
Octrooiraad



⑩ A Terinzagelegging ⑪ 8004297

Nederland

⑲ NL

⑤4 Antigeenpreparaten.

⑤1 Int.Cl³: A61K39/02.

⑦1 Aanvrager: The Wellcome Foundation Limited te Londen.

**⑦4 Gem.: Ir. H.M. Urbanus c.s.
Vereenigde Octrooibureaux
Nieuwe Parklaan 107
2587 BP 's-Gravenhage.**

②1 Aanvraag Nr. 8004297.

②2 Ingediend 25 juli 1980.

③2 Voorrang vanaf 27 juli 1979.

③3 Land van voorrang: Groot-Brittannië (GB).

③1 Nummer van de voorrangsaanvraag: 7926323 .

②3 --

⑥1 --

⑥2 --

④3 Ter inzage gelegd 29 januari 1981.

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

Antigeenpreparaten

De uitvinding heeft betrekking op antigeenpreparaten, vaccines daarvan en hun bereiding en toepassing voor voorkomen en behandelen van voetrot, in het bijzonder bij schapen.

Voetrot bij schapen is een wijd verspreide, besmettelijke ziekte, welke de opperhuidweefsels van de voet aantast en die wordt veroorzaakt door synergistische werking van 2 gramnegatieve anaerobe bacteriën, nl. Bacteroides nodosus (fusiformis nodosus) en Fusobacterium necrophorum (fusiformis necrophorum). De ziekte treedt alleen op wanneer deze organismen beide aanwezig zijn.

F. necrophorum wordt gewoonlijk gevonden in het spijsverteringskanaal en wordt met de uitwerpselen afgescheiden, zodat dit organisme meestal aanwezig is in de onmiddellijke omgeving van de voeten van het schaap en deel kan nemen aan de infectie. B. nodosus is daarentegen niet in staat onder natuurlijke omstandigheden meer dan een paar dagen in leven te blijven buiten de wonden van het voetrot. De geïnfecteerde schapenvoet is de enige natuurlijke woonplaats en daarom wordt B. nodosus dikwijls beschreven als de veroorzaker van deze ziekte. Verwijderen van B. nodosus uit een kudde schapen, hetgeen uitgevoerd kan worden door alle aanwezige gevallen van voetrot te genezen of door selectieve vernietiging van het organisme, zou de ziekte uitroeien, omdat F. necrophorum geen voetrot kan veroorzaken bij afwezigheid van B. nodosus.

In de afgelopen jaren werd voetrot bestreden door isoleren van aangetaste dieren, gevolgd door behandelen daarvan, waarbij uitgebreid wegsnijden van aangetaste gedeelten van de poten en uitwendig toepassen van desinfecterende middelen werd toegepast of ook wel uitwendige of parenterale toediening van geschikte antibiotica. In de laatste tijd werd het door succesvolle kweek op grote schaal van B. nodosus mogelijk, schapen te vaccineren met een emulsie of met door aluminium verjongde vaccines, verkregen volgens bij voorbeeld het Britse octrooischrift 1.375.544. Bij toepassing van dergelijke vaccines werd in vele gevallen onvolledig onderstukken van de ziekte verkregen en intensieve pogingen zijn gedaan om de oorzaak van het falen te vinden en de doelmatigheid van de bestaande vaccines te verbeteren.

Nu is gevonden, dat een antigeenpreparaat volgens de uitvinding

een grotere titer aan antilichamen levert en een betere onderdrukking van de ziekte dan de tot dusver gebruikte B. nodosus-vaccines. De uitvinding verschaft daarom een antigeenpreparaat, dat een tweefasige emulsie van water-in-olie omvat, welke antigeen-materiaal bevat, dat is afge-
5 leid van of bestaat uit Bacteroides nodosus-organismen en een aluminium-hulpstof in de waterige fase van de emulsie.

