



Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

(12) PATENTSCHRIFT A5

(21) Gesuchsnummer:	825/78	(73) Inhaber: Gist-Brocades N.V., Delft (NL)
(22) Anmeldungsdatum:	25.01.1978	
(30) Priorität(en):	26.01.1977 GB 3258/77	(72) Erfinder: Bijlenga, Gosse, St-Didier-au-Mont-d'Or (FR)
(24) Patent erteilt:	31.10.1986	
(45) Patentschrift veröffentlicht:	31.10.1986	(74) Vertreter: Schmauder & Wann, Patentanwaltsbüro, Zürich

(54) Tollwut-Impfstoff und Verfahren zu seiner Herstellung.

(57) Ein Tollwut-Lebendimpfstoff oder inaktivierter Impfstoff für die parenterale und nicht-parenterale Impfung enthält gegebenenfalls inaktivierten Tollwutvirus Stamm 675, hinterlegt bei der Tschechoslowakischen Nationalen Kultursammlung, Institut für Hygiene und Epidemiologie, Prag, mit der Registernummer CNCTC AO 4/77 oder dessen Mutanten und Varianten mit dem gleichen reproduzierbaren signifikanten cpE sowie anderen spezifischen Charakteristika des Stammes 675. Der Impfstoff wird hergestellt durch Vermehrung von Tollwutvirus Stamm 675 in Zellenkulturen von Vögeln oder Säugetieren und anschliessende Isolierung und gegebenenfalls Inaktivierung des Virusmaterials.

PATENTANSPRÜCHE

1. Tollwut-Lebendimpfstoff oder inaktivierter Impfstoff für die parenterale und nicht-parenterale Impfung, gekennzeichnet durch einen Gehalt an gegebenenfalls inaktiviertem Tollwutvirus Stamm 675, hinterlegt bei der Tschechoslowakischen Nationalen Kultursammlung, Institut für Hygiene und Epidemiologie, Prag, mit der Registriernummer CNCTC AO 4/77 oder dessen Mutanten und Varianten mit dem gleichen reproduzierbaren signifikanten cpE sowie anderen spezifischen Charakteristika des Stammes 675.

2. Impfstoff nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass er das Virus in einer pharmazeutisch annehmbaren Injektionslösung enthält.

3. Impfstoff nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass er mindestens einen Stabilisator, ein Konserverungsmittel, einen Puffer und/oder ein Adjuvans enthält.

4. Impfstoff nach einem der Ansprüche 1 bis 3 für die orale oder intestinale Applikation inkorporiert in Ködern.

5. Verfahren zur Herstellung der Impfstoffe nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man Tollwutvirus Stamm 675 (CNCTC AO 4/77) in Zellkulturen von Vögeln oder Säugetieren, die empfindlich für das Tollwutvirus sind, vermehrt, zur Aufspaltung der Zellen die erhaltene virushaltige Zellsuspension bei -70°C oder tiefer einfriert und/oder mit Ultraschall behandelt, die Zellen und den Zelldetritus durch Filtration oder Zentrifugation unter sterilen Kautelen entfernt und gegebenenfalls das Virusmaterial in der Zellkulaturflüssigkeit inaktiviert.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass man Hühnerembryofibroblastenkulturen mit dem Tollwutvirus Stamm 675 mit einer Multiplizität der Infektion von 0,02 bis 1 PBE/Zelle mindestens eine Stunde infiziert, nach der Entfernung von nicht adsorbiertem Virus ein Erhaltungsmedium vom pH-Wert 8,0 bis 8,2 zusetzt, die infizierten Zellen 3 bis 10 Tage bei 32 bis 39°C bebrütet, das virushaltige Zellkulturnedium bei -70°C oder tiefer einfriert und/oder mit Ultraschall behandelt, die Zellen und den Zelldetritus durch Filtration oder Zentrifugation unter sterilen Kautelen entfernt und gegebenenfalls das Virusmaterial in der Zellkulaturflüssigkeit inaktiviert.

7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass man als Erhaltungsmedium Eagle's Basalmedium in Earle'scher Salzlösung mit einem Zusatz von Antibiotika und 0,2 bis 0,5% Albumin verwendet.

8. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass man Babyhamsternierzellen Stamm BHK-21 13S in Suspensionskultur unter Zusatz von 7 bis 15% Tryptose-Phosphat-Bouillon, 7 bis 15% inaktiviertem Kälberserum und Antibiotika bis zu einer Zelldichte von etwa 2×10^6 Zellen/ml unter ständigem Bewegen vermehrt, die Zellen abzentrifugiert und die erhaltenen Zellen unter Bewegen mit dem Tollwutvirus Stamm 675 mit einer Multiplizität der Infektion von 0,01 bis 1 PBE/Zelle 30 bis 60 Minuten infiziert, sodann die Zellen in Suspensions-Kultur unter Zusatz von Erhaltungsmedium bei einem pH-Wert von 7,5 bis 8,0 während 4 bis 6 Tagen bei 32 bis 35°C bebrütet, das virushaltige Zellkulturnedium bei -70°C oder tiefer einfriert und/oder mit Ultraschall behandelt, die Zellen und den Zelldetritus durch Filtration oder Zentrifugation unter sterilen Kautelen entfernt und gegebenenfalls das Virusmaterial in der Zellkulaturflüssigkeit inaktiviert.

