

NORGE



**STYRET
FOR DET INDUSTRIELLE
RETTSVERN**

Utlegningskrift nr. 122031

Int. Cl. C 12 k 5

Kl. 30h-6

Patentsøknad nr. 164.282 Inngitt 12.VIII 1966

Løpedag -

Søknaden alment tilgjengelig fra 1.VII 1968

Søknaden utlagt og utlegningskrift utgitt 10.V 1971

Prioritet begjært fra: 13.VIII-65 USA,
nr. 479653

G

Merck & Co., Inc.,
126 East Lincoln Avenue, Rahway, N.J., USA.

Oppfinnere: Eugene Bernard Buynak,
Maurice Ralph Hillemann, begge adr.
126 East Lincoln Avenue, Rahway, N.J., USA.

Fullmektig: Siv.ing. Erling Quande.

Fremgangsmåte ved fremstilling av
levende kusmavirusvaksine.

Foreliggende oppfinnelse angår en fremgangsmåte ved fremstilling av en vaksine inneholdende et svekket, levende kusmavirus.

Som følge av dets svekkede natur forårsaker viruset liten eller ingen klinisk reaksjon. Det beforder imidlertid dannelse av en betydelig mengde motstoff mot viruset hos mennesker, og dette motstoff er vesentlig for å oppnå beskyttelse mot infeksjon av viruset og mot sykdom forårsaket av dette.

Kusma ansees på samme måte som meslinger som en av de mindre alvorlige barnesykdommer. Ved vanlig klinisk infeksjon er dette riktig. I spesielle tilfeller kan imidlertid de kliniske følger av virusinfeksjonen være alvorlige, og ettersykdommene kan være like ødeleggende som ved meslinger.

I det vanlige tilfelle av kusma inntreder den akutte febertilstand etter en inkubasjonstid på 18 - 21 dager. De viktigste kliniske symptomer er feber med ledsagende opphovning av spyttkjertlene på den ene side eller på begge sider, av og til også under medvirkning av de submaxillære og sublinguale kjertler.

Viremia ledsager ofte kusmavirusinfeksjon, og en rekke organer eller organsystemer kan være innblandet. Disse kan innbefatte bitedykkelen, blærehalskjertelen, eggstokken, leveren, bukspyttkjertelen, milten, skjoldbruskkjertelen, nyrene, labyrinten, øynene, brisselen, myocardium, brystkjertlene og sentralnervesystemet. De viktigste sykdommer er encephalitis, encephalomyelitis, neuritis i ansiktssnervene, i trigeminus eller i synsnervene, aseptisk meningitis (0,5-10 % av tilfellene), : scleritis, pancreatitis, som enkelte ganger fører til sukkersyre; og orchitis eller ovaritis, som av og til fører til atrophia og sterilitet. Alvorlige komplikasjoner er minst hyppige blant barn. De mer alvorlige tilfeller inntreder ved infeksjon av voksne mennesker som har unngått sykdommen som barn.

Kusma uten komplikasjoner hos barn er avkreftende, anstrengende for foreldrene og resulterer i betydelig fravær fra skolen. Kusma med komplikasjoner, enten det gjelder barn eller voksne, kan variere fra en mild sykdom med tilsynelatende fullstendig helbredelse til ødeleggelse eller nedsatt kapasitet av viktige organsystemer som kan gjøre pasienten til krøpling for livet eller være dødelig.

Det var kjent før denne oppfinnelse ble gjort - jfr. en artikkel av J.E. Prier i Basic medical virology, s. 259-264 (Baltimore 1966) - at kusmavirus kan tilpasses til vekst i fosterholdig hønseegg med suksessive passeringer gjennom dette medium, og at meget godt tilpasset virus kan dyrkes i kyllingfosterkultur. Samme kilde viser likeledes at det var kjent å fremstille en levende kusmavaksine ut fra virus dyrket i fosterholdig hønseegg. Det var imidlertid ikke kjent at man ved på nærmere bestemt måte å kombinere passeringer gjennom fosterholdig hønseegg med dyrkning i kyllingfostervevkultur kan fremstille en sikker men effektiv levende kusmavaksine.

