



⑩ A **Terinzagelegging** ⑪ **8003889**

Nederland

⑲ NL

⑤4 **Parenteraal vaccin.**

⑤1 Int.Cl³: A61K39/265.

⑦1 Aanvrager: Iowa State University Research Foundation, Inc. te Ames, Iowa,
Ver. St. v. Am.

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

②1 Aanvraag Nr. 8003889.

②2 Ingediend 4 juli 1980.

③2 Voorrang vanaf 9 juli 1979.

③3 Land van voorrang: Ver. St. v. Am. (US).

③1 Nummer van de voorrangsaanvraag: 55821 .

②3 --

⑥1 --

⑥2 --

④3 Ter inzage gelegd 13 januari 1981.

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

Titel: Parenteraal vaccin.

Infectieuze runderrhinotracheitis (IBR) is voor het eerst als een bepaalde veeziekte onderkend in de vijftiger jaren. Overeenkomstig andere herpesvirussen, vermenigvuldigt het IBR-virus zich in een groot aantal celtypen, waardoor het komt tot diverse ziekteverschijnselen als ziekten van de luchtwegen, conjunctivitis, vulvovaginitis, abortus, balanoposthitis, meningoëncephalitis, ziekten van de spijsverterings-
5 wegen en soms tot fatale systemische infecties. IBR is echter in hoofdzaak bekend als een ziekte van de luchtwegen, gekenmerkt door tracheitis, rhinitis en koorts. Een IBR-infectie is gewoonlijk de oorzaak van abortus
10 bij drachtig vee (zie J. Am. Vet. Med. Assoc., 162, 556-560 (1973)).

Het virus wordt snel doorgegeven en is over de hele wereld verspreid. Sommige dieren ontwikkelen een latente infectie, die op een later tijdstip kan worden gereactiveerd.

Bestrijding van IBR is in hoofdzaak gebaseerd op vaccinatie en een groot aantal IBR-vaccins is reeds ontwikkeld (J. Am. Vet. Med. Assoc., 171, 1055-1060 (1977)). Deze omvatten parenterale en intranasale vaccins, waarbij steeds levende verzwakte IBRV-materialen worden gebruikt. De parenterale vaccins, die gewoonlijk intramusculair worden toegediend, kunnen abortus veroorzaken bij drachtig vee en worden
20 bij drachtig vee liever niet toegepast. Voorts kan vaccinatie van door de moeder gevoede kalveren, die zich tussen drachtig vee bevinden, abortus veroorzaken, door de verspreiding van virus door deze gevaccineerde kalveren. Intranasale vaccins zijn in dit opzicht veiliger en eveneens in staat om humorale antilichamen te doen ontstaan
25 en welⁱⁿ titers, die vergelijkbaar zijn met die van intramusculaire vaccins. De toediening evenwel van intranasale vaccins gaat met problemen gepaard. Men moet de koppen vasthouden en ervoor zorgdragen, dat het vaccin diep in de neusgaten wordt toegediend. Bij deze vaccinatie hebben de dieren voorts de neiging, het vaccin weer uit te
30 blazen kort na de vaccinatie.

De effectiviteit van bekende vaccins is variabel en de duur van de bescherming beperkt. Over het algemeen neemt men aan, dat intramusculaire vaccinatie een langduriger bescherming oplevert dan intranasale vaccinatie. Bij intranasale vaccinatie schrijft een behoudende
35 praktijk een jaarlijkse revaccinatie voor, terwijl tenminste één re-

vaccinatie nu en dan wordt aanbevolen bij intramusculaire vaccins. Ook geïnactiveerde IBR-vaccins zijn ontwikkeld, maar hun effectiviteit staat ter discussie. Jaarlijkse revaccinatie wordt aanbevolen. Verderenadelen van geïnactiveerde vaccins omvatten soms een fatale overgevoeligheds-
5 reactie (anafylaxie) en een niet fatale urticaria.

Tot dusver is geen IBR-vaccin beschreven, gebaseerd op subeenheden. Toch is de subeenheidsbenadering bij de bereiding van een aantal andere virusvaccins onderzocht (zie b.v. Progr. Med. Virol., 21, 144-157 (1975)). Ook in Arch. Virol. 52, 29-35 (1976) zijn experimenten met
10 subeenheidsvaccins van herpes simplex-virus bij konijnen weergegeven. Een subeenheidsvaccin is effectief gebleken bij een immunisatie met levend of door U.V. geïnactiveerd herpes simplex virus. Ook zijn experimenten gedaan met subeenheidsvaccins tegen menselijke rabies. (Infect. and Immun., 16, 753-754 (1977)). Bij de laatste gevallen is
15 gewerkt met nonionogene detergentextracten van de virionen, omdat het bekend is, dat nonionogene detergentia de glycoproteïenomhulling van virussen kunnen solubiliseren (zie Helenius: "Solubilization of Membranes by Detergents", Biochem. et Biophys. Acta, 415, 29-79 (1975)). Evenwel is opgemerkt, dat over het algemeen vaccins met oplosbare anti-
20 genen veelal een specifieke immunogeniteit of bescherming opleveren, die duidelijk lager ligt dan die van de virionvaccins (Sokal: Vaccines of the Future: Immunogenicity of Viral Components, hoofdstuk 9, blz. 129-135 in Viruses and Immunity, Koproski, (1975), Academic Press Inc.

