(19) DANMARK

(12) **FREMLÆGGELSESSKRIFT** (11) **146312 B**

DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET

(21) Patentansøgning nr.: **2630/76**

(51) Int.Cl.[3]: **A 61 K 39/108**

(22) Indleveringsdag: **11 jun 1976**

(41) Alm. tilgængelig: **13 dec 1976**

(44) Fremlagt: **05 sep 1983**

(86) International ansøgning nr.: –

(30) Prioritet: **12 jun 1975 GB 25221/75**

(71) Ansøger: ***UNILEVER N.V.; Rotterdam, NL.**

(72) Opfinder: **Stephen Howell *Parry; GB, Philip *Porter; GB.**

(74) Fuldmægtig: **Ingeniørfirmaet Budde, Schou & Co**

(54) **Fremgangsmåde til fremstilling af en vaccine mod neonatal diarre**

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til fremstilling af en vaccine mod neonatal diarré til parenteral indgivning i drægtige pattedyr, hvilken vaccine indeholder antigenet K 88/adhæsionsfaktor fra en enteropatogen stamme af Escherichia coli.

Ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen fremstilles et antigent præparat, dvs. en vaccine, som omfatter et antigen, der er en enteropatogen bakteriestammes ædhæsionsfaktor, som ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen adsorberes selektivt på umodificerede erythrocyter (røde blodlegemer). Opfindelsen er baseret på den erkendelse, at visse umodificerede erythrocyter er i besiddelse af selektive receptor-sæder på deres overflader og derved er i

DK 146312 B

stand til at danne komplekser med specielle proteiner. Med "umodificerede erythrocyter" menes erythrocyter, som er i besiddelse af deres naturlige overfladeegenskaber. Til forskel herfra er modificerede erythrocyter f.eks. kemisk overflademodificeret ved berøring med stoffer som formaldehyd, garvesyre eller glutaraldehyd, hvorved de har mistet deres naturlige evne til selektivt at danne protein-komplekser. For et givet antigen findes meget få typer erythrocyter, måske kun en enkelt, som er i stand til selektivt at adsorbere det. Egnede erythrocyter findes ved "screening" af mulige erythrocyt-typer til bestemmelse af dem, som agglutineres i vandig opløsing, således som nedenfor beskrevet.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen har betydning i forbindelse med de enteropatogene stammer af Escherichia coli, der er implicerede i neonatal diarré specielt hos svin. Infektion af nyfødte grise med disse stammer kan hurtigt føre til vandtab og død for smågrisene og er derfor et alvorligt problem i svineopdrættet. Blandt de enterotoxin-producerede stammer, der hyppigst træffes ved neonatal diarré, kan nævnes følgende efter international serotype-klassificering:

International serotype-klassificering

08:K87 (B), K88a,b (L)
08:K87 (B), K88a,c (L)
045a,c:K 'E65', K88a,c (L)
0138:K81 (B), K88a,c (L)
0141:K85a,b (B), K88a,b (L)
0147:K89 (B), K88a,c (L)
0149:K91 (B), K88a,c (L)
0157:K 'V17', K88a,c (L)

Ved neonatal diarré hos svin bliver den anteriore tyndtarm koloniseret med en eller flere af sådanne stammer, og det menes, at deres modstand mod at blive fjernet fra tyndtarmen ved peristaltikkens virkning skyldes adhæsive stoffer, der findes på bakteriens overflade, og som kaldes adhæsivfaktorer. Alle disse stammer af E.coli syntetiserer det ene eller det andet af to nært beslægtede proteinoverfladeantigener, der betegnes

