



SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus  
Patent- och registerstyrelsen

C	(45) Patēntti myönnetty - Patent beviljats	
	(51) Kv.1k.4 - Int.c1.4	
	A 61K 39/12	
	(21) Patenttihakemus - Patentansökning	842215
	(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	01.06.84
	(24) Alkupaivä - Löpdag	01.06.84
	(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	07.12.84
	(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	30.11.89
	(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	
	06.06.83 NL 8301996	

(71) Hakija - Sökande

1. Duphar International Research B.V., C.J. Van Houtenlaan 36, Weesp, Netherlands, (NL)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Roerink, Jan Hendrik Gerrit, C.J. Van Houtenlaan 36, Weesp, Netherlands, (NL)

(74) Asiamies - Ombud: Oy Kolster Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä elävän virusrokotteen valmistamiseksi  
Förfarande för framställning av ett levande virusvaccin

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

DE A 1960713 (A 61 K 23/00), GB C 425406, GB C 888180, SE B 364987 (C 12 K 5/00),  
SE B 326796 (A 61 K 23/00)

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö koskee menetelmää tehostetun vaikutuksen omaavien elävien heikennettyjen rokotteiden valmistamiseksi. Menetelmän mukaan virusrokote liuotetaan öljy-vedessä-emulsioon tai elävä virusrokote sekoitetaan inaktivoituun rokotteeseen, joka sisältää öljy-vedessä-emulsion.

Uppfinningen avser ett förfarande för framställning av levande försvagade vacciner med förstärkt effekt. Enligt förfarandet löses virusvaccinet i en olja-i-vatten-emulsion eller blandas det levande virusvaccinet med ett inaktiverat vaccin innehållande olja-i-vatten-emulsionen.

## Menetelmä elävän virusrokotteen valmistamiseksi

Keksinnön kohteena on menetelmä elävien virusrokotteiden valmistamiseksi.

5 On tunnettua, että elävät heikennetyt virukset ovat yleensä vähemmän immunogeenisiä kuin alkuperäinen virulentti virus, josta ne ovat johdetut. Heikentämisen tarkoitus on poistaa virulenssi tai ainakin pienentää sitä niin vahvasti, että näin heikennettyä virusta voidaan 10 turvallisesti antaa. Kuitenkin tämä heikennys tavallisesti myös johtaa pienentyneeseen immunogeeniseen aktiivisuuteen.

Elävät virusrokotteet pakastekuivataan yleensä tarttuvuuden stabiloimiseksi, minkä tuloksena tällainen 15 elävä rokote on pitempään stabiili. Elävä rokote liuotetaan ennen antamista esimerkiksi fysiologiseen suolaliuokseen tai joskus inaktivoituun rokotteeseen. Tällainen inaktivoitu rokote on melkein aina  $Al(OH)_3$ :een adsorboitu rokote. Tällainen elävä virusrokote yhdistetään vain käytännön syistä inaktivoituun rokotteeseen; tosiasiaassa 20 molemmat voidaan nyt antaa samanaikaisesti. Yleensä tällainen yhdistelmä ei johda elävän aineosan suurempaan tehoon.

Toistaiseksi on pidetty selviönä, että eläviä rokotteita käyttäen voitaisiin aikaansaada suurempi immuuni-reaktio esimerkiksi lisäämällä viruspitoisuutta tai käyttämällä immunogeenisempää kantaa. 25

Yllättäen on huomattu, että öljy-vedessä-(o/w)-emulsion käytöllä "liuottimena" eläville rokotteille on 30 positiivinen vaikutus rokotettujen eläinten serologiseen ja immuunireaktioon. Tässä öljy-vedessä-emulsiossa on vesifaasi läsnä ulompana, ja pakastekuivattu elävä rokote voidaan helposti liuottaa siihen.

