



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑤① Int. Cl.³: C 12 N 13/00
C 12 N 1/36
A 61 K 39/00



Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑫ **PATENT**SCHRIFT A5

⑪

637 422

⑳ Gesuchsnummer: 11521/77

⑦③ Inhaber:
Bayer Aktiengesellschaft, Leverkusen (DE)

㉒ Anmeldungsdatum: 20.09.1977

③⑩ Priorität(en): 25.09.1976 DE 2643213

⑦② Erfinder:
Dr. Otto Christian Straub, Tübingen (DE)

㉔ Patent erteilt: 29.07.1983

④⑤ Patentschrift
veröffentlicht: 29.07.1983

⑦④ Vertreter:
E. Blum & Co., Zürich

⑤④ **Verfahren zur Attenuierung oder Inaktivierung von pathogenen Mikroorganismen.**

⑤⑦ Zur Attenuierung oder Inaktivierung von pathogenen Mikroorganismen wird eine entsprechende Mikroorganismensuspension einer Behandlung mit elektrischem Wechselstrom unterworfen.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Attenuierung oder Inaktivierung von pathogenen Mikroorganismen, dadurch gekennzeichnet, dass man eine entsprechende Mikroorganismensuspension einer Behandlung mit elektrischem Wechselstrom unterwirft.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man die Mikroorganismensuspension unter Zusatz eines Kulturmediums einer Behandlung mit elektrischem Wechselstrom unterwirft.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man die verfahrensgemäss erhaltene Mikroorganismensuspension als solche isoliert.

Die vorliegende Erfindung betrifft ein neues, technisch fortschrittliches Verfahren zur Attenuierung oder Inaktivierung von pathogenen Mikroorganismen.

Es ist bereits bekannt geworden, dass man Mikroorganismen, insbesondere Bakterien und Viren durch eine Anzahl von Passagen (Gewebeulturen, bzw. lebende Tiere oder Organe usw.) abschwächen kann, wobei diese so attenuierten Viren und Bakterien zwar noch vermehrungsfähig sind, jedoch ihre Pathogenität verloren haben. Solche attenuierten Viren haben ihre Immunogenität noch beibehalten (Lebendvakzinen). Der Nachteil dieser in der Literatur vielfach beschriebenen Attenuierungsverfahren (siehe z.B. Deutsche Offenlegungsschrift 20 33 946) ist vor allem der enorme Zeit- und Arbeitsaufwand, welcher notwendig ist, bis der gewünschte Attenuierungsgrad durch Passagierung erreicht worden ist. So kann man bei einer Attenuierung über z.B. 100 Gewebekulturpassagen mit einer Attenuierungsdauer von cirka einem Jahr rechnen.

Weiterhin ist bekannt geworden, dass man Mikroorganismen, vorzugsweise Bakterien und Viren, mit Hilfe chemischer Agentien (sog. «Inaktivierungsmittel») inaktivieren kann. Als Inaktivierungsmittel kommen eine Reihe verschiedener chemischer Stoffe und Stoffklassen in Frage, beispielsweise Formaldehyd, Äthylenimin und dessen Derivate Glutaraldehyd, β -Propiolacton, Phenol, Wasserstoffperoxid und verschiedene andere.

Die bekannten Verfahren sind jedoch nicht immer jeweils auf alle Mikroorganismen anwendbar, die Inaktivierungsdauer mit verschiedenen Inaktivierungsmitteln (z.B. Formaldehyd) ist z.T. lang.

Weiterhin ist bekannt geworden, dass z.B. durch Einwirkung von Wärme oder ultraviolettem Licht eine Inaktivierung von Mikroorganismen durchgeführt werden kann.

