



AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP A 61 K / 301 465 0	(22)	03.04.87	(44)	14.06.89
------	-----------------------	------	----------	------	----------

(71)	Forschungsinstitut für Lungenkrankheiten und Tuberkulose, Karower Straße 11, Berlin, 1115, DD
(72)	Nordheim, Willy, Dr. habil. Dipl.-Ing.; Bräuniger, Siegfried, Dr. Dipl.-Biol.; Teupel, Doris; Werchan, Dietmar, Dr.; Starke, Günther, OMR Prof. Dr. sc.; Petzold, Günter, Dr. Dipl.-Chem.; Nordheim, Regina; Tischner, Hartmut, Dr.; Luther, Peter, Dr. sc. Dipl.-Landw.; Noack, Klaus, Dipl.-Biol., DD

(54)	Verfahren zur besseren Herstellung lokal biologisch wirkender Präparate
------	---

(55) Antioxidantien, Aseptik, Bakteriophagen, Biopräparate, Detergenzien, Immunpräparate, Inaktivierung, Lyophilisation, Mikroorganismen, Pharmaka, pH-Wert, Redoxpotential, Säureresistenz, Stabilisierung, Viren

(57) Die Erfindung bezieht sich auf die bessere Herstellung von Pharmaka einschl. Immun- oder anderer Biopräparate unter bes. Berücksichtigung einer spezifischen lokalen biologischen Wirkung. – Die Reihenfolge der aseptischen Verfahrensstufen und der Zusatz von Substanzen werden so kombiniert, daß die Präparate in eine verbesserte Wirkungsform gebracht werden. Das wird im Falle der Herstellung von Inaktivimpfstoffen u. a. durch optimale Einordnung der Inaktivierung, kombinatorische Zugabe komplexer Stabilisatoren/Trägerstoffe/Verschnittmittel/Antioxidantien und/oder pH- und rH-Korrektur, rechtzeitige Konservierung durch Lyophilisation, Einlagerung in luft-, wasser- und säureresistente Schichten im Wechsel mit nichtresistenten Schichten und nicht zuletzt durch Detergenzien erreicht. Diese Verfahrensweise kann auf aktive Formen von Mikroorganismen einschl. Viren, Bakteriophagen und auch andere aktive Lebensformen übertragen und auf die Ineinanderschichtung von Grenzschichten mit unterschiedlicher pH-, rH-, enzymatischer oder gegebenenfalls thermischer Stabilität ausgedehnt werden.

Erfindungsanspruch:

1. Verfahren zur besseren Herstellung lokal biologisch wirkender Präparate, **gekennzeichnet dadurch**, daß während des Herstellungsganges die Reihenfolge und die äußeren Bedingungen der Verfahrensstufen so kombiniert/variiert werden, daß die natürlichen Eigenschaften der Präparate nicht nur erhalten, sondern in eine verbesserte Wirkungsform gebracht werden, und zwar durch veränderte Maßnahmen mit biologischen/chemischen/biochemischen/physikalischen/physikochemischen Mitteln in der Weise, daß beispielsweise im Falle der Herstellung von oral anzuwendenden Virusimpfstoffen, so unter anderem Oralimpfstoffen gegen Influenza, die nach bekannten Methoden aseptisch gewonnenen Virussuspensionen mit Thiomersal zwischen 1:10 000 bis 1:40 000 versetzt werden, durch Einordnung des Inaktivierungsschrittes bei 2–5°C mit Chemikalien, zum Beispiel mit minimal 1:40 000 HCHO über einen Tag, und zusätzlich mit Gammastrahlen bei max. 10 kGy und bei Temperaturen bis max. 20°C oder durch andere physikalische, chemische oder biochemische Maßnahmen, beispielsweise mit Mikrowellen, mit mehrwertigen Aldehyden, Alkoholen oder mit Enzymen, durch kombinatorische Zugabe komplexer Stabilisatoren, beispielsweise 5 Vol.-% Milch mit 2% Fett und 3,5 Vol.-% Gelatine (5%ig), und/oder durch pH-Wert-Verschiebung des virushaltigen Mediums auf 6,8–7,1, durch gezielte Beeinflussung der Redoxverhältnisse des virushaltigen Mediums durch z. B. l-Ascorbinsäure (bis 30 mg/l), Cystein (bis 0,3%), Glutathion (red.) (bis 0,5%), schweflige Säure (bis 5 mg/l) oder durch spezifische Beschwerungsstoffe aus den Viruszüchtungs substraten oder andere natürliche Quellen (z. B. Malzwürze), durch zusätzliche Spaltung der Influenzaviren mit Chemikalien, z. B. Salze der Desoxycholsäure (bis 0,25%) oder Sulfobetaine (bis 0,2%), in Verbindung mit einer rechtzeitigen Konservierung der Präparate durch Lyophilisation bei –25°C bis max. +25°C und durch Einlagerung (Kapseln, Preßlinge, Granulat) in eine luft-, wasser- und säureresistente Schicht, aus beispielsweise Celluloseacetatphthalat mit Hilfe eines Weichmachers und organischen Lösungsmitteln unter ständiger Bewegung bei gleichmäßigem Luftstrom vorgenommen, verfahren wird, oder in Anlehnung an die obigen Maßnahmen auch andere Viren oder andere native oder gentechnisch modifizierte Mikroorganismen wie zum Beispiel Zellen der Gattungen *Saccharomyces*, *Endomyces*, *Endomycopsis*, *Pichia*, *Hansenula*, *Debaryomyces*, *Candida*, *Torulopsis*, *Kloeckera* oder *Rhodotorula* oder der Gattungen *Methanomonas*, *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Microbacterium*, *Propionibacterium*, *Escherichia*, *Aerobacter*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Pediococcus* oder *Bacillus*, die Hämagglutinine oder andere Biopolymere bzw. Substanzen mit antigenen/immunogenen bzw. anderen Wirkeigenschaften synthetisieren und/oder exprimieren, eingesetzt werden.
2. Verfahren nach Anspr. 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß als weitere Träger- und Schutzstoffe oder als Verschnittmittel und zum Teil als Antioxidantien in flüssigen Ansätzen bzw. Trockenprodukten Albumine oder Hydrolysate daraus wie Humanserumalbumin (0,02–2%), Lactalbumin (0,02–7,5%), Pferdeserumalbumin (0,02–2%) oder Rinderserumalbumin (0,02–2,5%), Aminosäuren-Peptid-Zucker-Gemische, wie z. B. Glutamat als Mononatrium-L-Glutamat (bis 2%) in Saccharose-Glucose-Lösungen oder in Maltose-Glucose-Lösungen bzw. in weiteren Lösungen mit Glutamin (bis 5%) und Glutathion (bis etwa 1%), oder Aminosäuren allein oder in Gemischen wie Alanin, Arginin, Asparaginsäure, Cystin, Glycin, Histidin, Hydroxyprolin und Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Threonin, Tyrosin und/oder Valin (in Anteilen von 0,05–15%), Alkali- und Erdalkalitionen bis zur 50%igen Sättigungskonzentration, mehrwertige Alkohole wie z. B. Galactit, Glucit, Mannit (bis 5%), Gelatine bzw. Hydrolysate oder Teilhydrolysate, zum Teil auch in Gemischen mit Zucker oder Aminosäurezubereitungen (in Anteilen bis zu 7,5 Gewichtsanteilen), Phosphate, z. B. als Monokalium- oder Dikaliumphosphate (bis 1%), Natriumphosphate bzw. entsprechende Phosphatpuffer, Glutaminphosphat oder Gemische von Phosphaten mit Aminosäuren, Peptiden bzw. Polypeptiden oder Proteinen oder Kohlenhydraten oder auch Verwendung weiterer Pufferlösungen wie z. B. Acetatpuffer (pH 5,8–7,2), Citratpuffer oder spezifische Polypeptid-Gemische (mit Mol.-Gew. zwischen 5000–>250 000) in differenzierten Anteilen bis zu 10%, weitere Proteine wie Caseine (0,01–5%) bzw. Casein-Hydrolysate (0,1–5%), Lactoglobuline, Mono-, Di-, Tri-, Tetra-, Polysaccharide oder in Gemischen in Anteilen bis zu 15%, wie z. B. Fructose, Galactose, Glucose, Lactose, Maltose, Mannose, Saccharose und Dextrane mit unterschiedlichen Mol.-Gew. (bis 10%) oder andere Polysaccharide (bis 5%) oder diese Substanzen in entsprechenden Mischungen bzw. Kombinationen untereinander, einschließlich des Einsatzes von Polyalkylenglycolen und von Alkalimetallsalzen von Ethylendiamintetraessigsäure,

