



(12) Ausschließungspatent

(11) DD 300 833 A7

Erteilt gemäß § 18 Absatz 2

Patentgesetz der DDR

vom 27. 10. 1983

in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) A 61 K 39/145

DEUTSCHES PATENTAMT

(21)	DD A 61 K / 282 093 5	(22)	28. 10. 85	(45)	13. 08. 92
(72)	Hahn, Konrad, Dr. Dipl.-Chem.; Hehme, Norbert, Dipl.-Chem.; Engel, Wolf-Dietrich, Dipl.-Chem.; Pescheck, Christoph, Dipl.-Biol.; Olechnowitz, Adolf-Friedrich, Dr. sc. Dipl.-Chem.; Kluge, Manfred, Obering.; Schultz, Heinz, Obering., DE				
(73)	Sächsisches Serumwerk GmbH, Herbert-Bochow-Straße 40, PSF 227, O - 8012 Dresden, DE				
(74)	Kehrer, Stefan, Patentanwalt, Hüblerstraße 2, O - 8053 Dresden, DE				
(54)	Verfahren zur Herstellung von inaktivierten Influenza-Vollvirusimpfstoffen				
(55)	Influenza; Impfstoff; Vollvirus, inaktiviert; Verfahren; Reinheitsgrad; Verträglichkeit; Gesundheitswesen; Medizin; Pharmaindustrie				
(57)	Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung von hochgereinigtem Influenzavirus und dessen Verwendung zur Herstellung von Influenzaimpfstoffen, die auf Grund ihres Reinheitsgrades eine sehr gute Verträglichkeit aufweisen. Das Ziel der Erfindung ist ein im industriellen Maßstab einsetzbares Verfahren zur Gewinnung inaktivierter Influenza-Vollvirusimpfstoffe, die im wesentlichen nur die Influenzaviren und keine Eiweiße enthalten, aus maschinell gewonnenen Rohvirusprodukten. Das Wesen der Erfindung besteht darin, daß durch eine Kombination der Virusadsorption an Calciumphosphat mit einer Fällung mittels Ammoniumsulfat in Konzentrationen von 0,3 bis 0,7 mol/l und eine anschließende Klärzentrifugation und Klärfiltration eine intensive Vorreinigung der Rohvirusprodukte durch Abtrennung insbesondere hochmolekularer Verunreinigungen mit ähnlichen Sedimentationseigenschaften wie Influenzaviren erreicht und eine für die Zentrifugation vorteilhafte, partikelfreie und gereinigte Viruslösung erhalten wird.				

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung von inaktivierten Influenza-Vollvirusimpfstoffen, die im wesentlichen nur die kompletten, nicht vermehrungsfähigen Influenzaviren und keine Eiweiße enthalten, durch Adsorption der virushaltigen Allantoisflüssigkeit an Calciumphosphat, Auflösen des erhaltenen Gels im Dinatriumsalz von EDTA, Klärzentrifugation, Klärfiltration über mit dem Dinatriumsalz von EDTA imprägnierten Zelluloseacetat- bzw. -nitratmembranen, Durchflußzonalzentrifugation im Rohrzuckergradienten, Inaktivierung mit Formaldehydlösung, Stabilisierung, Einstellung einer definierten Viruskonzentration und Weiterverarbeitung zum sterilisierten, monovalenten Virusbulk, **dadurch gekennzeichnet**, daß man
 - nach dem Auflösen des Calciumphosphatgels hochmolekulare Verunreinigungen und Urate mit 0,3 bis 0,7 mol/l Ammoniumsulfat fällt,
 - die Imprägnierung der Zelluloseacetat- bzw. -nitratmembranen mit einer Lösung des Dinatriumsalzes von EDTA in Konzentrationen von 0,01 bis 1 mol/l und hydrolysierte Gelatine in einer Konzentration von 0,1 bis 0,5% in phosphatgepufferter NaCl-Lösung durchführt,
 - dem Influenza-Vollvirusimpfstoff zur Stabilisierung hydrolysierte Gelatine (im Handel erhältlich unter der Bezeichnung Gelafusal) in einer Konzentration von 0,1 bis 0,5% zusetzt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß man 0,5 mol/l Ammoniumsulfat zusetzt.
3. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß man zur Imprägnierung eine Lösung des Dinatriumsalzes von EDTA von 0,1 mol/l und hydrolysierte Gelatine von 0,2% verwendet.
4. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß man zur Stabilisierung hydrolysierte Gelatine in einer Konzentration von 0,2% verwendet.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung von hochgereinigtem Influenzavirus und dessen Verwendung zur Herstellung von Influenzaimpfstoffen, die auf Grund ihres Reinheitsgrades eine sehr gute Verträglichkeit aufweisen.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Zur Herstellung von Influenzaimpfstoffen wird bei den bekannten Verfahren von der virushaltigen Allantoisflüssigkeit embryonierter Hühnereier ausgegangen. Nach einer stammspezifisch festgelegten Vermehrungsdauer der Influenzaviren wird die Allantoisflüssigkeit den Hühnereiern entnommen. Dieser Vorgang wurde in den letzten Jahren im Interesse einer ökonomischeren Impfstoffherstellung weitgehend mechanisiert und teilautomatisiert. Neben der dadurch erreichten Verminderung des Zeit- und Arbeitskräfteaufwandes stiegen allerdings auch die Anforderungen an die Leistungsfähigkeit der nachfolgenden Konzentrierungs- und Reinigungsverfahren, da eine stärkere Verunreinigung der Rohvirusprodukte mit Bruteibestandteilen bei maschinellen Ernteverfahren nicht vermieden werden kann. Bei den bekannten Verfahren zur Herstellung von Influenzaimpfstoffen wird nach einer Klärzentrifugation (ca. $10^4 g$) zur Entfernung zellulärer Bestandteile aus der Allantoisflüssigkeit des Virus konzentriert und von gelösten Verunreinigungen befreit.

