
Octrooiraad



⑩ A **Terinzagelegging** ⑪ **8201859**

Nederland

⑲ NL

- ⑤4 **Werkwijze ter bereiding van een chemisch, multi-component meningococcide vaccine.**
- ⑤1 Int.Cl³.: A61K39/095.
- ⑦1 **Aanvrager: Moskovsky Nauchno-Issledovatel'sky Institut Vaksin i Syvorotok imeni I.I. Mechnikova te Moskou.**
- ⑦4 **Gem.: Ir. G.F. van der Beek c.s.
NEDERLANDSCH OCTROOIBUREAU
Joh. de Wittlaan 15
2517 JR 's-Gravenhage.**

-
- ②1 Aanvraag Nr. 8201859.
- ②2 Ingediend 6 mei 1982.
- ③2 --
- ③3 --
- ③1 --
- ⑥2 --

-
- ④3 Ter inzage gelegd 1 december 1983.

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

Werkwijze ter bereiding van een chemisch, multi-component
meningococcide vaccine.

AANVRAAGSTER NOEMT ALS UITVINDERS:

1. Tatyana Nikolaevna BELOVA
2. Dmitry Dmitrievich EFIMOV

De onderhavige uitvinding heeft betrekking op een geneesmiddel en meer in het bijzonder op een werkwijze ter bereiding van een chemisch, multi-component meningococcide vaccine, dat bruikbaar is voor de immunoprofylaxe van ziekten zoals cerebrospinale meningococcide meningitis en meningosepticemie veroorzaakt door meningococci van alle bekend serogroepen A, B, C, D, X, Y, Z, 29E, W-135.

Er zijn thans methoden bekend voor de bereiding van chemische vaccines; bijvoorbeeld een methode voor de bereiding van een meningococcide-polysaccharide vaccine (zie Amerikaanse octrooischrift 3.636.192), dat gericht is tegen het effect van meningococci van de serogroepen A en C. Het actieve principe van dit vaccine zijn antigene groep-specifieke polysacchariden van meningococci van de groepen A en C. De werkwijze berust op het feit, dat een kweek van meningococci voorgesteld door de stammen Neisseria meningitidis A-1, Neisseria meningitidis C-11 gekweekt wordt op een vloeibaar voedingsmiddelmilieu en vervolgens wordt afgezet door een kationoogeen detergentend middel, zoals hexadecyltrimethylammoniumbromide. De winning van een onzuiver tussenprodukt wordt uitgevoerd door centrifugeren, vervolgens worden het afzettingsmiddel en het tussenprodukt gescheiden en wordt het laatste voorafgaand gezuiverd van nucleinezuren door precipitatie met ethanol. Daarna wordt verdikking van het onzuivere tussenprodukt uitgevoerd door afzetting met ethanol; na de afzetting wordt het tussenprodukt gezuiverd van proteïne door ultracentrifugeren, wordt het centrifugeprodukt met een mengsel van chloroform-butanol gemengd en wordt de water bevattende fase verzameld. Tenminste zes cycli van een dergelijke zuivering worden uitgevoerd. Daarna wordt het polysaccharide met ethanol enkele malen afgezet, wordt het residu in een verzadigde oplossing van natriumacetataat opgelost, opnieuw met ethanol neergeslagen, wordt het precipitaat in water opgelost en gecentrifugeerd en wordt het centrifugeprodukt verzameld en met ethanol neergeslagen. Er wordt een gezuiverd meningococcus polysaccharide van serogroep A en serogroep C verkregen. Het aldus bereide vaccine heeft een strikte groep specificiteit A en/of C en beschermt niet tegen meningococci van andere serogroepen, in het

8201859

bijzonder B. Verbreding van het serologische traject van de vaccinewerking maakt een extra opname van preparaten van andere antigenen van meningococci noodzakelijk, hetgeen speciale methoden vereist voor hun bereiding en een geschikte toename van de dosis tengevolge van de in-
 5 voer van de additionele componenten. Voorts zijn antilichamen, die gevormd zijn na de invoering van het vaccine, allen gericht tegen capsullegroep-specifieke polysacchariden A en/of C, maar zijn onwerkzaam tegen andere stoffen van de celwand van meningococci.

In de techniek is een werkwijze bekend voor de bereiding van
 10 meningococcusproteïne-vaccine van het serotype 2 (Jour.Experim. Med., 147, (1978) 629-644), die het actieve principe-proteïne van het externe membraan van meningococci van serotype 2, serogroepen B, C, Y, W-135 bevat. Het effect van dit vaccine is gericht tegen meningococci van serotype 2 van serogroepen B, C, Y, W-135. De werkwijze voor de bereiding
 15 van het vaccine omvat kweken van een cultuur van meningococci op een vloeibaar, proteïne-vrij voedingsmiddelmilieu. Gebruik wordt gemaakt van de stammen N. meningitidis m-986 en m-986-NCV-1. De kweekgroei wordt met schudden, uitgevoerd, de microbiële massa wordt onderling verweven als een neerslag na centrifugeren van het vloeibare milieu. De microbi-
 20 ële massa wordt geëxtraheerd, vervolgens wordt het gecentrifugeerde produkt verzameld door ultracentrifugeren, het centrifugeprodukt wordt aan gelfiltratie onderworpen en de fractie met groot molecuulgewicht van meer dan 7.000.000 Dalton wordt verzameld. Vervolgens wordt natriumdesoxycholaat tot de concentratie van 5% toegevoegd en wordt het
 25 mengsel gedurende 30 minuten op een temperatuur van 56°C verwarmd of Triton X-100 wordt toegevoegd en 30 minuten op kamertemperatuur gehouden of emulsogen BC-720 wordt toegevoegd. Het mengsel van het tussenprodukt met een detergerend middel wordt aan een ultracentrifuge behandeling onderworpen, het neerslag wordt met ethanol afgezet, opgelost en
 30 de fractie van een vrij volume wordt uit de oplossing gewonnen door gelfiltratie door sefadex G-150. De fractie met groot molecuulgewicht wordt met ethanol neergeslagen. Het verkregen preparaat van het proteïne van het serotype beschermt slechts tegen meningococci van een homo-
 loog serotype. Dit vaccine bezit een strikte typische specificiteit en
 35 vormt geen antilichamen tegen groeppolysacchariden. De verruiming van het serologische traject van de vaccinewerking maakt extra toevoer van andere antigenen van meningococci noodzakelijk, hetgeen specifieke methoden en een overeenkomstige dosistoename vereist tengevolge van de
 invoer van de additionele componenten. Antilichamen gevormd na de toe-
 40 diening van het vaccine zijn slechts gericht tegen proteïne of serotype

2 van het externe membraan van meningococci en is onwerkzaam tegen andere stoffen van de celwand van meningococci.

