



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **229 031 A1**

4(51) **A 61 K 39/12**

A 61 K 9/24

A 61 K 9/32

A 61 K 9/58

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP A 61 K / 269 629 6

(22) 19.11.84

(44) 30.10.85

(71) Forschungsinstitut für Lungenkrankheiten und Tuberkulose, 1115 Berlin, Karower Straße 11, DD

(72) Bergmann, Karl-Christian, MR Dr. sc. med.; Nordheim, Willy, Dr. habil. Dipl.-Ing.; Bräuniger, Siegfried, Dr. Dipl.-Biol.; Noack, Klaus, Dipl.-Biol.; Reinhardt, Jürgen, Dr. Dipl.-Chem.; Petzold, Günter, Dr. Dipl.-Chem.; Kirsch, Brigitte; Teupel, Doris; Nordheim, Regina, DD

(54) Verfahren zur Herstellung eines Oral-Impfstoffes

(57) Die Erfindung bezieht sich auf die Herstellung eines Oral-Impfstoffes gegen Viren, beispielsweise Influenzaviren, und gegen andere Erreger. Das Ziel ist die Herstellung eines Oral-Impfstoffes gegen unterschiedliche Erreger von Infektionen, wobei durch die einfach zu handhabende Kombination der Herstellungsschritte eine ökonomische Verfahrensweise ermöglicht und eine applikationsfreundliche Endkonfektionsform erreicht wird. Die Aufgabe wird dadurch gelöst, daß die entsprechenden Keime kombiniert chemisch/physikalisch oder chemisch oder nur physikalisch oder durch relevante Inaktivierungsarten unter Ausnutzung von Schutzstoffen aus dem Züchtungssubstrat inaktiviert werden, diese inaktivierten Keime mit einem zusätzlichen Schutzkolloid versetzt werden, die Suspension in diesem Zustand unter 0°C abgekühlt und lyophilisiert wird und das anfallende Lyophilisat schließlich in magensaftresistente Kapseln, Suppositorien oder andere Einschlüsse gebracht wird. Dieses Arbeiten beinhaltet ebenfalls weitere Modifikationen (aktive oder gemischte aktive/inaktive Form). Das Anwendungsgebiet ist die Herstellung von Oral-Impfstoffen und ausgewählten Biopräparaten für die Human- und Veterinärmedizin.

Erfindungsanspruch:

1. Verfahren zur Herstellung eines Oral-Impfstoffes, **gekennzeichnet dadurch**, daß bei der Impfstoffherstellung in einer solchen Anordnung gearbeitet wird, daß die Verluste an antigenen/immunogenen Faktoren minimal gehalten und Fremdstoffe weitgehend vermieden werden und durch die besondere und einfach zu handhabende Kombination der Herstellungsschritte eine ökonomische Verfahrensweise möglich ist und damit ein oraler Impfstoff erhalten wird, der keine aufwendigen Reinigungsschritte erfordert, in seinen Eigenschaften physiologisch ist und auch in eine Applikationsform gebracht wird, die praktikabel und ohne Risiko ist, und zwar in der Weise, daß Viren, zum Beispiel Influenzaviren, kombiniert chemisch/physikalisch, beispielsweise mit 1:15000 HCHO und Gammastrahlen (Kobalt-60; 9,5 kGy), oder beispielsweise 1:5000 HCHO bei 24°C oder nur physikalisch, beispielsweise bei 28°C bis max. 10 d, oder durch relevante Inaktivierungsarten (zum Beispiel ultraviolettes Licht, Mikrowellen, Spaltung der Viren) inaktiviert werden unter Ausnutzung von Schutzstoffen aus dem Viruszüchtungs substrat, diese inaktivierten Viren in konzentrierter, beispielsweise durch Ultrafiltration, oder in nichtkonzentrierter Form mit einem zusätzlichen Schutzkolloidgemisch, beispielsweise entrahmte Vollmilch in einem Anteil von zum Beispiel 10–15 Vol.-%, oder mit einem einfachen Stabilisator, beispielsweise Dextranen, versetzt werden, die Suspension in diesem Zustand unter 0°C abgekühlt und anschließend gefriergetrocknet wird und das resultierende helle, pulverförmige Produkt mit einem Wassergehalt von <5% in magensaftresistente Kapseln oder in Suppositorien aufgenommen oder in andere Einschlüsse gebracht wird.
2. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß bei der Herstellung des Oralimpfstoffes auch Viren mit ausreichender Attenuierung in aktiver Form ohne Inaktivierungsschritt dieser Verfahrensordnung unterworfen werden.
3. Verfahren nach den Punkten 1 und 2, **gekennzeichnet dadurch**, daß aktive und inaktivierte Viren in dieser Verfahrensordnung bis zum Lyophilisat hergestellt und vor der Endkonfektionierung gemischt werden.
4. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß aktive Viren in dieser Verfahrensordnung als lyophilisiertes Produkt erhalten werden und nach Abfüllung in Einschlüsse durch Gammastrahlen inaktiviert werden und damit gleichzeitig das Endprodukt sterilisiert wird.
5. Verfahren nach den Punkten 1 bis 4, **gekennzeichnet dadurch**, daß in der Verfahrensordnung ohne Chemikalien (zum Beispiel Thiomersal, Formaldehyd) gearbeitet wird und damit ein besonders physiologischer Impfstoff erhalten werden kann.
6. Verfahren nach den Punkten 1 bis 5, **gekennzeichnet dadurch**, daß am Ende des Herstellungsprozesses (zum Beispiel eines Influenzavirusimpfstoffes) bei der Endkonfektionierung (zum Beispiel Kapseln) auch weitere Keime viraler bzw. mikrobieller Herkunft mit besonderer Affinität zu lymphoiden Aggregaten des Darmtraktes und/oder besonderer Bedeutung für den Infektionsschutz zugemischt werden.
7. Verfahren nach den Punkten 1 bis 6, **gekennzeichnet dadurch**, daß im Falle von Influenzaviren unterschiedliche Influenzavirusstämme der entsprechenden Typen auch im Gemisch miteinander in den Präparationsgang und in das Endprodukt eingehen.
8. Verfahren nach den Punkten 1 bis 7, **gekennzeichnet dadurch**, daß Viren oder diese auch zusammen mit anderen Keimen in aktiver oder inaktiver Form in ein Adsorptionspulver eingebettet werden und in zum Beispiel ein Granulat gebracht und zusätzlich mit einem magensaftresistenten Überzug, beispielsweise Cellulose-Acetat-Phthalat-Lack, überzogen wird.
9. Verfahren nach den Punkten 1 bis 8, **gekennzeichnet dadurch**, daß durch die besondere Verfahrensordnung mit den spezifischen Stabilisatoren die sonst bei der Endpräparation mit magensaftresistenten Lacken (Überzügen) eintretenden Antigenaktivitätsverluste weitgehend vermieden werden.
10. Verfahren nach den Punkten 1 bis 6 und 8 bis 9, **gekennzeichnet dadurch**, daß auch Keime, die direkt oder durch Gentransfer zur Biosynthese von immunogenen Faktoren fähig sind, oder auch von diesen Keimen abgegebene Substanzen oder daraus isolierte Substanzen mit entsprechender immunogener Wirksamkeit in aktiver oder inaktiver Form in magensaftresistente Einschlüsse oder in Suppositorien gebracht werden.
11. Verfahren nach den Punkten 1 bis 10, **gekennzeichnet dadurch**, daß interferonstimulierende Substanzen in die magensaftresistenten Einschlüsse oder Suppositorien mit eingebracht werden.
12. Verfahren nach den Punkten 1, 3, 6 und 8 bis 11, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Stabilisierungs- und Füllmittel für die Endapplikationsform des Impfstoffes spezielle trockenhaltende Substanzen eingesetzt werden.
13. Verfahren nach den Punkten 1, 6, 7, 8 und 10, **gekennzeichnet dadurch**, daß außer Formaldehyd auch andere Agenzien für die Modifizierung der Antigene zum Einsatz kommen und auch eine Fixierung der Antigene an Träger vorgenommen werden kann.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung bezieht sich auf die Herstellung eines Oral-Impfstoffes, der in einer solchen Verfahrensordnung präpariert wird, daß der resultierende Impfstoff ohne wesentliche Verluste anfällt und in seinen Eigenschaften physiologisch ist und darüber hinaus eine einfache Applikationsform erlaubt.

Das Anwendungsgebiet betrifft in erster Linie die technische Herstellung eines Oral-Impfstoffes gegen Influenza, ist aber auch übertragbar auf die Herstellung oraler Impfstoffe gegen virale Erreger, infektiöse Erkrankungen des Atemtraktes, und zwar sowohl für die inaktive als auch für die aktive oder die gemischte inaktive/aktive Form und ist geeignet für Betriebe oder Spezialeinrichtungen, die Impfstoffe oder andere spezielle Biopräparate für den Gesundheitsschutz herstellen.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Lösungswege für die Herstellung von beispielsweise Impfstoffen gegen Influenza sind in der Literatur und in den Angaben relevanter Produktionsbetriebe detailliert beschrieben. Diese Impfstoffe (Vollvirus, Spalt- oder Subeinheitsimpfstoffe) erfüllen aber auf Grund der angewendeten spezifischen Herstellungstechnologie und ihrer Applikationsweise nur teilweise die Forderungen für einen aktiven Schutz; denn die bisherige Prophylaxe gegen Influenzainfektionen des Atemtraktes des Menschen beruht ganz überwiegend auf subkutanen oder intramuskulären Injektionen von Influenza-Impfstoffen. Diese rufen die Bildung von Antikörpern im Blutkreislauf hervor, während die Bildung von lokalen Antikörpern in und auf der Schleimhaut des Atemtraktes nicht oder nur in einem sehr geringen Maß hervorgerufen wird. Auch die gelegentlich angewandte Methodik der lokalen Auftragung von Impfstoffen für die Respirationsschleimhaut ist nicht optimal.