Die Mehrzahl der Impfstoffhersteller verwendet seit den grundlegenden Untersuchungen von REIMER, C. B. et al. (Journal of Virology 1 [1967] 1207–1216) die Zonalzentrifugation in Durchflußrotoren für die großtechnische Herstellung von Influenzaimpfstoffen. Die Kapazität der dabei eingesetzten Rohrzuckergradienten und die Reinheit der im Dichtegradienten angereicherten Virusfraktion können durch eine intensive Vorreinigung des verarbeiteten Rohvirusproduktes verbessert werden. Die Herstellung wird damit ökonomischer und führt zu reineren und besser verträglichen Impfstoffen (HINZ, J. et al., European Symposium of Zonal Centrifugation in Density Gradients, Spectra 2000, 1973, No. 4, 211–214). Durch eine Vorreinigung sollten bei weitgehender Erhaltung der Virusaktivität insbesondere hochmolekulare Verunreinigungen mit ähnlichen Sedimentationseigenschaften wie die Influenzaviren (Sedimentationskoeffizient, isopyknische Dichte) abgetrennt werden. Anderenfalls überlagern derartige Kontaminanten vollständig oder teilweise die Virusbande im Dichtegradienten. Wichtig ist, daß die für die Vorreinigung angewandten Verfahren nur geringe stammspezifische Differenzen aufweisen, den Bedingungen einer industriellen Impfstoffherstellung entsprechen und die Verarbeitung maschinell gewonnenener Rohvirusprodukte (höherer Grad an Bruteiverunreinigungen) zulassen. Die in den Patentschriften DE 1617635 und US 3485718 beschriebenen Verfahren einer Virusreinigung durch Adsorption/Elution an Bariumsulfat erweisen sich als technologisch nachteilig, da wiederholte Sedimentationsvorgänge einschließlich der Trennung von Sediment und Überstand zeit- und arbeitsaufwendig sind und ein aseptisches Arbeiten erschweren. Die Rückgewinnung der adsorbierten Virusantigene ist nicht quantitativ und weist nach eigenen Untersuchungen stammabhängige Differenzen auf. Die Reinigung und Konzentrierungen von Influenzaviren mit Polyethylenglykol (PEG)-Fällungen geht auf POLSON (Preparative Biochemistry 4 [1974] 435–456) zurück und ist im Detail in den Patentschriften GB 1358734, DE 2258300 und DE 2847959 sowie SU 543674 beschrieben. Der mit diesem Verfahren erreichbare Reinigungseffekt wird durch die Zusammensetzung und Konzentration der Kontaminanten, die bei maschineller Gewinnung der Rohvirusprodukte einer beträchtlichen Variation unterliegt, bestimmt. Insbesondere beeinflussen wechselnde Konzentrationen an Lipiden und Lipoproteinen die PEG-Fällung negativ.

Kombinierte Verfahren, die eine Lipidextraktion mit organischen Lösungsmitteln einbeziehen (DE 2258300), führen nach eigenen Untersuchungen zu deutlichen Verlusten an Virusaktivität.

