



⑫ A **Terinzagelegging** ⑪ **8301996**

Nederland

⑲ NL

-
- ⑤4 **Werkwijze ter bereiding van geadjuveerde levende vaccins en aldus verkregen geadjuveerde levende vaccins.**
- ⑤1 Int.Cl.³: A61K39/00, A61K47/00.
- ⑦1 Aanvrager: Duphar International Research B.V. te Weesp.
- ⑦4 Gem.: Drs. E.J. Mebius c.s.
Octrooibureau ZOAN B.V.
Apollolaan 151
1077 AR Amsterdam.

-
- ②1 Aanvraag Nr. 8301996.
- ②2 Ingediend 6 juni 1983.
- ③2 --
- ③3 --
- ③1 --
- ⑥2 --

-
- ④3 Ter inzage gelegd 2 januari 1985.

De aan dit blad gehechte stukken zijn een afdruk van de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en).

Werkwijze ter bereiding van geadjuveerde levende vaccins en aldus verkregen geadjuveerde levende vaccins.

De uitvinding heeft betrekking op een werkwijze ter bereiding van levende vaccins en op de aldus verkregen levende vaccins.

Bekend is dat levende geattenuerde virussen over het algemeen minder immunogeen zijn dan het oorspronkelijke virulente virus waar ze van zijn afgeleid. Het attenueren is bedoeld om de virulentie op te heffen of in elk geval zo sterk te verminderen, dat het aldus verzwakte virus veilig kan worden toegediend. Echter, dit attenueren heeft door-
gaans ook een verminderde immunogene werking tot gevolg.

In de regel worden levende virusvaccins gevriesdroogd, teneinde de infectiositeit te stabiliseren, waardoor een dergelijk levend vaccin langer houdbaar is. Vóór toediening wordt een levend vaccin opgelost, bijvoorbeeld in een fysiologische zoutoplossing of soms in een geïnactiveerd vaccin. Zo'n geïnactiveerd vaccin is bijna steeds een $Al(OH)_3$ geadsorbeerd vaccin. Alleen op praktische gronden wordt zo'n levend virusvaccin gecombineerd met een geïnactiveerd vaccin; beide kunnen nu immers gelijktijdig worden toegediend. Van een betere werkzaamheid van de levende component in zo'n combinatie is in de regel geen sprake.

Tot nu toe werd aangenomen dat met levende vaccins een hogere immunoresponsie was te bereiken door bijvoorbeeld het virusgehalte te verhogen, of door een meer immunogene stam te gebruiken.

Verrassenderwijze werd nu gevonden, dat het gebruik van een olie-in-water (o/w) emulsie als "oplosmiddel" voor levende vaccins een sterk positief effect heeft op de serologische respons in de gevaccineerde dieren. Bij deze olie-in-water emulsie bevindt de waterfase zich aan de buitenzijde en hierin kan het gevriesdroogde levende vaccin gemakkelijk worden opgelost.

De oliephase van de volgens de uitvinding te gebruiken emulsie is een minerale olie, bijvoorbeeld Marcol[®] of Drakeol[®].

De hoeveelheid olie in de emulsie ligt gewoonlijk tussen 15 en 50 vol.%, bij voorkeur 20 - 30 vol.%.

De te gebruiken emulsie kan op gebruikelijke

wijze worden verkregen onder toepassing van voor dit doel geschikte emulgatoren.

De uitvinding wordt onderstaand toegelicht aan de hand van enkele experimenten met een levend geattenuëerd Aujeszky-vaccin op basis van de Bartha stam.

Het is bekend dat de Bartha stam niet erg immunogeen werkzaam is, vooral bij biggen die nog over matернаal verkregen antilichamen beschikken. Ook een verhoogd virusgehalte van dit vaccin bleek niet in staat een voldoende hoge serumtiter te bewerkstelligen.

Door toepassing van een olie-in-water emulsie volgens de uitvinding werd met hetzelfde virusmateriaal een verrassend hogere serologische response verkregen.