Eveneens in de techniek bekend is een werkwijze voor de bereiding van meningococcus vaccine, dat als het actieve principe hydrofobe verbindingen van een meningococcuspolysaccharide van groep B en het basisproteïne van serotype 2 van het externe membraan van meningococci bevat (Jour. Clin. Invest. 63, No.5, (1979), 836-848). Het vaccine effect is gericht tegen meningococci van serogroep B, serotypen 2, 4, 6, 7, 11, 14. De werkwijze voor de bereiding van het vaccine omvat de kweek van stammen van N-meningitidis M 1080 (B:P11: 3, 4, 7, 8); M 981 (B:P14: 5); M138 (B:P4, 7: 4); m986 (B:P2,6 : 2, 3, 7) op een vloeibaar, proteïnevrij milieu met schudden. Polysaccharide van groep B wordt gewonnen volgens de Gotschlich methode, die de toevoeging omvat van 0,1 % hexadecyltrimethylammoniumbromide aan de vloeibare kweek, verzameling van het neerslag, centrifugeren, scheiding van het afzettingmiddel van het onzuivere tussenprodukt, een voorafgaande zuivering door afzetting met ethanol, oplossing van het residu, herprecipitatie, wassen met ethanol, oplossen voor het verkrijgen van een preparaat van polysaccharide van groep B. Het externe membraanproteïne wordt gewonnen door de microbiële massa gedurende twee uren met 0,5% fenol te behandelen. Het microbiële residu wordt door centrifugeren van het vloeibare milieu, suspenderen daarvan in een bufferoplossing verzameld; het mengsel wordt driemaal gecentrifugeerd, het centrifugeprodukt wordt verzameld en aan ultracentrifuge onderworpen; het residu wordt verzameld en opgelost, door gelfiltratie door Sephadex G-100 van lypopolysacchariden gezuiverd, vervolgens gecentrifugeerd; uit het centrifugeprodukt wordt de fractie met groot molecuulgewicht van een vrij volume door gelfiltratie gewonnen, welke fractie met ethanol wordt neergeslagen, met ethanol wordt gewassen en in water wordt opgelost. Op deze wijze wordt een preparaat verkregen, dat een oplossing bevat van proteïne van serotypen 2, 4, 6, 7, 11 en 14. Het vaccine wordt, bereid door combinatie van het polysaccharide van groep B en proteïne van serotypen 2, 4, 6, 7, 11 en 14 van het externe membraan van meningococci. Het verkregen vaccine heeft niet het vermogen antilichamen te vormen tegen een dergelijke belangrijke component van de celwand van meningococci als lypopolysaccharide. Het vaccine veroorzaakt geen vorming van antilichamen tegen meningococci van serogroep A en daarom is voor de verruiming van de omvang van de werking ervan de toevoeging van supplementaire componentwerking ervan de toevoeging van supplementaire componenten noodzakelijk, in het bijzonder een polysaccharide van groep A. Het verkregen

mengsel van polysaccharide van groep B en proteïne van serotypen 2, 4, 6, 7, 11 en 14 is geen natuurlijke verbinding, maar een secundaire, kunstmatige, non-covalente, hydrofobe combinatie van afzonderlijke preparaten.

5 Voorts is in de techniek een werkwijze bekend voor de bereiding van meningococcusvaccine, dat als actief principe proteïne van het membraan van meningococci van serogroep B serotype 2 (zie Duits octrooi-schrift 2.848.965) bevat. Het effect van het vaccine is gericht tegen meningococci van serogroep B, serotype 2. De methode van de vaccine-be-
10 reiding omvat het kweken van stammen van N.meningitidis B-986 op een vloeibaar voedingsmiddelmilieu. De microbiële massa wordt behandeld met een detergentend middel, bijvoorbeeld natriumdesoxycholaat, 4M ureum, 1% emulsogeen, 1% Twin of 1% Triton X-100. De suspensie van microben in de detergentende oplossing wordt gecentrifugeerd, het centrifugeprodukt
15 wordt verzameld, het microbiële residu wordt opnieuw behandeld om het rendement te vergroten. De oplossing wordt aan een ultracentrifuge behandeling onderworpen, het residu wordt verzameld, opnieuw opgelost in een bufferoplossing van het detergentende middel onder behandeling met ultrageluid. De oplossing wordt door centrifugeren geklaard. Het prote-
20ïne wordt neergeslagen en met ethanol gewassen. Het proteïne residu wordt in 5% raffinose opgelost en uit de verkregen oplossing wordt het vaccine bereid. Aangezien het alleen bereid is voor proteïne van serotype 2, beschermt het vaccine niet tegen meningococcusinfectie van serogroep A, alsmede andere serotypen anders dan serotype 2. Het vaccine
25 veroorzaakt geen vorming van antilichamen tegen enkele belangrijke pathogenetische factoren van meningococci, zoals groeppolysacchariden en lypopolysacchariden.

Bij alle hiervoor vermelde werkwijzen voor de bereiding van een meningococcusvaccine wordt gebruik gemaakt van vloeibare voedingsmid-
30 delmedia, die gunstige omstandigheden creëren voor het kweken van meningococcimicroben, waarvoor de micro-organismen meer waardevolle fysiologische eigenschappen hebben en meer toxisch zijn. Het is noodzakelijk vast te stellen dat bij de methode van de vaccine-bereiding opeenvolgende trappen nodig zijn voor de zuivering van het vaccine uit lypo-
35 polysaccharide. Het gebruik van detergentende middelen bij de hiervoor besproken werkwijzen voor de winning van actieve principes van het vaccine maakt de werkwijze ingewikkeld, aangezien het extra zuiveringswerkingen van het detergentende middel noodzakelijk maakt.