Het antigene materiaal van het preparaat kan een immunogeen extract van de organismen bevatten, maar bij voorkeur bevat het materiaal de gehele gedode organismen in de vorm van een anacultuur of geoogste cel-
10 len. Elke immunogene stam kan worden gebruikt of een variant daarvan of een combinatie van stammen en/of varianten, welke representatief zijn voor één of meer van de Bacteroides nodosus-sero-typen. Een bevredigende bescherming is in het bijzonder verkregen door toepassing van organismen, welke gekweekt zijn uit fimbriate kolonies, waarin de organismen sterk
15 gepileerd zijn (zie bij voorbeeld Journal of applied Bacteriology (1976), 40, blz. 301-315). Vers geïsoleerde B. nodosus-organismen, die gekweekt zijn op vaste media zijn sterk gepileerd en bij het uitvoeren van de werkwijze volgens de uitvinding kiest men bij voorkeur de kweekomstandig-
heden in een vloeibare cultuur zo, dat een zo groot mogelijke mate van
20 pileren optreedt om de werkzaamheid van de verkregen vaccines te vergroten. Onder sterk gepileerde organismen van B. nodosus worden in deze beschrijving verstaan, organismen met ten minste 20 pili/organisme en bij voorkeur meer dan 100 per organisme. Voor een maximale werkzaamheid bestaan de antigene mengsels en de daarvan afgeleide vaccines bij voor-
25 keur geheel uit sterk gepileerde varianten van B. nodosus, maar in de praktijk wordt een doelmatige bescherming reeds verkregen, wanneer 90% van de organismen bestaan uit sterk gepileerde varianten. De sterk gepileerde varianten van stam CSIRO nr. 198 (Welcome Laboratories Culture nr. 6476) (gedeponeerd bij de ATCC op 19 juli 1979 als nr. 3145) is bij-
30 zonder waardevol. Bij voorkeur kan bescherming worden verschaft tegen homologe besmetting (d.w.z. besmetting met één of meer sero-typen, die homolog zijn met de B. nodosus-serotypen van het mengsel) omdat bescherming tegen besmetting met heterologe typen minder goed is. Daarom zal men besmetten met organismen van meer dan één B. nodosus-serotype bij voor-
35 keur aanpakken met een preparaat, dat meer dan één stam omvat, waarbij elke stam representatief is voor ieder serotype, dat aanwezig is in de besmettingshaard.

De B. nodosus-organismen voor toepassing in de preparaten volgens

800 42 97

de uitvinding kunnen worden gekweekt volgens elke gebruikelijke methode, bij voorbeeld op de manier, beschreven in het Britse octrooischrift 1.375.544 of met de methode beschreven in het bovengenoemde artikel in Journal of Applied Bacteriology, welke leidden tot sterk gepileerde organismen.

De aluminiumhulpstof is er één, die reeds op zichzelf de anti-lichaam respons voor het antigene materiaal bevordert en de hulpstof kan worden gekozen uit de reeds bekende, zoals kaliumaluin, aluminiumhydroxyde en aluminiumfosfaat. Bijzondere voorkeur geeft men aan thixotrope β -type aluminiumhydroxydegelen, welke een positieve lading hebben bij afwezigheid van elektrolyten. Een voorbeeld van een dergelijk gel is "Alhydrogel" (handelsnaam). Bij voorkeur bevatten de mengsels 0,25-4 vol.% van de aluminiumhulpstof.

De emulsie heeft een enkele continue oliefase en een enkele gedispergeerde waterige fase (d.w.z. het is een tweefasige emulsie van water in olie) en de emulsie kan worden bereid onder toepassing van één of meer emulgatoren en een olie. Natuurlijk mag de emulgator of de emulgatoren, welke in de preparaten worden verwerkt, niet giftig zijn en verenigbaar met de antigene componenten van het vaccine. Bij voorkeur zijn ze niet ionogeen, zodat ze minder neiging hebben te worden neergeslagen door componenten van het antigeenpreparaat dan een kationogene of een anionogene emulgator. Ook is er minder gevaar door denatureren van het proteïne van het antigeen, wanneer men een niet ionogene emulgator gebruikt. De combinatie, de hoeveelheden en de verhoudingen van de gebruikte emulgator dienen zo te worden gekozen, dat ze bij verwerken in het vaccine een maximale versterking van de antigene eigenschappen opleveren en van de stabiliteit van de emulsie en bij voorkeur bestaan ze uit een lipofiele en een hydrofiele emulgator.

De lipofiele emulgatoren zijn bij voorkeur niet ionogene oppervlak-actieve stoffen met een kleine hydrofiel-lipofiel-verhouding van 8-20. [William C Griffin, 'Calculation of HLB values of non-ionic surfactants', Journal of the Society of Cosmetic Chemists (1954) volume 5, blz. 249-256; Osipow, 'Surface Chemistry, ACS Monograph 153', blz. 295-314, Reinhold, 1962]. Dit is de uiterste grens van het gebied van de HLD-waarden van emulgatoren, die het meest geschikt zijn voor verwerking in de oliefase en een optimale grens van de HLB-waarden is 2-6. Geschikte lipofiele emulgatoren zijn di- en triësters van meervoudige alcoholen en vetzuren, geoxydeerde vette oliën en partiële esters van normale vetzuren, zoals

palmitinezuur, laurinezuur, stearinezuur en oliezuur met hexitolanhydriden, afgeleid van sorbitol of mannitol. Voorbeelden van emulgatoren zijn mannitan- en sorbitanvetzsuuresters, zoals mannide monooleaat (Arlacel A, HLB 4.3), sorbitan monooleaat (Arlacel 80, HLB 4.3), sorbitan monopalmitaat (Arlacel 40, HLB 6.7), sorbitan monostearaat (Arlacel 60, HLB 4.7), en sorbitan sesquioleaat (Arlacel C, HLB 3.7).

