

(19) DANMARK



DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 144479 B

(21) Ansøgning nr. 4214/77	(51) Int.Cl. ³ C 12 N 13/00
(22) Indleveringsdag 23. sep. 1977	A 61 K 39/02
(24) Løbedag 23. sep. 1977	A 61 K 39/12
(41) Alm. tilgængelig 26. mar. 1978	
(44) Fremlagt 15. mar. 1982	
(86) International ansøgning nr. -	
(86) International indleveringsdag -	
(85) Videreførelsesdag -	
(62) Stamansøgning nr. -	
(30) Prioritet 25. sep. 1976, 2643213, DE	

(71) Ansøger BAYER AKTIENGESELLSCHAFT, 5090 Leverkusen, DE.

(72) Opfinder Otto Christian Straub, DE.

(74) Fuldmægtig Ingeniørfirmaet Budde, Schou & Co.

(54) Fremgangsmåde til fremstilling af vacciner, ved hvilken en mikroorganismesuspension underkastes en behandling med en elektrisk strøm.

Den foreliggende opfindelse angår en særlig teknisk for-
delagtig fremgangsmåde til fremstilling af vacciner (både som
levende og dræbt vaccine), ved hvilken en mikroorganismesuspen-
sion underkastes en behandling med elektrisk strøm.

Det er allerede kendt, at mikroorganismer, især bakteri-
er og vira, kan svækkes ved et antal passager (vævskulturer eller
levende dyr eller organer osv.), hvorved disse således attenuerede vira

DK 144479 B

og bakterier ganske vist stadig er formeringsdygtige, men har tabt deres pathogenitet. Sådanne attenuerede vira har bibeholdt deres immunogenitet (levende vacciner). Ulempen ved disse i litteraturen ofte beskrevne attenueringsmetoder (se f.eks. tysk offentliggørelsesskrift nr. 2.033.946) er frem for alt det enorme tids- og arbejdsforbrug, der er nødvendigt, indtil der er opnået den ønskede attenueringsgrad ved passager. Man kan således ved en attenuering over f.eks. 100 vævskulturpassager regne med en attenueringsvarighed på ca. 1 år.

Det er desuden kendt, at mikroorganismer, fortrinsvis bakterier og vira, kan inaktiveres ved hjælp af kemiske midler (såkaldte "inaktiveringsmidler"). Som inaktiveringsmidler kommer en række forskellige kemiske stoffer og stofklasser på tale, f.eks. formaldehyd, ethylenimin og dets derivater, glutaraldehyd, β -propiolacton, phenol, hydrogenperoxid og forskellige andre.

De kendte fremgangsmåder er imidlertid ikke altid anvendelige over for alle mikroorganismer, og den tid, der anvendes til inaktivering med forskellige inaktiveringsmidler (f.eks. formaldehyd), er undertiden lang.

Det er desuden kendt, at en inaktivering af mikroorganismer kan gennemføres ved f.eks. indvirkning af varme eller ultraviolet lys.

Fra beskrivelsen til tysk patent nr. 397.888 er det kendt til fremstilling af specifikke vacciner ud fra renkulturer af mikroorganismer at dræbe disse organismer ved hjælp af en elektrisk jævnstrøm og at foretage en forarbejdning til emulsioner i kogsaltopløsning på i og for sig kendt måde. Denne fremgangsmåde har den ulempe, at den forløber under elektrolysebetingelser, ved hvilke vævskulturer ødelægges på meget kort tid, og mikroorganismepartiklernes immunogenitet ophæves på grund af ødelæggelse af de antigene determinanter.

Hidtil kendte inaktiveringsmetoder har til dels forskellige ulemper; således forstyrres i for vid udstrækning til dels den antigenbestemmende nedbrydning af mikroorganismer, f.eks. vira, idet mikroorganismene kun bør nedbrydes i en sådan grad, at de strukturelementer, der er nødvendige til udløsning af det specifikke immunrespons, bibeholdes. Hvis organismene nedbrydes vidt-

gående, d.v.s. når der sker en nedbrydning af de antigene determinanter, mister vaccinen sin specificitet. Desuden er det ofte vanskeligt at bevirke en fuldstændig ødelæggelse af de infektiøse egenskaber af mikroorganismer og samtidig at bevare de antigene egenskaber. Det er til dels muligt ved rekombination og/eller mutation, at eventuelt bestemte inaktiverede mikroorganismer gen- erhverver deres infektiøse egenskaber. Desuden består der f.eks. ved gennemførelse af inaktiveringen med formaldehyd eller ved indvirkning af ultraviolet lys en fare for aggregatdannelse, hvorved eventuelt delmængder af de infektiøse mikroorganismer ikke inaktiveres.

