

(19) DANMARK



DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 143316 B

(21) Ansøgning nr. 234/76

(51) Int.Cl.³ A 61 K 39/04

(22) Indleveringsdag 21. jan. 1976

(24) Løbedag 21. jan. 1976

(41) Alm. tilgængelig 24. jul. 1976

(44) Fremlagt 10. aug. 1981

(86) International ansøgning nr. -

(86) International indleveringsdag -

(85) Videreførelsesdag -

(62) Stamansøgning nr. -

(30) Prioritet 23. jan. 1975, 7502185, FR

(71) Ansøger INSTITUT PASTEUR, 75015 Paris, FR.

(72) Opfinder Louis Chambon, FR: Marina Gheorghiu, FR.

(74) Fuldmægtig Th. Ostenfeld Patentbureau A/S.

(54) Fremgangsmåde til konservering af
vacciner indeholdende levende myco=
bakterier.

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til konservering af vacciner indeholdende levende mycobakterier, især *Bacille bilié Calmette-Guérin*, B C G.

Vacciner indeholdende levende bakterier frembyder ømtålelige konserveringsproblemer. Det skyldes, at antallet af levende bakterier, som de indeholder, kan formindskes hurtigt i tidsrummet, som følger efter deres fremstilling. Disse vacciners immuniseringsvirkning, som er forbundet med tilstedeværelsen af de levende bakterier, kan således let aftage hurtigt, endog forsvinde helt.

DK 143316 B

For B C G's vedkommende sker der for bakterierne, som hidrører fra kulturer, der er bragt i suspension i et medium, der for en fjerdedels vedkommende udgøres af et dyrkningsmedium og for tre fjerdedele vedkommende af destilleret vand (sædvanlig metode til fremstilling af frisk flydende vaccine) og konserveret ved 4°C , en halvering af levedygtigheden efter 15 dages konservering.

Denne manglende stabilitet af den flydende friske vaccine er årsag til tab af en vigtig del af produktionen, fordi det ikke kan lade sig gøre at anvende den inden for den meget korte frist, hvor bakteriernes levedygtighed er tilstrækkelig til, at en effektiv vaccination kan gennemføres. Denne manglende stabilitet nødvendiggør ligeledes en uafbrudt produktion, for at opretholdelsen af en permanent vaccinereserve kan sikres.

De med denne produktion forbundne økonomiske krav bevirker ligeledes, at man er tilbøjelig til at forlænge varigheden af bakteriedyrkningen til det tidspunkt, hvor man opnår maksimumproduktion, fortrinsvis efter 14 - 21 dage, skønt man ved, at de yngre kulturer, fortrinsvis 5 - 8 dage gamle, sædvanligvis har en større vaccinations-evne. På dette stadium er mængden af bakterier, som er udviklet, imidlertid relativt begrænset, og afbrydelsen af dyrkningen indebærer stærkt forøgede fremstillingsomkostninger.

For at mindske de vanskeligheder, der er forbundet med flydende friske vacciner indeholdende levende mycobakterier, er sådanne konserveringsmetoder som lyofilisering allerede blevet foreslået, men disse metoder er ikke uden ulemper.

Nærmere betegnet har man ved lyofilisering kunnet konservere BCG-vaccine i et år ved 4°C , og endog flere år ved -25°C . Men lyofiliseringen medfører døden eller fremkalder en tilstand af dyb anabiose hos en betydelig del af bakterierne. Dette tab af "levedygtighed" i vid forstand er mere end 50%. Det, som ud fra et immunitetsudviklingssynspunkt betyder mest, synes at være de metaboliske relationer, som etablerer sig mellem de levende bakterier og den parasit-angrebne celle. Disse relationer viser sig ved en forstærket metabolisk aktivitet udtrykt ved en forøgelse af mængden af lysosomer og hydrolytiske enzymer i makrofagerne, hvilket alt afhænger af den specifikke eller ikke specifikke immunitet.

For at begrænse faldet i levedygtighed og det deraf følgende effektivitetstab er forskellige løsninger blevet foreslået, som de, der består i gennemførelse af lyofiliseringen under tilstedeværelse af dimethylsulfoxid. Disse løsninger er dog ikke fuldstændig til-

fredsstillende, og fremfor alt er lyofiliseringsbehandlingerne relativt bekostelige.