Bisher bekannte Inaktivierungsverfahren haben zum Teil verschiedene Nachteile, so wird zum Teil der antigenen determinierende Aufbau von Mikroorganismen, beispielsweise Viren, zu weitgehend zerstört. Weiterhin ist es manchmal schwierig, eine vollkommene Zerstörung der infektiösen Eigenschaften der Mikroorganismen herbeizuführen und gleichzeitig die antigenen Eigenschaften beizubehalten. Zum Teil ist es durch Rekombination und/oder Mutation möglich, dass unter Umständen bestimmte inaktivierte Mikroorganismen ihre infektiösen Eigenschaften wiedererhalten. Ausserdem besteht beispielsweise bei Durchführung der Inaktivierung mit Formaldehyd oder bei Einwirkung von ultraviolettem Licht die Gefahr der Aggregat-Bildung, wobei unter Umständen Teilmengen der infektiösen Mikroorganismen nicht inaktiviert werden.

Es wurde gefunden, dass man Mikroorganismen vorzugsweise Bakterien und Viren, aber auch Mykoplasmen und Chlamydien durch Behandlung in einem elektrischen Wechselstromfeld in Suspension abschwächen bzw. inaktivieren

und daraus Lebend bzw. Totvakzinen herstellen kann.

Das erfindungsgemässe Verfahren zur Attenuierung oder Inaktivierung von pathogenen Mikroorganismen ist dadurch gekennzeichnet, dass man eine entsprechende Mikroorganismensuspension einer Behandlung mit elektrischem Wechselstrom unterwirft.

Durch die Herstellung von Lebend- bzw. Totvakzinen nach dem erfindungsgemässen Verfahren werden die oben geschilderten Nachteile der bisher bekannt gewordenen Attenuierungs- bzw. Inaktivierungsverfahren vermieden. Das erfindungsgemässe Verfahren stellt somit einen grossen und überraschenden Fortschritt auf dem Gebiet der Human- und Veterinärmedizin dar.

Das erfindungsgemässe Verfahren wird vorzugsweise in einem Reaktionsgefäss unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Als zweckmässig haben sich dabei die aus den Figuren 1 und 2 ersichtlichen bevorzugten Apparaturen herausgestellt. Die Apparatur 1 bestehe aus einer flachen Flasche aus Glas mit drei Öffnungen. Die Öffnung am Flaschenhals (3) ist durch einen Stopfen enthaltend ein Anlassrohr mit Ventil verschlossen, die anderen beiden Öffnungen sind ebenfalls durch Stopfen verschlossen, durch welche die Elektroden aus Edelmetall (beispielsweise Gold, Platin oder Silber, vorzugsweise Silber, aber auch Edelmetalllegierungen sind möglich) geführt werden, welche an eine elektrische Wechselstromspannungsquelle angeschlossen sind. (1, 2). Zur Kontrolle ist in der Flasche ein Thermometer angebracht. (5).

Im Glasgefäss befindet sich die mit dem elektrischen Wechselstrom zu behandelnde Mikroorganismensuspension. Die zu wählenden Versuchsbedingungen (Temperatur, Dauer der Behandlung mit elektrischem Wechselstrom, Wechselstromspannung, Stromstärke, pH Wert usw.) sind von der Beschaffenheit des zu behandelnden Mikroorganismus, und den durch das erfindungsgemässe Verfahren beabsichtigten Effekt (zum Beispiel Attenuierung zum Lebendimpfstoff bzw. Inaktivierung zum Totimpfstoff) abhängig. Ausserdem ist die Wirkung der einzelnen Faktoren, zum Teil miteinander gekoppelt, so dass man eine niedrigere Stromstärke beispielsweise durch eine längere Einwirkungszeit des Wechselstroms ausgleichen kann.

Man kann zur Erreichung höherer Spannungs- und Stromstärkewerte das Gefäss auch mit einem Kühlmantel versehen.

Die Apparatur für das sogenannte Durchflussverfahren wird in Figur 2 dargestellt.