Edelleen on havaittu, että käyttämällä öljy-vedessä-emulsiota liuottimena eläville rokotteille nuorissa eläimissä, joilla on vielä äidin immuniteettia, aikaansaadaan hyvin voimakas serologinen reaktio. Tämän hämmästyttävän vaikutuksen voi aiheuttaa öljy-vedessä-emulsion elävää virusta suojaava vaikutus eläimessä olevien vasta-

5 aineiden aiheuttamaa neutraloitumista vastaan.

Keksinnön kohteena on siten elävän virusrokotteen valmistusmenetelmä, jolle on tunnusomaista, että elävä

10 rokote valmistetaan käyttämällä adjuvanttina öljy-vedessä-emulsiota.

Eräs keksinnön toteutusmuoto on, että sen sijaan, että elävä virusrokote tai -rokotteet sekoitettaisiin öljy-vedessä-emulsioon sellaisenaan, mainitut elävät ro-

15 kotteet voidaan sekoittaa inaktivoituun rokotteeseen tai rokotteiden seokseen, jotka sisältävät öljy-vedessä-emulsiota.

Keksinnön mukaisesti käytettävän emulsion öljyfaasi on mineraaliöljy, esimerkiksi Marcol<sup>®</sup> tai Drakeol<sup>®</sup>.

20 Öljyn määrä emulsiossa on yleensä välillä 15 - 50 tilavuus-%, edullisesti 20 - 30 tilavuus-%.

Käytettävä emulsio voidaan saada tavanomaisella tavalla käyttämällä emulgointiaineita, jotka soveltuvat öljy-vedessä-emulsioiden valmistukseen.

25 Keksintöä kuvataan nyt yksityiskohtaisemmin viitaten joihinkin kokeisiin, jotka on tehty elävällä heikennetyllä Bartha-kantaan perustuvalla Aujeszky-rokotteella, elävällä heikennetyllä tarttuva naudan Rhinotacheitis-

30 virus (IBRV)-rokotteella ja elävällä heikennetyllä hengitysteiden synktyiaali-virusrokotteella (RSV).

On tunnettua, että Bartha-kanta ei ole kovin aktiivinen immunologisesti varsinkaan porsaissa, joilla vielä on äidiltä saatuja vasta-aineita. Myöskään tämän rokotteen lisätty viruspitoisuus ei osoittautunut kykene-

35 väksi aiheuttamaan riittävän suurta seerumin tiitteriä.

Käyttämällä öljy-vedessä-emulsiota keksinnön mukaisesti saatiin hämmästyttävästi suurempi serologinen reaktio samalla virusmateriaalilla.

Esimerkki I

5 Koska elävien Aujeszky-rokotteiden tärkeä käyttökohde on nuorten juottoporsaiden rokottaminen, joilla vielä on äidin vasta-ainetiitteri Aujeszky'n tautiin nähden, on vertaileva serologinen koe tehty käyttäen mainittuja eläimiä. Sen tulokset on luetteloitu taulukossa A.

10

Taulukko A

Keskimääräiset seerumin neutralointitiitterit (SN-tiitterit) ennen ja jälkeen rokotuksen Bartha-rokotteella liuotettuna fysiologiseen suolaliuokseen tai 25-%:iseen  
15 öljy-vedessä-emulsioon (o/w-emulsio)

20

Rokotteen tyyppi	Ryhmä	Ikä rokotettaessa	Eläinten lukumäärä	2 viikkoa ennen rokotusta	Rokotuspäivänä	Viikkojen lukumäärä rokotuksen jälkeen				
						2	4	6	8	10
Fysiol. suolaliuos	I	18 w	6	3,8	1,6	7,3	10,8	-	-	-
	II	16 w	6	9,1	1,6	11,5	5,8	-	-	-
	III	14 w	8	4,3	1,3	5,3	6,1	4,5	-	6,8
o/w-emulsio	IV	14 w	8	4,5	2,3	16,2	18,9	22,9	-	47,3
	V	11 w	8	23,8	6,6	11,7	13,4	19,4	29,4	-

25

- = ei suoritettu

30

Verinäytteet vasta-ainetiitterin määrittämiseksi otettiin 2 viikkoa ennen rokotusta, rokotuspäivänä ja useita viikkoja rokotuksen jälkeen taulukossa A esitetysti.

