



PATENTDIREKTORATET  
TAASTRUP

(51) Int.Cl.<sup>5</sup> A 61 K 39/295

(21) Patentansøgning nr.: 3830/79

(22) Indleveringsdag: 13 sep 1979

(41) Alm. tilgængelig: 15 mar 1980

(44) Fremlagt: 12 feb 1990

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 14 sep 1978 NL 7809364 26 apr 1979 NL 7903300

(71) Ansøger: \*Gist-Brocades N.V.; P.O. Box 1; 2600 MA Delft, NL

(72) Opfinder: Peter \*Apontowei; NL, Johannes Anthonius Gerardus \*Kok; NL

(74) Fuldmægtig: Internationalt Patent-Bureau

(54) Fremgangsmåde til fremstilling af en inaktiveret kombinationsvaccine klar til administrering, aktiv mod Newcastle-syge og ægproduktionsfald fremkaldt af adeno-lignende vira

(56) Fremdragne publikationer

DK ans. nr. 981/78  
US pat. nr. 3876763, 3983228  
Andre publikationer. Chem. Abs vol 89 (1978) 103639 g  
Vet. Bull. vol 48 (1978) 2966  
Vet. Bull. vol 48, no. 9 (1978) 5417

(57) Sammendrag:

3830-79

Inaktiveret kombinationsvaccine klar til administrering og aktiv mod i det mindste Newcastle disease og ægproduktionsfald forårsaget af adeno-lignende virus.

Vaccinen fremstilles ved tilsætning af en væske, som indeholder Newcastle disease-virus (NDV), og som er tilvejebragt ved kultivering af NDV, f.eks. i befrugtede hønseræg, efterfulgt af inaktivering af denne væske og eventuelt homogenisering heraf, sammen med en væske, som indeholder en adeno-lignende virus (ALV) opnået ved dyrkning af en ALV efterfulgt af inaktivering af denne væske og eventuelt homogenisering deraf, til en oliephase, hvis væsentlige komponenter er mindst én olie valgt blandt lette mineralolier, vegetabiliske olier og naphteniske mineralolier og et eller flere emulgeringsmidler, såsom ikke-ioniske overfladeaktive forbindelser afledt fra alkylbenzoxid og/eller hexavalente alkoholer og/eller højere naturlige fedtsyrer såsom estre eller ester-ethere, eventuelt efterfulgt af homogenisering og/eller tilføjning af et konserveringsmiddel.

Den anvendte NDV-udgangsoopløsning har fortrinsvis en titer på mindst  $10^{10}$  EID 50/ml, og ALV-væsken har fortrinsvis en aktivitet på  $10^3$  HA enheder.

Den anvendte ALV-holdige udgangsvæske kan fås ved en fremgangsmåde, hvor man dyrker adeno-lignende virus i andæg eller på en kultur af andefoster-fibroblaster.

Opfindelsen angår en fremgangsmåde til fremstilling af en inaktiveret kombinationsvaccine klar til administrering, aktiv mod Newcastle-syge og ægproduktionsfald fremkaldt af adeno-lignende vira.

- 5 Newcastle-syge (forkortes ND), der er en af de vigtigste luftvejssygdomme hos fjerkræ, er forårsaget af en virus og kan medføre stor dødelighed hos fjerkræ af alle aldre.

Der er udviklet adskillige vacciner mod ND, og det har vist sig mest hensigtsmæssigt at administrere disse vacciner i deres inaktiverede form, da denne form giver en høj grad af sikkerhed. Endvidere kan anvendelse af en levende vaccine i visse tilfælde medføre, at den inokulerede virus spredes fra det vaccinerede fjerkræ til fjerkræ, der er modtageligt for infektioner, eller som ikke er immunt.

Selvom der er udviklet relativt sikre og godt immuniserende levende ND-vacciner, som det f.eks. fremgår af britisk patentbeskrivelse nr. 1.510.100, er der stadig et behov for inaktiverede ND-vacciner.

Da luftvejssygdomme hos fjerkræ ofte er forårsaget af mere end én infektionskilde, er der udviklet kombinationsvacciner, f.eks. som beskrevet i USA-patentskrift nr. 2.798.835, og som består af en kombination af en vaccine mod infektiøs bronchitis og en ND-vaccine, idet begge komponenter er baseret på levende virus.