Det er ligeledes allerede blevet foreslået at konservere forstadier af BCG ved nedfrysning og lagring ved lav temperatur, fx. ved -70°C eller ved -196°C . Disse forstadier af bakterierne kan genvindes ved optøning.

Denne nedfrysning og optøning af mycobakterierne er vanskelig at gennemføre; det er nødvendigt strengt at overholde visse nedfrysnings- og optøningshastigheder.

En af de vanskeligheder, som man møder på nedfrysningsniveauet består i, at man ikke straks opnår en fuldstændig nedfrysning af indholdet af mycobakterierne. Det bemærkes særligt, at mycobakterierne mellem temperaturerne fra -10°C til -40°C er tilbøjelige til at lide betydelig skade, sandsynligvis på grund af en endnu kun delvis frysning af indholdet af mycobakterierne, hvilket medfører lokale elektrolytkoncentrationer, som kan blive meget stærkt forhøjet i de endnu ikke frosne partier. Det er allerede blevet foreslået at gennemføre denne nedfrysning under tilstedeværelse af beskyttende midler, såsom glycerol eller polyvinylpyrrolidon. Det er blevet antydnet, at disse beskyttelsesmidler, i særdeleshed glycerolen, skulle være i stand til at fiksere vand indeholdt i mycobakterierne, som således forhindres i at undergå frysning, og således reducere dannelsen af intracellulære iskrystaller.

Det bemærkes imidlertid, at mycobakteriekulturerne efter optøning genfindes i en meget skrøbelig tilstand dømt til en hurtig død, og endog hurtigere end det er tilfældet med de friske kulturer, uanset om nedfrysningen og optøningen har været gennemført under eller uden tilstedeværelse af glycerol, polyvinylpyrrolidon, dimethylsulfoxid eller andet beskyttelsesmiddel.

Fremgangsmåderne til konservering ved nedfrysning kan således næppe benyttes til konservering af vacciner på basis af mycobakterier. Dette ville forudsætte, at såvel producenter som brugere disponerede over særlige køleanlæg, hvilket naturligvis er utænkeligt i praksis.

Vanskelighederne forbundet med den hidtil kendte konserveringsteknik er endog så store, at den flydende friske vaccine på trods af de ulemper, den frembyder, stadig anvendes meget.

Den foreliggende opfindelse har til formål at afhjælpe de tidligere nævnte mangler, især at tilvejebringe en meget enklere og mindre bekostelig fremgangsmåde til konservering af vacciner inde-

holdende mycobakterier, som bevarer disse vacciners virkeevne, om ikke altid fuldstændigt, så dog i det mindste i en grad, som er tilstrækkelig betydelig til, at de kan anvendes med succes selv efter lange lagringsperioder. De vacciner, der kan konserveres ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, er specielt sådanne, som fremstilles ud fra de stammer, der kendes under betegnelsen BCG, fx. de som er registreret under numrene 1010, 1011 og 1019 i Trudeau Mycobacterial Culture Collection U.S.A., eller under nummeret 11 173 P 2 i Institut Pasteur's samling.

Konserveringsfremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendommelig ved, at bakterierne bringes i suspension i et om ønsket fortyndet næringsmedium for disse bakterier, hvilken suspension indeholder enten glycerol eller dimethylsulfoxid i en mængde på 4 til 10%, og at denne suspension holdes ved en temperatur, der er højere end 0°C og ikke overstiger 6°C . Suspensionen holdes fortrinsvis mellem 2°C og 6°C , og særlig foretrukket ved en temperatur omkring 4°C , idet der anvendes en sådan mængde beskyttelsesmiddel, at den er tilstrækkelig til at sikre konservering af vaccinen ved den ovenfor nævnte temperatur. Mængden af konserveringsmiddel vælges fortrinsvis således, at bakteriernes levedygtighed 3 måneder efter konserveringen endnu er omkring i det mindste 50% af det, som den var før konserveringen.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen, til konservering af vacciner indeholdende levende mycobakterier, er således bemærkelsesværdig derved, at der ikke forekommer noget nedfrysningstrin mellem dyrkningen af mycobakterierne og brugen af vaccinen.

Mængden af glycerol, som er det foretrukne konserveringsmiddel, eller dimethylsulfoxid udgør således mellem ca. 4 og ca. 10 volumen-%, og er særligt foretrukket af størrelsesordenen 5 volumen-% i forhold til den samlede opløsning.

