



УКРАЇНА

(19) UA «...» 12647

(13) CI

(5i)5 Л 61 К 39/10

ДЕРЖАВНЕ  
ПАТЕНТНЕ  
ВІДОМСТВООПИС ДО ПАТЕНТУ  
НА ВІНАХІД(54) СПОСІБ ВИДАЛЕННЯ ЕНДОТОКСИНУ З КУЛЬТУРАЛЬНОЇ РІДИНИ ШТАМУ ФАЗИ  
BORDETELLA PERTUSSIS

1

(20)96240081,28.10.93

(21)4355806/SU

(22)20.05.88

(24)28.02.97

(31)62-126394

(32)22.05.87

(33)JP

(46)28.02.97. Бюл. NsI

(56) 1. EP, № 0047802, кл. C 07 G 7/00, 1982.

2. JP, № 34-2149, кл. A 61 K 39/00, 1979.

3. Jap. Journal of Bacteriology, 1983,  
38, № 1, p. 423.4. US, №4455297, кл. Л 61 К 39/10, 1984  
(прототип).(72) Ісао Фудзіта (JP), Хідео Ватанабе (JP),  
Масатосі МІНМОТО(JP)

(73)Такеда Кемікал Індастріз Лтд(ЛР)

(57) 1. Способ удаления эндотоксина из  
культуральной жидкости штамма фазы I  
Bordetella pertussis, предусматривающий  
отделение супернатанта культуральной  
жидкости, фракционирование его сульфатом  
аммония, растворение осадка в фосфат-

ном буфере, содержащем NaCl, отделение  
антигенсодержащего супернатанта центрифугированием, обработку его сульфатом аммония, повторное растворение осадка в том же буфере, диализ полученной смеси с последующим центрифугированием диализата в градиенте плотности сахарозы в течение 10-24 час, отличающийся тем, что к антигенсодержащему супернатанту добавляют 0,01-0,1 милли-экв/мл ионов кальция в присутствии избытка ионов фосфора и выдерживают при температуре 4-25°C в течение 0,3-4 час до образования 0,01-0,1 милли-экв/мл кальций фосфатного иеля.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что в качестве ионов кальция используют ацетат кальция или хлорид кальция или нитрат кальция.

3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что центрифугирование осуществляют в градиенте плотности сахарозы от 0 до 30 мас/мас.% при 60000-122000 д.

V C

N3

Настоящее изобретение относится к (1) способу удаления эндотоксина из жидкости, содержащей антиинфекционную фракцию и эндотоксин штаммов фазы I Bordetella pertussis путем зонального центрифугирования, причем такой способ характеризуется тем, что а указанную жидкость вводят ионы кальция в присутствии избытка фосфатных ионов перед зональным центрифугированием и полученный в результате осадок отбрасывают; (2) способу получения токсоида пертуссиса, характеризующемуся тем, что осуществляют детоксификацию

жидкости, содержащей антиинфекционную фракцию, полученную по указанному выше способу, и (3) токсиду пертуссиса, содержащего в котором эндотоксина в расчете на 10 мкг протеинового азота, не превышает 0,5 нг.

В соответствии с методом удаления эндотоксина пертуссиса, согласно настоящему изобретению, отделение антиинфекционной фракции от эндотоксина может быть осуществлено более четко и чисто, в результате чего защитную фракцию легко выделить с улучшенным выходом. Кроме этого.

O

поскольку зональному центрифугированию можно подвергать большой объем исходного материала, выход токсоида пертусиса может быть увеличен более чем вдвое, причем эндотоксин может быть удален с высокой эффективностью. В связи с этим следует отметить, что настоящее изобретение является ценным а промышленном отношении.

Кроме этого, содержание эндотоксина в 10 токсоеде пертусиса настоящего изобретения составляет менее одной десятой в традиционном токсоеде, а использование токсоедз пертусиса настоящего изобретения позволяет осуществить промышленное 15 производство вакцин, такой же иммунологической мощности, что и традиционные вакцины, но пониженной токсичности.