De hydrofiele emulgator voor toepassing in de preparaten heeft bij voorkeur een HLB-waarde van 9-20 en liefst van 11-18. Geschikte groepen verbindingen zijn de polyglycolvetzsuuresters, de met polyoxyethyleen gemodificeerde vetzsuuresters, de polyoxyethyleen-polyolvetzsuuresters, polyoxypropyleenvetalcohol ethers en polypropyleenglycolvetzsuuresters. Een bijzonder nuttige groep zijn de polyoxyalkyleenderivaten van de vetzsuuresters van meerwaardige alcoholen, zoals de polyoxyethyleenderivaten van de partiële esters van laurinezuur, palmitinezuur, stearinezuur en oliezuur met hexitolanhydriden. Voorbeelden van deze emulgatoren zijn polyoxyethyleen (20) sorbitan monolauraat (Tween 20, HLB 16.7), polyoxyethyleen (20) sorbitan monopalmitaat (Tween 40, HLB 15.6), polyoxyethyleen (20) sorbitan monostearaat (Tween 60, HLB 14.9), polyoxyethyleen (20) sorbitan monooleaat (Tween 80, HLB 15), polyoxyethyleen (20) sorbitan trioleaat (Tween 85, HLB 11.0) en polyoxyethyleen (8) lauraat (G 2127, HLB 12.8).

Een niet giftige olie van plantaardige of minerale oorsprong, die verenigbaar is met het antigene materiaal, kan worden gebruikt in de preparaten volgens de uitvinding. Bijzondere voorkeur geeft men aan minerale olie van farmaceutische kwaliteit, omdat deze in het algemeen een aanzienlijk stabielere emulsie leveren en het weefsel minder irriteren. Lichte, vloeibare paraffine-oliën (Bayol F en Drageol 6R) blijken bevredigende emulsies en preparaten te leveren.

De vloeistof van de waterige fase kan bestaan uit het cultuurmedium, of wanneer de cellen worden geëxtraheerd of geoogst uit water of isotonische zoutoplossing.

De preparaten volgens de uitvinding kunnen worden bereid met elke gebruikelijke techniek voor de bereiding van emulsies van biologische materialen en in feite kunnen ze worden verkregen door krachtig roeren van een waterig mengsel van antigeen met aluminiumhulpstof met de olie en de emulgatoren. Het waterige mengsel van antigeen met aluminiumhulpstof wordt verkregen door de organismen van B. nodosus te inactiveren met bij voorbeeld formaline, de cultuur of de anacultuur te concentreren

tot ongeveer 30% van het oorspronkelijke cultuurvolume maar bij voorkeur niet verder dan tot 10% met een willekeurige bekende techniek, waarna men de aluminiumhulpstof toevoegt aan het waterige antigeen. De aluminiumhulpstof kan worden toegevoegd ná het concentreren of het concentreren
5 kan zelf gebruik maken van de aluminiumhulpstof.. Een voorbeeld van de eerste methode is neerslaan bij het iso-elektrische punt en een voorbeeld van de tweede methode is coprecipiteren met een vlokmiddel.

Precipiteren bij het iso-elektrische punt is in het bijzonder doelmatig bij antigeenmateriaal, dat sterk gepileerde B. nodosus-organismen
10 bevat. Bij deze techniek wordt de pH van de cultuur of de anacultuur verlaagd door toevoegen van een zuur tot ongeveer het iso-elektrische punt van de cellen, hoewel men ook een lagere pH kan gebruiken. Geschikte zuren zijn o.a. minerale zuren, zoals zoutzuur, fosforzuur en in het bijzonder zwavelzuur en sterke organische zuren, zoals azijnzuur en melk-
15 zuur. De pH is doelmatig kleiner dan 6,0 en bij voorkeur kleiner dan 5,6 en liefst 4,8-5,2. Beneden pH 4,8 is meestal het precipiteren volledig, maar afhankelijk van het gebruikte antigeenmateriaal kan dan schade aan het antigeen optreden. Na verlagen van de pH verlaagt men bij voorkeur de temperatuur van de cultuur of de anacultuur tot 4-12°C.

20 Coprecipiteren met een vlokmiddel kan worden uitgevoerd door een steriele oplossing van het vlokmiddel toe te voegen aan de anacultuur, waarna de pH wordt ingesteld bij voorbeeld met alkali tot de precipitatie optimaal is. Na koud bezinken (bij voorbeeld 2 dagen of meer) wordt de heldere bovenstaande vloeistof weggeworpen, zodat een concentratie
25 van de cellen en het proteïne-achtige materiaal (met inbegrip van pili) in de anacultuur is verkregen. Hoewel met de bovenstaande vloeistof ook een gedeelte van het vlokmiddel kan worden weggegooid, houdt men toch bij voorkeur de hoeveelheid voor het neerslaan gering, omdat hoe meer men gebruikt, hoe meer ook aanwezig is in het neerslag (concentraat) en
30 des te meer zal het verkregen vaccine irriteren. Geschikte vlokmiddelen zijn o.a. de sulfaten, chloriden en de onoplosbare hydroxyden van meerwaardige kationen en polyanionogene polymeren, zoals natriumcarboxymethylcellulose en hydroxypropylmethylcellulose. Bijzonder geschikt voor toepassing volgens de uitvinding is kaliumaluin, omdat deze stof tevens
35 dienst kan doen als aluminiumhulpstof. Gevonden is, dat 1 volume 10 gew.% aluinoplossing, toegevoegd aan 7 volume anacultuur (1,25 gew.% aluin in totaal) na instellen van de pH op 5,4 een neerslag levert met geschikte eigenschappen en daarnaast een heldere bovenstaande vloeistof. Hoe hoger

