



Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

ISSN 0433-6461

(11)

213 351

Int.Cl.³

3(51) A 61 K 39/145

AMT FUER ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP A 61 K/ 2473 811

(22) 20.01.83

(44) 12.09.84

(71) FORSCHUNGSINSTITUT FUER LUNGENKRANKHEITEN U. TUBERKULOSE, BERLIN, DD;
(72) BERGMANN, KARL-CHRISTIAN, MR. DR. SC.; NORDHEIM, WILLY, DR. HABIL. DIPL.-ING.;
BRAEUNIGER, SIEGFRIED, DR. DIPL.-BIOL.; NOACK, KLAUS, DIPL.-BIOL.; DD;
TISCHNER, HARTMUT, DR.; POHL, WOLF-DETLEF, DIPL.-MED.; SCHAEFER, HEINZ, DR. SC. DIPL.-CHEM.;
BAER, MANFRED, DR. DIPL.-CHEM.; DD;
STARKE, GUENTER, MR. PROF. DR. SC.; PETZOLD, GUENTER, DR. DIPL.-CHEM.; KIRSCH, BRIGITTE;
TEUPEL, DORIS, DD;
NORDHEIM, REGINA, DD;

(54) **VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON NICHTPARENTERALEN INAKTIVIMPFSTOFFEN GEGEN VIREN**

(57) Das Verfahren zur Herstellung von nichtparenteralen Inaktivimpfstoffen gegen Viren und in Kombinat mit diesen gegen pathogene Mikroorganismen ist anwendbar in der technischen Virologie, Mikrobiologie und Biochemie, insbesondere im Hinblick auf die Herstellung von Impfstoffen, Interferoninduktoren und speziellen Biopräparaten. Das Ziel ist die Herstellung von Inaktivimpfstoffen gegen Viren und in Verbindung mit diesen Impfstoffen im weiteren sonstige auf mikrobieller Basis hergestellte Inaktivimpfstoffe. Nach nichtparenteraler Anwendung dieser Inaktivimpfstoffe sollen eine kombinierte Ausnutzung der antigenen/immunogenen Wirkung und eine Interferoninduktion erreicht werden. Die Aufgabe zur Herstellung hochwertiger nichtparenteraler Inaktivimpfstoffe wird dadurch gelöst, Viren oder in Kombination mit diesen pathogene Mikroorganismen in ihrem empfindlichen Zentrum gezielt so zu treffen, daß dadurch ein schonender, aber völliger Infektiositätsverlust eintritt, die Integrität der entsprechenden Keime bei weitgehendem Erhalt der nativen Struktur der Antigenproteine bewahrt wird und die Interferoninduktoren hierbei besonders geschont werden. Diese gezielte Inaktivierung erfolgt durch Gammastrahlen, Mikrowellen, thermische Manipulationen oder durch gekoppelte physikalisch-chemische Methoden bei einem spezifisch eingestellten Konzentrations- und gegebenenfalls Reinigungsgrad der Viren bzw. Mikroorganismen. Die Anwendungsgebiete sind die Herstellung von Inaktivimpfstoffen und die Präparation sonstiger Biopräparate für die Human- und Veterinärmedizin.

Titel der Erfindung

Verfahren zur Herstellung von nichtparenteralen Inaktivimpfstoffen gegen Viren

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft die technische Herstellung von Inaktivimpfstoffen gegen Viren zur nichtparenteralen Applikation und beinhaltet auch spezielle mikrobielle Inaktivimpfstoffe. Diese Impfstoffe lassen sich technisch einfach mit wenigen Verfahrensschritten und mit günstigen Ausbeuten herstellen. Sie erlauben die Herstellung von Impfstoffen mit hohen antigenen/immunogenen Eigenschaften, die auch bei nichtparenteraler Applikation eine gute immunogene Wirkung und eine Interferoninduktion hervorrufen.

Das Anwendungsgebiet bezieht sich auf Herstellungsbetriebe und weitere Institutionen, die Impfstoffe, Interferoninduktoren oder andere spezielle Präparate produzieren.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Eine orale Immunisierung mit lebenden Viren ist wiederholt beschrieben worden. Bei Einsatz von Lebendimpfstoffen treten jedoch relativ häufig unerwünschte Nebenreaktionen auf. Das gilt gleichermaßen auch für den Einsatz von Rekombinanten, attenuierten, dragierten, passivierten oder modifizierten lebenden Viren der Influenza-Typen bzw. -Subtypen.

Inaktivierte Viren als oral applizierte Impfstoffe mußten bisher in sehr hohen Konzentrationen gegeben werden, um zu signifikanten Antikörperkonversionen in Atemwegsekreten zu führen.