Voorts maakt de winning van het actieve principe bij de hier-
40 voor beschreven werkwijzen, wanneer het actieve principe één

8201859

produkt bevat uit een complex van stoffen, die in de celwand van meningococci aanwezig zijn, extra zuiveringstechnieken noodzakelijk, die de werkwijze ingewikkeld maken en het gebruik van gekunstelde apparatuur vereist.

5 De onderhavige uitvinding is gericht op het verschaffen, door variatie van de werkwijzetrappen, van een zodanige methode, die het mogelijk maakt een chemisch, multi-component meningococcusvaccine te verkrijgen van een vooraf bepaald effect tegen meningococci van alle bekende serogroepen, dat onschadelijk, weinig reactief en geschikt voor
10 vaccinatie van zowel volwassenen als kinderen zal zijn, alsmede het gebruik van een vereenvoudigde methode en apparatuur zal mogelijk maken.

Dit oogmerk wordt bereikt doordat bij een werkwijze voor de bereiding van een chemisch, multi-component, meningococcide vaccine door het kweken van een meningococcikweek op een proteïnevrij voedingsmiddelmilieu, gevolgd door de winning van de polymere fractie met groot moleculgewicht, volgens de onderhavige uitvinding, de kweken van meningococci van serogroepen A, B en C gescheiden gekweekt worden op een vast, proteïnevrij voedingsmiddelmilieu, de verkregen microbiële massa van elk van de serogroepen gescheiden wordt gewassen door middel
15 van een isotone oplossing van natriumchloride met een pH van 7,0 tot 7,6, de verkregen kweekvloeistof met aceton wordt gedesinfecteerd, het droge residu in een bufferoplossing met een pH van 7,6 wordt opgelost met een concentratie van ten hoogste 0,2 mol en aan gelfiltratie wordt onderworpen voor het winnen van een polymere fractie met een moleculaire
20 re massa van tenminste 100.000 Dalton, de verkregen fractie met aceton wordt behandeld, het verkregen residu wordt gewassen en met aceton wordt gedroogd, de aldus bereide droge residuen van fracties van elk van de serogroepen A, B en C in gewichtsverhoudingen van respectievelijk 14:13:13 worden gemengd. Betreffende de kweken van meningococci
25 wordt bij voorkeur gebruik gemaakt van stammen van serogroepen A, B en C Neisseria meningitidis stam A-208, stam B-13090 of stam B-23247, of stam B-C₅; stam C-0638. Alle hiervoor vermelde stammen zijn gedeponeerd in de verzameling van kweken van de State Institute of Standardization and Control genoemd naar L.A. Tarasevich.

35 Voor het proteïnevrije, vaste voedingsmiddelmilieu wordt geadviseerd gebruik te maken van het voedingsmiddelmilieu met de volgende samenstelling:

droog milieu 199	17,5 g
vleesnat	400 ml
40 zetmeelpasta (1,5%)	100 ml

8201859

gedestilleerd water	500 ml
agar-agar	20 g
natriumchloride	10 g

20% oplossing van NaOH tot pH 7,4 tot 7,6.

5 Om een meer volledige oplossing van stoffen van de celwand te waarborgen, wordt aan de verkregen kweeksuspensie na desinfectie een 20%'s oplossing van NaOH toegevoegd tot een pH-waarde van 8,2 tot 8,4. De werkwijze volgens de onderhavige uitvinding maakt het mogelijk een chemisch, multi-component meningococcide vaccine te verkrijgen met een
 10 vooraf bepaald effect op meningococci van alle bekende serogroepen -A, B, C, D, X, Y, Z, 29E, W-135. Het vaccine is onschadelijk en weinig reactief, weshalve het gebruikt kan worden voor de immunisering van zowel volwassenen als kinderen. Het gebruik bij de werkwijze van vaste, proteïnevrije voedingsmiddelmedia maakt het mogelijk microben van
 15 meningococcus te verkrijgen in een lage toxische toestand, aangezien de werkwijze van de groei ervan onder ongunstige omstandigheden verloopt. Dit maakt het mogelijk in het actieve principe van het vaccine lypopolysaccharide van de celwand ten gevolge van de lage toxiciteit ervan, vast te houden. De ongunstige omstandigheden van kweken op een vast
 20 voedingsmiddelmilieu dient als reden voor de vorming van een celwand van meningococci met losse structuur, die gemakkelijk wordt opgelost na uitwas met een fysiologische oplossing en geen gebruik van detergerende middelen noodzakelijk maakt. Dit alles vereenvoudigt de procestechnologie, aangezien een aantal procestrappen voor zuivering van het actieve
 25 principe, die anders aanwezig zijn bij de gebruikelijke werkwijzen voor de bereiding van het vaccine, wordt uitgesloten. Voorts maakt de winning van het actieve principe van het vaccine volgens de onderhavige uitvinding geen extra zuiveringsbewerkingen noodzakelijk anders dan bij de bekende processen, aangezien het actieve principe een natuurlijk
 30 complex van alle stoffen aanwezig in de celwand van meningococci bevat.

De werkwijze volgens de onderhavige uitvinding wordt op de volgende wijze uitgevoerd.

Als vaccinestammen A, B en C wordt bij voorkeur gebruik gemaakt
 35 van stammen van Neisseria meningitidis, stam A-208, stam B-13090, of stam B-23247, of stam B-C₅, stam C-0638.

Voor het verkrijgen van een inoculatiekweek van de vaccinestammen van meningococci wordt een ampul met een droge kweek onder steriliteitsomstandigheden geopend en in twee porties verdeeld, die in twee
 40 Petrischalen geïnoculeerd worden met een vast voedingsmiddelmilieu, dat

8201859

20% bloedserum bevat. De kweekbehandeling wordt uitgevoerd bij een temperatuur van 37°C in een hermetisch afgedichte vochtige kamer met een toorts gedurende 18-20 uren. Om produktiekweken te verkrijgen worden de inoculatiekweken uit de Petrischalen gewassen onder toepassing van een oplossing volgens Hanks, die op een temperatuur van 37°C is voorverwarmd. Er wordt een suspensie verkregen, die 1 biljoen microbiële lichamen in 1 ml bevat. In elke scheidingskolf (plaatgaas), die een vast voedingsmiddelmilieu van de hiervoor vermelde samenstelling bevat, worden 5 ml van een dergelijke suspensie van meningococci geïnoculeerd. De kweek van de produktiekweek (elke stam gescheiden) wordt uitgevoerd op een vast voedingsmiddelmilieu met de volgende samenstelling:

droog milieu 199 (preparaat "Casamino zuren "Difco")	17,5 g
vleesnat	400 ml
15 zetmeelpasta (1,5%)	100 ml
gedestilleerd water	500 ml
agar-agar	20 g
natriumchloride	10 g

20% oplossing van NaOH wordt toegevoegd tot pH 7,4 tot 7,6.

