(19) DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK

PATENTSCHRIFT

Wirtschaftspatent

ISSN 0433-6461 (11) 155 875

Erteilt gemaeß § 5 Absatz 1 des Aenderungsgesetzes zum Patentgesetz

Int.Cl.³ 3(51) A 61 K 39/145

AMT FUER ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veroeffentlicht

(21) WP A 61 K/ 226 778 (22) 31.12.80 (44) 14.07.82

(71) INSTITUT FUER ANGEWANDTE VIROLOGIE,119/BERLIN;DD;
(72) NORDHEIM, WILLY,DR. HABIL. DIPL.-ING.;BRAEUNIGER, SIEGFRIED,DR. DIPL.-BIOL.;
STARKE, GUENTER,PROF. DR. SC. MED. MR;KONSTANTINOW-SIEBELIST, INGEBORG,DR. DIPL.-BIOL.;DD;
PETZOLD, GUENTER,DR. DIPL.-CHEM.;STAHL, JOACHIM,DR. DIPL.-ING.;KIRSCH, BRIGITTE;
NORDHEIM, REGINA;DD;
(73) siehe (72)
(74) DR. HABIL. WILLY NORDHEIM, INSTITUT FUER ANGEWANDTE VIROLOGIE, 1190 BERLIN, BRITZER STR.1-3

(54) VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG EINES BALLASTSTOFFARMEN INAKTIVIERTEN INFLUENZAIMPFSTOFFES

(57)Gebiet: Technische Virologie, insbesondere Impfstoffproduktion. Das Ziel ist die Entwicklung eines Verfahrens, durch das es moeglich ist - ohne wesentliche Veraenderung der Verfahrensweise fuer die Herstellung von ueblichen Influenzavollvirusimpfstoffen-, die entscheidenden Oberflaechenantigene der jeweils zum Einsatz gelangenden Influenzaviren zu solubilisieren und durch Abtrennung der unloeslichen Phase gleichzeitig einen entscheidenden Reinigungseffekt durch die Beseitigung nicht notwendiger Ballaststoffe zu erreichen.Influenzaviren der entsprechenden Typen werden lediglich durch Zugabe von Natriumdesoxycholat als einzigem zusaetzlichen Hilfsstoff und sonst ohne Veraenderung der Milieubedingungen behandelt,dann erfolgt eine Separation in eine loesliche und eine unloesliche Phase.Die unloesliche Phase enthaelt die wesentlichen Ballaststoffe. Die loesliche Phase, die vorrangig die Oberflaechenantigene Haemagglutinin und Neuraminidase enthaelt, wird zu Impfstoff verarbeitet.Moegliche Anwendungsgebiete:Grippeimstoffproduktion, besonders fuer die Anwendung bei Risikopersonen und Kindern.

Verfahren zur Herstellung eines ballaststoffarmen inaktivierten Influenzaimpfstoffes

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft die technische Herstellung von ballaststoffarmen inaktivierten Influenzaimpfstoffen auf dem Wege der Solubilisierung der Oberflächenantigene Hämagglutinin und Neuraminidase von Influenzaviren durch einfache Behandlung mit Natriumdesoxycholat ohne wesentliche Veränderung der konventionellen technologischen und Substratbedingungen. Auf Grund der spezifischen Ballaststoffarmut dieser Impfstoffe, die durch die gezielte Solubilisierung der Oberflächenantigene erreicht wird, entstehen Impfstoffe, die besonders auch für Risikopersonen bzw. für eine Anwendung im Kindesalter bedeutsam sind.

Das Gebiet der technischen Anwendung bezieht sich auf Betriebe, die entsprechende Impfstoffe oder artverwandte Präparate für die Human- oder auch Veterinärmedizin produzieren. Zusätzlich ist die Anwendung einführbar in Einrichtungen, die Antigene bzw. Präparate für die routinemäßige Diagnostik und die Analytik herstellen. Auch ist diese Verfahrensweise einführbar in der angewandten Forschung und Entwicklung, wo ballaststoffarme Präparate benötigt werden.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Lösungen zur Virusspaltung mit chemischen bzw. physikochemischen (z. B. mit Detergenzien) oder biochemischen (z. B. mit Enzymen) Mitteln zum Zwecke der Herstellung

von Spalt- bzw. Subeinheitenimpfstoffen oder von speziellen Antigenpräparationen sind zwar bekannt, jedoch haben sie z. B. den Nachteil, daß mit relativ hohen Detergenz-Konzentrationen, langen Verweil- bzw. Herstellungszeiten, zum Teil geringen Ausbeuten unter Zerstörung der Antigenstrukturen gearbeitet wird und diese auch nicht auf alle Influenzavirusstämme übertragbar sind. Im Falle der Anwendung von freien Enzymen sind eine beträchtliche Hydrolyse und auch ein Übergang der Enzymproteine in das Antigenendprodukt nicht zu vermeiden.