Hierbei fliesst die zu behandelnde Mikroorganismensuspension über den mit einem Ventil versehenen Zweigegehahn (A) in das Gefäss (B). Über die Zweigegepumpe (C) wird die Mikroorganismensuspension über die ggf. mit einem Kühlmantel (E) versehenen Elektroden (D) gepumpt. Aus dem Gefäss (F) erfolgt der Abfluss vorzugsweise über einen mit einem Ventil versehenen Zweigegehahn (G). B₁ und F₁ bezeichnen Vorrichtungen für die Luftzu- bzw. abführung. Hierbei wird gegebenenfalls Sterilluft eingesetzt.

Das in Figur 2 skizzierte Durchflusssystem eignet sich sehr gut für die Herstellung von Impfstoffen (sowohl Lebend- als auch inaktivierte Vakzinen).

Als Mikroorganismen kann man beim erfindungsgemässen Verfahren alle Stoffe einsetzen, die sonst auch durch Attenuierung über Gewebekultur- oder Tierpassagen bzw. durch Inaktivierung mit Hilfe chemischer und physikalischer Methoden in Lebend- bzw. Totimpfstoffen übergeführt werden können.

Beispielhaft seien aufgeführt:

65 RNS-Viren folgender Gruppen: stabförmige Pflanzenviren, Picornaviren, Toga-Viren, Rhabdoviren, Retroviridae, Arenaviren, Orthomyxoviren, Paramyxoviren, Corona- und Orbirien, doppelsträngige RNS-Viren, DNS-Viren folgender

Gruppen: Kleine DNS-Phagen, Parvo-, Reoviren, Adenoviren, Papovaviren, Phagen mittlerer Grösse, grosse Phagen, Herpesviren, Iridoviridae-Viren, paravakzinale Viren, Pokkenviren, Adeno-Begleitviren.

Als in Frage kommende Bakterien seien beispielsweise genannt:

Bakterien der Ordnung Eubacteriales (unverzweigte Bakterien), vorzugsweise der Gattung *Neisseria*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Serratia*, *Proteus*, *Salmonella*, *Pasteurella*, *Brucella*, *Haemophilus*, *Corynebacterium*, *Clostridium*.

Bakterien der Ordnung Actinomycetales, vorzugsweise der Gattung *Streptomyces*, Bakterien der Ordnung Spirochaetales vorzugsweise der Gattung *Leptospira*.

Falls man attenuierte d.h. nicht pathogene aber noch voll immunogene, lebende Mikroorganismen in Form von Lebendvakzinen herstellen will, haben sich in Abhängigkeit vom eingesetzten Mikroorganismus folgende Verfahrensbedingungen als zweckmässig erwiesen:

Wechselstromspannung:

i.a. arbeitet man zweckmässigerweise mit der vorliegenden Netzspannung, welche bei den im Rahmen der vorliegenden Anmeldung durchgeführten Versuchen 220 V betrug, natürlich kann man auch mit anderen Spannungswerten beispielsweise 110 oder 330 V arbeiten. In einem solchen Falle sind die anderen Reaktionsbedingungen auszugleichen.

Stromstärke:

als zweckmässig hat sich bei einer Wechselspannung von 220 V eine Stromstärke von 200 bis 300 mA erwiesen. Natürlich sind in Abhängigkeit von der Stromspannung und der Beschaffenheit der Lösung auch andere Stromstärkewerte möglich.

Temperaturen:

Die Behandlung mit dem elektrischen Wechselstrom wird i.a. bei Temperaturen von 4 bis 60°C, vorzugsweise bei 20 bis 40°C und insbesondere bei 37°C bis 39°C (physiologischer Temperaturbereich) durchgeführt. Die angewandte Temperatur ist beispielsweise abhängig von der Thermostabilität des eingesetzten Mikroorganismus.

Man kann die Temperatur der zu behandelnden Mikroorganismen bzw. -suspensionen bei gleichbleibender Stromspannung einstellen, indem man die Stromstärke in dem Masse variiert, dass ein konstanter Temperaturwert in der zu behandelnden Mikroorganismen-suspension vorliegt.