de pH is (bij voorbeeld 5,8 of 6,4) des te meer tijd is nodig voor volledig helder worden van de bovenstaande vloeistof. Hoe kleiner de concentratie aan aluin, des te meer tijd is nodig voor helder worden.

Ook het volume van het neerslag hangt af van de hoeveelheid aan het mengsel toegevoegde aluin. Zo leidt toevoegen van 1 volume 10%'s aluinoplossing aan 11 volumes anacultuur (0,83% aluin in totaal) tot een nauwelijks aanvaardbaar neerslag, bij een ongemakkelijk lange bezinkduur, terwijl toevoegen van 1 volume aluin aan 4 volumes anacultuur (2,0% aluin in totaal) leidt tot een zeer volumineus neerslag, dat zonder centrifugeren niet voldoende kan worden verdicht om bruikbaar te zijn bij oogsten van cellen. Op een soortgelijke wijze blijft het gezuiverde aluminiumhydroxyde "Alhydrogel" bij toevoegen aan anacultures van B. nodosus lange tijd in de gedispergeerde fase, zodat oogsten van de geabsorbeerde cellen/proteïne moet worden uitgevoerd door centrifugeren.

Een andere techniek om de cultuur of anacultuur te concentreren is ultrafiltratie en deze methode of centrifugeren kunnen ook worden toegepast in combinatie met neerslaan bij het iso-elektrische punt of bij co-precipitatie.

In geval meer dan 1 serotype B. nodosus in het antigeenmateriaal aanwezig is, wordt een waterig mengsel van antigeen en aluminiumhulpstof bereid, zoals hierboven beschreven is voor elke afzonderlijke stam of variant en daarna worden vóór het emulgeren ongeveer gelijke hoeveelheden van elk van deze waterige mengsels samengevoegd. Bij voorkeur wordt de emulsie bereid door de olie te mengen met de lipofiele emulgator, de waterige antigeen/aluminiumcomponent te mengen met de hydrofiele emulgator en daarna de olie- en waterfasen te combineren. Bij voorkeur voegt men de waterige fase langzaam toe aan de oliefase onder krachtig roeren, om de neiging, een olie-in-water-emulsie te vormen te onderdrukken. Een fijnere dispersie van de waterige fase kan worden verkregen door homogeniseren of malen in een colloïdmolen en dit kan worden voortgezet tot de deeltjesgrootte niet verder afneemt.

De optimale verhouding van olie- tot waterfase in een vaccine hangt af van een reeks van factoren, zoals de concentratie van antigeenmateriaal in de waterfase, de gewenste viscositeit van het vaccine en de mate van antigene eigenschappen in het antigene materiaal. De waterfase vormt bij voorkeur niet meer dan 60% en niet minder dan 10% van het totale volume van de emulsie. Een grotere hoeveelheid water is ongewenst, met het oog op de toename van de viscositeit en de instabiliteit van de

emulsie en een hoeveelheid van minder dan 10% waterfase maakt het moeilijk een voldoende hoeveelheid antigeen in het preparaat te verwerken, zonder een onaanvaardbaar groot volume per dosis te krijgen. Gevonden is, dat bevredigende vaccines worden verkregen, wanneer de waterfase 20-50 vol.% uitmaakt van het gehele vaccine. Wanneer een grote hoeveelheid water gewenst is, bij voorbeeld meer dan 40%, dan moeten voorzorgen worden genomen om te verhinderen, dat een olie-in-water-emulsie ontstaat of een instabiele emulsie. Gevonden is, dat dergelijke emulsies, welke polyoxyethyleen (20) sorbitantriolaat bevatten kunnen worden gestabiliseerd door toevoeging van Falba (een stabilisator, welke bijenwas, paraffineolie met variërende viscositeit uit lanoline geëxtraheerde oxycholesterinen bevat). De hoeveelheid in elke fase benodigde emulgator hangt af van een aantal factoren en in het bijzonder van de HLB-waarden van de emulgatoren en de keus van de olie en gewoonlijk zal 2,5-15 vol.% van een lipofiele emulgator en 0,5-10,0 vol.% van een hydrofiele emulgator in de betrokken fasen vaccines opleveren met de gewenste eigenschappen. Een aanzienlijke verbetering van de antigene eigenschappen van de antigenen is verkregen met 5-12 vol.% emulgator in de oliefase en 0,2-7 vol.% in de waterfase.