Für den speziellen Einsatz von Natriumdesoxycholat oder Ammoniumdesoxycholat existieren Lösungswege oder sind Verfahrensvarianten beschrieben, die aber mehr oder weniger die Nachteile der oben beschriebenen Art besitzen. So wurde beispielsweise schon 1969 Desoxycholat-Spaltimpfstoff in Australien hergestellt (Bull. WHO 41, 639 (1969)). Influenzavirushaltige Allantoisflüssigkeit wurde konzentriert, mit 0,05 % HCHO inaktiviert, Natriumdesoxycholat bis zur Endkonzentration von 1 % zugefügt und bei 37 °C 30 min behandelt. Nach niedertouriger Zentrifugation zur Entfernung der Aggregate wurde 3 Tage bis zu einer Detergenzkonzentration von weniger als 100 ppm dialysiert. Oder in einem anderen Beispiel kamen auf 2 ml Virussuspension 0,5 ml 5 %ige Natriumdesoxycholatlösung (J. Immunology 95, 596 (1966)).

Die Orientierung auf eine gezielte Solubilisierung der Oberflächenantigene Hämagglutinin und Neuraminidase von Influenzaviren unter Einsatz von Natriumdesoxycholat mit einem hohen Eliminierungsgrad an störenden Ballaststoffen, einem weit zu variierenden Gewichtsverhältnis Natriumdesoxycholat:Hämagglutinin - allerdings unter dem besonderen Aspekt einer sehr niedrigen Detergenz-Konzentration -, einer hohen oder 100 %igen Adsorptionsrate der solubilisierten Oberflächenantigene, einer Inaktivierung der Influenzaviren ohne Chemikalien oder thermische Manipulationen, einer Anwendbarkeit auf alle Influenzavirusstämme der ent-

sprechenden Typen, hohen Ausbeuten und einem sparsamen Antigeneinsatz bei der Applikation ist dagegen technisch bisher in dieser Komplexität noch nicht erreicht worden.

Einige Nachteile der beschriebenen Art lassen sich durch Einhaltung bzw. Übertragung der im Wirtschaftspatent 146 386 und im WP C 12 D/221 207 niedergelegten Parameter beseitigen.

Ziel der Erfindung

Der Erfindung liegt der Effekt zugrunde, ein Verfahren zu entwickeln, durch das es möglich ist - ohne wesentliche Veränderung der Verfahrensweise für die Herstellung von üblichen Influenzavollvirusimpfstoffen -, lediglich durch Zugabe von Natriumdesoxycholat die entscheidenden Oberflächenantigene Hämagglutinin und Neuraminidase der jeweils zum Einsatz gelangenden Influenzaviren zu solubilisieren und durch Abtrennung der unlöslichen Phase gleichzeitig einen entscheidenden Reinigungseffekt durch Beseitigung nicht notwendiger Ballaststoffe zu erzielen und die solubilisierten Antigene direkt zum Impfstoff zu verarbeiten, und zwar in adsorbierter oder nicht adsorbierter Form, der dann wiederum auf Grund seiner Ballaststoffarmut für eine Anwendung bei Risikopersonen oder auch speziell bei Kindern geeignet ist.

Der nützliche Effekt stellt sich bei Anwendung der Erfindung im Vergleich zu eingefahrenen Influenzavollvirusimpfstoffen wie folgt dar: Die Impfstoffe in Form der endpräparierten solubilisierten Oberflächenantigene enthalten gegenüber industriell gefertigten Vollvirusimpfstoffen bis zu 90 % weniger Ballaststoffe aus Proteinen oder anderen stickstoffhaltigen Verbindungen. Der reaktogene Aluminiumgehalt kann - im Falle der Herstellung adsorbierter Impfstoffe aus Oberflächenantigenen - um größer oder gleich 65 % gesenkt werden, ohne dabei die Adsorptionsrate zu reduzieren. Eine Verminderung des eingegebenen Antigenanteils um z. B. die Hälfte der im Vollvirus-