Obwohl bekannt ist, daß Oral-Impfstoffe wirksam sein können, treten aber bei deren Herstellung wesentliche Wirkungs- bzw. Ausbeuterverluste auf, die sich auch bei der Lagerung des Endproduktes noch fortsetzen. In einigen Patentschriften (zum Beispiel DT 1617779, DT 1617356, DT 1792256, DT 2103519) sind zwar Herstellungswege für nichtparenterale Impfstoffe beschrieben, aber diese offenbaren nicht die in vorliegender Erfindung aufgezeigten komplexen Vorteile. Die besondere Anreihung der Verfahrensschritte bei der beschriebenen Herstellung des Oral-Impfstoffes ist bisher in keiner Erfindungsbeschreibung ausfindig gemacht worden.

Ziel der Erfindung

Der Erfindung liegt der Effekt zugrunde, ein Verfahren zu entwickeln, durch das es möglich ist, einen Oral-Impfstoff gegen Influenza und andere Erreger von Infektionen des Atemtraktes herzustellen, wobei die Verluste an antigenen/immunogenen Faktoren minimal gehalten und Fremdstoffe weitgehend vermieden werden und durch die besondere und einfach zu handhabende Kombination der Herstellungsschritte eine ökonomische Verfahrensweise ermöglicht wird und ein oraler Impfstoff resultiert, der unnötige und aufwendige Reinigungsmanipulationen umgeht, in seinen Eigenschaften physiologisch ist und auch in eine Endkonfektionsform gebracht wird, die applikationsfreundlich und ohne Risiko ist.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß die entsprechenden Keime kombiniert chemisch/physikalisch (zum Beispiel = 1:15000 HCHO/Gammastrahlen) oder chemisch (zum Beispiel mit HCHO bei 24°C) oder nur physikalisch (zum Beispiel bei 28°C über mehrere Tage) oder relevante Inaktivierungsarten (zum Beispiel ultraviolettes Licht, Mikrowellen, Spaltung) unter Ausnutzung von Schutzstoffen aus dem Züchtungssubstrat inaktiviert werden, diese inaktivierten Keime in konzentrierter oder nichtkonzentrierter Form mit einem zusätzlichen Schutzkolloidgemisch oder einem einfachen Stabilisator versetzt werden, die Suspension in diesem Zustand unter 0°C abgekühlt und anschließend lyophilisiert wird und das Lyophilisat in magensaftresistente Kapseln, Suppositorien oder andere Einschlüsse gebracht wird. Das Arbeiten in dieser Verfahrensanordnung beinhaltet ebenfalls weitere Modifikationen (zum Beispiel ohne Chemikalien) sowie auch den Einsatz von Keimen in aktiver Form mit ausreichender Attenuierung in der Endkonfektionsform oder die gemischte aktive/inaktive Variante.

Die Anordnung der Verfahrensschritte kann somit zum Beispiel wie folgt aussehen:

Virusvermehrung
Grobreinigung des Virusmaterials (niedertour. Zentrifug.)
Inaktivierung (mit substrateigenen Schutzstoffen)
Zusatz eines komplexen Stabilisators (= Milch)
Lyophilisation
Einstellung der Konzentration
Abfüllung in Gelatinekapseln und magensaftresist. Überzug

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

Embryonierte Hühnereier (10d) werden mit einer sterilen Nadel oberhalb der Luftsackgrenze geöffnet und mit einer Virusverdünnung beimpft (Stamm X-73). Es folgt eine Nachbebrütungsperiode (48 h, 35°C). Anschließend werden die Embryonen abgetötet: (20 ± 4) h bei (4 ± 2) °C, und aus den desinfizierten Eiern wird die klare Allantoisflüssigkeit mittels einer Pumpe über eine Kanüle in eine Infusionsflasche gesaugt. Die virushaltige Allantoisflüssigkeit wird durch Zentrifugation bis max. 10000g von Zellresten und Eibestandteilen befreit und bei Temperaturen von +4°C gelagert.

Nach Einwirkung von HCHO 1:15000 erfolgt eine Inaktivierung der Influenzaviren mittels Gamma-Strahlen (Kobalt-60; 9,6kGy).