Endvidere omhandler offentliggjort hollandsk patentansøgning nr. 71.17.873 (fremlagt under nummeret 157.209) en fremgangsmåde til fremstilling af en kombinationsvaccine mod luftvejssygdomme hos fjerkræ, som er kendetegnet ved en kombination af en død vaccine mod infektiøs coryza, opnået ved dyrkning af en stamme af *Haemophilus gallinarum* i et naturligt næringsmedium og på følgende inaktivering af bakterien, med en død vaccine fra en virus, som fremkalder infektiøs bronchitis, og en død ND-vaccine.

Det bemærkes, at adskillige litteratursteder, f. eks. Avian Dis. 7 (1963) side 106-122, Am.J.Vet.Res. 17

(1956) side 294 og 298, Avian Dis. 11 (1967) side 399-406 og Virology 33 (1967 side 598-608, angiver at aktiviteten af hver af komponenterne kan svækkes eller kan mistes helt ved blanding af levende vira som følge af gensidig hæmning.

En forbindelse mellem tilstedeværelse af adeno-lignende virus (i det følgende betegnet ALV) og et pludseligt fald i æglægningen og/eller en øget produktion af æg med bløde skaller og/eller af æg uden skaller, der er iagttaget stadigt hyppigere i de sidste år, specielt hos avlsdyr og hos høns af racer med middel æglægning, er angivet i Avian Pathology 5 (1976) side 261-272. I litteraturen betegnes sådanne symptomer i visse tilfælde "egg drop syndrome".

15 I Chemical Abstract, vol. 89 (1978), 103639g antages det, at en virus, som er isoleret fra dyr med "egg drop syndrome" formentlig en adeno-virus.

Avian Pathology 6 (1977) side 405-413 omhandler også en forbindelse, som er iagttaget mellem udviklingen af antistoffer mod en hemagglutinerende virus, betegnet 127 virus, og de i økonomisk henseende meget uheldige symptomer, der er beskrevet ovenfor. Avian Pathology 7 (1978) side 35-47 bekræfter den antagede forbindelse mellem tilstedeværelse af en adeno-lignende virus og det ovenfor beskrevne pludselige fald i produktionen. Endvidere er beskrevet adskillige karakteristiske egenskaber for den pågældende type virus, f.eks. den karakteristiske agglutination af hønse-erythrocyter og den manglende evne af antisera til at kunne neutraliseres i de kendte adeno-virus-typer.

I luxembourgsk patentbeskrivelse nr. 79.154 omhandles en fremgangsmåde til fremstilling af en vaccine mod "egg drop syndrome" ud fra en ALV karakteriseret ved en specifik hemagglutination og antisera-reaktion. I beskrivelsen og eksemplerne er denne virus betegnet EDS-76 og BC-14. Denne vaccine fremstilles ved at dyrke den hidtil ukendte virus i en vævskultur, fortrinsvis i en vævskultur stammende fra fugle, som kyllingefoster-fibroblaster

og fosterleverceller eller fosternyreceller eller i embryonale andæg.

Fra Avian Pathology 5 (1976) side 262, andet afsnit, fra Avian Pathology 6 (1977) side 406 og fra luxembourgske patentbeskrivelse nr. 79.154, side 1, linie 7-11 fremgår det, at fald i ægproduktionen kan forårsages af Newcastle-syge, infektiøs bronchitis, avian- og cefalomyelitis, fuglekoppe-virus og kombinationer deraf.

Derfor vil man af praktiske grunde ofte vaccinere fjerkræ samtidigt eller med korte tidsintervaller med to eller flere vacciner mod ovennævnte almindeligt forekommende virus-sygdomme. Specielt vil fjerkræ blive vaccineret samtidig mod ND og det produktionsstab, der forårsages af ALV. Ved den hidtil sædvanligt anvendte fremgangsmåde til en sådan samtidig administrering blandede man standardvolumener af de enkelte anvendelsesklare vacciner, og der blev administreret en vaccinedosis, som blev sammensat på stedet. Denne dosis bestod derfor af praktisk taget det dobbelte volumen sammenlignet med volumenet af de separate administrerede vacciner, samtidig med at koncentrationen af virus deri blev fortyndet. Endvidere kan man næppe være sikker på at opnå en præcis sammenblanding, da der kan opstå problemer som følge af fremmed infektiøst stof.

I denne forbindelse skal det imidlertid bemærkes, at der vil opstå et stort antal problemer i forbindelse med fremstilling af kombinerede vacciner, således som dette er forklaret f.eks. i US patentskrift nr. 3 876 763.