Opfindelsen bygger på den iagttagelse, at glycerol og dimethylsulfoxid i sig selv er i besiddelse af en virkning, som favoriserer konserveringen af mycobakterier, uden at der foretages nedfrysning, og således uden at der er behov for at beskytte mycobakterierne mod nogen form for osmotisk chok eller dannelse af intracellulære iskrystaller.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen tillader som følge heraf konservering af en ikke forud traumatiseret vaccine, hvorved det væsentlige af metabolismen og af den friske vaccines evne til at stimulere det retikulo-endotheliale system bevares.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen frembyder en økonomisk fordel forsåvidt angår vaccineproduktionsetaperne, som kan fordeles tidsmæssigt. Det bliver ligeledes muligt at begrænse dyrkningsvarigheden med det formål at opnå vacciner med maksimal aktivitetsgrad, uden at de udbyttetab, som er resultatet deraf, er uforenelige med produktionsomkostningerne.

De næringsstoffer, der er nødvendige for mycobakteriernes overlevelse, udgøres fortrinsvis af dyrkningsmedierne for de pågældende bakterier. Disse dyrkningsmedier kan anvendes i deres sædvanlige form eller fortyndet f.eks. ved hjælp af destilleret vand. Når en sådan fortynding gennemføres, er det med det formål at nærme mediet til isotoniske tilstande. Under alle omstændigheder må fortyndingen ikke fortsættes i en sådan grad, at opløsning af bakterierne risikeres. Slut-anvendelsen, og især administreringen af præparaterne i form af vaccine lettes derved. Det foretrækkes, at disse medier ikke indeholder dispergeringsmidler, da man har konstateret, at konserveringen bliver bedre i fravær af disse midler, som sædvanligvis kun tilsættes med det formål at lette den homogene udvikling af kulturerne under dyrkningen. I forhold til den sædvanlige udformning af disse dyrkningsmedier, kan det yderligere være fordelagtigt at tilsætte menneskealbumin i en mængde på ca. 1 til ca. 10 g pr. 100 ml medium, fortrinsvis i størrelsesordenen 1,75 g/100 ml medium, idet menneskealbumin foretrækkes frem for oksealbumin af immunologiske årsager.

Endelig anvendes med fordel bakterier, der stammer fra unge kulturer, dvs. kulturer, som ikke har nået deres udviklingsmaksimum ved de særligt opretholdte betingelser, da disse kulturer konserveres bedre end de ældre og mere fyldige kulturer.

Forsåvidt angår BCG kan næringsmediet med fordel udgøres af dyrkningsmedier af den type, der kendes under navnene "Sauton" og "Dubos", og fortrinsvis af sidstnævnte. Sammensætningen af disse medier gives senere, idet medierne i påkommende tilfælde fortyndes.

Et særlig foretrukket konserveringsmedium har følgende sammensætning:

Monokaliumphosphat	1	g	
Dinatriumphosphat	6,3	g	
Asparagin	2	g	
Kasein-autolysat	2	g	
Ammoniakalsk ferrumcitrat	5%-ig opløsning		1 ml
Magnesiumsulfat	1%-ig	-	1 ml
Calciumchlorid	0,05%-ig	-	1 ml
Zinksulfat	0,01%-ig	-	1 ml
Kobbersulfat	0,01%-ig	-	1 ml
Menneske-albumin, Kohn fraktion V	17,5 %-ig	-	100 ml
Glucose	50 %-ig	-	10 ml
Glycerol	50 %-ig	-	100 ml
Destilleret vand			<u>790 ml</u>
			1000 ml

Glycerolen i ovenstående medium kan erstattes med dimethylsulfoxid (DMSO).

Det er konstateret, at der ved konserveringsfremgangsmåden ifølge opfindelsen opnås en betydelig forøgelse af bakteriernes levedygtighed ved lagring i forhold til levedygtigheden ved friske vacciner. Som følge deraf fremkalder disse mere stabile vacciner mere ensartede resultater. Da disse vacciner er mindre forgængelige, er tabene ligeledes begrænsede, hvis de overhovedet forekommer.

Det må ydermere bemærkes, at disse forbedringer er opnået ved meget simple midler, som er lette at iværksætte, og som ikke påvirker produktionsomkostningerne kendeligt.