Die Erfindung betrifft einen neuen Tollwut-Impfstoff, der in Zellkulturen hergestellt und inaktiviert oder vermehrungsfähig verwendet wird und ein Verfahren zur Herstellung dieses Impfstoffes.

Im Einzelnen bezieht sich die Erfindung auf einen vermehrungsfähigen oder inaktivierten Tollwut-Impfstoff, der postinfektionell oder prophylaktisch an Haustiere, wildlebende Tiere und den Menschen auf verschiedene Arten verabreichtbar ist. Der vermehrungsfähige Impfstoff eignet sich besonders gut für die orale Verabreichung. Eine orale Verabreichung (nachstehend als orale Impfung bezeichnet) ist besonders bei der Immunisierung von wildlebenden Tieren, wie z. B. Füchsen, erwünscht. Einen weiteren Teil dieser Erfindung bilden die orale und andere, nicht-parenterale Applikationsformen, wie z. B. die intestinale oder intranasale Verabreichung, z. B. durch Köder oder Spray, bei anderen, epidemiologisch wichtigen, wildlebenden Tieren, bei Haustieren und beim Menschen.

Es ist bekannt, dass die Tollwutvirusinfektion in Warmblütern durch die prophylaktische parenterale Verabreichung von Impfstoffen, z. B. LEP Flury-Impfstoff oder HEP Flury-Impfstoff bekämpft werden kann. LEP bedeutet niedrige Eipassage, HEP hohe Eipassage. Die Gewinnung dieser Impfstoffe wird nachstehend beschrieben.

Am 29. Januar 1939 starb im Bundesstaat Georgia in den V. St. v. A. ein Mädchen mit dem Namen «Flury». Als Todesursache wurde Tollwut als Folge einer Infektion durch einen tollwütigen Hund festgestellt. Tollwutvirus wurde aus dem Gehirn, aus den Tränendrüsen und aus den Speicheldrüsen des Mädchens über intracerebrale Mauspassagen isoliert; vgl. C. N. Leach und H. N. Johnson, Amer. J. Trop. Med., Bd. 20 (1940), S. 335.

Das Gehirn der infizierten Mäuse wurde später intracerebral auf Eintagsküken verimpft und im Gehirn von Eintagsküken insgesamt 136 mal passagiert; vgl. H. Koprowski und H. R. Cox, J. Immunol., Bd. 60 (1948), S. 533. Nach zwei weiteren intracerebralen Passagen wurde dieses Tollwutvirus auf den Dottersack von Hühnerembryonen adaptiert. Nach 60 Dottersack-Passagen war dieser Virusstamm für eine Reihe von Säugetieren praktisch apathogen. Er wird unter der Bezeichnung «LEP Flury Impfstoff» als Tollwutimpfstoff für Hunde verwendet. Nach weiteren 170 – 174 Passagen im bebrüteten Hühnerrei verlor das Virus weiter an Pathogenität. Zwei Wochen alte Mäuse überleben die intracerebrale Infektion mit diesem Stamm, während neugeborene Mäuse tödlich erkranken. Dieser attenuierte Virusstamm wird unter der Bezeichnung «HEP Flury» als Impfstoff verwendet.

Die LEP- und HEP-Impfstoffe vermitteln einen wirksamen Schutz gegen die Tollwut, wenn sie prophylaktisch eingesetzt werden. Trotzdem besteht ein Bedarf nach anderen Tollwut-Impfstoffen, wie kürzlich durch Kontrolluntersuchungen auf nationaler und internationaler Ebene festgestellt wurde. So ist z. B. die Kontrolle der sylvatischen Tollwut in den Industrieländern, in denen die Tollwut seit längerer Zeit endemisch ist, oder wo sie erst seit kurzem eingeschleppt wurde, eines der kompliziertesten und aus ökologischen Gründen schwierigsten Probleme. In der gegenwärtigen Situation gibt es noch keine voll befriedigende, ökonomisch vertretbare Bekämpfungsmassnahme.

Die postinfektionelle Impfung des Menschen hat in den tollwutverseuchten Ländern in der ganzen Welt zahlreiche Probleme aufgeworfen. Aus diesen Gründen richtete sich das Augenmerk der Forschung auf die Möglichkeit der prophylaktischen wie postinfektionellen Immunisierung durch eine nicht-parenterale, bevorzugt die orale Applikation.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, einen Tollwutvirus-Impfstamm zu entwickeln, der auf verschiedene Weise appliziert werden kann, z. B. parenteral oder nicht-parenteral, und der trotzdem einen voll wirksamen Impfschutz vermittelt, wenn er vor oder nach einer stattgefundenen Tollwutinfektion gegeben wird. Diese Aufgabe wird durch die Erfindung gelöst.