impfstoff enthaltenen Menge ist vertretbar. Diese Faktoren führen zur Reduzierung der Reaktogenität für die Überempfindlichkeitsreaktion nach dem Soforttyp um mindestens 65 % und nach dem Spättyp um mindestens 50 %.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein technisch unkompliziert zu führendes Verfahren zur Herstellung von ballaststoffarmen inaktivierten Influenzaimpfstoffen in der Form anzugeben, daß durch gezielte Solubilisierung der Oberflächenantigene von Influenzaviren der entsprechenden Typen hochgereinigte Impfstoffe resultieren, die auch für Risikopersonen und zur Anwendung bei Kindern geeignet sind.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß unter wesentlicher Beibehaltung der eingefahrenen Technologie für Influenzavollvirusimpfstoffe Influenzaviren der entsprechenden Typen lediglich durch Zugabe von Natriumdesoxycholat als einzigem zusätzlichen Hilfsstoff und sonst ohne Veränderung der Milieubedingungen durch Schütteln oder eine andere Mischungsart oder auch durch einfaches Stehenlassen behandelt werden und dann eine Separation in eine lösliche und eine unlösliche Phase erfolgt. Die unlösliche Phase enthält die wesentlichen Ballaststoffe. Die lösliche Phase, die vorrangig die Oberflächenantigene Hämagglutinin und Neuraminidase enthält, wird zu Impfstoff vorbereitet.

Der Vorteil dieser Impfstoffe aus solubilisierten Oberflächenantigenen im Vergleich zu Vollvirusimpfstoffen besteht besonders darin, daß die Ballaststoffe bei Anwendung der Impfstoffe am Menschen nicht appliziert und damit die Nebenwirkungen wesentlich reduziert werden.

Im einzelnen kann wie folgt verfahren werden: Influenzaviren werden aus virushaltiger Allantoisflüssigkeit durch z. B. Ultrazentrifugation konzentriert. Das erhaltene Viruskonzentrat wird mit phosphatgepufferter physiologischer

NaCl-Lösung unter Zusatz von Natriumdesoxycholat (ca. 0,15 % Endkonzentration) aufgenommen. Nach kurzer Inkubation bei Raumtemperatur werden die Viruscores durch Ultrazentrifugation abgetrennt. Der Überstand enthält die Oberflächenantigene in relativ reiner Form, und deshalb können sie an eine deutlich reduzierte Menge des Adsorptionsmittels (verglichen mit Vollvirusimpfstoff) adsorbiert werden. Diese Adsorption, z. B. an Aluminiumoxidhydrat, ermöglicht auch die nahezu vollständige Abtrennung des eingesetzten Natriumdesoxycholats sowie auch anderer Begleitstoffe (Saccharose, N-haltige Ballaststoffe etc.). Das erhaltene Adsorbat wird auf den erforderlichen Antigengehalt des Impfstoffes eingestellt.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

Zur Solubilisierung der Oberflächenantigene Hämagglutinin und Neuraminidase wird virushaltige Suspension (X-71: A/PR/8/34 x A/Brazil/11/78 - H1N1) nach Zugabe von Natriumdesoxycholat im Verhältnis von 300 µg Hämagglutinin zu 1 500 µg Natriumdesoxycholat auf einem Horizontalschüttler 30 min behandelt. Danach werden die Ballaststoffe durch Ultrazentrifugation (55 000 bis 65 000 g, 120 min) bei 8 °C als Sediment abgetrennt. Der nach der Zentrifugation gewonnene Überstand wird auf Abwesenheit von vermehrungsfähigen Viren geprüft und auf den geforderten Antigengehalt eingestellt. Für Verdünnungen kommt phosphatgepufferte physiologische NaCl-Lösung mit 0,01 % Thiomersal zum Einsatz.

Aus dieser Präparation resultiert ein Impfstoff von folgender Zusammensetzung pro Dosis: 28 µg Hämagglutinin, 45 µg Protein, weniger als 0,25 µg Ovalbumin, 14 µg Kjeldahl-N.

Beispiel 2

Es wird nach Beispiel 1 verfahren.

Der hierbei präparierte Überstand wird nach der Einstellung des Hämagglutiningehaltes mit Aluminiumoxidhydratsuspension

versetzt. Nach Zentrifugation bei 1 000 g unter Kühlung wird der Überstand verworfen und das Sediment mit phosphatgepufferter physiologischer NaCl-Lösung auf das gleiche Volumen aufgefüllt. Alle Präparationsschritte erfolgen unter aseptischen Bedingungen.

Dieser Impfstoff besitzt die gleiche Zusammensetzung wie unter Beispiel 1 angegeben mit zusätzlich 0,25 mg Al pro Dosis.

Beispiel 3

Es wird nach Beispiel 1 verfahren.