De uitvinding is nu o.m. gebaseerd op de ontdekking van mogelijk-
25 heden voor het produceren van IBR-vaccins met een duidelijk hogere antilichaamrespons dan enig bekend experimenteel of handels-IBR-vaccin. Voorts zijn de onderhavige vaccins in staat tot het produceren van een hogere anti-lichaamrespons dan wordt gevonden in vee, dat is hersteld van een natuurlijke IBR-infectie.

30 De onderhavige vaccins worden bereid uit virulente IBR-virussen, zoals uit het veld geïsoleerde IBRV of nagenoeg onverzwakt IBRV. Het IBR-virus in zijn natuurlijke virulente vorm wordt vermeerderd in een celmediummengsel, dat de vermenigvuldiging van dit virus bevordert. Na deze vermeerdering worden de geïnfecteerde cellen gescheiden van het
35 mengsel en geëxtraheerd met een waterige oplossing van een niet-ionogeen

8003889

detergens, waardoor een waterige oplossing van het antigene eiwit wordt verkregen. Het niet gesolubiliseerde residu wordt van de bovenstaande vloeistof afgescheiden, welke laatste vervolgens wordt gebruikt als antigeen bestanddeel van het vaccin. Het oplosbare antigeen in de waterige oplossing wordt bij voorkeur gecombineerd met een passend adjuvans, 5 waardoor een parenteraal ^{vaccin} in een injecteerbare dosisevorm ontstaat. Bij voorkeur worden hulpstoffen van het polytype toegepast, zoals Freund's incompleet adjuvans.

10 Bij een effectief dosisniveau in combinatie met een passende hulpstof, kan een antilichaamspiegel worden bereikt, die een goede immuniteit tegen de ziekte oplevert en tevens de ontwikkeling van een IBR-infectie verhindert. Dit blijkt uit het feit, dat gevaccineerde dieren bij een besmetting met levend virulent IBRV geen virus afgeven. Deze vondst was hoogst onverwacht, omdat virusafgifte altijd werd opgemerkt 15 na een besmetting van kalveren die gevaccineerd waren met de bestaande vaccins en er bestaat geen literatuurplaats die suggereert, dat een verhindering van IBR-virusafgifte door vaccinatie kan worden bereikt. Het gevaccineerde vee ondergaat geen beschadigingen of klinische verschijnselen van een IBR-ziekte.

20 De onderhavige vaccins kunnen worden gebruikt bij drachtige dieren, bij gezoogde kalveren en bij kalveren met antilichamen van de moeder. De vaccins zijn vrij van actief IBR-virus en kunnen dus geen infectie of overdracht van IBRV veroorzaken. Omdat voorts de vaccins een beperkte antigene samenstelling bezitten, kunnen serologische proeven worden ont- 25 worpen om gevaccineerde dieren van geïnfecteerde dieren te onderscheiden. Dit is onmogelijk bij tot dusver beschikbare IBR-vaccins. Meer in het bijzonder kan het onderhavige vaccin worden gebruikt bij een lokaal of nationaal uitroeiingsprogramma, omdat tegengaan van virusafgifte essentieel is bij het tegengaan van virusdoorgifte. Tot dusver beschik- 30 bare IBR-vaccins verhinderen een afgifte van virus of het optreden van latente infecties niet.

Elke virulente stam van infectieuze runderrhinotracheitisvirussen kan worden gebruikt bij de uitvinding. B.v. kan de Cooper-stam worden toegepast, die wordt gebruikt als een IBR-besmettingsvirus door het 35 Veterinary Services Laboratory, U.S.D.A., te Ames, Iowa. Virulente IBRV-stammen kunnen ook uit andere bronnen worden verkregen, b.v. uit de

ATCC. B.v. is ATCC No. VR-188 geschikt. Daarnaast kunnen ook uit het veld geïsoleerde virussen uit met IBRV geïnfecteerd vee worden toegepast, maar dan moeten deze isolaten wel volledig virulent zijn. Deze virulente stammen kunnen wel aan een reeks in-vitro-celpassages worden
5 onderworpen, maar behouden dan hun virulentie, zoals blijkt uit het vermogen om vee te infecteren en klinische verschijnselen van IBR op te roepen, b.v. een gemiddelde temperatuursverhoging boven 39,7°C.

Het virulente IBRV wordt vermeerderd door celcultuur. Bij voorkeur worden rundercellen gebruikt, die in staat zijn IBR-virus tot een hoge
10 titer te vermeerderen, zoals runderlongcellen, niercellen, testikelcellen enz. Bepaalde lijnen van rundercellen, geschikt gemaakt voor een in vitro-cultuur kunnen worden gebruikt, hoewel ook goede resultaten kunnen worden verkregen met vers gewonnen cellen. Voor de virusvermeerdering worden de cellen gecombineerd met een passend voedingsmedium,
15 dat geschikt is gemaakt voor de groei van het virus tot een hoge titer. Het basisch medium kan b.v. Eagle's minimaal essentieel medium (MEM) bevatten. Om een virusvermenigvuldiging te bevorderen wordt bij voorkeur ook foetaal kalverserum (FCS) toegevoegd. B.v. kan 10% FCS worden gebruikt voor de groei van de cellen en een 5%'s FCS-niveau worden toege-
20 past voor het instandhouden van de cellen na infectie, terwijl het virus zich vermenigvuldigt. Binnen 24 uur na inoculatie met IBRV kunnen de cellen zijn gedood en is de vermenigvuldiging van het virus compleet. Het gewenste virusomhullingseiwit associeert zich met de celmembranen, waar het zich heeft verzameld alvorens tot IBR-virusdeeltjes te vormen.