Polyvinylpyrrolidon bis 12 Gew.-%, polyhydricem Alkohol, polymerisiertem Polyoxyethylenglycol oder Hydrolysaten oder Extrakten aus Mikroorganismen, besonders von Hefen, oder von Teil- oder Vollextrakten aus anderen Naturprodukten oder chemisch synthetisierten Substanzen.

3. Verfahren nach den Anspr. 1 und 2, **gekennzeichnet dadurch**, daß bei oralen Impfstoffen auch zusätzlich noch Detergenzien, wie zum Beispiel Desoxycholate, in das Lyophilisat eingebracht werden können.
4. Verfahren nach Anspr. 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß durch Milchinhaltsstoffe bei Impfstoffen eine besondere stabilisierende und wirkstoffverstärkende Funktion im Herstellungsgang und nach Verabreichung erreicht wird, z. B. höhere Antigenausbeuten und Auslösung zusätzlicher unspezifischer Abwehrmechanismen.
5. Verfahren nach den Anspr. 1 und 2, **gekennzeichnet dadurch**, daß im Falle der Anwendung aktiver Formen von Mikroorganismen einschl. Viren alle inaktivierenden Maßnahmen einschl. des Einsatzes von Detergenzien zu umgehen sind, die Stabilisierungs- und sonstigen Maßnahmen über beizubehalten sind.
6. Verfahren nach Anspr. 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß neben luft-, wasser- und säureresistenten Grenzschichten auch Grenzschichten mit unterschiedlicher rH-, enzymatischer oder bedingt thermischer Stabilität Verwendung finden können und für deren Herstellung sowohl anorganische als auch organische Substanzen eingesetzt werden und in diese Grenzschichten sowohl inaktive Antigene, entsprechende Wirkstoffgemische, Biostatika usw. als auch lebende Mikroorganismen einschl. Viren bzw. Bakteriophagen oder andere aktive Lebensformen oder zum Beispiel Enzyme und die daraus sich ergebenden Kombinationen eingebracht werden können.
7. Verfahren nach den Anspr. 1, 2, 3, 5 und 6, **gekennzeichnet dadurch**, daß durch ineinanderschichtung von Grenzschichten mit unterschiedlicher pH-, rH-, enzymatischer oder ggf. thermischer Stabilität unterschiedliche Barrieren überwunden werden und damit unterschiedliche lokale Freisetzungen für die Wirkstoffe erreicht werden.
8. Verfahren nach Anspr. 6, **gekennzeichnet dadurch**, daß im Falle von Bakteriophagen vorrangig eine Lyse von pathogenen Bakterien erreicht werden soll.
9. Verfahren nach den Anspr. 1 bis 3, **gekennzeichnet dadurch**, daß von den Mikroorganismen synthetisierte Substanzen aus den Gemischen gewonnen und gereinigt und z. B. zu Impfstoffen in stabilisierter Form für subcutane oder intramuskuläre Applikationen konfektioniert werden.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur besseren Herstellung lokal biologisch wirkender Präparate, und zwar durch Maßnahmen, daß unphysiologische Milieubedingungen bzw. Barrieren überwunden werden.

Die Anwendung bezieht sich auf die Herstellung von Bioprodukten in Form von Pharmaka einschl. Immunpräparaten oder anderen Biopräparaten für die Human- und Veterinärmedizin.