Konserveringsbetingelserne, og i særdeleshed konserveringens varighed, vælges foretrukket således, at levedygtigheden af mycobakterierne i vaccinerne, ikke er mindre end ca. 50% af det, den var før konserveringen.

Konserveringsfremgangsmåden ifølge opfindelsen anvendt på vaccine BCG belyses nærmere i de følgende udførelseseksempler.

Bakterierne behandles forud for konserveringen efter de sædvanlige fremgangsmåder. Denne behandling består, idet der gås ud fra bakteriestammen, i dyrkning i et egnet medium. Et foretrukket medium er for BCG's vedkommende af typen "Sauton" eller af typen "Dubos". Disse mediers sammensætning er som følger:

"Sauton"

Asparagin	4 g
Citronsyre	2 g
Dikaliumphosphat	0,5 g
Magnesiumsulfat	0,5 g
Ammoniakalsk ferrumcitrat	0,05 g
Glycerol	60 ml
Destilleret vand	<u>940 ml</u>
	1 liter

"Dubos"

Monokaliumphosphat	1 g	
Dinatriumphosphat	6,3 g	
Asparagin	2 g	
Kasein-autolysat	2 g	
Ammoniakalsk ferrumcitrat	5%-ig opløsning	1 ml
Magnesiumsulfat	1%-ig -	1 ml
Calciumchlorid	0,05%-ig -	1 ml
Zinksulfat	0,01%-ig -	1 ml
Kobbersulfat	0,01%-ig -	1 ml
"Tween 80"	10%-ig -	5 ml
Okseplasma, fraktion V	5%-ig -	10 ml
Glucose	50%-ig -	1 ml
Destilleret vand		op til 1000 ml

Der gennemføres, stadig ifølge den sædvanlige teknik til fremstilling af frisk flydende vaccine, to passager af bakterierne i det eller de valgte dyrkningsmedier. Ved afslutningen af den anden passage indhøstes og renses bakterievæksten.

I de efterfølgende eksempler anvendes unge kulturer (dvs. fra 6 til 11 dage gamle), og nærmere betegnet kulturer på 8 dage.

Eksempel 1

Bakterier af stamme nr. 1011 fra Trudeau Mycobacterial Culture Collection behandlet som anført nedenfor anbringes i forhold på 50 mg/ml i opløsningerne A, B og T, hvis sammensætning er som følger:

- A - Bouillon "Dubos" uden befugtningsmiddel (f.eks. uden "Tween 80") hvortil der er sat injicerbar menneske-albumin i stedet for okse-albumin, og som er tilsat glycerol til en koncentration på 5%.

- B - det samme "Dubos"-medium som ved opløsning A, men med glycerol erstattet af dimethylsulfoxid (DMSO) til en koncentration på 5%.

- T - 1/4 "Sauton"-medium fortyndet med 3/4 vand til vaccine som sammenligningsmedium (sædvanlig laboratorieteknik).

- T - "Sauton"-medium fortyndet 1/4 til vaccine som sammenligningsmedium (sædvanlig laboratorieteknik).

Opløsning T svarer til den, som sædvanligvis anvendes til fremstilling af flydende frisk vaccine. Denne opløsning tjener som sammenligningsmedium for opløsningerne A og B ifølge den foreliggende opfindelse.

De således fremstillede suspensioner fordeles i ampuller i mængder på 0,6 til 1 ml pr. ampul. Påfyldningen gennemføres under sterile betingelser.

Konserveringen gennemføres ved 4°C i 7 måneder, i løbet af hvilke vaccinerne levedygtighed kontrolleres med regelmæssigt mellemrum. Hertil anvendes metoden til bestemmelse af levedygtige enheder (på medium Loewenstein-Jensen) ifølge teknikken beskrevet i "Guide Technique" 67-6 udgave O.M.S., l'Organisation Mondiale de la Santé.

Resultaterne af disse undersøgelser er anført i Tabel I, som for hver opløsning og som funktion af lagringstiden viser antallet af dyrkbare enheder (NUC) pr. mg halvfugtig BCG.

TABEL I

Antal levedygtige enheder i 1 mg "skarifikations"-BCG lagret ved 4°C (fortyndet i opløsningerne A, B og T).