Упомянутая выше жидкость, содержащая антиинфекционную фракцию и эндо- 20 токсин штаммов фазы I Bordetella pertussis может представлять собой, например, верхний слой культурного бульона, полученного при выращивании штаммов фазы I B. pertussis или его концентрат, причем осо- 25 бено предпочтительным является концентрат. Культивирование штаммов фазы I Bordetella pertussis может проводиться традиционным методом. Так например, микроорганизмы выращивают в бульонной среде 30 (например, в среде Кохен-Вилира или Стойкер-Шолте) при температуре 35-37°C в течение 5-7 дн. Верхний слой полученного таким образом культурного бульона собирают, например, путем фильтрации или цент- 35 рифугирования. Такой верхний слой может быть непосредственно, или после концентрирования, подвергнут следующей стадии обработки с целью удаления эндотоксина. Концентрирование для этой цели может 40 быть осуществлено путем использования известных методов высаливания. Так например, 2-5 кг сульфата аммония добавляют к каждому 10 л верхнего культурного 45 слоя и полученный осадок собирают путем, например, фильтрации или центрифугирования. Такой осадок затем растворяют в соответствующем количестве системы I М хлористого натрия-0,05 М фос- 50 фатный буфер и полученный раствор центрифугируют либо обрабатывают каким-либо еще способом с целью отделения верхнего надосадочного слоя.

Удаление эндотоксина согласно настоящему изобретению заключается в том, что в 55 жидкость, содержащую антиинфекционную фракцию и эндотоксин штаммов фазы I Bordetella pertussis вводят ионы кальция а присутствии избытка ионов фосфата, полученный в результате осадок отбрасывают и

маточную жидкость подвергают зональному центрифугированию.

Если в жидкости отсутствуют ионы фосфата, то добавляют фосфатный буферный раствор, например, 0,05 М фосфатный буфер, дополненный 1 М хлористого натрия и затем вводят ионы кальция. Поставщиком ионов кальция могут служить такие растворимые соли кальция, как ацетат кальция, хлористый кальций, нитрат кальция и т.п., а также такие нерастворимые соли кальция, как фосфат кальция и т.п. Особенно предпочтительными соединениями являются ацетат кальция и хлористый кальций. Отношение количества ионов фосфата к количеству ионов кальция составляет 1,25-30 эквивалентов, предпочтительно, 1,5-7,5 эквивалентов ионов фосфата к каждому эквиваленту ионов кальция и рекомендуется обеспечить такой режим, чтобы образовалось 0,01-0,1 миллиэквивалентов/мл, предпочтительно 0,02-0,7 миллиэквивалентов кальций фосфатного геля.

Обычно используют следующую типовую методику. Предполагал, что осадок, полученный фракционным осаждением надосадочного слоя культурного бульона штаммов фазы I Bordetella pertussis с использованием сульфата аммония растворяется в смеси 1 М раствора хлористого натрия и 0,05 М фосфатного буфера, ацетат кальция добавляют до конечной концентрации 0,01-1,0 вес/об.%, предпочтительно 0,2-0,6 вес/об.%, при pH 6,5-9 и полученной смеси дают постепенно реагировать в температурном интервале 4°C - комнатная температура в течение времени от 20 мин до 2 ч с получением кальций фосфатного геля. После такой реакции полученный в результате осадок удаляют таким известным методом, как фильтрация или центрифугирование. Согласно такой методике можно селективно удалить 90-99,9% эндотоксина без заметной потери защитной фракции.

Полученный продукт, полученный выше, далее подвергают земельному центрифугированию, предпочтительно, после дополнительного концентрирования высаливанием с помощью сульфата аммония (фракционное осаждение).

Метод зонального центрифугирования согласно изобретению может представлять собой сахароза-градиентное центрифугирование, калий тартратное центрифугирование под действием силы тяжести, цезий хлоридное градиентное центрифугирование и т.п., хотя особенно предпочтительным методом является сахарозо-градиентное центрифугирование. Обычные условия сахароза-градиентного центрифугирования:

градиент плотности: 0-30 пс./вес.%;  
IWc: примерно 60.000-122.000 С; время:  
примерно 10—2-1 ч.