20 Het milieu wordt in een autoclaaf bij een temperatuur van 115°C gedurende 30 minuten dagelijks gedurende 3 dagen gesteriliseerd. De kweekbehandeling wordt 18-20 uren bij een temperatuur van 37°C uitgevoerd. Na voltooiing van de groei van de kweek worden de plaatgazen visueel waargenomen. De produktiekweek dient in de vorm van ronde, gladde, vlakke, enigzins opalescerende koloniën te groeien met een diameter tot 3 mm met een blauwachtige kleur in doorvallend licht. Na vaststelling van non-typische koloniën wordt het plaatgaas verwijderd. Van elk plaatgaas wordt een smeersel genomen, dat volgens Gram wordt gekleurd. Microscopische analyse van smeersels dienen slechts Gram-negatieve cocci te geven. De produktiekweek van meningococci wordt met een 0,9%'s oplossing van NaCl met een pH van 7,0 tot 7,6 gewassen; aan de gewassen kweek wordt merthiolaat toegevoegd tot een concentratie van 0,01%. Om de suspensie volledig te desinfecteren wordt deze 2 uren onder roeren op kamertemperatuur gehouden. Voor een meer volledige oplossing van de stof van de celwand wordt aan de verkregen kweeksuspensie na desinfecteren een 20%'s oplossing van natriumhydroxide tot een pH van 8,2 tot 8,4 toegevoegd. Om de microbiële rest te verwijderen wordt de suspensie van de produktiekweek gecentrifugeerd. Een transparant centrifugeproduct wordt verzameld. Het centrifugeproduct wordt op een temperatuur van +4 tot +6°C gekoeld en aceton wordt toegevoegd. Het verkregen meng-

sel wordt gedurende een periode van 18 tot 20 uren op een temperatuur van +4 tot +6°C gehouden. Het verkregen residu wordt door centrifugeren afgescheiden, gewassen en met aceton gedroogd. Een droog residu wordt aldus verkregen, dat een geel of lichtbruin poeder bevat. Het droge re-
5 sidu van de produktiekweek wordt gescheiden uit elke stam verkregen. Het verkregen droge residu van elke stam wordt gescheiden opgelost in een bufferoplossing, bijvoorbeeld in een bufferoplossing van 0,01M tris, 0,01M HCl, 0,15 M NaCl met 0,01% NaNO₃; pH=7,6. De verkregen oplossing wordt ter klaring gecentrifugeerd en aan gelfiltratie onder-
10 worpen waarbij een polymere fractie met een molecuulgewicht van niet minder dan 100.000 Dalton wordt gewonnen. De verzamelde fractie, die het vaccinemateriaal bevat, wordt gekoeld op een temperatuur van +4 tot +6°C en aceton wordt toegevoegd. Voor de vorming van een precipitaat wordt het mengsel 18 tot 20 uren bewaard. Het residu wordt door centri-
15 fugeren afgescheiden, gewassen en met aceton gedroogd. Er wordt een droog volumineus poeder met een witte of geelachtige kleur verkregen. De verkregen droge residuen van de fractie van elk van de serogroepen A, B en C worden op molecuulgewicht gecontroleerd. De controle van het molecuulgewicht van droge vaste stoffen van de fracties wordt uitge-
20 voerd volgens de gelfiltratiemethode in een kolom, die met de gel Sephadex G-100 is gevuld. De elutie wordt uitgevoerd met een 0,14 molaire oplossing van natriumchloride, die 0,05 mol trishydroxymethylaminomethaan, 0,001 mol van het dinatriumzout van ethyleendiaminetetra-
25 azijnzuur met een pH van 7,5 bevat. Bij de elutie worden hoeveelheden van 3-3,5 ml verzameld. De elutiesnelheid is 15 tot 20 ml/h. Het eerst bepaald wordt het vrije en eind (inwendige) volume van de gel in de kolom. Tot dit doel worden in de kolom 3 ml van de elutieoplossing gebracht, die 5 mg blauw dextran (molecuulgewicht 2.000.000 Dalton) en 5 mg merthiolaat bevat; de gelfiltratie wordt vervolgens uitgevoerd en de
30 verzamelde hoeveelheden van 3-3,5 ml worden aan een spectrometrische analyse bij 280 mm onderworpen. Het elutievolume van de eerste blauwe afvoerstroompiek komt overeen met het vrije volume van de kolom. Het elutievolume van de tweede, kleurloze piek komt overeen met het eind (inwendige) volume van de kolom. Het droge proefpreparaat wordt in de
35 elutie-oplossing opgelost in een hoeveelheid van 15 mg in 3 ml, ter klaring gecentrifugeerd, in de kolom gebracht en aan gelfiltratie onderworpen. Porties van 3-3,5 ml van het eluaat worden verzameld en daarna aan spectrofotometrie bij 280 mm onderworpen. Het totale volume van het geanalyseerde eluaat dient overeen te komen met het eindvolume
40 van de kolom. Het geanalyseerde preparaat van de vaccinefractie dient

8201859

uit de kolom te vloeien als één piek en het elutievolume ervan dient overeen te komen met het vrije volume van de kolom. Wanneer in het preparaat fracties zijn, die pieken met het elutievolume vormen die het vrije volume van de kolom overschrijden, kan dit preparaat niet ge-
 5 bruikt worden voor de vaccineproductie en dient aan een verdere zuivering te worden onderworpen.

De verkregen droge vaste stoffen van frakties van elk van de serogroepen A, B en C worden onder steriele omstandigheden in een gewichtsverhouding van respectievelijk 14:13:13 gemengd. Het gelijkmatig ge-
 10 mengde mengsel van de preparaten van residuen van drie stammen wordt onder steriele omstandigheden aan kolven toegediend, de kolven worden afgedicht en op een donkere plaats bij een temperatuur binnen het traject van 0 tot 4°C bewaard.