I dette patentskrift, som vedrører en kombineret vandig vaccine, som indeholder dræbt Newcastle-sygevirus og dræbt infektiøs bronchitis-virus og dræbt Hemophilus galinarum sammen med et hjælpemiddel, der kan være en aluminiumhydroxidgel, en aluminiumphosphatgel eller alun, anføres det at det må forventes, at en kombination af flere vacciner giver en ugunstig effekt hos fjerkræ, og at en blanding af forskellige vacciner vil have tendens til at miste de enkelte komponenters aktiviteter som følge af interferens eller gensidig hæmning.

Derfor er det ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen tilsigtet at tilvejebringe en kombinationsvaccine, som er klar til anvendelse, og som er effektiv mod ND og det produktionstab, der forårsages af ALV, og som endvi-  
5 dere opfylder de nugældende strenge krav fra veterinærmyndighederne i de fleste af de relevante lande.

Det har overraskende vist sig, at en kombinationsvaccine, som er klar til administrering, kan fremstilles ved at forene en inaktiveret ND-virusvæske og en inakti-  
10 veret ALV-væske.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendommelig ved, at en ND-virusholdig væske med en titer på mindst  $10^{9,8}$  EID<sub>50</sub>/ml inaktiveres, eventuelt homogeniseres og sammen med en væske, som indeholder adenolignende virus  
15 og med en titer på mindst  $10^2$  HA enheder/ml, opnået ved dyrkning af en i andæg eller i andefosterfibroblast passeret virusstamme 127 i andæg eller i en cellekultur af andefosterfibroblast og forud inaktiveret og eventuelt homogeniseret, idet volumenforholdet mellem den ND-virus-  
20 holdige væske og den adenolignende virusholdige væske andrager fra 3:4 til 5:1, sættes til en oliefase, der som væsentlige komponenter indeholder i det mindste én af bestanddelene udvalgt blandt lette paraffiniske mineralolier, vegetabilske olier og naphtheniske mineralolier og i  
25 det mindste ét emulgeringsmiddel udvalgt blandt estere og etherestere af alkylnoxidadditionsprodukter og/eller hexavalente alkoholer med fedtsyrer med 10-20 carbonatomer, idet volumenforholdet mellem den vandige fase, som dannes af de to virusvæsker, og oliefasen kan andrage fra 7:13  
30 til 3:7, idet der eventuelt tilsættes et konserveringsmiddel til den vandige fase.

Til anvendelse ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen frembringes den inaktiverede ND-virusholdige væske på en måde, der i princippet er kendt i sig selv, f.eks.  
35 ved at dyrke den ønskede virus i befrugtede hønseæg, opsamle den dyrkede virus i en væske med en titer sædvanlig for denne art vaccine, inaktivering deraf, suspendering af virus'en i en passende med stødpude forsynet

opløsning, homogenisering heraf, blanding af denne med en inaktiveret virusvæske på basis af en ALV, fremstillet ved dyrkning af virus'en i befrugtede andeæg eller i en cellekultur af andeceller, opsamling af den dannede virus  
5 i en væske med en titer, som er sædvanlig for denne type vacciner, og inaktivering af virusvæsken på i sig selv kendt måde.

Til fremstillingen af den ND-virusholdige væske kan anvendes forskellige svagt virulente eller praktisk taget avirulente (lentogene eller velogene) ND-virus med  
10 gode immuniseringsegenskaber, såsom La Sota eller Hitchner virus (lentogen) eller Herts 33/56 (velogen) virus.

Specielle eksempler på egnede virusstammer er stammerne P/76/5, P/76/4 og P/76/3, som kan tilvejebringes  
15 fra Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions und Seuchenmedizin der Ludwig Maximilians Universität, München, VR-108, VR-107, VR-109, VR-699 og VR-623, der kan fås fra American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA, Queensland V 4 stammen, der kan fås fra  
20 the Centr. Vet. Labs., Weybridge, Great Brittain eller L/Z 258 P virus, som er deponeret hos Collection d'Institut Pasteur, Paris, under 1091.

Til fremstilling af den inaktiverede ALV-væskekomponent anvendes fortrinsvis en passeret virusstamme  
25 127, som er deponeret hos Collection d'Institut Pasteur, Paris, under nr. 1090, men også andre, med hensyn til antigenicitet omtrent tilsvarende ALV-virus, som forårsager ægproduktionsfald, kan anvendes med godt resultat. Virusstammen 1090 dyrkes fortrinsvis i andeæg.

30 Fremstillingen af den inaktiverede ALV-væske sker fortrinsvis ud fra en virus afledt fra en passeret virusstamme 127 som angivet i de ovenfor citerede artikler i Avian Pathology, men andre ALV-typer, som forårsager formindskelse af ægproduktionen, kan også anvendes med godt  
35 resultat.