25 Na afloop van de vermeerdering worden de cellen bij voorkeur gescheiden van het vloeistofmedium. Dit kan b.v. plaatsvinden door te centrifugeren. Daarbij worden de cellen uit het cultuurmedium afgescheiden door 60 minuten bij 100.000 x g te centrifugeren. De afgescheiden cellen worden daarna geëxtraheerd met een niet ionogeen detergens,
30 dat de aan de membranen gehechte virusomhullingseiwitten solubiliseert en het IBR-virus inactieveert. De celresidu's kunnen in water met een niet ionogeen detergens worden hersuspendeerd voor solubilisatie. Detergensconcentraties van 0,5-5% kunnen worden gebruikt. De niet ionogene detergentia, die effectief zijn gebleken voor het solubiliseren van
35 de virusomhullingsglycoproteïnen zijn het meest geschikt, b.v. kan

8003889

Triton X-100 (octylfenoxypolyethoxyethanol) worden gebruikt. Dit niet ionogene oppervlakteactieve middel wordt bereid door Rohm & Haas te Philadelphia, Pennsylvania, en verkocht door Sigma Chemical Co. te St. Louis. Nonidet P 40 is een verder niet ionogeen oppervlakteactief
5 middel, dat geschikt is voor het selectief oplossen van virusomhullingseiwit. Nonidet P 40 wordt bereid door BDH Chemicals Ltd., te Poole en o.m. verkocht door Gallard-Schlesinger Chemical Corp. Dergelijke nonionogene detergentia solubiliseren het virusomhullingseiwit zonder dit eiwit merkbaar te denatureren.

10 Het contact tussen de waterige detergensoplossing met de celmembranen kan worden bevorderd door de cellen mechanisch te verbreken of te dispergeren. B.v. kunnen de hersuspendeerde cellen worden geleid door een homogenisator of een sonische behandeling ondergaan, waardoor het contact tussen het non-ionogene detergens met de celmembranen en
15 het IBR-virus wordt bevorderd. Zeer weinig van het gewenste virusomhullingseiwit wordt verkregen uit de IBR-virusdeeltjes zelf, maar een volledige inactivering van het IBR-virus is toch gewenst. Het is gunstig het contact uit te voeren bij een neutrale of licht basische pH, b.v. een pH tussen 6,0 en 9,0. Een passende buffer kan in de wa-
20 terige oplossing worden verwerkt om de gewenste pH aan te houden. Het water dat voor de extractie wordt gebruikt is liefst steriel gedemineraliseerd water. De extractie duurt gewoonlijk 1-2 uren. Bij homogenisatie en/of een sonische behandeling en continu roeren van de celsuspensie in de waterige detergensoplossing kan de extractie b.v. in
25 1 uur worden uitgevoerd. Bij voorkeur wordt de suspensie tijdens deze extractie op een temperatuur beneden 10°C gehouden, liefst op een temperatuur van ca. 4°C. Na de extractie wordt het residu van vast materiaal van de bovenstaande vloeistof met gesolubiliseerd proteïne afgescheiden. Deze scheiding kan b.v. plaatsvinden door te centrifu-
30 geren. De celresidu's kunnen tot een klein volume worden teruggebracht door 60 minuten te centrifugereren bij 100.000 x g.

Het extract van het subvirale, aldus verkregen proteïne, kan direct worden gebruikt voor het bereiden van vaccins, indien het, zoals bij voor-
keur, een toereikende concentratie aan eiwit bevat, om het mogelijk te
35 maken, dit extract te mengen met een adjuvans, waardoor injecteerbare

vaccin, doses ontstaan. De hoeveelheid per dosis gebruikt moet effectief zijn om de IBR-ziekte te verhinderen, ofwel als enkelvoudige injectie of in de vorm van twee injecties. B.v. kan het extract 3-6 mg geëxtraheerd proteïne-eiwit per cm^3 bevatten. De injecteerbare dosisvorm van het vaccin 5 kan worden verkregen door gelijke hoeveelheden van een passend adjuvans en het subviruseiwitextract als verkregen (zonder concentratie) samen te voegen. Terwijl het vaccin (eiwitextract met adjuvans) 0,5-10 mg/cm^3 totaal eiwit (droge stof) kan bevatten, zal deze hoeveelheid gewoonlijk zijn gelegen tussen 1 en 6 mg/cm^3 geëxtraheerd proteïne. Indien de dosis 10 van het vaccin bij voorkeur 2 cm^3 moet bevatten, zal de totale dosis 2-12 mg totaal proteïne bevatten, liefst een totale dosis van 4-8 mg.

