



DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK
AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

PATENTSCHRIFT 129 805

Wirtschaftspatent

Bestätigt gemäß § 6 Absatz 1 des Änderungsgesetzes zum Patentgesetz

Int. Cl.³

(11) 129 805 (45) 28.05.80 3(51) A 61 K 39/12
(21) WP C 12 K / 196 832 (22) 06.01.77
(44)¹ 08.02.78

(71) siehe (72)

(72) Müller, Hans, VR Dr.med.vet.; Nostitz, Dietrich, Dr.med.vet.;
Schwarz, Harald, DD

(73) siehe (72)

(74) Dipl.-Jur. Erich Fritzsche, Institut für Impfstoffe Dessau,
4500 Dessau, Jahnstraße 8

(54) Verfahren zur Herstellung von Viruslebendimpfstoffen,
insbesondere Aujeszky-Lebendimpfstoff

¹⁾ Ausgabetag der Patentschrift für das gemäß § 5 Absatz 1 AndG zum PatG erteilte Patent

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Viruslebendimpfstoffen für den Einsatz gegen Viruskrankheiten.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Nach dem bisherigen Stand der Technik erfolgt die Virusvermehrung für die Impfstoffproduktion über Versuchstiere oder mit Hilfe von bebrüteten Hühnereiern oder mit Hilfe von Zellkulturen. Bei Zellkulturen werden Einschichtzellkulturen (Monolayer), Rollerkulturen oder Suspensionskulturen verwendet.

Einschichtzellkulturen bedingen den höchsten Aufwand an Arbeitszeit und Material. Eine intensive Kontrolle der Virusvermehrung durch mikroskopische Kontrolle ist möglich. Rollerkulturen ergeben die höchste Viruskonzentration im Erhaltungsmedium. Der Arbeitszeit- und Materialaufwand ist noch erheblich. Suspensionskulturen erfordern den geringsten Arbeitszeitaufwand. Echte Suspensionskulturen von Zellen mit Vermehrung der Zellen sind jedoch nur mit permanenten Zelllinien möglich. Für die Herstellung von

Lebendimpfstoffen sind permanente Zelllinien wenig geeignet, da die mögliche Übertragung von onkogenen Informationen über den Lebendimpfstoff auf den Impfling nicht auszuschließen ist. Diese bekannten technischen
5 Lösungen sind alle in MAYR et.al., Virologische Arbeitsmethoden, Band 1, VEB Gustav-Fischer Verlag Jena, 1974, zusammengefaßt.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, den hohen Material- und Arbeitszeitaufwand, wie er bei der Monolayer-Kultur und
10 auch bei der Rollerkultur auftritt, wesentlich zu senken.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Die Virusvermehrung in Monolayer- und in Rollerkulturen bedingt einen erheblichen Arbeitszeitaufwand, der in der Hauptsache durch hohe Stückzahlen an Glasgeräten und der damit verbundenen Arbeitsgänge, wie Waschen, Trock-
15 nen, Sterilisieren und Handhabungen (z.B. Einsaat) begründet ist.

Alle Versuche, primäre Zellen in Suspensionskultur zu vermehren, sind bisher fehlgeschlagen.

Erfindungsgemäß wurde nun festgestellt, daß man die Virusvermehrung in Suspension von Primärzellen durchführen
20 kann, wenn die Virusart eine ausreichende Virusvermehrung vor dem starken Absinken der Lebendzellzahl ermöglicht. Im Gegensatz zu den bekannten Verfahren, bei denen vor der Virusbeimpfung eine Anhaftung der Zellen auf
25 einer Unterlage (z.B. Glaswand der Gefäße) und nachfolgende Vermehrung der Zellen stattfindet (Monolayer- und Rollerkulturtechnik) bzw. eine Zellvermehrung (Suspensionskultur von permanenten Zelllinien) erfolgt, fällt
beim erfindungsgemäßen Verfahren die vorgenannte Phase
30 der Zellvermehrung (Mindestdauer 24 Stunden) weg.

Die zur Gewinnung der erforderlichen Virusmenge benötigte Zellmenge wird hierbei bereits mit der Zelleinsaat zugeführt. Mit als erfindungswesentlich muß angesehen werden, daß bei diesem Verfahren, in dem die Primärzellen in Suspension gehalten werden, eine Überlebenszeit der Primärzellen erreicht wird, die bei Virusarten mit kurzen Vermehrungszeiten, wie Aujeszky-Virus und Newcastle disease-Virus, eine für die Impfstoffproduktion ausreichende Virusvermehrung ermöglicht. Auf diese Weise wurde nun erstmalig die Virusvermehrung mittels Suspension von Primärzellen für die Impfstoffproduktion angewandt. Als Primärzellen finden Geflügelembryofibroblasten, insbesondere Hühnerembryofibroblasten Verwendung, weil diese technologisch gut zu handhaben und in für die Impfstoffproduktion erforderlicher Qualität in ausreichender Menge verfügbar sind.