Til fremstillingen af kombinationsvaccinen inakti-

veres 150-250 ml af en med stødpude forsynet NDV-holdig væske, den homogeniseres eventuelt, og sættes sammen med 100-200 ml af en med stødpude forsynet ALV-holdig flydende, forud inaktiveret og eventuelt homogeniseret væske  
5 til 600-700 ml af en oliefase. De væsentlige bestanddele i denne oliefase er i det mindste én komponent udvalgt fra gruppen bestående af lette paraffiniske mineralolier (FDA-kvalitet), planteolier og naphteniske mineralolier, sammen med et eller flere egnede emulgeringsmidler, så-  
10 som ikke-ioniske overfladeaktive forbindelser afledt fra alkylenoxid og/eller hexavalente alkoholer og/eller højere naturlige fedtsyrer (C10-C20), f.eks. estre og esterethere. Eksempler derpå er mannidmonooleat ("Span"® 80, "Arlacel" 80® , "Arlacel" A® ) og polyoxyethylen (20)-  
15 sorbitan monooleat (f.eks. "Tween"® 80).

Volumenforholdet mellem den med stødpude forsynede ND-virusholdige væske og den med stødpude forsynede ALV-holdige væske kan variere fra 3:4 til 5:1 og andrager fortrinsvis 3:2.

20 Volumenforholdet mellem den vandige fase, der udgøres af de to virusvæsker, og oliefasen andrager fortrinsvis 7:13.

Det har vist sig, at den vandige fase må sættes til oliefasen under kraftig omrøring og/eller homogenisering for at opnå den ønskede stabile og tyndtflydende emulsion.

Oliefasen indeholder 2-20 vægtprocent (baseret på vægten af oliefasen) af et emulgeringsmiddel, fortrinsvis 2-15 vægtprocent, "Arlacel" A® eller "Arlacel" 80® eller "Span"® 80 og 0,2-4% af "Tween"® 80. Komponenterne i oliefasen er fortrinsvis opvarmet separat til mindst 110°C i en autoklav eller er sterilfiltreret som blanding.

Inaktiveringen af de to udgangsvirusvæsker anvendt  
35 som komponenter kan ske med sædvanlige inaktiverere, f.eks. ved hjælp af  $\beta$ -propiolacton, eventuelt kombineret med en stabilisator, eller med formaldehyd. Fortrinsvis tilsættes  $\beta$ -propiolacton i en koncentration på 0,05 til

0,25 vægtprocent (beregnet på vægten af den vandige fase) til en med stødpude forsynet ND-virusholdig væske, og væsken inkuberes ved ca.  $37^{\circ}\text{C}$  i 1-2 timer, fortrinsvis i 90 minutter, mens den med stødpude forsynede ALV-  
5 væske inaktiveres med formaldehyd og fortrinsvis ved ca.  $20^{\circ}\text{C}$  i ca. 20 timer og anvendelse af formaldehydkoncentration på 0,02-0,5 vægtprocent. Om nødvendigt homogeniseres virusvæskerne derpå på sædvanlig måde. Et konserveringsmiddel såsom thiomersal eller formalin i pufret  
10 opløsning kan derpå eventuelt sættes til den vandige fase.

For at opnå en kombinationsvaccine, som giver den ønskede titer efter administrering, må der anvendes en ND-virusholdig udgangsopløsning med en titer på  $10^{9,8}$  EID  
15 (Egg Infectious dose) 50/ml til  $10^{10,5}$  EID 50/ml og fortrinsvis  $\geq 10^{10}$  EID 50/ml, og en ALV-væske med en aktivitet på i det mindste  $10^2$  HA (Haemagglutination) enheder og fortrinsvis  $10^3$  HA enheder.

Det vil være klart, at de fordelagtige egenskaber  
20 af den foreslåede kombinerede virusvaccine ikke kunne forudsiges af fagmanden, da der kunne fremkomme adskillige uønskede reaktioner, som denne ikke kunne udelukke. Således kunne aktivitetene af den ene eller af begge viruskomponenter i den færdige vaccine blive svækket til  
25 et uønsket niveau som følge af uønskede gensidige reaktioner mellem komponenterne i virusvæskerne eller ved reaktioner mellem disse væskekompontener og et af de tilførte hjælpekemikalier. F.eks. ville fagmanden ikke kunne udelukke, at den tilsatte  $\beta$ -propiolacton ville inakti-  
30 vere en af viruskomponenterne for kraftigt som følge af indvirkning i for lang tid, samtidig med at en sådan tid ville være nødvendig til inaktivering af den anden komponent.