Die Anwendung ist möglich für Betriebe, die Produkte auf biotechnologischem oder chemischem Wege erzeugen.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Produkte mit hohen Werteigenschaften (z. B. Antigene als Impfstoffe, empfindliche Pharmaka) sind im allgemeinen in ihrer Herstellung aufwendig und damit teuer. In Relation zu den hohen Herstellungskosten ist oft der gewünschte Wirksamkeitseffekt zu gering, da eine vorzeitige Zerstörung bzw. zu früher Abbau vor Beendigung des Produktionsprozesses und darüber hinaus vor Erreichung des entsprechenden biologischen Lokalisationsortes durch das entsprechende Produkt erfolgt. Das liegt daran, daß bei der Herstellung unzureichend Maßnahmen angewendet werden, die den gesamten Herstellungsgang in Verbindung mit der vorgesehenen Applikationsbestimmung des Produktes komplex berücksichtigen.

Im DD-WP 229031 sind speziell für die Herstellung von Oralimpfstoffen Maßnahmen dargelegt und weitere Hinweise gegeben, die aber nicht die gegenseitig voneinander abhängigen Vorteile für die Herstellung lokal biologisch wirkender Präparate umfassen.

Ziel der Erfindung

Es ist das Ziel der Erfindung, solche Handlungsweisen anzuwenden, daß spezifisch lokal wirkende Biopräparate hergestellt werden können, die vom Beginn der biotechnologischen oder chemischen Produktion bis zur Endkonfektionierungsform auf eine maximale Wirksamkeit ausgerichtet sind und damit auch gute Applikationseigenschaften besitzen und damit außerdem zum Beispiel der human- und veterinärmedizinischen Praxis Maßnahmen in die Hand geben, um eine gezielte Prophylaxe und Therapie durchzuführen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur besseren Herstellung lokal biologisch wirkender Präparate zu entwickeln. Die Aufgabe wird dadurch gelöst, daß während des Herstellungsganges die Reihenfolge der Verfahrensstufen und der notwendige Zusatz von Substanzen so kombiniert wird, daß die natürlichen Eigenschaften der Endpräparate nicht nur erhalten, sondern auch in eine verbesserte Wirkungsform gebracht werden. Es wird hierbei auch auf eine multivalente Varianz orientiert, um gegenseitige Optimierungen bei der Herstellung des Produktes mit den einzusetzenden Stoffen und anzuwendenden Maßnahmen von vornherein zu erreichen.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

Die Herstellung eines lokal biologisch wirkenden Influenzavirus-Oralimpfstoffes (inaktiviert) erfolgt in Reinen Räumen mit Laminar-flow-Einrichtung und von der Beimpfung der Bruteier bis zum Finalbulk unter aseptischen Bedingungen.

Nur Hühnereier aus Beständen, die sich unter regelmäßiger veterinärmedizinischer Überwachung befinden, werden für die Impfstoffherstellung eingesetzt. Die Eier werden 10–11 d bei 37,5–38°C und 60–70% rel. Feuchte bei ausreichender Belüftung bebrütet. Beim Schieren der Eier sind die Luftsackgrenzen zu markieren.

Die Schalen der Bruteier werden mit 0,5 Vol.-% Wofasteril desinfiziert und mit einer sterilen Präpariernadel punktförmig oberhalb der Luftsackgrenze geöffnet. 0,1 ml einer Virusverdünnung, die mind. die 100fache EID₅₀ enthält, wird verimpft. Die Bereitung der Verdünnungsstufen erfolgt unter Zusatz von 0,1 mg/ml Neomycin.

Die gemäß Stammpaß nachbebrüteten Eier werden (20 ± 4) h bei (4 ± 1)°C gekühlt, um die Embryonen abzutöten und Blutungen in die virushaltige Allantoisflüssigkeit bei der Entnahme zu vermeiden. Die desinfizierten Eischalen werden oberhalb des Luftsackes mit einer sterilen Schere entfernt und die klare Allantoisflüssigkeiten mittels einer Pumpe in 500-ml-Infusionsflaschen abgesaugt. Die Allantoisflüssigkeit wird in diesen Flaschen in einer Kühlzentrifuge 30 min bei etwa 1 000 g zentrifugiert und durch Dekantieren von groben Verunreinigungen befreit. Vor der Zugabe von Thiomersal bis zu einer Konzentration von mind. 0,025 mg/ml wird von jeder Infusionsflasche eine Probe zur Prüfung der Sterilität und des Hämagglutinititers entnommen. Die Lagerung der Allantoisflüssigkeit erfolgt bei Temperaturen zwischen (2–5)°C.