35

Taulukon A esittämistä SN-tiittereistä ilmenee seuraavaa:

- Bartha-rokote fysiologisessa suolaliuoksessa ei pysty tuottamaan tyydyttävää serologista reaktiota, ei edes eläimissä, joilla äidiltä peräisin oleva immuniteetti on

hyvin pieni (1,3 - 1,6). Rokotushetkellä nämä eläimet olivat 14 - 18-viikkoisia.

-Bartha-rokote o/w-emulsiossa sitä vastoin antaa hyvät seerumin tiitterit annettaessa sitä porsaille, joiden äidiltä saatu immuniteetti on 2,3 - 6,6. Rokotettaessa nämä eläimet olivat 11 - 14-viikkoisia.

#### Esimerkki II

Toinen käyttöalue on nuorten emakkojen ja emakkojen rokottaminen. Käyttökelpoisuuden tässä tapauksessa määrittää oleellisesti eläinemosassa saavutetun tiitterin suuruus, koska vain tällöin voidaan varmistaa riittävän pitkään jatkuva äidin immuniteetti Aujeszky'n taudin suhteen jälkeläisissä.

Lähtien nuorista emakoista, joilla on äidiltä saattua immuniteettia, on tehty vertailu fysiologiseen suolaliuokseen liuotetun rokotteen ja 25-%:iseen öljy-vedessä-emulsioon liuotetun saman rokotteen välillä. Kumpaakin rokotetta annettiin kahdesti.

20

#### Taulukko B

Keskimääräiset SN-tiitterit ennen ja jälkeen 1. ja 2. rokotuksen 25-%:iseen öljy-vedessä-emulsioon (o/w-emulsio) liuotetulla Bartha-rokotteella ja fysiologiseen suolaliuokseen liuotetulla samalla rokotteella

25

Rokotetyyppi	Ryhmä	Eläinten lukumäärä	Ikä 1. rokotuksen sa (viikkoa)	SN-tiitteri ennen 1. rokotusta	Viikkojen lukumäärä 1. rokotuksen jälkeen				
					2	4	8	10	12
Fysiol. suolaliuos	VI	6	12	6,3	6,3	6,3 (*)	63	-	-
o/w-emulsio	VII	4	11	5,8	11,6	20,3	54 (*)	7080	3928
	VIII	4	11	4,9	10,3	22,5	23 (*)	4623	3012

35

- = ei suoritettu      \*) = 2. rokotuksen ajankohta

Taulukosta B ilmenee jälleen, että Bartha-rokote öljy-vedessä-formulaationa ensimmäisessä rokotuksessa läpääsee äidiltä peräisin olevan immuniteetin huomattavasti paremmin ja että sama rokote liuotettuna fysiologiseen suolaliuokseen ei tuota mitään serologista reaktiota yhden rokotuksen jälkeen näissä eläimissä, joilla on äidiltä saatu immuniteetti.

Toisen rokotuksen jälkeen näiden kahden formulaation välillä on myös selvä ero: vain 10-kertainen nousu tiitterissä savutetaan Bartha-rokotteella fysiologisessa suolaliuoksessa; käytettäessä Bartha-rokotetta öljy-vedessä-emulsiossa saavutettiin 130 - 200-kertainen nousu.

#### Esimerkki III

Tässä esimerkissä on käytetty yhdistettyä Aujeszky-influensa-rokotetta.

Influensarokote porsaille on inaktivoitu rokote, joka perustuu öljy-vedessä-emulsioon. Pakastekuivattu Bartha-rokote liuotetaan siihen välittömästi ennen käyttöä.

Tätä koetta varten käytettiin porsaita, joilla ei enää ole äidin vasta-aineita Aujeszky'n taudin suhteen, jotta olisi paremmin pystytty tutkimaan influensa-aineosan mahdollista negatiivista vaikutusta Bartha-rokotteeseen. Influensaviruksen määrää annosta kohti vaihdeltiin, ja tämä on ilmaistu arvoin "suuri", "kohtalainen" ja "pieni".

