



(1) Ausschneßungspatent

(11) DD 291 007 A5

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1
Patentgesetz der DDR
vom 27. 10. 1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) A 61 K 39/39

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

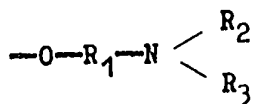
(21) DD A 61 K / 336 402 7 (22) 27. 12. 89 (44) 20. 06. 91

- (71) VEB Impfstoffwerk Dessau-Tornau, PF 214, O - 4500 Dessau, DE
- (72) Lukanoff, Brigitte, Dr. rer. nat.; Loth, Fritz, Dr. rer. nat.; Nostitz, Dietrich, Dr. med. vet.; Neubert, Andreas, Dipl.-Vet.-Med.; Gurk, Wolfhard, Dipl.-Vet.-Med., DE
- (73) VEB Impfstoffwerk O - 4500 Dessau-Tornau; Institut für Polymerenchemie „Erich Correns“, O - 1530 Teltow-Seehof, DE

(54) Verfahren zur Herstellung von Vakzinen mit erhöhter Wirksamkeit

(55) Inaktivierte Impfstoffe; Adjuvantien; Polysaccharidderivate; Newcastle Disease Virus; Virusimpfstoffe; Immunität; physiologische Verträglichkeit; pharmazeutisch-technischer Aufwand; Applizierbarkeit; Human- und Veterinärmedizin

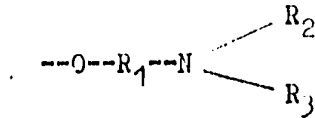
(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Vakzinen mit erhöhter Wirksamkeit und bezieht sich auf das Gebiet der Pharmazie. Die Aufgabe der Erfindung, mit Hilfe neuer Adjuvantien einen größeren Immunisierungseffekt bei Vakzinen zu erzielen, wurde dadurch gelöst, daß inaktiviertes Virus- oder Bakterienmaterial mit Polysaccharidderivaten, die funktionelle Gruppen der allgemeinen Formel



tragen, wobei R₁ = CH₂, C₂H₄, R₂ = H, CH₃, C₂H₅ und R₃ = H, CH₃, C₂H₅ bedeuten, zu pharmazeutischen Präparationen umgesetzt werden. Anwendungsgebiete der resultierenden Vakzine sind die Human- bzw. Veterinärmedizin sowie die Landwirtschaft (Tierproduktion).

Erfindungsanspruch:

1. Verfahren zur Herstellung von Vakzinen mit erhöhter Wirksamkeit durch Adjuvierung, **dadurch gekennzeichnet**, daß inaktivierte Virus- oder Bakterienmaterialien mit Polysaccharidderivaten umgesetzt werden, die funktionelle Gruppen der allgemeinen Formel



tragen, wobei $R_1 = \text{CH}_2, \text{C}_2\text{H}_4$, $R_2 = \text{H}, \text{CH}_3, \text{C}_2\text{H}_5$ und $R_3 = \text{H}, \text{CH}_3, \text{C}_2\text{H}_5$ bedeuten.

2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Polysaccharidderivate Produkte auf der Basis von Cellulose, Hemicellulose, Agarose oder Stärke verwendet werden.
3. Verfahren nach den Ansprüchen 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Substitutionsgrad der Polysaccharidderivate 0,05 bis 1,0 und der Polymerisationsgrad 20 bis 500 beträgt.
4. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Polysaccharidderivat Diethylaminoethylcellulose verwendet wird.
5. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß als inaktiviertes Virusantigen Rohvirusmaterial des Stammes „La Sota“ verwendet wird und der Virustiter vor der Inaktivierung $\geq 10^7 \text{ EID}/0,1 \text{ ml}$ beträgt.
6. Verfahren nach den Ansprüchen 1–4, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Polysaccharidderivat als 1–10%ige Lösung in physiologischer Kochsalzlösung sterilisiert wird, vorzugsweise durch Autoklavieren bei 121°C , und anschließend mit dem inaktivierten Virus- oder Bakterienmaterial im Volumenverhältnis 1:10 bis 10:1 vermischt wird.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Vakzinen mit erhöhter Wirksamkeit, die im Bereich der Human- oder Veterinärmedizin, der Pharmazie sowie in der Landwirtschaft (Tierproduktion) angewendet werden können.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Es ist bekannt, daß viele Virus- oder Bakterienantigene bei Injektion in einen Organismus keine meßbare oder nur eine geringe Immunantwort auslösen, so daß sie nicht ohne weiteres als Impfstoff verwendet werden können. Die antigene Wirksamkeit von viralen oder bakteriellen Materialien kann jedoch durch Zugabe von Adjuvantien verstärkt werden. In der Literatur sind zahlreiche Stoffe vorgeschlagen worden, die als Adjuvantien verwendet werden können. Am gebräuchlichsten sind bisher Aluminiumhydroxid, mineralische und pflanzliche Öle und Stoffwechselprodukte von Bakterien (THEIN, Vet. Med. Nachr. 59 [1988]). Sehr gute Adjuvanswirkungen werden durch Emulgieren von wäßrigen Antigenlösungen mit Mineral- oder Pflanzenölen erreicht. Solche Emulsionen, besonders Mineralölemulsionen, werden jedoch lokal schlecht vertragen. Nach Impfungen von Ölemulsionsvakzinen können makroskopische Veränderungen an den Impfstellen bis zur 28. Lebenswoche post vaccinationem wahrgenommen werden, was aus fleischbeschaulichen Gründen bei Nutztieren zu Reglementierungen führen kann. Weiterhin sind Ölemulsionsvakzinen verhältnismäßig viskös, wodurch der Umgang mit ihnen erschwert ist. Außerdem benötigt man für die Öle geeignete spezifische Emulgatoren. Unbefriedigend bei den meisten bekannten Adjuvantien ist allgemein ihre oft nur geringe Wirksamkeit oder eine ungenügende physiologische Verträglichkeit.