Die Inaktivierung erfolgt durch Einwirkung von HCHO 1:15/20 000 bei 2–3°C über 2 d und Gammastrahlen bis 10 kGy bei Raumtemperatur.

Der Inhalt jeder Infusionsflasche wird zu 3 × 150 ml auf weitere Flaschen aufgeteilt. Als Stabilisator dient ein Gemisch aus 5 Vol.-% H-Milch (TGL 35812) und 3,3 Vol.-% Gelatinelösung (5%ig).

Vor der Lyophilisation ist durch kontinuierliches Drehen der Behälter ein gleichmäßiges Einfrieren bei etwa –40°C zu gewährleisten.

Die Lyophilisation wird in einer kommerziellen Anlage entsprechend den Bedingungen für empfindliche Wirkstoffe bzw. Nährmedien bei –25 bis max. +25°C durchgeführt.

Die Lyophilisation verlief normal, wenn nach dem Schütteln ein pulveriges, gelbweißes Produkt entsteht. Je 150 ml Allantoisflüssigkeit + Stabilisator ergeben 2,5–3,0 g Lyophilisat.

Die resultierenden Lyophilisate werden zu einem „Monobulk“ zusammengefügt und bei 2–5°C vor Licht geschützt aufbewahrt. Die berechneten Mengen des Monobulks werden unter aseptischen Bedingungen gemischt, verrieben und in Gelatine kapseln eingebracht (soweit notwendig unter Zumischung eines sterilisierten Ballaststoffgemisches, bestehend aus lyophilisierter H-Milch und Gelatine).

Zur Herstellung eines magensaftresistenten Überzuges auf den Kapseln wird eine Lösung auf Basis von Celluloseacetatphthalat (CAP) benutzt.

Filmbildner	Celluloseacetatphthalat	18,0 g
Weichmacher	Propylenglycol	24,0 g
Lösungsmittel	Aceton	120,0 g
	Dichlormethan	240,0 g

Das Besprühen der Kapseln mit dieser Lösung geschieht unter ständiger Bewegung und gleichmäßigem Luftstrom.

Die Kapseln werden in geschlossenen Behältern vor Licht geschützt bei 2–5°C gelagert.

Die Zusammensetzung der Arzneifertigware (= Gelatine kapseln) ist dann wie folgt:

Kapselinhalt

Hämagglutinin (Influenzavirus): 0,050–0,100 mg

Gelatine: weniger als 50 mg

H-Milch (lyophilisiert): weniger als 100 mg

Thiomersal: weniger als 0,200 mg

Neomycinsulfat: weniger als 0,03 mg

Kapselhülle

Gelatine: 70–80 mg

Celluloseacetatphthalat/Propylenglycol: 0,030–0,200 mg

Die Sterilisation der Kapselhülle erfolgt vor der Befüllung unter Einsatz von Gammastrahlen (Kobalt-60) bis max. 25 kGy.

Die beschriebene Herstellung ist anwendbar auf alle Influenzaviren der Typen A, B und C; beispielsweise A/Chile/1/83, A/Philippines/2/82, B/USSR/100/83, C/Berlin/1/81.

Beispiel 2

In Anlehnung an die Verfahrensweise gemäß Beispiel 1 werden Influenzaviren, beispielsweise A/Singapore/6/86, noch zusätzlich mit 0,065% (= Endkonzentration) 3-Sulfopropyl-dimethyl-n-hexadecyl-ammoniumbetain behandelt. Die Konzentration an Hämagglutinin in µg/ml beträgt bei dieser Einwirkung 150. Die entsprechende Einstellung des Kapselinhalts erfolgt wie im Beispiel 1 angegeben.

Beispiel 3

Es wird wie im Beispiel 2 verfahren. Nach der Spaltung der Influenzaviren mit 3-Sulfopropyl-dimethyl-n-hexadecyl-ammoniumbetain werden die Hüllproteine durch Ultrazentrifugation (bis 90000 g; 10°C, 100 min) gewonnen und diese zu Oralimpfstoff weiterverarbeitet.