Dauer der Behandlung mit dem elektrischen Wechselstrom

Bei der Behandlung zwecks Herstellung von Lebendvakzinen auf der Basis attenuierter Mikroorganismen (vorzugsweise Bakterien und Viren) hat sich eine Behandlungszeit von 5 bis 300 Minuten, insbesondere von 30 bis 240 Minuten als zweckmässig erwiesen. Es sind aber in Abhängigkeit von der Natur des eingesetzten Mikroorganismus und der angewandten anderen Versuchsbedingungen (wie z.B. Temperatur, Suspensionsmittel, Stromspannung und Stromstärke) Zeitwerte innerhalb 5 bzw. oberhalb 300 Minuten möglich.

Ausserdem ist es von Bedeutung, welcher Attenuierungsgrad, messbar durch an sich bekannte tierexperimentelle Methoden erreicht werden soll.

Falls man mit Hilfe des erfindungsgemässen Verfahrens inaktivierte Mikroorganismen zur Verwendung in Totvakzinen herstellen möchte, gelten die gleichen bezüglich Wechselstromspannung, Stromstärke und Temperaturen bei der Herstellung von attenuierten Mikroorganismen zur Verwendung in Lebendvakzinen gemachten Aussagen.

Das Verfahren der Behandlung von Mikroorganismen mit elektrischem Wechselstrom ist also bei der Inaktivierung von Mikroorganismen das gleiche wie bei der Attenuierung von Mikroorganismen.

Die Inaktivierung nach dem erfindungsgemässen Verfahren erfordert aber im allgemeinen einen grösseren Zeit- und Energieaufwand.

So dauert der Inaktivierungsprozess nach dem erfindungsgemässen Verfahren (s. Fig. 1) im allgemeinen 10 bis 72 und vorzugsweise 15 bis 48 Stunden. Es sind aber in Abhängigkeit von der Natur des eingesetzten Mikroorganismus und der angewandten anderen Versuchsbedingungen (wie z.B. Durchflussverfahren (Fig. 2), Temperatur, Suspensionsmittel, Stromspannung und Stromstärke) beispielsweise Werte unterhalb 10 und über 72 Stunden möglich.

Als Ausgangsmaterialien werden beim erfindungsgemässen Verfahren im allgemeinen wässrige Suspensionen der oben genannten Mikroorganismen eingesetzt. Vorzugsweise werden diejenigen Medien verwendet, in welchen die zu behandelnden Mikroorganismen gezüchtet werden wie z.B. Earle-Medium, gegebenenfalls unter Zusatz von Lactalbumin-Hydrolysat oder folgenden anderen Medien: Eagle's Medium, Hanks Medium, Medium PM-13 (Serva), VM-3a Medium, MEM-Medium etc.

Die nach der Behandlung mit elektrischem Wechselstrom anfallenden Endprodukte, welche attenuierte oder inaktivierte Mikroorganismen enthalten, werden gewöhnlich entweder als solche in steriler Form appliziert oder nach an sich bekannten und üblichen Methoden zur Lebend- oder Totvakzine formuliert und als Lösung Sirup, Emulsion, Suspension, Spray, Salbe, Paste, Creme, Lotion, Aerosol, Tabletten usw. verabreicht.

Die Formulierungen werden normalerweise in an sich bekannter Weise hergestellt, z.B. durch Verdünnung der erfindungsgemäss attenuierten oder inaktivierten Mikroorganismen mit geeigneten Lösungsmitteln und/oder inerten nichttoxischen, festen, halbfesten oder flüssigen Trägerstoffen, gegebenenfalls unter Verwendung von Emulgier- und/oder Dispergier-, Sprüh- und Treibmitteln und unter Verwendung von geeigneten Stabilisatoren.