som K88a,b og K88a,c og er praktisk taget uopløselige ved pH-værdier mellem 3,5 og 5,5, har høj molekylvægt (sedimentationskoefficient på ca. 35S) og er varme-labile, idet de denatureres ved opvarmning til over 70°C. Det antages, at det er disse stoffer, der er skyld i de tarm-adhæsive egenskaber, som de enteropatogene stammer af E.coli er i besiddelse af.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er således specielt rettet på fremstilling af en injicerbar vaccine, der tjener til at forøge den naturlige modstandsevne overfor mavetarmvejsinfektioner, der videregives fra et moderdyr til hendes nyfødte unge via colostrum (råmælken). I den herved fremstillede vaccine er den aktive antigene komponent specielt en adhæsionsfaktor fra en enteropathogen stamme af E.coli. Det er allerede velkendt, at bakterielle adhæsionsfaktorer, såfremt de injiceres i et moderdyr, fremmer forøgelsen af passende antistoffer i blodserummet, og at denne fordel må kunne videregives til nyfødte unger. Det bemærkes, at der ved erkendelsen af dette fænomen udelukkende er tale om en interessant iagttagelse, hvor de hidtil opnåede resultater har været variable og upålidelige, således at de ikke har kunne danne grundlag for en konsekvent og brugbar metode til immunisering.

Der findes i litteraturen f.eks. The Veterinary Bulletin, vol 45, no. 7 (1975), side 491, nr. 3645 forskellig omtale af fremstilling af vacciner (dvs. antigen-præparater) indeholdende K88-antigen såsom K88-adhæsionsfaktor fra en enteropatogen stamme af E.coli, hvilken vaccine er afprøvet på drægtige søer med det formål i soens immun-kredsløb at danne yderligere beskyttende antistoffer, der, når soen farer, kan gå over i colostret (den første mælk) og derved være tilgængelige i sædet for E.coli-kolonisationen i pattegrisens tarm. Imidlertid står det fast (se J.M. Rutter "Escherichia coli infections in piglets: Pathogenesis, virulence and vaccination" i The Veterinary Record, 22. februar 1975, 96, 171-175), at der med sådanne vacciner er opnået meget varierende resultater, idet forsøgene med dem undertiden har givet positive resultater og i andre tilfælde ikke.

Den foreliggende opfindelse sigter på at anvise en brugbar fremgangsmåde til tilvejebringelse af en stabil og effektiv vaccine indeholdende en sådan adhæsionsfaktor. Interes-

sen har især gået i retning af at finde frem til en vaccine, der kan benyttes til at meddele nyfødte smågrise en effektiv immunisering mod enteropathogene stammer af E.coli. Indenfor den tekniske litteratur er der allerede fra flere forskellige sider publiseret en række arbejder vedrørende den mekanisme, ved hvilken enteropathogene E.coli-bakteriestammer hæfter fast til tarmvæggen og således modstår de naturlige tarmbevægelser (peristaltikken), der ellers ville feje bakterierne bort for tarmvejen og medrive dem ved fremførelsen af tarmindholdet, således at de effektivt elimineres fra dyrets system. De særlige egenskaber hos bakterierne, der er ansvarlige for deres evne til at forblive forankret til tarmvæggen, findes på deres overflade og er som nævnt ovenfor kendt under betegnelsen "adhæsionsfaktorer". Antallet af forskellige stammer af E.coli, som forekommer i naturen, er uoverskueligt stort, men adhæsionsfaktorerne kan hovedsageligt differentieres indenfor to brede klasser, der indenfor teknikken omtales som henholdsvis a,b og a,c, hvoraf sidstnævnte adhæsionsfaktorer er langt de mest udbredte. De almindelige stammer af E.coli udviser enten a,c-adhæsionsfaktorer eller a,b-adhæsionsfaktorer; men det er nu i forbindelse med den foreliggende opfindelse blevet påvist, at vaccinen, som omfatter den mindst almindelige af disse, nemlig a,b-adhæsionsfaktoren, alligevel udviser overbevisende aktivitet mod et særdeles bredt område af organismer, også sådanne der ikke i sig selv er i besiddelse af denne faktor. Til yderligere at fremhæve det bemærkelsesværdige i dette forhold kan nævnes, at de almindelige a,c-adhæsionsfaktorer tværtimod i almindelighed slet ikke er effektive overfor a,b-varieteter.