В соотTBGTCTDiui с настоящим изобретением, полученную таким образом жидкость, 5 содержащую антиинфекциюиую Фракцию пергузиса подвергают детоксификации с помощью формальдегида, глутарового альдегида, пировиноградного альдегида и т.п. после чего избыток формальдегида, глутарового 10 альдегида, лнровиноградного альдегида или т.п. удаляют такими per se известными методами, как диализ, центрифугирование или ультрафильтрация и т.д. с получением токсоида пертузиса. Рекомендованная методика 15 детоксификации, о соответствии с опубликованным японским патентом N° 57-50925, заключается о добавлении формальдегида к пертузис экзотокспн-содержщей жидкости в количестве 0,1-0,6 об./об.% припрактиче- 20 ском отсутствии (т.е. не более 10 mM) основных аминокислот (например, 1-лпзина, глицина и т.п.), инкубировании смеси при температуре 32-42°C и течение 3-14 дн с тем, чтобы вызвать флокуляцию, рзруше- 25 нии выпавшего хлопьями токсоида с помощью подходящих средств (например, воздействием ультразвука с частотой 10-15 килоциклов) и суспендирования его в соответствующей водной среде (например, 30 M/100-M/250 фосфатном буферном растворе) с получением токсойдпой жидкости.

Д соответствии с настоящим изобрзтеми-ем Д результате может Сьпь получен токсойд пертузиса с содержанием эндотоксина, в рас- 35 чете на 10 мкг протеинового азота, но более 0,3 нг, предпочтительно, не более 0,1 иг согласно лимулус лизатпому тесту. Другими словами степень удаления эндотоксина мо-жет быть улучшена до значения не менее 40 99,9^9-1%, или предпочтительно, по крайней мере 09,9938%.

Токсойд пертузиса согласно настоящему изобретению может быть превращен хорошо известными методами в осажденную 45 пертузиспую вакцину или осажденную пертузис-дифтерия-столбмячнуга тройную оакцину, предназначенную для вакцинации людей.

На фиг. 1 и 2 показаны профили сахаро- 50 за-градиентного центрифугирования кальций фосфатной гелевой группы и контрольной группы, соответственно, согласно примеру 1.

Пример. Представлснмью ниже спра- 55 сочные и рабочие примеры приведены лиш ^ в целях иллюстрации I; ,ie ограничивают сферу изобретения.

Свойства ишамма Be dciclia poitussis Тохамы фазы 1, используемого в.следующих

ниже примерах и справочных примерах описаны, например, о Infection and Immunity 6.890 (1972). Такой штамм хранится в Национальном институте здоровья, Токио, Япония (NIHJ) и депонирован также и Институте ферментации, Осака, Япония под каталожным номером IFO 14073 от 13 августа 1980 г.

Справочный пример 1. Штамм Eordetelta pertussis Тохамы фазы 1 (IFO 1-1073) ннокулировали па среду Бордета-Генгоу, приготовленную из картофеля, пептона, хлористого натрия, агара и корооьей крови и инкубировали при 35°C в течение 2 дм. Затем отбирали полупрозрачные кругосыя колонии и одну из них, реагирующую lla K агглютиимновое антитело, снова распределяли на среде Бордет-Генгоусцелью приготовления посевной культуры. Затем такую посевную культуру трансплантировали в бульонную среду Коген-Вилера и систему инкубировали в течение 1 дм при 35°C. Полученную в результате бактериальную суспензию добавляли в бульонную среду Стайнерл-Шолте до конечной концентрации 1 миллиард клеток/мл и в склянке Рауха в течение 5 дней проводили инкубацию при 35°C. Выросшие в культурном бульоне клетки собирали и о верхний слой добавляли 20 изес./об.% сульфата аммония. После тщательного перемешивания полученную смесь систаиоали при 4°C. Примерно через 14 дн смесь центрифугировали, верхний слой отбрасывали и собирали осадок. Затем к такому осадку добавляли 1/10 объема, в расчете на собранный раствор, смеси 1M хлористого натрия и 0,05M фосфатного буфера (pH 8,0) и полученную смесь тщательно перемешивали и выстаивали при 4°C в течение 4 дн. Затем смесь снова центрифугировали и собирали верхний надосадочный слой (экстракт I). Этотэкстракт 1 обогащен защитной фракцией, содержащей нитевидный гемагг-ii'зТИНИН (FHA) и токсин пертузиса (PT), а также эндотоксин, но при этом не содержит клеток.