Gegenstand der Erfindung ist daher ein Tollwut-Impfstoff, wie er im Patentanspruch 1 angegeben ist. Bevorzugte Merkmale werden in den Patentansprüchen 2 bis 4 angegeben. Gegenstand der Erfindung ist weiterhin das im Patentanspruch 5 angegebene Verfahren zur Herstellung des Impfstoffes. Bevorzugte Ausführungsformen sind in den Patentansprüchen 6 bis 8 angegeben.

Die Möglichkeit der oralen Applikation bei wildlebenden Tieren, die ja die wichtigsten Träger und zugleich ein ständiges Reservoir für die Tollwut sind, durch die ein wirksamer Immunschutz aufgebaut wird, ist eine der wichtigsten Fortschritte, die die vorliegende Erfindung bringt.

Der vermehrungsfähige Impfstamm 675 ist, soweit gegenwärtig bekannt, von allen existierenden Tollwut-Virusstämmen der am meisten apathogene. Dies ermöglicht den Schutz gegen das Strassenvirus auch nach stattgefunderner Infektion bereits durch eine einzige Applikation einer geeigneten Dosis. Auch der inaktivierte Impfstoff, der mit diesem Stamm 675 hergestellt wird, gestattet die postinfektionelle Anwendung. Der erzielte Schutz ist allerdings nicht ganz so gut. Der vermehrungsfähige Impfstoff sowie der inaktivierte Impfstoff besitzen eine sehr gute Antigenität, die fast gleich ist. Beide Impfstoff-Typen werden in Zellkulturen hergestellt und sind fast völlig frei von Fremdeiweiss, wodurch der Grad und die Häufigkeit von unerwünschten Nebenwirkungen praktisch vollständig beseitigt werden.

Der neue Virusstamm wurde folgendermassen isoliert: Virus aus dem HEP Flury-Impfstoff wurde in primären oder sekundären Fibroblastenkulturen aus spf-Hühnerembryonen vermehrt. Er wurde durch fluoreszenzserologische Untersuchungen in diesen Fibroblastenkulturen, durch den Mäuseschutztest – intraperitoneale Impfung und nachfolgende Belastungsinfektion mit einem standardisierten challenge-Tollwutstamm (CVS) – sowie durch die *in vitro* Neutralisation mit bekannt positiven Seren – International Rabies Reference Serum – auf seine Spezifität überprüft.

Durch die Verwendung des Plaquetestes in Hühnerembryofibroblastenkulturen oder in anderen Tollwutvirus-empfindlichen Zelllinien oder diploiden Zellstämmen nach der Methode von K. Yoshina u. Mitarb., Arch.ges. Virusforsch., Bd. 18 (1966), S. 370, und die Plaque-Zellsuspensionsmethode nach G. Bijlenga und L. Joubert, Bull. Soc. Sci. Vét. et Méd. Comparée Lyon, Bd. 76 (1974), S. 429, war es möglich, ein Plaque zu isolieren, welches sich von der Ausgangs-Viruspopulation klar durch seinen cytopathischen Effekt in Zellkulturen unterscheidet. Dieses Plaque wurde über weitere 3 Plaquepassagen (Klonisierung) gezüchtet, um eine Viruspopulation zu gewinnen, die rein und homogen ist.

Die Original-Plaque wurde als Nummer 675 und der nach der Reinigung gewonnene Tollwut-Virusstamm als Stamm 675 bezeichnet. Eine Probe dieses Stammes wurde in der Tschechoslowakischen Nationalen Kultursammlung, Institut für Hygiene und Epidemiologie, Prag, am 13. Januar 1977 hinterlegt. Sie wurde dort unter der Bezeichnung CNCTC Nr. AO 4/77 registriert.

Der Stamm kann vom Original-Stamm HEP Flury anhand folgender Charakteristika unterschieden werden:

- a) durch einen sehr ausgeprägten cytopathischen Effekt (cpE) in Zellkulturen (*in vitro*), der sich deutlich von dem durch den HEP Flury Stamm verursachten cpE unterscheidet;
- b) durch einen verkürzten primären Viruszyklus, der zwischen 9 und 11 Stunden beträgt, wodurch schneller Plaques ausgebildet werden;
- c) sehr klare Plaques, die im Durchschnitt etwas grösser als die durch den HEP Flury Stamm gebildeten sind (1 mm grösser);
- d) verstärkte Adsorption des Virus an die Zelloberfläche

in vitro, was vor allem für die Wirksamkeit einer oralen Impfung notwendig ist;

- e) eine schnellere Induktion der Interferonproduktion *in vivo* nach der Impfung aufgrund der zuvor beschriebenen Eigenschaften des Stammes. Diese Eigenschaft spielt vor allem bei der postinfektionellen Impfung eine grosse Rolle;
- f) höhere Infektiositätstiter in Zellkulturen;
- g) durch die Klonselektion und -reinigung ist das Risiko einer möglichen Reversion des Virus zur Ausgangs-Virulenz

10 praktisch ausgeschlossen, da eine homogene Viruspopulation erhalten wird;

- h) der Stamm besitzt von allen zur Zeit verfügbaren Tollwut-Stämmen die geringste Pathogenität.