Bij toepassing wordt het droge vaccine in een isotone injectieoplossing van natriumchloride opgelost. De totale hoeveelheid van de droge stoffen van de celwand van meningococci van groepen A, B en C in het vaccine dient gelijk aan 400 µg/ml te zijn. Het vaccine kan zowel in droge als in vloeibare toestand bereid worden.

Het aldus bereide vaccine bestaat uit een oplossing van stoffen van de celwand van meningococci van serogroepen A, B en C, die een complexe verbinding zijn van serogroep mucopolysaccharide, het gebruikelijke proteïne, lypopolysaccharide, meningococci-proteïnen van het algemene type aanwezig in de vorm van polymerenverbindingen met een groot molecuulgewicht (met een moleculaire massa van tenminste
 25 100.000 Dalton) die de vorming van antilichamen teweegbrengen na vaccinatie van menselijke individuen, die bactericide zijn tegen meningococci van serogroepen A, B en C. Het uiteindelijke vaccine wordt aan verschillende controlebewerkingen onderworpen. De fysische eigenschappen van het vaccine worden gecontroleerd door visuele waarneming
 30 van ampullen die het vaccine bevatten. Het vaccine dient een kleurloze transparante of enigszins opalescente oplossing te zijn, die geen vreemde insluitingen, resten of tekenen van troebeling bevat. De ampullen met het vaccine, die niet aan deze eisen voldoen, worden verwijderd.

Eveneens wordt de kwaliteit van de afdichting en de etikettering van de ampul en de steriliteit van het vaccine gecontroleerd. De controle van de onschadelijkheid van het vaccine wordt bij witte muizen uitgevoerd. De proef wordt uitgevoerd op 5 witte muizen, die 5 dagen in quarantaine worden gehouden voordat de proef wordt uitgevoerd. Bij het
 40 begin van de proef dient elke muis 12-14 g te wegen. Elke muis ontvangt

8201859

intraperitoneaal 1 ml van het vaccine of twee mensdosis. Tot dit doel wordt de inhoud van 2 ampullen in een injectienaald gebracht. De proefmuizen worden gedurende 7 dagen geobserveerd. Gedurende deze tijd dient geen dood van muizen in de proefgroep te worden geregistreerd.

5 De onschadelijkheid van het vaccine wordt eveneens bij cavia's beproefd. Het experiment wordt uitgevoerd bij 5 cavia's, die elk 350-400 g wegen; voorafgaande aan de proef worden de cavia's in quarantaine gehouden. Elke cavia ontvangt intraperitonenaal 5 ml van het vaccine, d.w.z. 10 mensdosis. De proefcavia's worden gedurende 7 dagen geobserveerd. Gedurende deze tijd dient geen dood van cavia's in de onderzochte groep geregistreerd te worden. De controle van pyrogene eigenschappen van het vaccine wordt bij konijnen uitgevoerd. Het vaccine dient niet pyrogeen voor konijnen te zijn na intraveneuze toediening ervan in de verdunningsverhouding van 1:40.000 in het volume van 1 ml per kg lichaamsgewicht van het konijn. De proef wordt uitgevoerd bij gezonde konijnen van beide geslachten, elk met een gewicht van 1,5 tot 2,5 kg, gevoed met een volwaardig dieet. De konijnen worden 5 dagen voorafgaande aan het experiment gekozen. De weging wordt om de andere dag gedurende tenminste 3 maal uitgevoerd. Gedurende de tijdsperiode 20 voorafgaande aan het experiment (5 dagen) dient geen verlies van lichaamsgewicht bij de konijnen geregistreerd te worden. Gedurende 3 dagen voorafgaande aan de proef wordt temperatuurcontrole bij alle proefkonijnen uitgevoerd. De uitgangstemperatuur dient binnen het traject van 38,5 tot 39,5°C te zijn. 24 Uren voor de proef worden de konijnen in een ruimte geplaatst, waarin de pyrogene proef wordt uitgevoerd. Voorafgaande aan en gedurende het experiment ontvangen de konijnen geen voedsel, alleen water wordt zonder beperking ter beschikking gesteld. Het pyrogene karakter van het vaccine wordt bij 3 konijnen beproefd.

30 De proefoplossing voor elk konijn wordt bereid onder toepassing van een afzonderlijke ampul met het vaccine. Voor verdunning van het vaccine wordt gebruik gemaakt van een 0,9% isotone oplossing van natriumchloride, die voor injecties bestemd is. Elk van de konijnen (drie stuks) ontvangt intraveneus de bereide oplossing van het vaccine 35 verdund in de verhouding van 1:40.000 in een hoeveelheid van 1 ml per 1 kg van het lichaamsgewicht van het dier. Het vaccine wordt beschouwd als de pyrogene proef te doorstaan, wanneer na de injectie bij geen van de drie proefkonijnen bij geen van de drie proefmetingen (met intervallen van 1 uur) van de lichaamstemperatuur, de toename ervan niet meer 40 is dan 0,6°C in vergelijking met de begintemperatuur en in totaal mag

de temperatuuroename bij alle drie konijnen niet $1,4^{\circ}\text{C}$ overschrijden. Wanneer bij een of twee konijnen de lichaamstemperatuur met meer dan $0,6^{\circ}\text{C}$ wordt verhoogd en in totaal meer dan $1,4^{\circ}\text{C}$ wordt de proef bij 5 konijnen herhaald. Het vaccine wordt beschouwd als de pyrogene proef te 5 doorstaan, wanneer in niet meer dan 3 konijnen uit het totale aantal van 8 konijnen de individuele toename van de lichaamstemperatuur niet meer dan $0,6^{\circ}\text{C}$ is en de totale toename van de lichaamstemperatuur bij alle 8 konijnen niet meer dan $3,7^{\circ}\text{C}$ is. De controle van serologische activiteit van het vaccine wordt eveneens uitgevoerd, alsmede de vacci- 10 ne-capaciteit, die de vorming van bactericide antilichamen na vaccinatie van menselijke individuen veroorzaakt.