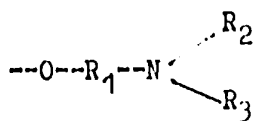
Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht daher darin, der pharmazeutischen Industrie zu human- oder veterinärmedizinischen Zwecken Vakzinen zugänglich zu machen, die sich durch eine erhöhte Wirksamkeit und eine gute physiologische Verträglichkeit auszeichnen. Gleichzeitig ist der pharmazeutisch-technische Aufwand ihrer Herstellung zu minimieren und eine gute Applizierbarkeit zu gewährleisten.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zu entwickeln, das mit Hilfe neuer Adjuvantien zu Vakzinen mit erhöhter Wirksamkeit führt, d. h. bei gleicher Antigenmenge eine bessere Immunisierung als ohne Adjuvans bzw. mit herkömmlichen Adjuvantien erfolgt.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß inaktivierte Virus- oder Bakterienmaterialien mit sterilisierten Lösungen von Polysaccharidderivaten vermischt werden, die funktionelle Gruppen der allgemeinen Formel



tragen, wobei $R_1 = \text{CH}_2, \text{C}_2\text{H}_4$, $R_2 = \text{H}, \text{CH}_3, \text{C}_2\text{H}_6$ und $R_3 = \text{H}, \text{CH}_3, \text{C}_2\text{H}_6$ bedeuten. Als Polysaccharidderivate können beispielsweise Produkte auf Basis von Cellulose, Hemicellulose, Agarose und Stärke verwendet werden, wobei der Gehalt an funktionellen Gruppen pro Polysaccharidgrundbaustein 0,05 bis 1,0 betragen sollte. In besonderem Maße geeignet erwies sich dabei Diethylaminoethylcellulose. Der Polymerisationsgrad der erfindungsgemäßen Polysaccharidderivate kann in weiten Grenzen variiert werden, sollte jedoch 500 nicht überschreiten, damit die Viskosität der resultierenden Vakzine nicht zu groß wird. Als günstig erwiesen sich Produkte mit einem Polymerisationsgrad zwischen 20 und 400, insbesondere jedoch zwischen 50 und 300. Für die Herstellung des Impfstoffes geht man vorteilhafterweise von einer 1- bis 10%igen Lösung des Polysaccharidderivates in physiologischer Natriumchloridlösung aus, die zunächst sterilisiert wird, beispielsweise durch Autoklavieren bei 121°C. Anschließend wird das inaktivierte Virus- oder Bakterienmaterial mit der Adjuvanslösung in einem solchen Verhältnis vermischt, daß die Adjuvanskonzentration im Impfstoff 0,5 bis 5% beträgt. Die Applikation des Impfstoffes erfolgt in Dosen von 0,2 bis 2 ml, die jeweils 2 bis 20 mg Adjuvans enthalten. Die erfindungsgemäß hergestellten Impfstoffe zeichnen sich durch sehr gute allgemeine und lokale Verträglichkeit, gute Applizierbarkeit, eine hohe Antikörperbildung und damit auch hohe Schutzwirkung aus. Die vorgeschlagenen Adjuvantien sind durch eine verstärkende Wirkung des Antigens, Unschädlichkeit für den Impfling und einfache Zubereitung bzw. Anwendung charakterisiert. Zwar ist bekannt, daß verschiedene Polysaccharide immunstimulierende Eigenschaften besitzen, die vor allem auf die β -1,3- und β -1,6-Verknüpfungen von Glucosebausteinen zurückgeführt werden, und auch bestimmte Voraussetzungen hinsichtlich Molekulargewicht und Löslichkeit gegeben sein müssen, doch war auf Grund dieser Kenntnisse nicht zu erwarten, daß die erfindungsgemäß als Adjuvantien vorgeschlagenen Polysaccharidderivate einen besonderen immunstimulierenden Effekt besitzen. Vielmehr hat sich gezeigt, daß vergleichsweise untersuchte Lösungen von Hydroxyethylcellulose und von Natriumcarboxymethylcellulose keine positive Wirkung zeigen. Die Erfindung soll anhand der nachfolgenden Beispiele näher erläutert werden.