К аликнотам такого экстракта 1 постепенно добавляли ацетат кальция до конечных концентраций 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 и 1,0 вес. /об.% и каждую смесь осторожно перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Затем полученный в результате осадок отфильтровывали с помощью фильтровальной бумаги с образованием верхнего надосадочного слоя. Используя каждый из полученных таким образом надосадочных слоев определяли титр гемагглютинаина(РА), содержание РТ и содержание ЫТ. Полученные результаты предетезлень в табл. 1. Содержание РТ определили методом ELISA, а содержание ЕТ определяли лимулус-лизат-

ным методом (набор Маллинкродта), используя в качестве стандарта эндотоксин E.coli Дифко 055-B5).

Из табл. 1 следует, что ЕТ можно селективно удалить путем введения в систему соли кальция в присутствии избытка ионов фосфата и отделения полученного осадка. Более того, в результате добавления 0,2-0,6 вес./об.% ацетата кальция можно удалить около 99% ЕТ, не теряя при этом защитной фракции (НА титр и содержание РТ).

Справочный пример 2. Повторяли методику, описанную в справочном примере 1, за исключением того, что рН устанавливали равным 5,0-10,0 с помощью гидроксида натрия или хлористоводородной кислоты, а количество добавленного ацетата кальция составляло 0,5 вес./об.%. Полученные результаты представлены в таблице 2.

Начиная со значения рН 6,0 происходило желатинизация и степень удаления эндотоксина увеличивалась с повышением значения рН. Из таблицы 2 следует, что оптимальное значение рН 7-9.

Справочный пример 3. Повторяли методику, описанную в справочном примере 2, за исключением того, что вместо 0,5 вес./об.% ацетата кальция использовали 5 вес./об.% гидроксилапатита (БДН). Полученные результаты представлены в табл. 3.

Из табл. 3 следует, что по сравнению с добавлением ацетата кальция для образования кальций фосфатных гелей внутри раствора, введение гидроксилапатита приводит к менее эффективному удалению эндотоксина и обеспечивает обращение упомянутой выше зависимости от значений рН.

Пример 1. Каждый экстракт 1 (контрольная группа), полученный по методике, описанной в справочном примере 1, и материал, полученный добавлением ацетата кальция к экстракту 1 до конечной концентрации 0,5 вес./об.% и последующей обработкой смеси согласно описанному в справочном примере 1, смешивали с равным объемом насыщенного йодного раствора сульфата аммония и полученную смесь высушивали с точением 7 дп при 17°C. Осажденный сульфатом материал центрифугировали при скорости вращения 10000 об/мин, а течение 20 мин и собирали осадок. Затем добавляли 1/300 объема, в расчете на объем раствора смеси Ш хлористого натрия и 0,05M фосфатного буфера (pH 8,0). После тщательного перемешивания смесь подвергали диализу в трубке с использованием в качестве внешней среды Ш раствора хлористого натрия (pH 8,0). Диализат подвергали сахароза-градиентному центрифугированию в следующих условиях; градиент плот-

ности сахарозы = 1-30 вес./вес.%, Нмакс = 694001G и время - около 18 часов. Загрузка в случае группы кальций фосфатного желатинирования вдвое превышала загрузку контрольной группы. После центрифугирования, в ротор сводили 34 вес./пес. % раствор сахарозы с целью осуществления фракционного сбора. В каждой собранной таким образом фракции определяли содержание ФНА с помощью методики ELISA и содержание РТ и ЕТ с помощью метода, описанного в справочном примере 1. Полученные результаты представлены на фиг. 1 и 2. На этих рисунках содержание ФНА, РТ и ЕТ обозначены символами -О-, -Д- и -Ш-, соответственно.

Из данных, представленных на фиг. 1 и 2, следует, что, несмотря на удвоенные загрузки, группа кальций фосфатного желатинирования обеспечивает более дискретное отделение защитной фракции (ФНА, РТ) от эндотоксина, чем это имеет место в контрольной группе.