Als Lösungsmittel, Trägerstoffe, Emulgier- bzw. Dispergiermittel seien hier beispielsweise genannt:

Wasser, nichttoxische organische Lösungsmittel bzw. Verdünnungsmittel wie Paraffine (z.B. Erdölfraktionen), pflanzliche Öle (z.B. Erdnuss-/Sesam-Öl), mehrwertige Alkohole wie z.B. Glycerin, Glycole (z.B. Propylenglycol, Polyäthylenglycol) und Wasser; feste Trägerstoffe wie z.B. natürliche Gesteinsmehle (z.B. hochdisperse Kieselsäure, Silikate), Zucker (z.B. Rohr-, Milch- und Traubenzucker); Emulgiermittel, wie nichtionogene und anionische Emulgatoren (z.B. Polyoxyäthylen-Fettsäure-Ester, Polyoxyäthylen-Fettalkohol-Äther, Alkylsulfonate und Arylsulfonate), Dispergiermittel (z.B. Lignin, Methylcellulose, Stärke und Polyvinylpyrrolidon) und Gleitmittel (z.B. Magnesiumstearat, Talkum, Stearinsäure und Natriumlaurylsulfat).

Als Stabilisatoren seien beispielhaft aufgeführt:

Aminosäuren, Zucker, Proteine, Polysaccharide, Polyalkylenglycole. Diese Stabilisatoren können sowohl in wässriger Lösung als auch im lyophilisierten Zustand zugesetzt werden.

Die erfindungsgemäss attenuierten Viren und Bakterien bzw. die aus diesem erfindungsgemäss erhaltenen Arzneimittel können in üblicher Weise angewendet werden, z.B. intranasal, introgenital, oral, intramuskulär, intravenös, subkutan (lokal, insbesondere an allen Schleimhäuten des menschlichen und tierischen Körpers.)

Die Applikationsmenge bei der Behandlung des menschlichen und tierischen Organismus müssen von Fall zu Fall ermittelt werden. Sie entsprechen jedoch in der Regel den

nach dem klassischen Verfahren hergestellten Mengen (z.B. 10^8 KID₅₀ pro ml bzw. g) des Impfstoffes.

Die in den folgenden Beispielen gebrauchten Abkürzungen haben folgende Bedeutung:

IBR-IPV-Viren: Infektiöse bovine Rhinotracheitis – Infektiöse pustulöse Vulvovaginitis

PI-3 Virus: Parainfluenza-3-Virus

MD-VD-Virus: Mucosal-Disease, Viresdiarrhoe-Viren

HAH: Hämagglutinationshemmend

Beispiel 1

Virulentes IBR-IPV Virus isoliert aus dem Respirationstrakt eines erkrankten Tieres wurde auf einer Kälbernierenzellkultur im Earle-Medium unter Zusatz von Lactalbumin-Hydrolysat bei 37°C über 48 Stunden kultiviert. Die so erhaltene IBR-IPV-Virussuspension wurde durch Zentrifugation bei 4°C und 2000 g von den Zellrückständen befreit und anschliessend bei 22°C einem elektrischen Wechselstromfeld (220 V Wechselstromspannung, Stromstärke 260 mA Silberelektroden) in dem in Figur 1 skizzierten Reaktionsgefäss 1 Stunde lang ausgesetzt.

Eine gleiche Menge IBR-IPV-Virus im Kulturmedium (Earle-Medium) wird zur Kontrolle bei 22°C aufbewahrt.

Im Anschluss daran wurden mit beiden Suspensionen je vier Rinder im Isolierstall infiziert.

Ergebnis:

Während die Kontrolltiere sämtliche Erscheinungen der Rhinotracheitis zeigten, waren bei den mit der wie oben behandelten Suspension infizierten Rindern keinerlei Krankheitssymptome festzustellen. In der Gewebekultur konnte gezeigt werden, dass

1) sowohl die mit elektrischem Wechselstrom behandelte, als auch die als Kontrolle dienende unbehandelte Virussuspension einen zytopathogenen Effekt zeigte, und dass

2) beide Gruppen von Tieren vier Wochen später spezifische neutralisierende Antikörper im Serum aufwiesen.

