CNBr-indholdet. Imidlertid fjerner den endelige rensning af vaccinen ved hjælp af gelpermeeringschromatografi enhver forurening under molekylvægt 100.000. Denne rensning udelukker forurening med residualsportioner af frit CNBr eller dets nedbrydningsprodukter.

1) Varmestabilitet: En undersøgelse af PRP-D-konjugatets varmemodstandsevne foretages. Materiale Massen indampes 40 fold, og der udtages 3 prøver på hver 3 ml. Den

første holdes i et 4°C varmt bad i 16 timer, og den tredje opvarmes i et 100°C varmt vandbad i 30 minutter. Prøverne udføres med hensyn til protein- og riboseindhold, gelpermeeringschromatografi med "Sephacrose"® Cl-4B og SDS-polysaccharid-gelelektroforese (PAGE).

Resultaterne viser ingen afgørende ændring i ribose- eller proteinindhold mellem prøverne sammenlignet med resultaterne af prøverne a) og b) ovenfor. De chromatografiske analyser viser en mindre nedgang i konjugatmaterialets molekylstørrelse, efterhånden som betingelserne gøres strengere. Imidlertid bibeholder materialet efter fraktioneret analyse af disse prøver ved at måle absorbens ved 254 nm kun én spids, der falder sammen med polysaccharidspidsen, og der kommer ingen spidser for frit protein; resultaterne kan således sammenlignes med dem for prøverne d) og g) ovenfor. Dette viser, at bindingen mellem proteinet og polysaccharidet ikke brydes, men nedgangen i molekylstørrelse skyldes brydningen af bindingerne i det lineære polysaccharid. Dette påvises yderligere ved sammenligning af PAGE-analyse af disse prøver med resultaterne, der er beskrevet under j) ovenfor. Frit protein kunne ikke påvises i nogen af prøverne, selv ikke i nærvær af et detergent (natriumdodecylsulfat). Dette bekræfter stærkt den derivatiserede protein/polysaccharidbindings covalens og dens stabilitet under behandlingen ved høj temperatur.

#### Eksempel 5

##### PRP-D-immunogenicitetsafprøvning

Dette forsøg er udformet for at vise T-celle-afhængigheden, som den kommer til udtryk: i bærerafhængighed, bærer-specificitet, booster-virkning og ændringen af Ig-klasse. Dette forsøg udføres i to dele: 1) en indledende forberedelsesrække på to injektioner, 2) en påvirkningsrække på to injektioner.

##### Materialer:

1. PRP-D koncentratmasse, eksempel 4.
2. Tetanus-toxoid (T).

3. Diphtheria toxoid (D).
4. H. influenza b kapsulært polysaccharid (PRP).
5. PRP/D en blanding af 20  $\mu\text{g}$  PRP (10  $\mu\text{g}$  ribose) og 20  $\mu\text{g}$  D.
- 5 6. PRP/D-AH, en blanding af 20  $\mu\text{g}$  PRP (10  $\mu\text{g}$  ribose) og 20  $\mu\text{g}$  D-AH.

Fremgangsmåde:

Alle immuniseringer indgives subcutant uden hjælpestof i voluminer på 1 ml. Alle doser, der indeholder PRP, justeres til 10  $\mu\text{g}$  ribose pr. 1 ml dosis. Ukonjugerede exotoxoiddoser justeres til 20  $\mu\text{g}$  protein pr. 1 ml dosis. En rotationsplan anvendes med immuniseringer med 14 dages mellemrum. Hver immunisering efterfølges af en blodtapning 10 dage senere. Alle præparater fortyndes i fosfatpuffret saltvandsopløsning, der indeholder 0,01% "Thimerosal". Alikvote mængder fremstilles som ampuller med 4 doser og opbevares ved  $-20^{\circ}\text{C}$ . I hver gruppe immuniseres tre kaniner.

Serologi:

Sera analyseres ved hjælp af fast-fase radioimmunanalyse (SPRIA) med hensyn til anti-PRP, anti-D-AH, anti-D og anti-T som anført. Antistofniveauerne mængdeangives i mikrogram IgG og IgM pr. ml.

Protokol:

25	Gruppe	Primær	Sekundær	SPRIA			
				PRP	D-AH	D	T
	1	PRP	PRP	+			
	2	T	PRP-D	+	+	+	+
	3	D	PRP-D	+	+	+	+
	4	PRP/D	PRP/D	+		+	
30	5	PRP/D-AH	PRP/D-AH	+	+		
	6	PRP-D	PRP-D	+	+	+	

Plan:

Kaniner tappes for blod i forvejen og immuniseres efter gruppe hver 14. dag. Hver immunisering efterfølges af en eftertapning af blod 10 dage senere. De første to injektioner foretages med det primære immunogen, medens den tredje og fjerde injektion foretages med det sekundære immunogen.

Anti-PRP-reaktion vises på tegningen. IgG-antistofs gennemsnitsniveau over for Haemophilus influenza b kapsulært polysaccharid i de 6 forsøgsgrupper kaniner (tre dyr i hver gruppe) er vist grafisk. Grupperne er i denne figur mærket  
5 ifølge ovenstående protokol. De i forvejen aftappede niveauer er under 1  $\mu\text{g/ml}$  for alle kaniner og er af hensyn til tydeligheden ikke vist på tegningen. Angivelsen "PO" (forkortelse af "Post" i tabel I) refererer til det respons, der fås efter den med et tal angivne injektion ("PO1" = respons  
10 efter injektion nr. 1 etc.).

Åbne kolonner viser IgG-niveauet efter to efter hinanden følgende injektioner med det primære immunogen. De udfyldte kolonner viser IgG-niveauerne efter den tredje og den fjerde injektion, som foretages med de sekundære eller  
15 påvirkningsimmunogenerne.