De preparaten volgens de uitvinding kunnen worden geformuleerd tot een vaccine, dat geschikt is voor toediening door het preparaat in een geschikte concentratie en in steriele vorm te verwerken tot een toedieningsvorm.

Het is nodig, na het emulgeren het preparaat te steriliseren ofwel de afzonderlijke componenten tevoren te steriliseren en ze daarna onder steriele omstandigheden te emulgeren. De preparaten volgens de uitvinding kunnen worden gesteriliseerd door toepassing van hitte en filtratie om de componenten te steriliseren of door toepassing van gammastraling zonder dat daardoor de stabiliteit of de werkzaamheid vermindert. Het uiteindelijke vaccine wordt in steriele houders gebracht en deze worden gesloten. Het vaccine bevat bij voorkeur een bacteriostaat van een soort, die gewoonlijk wordt gebruikt voor gedode bacterievaccines en 0,01 gew.% thiomersal (natriumethylmercurythiosalicylaet) kan voor dit doel in de waterige fase worden verwerkt. Doelmatig bevat het uiteindelijke vaccinepreparaat in totaal $2,5 \times 10^7$ - 1×10^{11} en liefst tussen 1×10^8 en $1,25 \times 10^9$ gedode organismen per ml preparaat.

De vaccines volgens de uitvinding worden bij voorkeur aan de dieren toegediend door onderhuidse, intramusculaire of intraperitoneale

inspuiting. Het is doelmatig, het vaccine toe te dienen op een plaats waar plaatselijke reactie op de toediening voor de boer van weinig belang is, bij voorbeeld vooraan de rugkant van de nek of op de onderkaak. De het liefst gebruikte dosis ligt tussen 1×10^8 en 1×10^{11} gedo-
5 de organismen/dosis en in het bijzonder tussen 1×10^8 en 1×10^{10} organismen/dosis, waarbij onder dosis wordt verstaan de totale hoeveelheid antigeenmateriaal, die per keer wordt toegediend aan het dier, zoals een schaap, in een geschikt volume vloeistof, bij voorbeeld 1-2 ml. De dosis vaccine kan aan een dier worden toegediend als één eenheid of
10 als een reeks sub-doses en deze laatste kunnen worden gespreid over een periode of door gelijktijdige inspuiting van de sub-doses op verschillende plaatsen van het lichaam. Een geschikt immunisatieschema kan bestaan uit één enkele injectie van de dosis of uit 2 injecties, die ieder een sub-dosis vormen, en gelijktijdig op verschillende plaatsen van het
15 lichaam worden toegediend. Het optimale dosisschema varieert natuurlijk, afhankelijk van de als basis voor het vaccine gekozen stam van het organisme, van het totale aantal organismen dat gebruikt wordt, van de aard van de hulpstof en de methode, van toediening. Het is bijzonder gunstig gebleken, een vaccine toe te dienen, dat 3×10^8 organismen per ml bevat
20 als een enkele dosis van 1 of 2 ml langs subcutane weg, gevolgd door een tweede injectie van met hetzelfde volume en dezelfde concentratie en langs dezelfde weg na een periode van ten minste 6 weken en bij voorkeur 12 weken. Versterkingsdoses worden bij voorkeur toegediend kort voor het seizoen waarin verspreiding van voetrot wordt verwacht.

25 Naast het antigene materiaal, afgeleid van B. nodosus kan een vaccine volgens de uitvinding ook antigeen materiaal bevatten, dat is afgeleid van andere bacteriën, welke ziekten kunnen veroorzaken, bij voorbeeld bij schapen, in het bijzonder F. necrophorum of clostridia. Een zeer bij voorkeur gebruikte combinatie is een vaccine met meerdere
30 componenten, dat een preparaat bevat van één of meer clostridiale antigenen, beschreven in het Britse octrooischrift 1.143.545, gecombineerd met een antigeenmengsel voor B. nodosus, welk laatste bereid is zoals hiervoor is beschreven.

De uitvinding verschaft daarom:

- 35 a) een antigeenpreparaat, dat omvat een water-in-olie-emulsie met antigeenmateriaal, afgeleid van of bestaande uit Bacteroides nodosus-organismen en een aluminiumhulpstof in de waterige fase van de emulsie;
- b) een werkwijze om een antigeenpreparaat te bereiden van het type

800 4297

als beschreven onder (a), waarbij men een waterig medium, dat antigeen-materiaal bevat, afgeleid van of bestaat uit B. nodosus-organismen en een aluminiumhulpstof wordt geëmulgeerd in een olie;

5 c) een vaccine, dat een steriel preparaat bevat van een mengsel als omschreven onder (a);

d) een werkwijze voor profilaxie of behandeling van voetrotinfectie bij schapen, waarbij men aan het echaap een werkzame en niet giftige dosis toedient van een vaccine van het type, beschreven onder (c).