	A	B	T
før lagring	$7,5 \cdot 10^6$	$8,9 \cdot 10^6$	$16,9 \cdot 10^6$
efter 15 dage	$9,4 \cdot 10^6$	$9,2 \cdot 10^6$	$0,6 \cdot 10^6$
efter 1 måned	$1,34 \cdot 10^6$	$7,1 \cdot 10^6$	$13,44 \cdot 10^6$
efter 2 måneder	$9,94 \cdot 10^6$	$8,04 \cdot 10^6$	$10,38 \cdot 10^6$ 61 %
efter 3 måneder	$3,3 \cdot 10^6$	$4,75 \cdot 10^6$	$2,6 \cdot 10^6$
efter 4 måneder	$8,08 \cdot 10^6$	$5,4 \cdot 10^6$	$1,68 \cdot 10^6$
efter 5 måneder	$5,9 \cdot 10^6$	$7,6 \cdot 10^6$	$1,2 \cdot 10^6$
efter 6 måneder	$3,4 \cdot 10^6$	$2,7 \cdot 10^6$	$0,3 \cdot 10^6$
efter 7 måneder	$1,5 \cdot 10^6$	-	-

Det fremgår af disse resultater, at prøve T bevarer en god levedygtighed i ca. 2 måneder (61 %), men at den derefter aftager meget hurtigt. I sammenligning med de tidligere anvendte flydende vacciner, hvis levedygtighed efter 15 dage allerede er reduceret til halvdelen, frembyder prøve T dog en forøget stabilitet, som må tilskrives anvendelsen af unge kulturer.

Prøverne A og B, som er fremstillet og konserveret ved fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse, frembyder en endnu mere fremragende stabilitet end prøve T. For A's vedkommende er levedygtig-

heden på 100 % efter 4 måneder, 80 % efter 5 måneder og endnu på 50 % efter 6 måneders lagring. For de samme lagringsperioder er levedygtigheden af B, henholdsvis 80, 65 og 30 %.

Eksempel 2

To serier prøver A og T fremstillet som under eksempel 1 undersøgtes, idet samme konserveringsmetode fulgtes.

Der anvendtes samme målemetoder som i eksempel 1. Resultaterne er anført i tabellerne II og III. Tabel III viser middelværdierne opnået ved syv prøver i hver af serierne A og T.

TABEL II - Antal dyrkbare enheder i 1 mg frisk "skarifikations"-BCG lagret ved 4°C *

	A1	T1	A2	T2	A3	T3	A4	T4	A5	T5	A6	T6	A7	T7
Før lagring	9,4	9,85	7,2	7,7	7,7	11,1	8,2	6,3	8,9	10	6,5	8,7	15	11,7
efter 1 måned	6,9	4,5	7,6	5,9	4,9	5,1	7,9	6,6	6,1	6,6	8,5	8,8	12,1	7,4
efter 2 måneder	10,4	8,7	9,2	4,3	9,4	8,9	6,15	3,1	10,7	4,6	11,2	9,5	15,4	8,4
efter 3 måneder	5,7	4,1	6	2,65	6,93	7	4,5	4,9	8,9	6,1	6,5	6,5	12,9	11,7
efter 4 måneder	5,9	3,5	2,3	0,98	6,8	2,5	5,6	2	2,9	1,2	-	-	8,4	4,7
efter 5 måneder	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
efter 6 måneder	9,9 100%	3,4 34%	4,3 59%	0,034 0,4%	4,4 57%	1,25 11%	5,6 70%	1,3 20%	1,5 17%	1,1 11%	2,6 40%	1,8 20%	3,3 22%	1,7 14%
efter 8 måneder	1,5	0,1	2,6	-	2,2	-	0,8	-	0,3	-	0,5	-	0,75	-
efter 1 år	0,7	-	1,2	-	0,7	-	-	-	0	-	0,02	-	0,12	-

* tal multipliceres med 10⁶/mg

TABEL III

Antal dyrkbare enheder i 1 mg BCG lagret ved 4°C *

	Konserverings- opløsning (A)	"Sauton" 1/4 (T)
Før lagring	8,9	9,3
1 måned 4°C	7,7	6,4
2 måneder 4°C	10,4 100%	6,8 73%
3 måneder 4°C	7,4 81%	6,1 65%
4 måneder 4°C	5,3 59%	• 2,5 26%
6 måneder 4°C	4,5 50%	1,5 16%

* tal multipliceres med $10^6/\text{mg}$

Disse resultater bekræfter resultaterne i eksempel 1, idet overlevelsen af BCG er 50 % efter 6 måneders lagring for A-prøvernes vedkommende og kun 16% for T-sammenligningsprøvernes vedkommende.