Die unter (a) bis (h) genannten Eigenschaften gestatten 15 eine eindeutige Differenzierung des Stammes vom Stamm HEP Flury.

Die vorliegende Erfindung schliesst auch Impfstoff mit artifiziell vom Stamm 675 gewonnene Mutanten (u. Varianten) ein, die die gleichen Eigenschaften haben wie dieser 20 Stamm.

Aufgrund der vorstehend beschriebenen Eigenschaften, vor allem durch die Klonselektion (g), ist gewährleistet, dass mit dem neuen Stamm 675 Impfstoffchargen gleichbleibender Qualität hergestellt werden können.

25 Dieser verbesserte Impfstoff der Erfindung hat folgende Vorteile:

1. Der erfindungsgemäss Lebendimpfstoff vermehrt sich im Gegensatz zum HEP Flury-Impfstoff nicht mehr im Impfling; Restvirus wird nicht nachgewiesen und ausgeschieden;

2. Der Impfstoff induziert eine sehr rasche Interferonproduktion und -ausschüttung sowie die Aktivierung von anderen, noch nicht genau bekannten bzw. definierten interferierenden Mechanismen, wie z. B. der zellulären Immunität.

35 Eine einzige Applikation des Impfstoffes verleiht deshalb einen ausreichenden Immunschutz gegen die Infektion mit einem natürlich vorkommenden Virus (Strassenvirus). Im Hinblick auf die schnelle Interferonproduktion und die Aktivierung der zellulären Immunität ist die Verwendung des erfindungsgemässen Impfstoffes für die postinfektionelle Impfung für kurz zuvor infizierte Tiere bei einem Tollwut-Ausbruch nun möglich. Es wurde vor allem auch die Möglichkeit der postinfektionellen Impfung des Menschen durch diesen Impfstoff sehr stark verbessert, da nachgewiesen werden konnte, dass der Impfstoff auch nach einer stattgefundenen Infektion im Tier ausserordentlich wirksam ist und sogar in einem relativ weit fortgeschrittenen Stadium der Infektion noch die Genesung einleiten kann;

40 3. Nicht-parenterale Applikationsformen, wie z. B. die orale Impfung mit dem Lebendimpfstoff, erlauben organisierte grosse Impfkampagnen.

Ein Lebendimpfstoff, der mit dem Stamm 675 hergestellt wird, hat für die prophylaktische Impfung folgende Vorteile:

55 A) in Tieren

- 1. die Immunisierung von Füchsen und anderen epidemiologisch wichtigen, wildlebenden Tieren mit Hilfe von Ködern, die Impfstoff enthalten;
- 2. die orale Impfung von Haustieren, z. B. von streunenden Hunden, in denjenigen Ländern, in denen aus religiösen und/oder gesetzlichen Gründen die Tötung nicht erlaubt ist;
- 3. eine starke Vereinfachung von Impfkampagnen durch die Möglichkeit, gleichzeitig eine grosse Zahl von Individuen zu impfen, wie z. B. durch die Verteilung von gegebenenfalls gefrorenen Fleischbällen, in denen Impfstoff enthalten ist, durch Flugzeuge;
- 4. der wirksame Schutz von Haustieren nach einer stattgefundenen Infektion in Ländern, in denen eine derartige

Impfprozedur gestattet ist und in Ländern, in denen Tiere, die vor der Infektion bereits einmal immunisiert worden sind, nicht getötet werden müssen.

B) im Menschen

1. Furcht vor der oralen Impfung gibt es so gut wie nicht. Die Furcht vor der Injektion ist in vielen Ländern ein entscheidender Faktor für die Ablehnung der Impfung durch den Patienten;

2. die orale Verabreichung verursacht keine lokalen Reaktionen oder Irritationen, ein entscheidender Nachteil der zur Zeit im Handel befindlichen Impfstoffe;

3. die einfache Verabreichung gestattet die gleichzeitige Impfung grosser Populationen durch medizinisch nicht (besonders) geschultes Personal (wie z. B. bei der Polio-Impfung).

In diesem Zusammenhang ist auch sehr wichtig, dass nachweislich eine einzige Applikation ausreicht, um einen wirksamen Impfschutz zu induzieren.

Der neue Impfstoff kann mit den gebräuchlichen Methoden hergestellt werden, wie z. B. in Zellkulturen, Einschaltung der üblichen und vorgeschriebenen Kontrollen auf bakterielle und virale Kontaminationen und Beachtung der bekannten Grundsätze und der internationalen Standard-Anforderungen.