Ved forskning i adhæsionsfaktormekanismen hos E.coli bakterier er det i denne sammenhæng blevet konstateret, at der ved standard hæmagglutinationsprøver, der anvendes indenfor teknikken til at identificere antigen aktivitet, i visse særlige tilfælde dannes en meget stærk binding mellem a,b-adhæsionsfaktorer og visse erythrocyter, som stadig er i besiddelse af deres naturlige overflade-egenskaber. Ved kombinationen af disse iagttagelser og rationel udnyttelse heraf, har det ifølge den foreliggende opfindelse specielt vist sig, at denne mekanis-

me kan udnyttes til at tilvejebringe stabile vacciner, hvori disse specifikke adhæsionsfaktorer indgår. Herudover har det vist sig, at a,c-adhæsionsfaktorerne kun danner stærke bindinger med erythocyter ved lav temperatur og således er ustabile ved omgivelsestemperatur. Det er kun ved hjælp af a,b-adhæsionsfaktorerne, at man kan tilvejebringe temperatur-uafhængig stabilitet sammen med erythrocyter. Ved afprøvning af tilvejebragte stabile, a,b-adhæsionsfaktor/erythocytkombinationer er det yderligere blevet påvist, at man herved opnår et antigent præparat i form af en injicerbar vaccine, ved hjælp af hvilken man kan fremkalde et højeffektivt immunrespons i blodserummet hos drægtige hunpattedyr, og at dette respons endvidere udmærker sig at kunne videregives på særdeles effektiv måde til de nyfødte unger.

Fordelen ved at anvende erythocyter, som stadig har deres naturlige overfladeegenskaber, er, at den meget specifikke evne, som visse erythocyter har til at danne stærke bindinger med visse antigene forbindelser, kan udnyttes til at sikre, at den valgte erythrocyt vil opsamle store mængder af det ønskede antigen fra en sammensat "suppe" af cellulært materiale, der fås, når bakterierne, som har været dyrket heri, dræbes og opbrydes. Det har herved vist sig, at det cellulære materiales store masse ikke vil bindes til erythocyterne, fordi den hertil nødvendige specifitet ikke er tilstede. Dette står i stærk kontrast til de erfaringer, man har med erythrocyter, hvis overfladeegenskaber er modificeret, f.eks. ved behandling med formalin, hvorved de har mistet deres naturlige specifitet og derfor vil opsamle alt for meget ekstracellulært materiale, således at vaccinens effektivitet sænkes.

For yderligere at forbedre de således fremstillede vacciners opbevaringslevetid, der må sondres fra simpel temperaturstabilitet, er det endvidere nødvendigt i vaccinen at indbefatte et standardkonserveringsmiddel for vacciner. Som eksempler på sådanne konserveringsmidler kan nævnes natriumazid eller formalin.

Den foreliggende opfindelse bygger således på følgende hovedprincipper:

1. Vacciner, hvori indgår a,b-adhæsionfaktorer, er effektive overfor et bredt område af a,c-organismer såvel som a,b-organismer.

2. Visse erythocyter, der stadig har deres naturlige overfladeegenskaber, kan selektivt adsorbere bakterielle a,b--adhæsionsfaktorer under tilvejebringelse af specifikke vacciner.

3. Disse vacciner er stabile ved omgivelsestemperatur og tilvejebringer høj effektivt immumrespons, når de indgives til i drægtige hunpattedyr.

I overenstemmelse med de ovenfor anførte principper er fremgangsmåden ifølge opfindelsen ejendommelig ved, at antigenet er K88a,b/adhæsionsfaktor, og at det adsorberes på erythrocyter, der er i besiddelse af deres naturlige overfladeegenskaber, fra en cellefri vandig opløsning, idet forholdet mellem adsorberet K88a,b/adhæsionsfaktor og rumfanget af tilstedeværende erythrocyter ligger i området 125-800 hæmaglutinationhæmningsenheder pr. ml, hvorefter det herved opnåede produkt gøres opbevaringsholdbart ved tilsætning af et konserveringsmiddel dertil.