Anvendelsen af kombinationsvaccinen fremstillet  
35 ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen er fordelagtig i forhold til de kendte vacciner,



der fremstilles ved at blande vacciner på stedet, idet der kun kræves et mindre volumen (f.eks.  $0,5 \text{ cm}^3$  i stedet for  $1 \text{ cm}^3$ ), således at der fremkommer mindre lokal irritation. Endvidere bliver den mængde af fremmede kemikalier, som administreres, mindre. Yderligere undgår man de ovennævnte problemer, som kan fremkomme ved blanding og indførelse af fremmed infektiøst stof.

De således fremstillede vacciner administreres sædvanligvis til fugle, der er 10-20 uger gamle, før æglægningen begynder.

Ved en foretrukken udførelsesform for fremgangsmåden ifølge opfindelsen dannes en monolagskultur i en rullende flaske af andefoster-fibroblaster ved at suspendere udgangscellerne i et kulturmedium, som består af i det mindste 70-90 dele Eagle's medium og eventuelt 5-15 dele kalve-serum, en 2-4% 's natriumhydrogencarbonatopløsning og 1-5 dele af en opløsning eller en suspension af et eller flere antibiotica, såsom penicillin G, streptomycin eller natamycin, og kulturvæsken separeres, når cellekulturen er næsten lukket. Cellekulturen inficeres med virus-suspension, inkuberes ved  $37^{\circ}\text{C}$  i 0,5-2 timer for at opnå tilknytning af virus'en, og der til sættes, med henblik på opretholdelse af mediets bestanddele, Eagle's medium med 2-10% kalve-serum, 2-10 dele tryptose-phosphat-næringsvæske (30 g/l), 10-20 dele bovin amnion fluid (BAF) og de ovenfor nævnte additiver, og det virusholdige medium og celler høstes 0,5-2 døgn efter CPE-fremkomsten (CPE = Cytopatic effect).

Cellekulturen inokuleres med en ALV-suspension med en aktivitet  $\geq 30 \times 10^6 \text{ TCID}_{50}$  pr. rullende dyrkningsflaske (TCID = Tissue Culture Infections Dose). I denne forbindelse har det vist sig, at cellesuspensionskulturer ikke var egnede til den ovenfor beskrevne fremgangsmåde.

Ganske vist beskriver luxembourgsk patentbeskrivelse nr. 79.154 alment fremstilling af vacciner mod "egg drop syndrome", men den her foreslåede foretrukne fremstillingsmåde i industriel målestok for disse vaccinevæsker med acceptabel høj titer er ikke på nogen måde

beskrevet eller foreslået.

I denne forbindelse skal det bemærkes, at det side 2, linie 28-30 i nævnte luxembourgske patentbeskrivelse klart angives, at virus'en bl.a. kan dyrkes på kyllinge-  
5 foster-fibroblaster. Imidlertid har det vist sig, at en sådan fremgangsmåde ikke fører til de resultater, der er ønskede af økonomiske grunde. Side 6, linie 29-35 angiver, at en kultur af embryonale kyllingelever-celler anvendes, hvilket imidlertid ikke fører til de ønskede, af  
10 økonomiske grunde nødvendige resultater, da dyrkning i industriel målestok af embryonale leverceller stadig betragtes som meget vanskelig og derfor er en kostbar produktionsmetode.

Opfindelsen illustreres nærmere ved hjælp af følgende eksempler.  
15

#### Eksempel 1

a) Dyrkning af adeno-lignende virus (passeret stamme 127).

I rullende dyrkningsflasker af fabrikatet Bellco  
20 frembringes cellekulturer DEF (Duck Embryo Fibroblasts) ud fra andeæg, som udvikles i 12-13 døgn i Eagle 10% kalveserum-medium, indeholdende 0,22 vægtprocent  $\text{NaHCO}_3$  og 2 volumenprocent af en antibiotica-opløsning indeholdende penicillin G, streptocycin og natamycin.

25 Mediet suges fra, når cellekulturerne er næsten lukkede. Derpå inokuleres kulturerne med en suspension af den passerede virus 127-stamme, inkuberes ved  $37^\circ\text{C}$  i 1 time og fyldes op med Eagle's vedligeholdelsesmedium, indeholdende 5% kalveserum, 10 volumenprocent tryptose-phosphat-næringsvæske (30 g/l), 10 volumenprocent bovin  
30 amnion-væske, 0,22 vægtprocent  $\text{NaHCO}_3$  og 2 volumenprocent af ovennævnte antibiotica-opløsning.