Als technologisch nachteilig erweist sich die mit der PEG-Fällung verbundene Sedimentation der Präzipitate, die bei einer industriellen Impfstoffherstellung nur in Durchflußrotoren kostenaufwendiger Industrieseparatoren zu bewältigen ist. Die Reinigung von Influenzaviren durch Adsorption an mineralischen Aluminiumverbindungen wurde von verschiedenen Autoren untersucht. MILLER u. SCHLESINGER (Journal of Immunology 75 [1955] 155-160) beschreiben ein adsorptionschromatographisches Verfahren unter Verwendung von Aluminiumphosphat. Neben den Schwierigkeiten, chromatographische Methoden im industriellen Maßstab einzusetzen (Arbeiten unter aseptischen Bedingungen), wies das Verfahren reduzierte Ausbeuten bei der Verarbeitung von B-Stämmen auf. DRESCHER (American Journal of Hygiene 74 [1961] 104-110) und SENGBUSCH (FEBS Letters 15 [1971] 78-80) verwendeten Aluminiumoxid bzw. Aluminiumhydroxid und Aluminiumphosphat für Adsorptionen im Batch-Verfahren. Sinngemäß gelten hier die für die Verwendung von Bariumsulfat getroffenen Feststellungen, insbesondere erweist sich die Adsorption aus maschinell gewonnenen Rohvirusprodukten als nicht reproduzierbar. Das in der Patentschrift DD 114616 beschriebene Verfahren ist für den vorgesehenen Anwendungszweck nicht geeignet, da das adsorbierte Virusantigen am mineralischen Träger verbleibt und zur Erhöhung der immunogenen Wirkung in dieser Form zur Anwendung gelangt. Derartige Impfstoffe besitzen nur eine begrenzte Reinheit und Wirksamkeit, die Herstellung von Vakzinen, die neben zwei Influenzavirus A-Stämmen einen B-Stamm einbeziehen, ist nach diesem Verfahren nicht möglich. Einen Vorteil gegenüber den beschriebenen Adsorptionsmethoden liefert die Adsorption der Virusantigene an Calciumphosphat. Die Verfahrensweisen sind in den Patentschriften US 3 197 374, US 3 316 153 und US 3 478 145 beschrieben. Calciumphosphatgele können nach erfolgter Virusadsorption im Batch-Verfahren durch Lösungen geeigneter komplexbildender Verbindungen (Natriumsalze der Ethylendiamintetraessigsäure) gelöst werden, was eine vollständige Rückgewinnung der adsorbierten Virusantigene ermöglicht. Die quantitative Adsorption ist durch die Adsorbensmenge zu steuern und konnte für alle bisher untersuchten Virusantigene der Serotypen A und B in entsprechenden Versuchen nachgewiesen werden. Das Verfahren führt zu einer Abtrennung von mehr als 90% der niedermolekularen Proteinkontaminanten. Die Entfernung hochmolekularer Verunreinigungen aus dem Vermehrungssubstrat mit ähnlichen Sedimentationseigenschaften wie die Influenzaviren, gelingt dagegen auch mit dieser Technik nur ungenügend. Neben ihrem Einfluß auf die Reaktogenität der Impfstoffe verursachen derartige Verunreinigungen beträchtliche Aktivitätsverluste durch Ausbildung von Gelschichten (Sekundärmembranen) bei der Sterilfiltration der gereinigten Viruskonzentrate. Unter ungünstigen Voraussetzungen können die Ausbeuteverluste bis zu 50% des eingesetzten Virusmaterials betragen.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist ein im industriellen Maßstab einsetzbares Verfahren zur Gewinnung inaktivierter Influenza-Vollvirusimpfstoffe, die im wesentlichen nur die Influenzaviren und keine Eiproteine enthalten, aus maschinell gewonnenen Rohvirusprodukten.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Erreichung des genannten Zieles so zu entwickeln, daß durch eine intensive Vorreinigung der Rohvirusprodukte insbesondere hochmolekulare Verunreinigungen mit ähnlichen Sedimentationseigenschaften wie Influenzaviren wirksam entfernt werden und somit optimale Voraussetzungen für eine maximale Kapazitätsauslastung der Rohrzuckergradienten in der Zonalzentrifugation bei gleichzeitiger hoher Reinheit der Viruszone im Gradienten geschaffen werden. Erfindungsgemäß wurde gefunden, daß durch eine Kombination der an sich bekannten Adsorption an Calciumphosphat mit einer nachfolgenden Fällung mittels Ammoniumsulfat in Konzentrationen von 0,3 bis 0,7 mol/l eine hochwirksame Vorreinigung erfolgt, die zur Abtrennung von vor allem solchen Verunreinigungen führt, die die gleiche isopyknische Dichte wie das Influenzavirus aufweisen.