Det har nu vist sig, at man kan svække henholdsvis inaktiverede mikroorganismer, fortrinsvis bakterier og vira, men også mycoplasma og chlamydier, ved behandling i et elektrisk vekselstrømsfelt i suspension og herudfra kan fremstille levende eller dræbte vacciner.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen, der er af den allerede angivne art, er således ejendommelig ved, at mikroorganismesuspensionen, eventuelt under tilsætning af et kulturmedium, underkastes en behandling med elektrisk vekselstrøm med en spænding mellem 110 og 330 Volt, en strømstyrke på 200-300 mA og ved en temperatur på 4-60°C, og at den således fremkomne mikroorganismesuspension eventuelt isoleres som sådan og eventuelt på i og for sig kendt måde tilsættes yderligere formuleringshjælpemidler.

Ved fremstillingen af levende eller dræbte vacciner ved fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse undgås de ovenfor beskrevne ulemper ved hidtil kendte attenuerings- eller inaktiveringsmetoder. Den her omhandlede fremgangsmåde udgør således et stort overraskende fremskridt inden for human- og veterinærmedicinen.

Fremgangsmåde ifølge opfindelsen gennemføres i en reaktionsbeholder under sterile betingelser. De på tegningens fig. 1 og 2 anskueliggjorte apparater har vist sig hensigtsmæssige. Apparatet i fig. 1 består af en flad flaske af glas med tre åbninger. En åbning ved flaskehalsen 3 er lukket med en prop indeholdende et tilledningsrør med ventil, og de to andre åbninger er ligeldes

lukket med propper, gennem hvilke elektroder 1, 2 af ædelmetal (f.eks. guld, platin eller sølv, fortrinsvis sølv, men også ædelmetallegeringer er mulige) føres, til hvilke der er sluttet en elektrisk vekselstrømsspændingskilde. Til kontrol er der i flasken anbragt et termometer 5.

I glasbeholderen befinder sig den mikroorganismesuspension, der skal behandles med elektrisk vekselstrøm. De forsøgsbetingelser, der skal vælges (temperatur, varighed af behandlingen med elektrisk vekselstrøm, vekselstrømsspænding, strømstyrke, pH-værdi osv.) er afhængige af beskaffenheden af den mikroorganisme, der skal behandles, og af den ved hjælp af den her omhandlede fremgangsmåde påtænkte effekt (f.eks. attenuering til levende vaccine eller inaktivering til dræbt vaccine). Desuden er virkningen af de enkelte faktorer til dels forbundet med hinanden, således at man f.eks. kan udligne en lav strømstyrke f.eks. ved en længere indvirkningstid af vekselstrømmen.

Man kan til opnåelse af højere spændings- og strømstyrkeværdier også forsyne beholderen med en kølekappe.

Et apparat til den såkaldte gennemstrømningsmetode er vist i fig. 2.

Herved strømmer den mikroorganismesuspension, der skal behandles, over en med en ventil forsynet togangshane (A) i en beholder (B). Over en pumpe (C) pumpes mikroorganismesuspensionen over eventuelt med en kølekappe (E) forsynede elektroder (D). Fra en beholder (F) sker bortledningen fortrinsvis over en med en ventil forsynet togangshane (G). B_1 og F_1 betegner indretninger til tilførsel og bortledning af luft. Herved anvendes eventuelt steril luft.

Det i fig. 2 skitserede gennemstrømningssystem egner sig godt til fremstilling af vacciner (både levende og inaktiverede vacciner).

Som mikroorganismer kan man ved den her omhandlede fremgangsmåde anvende alle stoffer, der ellers også ved attenuering over vævskultur- eller dyrepassager eller ved inaktivering ved hjælp af kemiske og fysiske metoder kan overføres i levende eller dræbte vacciner.

Som eksempler herpå skal i enkeltheder nævnes:

RNS-vira fra følgende grupper: stavformige plantevira, Picornavira, Toga-vira, Rhabdovira, Retroviridae, Arenavira, Orthomyxovira, Paramyxovira, Corona- og Orbivirier, dobbeltstrengede RNS-vira, DNS-vira fra følgende grupper: små DNS-phager, Parvo- og Reovira, Adenovira, Papovavira, phager med middelstørrelse, store phager, Herpesvira, Iridoviridaevira, paravaccinale vira, koppevira og Adeno-ledsagevira.