Beispiel 4

Es wird wie im Beispiel 1 verfahren. Anstelle der Inaktivierung durch HCHO/Gammastrahlen werden die Influenzaviren jedoch mit Natriumdesoxycholat (= 0,20% Endkonzentration) bei 155 µg HA/ml gespalten und das anfallende Material nach Zugabe von Stabilisatoren und nach Lyophilisation entsprechend Beispiel 1 zu einem Impfstoff in Gelatine kapseln endkonfektioniert.

Beispiel 5

Die Herstellung des Oralimpfstoffes wird wie in den Beispielen 1, 2, 3 oder 4 angegeben vorgenommen. Die Kapsel wird in einer weiteren Gelatine kapsel ohne magensaftresistenten Überzug untergebracht; zusätzlich erhält der zweite Kapselinhalt ein Gemisch aus sauren Proteasen.

Beispiel 6

Die Impfstoffpräparation erfolgt in Anlehnung an die Beispiele 1, 2, 3, 4 oder 5. Nach der Ernte der Viren wird den Suspensionen jedoch noch zusätzlich l-Ascorbinsäure (10 mg/l) zugegeben.

Beispiel 7

Es wird wie in den Beispielen 1, 2, 3, 4 oder 5 vorgegangen. Simultan mit der Zugabe der Stabilisatoren vor der Lyophilisation wird zusätzlich noch l-Ascorbinsäure (10 mg/l) eingesetzt.

Beispiel 8

Die Impfstoffherstellung erfolgt nach den Beispielen 1, 2, 3, 4 oder 5. Als weitere Maßnahme wird der pH-Wert in der entsprechenden Suspension vor der Lyophilisation auf 6,8–7,1 gebracht.

Beispiel 9

Impfstoff wird nach den Angaben in den Beispielen 6 oder 7 hergestellt. Zusätzlich wird der pH-Wert in der entsprechenden Suspension vor der Lyophilisation auf 6,8–7,1 gebracht.

Beispiel 10

Es wird nach Beispiel 1 vorgegangen. Als Stabilisatoren wird ein Gemisch von Glutamin (1%), Glutathion (0,5%) und Mannit (2%) genommen.

Beispiel 11

Zellen von *Saccharomyces cerevisiae* Stamm HA-FLT 1, die auch Proteine mit Hämagglutinineigenschaften synthetisieren und exprimieren, werden unter sterilen aeroben Bedingungen kontinuierlich bei pH 4,7–5,0 und einer Verweilzeit zwischen 4 und 5 Stunden gezüchtet. Das Medium enthält 35 g Glucose bzw. Saccharose, 7 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,8 ml H_3PO_4 (85%ig), 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,1 g NaCl, 1,1 g CaCl_2 , 0,23 mg Riboflavin, 0,6 mg Thiaminhydrochlorid, 0,33 mg Pantothenol, 0,21 mg Pyridoxinhydrochlorid, 2,2 mg Nicotinamid, 2 µg Biotin, 2,15 mg Inosit und diverse Spurenelemente im Liter Aqua dest. Zusätzlich wird dem Züchtungsmedium noch 2,5 g Hefeextrakt (sprühgetrocknet) zugesetzt. Die pH-Wert-Regulierung erfolgt durch automatischen Zulauf von KOH. Die Abläufe (entsprechend der Verweilzeit) werden gesammelt. Die Hefe erhält man durch Zentrifugation bis 5000 g. Anschließend werden die Zellen mit Hilfe von Ultraschall (Frequenz 20 kHz und einer Schalleistungsdichte von 50 Watt/cm²) bei 3°C aufgeschlossen. Gleichzeitig werden aus dem Filtrat die Proteine einschließlich der Proteine mit Hämagglutinin-Antigeneigenschaften nach konventionellen Methoden ausgefällt. Die aufgeschlossenen Hefezellen und die ausgefallenen Proteine werden lyophilisiert und entsprechend Beispiel 1 in Gelatine kapseln gebracht und mit einem magensaftresistenten Überzug versehen.