Desgewenst kan het antigene eiwit ook worden geconcentreerd of gewonnen alvorens het vaccin te bereiden, b.v. door uitzouten of ultrafiltreren. Indien het antigene eiwit wordt gewonnen in een vaste vorm, 15 wordt het vervolgens liefst weer gesuspenderd in water en wel tot de gewenste concentratie voor verwerking tot vaccins. Daarna wordt de oplossing (als eerder aangegeven) van het virusomhullingseiwit gecombineerd met een passend adjuvans. Omdat het antigeen zich in oplossing bevindt, wordt de waterige oplossing bij voorkeur gecombineerd met een adjuvans 20 van het olietype. B.v. wordt Freund's incompleet adjuvans gebruikt.

Dit adjuvans kan worden gekocht bij Difco Laboratories te Detroit of worden bereid door een combinatie van mannidemonoöleaat met paraffineolie in de volumeverhouding 1,5:8,5. Het resulterende vaccin is een water-in-olie-emulsie met het antigeen in de gedispergeerde waterfase. 25 Hoewel de relatieve hoeveelheden adjuvans en eiwitextract sterk kunnen wisselen, worden bij voorkeur ongeveer gelijke hoeveelheden toegepast.

De onderhavige vaccins zijn in het bijzonder bestemd voor vee en kunnen worden toegediend aan kalveren en drachtige dieren. De vaccins kunnen ook worden toegepast bij andere rundersoorten, zoals ossen of 30 waterbuffels. Het volume van de injecteerbare dosis kan variëren, b.v. van 1 tot 4 cm^3 . Meestal wordt een 2 cm^3 dosis gebruikt. Bij het toedienen van het vaccin kan soms met één enkele injectie worden volstaan, maar bij voorkeur worden twee opeenvolgende injecties per dier toegediend, b.v. een dosis van 2 cm^3 met daarin 4-8 mg totaal eiwit 35 twee keer met 30 dagen daartussen. De ziekte wordt verhinderd en de over-

dracht van IBR-virus door virusafgifte eveneens verhinderd, waardoor een IBR-infectie effectiever wordt tegengegaan.

Bij het ontwikkelen en beproeven van de onderhavige vaccins werden de volgende stoffen en procedures gebruikt.

- 5 Virus: De virulente Cooper-stam van IBRV werd toegepast na 8 passages en deze Cooper-stam wordt ook gewoonlijk gebruikt als besmettingsstam. Deze stam werd tweemaal gepasseerd door runderlongcellen (BLU) en een voorraad met $1,0 \times 10^8$ plaquevormende eenheden (PFU) per cm^3 werd ingevroren bij -70°C .
- 10 Celcultuur: De hier toegepaste celculturen werden gekweekt in Eagle's minimaal essentieel medium (MEM) gesupplementeerd met 10% bestraald foetaal kalverserum (FCS), dat 30 minuten bij 56°C was geïnactiveerd, 0,5% lactalbuminehydrolysaat en enige antibiotica (100 I.E. penicilline, 100 μg kanamycinesulfaat en 100 μg streptomycinesulfaat per cm^3).
- 15 Dit medium werd vervolgens gebufferd met 0,16% natriumbicarbonaat en 8 mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethaansulfonzuur (HEPES). Deze culturen werden bij 37°C geïncubeerd in een 5%'s CO_2 -atmosfeer.
- Virusisolatie: Neussecreties werden verzameld voor het isoleren van het virus door inschuiven van een 15 cm lange prop met wattenuiteinden in
- 20 de linker ventrale nasale meatus en dit geheel rondgedraaid tot hij was verzadigd. De aldus verkregen monsters werden gedispergeerd in $1,0 \text{ cm}^3$ MEM met daarin antibiotica (200 I.E. penicilline, 200 μg kanamycinesulfaat, 200 μg streptomycinesulfaat en 15 μg amfoteracine B per cm^3) en 30 minuten bij 4°C bewaard. De propen werden vervolgens
- 25 uit het medium verwijderd en dit medium ingevroren bij -70°C tot het werd gekweekt.

- Plaquevormende eenheden virus in monsters werden bepaald door inoculeren van duplicaatculturen van BLU monolagen met 10-voudige seriëverduunningen (in MEM) voor elk monster. De inocula werden gedurende
- 30 60 minuten geadsorbeerd, de monolagen gewassen met MEM en overdekt met 1% agarose met daarin MEM, 5% FCS en antibiotica. Deze culturen werd 72 uur bij 37°C geïncubeerd in een 5%'s CO_2 -atmosfeer. De culturen werden gefixeerd met een 10%'s formalineoplossing (gebufferd), de agaroselaag verwijderd en de cellaag gekleurd met kristalviolet.
 - 35 De virustiter werd bepaald door het tellen van de PFU-waarden.