Für die Virusvermehrung wird in ein Kultivationsgefäß, das mit einer Rührvorrichtung ausgerüstet ist, eine solche Zellmenge eingesät, daß eine Zellkonzentration von 1×10^6 bis 4×10^6 , vorzugsweise 3×10^6 Zellen/ml erreicht wird. Die Bebrütung erfolgt bei 37°C bei einem geregelten pH-Wert von 6,9 bis 7,3. Die Füllmenge des Kultivationsgefäßes darf 80 % des Gesamtvolumens nicht überschreiten. Die Virusbeimpfung erfolgt innerhalb von 30 min. nach der Zelleinsaat. Während der Virusvermehrungsphase wird die Sedimentation der Zellen durch ständiges Rühren des Nährmediums verhindert. Die Virusernte erfolgt 24 bis 48 Stunden nach der Beimpfung. Das Rohvirusmaterial wird in bekannter Weise weiterverarbeitet.

Ausführungsbeispiel 1

Ein 30-l-Fermentor mit Rühreinrichtung wurde mit 13,05 l Zellsuspension (Konzentration der Zellen $3 \times 10^6/\text{ml}$),

bestehend aus gepufferter Salzlösung nach HANKS unter Zusatz von 0,2 % Laktalbuminhydrolysat und 3 % Kälberserum, gefüllt. Als Zellen finden Hühnerembryofibroblasten Verwendung. 15 min. nach der Zelleinsaat wurde der
5 Ansatz mit 650 ml (Aujeszky-Virus) beimpft. Das Rohvirusmaterial lag dabei in einer Konzentration von $10^{5,5}$ KID₅₀/0,1 ml vor. Den Titerverlauf zeigt Tabelle 1:

Tabelle 1 - Vermehrung von AUJESZKY-Virus

Titerverlauf (Stunden nach der Beimpfung)	Konzentration (KID ₅₀ /0,1 ml)
27	$10^{7,0}$
43	$10^{6,5}$
50	$10^{6,0}$

Der pH-Wert lag während des Ansatzes zwischen 7,0 und 7,3. 50 Stunden nach der Beimpfung erfolgte die Virus-
10 ernte. Unter Zusatz von GS-4-Stabilisator wurde das Rohvirusmaterial lyophilisiert.

Ausführungsbeispiel 2

Ein 6 l-Glasfermentor mit Rührer wird mit 2 l Zellsuspension (Konzentration der Zellen 4×10^6 Zellen/ml), bestehend aus gepufferter Salzlösung nach HANKS mit 0,5 % Laktalbuminhydrolysat und 10 % Kälberserum, ge-
15 füllt. 30 min. nach der Einsaat wird mit 253 ml Newcastle disease-Virus (Titer $10^{5,33}$ KID₅₀/0,1 ml) beimpft. Bei einem pH-Wert von 7,4 wird folgender aus Tabelle 2 ersichtlicher, Titerverlauf beobachtet.

Tabelle 2 - Vermehrung von Newcastle disease-Virus

Titerverlauf (Stunden nach der Beimpfung)	Konzentration (KID ₅₀ /0,1 ml)
19	10 ^{6,33}
33	10 ^{5,67}
50	10 ^{5,33}

Die Virusernte erfolgt 50 Stunden nach der Beimpfung.
Unter Zusatz von GS-4-Stabilisator wird das Rohvirus-
material lyophilisiert.

Erfindungsanspruch

1. Verfahren zur Herstellung von Lebendvirusimpfstoffen, insbesondere Aujeszky-Lebendimpfstoff, dadurch gekennzeichnet, daß die Virusvermehrung in Suspension von Primärzellen unter Verhinderung der Zellsedimentation durch Flüssigkeitsbewegung bei einer Zellkonzentration der Primärzellen von 1×10^6 bis 4×10^6 , vorzugsweise 3×10^6 Zellen/ml sowie einer Virusbeimpfung spätestens 30 min. nach der Zellein-
5
10
saat und die Virusernte vor dem starken Absinken der Lebendzellzahl erfolgt.
2. Verfahren nach Punkt 1 dadurch gekennzeichnet, daß als Primärzellen Geflügelembryofibroblasten, vorzugsweise Hühnerembryofibroblasten, verwendet werden.
- 15 3. Verfahren nach Punkt 1 und 2 dadurch gekennzeichnet, daß die Virusvermehrung bei einer Füllmenge von maximal 80 % des Gesamtvolumens des Kultivationsgefäßes, bei einer Temperatur von 37° C und einem pH-Wert von 6,9 bis 7,3 erfolgt.