Som bakterier, der kan komme på tale, skal følgende nævnes: Bakterier fra ordenen Eubacteriales (uforgrenede bakterier), især fra slægterne Neisseria, Streptococcus, Leuconostoc, Pseudomonas, Escherichia, Serratia, Proteus, Salmonella, Pasteurella, Brucella, Haemophilus, Corynebacterium og Clostridium.

Bakterier fra ordenen Actinomycetales, især fra slægterne Streptomycesbakterier, eller fra ordenen Spirochaetales, især fra slægten Leptospira.

Hvis man vil fremstille attenuerede, dvs. ikke-pathogene, men stadig helt immunogene, levende mikroorganismer i form af levende vacciner, har i afhængighed af den anvendte mikroorganisme følgende fremgangsmådebetingelser vist sig hensigtsmæssige:

Vekselstrømsspænding:

Man arbejder hensigtsmæssigt med den foreliggende net-spænding, som ved de inden for rammerne af de her beskrevne forsøg androg 220 volt, men man kan naturligvis også arbejde med andre spændingsværdier, f.eks. 110 eller 330 volt. I sådanne tilfælde skal de andre reaktionsbetingelser udlignes.

Strømstyrke:

Ved en vekselstrømsspænding på 220 volt har en strømstyrke på 200-300 mA vist sig hensigtsmæssig. Strømstyrkeværdien afhænger af strømsspænding og beskaffenheden af opløsningen.

Temperaturer:

Behandlingen med elektrisk vekselstrøm gennemføres ved temperaturer fra 4 til 60°C, fortrinsvis ved 20-40°C og især ved 37-39°C (fysiologisk temperaturområde). Den anvendte temperatur er f.eks. afhængig af termostabiliteten af den anvendte mikroorganisme.

Man kan indstille temperaturen af den mikroorganisme eller -suspension, der skal behandles, ved uforandret strømspænding, ved at strømstyrken varieres således, at der foreligger en konstant temperaturværdi i den mikroorganismesuspension, der skal behandles.

Varighed af behandlingen med elektrisk vekselstrøm:

Ved behandlingen til fremstilling af levende vacciner på basis af attenuerede mikroorganismer (fortrinsvis bakterier og vira) har en behandlingstid på 5-300 minutter, især på 30-240 minutter vist sig hensigtsmæssig. Det er imidlertid i afhængighed af naturen af den anvendte mikroorganisme og af de anvendte andre forsøgsbetingelser (f.eks. temperatur, suspensionsmiddel, strømspænding og strømstyrke) muligt at anvende tidværdier under 5 eller over 300 minutter.

Det er desuden af betydning hvilken attenueringsgrad, der kan måles ved hjælp af i og for sig kendte dyreeksperimentelle metoder, der skal opnås.

Hvis man ved hjælp af den her omhandlede fremgangsmåde vil fremstille inaktiverede mikroorganismer til anvendelse i døde vacciner, gælder de samme angivelser hvad angår vekselstrømspænding, strømstyrke og temperaturer ved fremstillingen af attenuerede mikroorganismer til anvendelse i levende vacciner.

Fremgangsmåden til behandling af mikroorganismer med elektrisk vekselstrøm er altså ved inaktivering af mikroorganismer den samme som ved attenuering af mikroorganismer.

Inaktiveringen ifølge den her omhandlede fremgangsmåde kræver imidlertid almindeligvis et større tids- og energiforbrug.

Således varer inaktiveringsprocessen ved den her omhandlede fremgangsmåde (se fig. 1) almindeligvis 10-72 og især 15-48 timer. I afhængighed af naturen af den anvendte mikroorganisme og de anvendte andre forsøgsbetingelser (f.eks. gennemstrømningsmetoden (fig. 2), temperatur, suspensionsmiddel, strømspænding og strømstyrke) er imidlertid værdier på under 10 og over 72 timer mulige.