Der erfundungsgemäße neue Impfstoff wird bevorzugt durch die Vermehrung des Tollwutvirus Stamm 675 in primären oder sekundären Hühnerembryofibroblasten-Kulturen von 10-tägigen spf-Hühnerembryonen hergestellt. Es können allerdings auch andere Zellsysteme, die für das Tollwutvirus empfänglich sind, verwendet werden, also Zellen von verschiedenen Vögeln oder Säugetieren, vorzugsweise der Babyhamsternieren-Zellstamm BHK-21 (21 Passagen als Monolayerkultur) bzw. BHK-21 13S (13 Passagen als Suspensionskultur). In BHK-Kulturen hergestelltes Virus eignet sich allerdings nur für Impfstoffe, die in der Veterinärmedizin eingesetzt werden. Suspensionskulturen haben den grossen Vorteil, dass für die Herstellung des Virusmaterials Fermenter mit einer grossen Kapazität verwendet werden können, was die Produktion erleichtert.

Der Impfstoff kann aber auch in Zellen, die auf Mikroträgern zur Vermehrung gebracht wurden, hergestellt werden (Tropfen-Zellkultur-System). So haben z. B. Dextran-Tropfen bzw. -Perlen, die vor und/oder während der Zellvermehrung mit makromolekularen Anionen behandelt werden, eine positive Ladungsdichte, die günstig für die Vermehrung von Zellen an ihrer Oberfläche ist. Auf diese Art und Weise werden Suspensionen mit Zellen und Perlen, die gerührt werden, mit dem Virusmaterial beimpft. Nach der Virusvermehrung wird der Rührvorgang beendet, wodurch die Perlen sich am Boden absetzen und die Virusernte von der Suspension abgetrennt werden kann.

In einer bevorzugten Methode werden für die Herstellung des Impfstoffes die Hühnerembryofibroblasten-Kulturen mit dem Tollwutvirus Stamm 675 mit einer Multiplizität der Infektion von 0,02 bis 1 PBE/Zelle infiziert, wobei eine Adsorptionszeit von mindestens 1 Stunde bevorzugt wird (Adsorptionsmethode). Nach der Entfernung des nicht adsorbierten Virusmaterials wird den Zellkulturen Erhaltungsmedium zugesetzt. Dieses besteht bevorzugt aus Eagle's Basalmedium (BME) in Earle'scher Salzlösung mit einem Zusatz von Antibiotika (z. B. 100 I. E. Penicillin und 100 γ Streptomycin) sowie 0,2 bis 0,5% Albumin. Es muss unbedingt darauf geachtet werden, dass der pH-Wert des Erhaltungsmediums bei 8,0 bis 8,2 liegt. Die virusinfizierten Zellen werden 3 bis 10 Tage bei 32 bis 39 °C bebrütet. Anschliessend wird das virushaltige Medium bei –70 °C oder bei tieferen Temperaturen eingefroren, um die Zellen zu zerstören

und damit zellgebundenes Virus freizusetzen; dies erhöht den Titer. Unter sterilen Bedingungen werden danach die Zellen und der Zelldetritus mittels Filtration oder Zentrifugation entfernt. Das Filtrat bzw. der Überstand wird anschliessend bei –70 °C gelagert. Entsprechende Proben werden zuvor für die Titration mit Hilfe der Plaquemethode entnommen. Es können natürlich auch andere Methoden zum Aufschluss der Zellen verwendet werden, z. B. eine Ultraschallbehandlung.

10 Eine Alternativmethode ist die Vermehrung des Virus in BHK-21 13S-Suspensionskulturen. Hierfür werden die Zellen in Suspension, z. B. in Spinner-Flaschen mit entsprechenden Röhreinrichtungen, gezüchtet. Das Anzuchtmedium enthält geringe Mengen (7 bis 15%) Tryptosephosphat-

15 Bouillon, inaktiviertes Kälberserum (7 bis 15%) und Antibiotika (z. B. 100 I. E. Penicillin und 100 γ Streptomycin). Es wird so lange gezüchtet, bis eine Zelldichte von etwa 2×10^6 Zellen/ml erreicht ist. Um ein Absinken oder Klumpen der Zellen zu vermeiden, wird die Suspension ständig bewegt.

20 Sodann werden die Zellen abzentrifugiert und unter Bewegen mit dem Tollwutvirus Stamm 675 mit einer Multiplizität der Infektion von 0,01 bis 1 PBE/Zelle 30 bis 60 Minuten infiziert.

Nach der Infektion werden die Zellen wieder z. B. in 25 Spinner-Flaschen gegeben. BHK-21 Erhaltungsmedium wird zugefügt. Dieses enthält eine kleine Menge Rinderserumalbumin Fraktion V, z. B. 0,1 bis 0,4 Gew.-%, und Antibiotika (z. B. Kanamycin oder Neomycin in einer Menge von 50 bis 300 γ). Der pH-Wert wird auf 7,5 bis 8,0 eingestellt.