Eksempel 3

Under samme betingelser som i eksempel 1A undersøgtes levedygtigheden af bakteriestammerne BCG nr. 1019 og 1010 fra Trudeau Mycobacterial Culture Collection og stammen betegnet "stamme C" i Exp. Intern. Laboratories (Intern. Ass. Biol. Stand.).

Som i eksempel 1 bestemtes stammernes levedygtighed fra måned til måned. Resultaterne er anført i tabel IV. Det bemærkes for disse tre stammers vedkommende, at levedygtigheden holder sig på et højt niveau, og at den ikke er lavere end ca. 50 % efter 3 måneders forløb.

TABEL IV

Lagringstid i måneder	0	1	2	3	4	5	6
1019	$21,6 \cdot 10^6$	$18,48 \cdot 10^6$	-	$16,52 \cdot 10^6$	$15,12 \cdot 10^6$	$12,96 \cdot 10^6$	$10,95 \cdot 10^6$
1010	$6,12 \cdot 10^6$	$4,20 \cdot 10^6$	-	$2,87 \cdot 10^6$	$2,10 \cdot 10^6$	$1,3 \cdot 10^6$	
Stamme C	$60 \cdot 10^6$	$55 \cdot 10^6$	$49,9 \cdot 10^6$	$48,1 \cdot 10^6$	$32,3 \cdot 10^6$	$28,3 \cdot 10^6$	$8,56 \cdot 10^6$

Eksempel 4

Under anvendelse af samme metode som i eksempel 1 undersøgtes successivt forskellige faktorerers betydning for konserveringen af vaccine af stamme nr. 1011.

Ved forsøg D anvendtes kulturer, som var 14 dage gamle i stedet for 7 som i eksempel 1A. Af resultaterne fremgår det, at konserveringen, skønt den er bedre end de sædvanligvis anvendte friske vacciners, er dårligere end den, som man opnår med unge kulturer. I forsøg E anvendtes et medium bestående af "Sauton"-medium tilsat albumin og glycerol til konservering af en stamme hidrørende fra en 7 dage gammel kultur. Levedygtigheden er i dette tilfælde også mindre end den på "Dubos"-medium opnåede.

Dette resultat er imidlertid ikke fuldstændig signifikant, da det drejede sig om et enkelt forsøg, som kan være blevet ændret på en ikke kontrolleret måde.

I forsøgene F og G anvendtes kulturer på 7 dage i medier bestående af "Dubos"-medium tilsat henholdsvis 10% albumin og 5% glycerol.

Resultaterne af disse forskellige forsøg er anført i efterfølgende Tabel V.

TABEL V

Lagringstid i måneder	0	1	2	3	4	5	6
D	$5,76 \cdot 10^6$	$4,9 \cdot 10^6$	$2,37 \cdot 10^6$	$1,08 \cdot 10^6$	$1,45 \cdot 10^6$	$0,6 \cdot 10^6$	-
E	$24,6 \cdot 10^6$	$13,22 \cdot 10^6$	$14,36 \cdot 10^6$	$5,45 \cdot 10^6$	$3,74 \cdot 10^6$	$2,24 \cdot 10^6$	$0,9 \cdot 10^6$
F	$18,4 \cdot 10^6$	$17,4 \cdot 10^6$	$9,8 \cdot 10^6$	$9,4 \cdot 10^6$	$9,5 \cdot 10^6$	$7,9 \cdot 10^6$	$3,5 \cdot 10^6$
G	$12,7 \cdot 10^6$	-	$11,5 \cdot 10^6$	-	$5,95 \cdot 10^6$	$4,59 \cdot 10^6$	$2,41 \cdot 10^6$

Eksempel 5

Prøverne A i eksempel 2 underkastedes en biologisk kontrol efter afslutningen af de 7 måneders konservering. Marsvin inokuleredes intradermalt, idet hvert marsvin fik 0,1 og 0,01 mg BCG afprøve A på den ene side og de samme mængder BCG afprøve T på den anden side.

Den iagttagne reaktion tillader bestemmelse af vaccinerne restvirulens, hvoraf den immuniserende evne sluttelig afhænger.