Det ALV-holdige medium og cellerne høstes 1 døgn efter CPE fremkomst, og cellerne næsten løsner sig fra  
35 glasvæggen. Virus-suspensionen fryses ved  $-20^\circ\text{C}$  og gemmes til vaccineproduktion. HA-titeren og  $\text{TCID}_{50}$  af denne suspension blev bestemt.

b<sub>1</sub>) Dyrkning af ND-virus.

SPF-æg, som var udruget i 11 døgn, blev inokuleret med L/Z 258 P virus. Kulturen blev inkuberet ved 37°C i 72 timer, og AAF (Amnion Allantoic Fluid) blev høstet.

5 Denne indeholdt på dette tidspunkt ca.  $10^{10}$  EID<sub>50</sub>/ml. Virus-suspensionen blev frosset ved -20°C eller lavere og opbevarede til vaccineproduktion.

b<sub>2</sub>) SPF-æg blev udruget i 11 døgn og inokuleret med Herts 33/66 pøde-virus. Efter inkubering ved 37°C i 24-  
10 48 timer blev AAF høstet, og dette indeholdt ca.  $10^{10}$  EID<sub>50</sub>/ml. Virus-suspensionen fryses ved -20°C eller lavere og opbevares til vaccineproduktion.

c) Behandling af virus-suspensionerne.

De frosne virus-suspensioner optøs og inaktiveres  
15 med 0,05-0,25% β-propiolacton i et vandbad ved 37°C i 90 minutter. Suspensionerne henstilles natten over ved +4°C. Inaktiveringen følges ved at iagttage dannelsen af CPE på DEF eller CEF (Chicken Embryo Fibroblasts), efterfulgt af en hemabsorptionsprøve. Endvidere inkuberes forud  
20 udrugede SPF-høseæg med den inaktiverede virus-væske og kontrolleres derpå.

Virus-suspensionerne homogeniseres med en "Ultra Turrax" homogenisator. Om ønsket fortyndes suspensionen med PBS + 0,3% formalin, afhængigt af EID<sub>50</sub> af AAF og HA-  
25 titeren af suspensionen af adeno-lignende virus. Derpå blandes med ND-virus-AAF og suspensionen af adeno-lignende virus i forhold på 6:4 og anvendes til emulsionsfremstilling.

d) Fremstilling af emulsionen.

30 Virus-suspensionerne blandes med oliefasen i et forhold på 6,5 dele olie til 3,5 dele virusholdig væske, og blandingen emulgeres således, at den gennemsnitlige dråbestørrelse af den vandige fase bliver 0,05-0,5μ, f.eks. ved indsprøjtning af virus-suspensionen i oliefasen under samtidig homogenisering med en "Ultra Turrax"-  
35 homogenisator.

Oliefasen har følgende sammensætning:

"Marcol" ® 52 (hvid paraffinisk

Esso-olie) 93,6 volumenprocent  
 "Arlacel" <sup>®</sup> A eller "Arlacel" 80 <sup>®</sup>  
 eller "Span" 80 (mannid monooleat) 6,0 "  
 "Tween" <sup>®</sup> 80 (polyoxyethylen-20-  
 5 sorbitan monooleat) 0,4 "

Oliefasens komponenter opvarmes hver for sig til 110°C i en autoklav, eller de sterilfiltreres som en blanding.

Der opnås en stabil emulsion, hvilket kontrolleres  
 10 ved:

- 1) direkte pipettering efter emulgeringen af emulsionsdråber på den vandige overflade, hvorved dråberne ikke spreder sig ud, men forbliver intakte, og
- 2) henstand ved 37°C i 4 uger, hvorved der ikke udskilles en vandig fase.

Den sluttelige koncentration af de således fremstillede emulsioner er 21% ND-virusholdig med stødpude forsynet væske og 14% ALV 127-holdig med stødpude forsynet væske.

20 Således opnået vaccine anvendes i en dosering på 0,5 ml pr. dyr intramuskulært i bryst- eller lårmuskler eller subcutant i nakken. Otte dage efter vaccinationen kan iagttages hemagglutinations-hæmmende antistoffer.