Den ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen fremstillede vaccine mod neonatal diarré er specielt udviklet og afprøvet overfor grise, hvor denne sygdom har særlig alvorligt omfang og særlig graverende konsekvenser; med det vides, at K88a,b/-adhæsionsfaktoren også har betydning hos andre pattedyr, som derfor ligeledes vil nyde godt af vaccinen. Specielt i forbindelse med udviklingen af vaccinen til indgivelse til drægtige søer har man med held benyttet hønseerythrocyter som bæremediet for K88a,b/adhæsionsfaktor, da det herved er konstateret, at der dannes et kompleks, der er stærkt immunogent, og at de herved tilvejebragte antistoffer, der dannes ved parenteral indgivelse af komplekset, er særlig kraftige ved hæmning af adhæsionen af alle de ovenfor E.coli stammer i smågrisenes mavetarmvej, uanset om disse stammer bærer K88a,b- eller K88a,c--antigen på deres overflade.

Mekanismen, ved hvilken enteropathogene bakterier fæstner sig til tarmvæggen, er allerede undersøgt og beskrevet indenfor litteraturen, jf. således Journal of General Microbiology (1974), 84, side 135-144 (af Jones og Rutter). Der er dog herved ikke tale om fremstilling af injicerbare vacciner, ligesom dette litteratursted ikke indeholder nogen som helst antydning om, at de pågældende adhæsionsfaktorer skulle kunne adsorberes på erythrocyter og derfor naturligvis heller ikke indeholder nogen som helt antagelse om, hvad der eventuelt herved måtte ske. De af Jones og Rutter beskrevne analytiske metoder er imidlertid de samme som anvendt ved ovennævnte screening-arbejde ved udviklingen af den foreliggende opfindelse. Selv om Jones og Rutter har beskrevet et stort antal E.coli stammer, der har været undersøgt ved forskellige analytiske metoder, findes der ingen klare angivelser, der tillader med sikkerhed at slutte, hvorvidt en adsorption har fundet sted fra en cellefri vandig opløsning af K88a,b/adhæsionsfaktorer på specifikke erythrocytter, ligesom der ikke findes nogen sondring mellem K88a,b-stammer og K88a,c-stammer, som har udgjort langt størstedelen af det undersøgte materiale, og som i hvert fald ikke har kunnet bidrage med ovennævnte nyttige K88a,b/adhæsionsfaktor. Hertil kommer, at langt de fleste prøver er gennemført med levende bakteriesuspensioner, som altså ikke har været cellefri. Selv hvor der har været benyttet cellefri K88-antigenekstrakter, har der i alle tilfælde herved været tale om en K88a,c-varietét. Da Jones og Rutter således ikke overhovedet har været inde på tanken om tilvejebringelse af en vaccine, har de naturligvis heller ikke beskæftiget sig med eventuelle krav til stabilisering af en sådan ved at medtage et konserveringsmiddel såsom natriumazid eller formalin. Tværimod har Rutter i ovennævnte litteratursted i The Veterinary Record anvist vacciner til drægtige søer under anvendelse af K88-antigener, som ikke var bundet til erythrocyter for derved at fremkalde yderligere beskyttelsesantigenitet hos søerne i disses kredsløbsimmunsystem.

Under ét må det derfor konkluderes, at intet af ovennævnte litteratursteder, hverken enkeltvis eller tilsammen, foregriber den foreliggende opfindelse ved at antyde muligheden for fremstilling og brug af en injicerbar vaccine omfattende K88a,b/adhæsionsfaktorer adsorberet til umodificerede erythrocy-

ter med det klare sigte derved at opnå effektiv bekæmpelse af neonatal diarré hos smågrise ved vaccination af de drægtige søer, kort før disse farer.

Forholdet mellem adsorberet K88a,b/adhæsionsfaktor og erythrocyt-rumfanget i vaccinen er i området 125-800 enheder pr. ml, og et forhold i området 400-800 enheder pr. ml er især at foretrække. Ud over forholdet 800 enheder pr. ml vil overskudet for størstedelen ikke adsorberes på erythrocyterne og udnyttes ikke immunogent så effektivt som det adsorberede materiale. De nævnte enheder er hæmagglutineringsenheder, der er målt efter en metode, der er tilpasset ud fra en metode, som er almindeligt anvendt i immunologien, og den vil blive nærmere beskrevet i det senere anførte eksempel 1.

