

NORGE



**STYRET
FOR DET INDUSTRIELLE
RETTSVERN**

Utlegningskrift nr. 125776

Int. Cl. C 12 k 5/00 Kl. 30h-6

Patentsøknad nr. 170.199 Inngitt 19.10.1967

Løpedag -

Søknaden alment tilgjengelig fra 1.7.1968

Søknaden utlagt og utlegningsskrift utgitt 30.10.1972

Prioritet begjært fra: 21.10.1966 Storbritannia,
nr. 47399/66

Recherche et Industrie Therapeutiques "R.I.T.",
13, rue du Tilleul, Genval, Belgia.

Oppfinnere: Constant Huygelen, Vossekoten, Huldenberg og
Julien Peetermans, 6, Avenue J. Herman,
Rixensart, begge: Belgia.

Fullmektig: Dr.ing. K. O. Berg.

Fremgangsmåte for fremstilling av en vaksine mot rubella.

Nærværende oppfinnelse vedrører en fremgangsmåte for fremstilling av svekket levende vaksine mot røde hunder-virus, (rubella virus) med evne til å indusere aktiv immunitet mot denne sykdom.

Uttrykket "svekket levende virus" anvendes i nærværende beskrivelse med henvisning til en rubella virus-stamme, hvis virulens er blitt svekket ved minst 21 passasjer i serie på primære kaninnyrevev kulturer.

Ifølge fremgangsmåten som beskrives i det følgende, oppnås en

modifisert virus og derved en vaksine som har høy antigenitet og som ikke gir noen vesentlig uønsket reaksjon når inokulert på barn.

Nærværet av uønskede reaksjoner, og blant dem mer spesielt den mulige disseminering av virus hos vaksinerte personer, er en av de store problemer ved utviklingen av en rubella virus av levende type.

Det er kjent at ved siden av komplikasjoner, slik som hjernebetennelse og trombocytopen purpura, som er alvorlig men ganske sjelden, og også artritt som ikke er uvanlig men vanligvis selvbegrensende og av kort varighet, er de mest alvorlige komplikasjoner ved denne sykdom av teratogen natur. Rubella er meget alvorlig tilstand for kvinner i den første tredjedel av graviditet, på grunn av sin virkning på kogenitale misdannelser hos fosteret, dødfødsel eller abort.

I denne henseende er det vesentlig at et barn som mottar en rubella vaksine av levende type ikke danner en potensiell fare for en gravid kvinne, med hvilken det kan komme i kontakt.

Inntil nu var de eneste mulige midler for å forebygge slike rubella foster-komplikasjoner enten å administrere gamma globulin i store doser til utsatte svangre kvinner eller utsette unge piker for rubella før de når kjønnsmoden alder.

Administrasjonen av gamma globulin betraktes langt fra av hver spesialist som en effektiv behandling, og av selvfølgelig grunner er det å utsettes for sykdommen i ung alder ingen akseptbar løsning av problemet.

Det er allerede tidligere kjent (James R. Prier, Basic Medical Virology, U.S.A., side 561, 1966 og Parkman et al. J. Immunol. 93, side 595-607 og 608-617, 1964) å dyrke rubella virus i forskjellige vevkulturer og blant dem primære kaninnyrevkulturer.

Det er nå overraskende blitt funnet at ved valg av en spesiell

vevkultur - som primær er kaninnyrevevkultur - i forbindelse med definerte behandlingsbetingelser, og mer spesielt definert antall av passeringer, er det mulig å fremstille en rubella-vaksine hvis administrasjon overraskende ikke oppviser noen vesentlig uønsket reaksjon og ikke oppviser de bivirkninger som opptrer ved administrasjon av rubella-vaksiner fremstilt i andre vevkultursystemer.

Ved uttrykket "ikke noen vesentlig uønskede reaksjoner" som angitt foran skal det fastslås ikke bare at inokulering av vaksine ifølge nærværende oppfinnelse stimulerer immunitet uten å indusere de vanlige patologiske symptomer for vanlig rubella, men også at ved kliniske forsøk som er utført med en vaksine ifølge oppfinnelsen er ingen serologiske eller virologiske tegn på infeksjon blitt fastslått ved utsatt intim kontakt.