Som udgangsmaterialer anvendes ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen almindeligvis vandige suspensioner af de ovenfor nævnte

mikroorganismer. Fortrinsvis anvendes de medier, i hvilke de mikroorganismer, der skal behandles, er blevet dyrket, f.eks. Earle-mediet, eventuelt under tilsætning af lactalbumin-hydrolysat eller følgende andre medier: Eagle's medium, Hanks medium, medium PM-13 (Serva), VM-3a medium og MEM-medium.

De efter behandlingen med elektrisk vekselstrøm dannede slutprodukter, der indeholder attenuerede eller inaktiverede mikroorganismer, anvendes enten som sådanne i steril form eller formuleres på i og for sig kendt og sædvanlig måde til levende eller dræbte vacciner og indgives som opløsning, sirup, emulsion, suspension, spray, salve, pasta, creme, lotion, aerosol eller tabletter.

Formuleringerne fremstilles på i og for sig kendt måde, f.eks. ved fortynding af de ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen attenuerede eller inaktiverede mikroorganismer med egnede opløsningsmidler og/eller indifferente ikke-toksiske, faste, halvfaste eller flydende bærestoffer, eventuelt under anvendelse af emulgeringsmidler og/eller dispergeringsmidler, sprøjtemidler og drivmidler og under anvendelse af egnede stabilisatorer.

Som opløsningsmidler, bærestoffer, emulgeringsmidler eller dispergeringsmidler skal her nævnes: vand, ikke-toksiske organiske opløsningsmidler eller fortyndingsmidler, såsom paraffiner (f.eks. jordoliefraktioner), vegetabiliske olier (f.eks. jordnøddes-/sesamolie), polyvalente alkoholer, f.eks. glycerol, glycoler (f.eks. polypropylenglycol og polyethylenglycol) og vand, faste bærestoffer såsom naturlige stenmelsarter (f.eks. højdispers kiselsyre og silicater), sukker (f.eks. rør-, mælke- og druesukker), emulgeringsmidler, såsom ikke-ionogene og anioniske emulgatorer (f.eks. polyoxyethylen-fedtsyreestere, polyoxyethylen-fedtalkohol-ethere, alkylsulfonater og arylsulfonater), dispergeringsmidler (f.eks. lignin, methylcellulose, stivelse og polyvinylpyrrolidon) og smøremidler (f.eks. magnesiumstearat, talkum, stearinsyre og natriumlaurylsulfat).

Som stabilisatorer skal der nævnes: aminosyrer, sukker, proteiner, polysaccharider og polyalkylenglycoler. Disse stabilisatorer kan både tilsættes i vandig opløsning og i lyophiliseret tilstand.

De ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen attenuerede vira og bakterier eller de ud fra disse fremstillede lægemidler kan anvendes på sædvanlig måde, f.eks. intranasalt, intragenitalt, oralt, intramuskulært, intravenøst, eller subcutant (lokalt, især på alle slimhinder i menneske- eller dyrekroppen).

Indgivelsesmængden ved behandling af menneske- og dyreorganismer skal bestemmes fra tilfælde til tilfælde. Den svarer imidlertid i regelen til de ifølge klassiske metoder fremstillede mængder (f.eks. 10^5 KID₅₀ pr. ml eller g) af vaccinen (KID = kulturinfektiøse doser).

De i de følgende eksempler anvendte forkortelser har følgende betydninger:

IBR-IPV-vira:	Infektiøs bovin-Rhinotracheitis infektiøs pustuløs Vulovaginitis
PI-3 Virus:	Parainfluenza-3-virus
MD-VD-Virus:	Mucosal-Disease, Virusdiarrhoe-virus
HAH:	hæmagglutinationshæmmende

Eksempel 1

Virulent IBR-IPV virus isoleret fra respirationsområdet hos et sygt dyr (okse) dyrkes på en kalvenyrecellekultur i Earle-medium under tilsætning af lactalbumin-hydrolysat ved 37°C i 48 timer. Den således fremkomne IBR-IPV-virussuspension befries ved centrifugering ved 4°C og 2000 g fra resterende celler og udsættes derpå i 1 time ved 22°C for et elektrisk vekselstrømfelt (220 V vekselstrømsspænding, strømstyrke 260 mA, sølvelektroder) i den i fig. 1 skitserede reaktionsbeholder.

Den samme mængde IBR-IPV-virus opbevares i et kulturmedium (Earle-medium) til kontrol ved 22°C.

Derpå inficeres med de to suspensioner hver gang fire okser i en isoleringsstald.