Ausführungsbeispiel

Herstellung einer inaktivierten Vakzine gegen Newcastle Disease (ND) der Hühner

Für die Herstellung von Impfstoffmustern wurde Rohvirusmaterial des Stammes „La Sota“, inaktiviert mit 0,1% Formalin, verwendet. Der Virustiter betrug vor der Inaktivierung $10^{8,1}$ EID₅₀/0,1 ml. Pro Impfdosis wurde eine Virusmenge von 80 µl verwendet.

Adjuvanzubereitung: Es wurde eine 5%ige Lösung aus Diethylaminoethylcellulose hergestellt, indem 5 g der Trockensubstanz mit 100 ml physiologischer Kochsalzlösung aufgeköcht und anschließend 30 Minuten bei 121°C autoklaviert wurde. Die verwendete Diethylaminoethylcellulose wurde durch homogene Umsetzung von Regeneratcellulose mit 2-Chlorethyl-diethylamin-Hydrochlorid in 10%iger Natronlauge hergestellt und anschließend durch Fällung mit Ethanol isoliert. Das Produkt besitzt einen Substitutionsgrad an Diethylaminoethylgruppen von 0,4 und ist wasserlöslich. Der Polymerisationsgrad beträgt ca. 220.

Die Impfstoffherstellung erfolgte, indem 120 ml inaktiviertes Virusmaterial mit 80 ml Adjuvanslösung vermischt wurden. Die Adjuvanskonzentration beträgt somit 2% im Impfstoff, d. h., in 0,5 ml Impfstoff (1 Impfdosis) sind 10 mg des Adjuvans enthalten.

Wirksamkeitsprüfung:

Die Immunisierung von Küken erfolgte im Alter von 31 Tagen mit einer Impfdosis pro Tier. 3 Wochen später wurde eine Testinfektion mit einem velogenen ND-Stamm durchgeführt. Der Versuch wurde 14 Tage nach der Infektion beendet. Die Wirksamkeitsprüfung wurde nach dem Kriterium der Schutzrate (gesund überlebende Tiere) und der serologischen Reaktion (Hämagglutinationshemmungsreaktion) bewertet.

Es wurden mehrere Vakzinen zur Wirksamkeitsprüfung eingesetzt.

Schutzraten nach Testinfektion

Vakzine	geschützt/ gesamt	Schutzrate %	Konfidenz bereich $p = 0,05$
1. ND-Vakzine mit DEAE-Cellulose als Adjuvans	26/26	100	86,77–100
2. ND-Vakzine ohne Zusatz von Adjuvans	18/26	69,23	48,21–85,67
3. ND-Adsorbatvakzine „Dessau“®	17/26	65,4	44,33–82,79
4. Kontrollen (keine Immunisierung)	0/15	0	0–21,80

Ergebnis der serologischen Untersuchung

Vakzine	\bar{x} TKZ vor Immunisie- rung	\bar{x} TKZ 20 Tage nach Immun.	\bar{x} TKZ 14 Tage nach Infektion
1. ND-Vakzine mit DEAE-Cellulose als Adjuvans	0	7,25	7,33
2. ND-Vakzine ohne Adjuvans	0	2,88	10,75
3. ND-Adsorbatvakzine „Dessau“*	0	3,82	8,5
4. Kontrollen (keine Immunisierung)	0	0	n. u.

TKZ = Titerkennzahl	ohne Titer	0
	1:1	1
	1:2	2
	1:4	3

\bar{x} TKZ = arithmetisches Mittel der Titerkennzahl

n. u. = nicht untersucht