Die Ursachen sind in der chemischen Inaktivierung mit beispielsweise Formaldehyd oder β -Propiolacton zu sehen, die zu irreversiblen Reaktionen mit den determinanten Gruppen der Antigene und mit den Nukleinsäuren führen. Die Strukturveränderungen der Nukleinsäuren reduzieren u.a. auch deren Wirkung als Interferoninduktoren. Damit haben sich Impfungen mit inaktivierten, nichtvermehrungsfähigen Viren auf nichtparenteralem Wege bisher in praxi nicht durchgesetzt.

Die Herstellung von hochwirksamen nichtparenteralen Inaktivimpfstoffen ist im technischen Maßstab noch nicht vorgenommen worden.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung hat zum Ziel, ein Verfahren zu entwickeln, durch das es möglich ist, Inaktivimpfstoffe gegen Viren und in Verbindung mit diesen Impfstoffen im weiteren sonstige auf mikrobieller Basis hergestellte Inaktivimpfstoffe zu produzieren. Nach Anwendung der Inaktivimpfstoffe (inaktivierte Viren oder in Verbindung mit inaktivierten Mikroorganismen) sollen eine kombinierte Ausnutzung der antigenen/immunogenen Wirkung und eine Interferoninduktion erreicht werden.

Der nützliche Effekt stellt sich wie folgt dar: Im Vergleich zu konventionellen auf parenteralem Wege zu applizierenden Vollvirusimpfstoffen kann die mehr oder weniger vorgenommene hochgradige Reinigung und im Vergleich zu Spalt- und Subeinheitenimpfstoffen auch noch zusätzlich die dort erfolgende Spaltung durch Chemikalien oder Enzyme entfallen.

Darüber hinaus kann sich - wie im Falle von Adsorbatimpfstoffen - auch die Verwendung von Adsorbenzien/Adjuvantien (z.B. Aluminiumverbindungen) erübrigen. Mit dieser Verfahrensweise soll gleichzeitig erreicht werden, daß virale und

mikrobielle Impfstoffe beliebig kombiniert werden können und die Applikation der Impfstoffe sehr einfach (nicht-parenteral) erfolgen kann. - Im weiteren soll erreicht werden, daß solche Inaktivierungsbedingungen gewählt werden, die eine Integrität der entsprechenden Keime bei weitgehendem Erhalt der nativen Struktur der entsprechenden Antigenproteine zulassen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Herstellung von Inaktivimpfstoffen gegen Viren und in Kombination damit gegen pathogene Mikroorganismen anzugeben, so daß auf Grund der besonderen Präparationsart und -form dieser Impfstoffe eine bevorzugte nichtparenterale Applikation erfolgen kann.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß Viren oder in Kombination mit diesen pathogene Mikroorganismen in ihrem empfindlichen Zentrum so gezielt getroffen werden, daß dadurch ein schonender, aber völliger Infektiositätsverlust eintritt und die entscheidenden Antigenproteine sowie Interferoninduktoren hierbei besonders geschont werden. Das kann zum Beispiel erfolgen durch Gammastrahlen, Mikrowellen oder entsprechende thermische Manipulationen oder auch durch gekoppelte physikalisch-chemische Verfahrensschritte. Der Reinigungs- und Konzentrierungsgrad kann hierbei variabel eingestellt werden.

Die Reihenfolge der Hauptverfahrensschritte läßt sich beispielsweise wie folgt darstellen:

1. Virusvermehrung
2. Geringe Virusanreicherung (Ultrazentrifugation oder Ultrafiltration)
3. Inaktivierung (ionisierende Strahlung oder/und thermische Behandlung bis max. 25 °C)
4. Endpräparation als Impfstoff zur nichtparenteralen Applikation

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

Influenzaviren (Stamm A/Brazil/11/78) werden nach der Standardmethode in fertilen Hühnereiern vermehrt. Die virushaltige Allantoisflüssigkeit wird durch Zentrifugation bis max. 10 000 g von Zellen und Eibestandteilen befreit. Die weitere geringe Konzentrierung wird durch Ultrafiltration mit einem kommerziellen Gerät und einer Celluloseacetat-Membran mit einer Selektivität 87,5 % (gegenüber Dextran 110 000) vorgenommen. Die Filtrationsgeschwindigkeit beträgt bei einem Druck von etwa 0,2 MPa $10 - 50 \text{ l} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$. Das Filtrat enthält keine Viren oder deren Bestandteile. Im Konzentrat wird auf eine Anreicherung der Virusantigene mit 50 - 80 μg Hämagglutinin/ml orientiert. Die Virusinaktivierung läuft wie folgt ab: Bestrahlungsanlage ROH Gamma-30, Nuklid Kobalt-60, Gesamtdosis 15 000 Gray, T 15 °C. - Hämagglutiningehalt und Neuraminidaseaktivität fallen unter diesen spezifischen Bedingungen kaum oder nicht ab; die Integrität der Viren wird ebenfalls erhalten. Dies wirkt sich positiv auf die Darreichungsform (nichtparenteral) aus. Die Anwendungsmenge beim jeweiligen Impfling richtet sich nach der Art und der Konzentration des verwendeten Impfstoffes.