Kombiniert wird diese Fällung mit einer anschließenden Klärzentrifugation im Durchflußverfahren und Klärfiltration über Zelluloseacetat- bzw. Zellulosenitratmembranen, wodurch eine für die Zonalzentrifugation vorteilhafte, partikelfreie und gereinigte Viruslösung erhalten wird. Erfindungsgemäß wurde dabei gefunden, daß Virusverluste bei der Klärfiltration durch Imprägnierung der Membranen mit einer Lösung des Dinatriumsalzes der Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) in Konzentrationen von 0,01 bis 1 mol/l und hydrolisierter Gelatine in einer Konzentration von 0,1 bis 0,5% in phosphatgepufferter NaCl-Lösung vermieden werden. Die Vorreinigung mittels Ammoniumsulfatfällung führt darüber hinaus zu einer vollständigen Abtrennung von Verbindungen der Harnsäure (Uraten) aus den Rohvirusprodukten, die anderenfalls die Fraktionen des Rohrzuckergradienten infolge Diffusion kontaminieren. Die Verarbeitungskapazität einer Zonalzentrifugation in K 3-Rotoren der Fa. Electronucleonics Inc./USA kann im Ergebnis der erfindungsgemäßen Vorreinigung von üblicherweise 150 bis 200 l (bezogen auf Volumen der Allantoisflüssigkeit) auf 200 bis 600 l (abhängig von der Viruskonzentration) erhöht werden. Die Bedingungen für die Sterilfiltration der inaktivierten Virusfraktion des Rohrzuckergradienten und die Stabilisierung der monovalenten Virusbulks sowie der Influenza-Vollvirusimpfstoffe konnten erfindungsgemäß durch Zusatz eines Stabilisators aus hydrolisierter Gelatine in einer Konzentration von 0,1 bis 0,5% verbessert werden. Gegenüber der Verwendung nativer Gelatine (CA 987 230, US 3 880 993) beeinflußt dieser Stabilisator nicht die Filtrationskapazität und schließt unerwünschte Nebenwirkungen bei den Empfängern der Impfstoffe aus. Der Reinheitsgrad der nach dem beschriebenen Verfahren hergestellten Influenza-Vollvirusimpfstoffe beträgt bei einer Hämagglutininkonzentration von 35 µg pro Impfdosis 14 bis 20 µg Proteinstickstoff pro Impfdosis. Der von der Weltgesundheitsorganisation empfohlene Maximalwert von 50 µg Proteinstickstoff pro Impfdosis (Technical Report Series 638, WHO, Genf 1979) wird damit deutlich unterschritten.

Ausführungsbeispiel

200 l Influenzavirushaltige Allantoisflüssigkeit werden unter Rühren mit 5,28 l Na_2HPO_4 -Lösung (0,5 mol/l) und 4,80 l CaCl_2 -Lösung (0,5 mol/l) versetzt. Nach Sedimentation des gebildeten Calciumphosphatgels und Abpumpen des Überstandes wird das Gel in dem der Calciumphosphatmenge entsprechenden stöchiometrischen Volumen von 10,0 l einer Lösung des Dinatriumsalzes von EDTA (0,26 mol/l), die auf einen pH-Wert von 8,3 eingestellt wurde, aufgelöst. Aus der teilgereinigten und konzentrierten Viruslösung werden hochmolekulare Verunreinigungen und Urate durch Zugabe einer auf pH 7,2 eingestellten $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung (4 mol/l) bis zu einer Endkonzentration von 0,3 mol/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ausgefällt. Durch eine anschließende Klärzentrifugation im Durchflußverfahren (CEPA-Zentrifuge Z 61 G, 17 000 g, 100 l/h) und Klärfiltration über mit einer Imprägnierlösung gespülte Zelluloseacetatmembranen wird die vorgereinigte Viruslösung in eine für die nachfolgende Durchflußzonalzentrifugation geeignete partikelfreie, gereinigte Form überführt. Als Imprägnierlösung wird eine phosphatgepufferte NaCl-Lösung, pH 7,2 mit Zusätzen von 0,1 mol/l EDTA- Na_2 und 0,2 % hydrolysierten Gelatine eingesetzt. Die Ultrazentrifugation wird in einem Durchflußzonalrotor (K 3-Rotor, Ultrazentrifuge Modell K Mark II, 35000 min^{-1}) durchgeführt, der mit einem Rohrzuckergradienten (0–60 % Saccharose) beladen wurde. Die Durchflußgeschwindigkeit wird mittels einer Peristaltikpumpe auf 12 l/h eingestellt. Nach Abschluß der Zentrifugation wird der virushaltige Gradient fraktionsweise gesammelt.

Die Virusfraktionen liegen im Konzentrationsbereich von 38 bis 48 % Saccharose. Für die Weiterverarbeitung zum monovalenten Impfstoffkonzentrat werden die Virusfraktionen vereinigt (ca. 0,5 l), mit Formaldehyd inaktiviert (0,025 %, 72 h, 4°C), mit phosphatgepufferter NaCl-Lösung, pH 7,2 auf eine Konzentration von ca. 100 µg Hämagglutinin/ml verdünnt, mit hydrolysierten Gelatine (Endkonzentration: 0,2 %) versetzt und sterilfiltriert.