Zusätzlich kann vor der Lyophilisation eine Inaktivierung mit Cobalt-60-Gammastrahlen mit 9,8 kGy vorgenommen werden.

Beispiel 12

Die Präparation des Impfstoffes erfolgt in Anlehnung an Beispiel 11. Anstelle des synthetischen Nährmediums wird jedoch Bierwürze (mit 10,5% Stammwürze) eingesetzt, der pH-Wert bei der Züchtung auf 5,7 gebracht, der gesamte Ablauf gesammelt, direkt lyophilisiert und in magensaftresistente Kapseln gebracht.

Beispiel 13

Zusätzlich zur Verfahrensweise in den Beispielen 11 oder 12 wird Kinetin in einer Konzentration zwischen 10^{-3} bis 10^{-9} g/l bei der Vermehrung der Biomasse eingesetzt.

Beispiel 14

Es wird wie in den Beispielen 11 oder 12 verfahren. Zusätzlich werden bei der Fermentation Substanzen mit cytokininähnlichen Effekten, wie z. B. ein DNS-RNS-Hydrolysat aus untergäriger Bierhefe, eingesetzt; bezogen auf die Trockensubstanz in einer Konzentration von 10^{-6} g/l.

Beispiel 15

In Anlehnung an Beispiel 11 wird als Mikroorganismus *Candida spec. utilis* eingesetzt. Für die Fermentation dient folgendes Substrat: 20 g Glucose oder Saccharose, 4,5 g $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$, 0,75 ml H_3PO_4 (85%ig), 0,3 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; mit Leitungswasser ad 1 l. Die pH-Wert-Regulierung erfolgt über einen separaten Zulauf mit KOH, wodurch gleichzeitig der Kaliumbedarf gedeckt wird. Die Fermentation verläuft bei optimaler Belüftung unter sterilen Bedingungen. Der durchschnittliche pH-Wert liegt bei 4,7, und die Verweilzeit beträgt 5 Stunden. Die Temperatur wird auf 28°C gehalten. Die Verarbeitung zu magensaftresistenten Gelatinekapseln erfolgt wie bei Beispiel 11. — Zusätzlich wird in eine zweite äußere Kapselhülle (nicht magensaftresistent) ein Gemisch wasserlöslicher Vitamine in lyophilisierter Form gebracht.

Beispiel 16

Die in den Beispielen 11 bis 15 dargelegten Verfahrensschritte sind neben dem Einsatz von modifizierten Hefezellen der Gattungen *Saccharomyces* und *Candida* auch auf Hefezellen weiterer Gattungen, beispielsweise *Pichia*, *Hansenula*, *Torulopsis* oder *Rhodotorula*, anwendbar.

Beispiel 17

SHIGA-Phagen (Bilaudelle), die durch Ultrazentrifugation (bis 100 000 g) aus Phagenfiltrat angereichert wurden (etwa 50% Protein, 5% Lipide, 15% Kohlenhydrate), werden dickbreiig in ein Gemisch von Milchpulver-Gelatine (90:10) aufgenommen, zu Granula verarbeitet und mit einem magensaftresistenten Überzug überzogen. Die überzogenen Granula mit den aktiven Phagen werden in einer zweiten Hülle (= Gelatinekapsel ohne magensaftresistenten Überzug) untergebracht; zusätzlich kommen in die äußere Hülle noch Phagen, aber ohne Einschluß in eine magensaftresistente Schicht. — Vor oraler Anwendung der Kombi-Kapsel kann die Magensäure durch Natriumhydrogencarbonat kompensiert werden.

Beispiel 18

Es wird gemäß Beispiel 1 verfahren, jedoch ohne Inaktivierung. Als Stabilisator wird nur Milch mit 2% Fett genommen. Der Kapselinhalt wird ansonsten entsprechend Beispiel 1 eingestellt. Die $\text{ELD}_{50}/0,1 \text{ ml}$ beträgt minimal $10^{-6,0}$.

Beispiel 19

Die Verfahrensweise ist wie im Beispiel 18. Zusätzlich wird der Virussuspension vor der Lyophilisation noch Cystein (0,1%) und Glutathion (red.) (0,12%) beigegeben.