8003889

- Plaquereductie-neutralisatieproeven: Anti-IBR-serum neutralisatietiters werden bepaald door de plaquereductieneutralisatieproeven. Tweevoudige serumverdunding van door 30 minuten bij 56°C verwarmen, geïnactiveerd serum werden gemengd met gelijke volumina MEM met daarin 1000 PFU
- 5 IBRV per cm³ en 60 minuten bij 37°C geïncubeerd. Monolagen van BLU-cellen in de uithollingen van plastic weefselcultuurplaten met zes uithollingen van 35 mm werden geïnoculeerd met 0,2 cm³ serum-virusmengsel. Na adsorptie van het serum-virusmengsel gedurende 60 minuten bij 37°C werden de culturen gewassen met MEM, overdekt met 1% agarose met daarin
- 10 MEM, 5% FCS en antibiotica. De culturen werden 72 uren geïncubeerd bij 37°C en daarna gefixeerd met 10%'s formaline (gebuffered). De agarose-laag werd verwijderd en de cellaag gekleurd met kristalviolet. De serum-neutralisatietiter was het reciproke van de hoogste serumverdunding, die de plaquetelling met ten minste 50% verminderde.
- 15 Eiwitbepaling: Het eiwit werd bepaald volgens Lowry, J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951) met runderserumalbumine als standaard. Het eiwitgehalte van monsters met non-ionogeen detergens werd bepaald volgens een gemodificeerde procedure als beschreven in Anal. Biochem., 86, 346-356 (1977).
- 20 De produktie van de onderhavige vaccins en hun resultaten bij onderzoek worden geïllustreerd door de volgende voorbeelden.
- Voorbeeld I:
- Runderlongcellen werden vermeerderd in rollende 490 cm³ flessen tot zich monolagen hadden gevormd. Deze monolagen werden geïnfecteerd door
- 25 het medium te verwijderen en 5 cm³ voorraad-IBRV toe te voegen, bereid als bovenbeschreven. Na 60 minuten adsorberen werd het inoculum verwijderd, de monolaag gewassen met MEM en 30 cm³ onderhoudsmedium (MEM met 5% FCS) toegevoegd. De cellen werden vervolgens onder rollen (1 tpm) bij 37°C geïncubeerd tot het cytopathologische effect (CPE) volledig
- 30 was (ca. 24 uren). De geïnfecteerde BLU-cellen werden van het flesoppervlak met een rubber staaf afgeschraapt. Het celmediummengsel werd een uur bij 100.000 x g gecentrifugeerd. Het verkregen residu werd gesolubiliseerd onder toepassing van een modificatie van de Vestergaard-procedure.
- (J. Virol., 24, 87-90 (1977)). Het residu werd gesuspenseerd in 0,01 M
- 35 glycine-0,038 M tris(hydroxymethyl)aminomethaan (pH 9,0) met daarin 0,5%

8003889

- Triton X-100 (1 cm³ per fles). Dit mengsel werd gehomogeniseerd met een homogenisator en sonisch behandeld met twee cycles van 20 seconden met een sonicator in een stand van 90% efficiëncy. Hierna liet men het mengsel 1 uur bij 4°C reageren onder constant mengen met een magnetische roerder.
- 5 Het mengsel werd nu 1 uur bij 100.000 x g gecentrifugeerd en de bovenstaande vloeistof als vaccin gewonnen. Dit vaccin werd bij -70°C opgeslagen tot gebruik. Het vaccin werd gemengd met een gelijk volume Freund's compleet of Freund's incompleet adjuvans en geëmulgeerd in een adjuvans mengapparaat. Een tweede subeenheidsvaccin werd geproduceerd door een modificatie van deze procedure. De extraherende oplossing was 2,5% nonidet P-40 (NP-40) in gedestilleerd water bereid als beschreven door Martin in Infect. Immun. 5, 248-254 (1972).
- 10

Voorbeeld II:

Bepaling activiteit

- 15 Met Triton X-100 gesolubiliseerd IBR-subeenheidsvaccin en celcontrolepreparaten werden toegediend aan 10 IBR seronegatieve runderen en wel met twee intramusculaire doses met een tussenpoos van 20 dagen als weergegeven in tabel A. De dieren werden dagelijks onderzocht op klinische tekenen van ziekte. De rectale temperaturen werden opgetekend
- 20 3 dagen vóór vaccinatie en 10 dagen na vaccinatie. Neussecreties werden opgevangen om virus te isoleren vóór vaccinatie en op de dagen 2, 3 en 7 na de vaccinatie. Serummonsters werden wekelijks getrokken.

Exp. 1. Bepaling subeenheidsvaccinactiviteit.

- Alle 10 dieren bij dit experiment bleven klinisch normaal gedurende het gehele onderzoek. De rectale temperaturen na de vaccinatie lagen binnen $\pm 1^{\circ}\text{C}$ van de temperaturen vóór vaccinatie. Uit de neussecreties kon geen virus worden geïsoleerd, noch vóór noch na de vaccinatie. De serumneutralisatietiters zijn weergegeven in tabel B.

30

35

8003889

8003889

Tabel A: Vaccinatieschema voor het bepalen van de antigene activiteit van met Triton X-100 gesolubiliseerd IBR subeenheidsvaccin

Kalf	Vaccin	dosis (ml) vaccinatie (2)
1	celcontrole zonder adjuvans	1
2	celcontrole met adjuvans	2
3	IBR-subeenheid zonder adjuvans	1
4	"	1
5	"	2
6	"	2
7	IBR-subeenheid met adjuvans (1)	2
8	"	2
9	"	4
10	"	4

-10-

(1) Freund's compleet adjuvans.