В каждой из кальций фосфатных и контрольных групп собирали фракции с дефицитом ЕТ и обогащенные ФНА и содержание протеинового азота устанавливали равным примерно 50 мкг/мл. К ним добавляли 0,02 вес./об.% желатины, 0,05 вес./об.% Твида 80 и 0,4 об./об.% формальдегида и полученные смеси инкубировали в течение нескольких дней при 39°C. Получению в результате токсидную жидкость диализовали и определяли в ней содержание ЕТ. Полученные результаты приведены в таблице 4. Содержание ЕТ определяли лимулус-лизатным тестом (набор Вако Пьюэ Кзмикл), используя в качестве стандарта эндотоксин E.coli. (Дифко 055-(35).

Как следует из данных, представленных в таблице 4, в сравнении с содержанием ЕТ в основной жидкости токсид пертузиса на вакцинном уровне (содержание протеинового азота 10 мкг/мл), содержание ЕТ в группе кальций фосфатного желатинирования улучшено до величины менее 1/10 от значения в контрольной группе.

Пример 2. В соответствии с оригинальным методом Левина (Рео Левин, Джо-зеф Л.Стоун, Льюиз Б.Виман: Факторы, оказывающие влияние на эффективность алюминиевой присадки к токсинам дифтерии и столбняка. J.Immunology 75, 301-307, 1955), каждую из двух партий основной жидкости токсид перт/зиса разбавляли фосфатным буферным раствором M/250 (pH 7,0) с получением содержания протеинового азота 10 мкг/мл, после чего добавляли хлористый алюминий до конечной концентрации 0,18 вес./об.%. Полученную смесь

тщательно перемешивали и устанавливали рН 7,0 с помощью хлористоводородной кислоты или гидроксида натрия с целью приготовления 0,2 мг/л адсорбированной на алюминии вакцины.

Основные свойства такой вакцины: рН 7,0, пирогенность на кроликах: отрицательная, уменьшение веса мышей: 10 В\А/ДУ/мл

или менее; увеличение числа лейкоцитов у мышей: 0,5 {РУ/мл или менее; чувствительность к гистамину у мышей: 0,8 НБУ/мл или менее; мощность токсоида пертузиса: 8 IY/мл или более. Таким образом, обе партии удовлетворяют стандартным значениям, указанным в Стандарте на биологические продукты.

Т а б л и ц а 1

Количество добавленного ацетата кальция (вес/об.%)	Содержание он* лотокемно (нг/мл)	Удаление эндотоксина, %	Титр НЛ* (НАи/мл)	Содержание РТ (Еи/мл)
0	87800		1200	1220
0.2	1013	98,2	1100	1140
0.4	960	98,9	1400	1400
0.6	720	90,2	1200	1080
0.8	73	99,9	400	1210
1,0	20	99,9	200	1030

<sup>A</sup>Титу> ИЛ преимущественно отражает содержание ФНА.

Т а б л и ц а 2

рН	Содержание эндотоксина (нг/мл)	Удаление эндотоксина (%)	Титр НА* (НАи/мл)
(до обработки)	33-1000		3000
5,0	10000	41,6	2700
6,0	103000	67,7	3000
6,5	53000	84,1	3000
7,0	24000	92,8	3000
8,0	22000	93,4	3200
9,0	18000	94,6	3000
10,0	26000	19,8	3000

Т а б л и ц а 3

РН	Содержание эндотоксина (нг/мл)	Удаление эндотоксина (%)	Титр НА* (НАи/мл)
(до обработки)	334000	-	3000
6,0	100000	52,1	3000
7,0	195000	41,6	3000
8,0	264000	21,0	3000
■ 9,0	294000	12,0	3000

Т а б л и ц а 4

	Група Са-фосфатного желатинирования		Контрольная группа	
	Содержание эндотоксина	Удаление эндотоксина	Содержание эндотоксина	Удаление эндотоксина
Пример 1	0,3 нг/мл (0,6 нг/мл)	99,99994%	19,0 нг/мл (3,8 нг/мл)	99,99591%
Пример 2	0,3 нг/мл (0,06 нг/мл)	99,99988%	12,8 нг/мл (2,6 нг/мл)	99,99458%

\* Значение в скобках означает содержание эндотоксина на 10 г/мл протеинового азота.

Упорядник

Техред М.Моргентал

Коректор М. Самборська

Замовлення 4076

Тираж  
Державне патентне відомство України,  
254655, ГСП. КиТв-53, Львівська пл., 8

Підписне

Відкрите акціонерне товариство "Патент", м. Ужгород, вул.Гагаріна, 101