Het vaccine wordt beschouwd als in staat te zijn de vorming van bactericide antilichamen bij mensen te veroorzaken in het geval dat tenminste 4 van 5 gevaccineerde mensen in serum verkregen na de vacci- 15 natie bactericide antilichamen zijn gevormd met betrekking tot elk van de drie onderzochte stammen in een gehalte, dat vier maal het gehalte van bactericide antilichamen van het serum genomen voorafgaande aan de immunisering overschrijdt. Wanneer bij minder dan 4 personen uit de 5 een viervoudige toename van het gehalte van bactericide antilichamen 20 met betrekking tot elke bijzonder stam, die voor het experiment is gekozen, wordt waargenomen, wordt de proef herhaald. In dit geval wordt de proef uitgevoerd bij 10 vrijwilligers. Bij tenminste 8 daarvan dient een viervoudige toename van het gehalte van bactericide antilichamen met betrekking tot elk van de drie stammen in vergelijking met de waar- 25 de van het gehalte voorafgaande aan de vaccinering te worden waargenomen.

Het vaccine volgens de uitvinding is op onschadelijkheid voor menselijke individuen onderzocht.

Deze proef heeft een specifiek belang tengevolge van het feit, dat 30 het actieve principe van het vaccine 12 tot 18% lypopolysaccharide bevat, dat beschouwd wordt als een endotoxine, dat schadelijke bijwerkingen bij de vaccinatie veroorzaakt. Onder klinische omstandigheden (met ziekenhuisopname voor een uitgebreid onderzoek) is de onschadelijkheid van het vaccine onderzocht bij 20 vrijwilligers, die hypoder- 35 maal 1 dosis van het vaccine - $0,5\text{ ml}$, die $200\text{ }\mu\text{g}$ van het actieve principe van de celwand van meningococci bevat, ontvingen. De leeftijd van de vrijwilligers varieerde van 18 tot 48 jaar. Bij de onder klinische omstandigheden gevaccineerde patiënten, werd de algemene gezondheid onderzocht - gedetailleerde en regelmatige bepaling van de temperatuurre- 40 actie, controle van plaatselijke reacties, systematisch onderzoek door

klinische artsen, elektrocardiografie en elektroëncefalografie, systematische bepaling van hemogram, urine analyse, kenmerken van het zuur-alkali evenwicht van het bloed. Alle geregistreeerde parameters zijn binnen het traject van normale fysiologische reacties en laten de klinische onschadelijkheid van het vaccine volgens de onderhavige uitvinding voor volwassenen zien.

Bepaling van onschadelijkheid en reactiviteit van het vaccine onder laboratoriumomstandigheden is uitgevoerd bij vrijwilligers met een leeftijd van 18 tot 22 jaar, die zware arbeid verrichten onder de omstandigheden van het warme klimaat van een droge steppe als geografische zone bij onvoldoende acclimatisering en aanpassing aan dergelijke omstandigheden. Er werden vier groepen vrijwilligers gevaccineerd, elk van 110 personen. Bij elk van de groep vrijwilligers werd hypodermale door middel van een injectienaald: 1) 0,25 ml van het vaccine (100 µg van het actieve principe); 2) 0,5 ml van het vaccine (200 µg van het actieve principe); 3) 1,0 ml van het vaccine (400 µg van het actieve principe) en 4) controlegroep - 0,5 ml van een fysiologische injectieoplossing geïnjecteerd. Bij de met het meningococcusvaccine gevaccineerde patiënten werden zwakke temperatuurreacties (tot 37,5°C) niet frequenter waargenomen dan bij de controlegroep (50%). Middelmatige temperatuurreacties (tot 38°C) werden waargenomen in afzonderlijke gevallen (5 resp. 2 personen bij elke groep van 110 personen bij de dosis van het vaccine van 0,5 resp. 1 ml) en waren afwezig in het geval van de dosis van 0,25 ml. Roodkleuring met een diameter tot 2,5 cm zonder infiltratie werd waargenomen bij 3 personen, die met 0,5 ml van het vaccine waren gevaccineerd. De bloedonderzoekparameters (met registratie van hemogrammen), alsmede urine-analyse, elektrocardiografie en algemeen onderzoek wijzen op onschadelijkheid van het vaccine na hypodermale toediening daarvan aan volwassen personen in de dosering tot 1,0 ml.

Bepaling van onschadelijkheid en reactiviteit van het vaccine onder veldomstandigheden zijn uitgevoerd bij 5000 personen met een leeftijd van 18 tot 22 jaar, die hypodermale geïnjecteerd werden door middel van een naaldloze spuit met 0,5 ml van het vaccine (200 µg). De gevaccineerde personen verrichten zware fysieke arbeid in het warme klimaat van de droge steppe als geografische zone onder de omstandigheden van onvoldoende acclimatisering en aanpassing aan dergelijke omstandigheden. Bij geen van de gevaccineerde personen werd achteruitgang van gezondheid of vermindering van werkcapaciteit waargenomen, hetgeen de onschadelijkheid van het vaccine bij hypodermale toediening door middel

van een naaldloze spuit in de dosis van 0,5 ml (200 µg van het actieve principe) laten zien.

Onschadelijkheid en reactiviteit van het vaccine voor kinderen werd onderzocht door hypodermale injecties van 0,2 ml (80 µg van het actieve principe) bij kinderen van 6 maanden tot 2 jaar en 0,25 ml (100 µg van het actieve principe) bij kinderen van 3 tot 7 jaar. De gegevens van de klinische waarneming bij de kinderen, alsmede instrumenteel en allergologisch laboratorium onderzoek gaven aanleiding om te concluderen dat de gebruikte doses van het vaccine - 0,2 ml en 0,25 ml - onschadelijk en toelaatbaar waren.