Nærværende oppfinnelse vedrører således en fremgangsmåte til fremstilling av en vaksine mot rubella som inneholder en svekket, levende rubella virus som aktiv bestanddel, hvilken svekkede, levende rubella virus er oppnådd ved dyrkning av en rubella virusstamme på en primær kaninnyrevevkultur og fremgangsmåten karakteriseres ved at rubella virusstammen svekkes ved i serie å passere minst 21 ganger gjennom primære kaninnyrevevkulturer ved en temperatur mellom 28 og 36°C, idet varigheten for hver passering ikke overstiger 5 dager og at den oppsamlede, svekkede, levende rubella virus tilsettes som aktiv komponent i en vaksine.

En vaksine fremstilles derfor fra en egnet passasje i primære kaninnyre-celler under bruk av enhver teknikk som er kjent på området for slik fremstilling.

Rubella virus som anvendes for å utføre denne oppfinnelsen isoleres fra et typisk klinisk tilfelle under anvendelse av f.eks. halspenslinger eller urin- eller gurgelprøver. Prøvene fryses enten umiddelbart og holdes ved -60°C inntil anvendelse eller inokuleres umiddelbart i et egnet vevkultursystem, f.eks. primær afrikansk grønne apenyrre (GMK) eller annet vevkultursystem

som er kjent på området for slik isolering. Nærværet av rubella virus kontrolleres ved å pøde kulturer f.eks. med en entero-virus slik som Echovirus 11 eller Coxsackievirus A 9 på den 9. eller 10. dagen etter inokulering.

Ved å bruke spesielt antiserum fremstilt i kaniner mot en kjent RV-stamme er det mulig å identifisere rubella virus ved spesifikk nøytralisasjonsprøve i mottagelige celler slik som GMK-celler. Fraværet av tilfeldig forekommende apelignende virus kontrolleres i GMK-celler etter nøytralisasjon ved spesifikt antiserum, fremstilt i et annet celledsystem.

De primære kaninnyrecellekulturer for seriepassasjer fremstilles fortrinnsvis fra nyrer av dyr ikke eldre enn 3 uker. Foretrukket vekstmedium for primære kaninnyre-kulturer er Hanks' balanserte saltmedium, supplert med inaktivert kalveserum, lactalbumin hydrolysat og tryptose fosfat-suppe, men andre media som er kjent for fagmannen på området kan også anvendes. Inkubasjonstemperaturen er ikke over 36°C. Seriepassasjene utføres ved å inokulere kaninnyre-lag med alikvoter av den ovenstående væske fra den tidligere passasje og fortrinnsvis samle inn virusen mellom den 3. og 5. dag etter inokulering. Titrering av den innsamlede virus kan utføres ved anvendelse av interferensmetoden i GMK-kulturrør under anvendelse av f.eks. Echovirus 11 eller Coxsackievirus A 9 som angitt foran for isoleringstrinnet.

Ved et visst passasjenivå, ikke før den 21. og fortrinnsvis mellom den 21. og 60. passasje, kastes den ovenstående væske av de inokulerte kulturer på den 5. dag etter inokuleringen og lagene vaskes med en pufret saltoppløsning, f.eks. Eagle's oppløsning eller Hanks' oppløsning, og inkuberes videre med et opprettholdelsesmedium, f.eks. Hank' medium supplert med casein hydrolysat. Etter en ytterligere inkubasjon på 3 dager, samles den ovenstående væske og klares ved filtrering eller sentrifugering.

Alternativt utføres innsamling av virus etter frysing, oppthøing og rystning av kulturen i opprettholdelsesmediumet og

etterfølgende filtrering eller sentrifugering.

Det innsamlende RV, supplert eller ikke med et stabiliserende tilsetningsstoff, kan lagres enten i frossen tilstand, f.eks. ved ca. -60°C eller fryses i tørr tilstand. Den oppnådde vaksine administreres subkutant eller intramuskulært hvis nødvendig etter gjenfremstilling.

De følgende eksempler illustrerer oppfinnelsen

EKSEMPEL 1

En 3 uker gammel kanin fra en oppdrettingskoloni undersøkes på fraværet av patologiske skader etc. Begge nyrer blir aseptisk fjernet og kuttet i små stykker som bringes i kontakt med en pufret saltoppløsning av trypsin (2,5 g/l) og blandingen røres kontinuerlig om i 10 minutter ved en temperatur på 37°C . Væsken helles deretter av og erstattes av samme volum frisk trypsinoppløsning. Trypsinbehandlingen fortsettes så under omrøring inntil forbruk av vevet, og celler suspendert i væsken fjernes fra tid til annen og sentrifugeres så.