Es liegt also im Falle der mit elektrischem Wechselstrom behandelten Virussuspension eine Lebend-Vakzine vor, welche apathogenes IBR-IPV-Virus enthält.

Beispiel 2

Ein Parainfluenza-3-Virusstamm wurde aus dem Respirationstrakt eines erkrankten Rindes isoliert und auf sekundären Kälbernierenzellen in Earle's-Medium mit Zusatz von 0,5% Lactalbumin-Hydrolysat und 3% antikörperfreiem, inaktiviertem Kälberserum vermehrt. Nach Abzentrifugation des Zelldebris wurde die aktive PI₃-Virus-Suspension 1 Stunde bei 37°C einem elektrischen Wechselstromfeld (220 V Wechselstromspannung, Stromstärke 255 mA, Silberelektroden) ausgesetzt.

Mit Hilfe der Gewebekulturtechnik kann anschliessend festgestellt werden, dass vermehrungsfähiges Virus in der Suspension vorhanden ist (Vorliegen einer sogenannten «Lebendvakzine».)

- 5 Der tierexperimentelle Versuch mit dem erfindungsgemäss behandelten PI-3-Virus-Stamm zeigte die gleichen Ergebnisse wie bei Beispiel 1 beschrieben, d.h. der zytopathogene Effekt war nachzuweisen, ausserdem konnte spezifische neutralisierende bzw. HAH-Antikörper im Blutserum der behandelten Tiere nachgewiesen werden.

Beispiel 3

In Analogie zu der in Beispiel 1 beschriebenen Methodik wird eine wässrige Suspension von virulentem IBR-IPV-Virus bei 37°C 24 Stunden lang einem elektrischen Wechselstromfeld (220 V Wechselstromspannung, 250 mA Stromstärke, Silberelektroden) ausgesetzt. Anschliessend liegt eine inaktivierte IBR-IPV-Vakzine vor.

Die so erhaltene Virussuspension wurde auf eine Kälbernierenkultur gebracht und bis zu 5 Tagen bei 37°C bebrütet. Dabei konnte kein zytopathogener Effekt mehr beobachtet werden.

Beispiel 4

25 85 ml der nach Beispiel 3 erhaltenen Virussuspension werden mit 15 ml einer 3%igen Al(HO)₃-Suspension vermischt. Je 10 ml des so erhaltenen Impfstoffes werden je 3 IBR-IPV-Antikörperfreien Rindern subkutan verabreicht.

Nach 20 Tagen konnte bei allen 3 Rindern IBR-IPV-Antikörper im Blutserum nachgewiesen werden.

Am 21. Tag wurden die 3 vakzinierten Rinder und ein nichtvakziniertes Kontrolltier mit je 2 ml der im Beispiel 1 beschriebenen, nicht dem elektrischen Wechselstrom ausgesetzten, aktiven IBR-IPV-Virus-Suspension intranasal infiziert.

Während das Kontrolltier alle Erscheinungen einer akuten Rhinotracheitis aufwies, konnte bei den 3 vakzinierten Rindern keinerlei Krankheitssymptome festgestellt werden.

Beispiel 5

Analog Beispiel 1 wurde eine Suspension von virulentem MD-VD-Virus in Eagle's Medium bei 37°C einem elektrischen Wechselstromfeld (220 V Wechselstromspannung, 45 Stromstärke 260 mA, Silberelektroden) 32 Stunden lang ausgesetzt.

Die so erhaltene MD-VD-Virussuspension erwies sich als vollkommen inaktiviert, d.h. es war kein zytopathogener Effekt nachweisbar.

Die immunogenen Eigenschaften blieben jedoch erhalten (spezifische Antikörperbildung, Identität im Doppeldiffusionstest).