De uitvinding wordt toegelicht, maar niet beperkt, door de volgende voorbeelden.

10 Vergelijkingsvoorbeeld I

Kweek van het organisme.

B. nodosus (stam SCIRO nr. 98) organismen, verkregen uit een ent-cultuur werden geënt op het medium, beschreven door Thorley, C.M. (1976) J. Appl. Bact. 40, 301-309, blz. 302) dat aanwezig was in flessen met
15 schroefdop en de lucht in de flessen werd verdrongen door een mengsel van 10% kooldioxyde en 90% stikstof. De cultures werden op 37°C gehouden gedurende 20-40 uur en de organismen werden gedood door toevoegen van formaline (0,5 gew.%). Onderzoek van de organismen onder een elektronmicroscop toonde aan, dat ten minste 90% daarvan sterk gepileerd was
20 (meer dan 100 pili/organisme).

Voorbeeld II

Antigeenmengsel.

Een geformaliseerde anacultuur (3200 ml) van sterk gepileerde B. nodosus-organismen, verkregen als in voorbeeld I, werd behandeld met
25 320 ml 10%'s kaliumaluinoplossing en de pH van het mengsel werd op 6,2 gebracht door toevoegen van 40%'s NaOH-oplossing. Nadat het mengsel 24 uur was bewaard bij 4°C werd de bovenstaande vloeistof afgegoten, zodat het volume van het neergeslagen organisme 1200 ml werd.

Aan dit residu werd toegevoegd 30 ml Tween 80 (40 vol.% in water)
30 en 1,2 ml thiomersal (10% oplossing in water) en het mengsel werd geëmulgeerd met een mengsel van 2,8 l Arlacel A (10 vol.%) en Marcol (90 vol.%).

Voorbeelden III-VI

Antigene mengsels.

35 Sterk gepileerde B. nodosus-organismen werden verzameld door neerslaan bij het iso-elektrische punt, waarbij de anacultures werden behandeld met een voldoende hoeveelheid verdund waterig zwavelzuur om de pH

te verminderen tot 5,0. Na 3 dagen staan bij 16-20°C werden de organismen 9-10 maal geconcentreerd door 133,7 l van de bovenstaande vloeistof weg te werpen. De organismen werden gebruikt bij de bereiding van vaccineformuleringen volgens de voorbeelden III-VI, zoals aangegeven in onderstaande tabel A. In elk van de gevallen werd de geconcentreerde anacultuur verdund (kolom 3) met waterige keukenzoutoplossing en aan het waterige mengsel werd thiomersal toegevoegd (kolom 7) tot een concentratie van 0,01% vóór de waterige oplossing werd geemulgeerd in olie (kolom 8). In de voorbeelden IV-VI werd na het toedienen van de hydrofiele emulgator de pH bijgesteld.

T A B E L A

Kol 1	Kol 2	Kol 3	Kol 4	Kol 5	Kol 6	Kol 7	Kol 8
Anacultuur (volume, ml)	Concentra- tieverhou- ding	Verdunnen met wate- rige NaCl oplossing (0,9%)	Aluminium- hulpstof	pH inge- steld op	Hydrofiële emulgator	Totaal volume waterfase (liter)	Volume "olie" (liter)
III 200	10	700 ml	Kaliumaluin (154 ml; 10%)	6,1	T80 (13,3 ml)	1,054	2,459
IV 200	10	644 ml	AH (210 ml)	6,1	T80 (13,3 ml)	1,054	2,459
V 300	9,2	1,7 liter	AH (500 ml)	6,1	T80 (62,5 ml)	2,5	2,5
VI 500	9,2	1,5 liter	AH (500 ml)	6,1	T80 (62,5 ml)	2,5	2,5
VII 6 liter	3	-	Kaliumaluin (1,2 liter; 10%)	6,2	T80 (75 ml)	3,078	7,0

T80: sorbitanmono-oleaat ('Tween 80') 40% waterige oplossing

AH: thixotrope β -type aluminiumhydroxydegel ('Alhydrogel')

"Olie" Een mengsel van 10 volume % mannide mono-oleaat (Arlacel A') en 90 vol.% "Mercol"

Voorbeeld VII

Antigeenmengsel.

Op dezelfde wijze als in voorbeeld II werd een ander mengsel bereid onder toepassing van sterk gepileerde B. nodosus-organismen (ver-
5 kregen op de manier, beschreven in voorbeeld I), zoals vermeld in tabel A.

Voorbeeld VIII

Vaccines.

De mengsels beschreven in de voorbeelden III-VII kunnen worden af-
10 gevuld in steriele flesjes van 1,2 of 10 ml en daarna gesloten en gesteriliseerd door gammastraling.

Voorbeeld IX

Doelmatigheid.