Ved hjelp av oppfinnelsen tilveiebringes der således nu en fremgangsmåte ved fremstilling av levende kusmavirusvaksine ut fra virus som er dyrket suksessivt i fosterholdig hønseegg, hvilken fremgangsmåte utmerker seg ved at man anvender kusmavirus som har passert minst ti suksessive ganger gjennom fosterholdig hønseegg og deretter er blitt dyrket i kyllingfostervevkultur inneholdende vev fra 9 til

11 dager gamle kyllingfostere ved 30 - 38°C.

Fremgangsmåten omfatter de følgende trinn: (A) isolering av det livskraftige virus i fosterholdig hönseegg og tilpasning av dette til kyllingfostervevkultur, (B) utvikling av det svekkede, levende virus ved hjelp av dyrkninger i kyllingfostervevkultur og (C) fremstilling av vaksinen ut fra det erholdte svekkede, levende virus. Disse trinn skal beskrives hvert for seg.

A. Isolering og tilpasning av livskraftig virus

Kusmaviruset skaffes fra klinisk materiale, nemlig fra personer som vites å ha kuma. Isolering og tilpasning av kusmaviruset utføres i kyllingfostervevkultur etter at det på forhånd er blitt formert i fosterholdig hönseegg. Inkubasjon av infiserte kulturer kan utføres ved 30 - 34°C (optimalt 32°C) eller ved 35 - 38°C (optimalt 36°C)

B. Fremstilling av svekket, levende kusmavirus

Viruset som under A er påvist å være kusmavirus, anbringes i glassflasker inneholdende kyllingfostervevkulturer tilberedt av finhakkede og trypsinerte, omtrent ti dager gamle kyllingfostere. Dyrkningsmediet kan f.eks. være det kjente medium 199 til hvilket det er tilsatt kalveserum. Etter tilsetningen av serumet inkuberes de infiserte cellekulturer ved suksessive dyrkninger ved 30 - 38°C i varierende tidsrom, hvorunder viruset svekkes. De virusholdige væsker innsamles deretter og lagres i fryst tilstand eller ved annen lav temperatur for å opprettholde virusets infektivitet.

De ovennevnte suksessive dyrkninger utføres under anvendelse av et fortynnet innpodningsmateriale, og flere innhøstninger foretas med varierende mellomrom. Infektivitetstitreringer utføres i HeLa-kultur, grivetapenyrevevkultur eller kyllingfostervevkultur.

C. Fremstilling av vaksine

Kusmaviruset som ble høstet etter disse suksessive dyrkninger, viste seg ikke å fremkalle sykdom hos aper og gnagere, å fremkalle liten eller ingen klinisk reaksjon hos mennesker og å føre til dannelse av en betydelig mengde motstoff. Virusinfektiviteten stabiliseres ved hjelp av et egnet stabiliseringsmiddel såsom sucrose menneskealbumin, glutamin, fosfat eller blandinger derav. Etter titrering for bestemmelse av dets styrke fylles viruspreparatet på ampuller. Produktet kan lagres og utdeles i fryst tilstand, men blir fortrinnsvis frysetørret og oppbevart fritt for fuktighet.

122031

4

Forsök på mennesker: Omtrent 150 barn som ikke tidligere hadde hatt kusma, ble parenteralt gitt en dose av en vaksine av svekket kusma-virus. Praktisk talt samtlige barn reagerte ved en betydelig motstofftiter innen en måned etter vaksineringsen. Barna viste få eller ingen kliniske symptomer, alt etter stammen av kusmavirus og antall dyrkninger i fosterholdig hönseegg og kyllingfostervevskulturer.

Eksempel

Innpodningsmaterialet er det som fåes ved den ovenfor beskrevne isolasjonsmetode etter 10 suksessive passeringer gjennom fosterholdig hönseegg.