VOORBEELD I

Aangezien een belangrijk toepassingsgebied van levende Aujeszky vaccins ligt in de vaccinatie van jonge mestvarkens die nog een maternale antilichaam-titer ten opzichte van de ziekte van Aujeszky bezitten is een vergelijkende serologische proef opgezet met gebruikmaking van deze dieren. De resultaten hiervan zijn samengevat in tabel A.

25

30

35

TABEL A

Gemiddelde serumneutralisatie (SN)-titers vóór en ná vaccinatie met het Bartha vaccin, opgelost in fysiologisch zout of in een 25%-o/w emulsie.

vaccin type	groep	leeftijd bij vaccinatie	Aantal dieren	2 weken voor vacc.	dag van vaccin.	Aantal weken na vaccinatie				
						2	4	6	8	10
Fysiol. zout	I	18 w	6	3,8	1,6	7,3	10,8	-	-	-
	II	16 w	6	9,1	1,6	11,5	5,8	-	-	-
	III	14 w	8	4,3	1,3	5,3	6,1	4,5	-	6,8
o/w emulsie	IV	14 w	8	4,5	2,3	16,2	18,9	22,9	-	47,3
	V	11 w	8	23,8	6,6	11,7	13,4	19,4	29,4	-

- = niet uitgevoerd

TABEL B

Gemiddelde SN-titers vóór en ná 1e en 2e vaccinatie met het Bartha vaccin opgelost in een 25%-o/w emulsie en het zelfde vaccin opgelost in fysiologische zoutoplossing.

vaccin type	groep	aantal dieren	leeftijd bij 1e vaccinatie (weken)	SN-titer vóór 1e vaccinatie	aantal weken na 1e vaccinatie				
					2	4	8	10	12
Fysiol. zout	VI	6	12	6,3	6,3	6,3*	63	-	-
o/w emulsie	VII	4	11	5,8	11,6	20,3	54*	7080	3928
	VIII	4	11	4,9	10,3	22,5	23*	4623	3012

- = niet uitgevoerd

* = moment van 2e vaccinatie

Bloedmonsters voor de antilichaamtiter bepaling werden genomen 2 weken vóór vaccinatie, op de dag van vaccinatie en op verschillende weken ná vaccinatie zoals vermeld in tabel A.

5 Uit de SN-titers vermeld in tabel A blijkt het volgende:

- Het Bartha vaccin in fysiologische zout is niet in staat een bevredigende serologische response op te wekken zelfs bij dieren die slechts een zeer lage maternale immuniteit bezitten (1,3 - 1,6). Deze dieren waren op het moment van
10 vaccinatie 14 - 18 weken oud.
- Het Bartha vaccin in o/w emulsie daarentegen geeft goede serumtiters, bij toediening aan biggen met een maternale immuniteit van 2,3 of 6,6. Deze dieren waren bij vaccina-
15 tie 11 of 14 weken oud.

VOORBEELD II

Een ander toepassing gebied ligt in de vaccinatie van zeugen. De bruikbaarheid wordt hier in hoofdzaak bepaald door de bereikte titerhoogte in het moederdier omdat alleen dan ga-
20 ranties te geven zijn over een voldoende lang aanhoudende maternale immuniteit ten opzichte van de ziekte van Aujeszky bij de nakomelingen.

Uitgaande van matернаal immune dieren is een vergelijking gemaakt tussen het Bartha vaccin, opgelost in fysiologische zoutoplossing en het zelfde vaccin opgelost in 25% o/w emul-
25 sie. Beide vaccins werden twee keer toegediend.

TABEL B - zie pagina 3

30 Uit tabel B blijkt opnieuw dat het Bartha vaccin in o/w formulering bij de eerste vaccinatie aanmerkelijk beter door de maternale immuniteit heen breekt en dat het zelfde vaccin opgelost in fysiologische zoutoplossing in deze matернаal immune dieren na één vaccinatie geen enkele
35 serologische response teweeg brengt.