Cellesedimentet som er oppnådd, resuspenderes i Hanks' oppløsning og sentrifugeres igjen. Dette siste trinnet gjentas to ganger og det endelige celledsedimentet suspenderes i vekstmedium som består av Hanks' balanserte saltmedium med 10% inaktivert kalveserum, 0,5% laktalbumin hydrolysat og 0,1% tryptose fosfat suppe for å sikre en konsentrasjon på ca. 10^5 celler pr. ml.

Alikvote deler (1 ml) av den oppnådde celledsuspensjonen som inneholder hver ca. 10^5 celler helles i 10 kulturrør (12 mm diameter) som inkuberes i en lett skrå stilling ved 37°C i 4 dager. Etter denne inkubasjonsperioden er et fullstendig monolag utviklet. Næringsmediumet erstattes med et lignende volum friskt, like før virus-inokuleringen.

Det samme næringsmediumet anvendes før og etter virus-

125776

6

inokulering og hver primær kaninnyre-cellekultur angitt i dette eksempel fremstilles ifølge den her foran-beskrevne teknikk.

Alikvote deler (0,1 ml) av en rubella virus-stamme, isolert i primære GMK-kulturer og ført 3 ganger gjennom dette system blir, for videre karakterisering, inokulert i primære kaninnyre-kulturrør som inkuberes ved 34°C i en skrå stilling.

På den 5. dagen etter inokulering innsamles den ovenstående væske og den innsamlede virus identifiseres og titreres ved å anvende interferensmetoden beskrevet foran.

Titeret i GMK-celler etter denne første passasjen i kaninnyre-celler er $10^{2,83}$ InD₅₀ pr. ml.

Alikvote deler av den samlede ovenstående væske fra den første passasjen inokuleres i andre primære kaninnyre-kulturrør som inkuberes ved 34°C.

På den 5. dagen etter inokuleringen samles den ovenstående væske. Virusen titreres som angitt ved slutten av den første passasjen. Denne prosessen gjentas opp til den 21. passasjen, og inkubasjonsperioden av hver individuell passasje varierer mellom 3 og 5 dager.

Fra den 9. passasje av iakttas en cytopatisk effekt i primære kaninnyre-celler.

For den 21. passasje i kaninnyre-celler fremstilles primære kaninnyre-cellekulturer i 500 cm³ Roux flasker, under anvendelse av teknikken beskrevet foran.

Etter en inkubasjonsperiode på 3 dager ved 36°C oppnås et fullstendig monolag. Den ovenstående væske kastes derpå og erstattes av samme volum av samme vekstmedium og inokuleres med alikvote deler av virusmateriale fra den 20. passasje.

Etter videre inkubasjon i 5 dager ved 34°C, kastes den ovenstående væske og erstattes av et like volum av opprettholdelsesmedium som består av Hanks' oppløsning supplert med 0,3% casein hydrolysat. Etter videre inkubasjon i 3 dager ved 34°C, samles den ovenstående væske og klares ved sentrifugering.

Prøver er blitt tatt for titrering, identifisering og sikkerhetsprøving og virusen lagres ved -60°C.

Virustiteret er 10^5 InD_{50} pr. ml. prøvet i primære GMK-celler ved interferenssystemet.

Dette virusmaterialet blir så utsatt for sikkerhetsprøving som inkluderer bakteriesterilitet og fravær av fremmedstoffer ved inokulering i kaniner, hamstere, marsvin, mus og aper.

Ytterligere sikkerhetsprøving utføres i forskjellige vevkultur-systemer.

Preliminær potensprøving utføres ved å inokulere kaniner og aper med $10^{3.5}$ InD_{50} . Serumsnøytralisasjonsprøver utføres i GMK-celler.

Resultater angis i de følgende tabeller I og II.

125776

8

TABELL I

Motstoffsrespons av aper inokulert intramuskulært med $10^{3.5} \text{InD}_{50}$.