Der hierbei präparierte Überstand wird nach Einstellung des Hämagglutiningehaltes mit äquimolaren Mengen von Kalziumchlorid- und Dinatriumhydrogenphosphatlösung versetzt. Zur Adsorption der Oberflächenantigene an das gebildete Kalziumhydrogenphosphat erfolgt kurzzeitiges Rühren der Suspension. Nach Zentrifugation bei 1 500 g unter Kühlung wird ein Sediment gewonnen, das mit phosphatgepufferter physiologischer NaCl-Lösung aufgenommen und erneut zentrifugiert wird. Das Resuspendieren dieses Sediments geschieht wieder mit phosphatgepufferter physiologischer NaCl-Lösung mit 0,01 % Thiomersal.

Dieser Impfstoff besitzt die gleiche Zusammensetzung wie unter Beispiel 1 angegeben mit zusätzlich 0,5 mg Ca pro Dosis.

Beispiel 4

Es wird nach Beispiel 1 verfahren.

Zur Solubilisierung der Oberflächenantigene der Viren des Stammes B/Singapore/222/79 werden 1 000 µg Natriumdesoxycholat pro 670 µg Hämagglutinin gegeben.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung eines ballaststoffarmen inaktivierten Influenzaimpfstoffes durch Behandlung mit Natriumdesoxycholat, gekennzeichnet dadurch, daß eine Solubilisierung der Oberflächenantigene Hämagglutinin und Neuraminidase erfolgt und nach Abtrennung in der löslichen Phase als Impfstoffantigene angereichert werden.

2. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß die mit Natriumdesoxycholat erhaltenen Impfstoffe die gleiche Qualität aufweisen wie bei Verwendung von Ammoniumdesoxycholat als Detergenz.

3. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß eine Beseitigung von viralen und nichtviralen Begleitstoffen, insbesondere von Proteinen, bei einem Gewichtsverhältnis Natriumdesoxycholat:Hämagglutinin von 1:1 bis $1:10^{-1}$ erfolgt.

4. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß der Ausgangs- bzw. Reinigungszustand der Influenzaviren oder die Einordnung des Solubilisierungsschrittes in den Prozeß ohne signifikanten Einfluß auf die Beseitigung von Begleitproteinen, die zwischen 50 bis 80% liegt, ist.

5. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß die Anordnung der Oberflächenantigene in ihren Komplexen eine nahezu 100%ige Adsorption, beispielsweise an Aluminiumoxidhydrat für biologische Präparate, gewährleistet und damit Begleitstoffe, beispielsweise aus der Dichtegradientenzentrifugation herrührend, abgetrennt werden.

6. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß bei der Solubilisierung die Infektiosität von Viren völlig oder weitestgehend verlorengeht und eine chemische Inaktivierung von Influenzaviren entfallen kann und damit formaldehydfreie Impfstoffe erhalten werden können.

7. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß die Verfahrensbedingungen auf die bisher bekannten Influenzaviren übertragbar und besonders auch für Influenzaviren A des Subtyps H1N1 anwendbar sind, sich damit mono-, bi- und polyvalente Impfstoffe herstellen und bei der Applikation kombinieren lassen.

8. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß sich auch Influenzaviren aus unterschiedlichen Typen und Subtypen im Gemisch mit dem Detergenz behandeln lassen und dann die Oberflächenantigene gleich zusammen gewonnen werden.

9. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß beispielsweise so präpariert werden kann, daß bei H1N1-Stämmen folgende Reinheitskriterien in dem entsprechenden Impfstoff erreicht werden können: Hämagglutiningehalt mit 0,058 mg/ml, Protein (Lowry) mit 0,092 mg/ml, Ovalbumin mit weniger als 0,0005 mg/ml, Kohlenhydrate mit 0,041 mg/ml, Natriumdesoxycholat mit weniger als 0,09 mg/ml und Aluminium mit 0,59 mg/ml.

10. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß die Impfstoffe für eine Applikation bei Kindern besonders geeignet sind und auch ohne anorganisches Adjuvans eine Immunantwort zeigen.

11. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß bei einmaliger Immunisierung (0,5 ml subcutan/Impfling) für einen signifikanten Anstieg des Hämagglutinations-Hemmungs-Titers 20 bis 50 µg Hämagglutinin/ml Impfstoff und Stamm, vorzugsweise 30 bis 40 µg/ml, ausreichend sind.

12. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß bei zweimaliger Immunisierung (je 0,5 ml subcutan) für einen signifikanten Titeranstieg 5 bis 10 µg Hämagglutinin pro ml und Stamm, vorzugsweise 10 µg/ml, ausreichend sind.

13. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß nach zweimaliger Immunisierung (je 0,5 ml subcutan) ein signifikanter Anstieg der Neuraminidase-Hemmungs-Titer erreicht wird.