Het immuniologische rendement van het vaccine is onderzocht door bepaling van bactericide antilichamen in de gevaccineerde personen van 18 tot 22 jaar, die hypodermaal door middel van een injectienaald het vaccine ontvingen in de doses 0,25 ml (100 µg van het actieve principe) - 56 personen; 0,5 ml (200 µg) - 55 personen; 1,0 ml (400 µg) - 57 personen. Bij 152 personen uit het totale aantal van 168 gevaccineerde personen (d.w.z. in 90,4%) werd 22-30 dagen na de vaccinatie een viervoudige en hogere toename van gehalten bactericide antilichamen ten opzichte van meningococci van de drie serogroepen A, B en C vastgesteld. Er werden proeven uitgevoerd over het epidemiologische rendement van het vaccine: 400 personen werden subcutaan gevaccineerd met het chemische, multi-component meningococcus vaccine volgens de onderhavige uitvinding; de gevaccineerde personen van 18 tot 22 jaar waren onder omstandigheden van verhoogd risico van ziek worden met gegeneraliseerde vormen van meningococcusinfectie. Elke groep van 110 personen werd gevaccineerd met de dosis van 0,25 ml (100 µg van het actieve principe) en 1,0 ml (400 µg van het actieve principe) en 180 personen met de dosis van 0,5 ml (200 µg van het droge actieve principe). Gedurende 3 maanden van waarneming (vanaf de vaccinatiedag) werden geen ziekten van gegeneraliseerde vormen van meningococcusinfectie geregistreerd onder de gevaccineerde personen, terwijl onder de niet gevaccineerde personen, die onder dezelfde omstandigheden verkeerden en in contact waren met de gevaccineerde personen, zowel op het werk als thuis, nog grote aantallen ziekten werden waargenomen met gegeneraliseerde vormen van meningococcus infectie.

Voor een beter begrip van de onderhavige uitvinding licht het volgende voorbeeld de werkwijze voor de bereiding van een chemisch, multi-component meningococcusvaccine toe.

Voorbeeld I.

Vaccine-stammen van meningococci van serogroepen A, B en C worden

8201859

in afgedichte ampullen onder gelyofiliseerde omstandigheden bewaard. De produktie van het preparaat, dat in de vaccine-samenstelling is opgenomen, wordt gescheiden uitgevoerd voor elke stam van de drie serogroepen. Serogroep A - Neisseria meningitidis stam A-208, serogroep B -
 5 Neisseria meningitidis stam B-13090, serogroep C - stam C-0638. Voor de bereiding van de inoculatiekweek, wordt de inhoud van de ampul in twee groepen verdeeld, die in twee Petrischalen geïnoculeerd worden met een vast voedingsmiddelmilieu, dat 20% bloedserum bevat. De kweek wordt
 10 uitgevoerd bij een temperatuur van 37°C in een vochtige ruimte in een atmosfeer, die 10% CO₂ bevat, gedurende 18-20 uren.

Om produktiekweken te verkrijgen worden de inoculatiekweken uit de Petrischalen gewassen voor het verkrijgen van een suspensie, die 1 biljoen microbiële lichamen in 1 ml bevat. Deze suspensie wordt in scheidingskolven geïnoculeerd, die een dicht, proteïnevrij semi-synthetisch
 15 voedingsmiddelmilieu bevatten, bestaande uit de volgende componenten:

droog milieu 199 (Casaminozuren "Difco")	17,5 g
vleesnat	400 ml
zetmeelpasta (1,5%)	100 ml
gedestilleerd water	500 ml
20 agar-agar	20 g
natriumchloride	10 g

20%'s NaOH oplossing wordt toegevoegd tot pH 7,4-7,6.

Het milieu wordt in een autoclaaf bij een temperatuur van 115°C gedurende 30 minuten dagelijks gedurende 3 dagen gesteriliseerd. In elke
 25 scheidingskolf worden 5 ml van de suspensie geïnoculeerd. De suspensie van meningococci van elk van de drie serogroepen wordt in 100 scheidingskolven geïnoculeerd.

De groei van de produktiekweek wordt uitgevoerd bij een temperatuur van 37°C in een vochtige ruimte in een atmosfeer, die 10% CO₂
 30 bevat, gedurende 18-20 uren. Na voltooiing van de groei wordt de produktiekweek uitgewassen door middel van een 0,9%'s oplossing van natriumchloride met een pH van 7,2-7,4 door aan elke scheidingskolf 15-20 ml van de oplossing toe te voegen. De wasvloeistoffen van de scheidingskolven worden verenigd tot 1.000-2.000 ml van de suspensie van elke af-
 35 zonderlijke serogroep van meningococci. Aan elke suspensie wordt thio-mersal (merthiolaat) toegevoegd in een hoeveelheid van 10 mg per 100 ml van de suspensie, d.w.z. tot een concentratie van 0,01%.

De suspensies worden 2 uur op kamertemperatuur gehouden, terwijl elke 20-30 minuten werd geroerd.

40 Direkt na het uitwassen van het vaccine uit de scheidingskolven en

8201859

de toevoeging van merthiolaat wordt een 20%'s oplossing van NaOH toegevoegd aan de suspensie tot een pH van 8,2-8,4.

De suspensie wordt gecentrifugeerd om de microbiële massa volledig neer te slaan, een transparant centrifugeprodukt wordt verzameld en het
5 neerslag wordt verwijderd.

Het centrifugeprodukt van de produktiekweek wordt op 4-6°C gekoeld en 2 volumedelen aceton, vooraf gekoeld tot dezelfde temperatuur, worden toegevoegd; het mengsel wordt 18 tot 20 uren op 4-6°C gehouden om een neerslag te vormen. Het verkregen neerslag wordt door centrifugeren
10 afgescheiden, driemaal met op 4-6°C gekoelde aceton gewassen en onder een stroom lucht in centrifuges gedroogd. Een droog preparaat van het centrifugeprodukt van de produktiekweek wordt aldus verkregen, dat uit een geel poeder bestaat. Dit preparaat wordt in kolven bewaard, die met een rubberstop goed zijn gesloten in een droge omgeving bij kamertempe-
15 ratuur.

De opbrengst van het droge preparaat is 10 tot 20 g uit 100 scheidingskolven.