30 Während der Bebrütung wird die Temperatur auf 32 bis 35 °C, bevorzugt auf 33 °C, eingestellt. Jeden Tag werden kleine Proben entnommen und mit Hilfe der Immunfluoreszenz untersucht. Zwischen dem 2. und 3. Tag p.inf. sind zwischen 80% und 100% der Zellen infiziert und zeigen eine für

35 das Tollwutvirus typische Fluoreszenz im Cytoplasma. Dies ergibt am 4. bis 6. Tag p.inf. eine Virusernte mit einem Infektiositätstiter von 10^8 bis 10^9 PBE/ml. Für die Virusernte wird die Flüssigkeit gesammelt und bei –70 °C eingefroren.

Nach Entfernung der Zellen und des Zelldetritus wird 40 eine kleine Probe mit Hilfe der Plaquemethode titriert. Wenn ein ausreichender Titer erreicht wurde ($10^{7,5}$ bis $10^{8,5}$ PBE/ml oder höher), werden die Zellen und der Zelldetritus von der Virusernte mittels Filtration oder Zentrifugation unter sterilen Bedingungen entfernt.

45 Nach der Zugabe eines geeigneten Stabilisators kann die Flüssigkeit in Ampullen abgefüllt und gefriergetrocknet werden.

Die Erfahrung betrifft auch inaktivierten Tollwut-Impfstoff, vor allem zum Gebrauch in der Humanmedizin. Für 50 den inaktivierten Impfstoff wird die erhaltene Flüssigkeit des Lebendimpfstoffs nach bekannten Methoden bzw. modifizierten Methoden inaktiviert, z. B. durch Zugabe von β-Propriolacton, wässrige Formaldehydlösung oder Acetyl-ethylenimin oder durch Bestrahlung mit ultraviolettem Licht.

55 Der erfundungsgemäße Tollwut-Impfstoff, welcher mit dem Virusstamm hergestellt wird, kann einen oder mehrere übliche Stabilisatoren, Konservierungsmittel, Puffer und/oder Adjuvantien enthalten.

Die Beispiele erläutern die Erfahrung.

60

Beispiel 1

Monolayer von primären oder sekundären Hühnerembryofibroblastenkulturen, hergestellt von spf-Hühnerembryos, werden als stationäre oder Rollerkulturen mit dem Tollwut-Saatvirus Stamm 675, das eine Multiplizität der Infektion von 0,02 bis 1 PBE/Zelle besitzt, beimpft. Wenn geringere Virusmengen für die Beimpfung verwendet werden, verlängert sich die Adsorptionszeit. Das Saatvirus muss minde-

stens 1 Stunde adsorbiert werden. Nach Beendigung der Adsorptionszeit wird das nicht adsorbierte Virusmaterial entfernt und die Zellkultur mit Erhaltungsmedium beschickt. Dieses besteht aus Eagle's Basalmedium (BME) in Earle'scher Salzlösung mit einem entsprechenden Antibiotikazusatz und 0,2% Albumin der Species, für die der Impfstoff verwendet werden soll. Der pH-Wert des Erhaltungsmediums wird auf 8,2 eingestellt.

Bei einer Bebrütung bei 33° bis 35°C über 4 bis 8 Tage entsteht ein ausgeprägter cpE (cytopathischer Effekt). Das virushaltige Medium wird danach bei -70°C eingefroren. Nach dem Auftauen werden die Zellen und der Zelldetritus mittels Zentrifugation mit 1000 g oder durch Filtration durch ein Membranfilter (Porengröße: 5 Mikron) unter sterilen Kautelen entfernt. Die Flüssigkeit (Überstand bzw. Filtrat) wird bei -70°C gelagert. Für die Titration im Plaquetest nach Bijlenga und Joubert, a.a.O., werden entsprechende Proben entnommen.

Für Impfstoffe, die für postinfektionelle Impfungen verwendet werden sollen, muss der Virustiter 10^8 PBE/ml betragen. Für prophylaktisch verwendete Impfstoffe genügen auch Virustiter von bis zu 10^7 PBE/ml.

Die Herstellung der Impfstoffchargen wird durch die üblichen Wirksamkeitsteste (NIH- und Habel-Test) kontrolliert. Chargen, die für postinfektionelle Impfungen verwendet werden sollen, werden einem zusätzlichen Wirksamkeits- test nach der Methode von G. Bijlenga, Symposium on Advances in Rabies Research, Atlanta, Georgia, V.St.A., 7. bis 9. September 1976, S. 14, unterzogen.

In diesem neuen Wirksamkeitstest wird lokales Strassenvirus 4 Wochen alten Mäusen intramuskulär appliziert. Innerhalb von 24 Stunden erhalten die infizierten Tiere einmal 0,5 ml Impfstoff intraperitoneal. Alle geimpften Mäuse sollten überleben, während von den infizierten Kontrollmäusen innerhalb der Testperiode von 3 Wochen ungefähr 50% sterben sollten.