Resultater:

Mens kontroldyrene udviser samtlige tegn på Rhinotracheitis, kunne der ved de med de ovenfor behandlede suspensioner inficerede okser ikke fastslås nogen sygdomssymptomer. I vævskulturen kunne det vises, at

1) både den med elektrisk vekselstrøm behandlede og den som kontrol tjenende ubehandlede virussuspension udviste en cytopathogen effekt, og at

2) begge grupper dyr fire uger senere udviste specifikt neutraliserende antistoffer i serum.

I tilfælde af med elektrisk vekselstrøm behandlede virus-suspensioner foreligger der altså en levende vaccine, der indeholder apathogen IBR-IPV-virus.

Eksempel 2

En parainfluenza-3-virusstamme isoleres fra åndedrætssystemet hos en syg okse og formeres på sekundære kalvenyrecceller i Earle's-medium under tilsætning af 0,5% lactalbumin-hydrolysat og 3% antistoffrit, inaktiveret kalveserum. Efter fracentrifugering af cellerester udsættes den aktive PI₃-virussuspension i 1 time ved 37°C for et elektrisk vekselstrømsfelt (220 V vekselstrømsspænding, strømstyrke 255 mA, sølvelektroder).

Ved hjælp af vævskulturteknik kan det derpå fastslås, at der i suspensionen findes formeringsdygtigt virus (der foreligger altså en såkaldt "levende vaccine").

Dyreeksperimentforsøget med den ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen behandlede PI-3-virusstamme viste de samme resultater som beskrevet i eksempel 1, dvs. der kunne påvises en cytopathogen effekt, og desuden kunne der påvises specifikt neutraliserende eller HAH-antistoffer i blodserum fra de behandlede dyr.

Eksempel 3

I analogi med den i eksempel 1 beskrevne metode udsættes en vandig suspension af virulent IBR-IPV-virus ved 37°C i 24 timer for et elektrisk vekselstrømsfelt (220 V vekselstrømsspænding, 250 mA strømstyrke, sølvelektroder). Derpå foreligger der en inaktiveret IBR-IPV-vaccine.

Den således fremkomne virussuspension anbringes på en kalvenyrekultur og dyrkes i indtil 5 dage ved 37°C. Herved kunne der ikke mere iagttages nogen cytopathogen effekt.

Eksempel 4

85 ml af den ifølge eksempel 3 fremstillede virussuspension blandes med 15 ml af en 3%'s $\text{Al}(\text{OH})_3$ -suspension. 10 ml af den således dannede vaccine indgives hver gang til 3 IBR-IPV-antistof-fri okser subcutant.

Efter 20 dages forløb kan der ved alle tre okser påvises IBR-IPV-antistoffer i blodserum.

På den 21. dag inficeres de tre vaccinerede okser og et ikke-vaccinet kontroldyr intranasalt med hver 2 ml af den i eksempel 1 beskrevne, ikke for elektrisk vekselstrøm udsatte, aktive IBR-IPV-virussuspension.

Mens kontroldyrene alle udviste tegn på akut Rhinotracheitis, kunne der ved de tre vaccinerede okser ikke fastslås nogen sygdomstegn.

Eksempel 5

Analogt med eksempel 1 udsattes en suspension af virulent MD-VD-virus i Eagle's medium ved 37°C for et elektrisk vekselstrømsfelt (220 V vekselstrømsspænding, strømstyrke 260 mA, sølvelektroder) i 32 timer.

Den således fremkomne MD-VD-virussuspension viser sig at være fuldstændig inaktiveret, dvs. at der ikke kunne påvises nogen cytopathogen effekt.

De immunogene egenskaber forbliver imidlertid bevaret (specifik antistofdannelse, identitet ved dobbelt-diffusionsforsøg).

P a t e n t k r a v

Fremgangsmåde til fremstilling af vacciner, ved hvilken en mikroorganismesuspension underkastes en behandling med en elektrisk strøm, k e n d e t e g n e t ved, at mikroorganismesuspensionen, eventuelt under tilsætning af et kulturmedium, underkastes en behandling med elektrisk vekselstrøm med en spænding mellem 110 og 330 Volt, en strømstyrke på 200-300 mA og ved en temperatur på 4-60°C, og at den således fremkomne mikroorganismesuspension eventuelt isoleres som sådan og eventuelt på i og for sig kendt måde tilsættes yderligere formuleringshjælpe-midler.

Fremdragne publikationer:

DE patent nr. 397888.