#### 25 Eksempel 2

Der gås frem som i Eksempel 1 med følgende afvigelser:

- a) I stedet for at fremstille ALV som angivet i afsnit a) i Eksempel 1, fremstilles en ALV-holdig væske ved inokulering af andæg, der forud var udruget i 9 døgn, med den passerede 127-virusstamme. Efter 7 døgns inkubering ved 37°C blev AAF (amnion allantoic fluid) høstet. Denne havde en HA-titer på ca. 1:1024. Virus-suspensionen blev derpå frosset ved -20°C og opbevaret til vaccinefremstilling.
- 35 b) Efter behandling af NDV-suspensionen som beskrevet under c) i Eksempel 1, og inaktivering af ALV-suspensionen med 0,02-0,5% formaldehyd i 20 timer ved 22°C blev

ND-virus- og ALV-væsker blandet i forhold på 4:1 og anvendt til fremstilling af emulsionen som beskrevet under d) i Eksempel 1.

### 5 Eksempel 3

- a) En ALV-holdig væske fremstilles efter det tilsvarende trin i Eksempel 2.
- b) En ND-virusholdig væske fremstilles efter det tilsvarende trin i Eksempel 1.
- 10 c) Behandlingen af ND-virus-suspensionen udføres på lignende måde som i Eksempel 1, og behandlingen af ALV-suspensionen udføres som i Eksempel 2.

De behandlede NDV-AAF og ALV-AAF blandes derpå i forholdet 5:1.

- 15 d) De sammenblandede virus-suspensioner sættes til og blandes med en oliefase i forholdet 6,5 dele oliefase: 3,5 dele virusholdig væske, og der fremstilles en emulsion ved at lede blandingen gennem en colloid-mølle.

Oliefasen har følgende sammensætning:

|    |                                                          |                  |
|----|----------------------------------------------------------|------------------|
| 20 | "Marcol" <sup>®</sup> 52                                 | 91,4 vægtprocent |
|    | "Arlacel" A <sup>®</sup> eller "Arlacel" <sup>®</sup> 80 |                  |
|    | eller "Span" <sup>R</sup> 80                             | 8,0 "            |
|    | "Tween" <sup>®</sup> 80                                  | 0,6 "            |

### 25 Eksempel 4

- En ALV-holdig væske og en ND-stilles efter de tilsvarende trin i Eksempel 1. Efter behandling af virus-suspensionerne som i c) i Eksempel 1 blandes ND-virusholdig AAF og den ALV-holdige væske i et
- 30 forhold på 4:3, og der fremstilles en emulsion på samme måde under d) i Eksempel 1. Imidlertid blandes oliefasen og de forenede virusholdige væsker nu i et forhold på 6:4. Den anvendte oliefase har samme sammensætning som i Eksempel 1 under d).

## Eksempel 5

Kombinationsvaccinen, der blev fremstillet ifølge Eksempel 4, er blevet afprøvet på følgende måde.

Ikke tidligere vaccinerede SPF-høns, med en alder  
5 på 8 uger, vaccineres med kombinationsvaccinen. Den fund-  
ne HAI (hemagglutinations-hæmning)-titer samt antallet  
af HAI-enheder i sera fra de vaccinerede dyr afviger ik-  
ke væsentligt fra de antistof-niveauer, som findes hos  
dyr, der er vaccinerede med de tilsvarende enkelte vac-  
10 ciner med en lignende sammensætning og under de samme  
betingelser.

På tegningen vises de kurver, der fås således ved  
at afsætte de fundne HAI-enheder og HAI-niveauer udtrykt  
på formen  $2^x$  i en logaritmisk skala, medens tiden er af-  
15 sat langs abscissen.

Hvad angår ND-virus-HAI-enhederne blev der fundet  
væsentligt større værdier hos dyr, som forud var vaccine-  
ret med levende ND-virus-vaccine (således som det sædvan-  
ligt sker i praksis).

20 På sådanne dyr kan konstateres f.eks. ca.  $10^{16,0}$ -  
 $10^{17,0}$  ND-virus-HAI-enheder i perioden fra 4 til 8 uger  
efter vaccinationen med den kombinerede ND-virus-ALV-vac-  
cine.