(2) 1 ml zonder adjuvans en elke 2 ml met adjuvans bevatten 4,4 mg geëxtraheerd proteïne.

Tabel B: Serum neutralisatie titers na intramusculaire toediening van met Triton X-100 gesolubiliseerd IBR subeenheidsvaccin.

Kalf	Vaccin	dosis (ml) ⁽⁴⁾	Serum neutralisatie titer (1)						
			weken na vaccinatie (3)						
			1	2	3	4	5	6	7
1	celcontrole zonder adjuvans	1	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
2	celcontrole met adjuvans	2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
3	IBR subeenh. zonder adjuvans	1	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
4	"	1	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
5	"	2	<2	8	4	8	2	2	2
6	"	2	<2	4	4	8	8	8	4
7	IBR subeenh. met adjuvans ⁽²⁾	2	<2	4	8	128	128	128	128
8	"	2	<2	8	16	1024	512	512	512
9	"	4	<2	64	64	512	512	512	512
10	"	4	<2	64	64	1024	1024	512	512

(1) Titer uitgedrukt in de reciproke van de hoogste serumverduiming die de plaque-telling met tenminste 50% verminderde.

(2) Freund's compleet adjuvans.

(3) 2e dosis van het vaccin na 3 weken toegediend.

(4) zie tabel A.

Voorbeeld III:

Bepaling van de bescherming

20 IBR seronegatieve kalveren, 3-6 maanden oud, werden naar willekeur verdeeld in 5 groepen (4 in elke groep) en ondergebracht in gescheiden, gesloten en geïsoleerde ruimten gedurende dit onderzoek. De groepen kalveren, aangeduid 1-5, werden intramusculair gevaccineerd als in tabel C is weergegeven. 30 dagen na de vaccinatie werden de kalveren besmet met een standaardvirusinoculum (1×10^6 PFU Cooperstam IBR, 10e passage). Een verstuiver werd toegepast om 2 cm^3 inoculum aan elk neusgat toe te dienen.

De kalveren werden dagelijks op klinische tekenen van ziekte onderzocht en wel van 7 dagen vóór de vaccinatie tot het eind van de studie. De rectale temperaturen werden opgenomen van 3 dagen vóór de vaccinatie tot 10 dagen na elke vaccinatie en gedurende 14 dagen na de besmetting. Neussecreties werden opgevangen voor het isoleren van virus 3 maal vóór de vaccinatie en dagelijks gedurende 7 dagen na de initiële vaccinatie bij elke groep. Na de experimentele besmetting werden de neussecreties op de volgende tijdstippen opgevangen: 5 minuten na de besmetting, telkens met tussenpozen van 15 minuten gedurende het eerste uur na de besmetting, elk uur tot 15 uur tot na de besmetting en 18, 20, 22 en 24 uren na de besmetting en hierna telkens met tussenpozen van 24 uur tot 14 dagen na de besmetting. De serummonsters werden driemaal vóór de vaccinatie en met wekelijkse tussenpozen na de vaccinatie getrokken.

Na de vaccinatie ontwikkelden 4 van de 4 controlekalveren en 5 van de 12 gevaccineerde harde zwellingen op de plaats van de inenting en koortseffecten (40 tot $41,1^\circ\text{C}$) die 1-3 dagen duurde. Diepe intramusculaire inoculatie en vermindering van inoculumkruip verhinderden een reactie op de tweede vaccinatie.

Tabel D geeft de serumneutralisatietiters na vaccinatie en besmetting weer.

Na een intranasale besmetting met IBRV bleven alle kalveren in de groepen 2, 3, 4 en 5 klinisch normaal, alleen de kalveren 5, 10 en 11 ontwikkelden een lichte infectie van de luchtwegen. Clinische tekenen van ziekte omvatten verhoogde temperaturen, intranasale herpetische

8003889

pustules en een fibrino-necrotisch neusexudaat. Het klinische verloop van de ziekte, waargenomen bij de kalveren 10 en 11, werd gekenmerkt door een verhoogde temperatuur, na herstel van de intranasale beschadigingen en het optreden van neusexudaat. De temperatuur keerde terug op zijn basislijn 24 uur na een antibioticumtherapie, begonnen op de 9e dag na de besmetting. Kalf 20 overleed om redenen die niets met het experiment te maken hadden en wel 38 dagen na de vaccinatiedag. Een post mortemonderzoek leverde geen enkele aanwijzing omtrent ziekte of beschadiging op de plaats van de vaccinatie. Besmetting van controle-kalveren leverde een zware luchtwegenziekte op met een sterk verhoogde temperatuur (tot 41,7°C) en de vorming van grote fibrino-necrotische plaques op de neusmucosa.

Virus kon niet worden aangetoond in de neussecreties vóór en na de vaccinatie. Bij de groepen 2 en 3 werd besmettingsvirus geïsoleerd 5 en 15 minuten na de besmetting, maar niet meer op 30 minuten en later na de besmetting. Een besmettingsinoculumvirus kon evenmin worden geïsoleerd uit de neussecreties van kalveren in de groepen 4 en 5 op het tijdstip 5 minuten na de besmetting. Na de aanvankelijke clearing van besmettingsvirus werd virus geïsoleerd uit neussecreties 18 uur na besmetting in de groepen 2 en 3 en 22 uur na besmetting in de groepen 4 en 5. Tabel E geeft details omtrent het voorkomen van virus in de neussecretie gedurende dagen 1-14 na besmetting. Virus werd niet geïsoleerd uit de kalveren 13, 14, 17, 18 of 19 na de intranasale besmetting.