Entsprechend den international anerkannten Mindestanforderungen werden die entsprechenden Kontrollen auf die Abwesenheit von bakteriellen und viralen Kontaminationen sowie die bei der Impfstoffproduktion üblichen Kontrollen für primäre oder sekundäre Zellen bzw. Zelllinien durchgeführt.

Beispiel 2

BHK-21 13S-Zellen werden als Suspensionskultur in Spinner-Flaschen gezüchtet. Als Medium dient das übliche BHK-21 Medium mit einem Zusatz von 10% Tryptosephosphat-Bouillon, 10% inaktiviertem Kälberserum und Antibiotika (100 I.E. Penicillin, 100 γ Streptomycin). Die Zellen werden unter ständigem Rühren, um sie in der Sus-

pension zu halten und um ein Verklumpen zu vermeiden, so lange bebrütet, bis eine Zeldichte von 2×10^6 Zellen/ml erreicht ist.

Die Zellen werden dann mit 80 g abzentrifugiert und 45 Minuten mit Tollwut-Saatvirus Stamm 675 beimpft und bewegt. Das Saatvirus hat eine Multiplizität der Infektion von 0,01 bis 1 PBE/Zelle. Nach der Infektion werden die Zellen wieder in die Spinner-Flaschen gegeben und es wird Erhaltungsmedium zugefügt. Dieses besteht aus BHK-21 Spinner-10 Kulturmedium mit einem Zusatz von 0,2% Rinderserumalbumin Fraktion V und entsprechenden Antibiotika (z.B. Kanamycin oder Neomycin). Der pH-Wert wird auf 7,8 eingestellt.

Die Bebrütungstemperatur liegt bei 33°C. Jeden Tag 15 werden aus den Spinner-Flaschen kleine Proben entnommen und mit Hilfe der Immunfluoreszenz untersucht. 2 bis 3 Tage p.inf. sollten 80 bis 100% der Zellen eine für das Tollwutvirus typische Fluoreszenz im Cytoplasma zeigen. Dies entspricht einem Infektiositätstiter von 10^8 bis 10^9 PBE/ml,

20 wenn die Kulturen am 4. bis 6. Tag p.inf. geerntet werden.

Für die Virusernte wird die Flüssigkeit entnommen und bei -70°C eingefroren. Eine kleine Probe wird entnommen, von Zellen und Zelldetritus befreit und im Plaquetest titriert. Wenn ein ausreichender Titer erreicht wurde ($10^{7.5}$ bis $10^{8.5}$ 25 PBE/ml und höher), wird die gesamte Virusernte, wie zuvor schon beschrieben, von Zellen und Zelldetritus befreit und kann dann nach der Zugabe von geeigneten Stabilisatoren in Ampullen abgefüllt und gefriergetrocknet werden.

Um höhere Titer zu erzielen, benutzt man in einer Alter-

30 nativmethode entweder stationäre Monolayer-Kulturen oder Monolayer in Roller-Kulturen für die Infektion. 2 bis 8 Stunden nach der Infektion werden die Zellen abtrypsinisiert und in Suspensionskulturen verbracht, die nach den vorstehend beschriebenen Verfahren hergestellt wurden. Es muss 35 dabei besonders darauf geachtet werden, dass sich die Zellen nicht verklumpen. Auf diese Weise können mehr als 2×10^6 Zellen/ml verwendet werden, wodurch in Abhängigkeit von der Zellzahl, die in die Suspensionskultur gegeben wurde, höhere Titer erreicht werden.

40

Beispiel 3

Um die Verwendungsmöglichkeit und die Wirksamkeit des vermehrungsfähigen und des inaktivierten Tollwut-Impfstoffes der Erfindung zu zeigen, sind einige Beispiele von 45 prophylaktischen und postinfektionellen Impfversuchen im folgenden zusammengestellt:

A) Orale Impfung von Füchsen mit dem Tollwut-Lebendimpfstoff (Stamm 675, Infektiositätstiter: 2×10^8 PBE/ml, Impfdosis: 2 ml/Fuchs)

Tabelle 1

	Nr. des Fuchses	Alter (11. 8. 75)	Serumtiter*) 11.9	7.10	21.11	Belastungsinfektion**) 23. 12. 75
oral geimpfte Füchse	84	5 Monate	4,0	7,0	8,2	geschützt
	86	6 Monate	1,3	1,6	1,4	geschützt
	88	6 Monate	2,0	2,4	3,2	geschützt
nicht geimpfte Kontrollfüchse	83	6 Monate				Tod 15. Tag p. inf.
	85	6 Monate				Tod 17. Tag p. inf.
	92	6 Monate				Tod 18. Tag p. inf.

* Eine I.E. (Internationale Einheit) entspricht einer Serumverdünnung von 1:300, die eine 50prozentige Plaquereduktion hervorruft.