Det antigene præparat kan være et simpelt vandigt præparat, eller det kan indeholde en fase af en adjuvant-olie såsom mineralolie eller arachis-olie, hvis tilstedeværelse muliggør, at der ved indgivning ved injektion kan opnås et forøget antistof-respons i forhold til det, der opnås med et simpelt vandigt præparat. I den foretrukne form er præparatet en flerfoldig olie/vand-emulsion af den art, der findes beskrevet i britisk patentskrift nr. 1.080.994. I denne form er den kontinuerlige fase en vandig fase (såsom sterilt vand, fysiologisk saltopløsning eller phosphat-puffer), og det antigene materiale (i det foreliggende tilfælde komplekset af K88a,b/adhæsionsfaktor og røde blodlegemer) findes i en yderligere (sekundær) vandig fase, der selv er dispergeret i en primær dispers fase af olie.

Til fremstilling af det antigene præparat bringes en cellefri vandig opløsning indeholdende K88a,b/adhæsionsfaktoren i berøring med umodificerede erythrocyter, især umodificerede hønse-erythrocyter, under sådanne betingelser, at K88a,b/adhæsionsfaktoren bliver adsorberet af erythrocyterne. Den cellefrie vandige opløsning kan selv fremstilles ud fra en K88a,b-stamme (hensigtsmæssigt de enterotoksiske stammer G7 eller G68 type 1, der kan fås fra Central Veterinary Laboratory, Ministry of Agriculture and Fisheries, New Haw, Weybridge, Surrey UK) efter den metode, der er beskrevet af Stirm, Orskov, Orskov og Mansa i J. Bacteriology, 93, 731-739. Disse metoder medfører frigørelse af K88-materiale fra bakteriernes overflader og overføring af dem til vand, f.eks. ved opvarmning

af de levende bakterier i et vandigt medium, pufret til en pH-værdi på 6-9, til 60-65°C i 15 minutter eller mere eller ved udøvelse af friktion på bakteriernes overflader i den vandige puffer f.eks. i en Waring-blender. Bakterierne fjernes derefter ved filtrering eller centrifugering fra de derved opnåede vandige K88-ekstrakter. Det i de cellefrie ekstrakter tilstedeværende K88-materiale kan om ønsket (f.eks. til forsøg) renses ved gentagen isoelektrisk udfældning (pH = 5) og genopløsning. I stor skala kan en K88 a,b-stamme af E.coli dyrkes på et sædvanligt caseinhydrolysat/saccharose-medium, suppleret med de sædvanlige additiver såsom vitaminer, under gennemluftning (f.eks. 3 liter/minut/10 liter medium) og konstant omrøring, samt pH-regulering (ca. 7) og temperaturregulering (37°C). Den fremkomne kultur høstes efter 24 timers forløb og centrifugeres til udskillelse af bakterierne, som derefter suspenderes i en 0,15 M fysiologisk saltopløsning i en mængde på 3% af det oprindelige kultur-rumfang og derefter opvarmes til ca. 60°C til frigørelse af adhæsionsfaktoren og overføring af den til det vandige medium. Celleresterne fjernes ved centrifugering, og den overliggende væske prøves for sit indhold af adhæsionsfaktor, hvorefter denne adsorberes på hønse-erythrocyter.

Vaccinen fremstillet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen kan bedst udnyttes ved at injiceres parenteralt i drægtige søer ca. 3 uger før faringen (dvs. 95 dage efter befrugtningen), således at colostret efter fødslen vil komme til at indeholde en effektiv koncentration af antistoffer til K88a,b/adhæsionsfaktoren af de enterotoksiske E.coli-stammer.

De følgende eksempler skal tjene til nærmere illustrering af fremgangsmåden ifølge opfindelsen og anvendelsen af den fremstillede vaccine.