Tabel C: Vaccinatieschema ter bepaling van het effect van met Triton X-100
en NP-40 gesolubiliseerde IBR subvirus vaccins

Groep	Kalf	Vaccin	dosis van dit vaccin (1)
1	1 tot 4	met Triton X-100 gesolubiliseerde celcontrole	1
2	5 tot 8	met Triton X-100 verkregen IBR sub- eenh.	1
3	9 tot 12	met NP-40 verkregen IBR subeenh.	1
4	13 tot 16	met Triton X-100 verkregen IBR subeenh.	2
5	17 tot 20	met NP-40 verkregen IBR subeenh.	2

-14-

(1) Elke dosis bestond uit 1 ml cel-extract en 1 ml Freund's incompleet adjuvans.

Elke ml van het Triton X-100 extract bevatte: 3,5 mg proteïne en bij het NP-40 extract bevatte
elke ml 5,8 mg proteïne. De 2e dosis van het vaccin werd na 30 dagen toegediend.

Tabel D: Serum neutralisatie titers na intramusculaire toediening van het Triton X-100 en NP-40
gesolubiliseerd IBR subvirus vaccin

Groep/ dier	subeenh. vaccin	Serum neutralisatie titer (1)				Weken na besmetting (3)						
		weken na vaccinatie										
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2
Groep 1	controle											
1		<2	<2	<2	<2	<2				<2	<2	16
2		<2	<2	<2	<2	<2				<2	<2	32
3		<2	<2	<2	<2	<2				<2	<2	16
4		<2	<2	<2	<2	<2				<2	<2	32
groep 2	Triton X-100											
5	1 dosis	<2	<2	16	16	32				128	128	512
6		<2	2	8	16	16				256	256	512
7		<2	<2	8	16	16				32	32	512
8		<2	2	4	16	32				128	128	512
groep 3	NO-40											
9	1 dosis	<2	2	64	32	64				128	128	256
10		<2	<2	32	32	64				128	128	512
11		<2	2	64	32	64				256	256	512
12		<2	4	64	32	64				256	256	1024
groep 4	Triton X-100											
13	2 doses	<2	2	16	64	32	256	256	512	512	512	512
14		<2	2	16	32	64	1024	1024	512	512	512	512
15		<2	2	8	8	8	256	256	128	128	64	256
16		<2	2	8	16	16	128	128	128	128	128	128
groep 5	NP-40											
17	2 doses	<2	2	8	32	32	256	512	512	512	256	512
18		<2	2	8	64	64	256	256	256	256	256	512
19		<2	<2	32	32	64	256	256	256	128	128	256
20		<2	2	16	16	16	128	(2)				

(1) Titer uitgedrukt als de reciproke v.d.hoogste serum-verdunning die de plaque telling met >50% verminderde.

(2) Kalf stierf 58 dagen na de vaccinatie.

(3) Intranasale besmetting met 1×10^6 PFU
Goeder stam IBR virus toegediend 30
dagen na de laatste dosis v.h. vaccin

Tabel E: Virus isolatie na een intranasale besmetting van kalveren gevaccineerd met door Triton X-100 en NP-40 gesolubiliseerd IBR subvirus vaccin.

Groep/ dier	subeenh. vaccin	Virus titers (1) op dagen na de besmetting													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
groep 1 controle															
1		3,8	5,3	7,4	7,0	6,7	5,8	5,5	3,2	2,5	-(2)	-	-	-	-
2		2,3	5,0	5,7	7,2	7,3	6,0	6,2	6,0	3,0	-	-	-	-	-
3		3,0	4,8	6,8	7,0	6,8	6,3	5,9	4,0	-	-	-	-	-	-
4		3,7	5,7	7,7	7,3	7,0	6,0	5,5	3,4	3,0	-	-	-	-	-
groep 2 Triton X-100															
5	1 dosis	-	-	3,0	5,0	5,8	4,7	5,9	-	-	-	-	-	-	-
6		-	3,0	3,7	5,5	6,0	5,3	5,0	-	-	-	-	-	-	-
7		-	2,3	2,3	4,2	6,7	5,6	5,8	4,0	-	-	-	-	-	-
8		-	-	-	-	2,9	1,8	1,5	-	-	-	-	-	-	-
groep 3 NP-40															
9	1 dosis	-	1,0	4,6	4,8	5,0	3,2	4,3	2,5	-	-	-	-	-	-
10		-	-	1,3	1,7	4,0	3,0	4,7	4,0	1,8	1,8	-	-	-	-
11		-	1,0	3,4	4,7	5,2	4,5	4,5	1,6	-	-	-	-	-	-
12		1,0	3,5	5,8	6,0	6,0	4,5	2,7	-	-	-	-	-	-	-
groep 4 Triton X-100															
13	2 doses	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15		1,5	-	2,3	2,9	3,7	4,6	5,6	4,8	3,0	3,0	-	-	-	-
16		1,9	1,2	1,6	2,6	1,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
groep 5 NP-40															
17	2 doses	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(1) virus titer als $\log_{10}$ plaque vormende eenh./neusprop.