25

30

35

## P A T E N T K R A V

1. Fremgangsmåde til fremstilling af en inaktiveret kombinationsvaccine klar til administrering, aktiv mod Newcastle-syge (ND) og ægproduktionsfald fremkaldt af adeno-lignende vira, k e n d e t e g n e t ved, at en ND- virusholdig væske med en titer på mindst  $10^{9,8}$  EID<sub>50</sub>/ml inaktiveres, eventuelt homogeniseres og sammen med en væske, som indeholder adenolignende virus og med en titer på mindst  $10^2$  HA enheder/ml, opnået ved dyrkning af en i andeæg eller i andefosterfibroblast passeret virusstamme 127 i andeæg eller i en cellekultur af andefosterfibroblast og forud inaktiveret og eventuelt homogeniseret, idet volumenforholdet mellem den ND-virusholdige væske og den adenolignende virusholdige væske andrager fra 3:4 til 5:1, sættes til en oliefase, der som væsentlige komponenter indeholder i det mindste én af bestanddelene udvalgt blandt lette paraffiniske mineralolier, vegetabiliske olier og naphtheniske mineralolier og i det mindste ét emulgeringsmiddel udvalgt blandt estere og etherestere af alkylinoxidadditionsprodukter og/eller hexavalente alkoholer med fedtsyrer med 10-20 carbonatomer, idet volumenforholdet mellem den vandige fase, som dannes af de to virusvæsker, og oliefasen, kan andrage fra 7:13 til 3:7, idet der eventuelt til-sættes et konserveringsmiddel til den vandige fase.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at volumenforholdet mellem den med stødpude forsynede ND-virusholdige væske og den med stødpude forsynede adenolignende virusholdige væske andrager 3:2.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at man som adenolignende virus anvender en passeret virusstamme 127, deponeret under 1090 i Collection d'Institut Pasteur, Paris.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at man anvender en ND-virusstamme L/Z 258 P, deponeret under 1091 hos Collection d'Institut Pasteur, Paris.

5. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g -  
n e t ved, at oliefasen indeholder 2-20 vægt% af et  
emulgeringsmiddel, fortrinsvis 2-15 vægt% dianhydroman-  
nit-monooleat eller sorbitanmonooleat og 0,2-4 vægt% po-  
5 lyoxyethylen-20-sorbitanmonooleat.

6. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g -  
n e t ved, at man anvender formaldehyd som inaktivator  
for væskekomponenten, som indeholder adenolignende vi-  
rus.

10 7. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g -  
n e t ved, at der gås ud fra en ND-virusholdig væske med  
en titer, andragende fra  $10^{9,8}$  EID<sub>50</sub>/ml til  $10^{10,5}$  EID<sub>50</sub>/  
ml.

8. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g -  
15 n e t ved, at der gås ud fra en ND-virusholdig væske med  
en titer  $>10^{10}$  EID<sub>50</sub>/ml.

9. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g -  
n e t ved, at man dyrker den adenolignende virus i en  
kultur af andefosterfibroblastceller som monolag i en rullende  
20 flaske eller støttet til faste, indifferente bærere.

10. Fremgangsmåde ifølge krav 9, k e n d e t e g -  
n e t ved, at monolagscellekulturen dannes ved at su-  
spendere udgangscellerne i et kulturmedium bestående af  
mindst 70-90 dele Eagle's medium, hvortil, om ønsket,  
25 er sat 5-15 dele kalveserum, 2-4 vægt% natriumhydrogen-  
carbonatopløsning og 1-5 dele af en opløsning eller su-  
spension af et eller flere antibiotika, såsom penicillin  
G, streptomycin og natamycin, kulturmediet fraskilles,  
når cellekulturen er næsten lukket, inokuleres med vi-  
30 russuspensionen, inkuberes ved 37°C i 0,5-2 timer til  
fæstning af virussen, og der tilsættes vedligeholdelses-  
medium, bestående af i det mindste Eagle's medium med  
2-10% kalveserum, 2-10 dele tryptose-phosphat-nærings-  
væske (30 g/l), 10-20 dele bovinamnionvæske, og de øvri-  
35 ge ovennævnte additiver, hvorpå det virusholdige medium  
og cellerne høstes 0,5-2 døgn efter fremkomst af CPE.

11. Fremgangsmåde ifølge krav 10, k e n d e -



t e g n e t ved, at cellekulturen inokuleres med en suspension af adenolignende virus med en aktivitet  $\geq 30 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub> pr. rullende dyrkningsflaske.

12. Passeret adenolignende virusstamme 127 til  
5 anvendelse ved fremgangsmåden ifølge krav 1, k e n d e -  
t e g n e t ved, at det er den stamme, der er deponeret  
under nr. 1090 hos Collection d'Institut Pasteur, Paris.

13. Newcastle -sygevirusstamme L/Z 258 P, til  
anvendelse ved fremgangsmåden ifølge krav 1, k e n d e -  
10 t e g n e t ved, at det er den stamme, der er deponeret  
under 1091 hos Collection d'Institut Pasteur, Paris.