Ook na de tweede vaccinatie is sprake van een duidelijk verschil tussen de beide formuleringen: met het Bartha vaccin in fysiologische zoutoplossing wordt slechts een 10-voudige

titerstijging bereikt; met het Bartha vaccin in o/w emulsie bedraagt de titerstijding het 130 tot 200-voudige.

Volgens een tot de uitvinding behorende variant kan men in plaats van het levende vaccin op te nemen in de o/w emulsie als zodanig, dit levende vaccin ook opnemen in een geïnactiveerd vaccin dat de o/w emulsie bevat. Dit wordt beschreven in voorbeeld III.

VOORBEELD III

Hier is gebruik gemaakt van een gecombineerd Aujeszky-influenza-vaccin.

Het influenza-vaccin voor varkens is een geïnactiveerd vaccin, gebaseerd op een o/w emulsie. Het gevriesdroogde Bartha vaccin wordt hierin vlak vóór gebruik opgelost.

Voor dit experiment werd gebruik gemaakt van biggen, die geen maternale antilichamen meer hebben ten opzichte van de ziekte van Aujeszky om een mogelijk negatieve invloed van de influenza komponent op het Bartha-vaccin beter te kunnen bestuderen. De hoeveelheid influenzavirus per dosis werd gevarieerd en wordt omschreven als "hoog", "middel" en "laag".

20

TABEL C

Gemiddelde Aujeszky SN-titers na 1 of 2 maal vaccineren met het Aujeszky-influenza-vaccin op o/w basis.

influenza dosering	aantal vaccinaties	aantal dieren	SN-titer 8 wk na 1e vaccin.	SN-titer 2wk na 2e vaccin.
"hoog"	2 x	4	195*	3016
	1 x	3	159	132
"middel"	2 x	4	116*	3887
	1 x	3	112	58
"laag"	2 x	4	107*	3887
	1 x	3	113	103

* deze dieren kregen 8 weken na de eerste vaccinatie, de tweede vaccinatie toegediend.

35

Uit tabel C blijkt duidelijk dat de aanwezigheid van geïnactiveerd influenza virus in de o/w emulsie geen

nadelig effect heeft op de resultaten van de levende Aujeszky
komponent. Zowel de serologische response na 1- als ná 2-
maal vaccineren is buitengewoon goed.

5 In verschillende proeven werd de lichaamstempe-
ratuur van de dieren gemeten van 1 dag vóór tot en met 3
dagen ná vaccinatie. Op geen enkel tijdstip ná vaccinatie
werd bij de dieren, gevaccineerd met de o/w formulering een
verhoogde temperatuur waargenomen. Ook werden er geen lokale
entreacties geconstateerd. Het levende vaccin in een o/w
10 formulering is derhalve als veilig te beschouwen.

15

20

25

30

35

CONCLUSIES:

1. Werkwijze ter bereiding van een levend vaccin, met het kenmerk, dat men een geadjuveerd levend vaccin bereidt met behulp van een olie-in-water emulsie.

5 2. Werkwijze volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat men een geadjuveerd levend Aujeszky-vaccin bereidt.

3. Werkwijze volgens conclusie 2, met het kenmerk, dat men een geadjuveerd levend Aujeszky-vaccin op basis van de Bartha-stam bereidt.

10 4. Werkwijze volgens conclusies 1-3, met het kenmerk, dat men het levende vaccin opneemt in een geïnactiveerd vaccin dat de olie-in-water emulsie bevat.

5. Werkwijze volgens conclusie 4, met het kenmerk, dat men het levende vaccin opneemt in een geïnactiveerd influenza vaccin dat de olie-in-water emulsie bevat.

15 6. Werkwijze voor het vaccineren van dieren met een levend vaccin, met het kenmerk, dat men een vaccin volgens conclusie 1 toepast.

20

25

30

35