Eksempel 1

a. Fremstilling og isolering af K88a,b/adhæsionsfaktoren

En renkultur af E. coli-stammen G7, international serotype klassificering 08:K87 (B), K88a,b (L), for-dyrkes i næringsvæske og inkuberes natten over ved 37°C. Næringsagar-skråkulterer i Roux-kolber podes kraftigt med kulturen og inkuberes ved 37°C i 24 timer, hvorefter den sammenflydende overfladevækst vaskes og høstes aseptisk under anvendelse af en steril 0,1M phosphat-puffer (Na_2HPO_4/NaH_2PO_4) med en pH-værdi på 7,5, og den derved fremkomne bakteriesuspension opvarmes til 60°C i 30 minutter til frigørelse af K88a,b/adhæsionsfaktoren fra celleoverfladerne. Det cellulære materiale fjernes derpå ved centrifugering (3000 g, 10 minutter), og efter tilsætning af natriumazid (0,2%) til forhindring af bakterievækst opbevares den overliggende væske ved 4°C i 3 døgn. Urenhederne, som derved udskilles, fjernes derpå ved centrifugering, og til den kontinuerligt omrørte overliggende væske sattes fortyndet eddikesyre til nedsættelse af pH-værdien til 5 (det isoelektriske punkt for K88a,b/adhæsionsfaktoren ligger mellem 4,5 og 5,5). Det udfældede materiale lades henstå i 24 timer ved 4°C, hvorefter det samles ved centrifugering og vaskes to gange med 0,005 M McIlvaine-puffer (Na_2HPO_4/citronsyre) med en pH-værdi på 5,0. Rensningen sker ved gentagen opløsning (under anvendelse af phosphat-pufret 0,15 M saltopløsning med en pH-værdi på 7,2) og udfældning (0,15 M McIlvaine-puffer, pH-værdi 5,0), og til sidst opløses det udfældede materiale i en 0,15 M saltopløsning phosphat-pufret til en pH-værdi på 7,2 og opbevares ved -20°C.

b. Prøvning af K88a,b/adhæsionsfaktor i opløsning af ukendt koncentration

Denne prøve kan anvendes som "screening" til identificering af de umodificerede erythrocyter, som er i stand til selektivt at adsorbere et givet antigen. En portion på 0,05 ml af den opløsning (Y), der skal prøves, fortyndes seriemæssigt med phosphat-pufret saltopløsning med en pH-værdi på 7,1 i succesive fordybninger i en mikrotitreringsplade til opnåelse af en række op-

løsninger med adhæsionsfaktorkoncentrationer på 1/2, 1/4, 1/8 .... $1/2^n$ af opløsningen Y's koncentration. Til hver af disse opløsninger sættes 0,025 ml af en 2%'s tre gange vasket (med phosphat-pufret saltopløsning, pH-værdi 7,1) suspension af hønse-erythrocyter i samme puffer, og pladen rystes mekanisk, hvorefter indholdende i fordybningerne får lov at sætte sig. Efter 1/2 times forløb inspiceres pladen. En agglutinering af hønse-erythrocyterne sker i de stærkere opløsninger (dem i de først fyldte fordybninger), men ikke i de svagere, og slutpunktet for titreringen (udført ved stuetemperatur) tages som den opløsning, hvori der lige netop sker en hæmagglutinering. I en typisk udførelse kan slutpunktet f.eks. ligge i den 13. fordybning, og titeren for opløsningen Y vil da være 2^{13} (= 8192, dvs. 8000, svarende til 8000 hæmagglutinerings(HA)-enheder pr. ml).

Eksempel 2

Fremstilling af en simpel vandig hønse-erythrocytvaccine

På den i eksempel 1b beskrevne måde prøves en opløsning, fremstillet som beskrevet i eksempel 1a, og den viser sig at have en K88a,b/adhæsionsfaktor-titer på 8000. Af denne opløsning fremstilles en vaccine ved, at 1 ml af opløsningen fortyndes til 10 ml med phosphat-pufret saltopløsning med en pH-værdi på 7,1 (PBS), hvorefter den fortyndede opløsning (Z) omrøres i 1/2 time ved 37°C med 10 ml af tre gange vaskede (PBS), sammenpakkede hønse-erythrocyter opnået ved centrifugering (1000 g, 10 minutter). Dette fører til praktisk taget mætning af hønse-erythrocyternes overflade med adhæsionsfaktoren, hvilket vil sige, at der ved mætning er 8000 HA-enheder af adhæsionsfaktoren pr. 10 ml røde hønseblodlegemer.