Taulukko C

Keskimääräiset Aujeszky-SN-tiitterit 1. tai 2. rokotuksen jälkeen suoritettuna öljy-vedessä-emulsiopohjaisella Aujeszky-influensarokotteella

5

10

15

Influenssa-annos	Rokotusten lukumäärä	Eläinten lukumäärä	SN-tiitteri 8 viikkoa 1. rokotuksen jälkeen	SN-tiitteri 2 viikkoa 2. rokotuksen jälkeen
"suuri"	2 x	4	195 (*)	3016
	1 x	3	159	132
"kohtalainen"	2 x	4	116 (*)	3877
	1 x	3	112	58
"pieni"	2 x	4	107 (*)	3887
	1 x	3	113	103

\*) toinen annos annettiin näille eläimille 8 viikkoa ensimmäisen rokotuksen jälkeen

20

Taulukosta C käy selväksi, että inaktivoidun influensaviruksen läsnäololla öljy-vedessä-emulsiossa ei ole haitallista vaikutusta elävän Aujeszky-aineosan tuloksiin.

25

Serologinen reaktio sekä 1. että 2. rokotuksen jälkeen on erittäin hyvä.

30

Eri kokeissa eläinten ruumiinlämpö mitattiin 1. päivästä ennen rokotusta 3. päivään rokotuksen jälkeen. Minään ajankohtana rokotuksen jälkeen ei öljy-vedessä-formulaatiolla rokotetuissa eläimissä huomattu kohonnutta lämpötilaa. Mitään paikallisia rokotusreaktioita ei myöskään havaittu. Elävää rokotetta öljy-vedessä-formulaationa on siis pidettävä turvallisena.

Esimerkki IV

Keksinnön mukaisesti käytettävän öljy-vedessä-emulsion vaikutusta tutkittiin myös elävällä heikennetyllä tarttuvalla naudan Rhinotracheitis-viruksella (IBRV) immunisoimalla lehmät tavallisella määrällä rokotevirusta liuotettuna joko 25-%:iseen öljy-vedessä-emulsioon tai fysiologiseen suolaliuokseen.

Serologiset reaktiot ovat taulukossa D esitetyt.

10

Taulukko D

Keskimääräiset SN-tiitterit ennen ja jälkeen 1. ja 2. rokotuksen IBRV-rokotteella 25-%:isessä öljy-vedessä-emulsiossa (o/w-emulsio) tai fysiologisessa suolaliuoksessa.

15

20

25

Rokotteen tyyppi	Eläinten lukumäärä	Rokotusten lukumäärä	SN-tiitteri		
			ennen 1. rokotusta	3 viikkoa 1. rokotuksen jälkeen	6 viikkoa 1. rokotuksen jälkeen
Fysiol.	4	1	0	1,4 (1)*	1,6 (1)
suolal.	4	2	0	1,3 (2)	3,2 (3)
o/w-emulsio	4	1	0	3,8 (4)	3,8 (4)
	4	2	0	2,9 (4)	8,5 (4)
ei rokotettu	4	0	0	0	0

\*) suluissa olevat numerot tarkoittavat niiden lehmien lukumäärää, joilla SN-tiitteri on positiivinen rokotuksen jälkeen

30

Taulukossa D esitetyistä SN-tiittereistä voidaan vetää seuraavat johtopäätökset:

35

1) 100 % eläimistä, jotka on rokotettu keksinnön mukaisesti valmistetulla o/w-emulsiota sisältävällä rokotteella antaa serologisen reaktion, kun taas vain 50 % eläimistä fysiologisessa suolaliuosryhmässä antaa positiivisen reaktion.

2) Sn-tiitterit rokotuksen jälkeen o/w-ryhmässä ovat 2-3 kertaa suuremmat kuin toisessa ryhmässä.