** eine sehr hohe Dosis von challenge-Virus (aus der Speicheldrüse eines natürlich infizierten Fuchses). Für die Bestimmung des Schutzwertes des Impfstoffs wurde eine Dosis von $1\ 391\ 610\ MLD_{50}$ verwendet.

Das Experiment beweist die Wirksamkeit der oralen Impfung von jungen Füchsen. Durch serologische Untersuchung konnten ein Antikörperanstieg und relativ hohe Serumtiter nachgewiesen werden. Mehr als 5 Monate nach der Impfung waren die Füchse noch voll geschützt, während alle 3 Kontrollfüchse nach einer sehr kurzen Inkubationszeit

starben, was auf die ausserordentlich hohe challenge-Dosis zurückzuführen ist (intramuskulär in das rechte Hinterbein). Die gebräuchliche challenge-Dosis ist für Füchse 3000 MLD₅₀.

⁵ B) Ergebnisse von serologischen Untersuchungen nach der Impfung mit dem inaktivierten Stamm 675

Tabelle 2

Tierart	Körpergewicht, kg	Impfdosis	Serumtiter 4 Wochen p. vacc.
Hund 1	6,5	2 ml i.m.	6,8
	8	2 ml i.m.	6,3
	12	2 ml i.m.	5,5
	10	2 ml i.m.	12,3
	15	2 ml i.m.	5,9
	14	2 ml i.m.	4,5
	17	2 ml i.m.	3,8
	17	2 ml i.m.	20,5
Kuh	200	5 ml s.c.	4,5
	400	5 ml s.c.	8,5
	300	5 ml s.c.	15,5
	500	5 ml s.c.	4,8
	400	5 ml s.c.	7,6
	600	5 ml s.c.	8,9
	500	5 ml s.c.	3,8
	400	5 ml s.c.	4,7

Es wurde eine einzige Impfstoff-Dosis appliziert. Die angegebenen Titer sind ausgedrückt in I. E. wie in Tabelle I.

4 Wochen nach der Impfung zeigten alle 8 Hunde und 8 Rinder einen Antikörperanstieg mit sehr hohen Titern. Der

geforderte Mindesttiter ist in der Europäischen Pharmacopoe mit 0,2 I. E./ml festgelegt.

³⁵ C) Schutzrate von Labormäusen nach einer Infektion mit Strassenvirus (vom Fuchs stammend)

Tabelle 3

Art des Impfstoffes	Intervalle zwischen der Infektion und der Impfung									
	1. Std.	1 Tag	2 Tage	3 Tage	4 Tage	5 Tage	6 Tage	7 Tage	8 Tage	9 Tage***
Lebendimpfstoff 657*										
unverdünnt	0/10**	1/10	1/10	1/10	2/10	0/10	0/10	4/10	5/10	3/10
10 ⁻¹	1/10									
10 ⁻²	4/10									
10 ⁻³	6/10									
10 ⁻⁴	8/10									
Kontrollen	6/10	8/10	7/10	7/10	7/10	7/10	6/10	6/10	6/10	8/10
inaktivierter Impfstoff 675*										
unverdünnt	0/10	1/10	5/10							
10 ⁻¹	1/10									
10 ⁻²	6/10									
10 ⁻³	8/10									
10 ⁻⁴	6/10									

* Titer des Impfstoffes 10^{8,2} PBE/ml (für den inaktivierten Impfstoff wurde der Titer vor der Inaktivierung bestimmt)

** Zahl der Todesfälle pro Zahl der infizierten Mäuse

*** 2 Impfungen am Tag 9 und 11.

Alle Mäuse wurden intramuskulär mit einem Tollwutvirus infiziert, das aus der Speicheldrüse eines Fuchses stamme (0,1 ml). Diese Menge reichte aus, um 60 bis 80% der Kontrollen nach einer Inkubationszeit von 9 bis 11 Tagen zu töten.

Der Lebendimpfstoff und der inaktivierte Impfstoff wurden jeweils in einer einzigen Dosis (0,5 ml) intraperitoneal in

unterschiedlichen Abständen von der Infektion, wie in Tabelle III aufgeführt, verabreicht.

Der unverdünnte Lebendimpfstoff schützte die Tiere noch 6 Tage nach der Infektion. Ein derartiger Schutzeffekt ist bisher noch bei keinem der im Handel befindlichen Impfstoffe nachgewiesen worden. Dieser Schutzeffekt beweist, dass sogar noch dann, wenn das Tollwutvirus bereits das

Zentralnervensystem erreicht hat, die Mäuse noch geheilt werden können.

Wird 2 mal hintereinander mit 1 Tag Intervall geimpft, ist 9 Tage nach der Infektion immer noch ein Teil der Mäuse geschützt.

Der Lebendimpfstoff sowie der inaktivierte Impfstoff können bis zu 10fach verdünnt werden. Mit dem verdünnten Impfstoff muss die Impfung innerhalb von 24 Stunden nach der Infektion vorgenommen werden.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65