Derpå sættes 0,2 vægt% natriumazid til den fremkomne vaccine, som derpå opbevares ved 4°C, indtil den anvendes.

Den således opnåede vaccine gives hensigtsmæssigt til drægtige søer i en dosisstørrelse på 2 ml, ved hvilken dosisstørrelse den har en ca. 10 gange så stor antistof-dannende virkning som den opløsning Z (ikke erythrocyt-holdig), hvoraf den er fremstillet.

I stedet for at anvende natriumazid som konserveringsmiddel som beskrevet ovenfor kan man behandle vaccinen med formalin (40%'s vandig formaldehyd-opløsning), hensigtsmæssigt i en mængde på et rumfang formalin til 100-50 rumfang af vaccinen.

Eksempel 3

Fremstilling af vacciner indeholdende et olie-adjuvans.

(i) I 9 ml af en mineralolie af farmaceutisk kvalitet opløstes 1 ml af den mannidmonooleat-emulgator, der fås under betegnelsen "Arlacel A"®, og denne olieopløsning sættes derefter til et lige så stort rumfang af den i eksempel 2 opnåede simple vandige hønse-erythrocyt-vaccine. Sammenblandingen foretages i en homogenisator til dannelse af en creme-agtig vand-i-olie-emulsion.

(ii) Af denne vand-i-olie-vaccine sættes 1 rumfang til et lige så stort rumfang af en 2%'s i 0,15 M saltopløsning af den polyoxyethylensorbitanmonooleat-emulgator, der fås under betegnelsen "Tween® 80", og sammenblandingen foretages i en homogenisator.

Den således opnåede lavviskose vand-i-olie-i-vand-vaccine injiceres intramuskulært i en dosisstørrelse på 8 ml på søer 3 uger før faringen (dvs. ca. 95 dage efter befrugtningen). Den herved frembragte antiadhæsions-aktivitet er forbundet med tre antistof-grupper (IgG, IgM og IgA), hvilket giver et bredt spektrum for antistof-aktivitet, der nedenfor er sammenlignet med den tilsvarende aktivitet i en kontrolgruppe bestående af ubehandlede drægtige søer.

	Anti-adhæsionsaktivitet	
	i serum	i colostrum
Vaccinerede søer	256	512
Ikke-vaccinerede søer	4-8	32

Anti-adhæsionsaktiviteten i serumet fra pattegrise, diet hos de vaccinerede søer, er 128 enheder, medens den i serumet fra pattegrise, diet hos de ubehandlede søer, kun er 32 enheder. De førstnævnte pattegrise er altså langt mere resistente end de sidstnævnte over for infektion med de enterotoksiske K88a,b- og K88a,c-stammer af E. coli.

P a t e n t k r a v .

1. Fremgangsmåde til fremstilling af en vaccine mod neonatal diarré til parenteral indgivning i drægtige pattedyr, hvilken vaccine indeholder antigenet K88/adhæsionsfaktor fra en enteropatogen stamme af Escherichia coli k e n d e t e g n e t ved, at antigenet er K88a,b/adhæsionsfaktor, og at det adsorberes på erythrocyter, der er i besiddelse af deres naturlige overfladeegenskaber, fra en cellefri vandig opløsning, idet forholdet mellem adsorberet K88a,b/adhæsionsfaktor og rumfanget af tilstedeværende erythrocyter ligger i områder 125-800 hæmagglutinationshæmningsenheder pr. ml, hvorefter det herved opnåede produkt gøres opbevaringsholdbart ved tilsætning af et konserveringsmiddel dertil.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at erythrocyterne er hønse-erythrocyter.

Fremdragne publikationer:

FR patent nr. 2205571 (C 12 K 5/00)
Journal of General Microbiology, 84 (1974), side 135-144, G.W.Jones & J.M.Rutter: The Association of K88 Antigen with Haemagglutinating Activity in Porcine Strains of Escherichia coli.
Chemical Abstracts, bind 48 (1954), spalte 855 e, J.Bacteriol, 66 (1953) 424-8
The Veterinary Bulletin, bind 45, nr. 7 (1975), side 491, 3645, Veterinary Record, 96, nr.8 (1975), side 171-175.