IgG-reaktioner ses kun efter immunisering med PRP-D-konjugatvaccinen, jfr. gruppe 2, 3 og 6 på tegningen. Præparering af kaninerne i gruppe 3 med diphtheria-toxoid fremskynder reaktionen på PRP-D, medens præparering med tetanus  
20 toxoid (gruppe 2) ikke har nogen virkning.

De grupper, der er angivet i den følgende tabel I, er de samme som de, der er angivet i den ovennævnte protokol.

Tabel I

## ANTI-PRP-RESPONS

Fastfase-radioimmunoafprøvning for IgM og IgG

5	<u>PRP</u>		<u>Difteri-toxoid</u>		<u>Tetanus-toxoid</u>	
	<u>IgG*</u>	<u>IgM</u>	<u>IgG</u>	<u>IgM</u>	<u>IgG</u>	<u>IgM</u>
	<u>Gruppe 1</u>					
	Præ	0.0#	0	IG	IG	
	Post 1	0.33	0			
10		±0.58				
	Post 2	0.8	0			
		±1.39				
	Post 3	0	0			
	Post 4	0	0			
15	<u>Gruppe 2</u>					
	Præ	0	0	0	0	0.5
						±0.87
	Post 1	0	0	0	0	25.1
						±15.10
						113.1
						±129.54
20	Post 2	0	0	0	0	112.00
						±0
						44.60
						±36.90
	Post 3	4.82	26.3	0	0	112.00
		±2.59	±45.55	0	0	±0
						8.50
						±14.72
	Post 4	36.1	74.57	0	0	151.60
						2.00
25		±17.43	±28.81			±52.64
						±3.46
	<u>Gruppe 3</u>					
	Præ	0.2	0	0	27.07	0.8
		±0.35			±46.88	±1.39
						±112.58
	Post 1	0.2	0	0	0	0.8
		±0.35				±1.39
30						
	Post 2	0	14.6	6.47	0	0.67
			±25.29	±5.98		±0.59
	Post 3	19.4	130.33	10.63	0	0.37
		±13.4	±89.49	±8.08		±0.65
35	Post 4	74.2	82.63	29.03	0	1.30
		±76.73	±5.16	±26.59		±2.25

Tabel I (fortsat)

## ANTI-PRP-RESPONS

Fastfase-radioimmunoafprøvning for IgM og IgG

5		<u>PRP</u>		<u>Difteri-toxoid</u>		<u>Tetanus-toxoid</u>	
		<u>IgG*</u>	<u>IgM</u>	<u>IgG</u>	<u>IgM</u>	<u>IgG</u>	<u>IgM</u>
	<u>Gruppe 4</u>						
	Præ	0	0	0	2.77	IG	
					±18.85		
10	Post 1	0	15.6	2.67	30.87		
			±27.02	±0.85	±27.14		
	Post 2	0	0	37.2	26.2		
				±10.94	±24.30		
	Post 3	0	0	210.00	19.63		
15				±0	±17.06		
	Post 4	0	0	298.27	0		
				±207.70			
	<u>Gruppe 5</u>						
	Præ	0	0	IG			
20	Post 1	0	0				
	Post 2	0	0				
	Post 3	0	0				
	Post 4	0	0				
	<u>Gruppe 6</u>						
25	Præ	0	0	0	0		
	Post 1	6.23	135.00	0	0		
		±2.56	±81.41				
	Post 2	54.2	182.00	0.93	0		
		±14.73	±0	±1.62			
30	Post 3	57.6	182.00	3.05	0		
		±22.91	±0	±4.31			
	Post 4	39.6	91.20	5.95	0		
		±25.17	±0	±8.41			

35 \* IgG og IgM udtrykkes som  $\mu\text{g}$  antistof pr. ml serum. Alle værdier er middelværdier og standardfejl.

# Ig-niveauer under sensitiviteten for prøven angives med værdien 0 (overalt).

Hvis der er niveauer højere end området for prøven, gives denne en værdi lig den øvre grænse for prøven.

40 IG = Ikke gennemført.

P a t e n t k r a v

1. Fremgangsmåde til fremstilling af et vandopløseligt covalent polysaccharid-diphtheria-toxoid-konjugat, der er i stand til at frembringe T-celle-afhængig antistofreaktion mod polysaccharid fra Haemophilus influenzae b, med en molekylvægt mellem 140.000 og 4.500.000 Dalton og med et ribose/protein-forhold mellem 0,25 og 1,0, k e n d e t e g n e t ved, at man

a) opvarmer et kapsulært polysaccharid af Haemophilus influenzae b bestående af tilnærmelsesvis ækvimolære mængder ribose, ribitol og fosfat, indtil mere end 60% af polysaccharidet har en molekylvægt mellem 200.000 Dalton og 2.000.000 Dalton,

b) aktiverer det fremkomne størrelsesregulerede polysaccharid med cyanogenbromid,

c) fjerner i det væsentlige alt uomsat cyanogenbromid, og

d) omsætter det aktiverede produkt med et adipinsyre-hydrazid-derivatiseret diphtheriatoxoid.

2. Hapten, i det væsentlige frit for protein og nucleinsyre, til anvendelse ved fremgangsmåden ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at det er fremstillet ud fra kapsulært Haemophilus influenzae b-polysaccharid, bestående af tilnærmelsesvis ækvimolære mængder ribose, ribitol og fosfat, ved opvarmning, indtil mindre end 20% af polysaccharidet har en molekylvægt under 200.000 Dalton, og mindre end 20% har en molekylvægt over 2.000.000 Dalton med dekstranstandard som reference ved gelpermeeringschromatografi.

3. Hapten ifølge krav 2, k e n d e t e g n e t ved, at polysaccharidet er til stede som natriumsalt.