Ni til elleve dager gamle kyllingfostere finhakkes under aseptiske betingelser etter at hode- og halepartier er fjernet, og det finhakkede vev vaskes flere ganger med Hanks' BSS. Det vaskede vev trypsineres ved 36°C under anvendelse av 0,25 % trypsin ("Difco" 1:250) i tris(hydroxymethyl)-aminomethan-puffer i 2 - 3 timer. Trypsincelleoppslemningen oppsamles gjennom to lag sterilt osteklede og sentrifugeres med en hastighet av 1500 omdr./min i 5 minutter. Sammenpakkede celler oppslemmes på ny i dyrkningsmedium for telling. Dyrkningsmediet er medium 199 inneholdende 2 % agamma-kalveserum (oppvarmet ved 56°C i 30 minutter) og 50 mcg/ml "Neomycin". Flaskekulturer plantes i en konsentrasjon av 350.000 levedyktige celler pr. milliliter. Etter inkubering ved 36°C i et tidsrom fra 48 til 72 timer kan flaskekulturene anvendes for suksessive dyrkninger eller for vaksinefremstilling.

Kyllingfostervevskulturer fremstilles i glassflasker under anvendelse av medium 199 inneholdende 2 % inaktivert kalveserum som dyrkningsmedium. Tre eller fire dager etter plantingen tas dyrkningsmediet ut under aseptiske forhold, og flaskekulturene vaskes fire ganger med Hanks' BSS, idet der benyttes 100 ml pr. vask, og podes med 2,5 ml fortynnet viruspreparat pr. flaske. 70 ml av medium 199 inneholdende 10 % av et egnet stabiliseringsmiddel for virusinfektiviteten tilsettes hver flaskekultur, og flaskene inkuberes ved 30 - 34°C. "Neomycin" i en konsentrasjon av 50 mcg/ml innlemmes i vekst- og vedlikeholdsmediet. Det foretas flere innhöstninger med 2 - 4 dagers mellomrom, og flaskene påfylles nytt vedlikeholdsmedium inneholdende det ovennevnte stabiliseringsmiddel. Ti suksessive dyrkninger utføres alle ved omtrent 32°C. Infektivitetstitreringer av hver innhöstning utføres i HeLa-kultur eller i grivetapenyrekultur. Hver innhöstning foretas aseptisk, idet der benyttes en steril be-

holder. Det tas ut prøver for bestemmelse av den mikrobielle sterilitet, og den resterende del skallfryses i et bad av tørris og alkohol. De virusholdige væsker lagres ved -70°C i en elektrisk drevet fryseenhet, før ett eller flere innhøstede materialer velges ut for fremstilling av vaksinen.

Ett eller flere egnede innhøstede materialer velges ut etter at det er foretatt infektivitetstitreringer. Det utvalgte materiale tas ut fra fryseren og tines opp. En prøve tas ut for kontroll og for å undersøke hvorvidt den er sikker. Den gjenværende væske klares, og en prøve tas ut for å teste materialet på aper. Passende mengder ytterligere stabiliseringsmiddel tilsettes den gjenværende væske. Væsken fordeles på skåler og tørres. Etter tørring blir skålene lukket og forseglet og holdt i beredskap for tilberedelse av en vaksine ved tilsetning av sterilt vann.

Førre eller flere suksessive dyrkninger av viruset i kyllingfostervevkulturen kan foretas i den hensikt å svekke viruset. Eksempelvis ga tyve suksessive passeringer gjennom fosterholdig hönseegg ved $30 - 38^{\circ}\text{C}$ med to påfølgende passeringer gjennom kyllingfostervevkultur ved $30 - 38^{\circ}\text{C}$ et godt resultat.

P a t e n t k r a v

Fremgangsmåte ved fremstilling av levende kumavirusvaksine ut fra virus som er dyrket suksessivt i fosterholdig hönseegg, k a r a k t e r i s e r t v e d at man anvender kumavirus som har passert minst ti suksessive ganger gjennom fosterholdig hönseegg og deretter er blitt dyrket i kyllingfostervevkultur inneholdende vev fra 9 til 11 dager gamle kyllingfoster ved $30 - 38^{\circ}\text{C}$.

Anførte publikasjoner:

Norsk patent nr. 101.813

J.E. Prier: Basic medical virology, side 259-264 (Baltimore 1966).