Nach Zugabe von 10Vol.-% Milch als Stabilisator wird die Allantoisflüssigkeit in einer kommerziellen Anlage lyophilisiert.

Das resultierende lyophilisierte Produkt weist folgende Werte auf:

HA-Gehalt (SRD-Test): 0,167 mg/g

Neuraminidase-Aktivität (WHO-Methode):

35,4mg freiges. NANA (18h, 37°C, Substrat: Ovomuroid) Vermehrungsfähigkeit nach WHO-Requirements 1979:

keine Vermehrungsfähigkeit

Sterilität: Produkt ist steril

Beispiel 2

Nach Einwirkung von HCHO 1:10000 erfolgt eine Konzentrierung der virushaltigen Allantoisflüssigkeit mittels einer Ultrafiltrationsmembran und einem handelsüblichen Gerät. Die Ultrafiltrationsmembran hat folgende Eigenschaften: Celluloseacetat-Membran mit einer Selektivität von 87,5% gegenüber Dextran 110000; Wasserdurchlässigkeit $1201 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$; Filtratstromdichte $91,21 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$; Filtrationsdruck max. 0,2MPa. Die Inaktivierung der Influenzaviren geschieht durch Gamma-Strahlen (Kobalt-60; 9,5kGy). Nach Zugabe eines Stabilisators (10Vol.-% Milch) wird das Konzentrat in einer kommerziellen Anlage lyophilisiert.

Das lyophilisierte Produkt hat folgende Werte:

HA-Gehalt (SRD-Test): 0,384 mg/g

Neuraminidase-Aktivität (WHO-Methode):

46,0mg freiges. NANA (18h, 37°C, Substrat: Ovomuroid)

Vermehrungsfähigkeit nach WHO-Requirements 1979:

keine Vermehrungsfähigkeit

Sterilität: Das Produkt ist steril

Bei der Virusvermehrung (Stamm X-73) und Grobreinigung (Zentrifugation) wird wie bei Beispiel 1 verfahren.

Beispiel 3

Nach Einwirkung von HCHO 1:15000 erfolgte eine Inaktivierung der Influenzaviren mittels Kobalt-60-Gamma-Strahlen (9kGy). Die Inaktivierung wird gemäß WHO-Requirements für Influenza-Vakzine überprüft. Anschließend erfolgt eine Konzentrierung der Allantoisflüssigkeit durch eine Ultrafiltrationsmembran mit einem handelsüblichen Gerät gemäß Beispiel 2. Nach Zugabe eines Stabilisators (50Vol.-% Infukoll) wird das Konzentrat in einer kommerziellen Anlage lyophilisiert.

Das lyophilisierte Produkt hat folgende Eigenschaften:

HA-Gehalt (SRD-Test): 0,476 mg/g

Neuraminidase-Aktivität (WHO-Methode):

53,2 mg freiges. NANA (18 h, 37°C, Substrat: Ovomucoid)

Sterilität: nachgewiesen

Bei der Virusvermehrung (Stamm X-73) und Grobreinigung (Zentrifugation) wird wie bei Beispiel 1 verfahren.

Beispiel 4

Es wird wie bei Beispiel 3 gearbeitet — allerdings mit dem Unterschied, daß anstelle von Infukoll 10 Vol.-% entrahmte Milch als Stabilisator zugemischt werden.

Das lyophilisierte Produkt hat dann folgende Grobzusammensetzung:

HA-Gehalt (SRD-Test): 0,810 mg/g

Neuraminidase-Aktivität: (WHO-Methode):

40,6 mg freiges. NANA (18 h, 37°C, Substrat: Ovomucoid)

Reinprotein: 99,6 mg/g

Vermehrungsfähigkeit und Sterilität: wie unter den Beispielen 1 bis 3 angegeben

Beispiel 5

Als Stamm dient B/Singapore/222/79. Die Virusvermehrung und Grobreinigung der virushaltigen Allantoisflüssigkeit erfolgen wie im Beispiel 1 beschrieben.

Die Inaktivierung wird bei 24°C über 65 h mit 1:6000 HCHO durchgeführt.

Die weitere Präparation wird wie bei Beispiel 1 vorgenommen.

Zu den Beispielen 1 bis 5

Die Lyophilisate werden in Gelatinekapseln gebracht oder als Granulat geformt und mit Cellulose-Acetat-Phthalat-Lack überzogen. Der Gehalt an Hämagglutinin beträgt im Durchschnitt bei Kapseln 30 µg.

Bei Überführung von aktivem Material (= ohne die in den Beispielen 1 bis 5 beschriebene Inaktivierung) in Einschlüsse kann die Viruskonzentration noch gesenkt werden.