Beispiel 2

Virushaltige Allantoisflüssigkeit (Stamm B/Singapore/222/79) wird bei etwa 37 °C 2 bis 5 Tage aufbewahrt. Nach Feststellung der Nichtvermehrungsfähigkeit (gegebenenfalls Verlängerung der Aufbewahrungsdauer) erfolgt eine Pelletierung bei etwa 55 000 g. Bezüglich der Applikation wird wie bei Beispiel 1 verfahren.

Beispiel 3

Eine Virussuspension (Influenzaviren Typ A - Rekombinante NIB-4) mit einem Hämagglutiningehalt von etwa 60 µg/ml - gewonnen durch Pelletierung gemäß Beispiel 2 - wird in einer Menge von 20 ml in einem verschlossenen Glasgefäß Mikrowellenenergie ausgesetzt. Hierzu dient ein handelsübliches Mikrowellengerät (z.B. Philips DX 260; Litton Industries Modell 402 002). Die Bestrahlungsdauer liegt zwischen 7 bis 14 Sekunden (Frequenz 2450 MHz $\pm$ 20 MHz, Leistungsabgabe 1,5 kW). - Eine gewisse Kühlung während der Bestrahlung kann erfolgen. - Sofort nach der Bestrahlung wird heruntergekühlt (4 °C). Nach dem Nachweis der Nichtvermehrungsfähigkeit der Viren erfolgt die nichtparenterale Applikation gemäß Beispiel 1.

Erfindungsanspruch

1. Verfahren zur Herstellung von nichtparenteralen Inaktivimpfstoffen gegen Viren, gekennzeichnet dadurch, daß solche Impfstoffe erzeugt werden, die eine kombinierte Ausnutzung der antigenen/immunogenen Wirkung und der Interferoninduktion bei gleichzeitigem Erhalt der Integrität der Viren, z.B. Influenzaviren, zulassen, und zwar auf dem Wege, daß Virusmaterial in konzentrierter oder unkonzentrierter bzw. gereinigter oder ungereinigter Form schonend inaktiviert wird bei weitgehendem Erhalt der nativen Struktur der entsprechenden Antigenproteine, und in der Weise, daß das empfindliche Zentrum gezielt so getroffen wird, daß dadurch ein schonender, aber völliger Infektionsverlust eintritt, und zwar besonders herbeigeführt durch direkte oder indirekte Strahlenwirkung, vorrangig durch ionisierende Strahlung in Form von Gammastrahlen im Bereich 1 000 - 25 000 Gray, durch Einsatz eines flüssigen Mediums (homogene Virussuspension) bzw. von Virusmaterial mit einem H_2O -Anteil von mindestens 0,5 %, unter Nachschaltung einer Ruhephase für die Wasserradikalwirkung sowie unter variablen Sauerstoffpartialdrücken, wobei es zu einer Virusinaktivierung, aber nicht zu einer Beeinflussung der Immunogenität der wesentlichen Virusbestandteile kommt.
2. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß im Falle von flüssigen Medien bzw. Virusmaterial mit Wasseranteil die gebildeten Radiolyseprodukte, wie z.B. e_{aq}^- , $H^\bullet$, $\cdot OH$, $HO_2^\bullet$, H_2O_2 , H_2 , ausgenutzt werden.
3. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß zwischen 0 - 35 °C oder auch lyophilisiertes oder tiefgefrorenes Virusmaterial inaktiviert werden kann.

4. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß die Fremdsubstanzen aus den Wirtszellen eine Schutzfunktion bei der Bestrahlung bzw. eine kombinatorische Wirkung im Impfstoff ausüben.
5. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß auch Bestrahlungen mit Elektronenstrahlen oder ultravioletttem Licht zur Inaktivierung vorgenommen werden.
6. Verfahren nach den Punkten 1 bis 5, gekennzeichnet dadurch, daß der Impfstoff so präpariert bzw. eingestellt wird, daß er in flüssiger oder fester Form, z.B. Kapsel, Dragee oder Tablette oder als Spray bzw. Aerosol nicht-parenteral zur ein- oder mehrmaligen alleinigen Immunisierung oder in Kombination mit anderen Vakzinierungen gegeben wird.
7. Verfahren nach Punkt 6, gekennzeichnet dadurch, daß nach der alleinigen oder kombinierten Applikation des inaktivierten Impfstoffes beim Menschen eine belastungsfähige Immunität gegen den oder die zur Präparation des Impfstoffes verwendeten humanen Virionen, z.B. Influenzastämme, nachweisbar ist.
8. Verfahren nach den Punkten 1 bis 5, gekennzeichnet dadurch, daß diese Verfahrensweise auch auf mikrobielle Inaktivimpfstoffe übertragen werden kann.