Bij deze proef werden 4 groepen van elk 5 schapen gevaccineerd,
15 subcutaan op de onderkaak, met 2 ml vaccine, bereid zoals beschreven in voorbeeld II (vaccine A) en met 3 andere vaccinepreparaten (vaccines B, C en D). Zes weken later werd een tweede dosis vaccine aan elk schaap toegediend, welke voor elk schaap in alle opzichten gelijk was aan de eerste dosis en uit elk van de vaccinegroepen werden 5 schapen besmet
20 met een levende cultuur van de betrokken vaccinestam, die rechtstreeks op elke voet werd gebracht. Daarna werd elke groep van 5 schapen met tussentijden van 1 maand opnieuw besmet, zodat de laatste besmetting werd uitgevoerd 12 weken na de tweede vaccinatie. Drie weken na elke besmetting werden de poten onderzocht op klinische voetrot. Een score, waarbij
25 één of meer van de voeten waren aangetast door voetrot op de zool of 2 of meer voeten waren aangetast door ernstige dermatitis tussen de tenen en dat bij 2 of meer van de 5 dieren, werd geacht te betekenen, dat het vaccine onvoldoende bescherming biedt en verder onderzoek van dat vaccine werd nagelaten.

30 De 4 onderzochte vaccines (A, B, C en D) werden gelijktijdig onderzocht en vergeleken met een controlegroep van niet gevaccineerde schapen om de virulentie van de besmettingscultuur te controleren. Vijf groepen van 4 x 5 schapen werden gebruikt. Bloedmonsters werden genomen na 0 weken en na 6 weken en telkens bij het onderzoek van de voeten. In die
35 monsters werd de agglutinatietiter bepaald en het geometrische gemiddelde van de titers werd berekend. De resultaten van de proef zijn samengevat in tabel B.

Daaruit blijkt, dat vaccine A volgens de uitvinding het enige was,

800 4297

T A B E L B

Vaccine	Besmetting 1		Besmetting 2		Besmetting 3		Besmetting 4	
	Aangetaste schapen	Titer	Aangetaste schapen	Titer	Aangetaste schapen	Titer	Aangetaste schapen	Titer
A gepileerd aluin en olie	0/5	59 020	0/5	124 000	0/5	40 960	1/5	13 510
B niet gepileerd aluin en olie 0/5	0/5	33 630	0/5	17 800	2/5	3 880	niet onderzocht	:
C gepileerd geen aluin wel olie	0/5	11 880	1/5	8 900	1/5	13 490	4/6	2 560
D niet gepi- leerd geen aluin wel olie	0/5	11 890	1/5	7 759	1/5	1 940	6/6	320
niet ge- vaccineerd	5/5	80	2/5	-	4/5	80	5/5	160

dat ook bij de vierde besmetting aan de schapen bescherming bood. Twee weken na het voetonderzoek waren bij het ene uit deze vaccinegroep aangetaste schaaap de voetwonden genezen, terwijl de wonden bij de 5 schapen uit de controlegroep onverminderd ernstig waren.

- 5 Verder werd een duidelijk verschil gevonden in de serumagglutinatietiters van de schapen die waren geïmmuniseerd met vaccine A en de schapen, welke waren gevaccineerd met de andere vaccines.

Besmetting nr. 2 was ongeldig, omdat van de controlegroep 3 schapen niet werden aangetast. Besmetting 4 was zeer ernstig, zodat de schapen uit de controlegroep reeds ernstig waren aangetast bij een voorlopig
10 onderzoek 10 dagen na de besmetting.

Deze proef toont voor het eerst aan, dat het mogelijk is door vaccinatie schapen tegen voetrot te beschermen gedurende een periode van 12 weken na de laatste dosis vaccine.

- 15 De vaccines B, C en D waren identiek aan vaccine A, behalve: vaccine B: de organismen waren niet virulent en genetisch niet gepileerd, d.w.z. geen daarvan bleek meer dan 20 pili/bacterie te hebben. Vaccine C: hierbij werd de aluminiumhulpstof weggelaten. Vaccine D: de aluminiumhulpstof werd weggelaten en bovendien waren de
20 organismen niet gepileerd, evenmin als bij vaccine B.

Voorbeeld X

Werkzaamheid van de vaccines.

Bij deze proef werden vaccines, bereid uit de mengsels uit voorbeelden III-VII, vergeleken met vaccines, welke uitsluitend aluin als hulpstof bevatten (vaccines F en G). Schapen, die vrij waren van voetrot werden behandeld met ofwel één enkele dosis van een vaccine uit de voorbeelden III-VII ofwel met 2 dosis van vaccines F of G, welke 6 weken uiteen lagen. Na de vaccinatie werden periodiek groepen van de gevaccineerde schapen vergeleken met niet gevaccineerde controledieren om de bestendigheid tegen infectie te bepalen tegen een kunstmatige besmetting met een levende cultuur van B. nodosus, zoals beschreven in voorbeeld IX. De resultaten zijn samengevat in tabel C.