Esimerkki V

5 Tässä esimerkissä tutkittiin keksinnön mukaisesti käytettävän öljy-vedessä-emulsion vaikutusta elävän rokotteen serologiseen reaktioon rokottamalla lehmiä elävällä heikennetyllä hengitysteiden synkytiaalivirusrokotteella (RSV), joko 25-%:isessä öljy-vedessä-emulsiossa tai fysiologisessa suolaliuoksessa.

10 Serologiset reaktiot rokotuksen jälkeen kummankin tyyppisillä rokotteilla on esitetty taulukossa E.

Kummallakin rokotetyypillä annettiin samat määrät virusta lehmille.

15

Taulukko E

Keskimääräiset epäsuorat immunofluoresenssi-(i.I.F.)-RSV-tiitterit rokotuksen jälkeen RSV-rokotteella liuotettuna fysiologiseen suolaliuokseen tai 25-%:iseen öljy-vedessä-emulsioon (o/w-emulsio)

20

Rokotteen tyyppi	Eläinten lukumäärä	i-IF-tiitteri	
		ennen rokotusta	3 viikkoa rokotuksen jälkeen
Fysiologisen suolaliuos	8	380	269
o/w-emulsio	8	453	3044
ei rokotettu	3	172	50

25

Taulukon E tuloksista ilmenee, että:

30

RSV-rokotteella o/w-emulsiossa rokotetuilla eläimillä on hyvin suuri tiitteri, vieläpä silloin, kun huomattava tiitteri on olemassa ennen rokotusta (äidin immuniteetista johtuen). Rokote liuotettuna fysiologiseen suolaliuokseen ei kuitenkaan aiheuta tiitterin kasvamista eläimillä, joilla on äidin immuniteettia.

35

## Patenttivaatimukset

1. Menetelmä elävän virusrokotteen valmistamiseksi,  
t u n n e t t u siitä, että elävä rokote valmistetaan  
5 käyttämällä adjuvanttina öljy-vedessä-emulsiota.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,  
t u n n e t t u siitä, että valmistetaan elävä Aujeszky-  
rokote.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä,  
10 t u n n e t t u siitä, että valmistetaan elävä Aujeszky-  
rokote Bartha-kannan pohjalla.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,  
t u n n e t t u siitä, että elävä rokote liuotetaan inak-  
tivoituun rokotteeseen, joka sisältää yhden tai useampia  
15 antigeenejä ja joka on formuloitu öljy-vedessä-emulsioksi.

5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä,  
t u n n e t t u siitä, että elävä rokote otetaan inakti-  
voituun influensarokotteeseen, joka sisältää öljy-vedessä-  
emulsiota.

20 6. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,  
t u n n e t t u siitä, että valmistetaan elävä tarttuva  
naudan rhinotracheitis-rokote.

7. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,  
t u n n e t t u siitä, että valmistetaan elävä hengitys-  
25 teiden synkytiaalirokote.

## Patentkrav

1. Förfarande för framställning av ett levande virusvaccin, k ä n n e t e c k n a t därav, att det levande vaccinet framställs genom att använda en olja-i-vatten-emulsion som adjuvant.  
5
2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att man framställer ett levande Aujeszky-vaccin.
- 10 3. Förfarande enligt patentkravet 3, k ä n n e t e c k n a t därav, att man framställer ett levande Aujeszky-vaccin på basis av Bartha-stammen.
- 15 4. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att det levande vaccinet löses i ett inaktiverat vaccin som innehåller en eller flera antigenener och som formulerats i en olja-i-vatten-emulsion.
- 20 5. Förfarande enligt patentkravet 4, k ä n n e t e c k n a t därav, att det levande vaccinet upptages i ett inaktiverat influensavaccin som innehåller olja-i-vatten-emulsion.
6. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att man framställer ett levande infektiöst nötdjursrhinotracheitis-vaccin.
- 25 7. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att man framställer ett levande respiratoriskt syncytialvaccin.