De winning van de vaccinefractie uit het droge preparaat voor elke serogroep van meningococci wordt uitgevoerd volgens de gelfiltratiemethode door Sephadex G-100. Fractionering wordt uitgevoerd onder steriele omstandigheden. De uit het vrije volume van de kolom geëluëerde stof wordt bij het proces van de gelfiltratie verzameld. De elutie wordt uitgevoerd door middel van een steriele, 0,9%'s oplossing van natriumchloride met een pH van 7,4 tot 7,6.
20

De bij de gelfiltratie verzamelde stof, geëluëerd uit het vrije volume en die het vaccinemateriaal bevat, wordt op een temperatuur van 4-6°C gekoeld en twee volumina gekoelde aceton worden toegevoegd. Voor de precipitatie wordt het mengsel 18-20 uren op de temperatuur van 4-6°C gehouden.
25

Het verkregen precipitaat wordt door centrifugeren afgescheiden, driemaal met gekoelde aceton gewassen en onder een luchtstroom gedroogd.
30

Aldus wordt een droog volumineus poeder verkregen met een witte of geelachtige kleur. De opbrengst van het droge preparaat van de vaccinefractie bedraagt 150 tot 200 mg uit 100 scheidingskolven.
35

De verkregen droge vaste stoffen van fracties voor elk van de serogroepen A, B en C worden onder steriele omstandigheden met elkaar gemengd in de gewichtsverhouding 14:13:13. De totale hoeveelheid droge stof van de celwand van meningococci van serogroepen A, B en C in het
40 vaccine is 400 µg/ml.

8201859

Het verkregen mengsel wordt onder steriele omstandigheden in kolven afgevuld in de hoeveelheid van 10 doses (met de hoeveelheid van 1 dosis, die 200 µg droge vaste stoffen van het actieve principe bevat, berekend voor gebruik met verdunning in 0,5 ml van de isotone injecteerbare oplossing van natriumchloride). De opbrengst van het eindvaccine van de 300 scheidingskolven (100 scheidingskolven voor elk van de serogroepen) is 1200 tot 1500 doses. De levensduur van het vaccine is 1 jaar vanaf de datum van de bereiding ervan.

Voorbeeld II.

10 De werkwijze voor de bereiding van het vaccine wordt op een soortgelijke wijze uitgevoerd als beschreven in voorbeeld I. Als stam van serogroep B wordt N-meningitidis stam B-23247 gebruikt.

De verkregen droge vaste stoffen van fracties van elk van de serogroepen A, B en C worden in isotone injectie-oplossingen van natriumchloride opgelost in een zodanige hoeveelheid, dat 1 ml van het vaccine de volgende hoeveelheden zal bevatten:

140 µg van het preparaat van meningococci van serogroep A,

130 µg van het preparaat van meningococci van serogroep B en

130 µg van het preparaat van meningococci van serogroep C.

20 Direct na oplossing, in isotone injectie-oplossing van natriumchloride, van droge vaste stoffen van fracties van elk van de serogroepen A, B en C wordt de verkregen oplossing aan een steriliserende filtratie onderworpen door filters met een poriëngrootte van niet meer dan 0,22 µm en eveneens onder steriele omstandigheden toegevoegd aan ampullen met hoeveelheden van 0,5 ml en de ampullen worden afgedicht. Een dosis van het vaccine is 0,5 ml, die 200 µg van het droge actieve principe bevat.

De opbrengst van het eindvaccine van 300 scheidingskolven (100 scheidingskolven voor elk van de serogroepen) is 1200 tot 1500 doses.

30 Ampullen met het vaccine worden bij een temperatuur van +4 tot +10°C bewaard tot de dag van toediening.

De levensduur van het vaccine is 1 jaar vanaf de dag van bereiding van de oplossing van vaccinefracties.

Voorbeeld III.

35 De werkwijze voor de bereiding van het vaccine wordt op een soortgelijke wijze uitgevoerd als beschreven in voorbeeld I.

Als stam van serogroep B wordt gebruik gemaakt van N-meningitidis stam B-C₅.

Het verkregen droge vaccine wordt aan kolven toegevoegd met 100 doses (1 dosis bevat 200 µg van het droge actieve principe). De op-

brengr van het eindvaccine van 300 scheidingskolven is 1200 tot 1500 doses. De levensduur van het vaccine is 1 jaar vanaf de dag van de bereiding ervan.

C O N C L U S I E S

1. Werkwijze ter bereiding van een chemisch, multi-component meningococcus vaccine door een kweek van meningococci op een proteïne-vrij voedingsmiddelmilieu te doen groeien, gevolgd door winning van een polymere fractie met groot molecuulgewicht en bereiding van het vac-
 5 cine, met het kenmerk, dat men kweken van meningococci van serogroepen A, B en C gescheiden doet groeien op een vast, proteïne-vrij voedingsmid-
 delmilieu, de verkregen microbiële massa van elk van de serogroepen ge-
 scheiden uitwast door middel van een isotone oplossing van natriumchlo-
 10 ride met een pH van 7,0 tot 7,6, de verkregen kweek suspensie desinfecteert, het microbiële residu daaruit verwijdert, de verkregen kweek-
 vloeistof met aceton behandelt, het verkregen neerslag afscheidt en
 vervolgens wast en met aceton droogt, de droge stoffen oplost in een
 bufferoplossing met een pH van 7,6 tot een concentratie van niet meer
 15 dan 0,2 mol, aan gelfiltratie onderwerpt voor de winning van een poly-
 mere fractie met een moleculaire massa van niet minder dan 100.000
 Dalton, de verkregen fractie met aceton behandelt, het aldus verkregen
 residu met aceton wast en droogt en de verkregen droge fractie-residuen
 van elk van de serogroepen A, B en C onder steriele omstandigheden in
 20 de gewichtsverhouding 14:13:13 mengt.

2. Werkwijze volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat men als meningococci kweken gebruik maakt van stammen van de serogroepen A, B en C Neisseria meningitidis stam A-208, stam B-13090 of stam B-23247 of stam B-C₅, stam C-0638.

25 3. Werkwijze volgens conclusies 1 en 2, met het kenmerk, dat men voor het proteïne-vrije vaste voedingsmiddelmilieu gebruik maakt van een voedingsmiddelmilieu met de volgende samenstelling:

droog milieu 199	17,5 g
vleesnat	400 ml
zetmeelpasta (1,5%)	100 ml
gedestilleerd water	500 ml
agar-agar	20 g
natriumchloride	10 g
20% oplossing van natriumchloride tot pH	7,4-7,6.

35 4. Werkwijze volgens conclusies 1 tot 3, met het kenmerk, dat men om een meer volledige oplossing van stoffen van de celwand van meningococci te waarborgen, aan de verkregen suspensie na desinfectie daarvan een 20%'s oplossing van NaOH toevoegt tot een pH van 8,2 tot 8,4.