T A B E L C

Vaccine	Dosis vaccine (ml)	Besmetting na vaccinatie (aangetaste schapen)		
		8 weken	12 weken	15 weken
Voor- beeld III	1	1/5	0/4	-
Voor- beeld IV	1	0/5	0/5	-
Voor- beeld V	2	-	-	0/5
Voor- beeld VI	1	0/5	-	0/5
Voor- beeld VII	1	0/5	1/5	-
Voor- beeld VII	2	0/4	0/5	-
F	2x2	4/5	-	-
G	2x2	4/5	-	-
Controle	0	4/5	5/5	4/5

C O N C L U S I E S

1. Antigeenmengsel, dat een emulsie van antigeenmateriaal omvat, dat is afgeleid van of bestaat uit Bacteroides nodosus-organismen, met het kenmerk, dat de emulsie bestaat uit een water-in-olie-emulsie, welke in de waterfase van de emulsie het antigene materiaal en een aluminium-
5 hulpstof bevat.
2. Mengsel volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat de B. nodosus-organismen sterk gepileerd zijn.
3. Mengsel volgens conclusie 1 of 2, met het kenmerk, dat de B. nodosus-organismen bestaan uit de sterk gepileerde variant van de stam, gedepo-
10 neerd onder nr. ATCC 3145.
4. Mengsel volgens conclusies 1-3, met het kenmerk, dat de aluminium-hulpstof is gekozen uit kaliumaluin, aluminiumhydroxyde en aluminiumfosfaat.
5. Mengsel volgens conclusies 1-4, met het kenmerk, dat de aluminium-
15 hulpstof is gekozen uit kaliumaluin en thixotrope β -type aluminiumhydroxydegel.
6. Mengsel volgens conclusies 1-5, met het kenmerk, dat de emulsie een niet ionogene emulgator bevat.
7. Mengsel volgens conclusies 1-6, met het kenmerk, dat de emulsie
20 een lipofiele emulgator bevat.
8. Mengsel volgens conclusie 7, met het kenmerk, dat de lipofiele emulgator een mannitan- of sorbitanvetzauurester is.
9. Mengsel volgens conclusie 7 of 8, met het kenmerk, dat de lipofiele emulgator mannidemono-oleaat is.
- 25 10. Mengsel volgens conclusies 7-9, met het kenmerk, dat de lipofiele emulgator 5-12 vol.% uitmaakt van de oliefase van de emulsie.
11. Mengsel volgens conclusies 1-6, met het kenmerk, dat de emulsie een hydrofiele emulgator bevat.
12. Mengsel volgens conclusie 11, met het kenmerk, dat de hydrofiele
30 emulgator een polyoxyalkyleenderivaat is van een vetzauurester van een meerwaardige alcohol.
13. Mengsel volgens conclusie 11 of 12, met het kenmerk, dat de hydrofiele emulgator polyoxyethyleen (20) sorbitammono-oleaat is.
14. Mengsel volgens conclusies 11-13, met het kenmerk, dat de hydro-
35 fiele emulgator 0,2-7 vol.% uitmaakt van de waterfase van de emulsie.
15. Mengsel volgens conclusies 1-14, met het kenmerk, dat de oliefase

800 4297

van de emulsie een minerale olie omvat.

16. Mengsel volgens conclusie 15, met het kenmerk, dat de olie een vloeibare paraffine-olie is.

17. Mengsel volgens conclusies 1-16, met het kenmerk, dat de waterfase
5 10-60 vol.% van de emulsie uitmaakt.

18. Mengsel volgens conclusies 1-17, met het kenmerk, dat de waterfase 20-50 vol.% van de emulsie uitmaakt.

19. Mengsel volgens conclusies 1-18, met het kenmerk, dat het antigene materiaal aanwezig is in een hoeveelheid van $2,5 \times 10^7 - 1 \times 10^{11}$

10 B. nodosus-organismen per ml mengsel.

20. Vaccine, dat een steriele toedieningsvorm van een antigeenpreparaat omvat, welk preparaat een emulsie met antigeenmateriaal omvat, dat is afgeleid van of bestaat uit Bacteroides nodosus-organismen, met het kenmerk, dat de emulsie een water-in-olie-emulsie is, welke het antigene
15 materiaal en een aluminiumhulpstof bevat in de waterfase van de emulsie.

21. Vaccine volgens conclusie 20, met het kenmerk, dat de waterige fase van de emulsie een bacteriostaat bevat.

22. Werkwijze om een antigeenmengsel volgens conclusies 1-19 te bereiden, met het kenmerk, dat men het antigene materiaal, dat is afgeleid
20 van of bestaat uit B. nodosus-organismen in een waterig medium dispergeert en het waterige medium emulgeert met een olie, met het kenmerk, dat in het waterige medium tevens een aluminiumhulpstof wordt gebruikt.

23. Vaccine volgens conclusie 20 of 21, voor toepassing bij de profylaxe of behandeling van een infectie van schapen met voetrot.