Ape nr.	Preinokulerings-serumprøve	Resultater av SN-prøve mot 30InD_{50} i GMK-celler			
		14 *	25 *	32 *	45 *
225	< 1/4	ND	1/8	1/16	1/16
509	< 1/4	ND	1/4	1/16	1/32
611	< 1/4	< 1/4	1/8	ND	1/32
831	< 1/4	1/4	1/32	ND	1/32
619	< 1/4	1/4	1/8	ND	1/16
857	< 1/4	1/4	1/8	ND	1/16
1064	< 1/4	ND	1/32	ND	1/64
953	< 1/4	ND	1/16	ND	1/32
1053	< 1/4	ND	1/4	ND	1/8

ND = ikke bestemt

* dager etter inokulering

TABELL II

Motstoffsrespons av kaniner inokulert subkutant med $10^{3.5} \text{InD}_{50}$

Kanin nr.	Preinokulerings-serumprøve	Resultater av SN/prøve mot 30InD_{50} i GMK-celler 24 dager etter inokulering
1	< 1/4	$\geq 1/8$
2	< 1/4	$\geq 1/8$
3	< 1/4	1/16
4	< 1/4	1/8
5	< 1/4	$\geq 1/8$
6	< 1/4	1/16
7	< 1/4	1/16
8	< 1/4	1/8

Viruspreparatene fordeles i glassampuller av hvilke hver inneholder 1 ml væske.

Ampullene fryses, tørres og forsegles.

Etter gjenfremstilling ved å tilsette 1 ml destillert vann, inokuleres vaksinen subkutan til mottagelige individer og de individuelle doser er ca. 125 InD₅₀.

Resultater av serologisk responsprøving utført på en gruppe av 25 seronegative barn (15 mottar vaksine og 10 kontroller lever i nær kontakt) gjengis i tabell III.

Fra de 15 vaksinerte barn, hadde 13 stigning i motstoff på opp til 1/32 eller mer (2 prøver - angitt ND - var ikke tilgjengelige på prøvetidspunktet). Ingen viste kliniske tegn på infeksjon. Alle 10 kontakter forble serologisk negative.

125776

10

TABELL III

Serologisk respons uttrykt i seronøytraliserings-motstandstiter

Individer	Alder (år)	Prevaksinasjons-prøve	Status	56 dager etter vaksinasjon
S.M.	2 1/2	< 4	V	32
V.S.	2	< 4	V	≥ 32
M.J.	2	< 4	V	≥ 32
N.R.	2	< 4	V	≥ 32
H.A.	1	< 4	V	32
DB.G.	2	< 4	C	< 4
VN.L.	2	< 4	C	< 4
R.F.	2	< 4	V	≥ 32
B.D.	2	< 4	C	< 4
J.A.	1 1/2	< 4	C	< 4
V.M.	1	< 4	V	≥ 32
E.P.	1	< 4	V	≥ 32
L.T.	1	< 4	C	< 4
C.C.	1	< 4	V	≥ 32
A.M.	1	< 4	V	≥ 32
R.O.	1	< 4	C	< 4
L.A.	2	< 4	V	ND
D.A.	2	< 4	C	< 4
G.O.	2 1/2	< 4	C	< 4
M.A.	2 1/2	< 4	V	ND
J.A.	1	< 4	C	< 4
P.A.	2 1/2	< 4	V	≥ 32
D.B.	3 1/2	< 4	V	32
GB.K.	5	< 4	V	8
GB.F.	4	< 4	C	< 4

V = vaksinert

C = kontakt

EKSEMPEL 2

Arbeidsmåten er den som er beskrevet i eksempel 1, men passasjene fortsettes opp til den 30. passasje i primære kaninnyre-cellekulturer.

En vaksine fremstilles fra disse og sikkerhetsprøvning utføres som beskrevet i eksempel 1.

Potensen for prepareringen undersøkes på dyr (aper).

Resultater angis i tabell IV

TABELL IV

Motstoffsrespons av aper inokulert intramuskulært med $10^{2.5} \text{InD}_{50}$.

Ape nr.	Preinokulerings- serumprøve	Resultater av SN-prøve mot 10 InD_{50} i GMK-celler	
		25*	39*
1098	< 1/4	1/8	ND
1091	< 1/4	1/8	ND
919	< 1/4	1/8	1/8
943	< 1/4	1/16	1/16

* dager etter inokulering

EKSEMPEL 3

Ved å gå ut fra virusmateriale fra den 21. passasje ved 34°C som oppnådd i eksempel 1, utføres 9 ytterligere seriepassasjer i primære kaninnyre-cellekulturer, men ved 28°C inklusive det siste trinn for vaksinepreparering.

Den oppnådde vaksine sikkerhetsprøves og inokuleres til kaniner og aper for potensprøvning.

Resultater angis i de følgende tabeller V og VI.

125776

12

TABELL V

Motstoffrespons av aper inokulert intramuskulært med
 $10^{2.0} \text{InD}_{50}$.