(2) geen virus werd aangetoond indien geen cijfer is ingevuld.

Hierboven betekent "verhinderung van IBR-ziekte", dat het vaccin
runderen goed tegen de ontwikkeling van klinische verschijnselen van
de ziekte beschermt wanneer ze worden besmet met virulent IBR-virus.
Bij vee is een belangrijk teken omtrent ziekte een temperatuursverhoging
5 boven $39,7^{\circ}$ of meer gedurende 2 of meer dagen. Gevaccineerd vee kan na
de besmetting, hoewel geen klinische verschijnselen van ziekte optreden,
virulent IBR-virus afgeven, dat de infectie kan doorgeven aan niet ge-
vaccineerd vee. Wanneer daarom gesproken wordt over "verhinderung van
een IBR-infectie" betekent zulks, dat het vaccin tevens verhindert
10 dat virus wordt afgegeven. Dit resultaat vooral is nieuw en verrassend.

CONCLUSIES:

1. Een parenteraal vaccin in een injecteerbare dosisvorm ter ver-
hinderen van infectieuze runderrhinotracheitis (IBR) bij runderen, met
het kenmerk, dat dit een effectieve IBR-ziekte verhinderende hoeveelheid
aan IBR-virusomhullingseiwit bevat, welk virusomhullingseiwit werd ver-
5 kregen door het kweken van virulent IBR-virus in een celmediummengsel
dat de vermenigvuldiging van dit virus bevordert, het scheiden van de
geïnfecteerde cellen uit dit mengsel, het in contact brengen van de
celmembranen van deze afgescheiden cellen met een waterige oplossing van
een non-ionogeen detergens en afscheiding van de aldus verkregen wa-
10 terige oplossing van het niet gesolubiliseerde residu.
2. Parenteraal vaccin volgens conclusie 1, waarbij de injecteer-
bare dosis een adjuvans bevat voor het bevorderen van de immunogene
respons van runderen op dit virusomhullingseiwit.
3. Parenteraal vaccin in injecteerbare dosisvorm voor het immuni-
15 sieren van vee tegen infectieuze runderrhinotracheitis en het tegengaan
van de overdracht van infectieus IBR-virus, bestaande uit een waterige
oplossing van IBR-virusomhullingseiwit gemengd met een met water niet
mengbaar olieadjuvans, welke vaccindosis een effectieve hoeveelheid
van dit virusomhullingseiwit bevat voor een IBR-immunisatie, en het
20 verhinderen, dat IBR-virus wordt afgegeven door een opeenvolgende
toediening van twee van dit soort doses per dier, met het kenmerk, dat
het virusomhullingseiwit werd verkregen door virulent IBR-virus
te kweken in een celmedium dat de vermenigvuldiging van dit virus be-
vordert, de geïnfecteerde cellen uit dit mengsel af te scheiden, de cel-
25 membranen van deze afgescheiden cellen met een waterige oplossing van
een niet-ionogeen detergens te behandelen, waarbij een waterige oplos-
sing van het virusomhullingseiwit wordt verkregen, gevolgd door af-
scheiding van deze waterige oplossing van het niet gesolubiliseerde
residu.
- 30 4. Parenteraal vaccin volgens conclusie 3, met het kenmerk, dat
de afgescheiden oplossing van een subeenheidseiwit in dit vaccin
wordt gebruikt zonder concentratie van het eiwit daarin.
5. Parenteraal vaccin volgens conclusie 3 of 4, met het kenmerk,
dat elk van de doses een volume van ca. 2 cm³ heeft en elke dosis
35 4-8 mg totaal eiwit bevat.

8003889

6. Vaccin volgens conclusie 3-5, met het kenmerk, dat het vrij is van actief IBR-virus.

7. Werkwijze voor het tegengaan van een infectie van vee met infectieus runderrhinotracheitisvirus en overdracht van IBR-virus door virusafgifte, met het kenmerk, dat men tenminste twee achtereenvolgende doses van een vaccin parenteraal toedient, dat een effectieve ziekte-verhinderende hoeveelheid IBR-virusomhullingseiwit bevat, welk virusomhullingseiwit werd verkregen door een virulent IBR-virus in een celmediummengsel te kweken, dat de vermenigvuldiging van dit virus bevordert, de geïnfecteerde cellen uit dit medium afscheiden, de celmembranen van deze afgescheiden cellen in contact te brengen met de waterige oplossing van een niet-ionogeen detergens, waarbij een waterige oplossing van het virusomhullingseiwit ontstaat, en deze waterige oplossing van het niet gesolubiliseerde residu te scheiden.

8. Werkwijze volgens conclusie 7, met het kenmerk, dat het vaccin tevens een adjuvans bevat voor het bevorderen van de immunogene reactie.

9. Werkwijze volgens conclusie 7 of 8, met het kenmerk, dat elk van de doses 4-8 mg totaal proteïne bevat.

10. Werkwijze volgens conclusie 7, waarbij het vaccin vrij is van actief IBR-virus.

8003889