Fem dage efter inokulering fremkommer nodulerne, som varer ca. 30 dage.

Nodulernes diameter tjener som mål for vaccinenes virulens. For prøverne A's og for doserne 0,1 og 0,01 mg's vedkommende er nodulernes diameter henholdsvis 8 og 4 mm; for prøverne T's vedkommende 4 og 2 mm.

Dette forsøg viser klart de fortrin, som vaccinerne konserveret efter fremgangsmåden ifølge opfindelsen besidder.

Eksempel 6

I dette forsøg målttes kim-multiplikationen i mus inokuleret med prøverne fra eksempel 2 efter lagring ved 4°C i 7 måneder.

Samtidig gennemførtes et identisk forsøg med en flydende frisk-fremstillet vaccine.

Hver mus indgaves 0,02 mg BCG (halvfugtig vægt). Efter 30 dages forløb bestemtes antallet af dyrkbare enheder i musenes milt efter fremgangsmåden beskrevet af Gheorghiu og hendes medarbejdere i "Contrôle de la qualité du vaccin BCG lyophilisé par inoculation à la souris" (International Symposium on BCG vaccine Frankfurt/Main - Series Immunobiol. Standard 1971, t. 17, p. 221-226).

Resultaterne af disse forsøg er anført i tabel VI.

TABEL VI

Indsamlet antal dyrkbare enheder pr. musemilt

Mus	Vacciner lagret i 7 måneder ved 4°C		Frisk vaccine ikke lagret
	A	T	
1	11.730	0	28.000
2	17.700	0	102.200
3	9.706	0	13.900
4	26.830	0	2.830
5	9.460	0	30.060
6	-	-	15.400
Middel-værdi	15.085		32.165

Det konstateredes, at milten hos mus vaccineret med prøverne A, T og frisk vaccine gennemsnitligt indeholdt henholdsvis 15.000, 0 og 32.000 dyrkbare enheder. Vaccine konserveret ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen er således i besiddelse af en indtrængningsevne, en evne til at multiplicere sig og til at bevares i organismen som er af størrelsesordenen 50 % af den friske vaccines.

Patentkrav

1. Fremgangsmåde til konservering af vacciner indeholdende levende mycobakterier, især Bacille bilié Calmette-Guérin, BCG, k e n d e t e g n e t ved, at bakterierne bringes i suspension i et om ønsket fortyndet næringsmedium for disse bakterier, hvilken suspension indeholder enten glycerol eller dimethylsulfoxid i en mængde på 4 til 10%, og at denne suspension holdes ved en temperatur, der er højere end 0°C og ikke overstiger 6°C.
2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at næringsmediet udgøres af et dyrkningsmedium for de pågældende bakterier, hvilket dyrkningsmedium er af "Dubos"- eller "Sauton"-typen.
3. Fremgangsmåde ifølge krav 1 eller 2, k e n d e t e g n e t ved, at næringsmediet indeholder menneskealbumin i en mængde på 1 til 10 g, og fortrinsvis 1,75 g, pr. 100 ml medium.
4. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af de foregående krav, k e n d e t e g n e t ved, at de anvendte mycobakterier stammer fra unge kulturer.
5. Fremgangsmåde ifølge krav 1, ved hvilken mycobakterierne er BCG, k e n d e t e g n e t ved, at bakterier hidrørende fra 7 til 11 dage gamle kulturer bringes i suspension i et dyrkningsmedium af "Dubos"-typen, hvortil der sættes glycerol, på en sådan måde at den resulterende blanding har et glycerol-indhold på 5%, og i hvilket okse-albumin er erstattet med menneske-albumin, og at suspensionen opbevares ved en temperatur på 4°C.
6. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af de foregående krav, k e n d e t e g n e t ved, at mediet, hvori bakterierne anbringes, ikke indeholder dispergeringsmiddel.
7. Fremgangsmåde ifølge krav 5, k e n d e t e g n e t ved, at mycobakterierne hidrører fra stammer registreret under numrene 1010, 1011 og 1019 i "Trudeau Mycobacterial Culture Collection".

Fremdragne publikationer:

Dansk patent nr. 106687

Britiske patenter nr. 1014712, 1171783

Tysk fremlæggelsesskrift nr. 1245037

Tysk offentliggørelsesskrift nr. 2024341.