Ape nr.	Preinokulerings- serumprøve	Resultater av SN-prøve mot 10 InD_{50} i GMK-celler	
		25 *	39 *
1003	< 1/4	1/8	1/16
977	< 1/4	1/8	1/8

* dager etter inokulering

TABELL VI

Motstoffrespons av kaniner inokulert intramuskulært med
 $10^{2.0} \text{InD}_{50}$.

Kanin nr.	Preinokulerings- serumprøve	Resultater av SN-prøve mot 10 InD_{50} i GMK-celler	
		26 *	
29	< 1/4	1/8	
30	< 1/4	1/4	
31	< 1/4	1/16	
32	< 1/4	1/8	
33	< 1/4	1/4	

* dager etter inokulering

EKSEMPEL 4

Arbeidsmåten er den som er beskrevet i eksempel 1, men passasjene fortsettes opp til den 51. passasje i primære kaninnyre-cellekulturer og det endelige opprettholdelsesmedium består av Hanks' oppløsning supplert med 0,3% casein hydrolysat og inneholder 50 mcg kloramfenikol pr. ml. Hanks' oppløsning.

Etter inkubering på 9 dager ved 34°C, samles den ovenstående væske, klares ved sentrifugering og blandes med et like volum stabiliserende oppløsning bestående av 30 g kalium glutamat, 200 g sukrose og 50 mg kloramfenikol pr. liter destillert vann, og blandingen fordeles i glassampuller som inneholder 1 ml. vann.

Ampullene blir så fryse-tørret og forseglet.

Etter gjenfremstilling ved å tilsette 1 ml destillert vann inokuleres vaksinen subkutan til 65 seronegative individer, og titreringen av de individuelle doser når ca. $10^{2.6}$ InD_{50} i GMK-celler eller $10^{3.7}$ PFU (plateformede enheter) i kaninnyre 13-celler. En gruppe på 30 seronegative barn ble holdt i intim kontakt med de vaksinerte i en periode på 6 uker.

En serologisk responsundersøkelse utført på gruppen på 65 vaksinerte individer viste at alle uten 1 responderte på vaksinen med et gjennomsnittlig antistoff-titer på 1/128 som prøvet i HAI (Hemagglutininhemning) forsøk. Ingen viste kliniske tegn på infeksjon. Alle 30 kontakter forble serologisk negative.

EKSEMPEL 5

Arbeidsmåten er den som er beskrevet i eksempel 1, men passasjene fortsettes opp til den 61. passasje i primære kaninnyre-cellekulturer, og det endelige opprettholdelsesmedium består av Hanks' oppløsning supplert med 0,3% casein hydrolysat og inneholder 50 mcg kloramfenikol pr. ml Hanks' oppløsning.

Etter inkubering på 9 dager ved 34°C, samles den ovenstående væske, klares ved sentrifugering og blandes med et like volum av stabiliserende oppløsning bestående av 30 g kalsiumglutamat, 200 g sukrose og 40 mg kloramfenikol pr. liter destillert vann, og blandingen fordeles i glassampuller som inneholder 1 ml. vann.

Ampullene fryse-tørres så og forsegles.

Etter gjenfremstilling ved å tilsette 1 ml. destillert vann, inokuleres vaksinen subkutant til seronegative individer, og titreringen av de individuelle doser når ca. $10^{2.83}$ InD_{50} i GMK-celler eller $10^{3.9}$ PFU i kaninnyre-13 celler.

En serologisk responsprøve utført i en gruppe på 7 seronegative individer viste at alle responderte på vaksinen med et gjennomsnittlig titer på 1/64, som prøvet i HAI-forsøk.

Ingen viste kliniske tegn på infeksjon.

P a t e n t k r a v

1. Fremgangsmåte for å fremstille en vaksine mot rubella som inneholder en svekket, levende rubella virus som aktiv bestanddel, hvilken svekkede, levende rubella virus er oppnådd ved dyrkning av en rubella virusstamme på en primær kaninnyrevevkultur, k a r a k t e r i s e r t v e d at rubella virusstammen svekkes ved i serie å passere minst 21 ganger gjennom primære kaninnyrevevkulturer ved en temperatur mellom 28 og 36°C, idet varigheten for hver passering ikke overstiger 5 dager og at den oppsamlede, svekkede, levende rubella virus tilsettes som aktiv komponent i en vaksine.

2. Fremgangsmåte etter krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at antallet seriepasseringer på primære kaninnyrevevkulturer er maksimalt 60.

Anførte publikasjoner:

James E. Prier: Basic Medical virology (USA 1966) side 561