



Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 18 Absatz 2 Patentgesetz

ISSN 0433-6461

(11)

211 444

Int.Cl.³

3(51) A 61 K 39/145

AMT FUER ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

(21) WP A 61 K/ 2426 210

(22) 19.08.82

(45) 11.07.84

(71) VEB SAECHSISCHES SERUMWERK DRESDEN;DD;
(72) GLATHE, HORST, DR.SC.MED.VET.; MALUR, JOHANNES, DR.SC.NAT. DIPL.-CHEM.; KUNZE,
MARTINA, DIPL.-BIOCHEM.; KLENZ, GEBHARD, DR.RER.NAT. DIPL.-CHEM.; HEHME,
NORBERT, DIPL.-CHEM.; HAHN, KONRAD, DR. DIPL.-CHEM.; OLECHNOWITZ,
ADOLF-FRIEDRICH, DR.SC. DIPL.-CHEM.; ENGEL, WOLF-DIETRICH, DIPL.-CHEM.;
PESCHECK, CHRISTOPH, DIPL.-BIOL., DD

(54) VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON INFLUENZA-IMPfstOFFEN

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung der immunogenen Bestandteile des Influenzavirus und dessen Verwendung zur Herstellung von Influenzaimpfstoffen, die aufgrund ihres Reinheitsgrades zur Anwendung sowohl bei Erwachsenen als auch bei Kindern geeignet sind. Das Ziel der Erfindung ist ein im industriellen Maßstab einsetzbares Verfahren zur Gewinnung eines inaktivierten Influenzaimpfstoffes, der im wesentlichen nur die immunologisch bedeutsamen Oberflächenantigene Hämagglutinin und Neuraminidase enthält und der durch seine lokale und allgemeine Verträglichkeit eine Anwendung in allen Altersgruppen gestattet. Das Wesen der Erfindung ist die Spaltung des nicht inaktivierten und in einem Medium geringer Ionenstärke suspendierten Influenzavirus in einem Zonalrotor, der mit einem Rohrzuckergradienten beladen ist und der gleichzeitig einen Gradienten eines geeigneten Salzes der Desoxycholsäure enthält. Die Oberflächenantigene werden aufgrund ihres spezifischen Sedimentationsverhaltens sowohl vom Restvirus als auch von den Lipiden der Virushülle getrennt und nach der weitgehenden Entfernung des Salzes der Desoxycholsäure sowie des aus dem Gradienten stammenden Rohrzuckers nach abschließender Sterilfiltration zu einem Impfstoff weiterverarbeitet.

Titel der Erfindung

Verfahren zur Herstellung von Influenza-Impfstoffen

Anwendung der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung der immunogenen Bestandteile des Influenzavirus und deren Verwendung zur Herstellung von Influenzaimpfstoffen, die aufgrund ihres Reinheitsgrades zur Anwendung sowohl bei Erwachsenen, als auch bei Kindern geeignet sind.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Bei den bekannten Verfahren zur Herstellung von Influenzaimpfstoffen wird der Erreger der Influenza (Myxovirus influenzae) in der Allantoishöhle embryonierter Hühneräier zur Vermehrung gebracht.

Dabei werden solche Stämme des Influenzavirus verwendet, die mit den in der Bevölkerung zirkulierenden Varianten eine möglichst enge Beziehung aufweisen.

Nach einer durch Erfahrung festgelegten Vermehrungsdauer werden die virushaltigen Allantoisflüssigkeiten den embryonierten Eiern entnommen und durch niedertourige Zentrifugation (max. 10^4 g) von den in ihnen befindlichen zellulären Bestandteilen befreit. Danach wird das Influenzavirus üblicherweise durch Einwirkung von Betapropiolacton oder Formaldehyd in eine nicht mehr vermehrungsfähige Form überführt.

- 2 -

Das nunmehr in inaktiver Form vorliegende Influenzavirus wird mit physikalischen Verfahren, vorzugsweise mittels Ultrazentrifugation, konzentriert.

Die Mehrzahl der bekannten Verfahren basiert auf der Zonalzentrifugation im Rohruckergradienten unter Verwendung von Rotoren, die einen Betrieb mit kontinuierlichem Durchfluß des zu verarbeitenden Materials gestatten.

Dabei wird das Influenzavirus entsprechend seinem spezifischen Sedimentationsverhalten in einem bestimmten Bereich des Gradienten konzentriert und gleichzeitig weitgehend von den aus dem Hühnerei stammenden Proteinen getrennt.

Das auf diese Weise gereinigte und konzentrierte Virusmaterial kann nunmehr nach Einstellung der Viruskonzentration auf den zur Gewährleistung der Wirksamkeit erforderlichen Mindestwert, dem Zusatz konservierender Substanzen (z. B. Thiomersal) und einer abschließenden Sterilfiltration, direkt zu einem Influenzaimpfstoff verarbeitet werden.

Impfstoffe dieser Art, sogenannte Vollvirusimpfstoffe, können, besonders bei Kindern, sowohl örtliche, als auch allgemeine Unverträglichkeitserscheinungen auslösen. Als Ursache derselben wurden bestimmte lipidhaltige Substanzen der äußeren Virushülle erkannt.

Die bekannten und beschriebenen Verfahren zur Herstellung von Influenzaimpfstoffen, die diese Nachteile nicht aufweisen, beruhen auf der Erkenntnis, daß die für die Auslösung einer Immunantwort verantwortlichen Komponenten des Influenzavirus mit den an der Oberfläche der Viruspartikel in Form von Stäbchen (sog. "Spikes") lokalisierten Glykoproteinen Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA) identisch sind.

Diese Glykoproteine sind beim intakten Virus durch hydrophobe Endstücke mit der äußeren lipidhaltigen Membran fest verbunden. Dagegen besitzen die Proteine des Influenzavirus, die sich im Innern der Viruspartikel befinden, für die Auslösung der Immunantwort keine Bedeutung.

Das betrifft das mit der Ribonukleinsäure assoziierte Nukleoprotein (NP), das Matrixprotein (M) und die Proteine P1, P2 und P3 des Polymerasekomplexes.

Die bekannten und beschriebenen Methoden zur Gewinnung der Glykoproteine HA und NA zum Zwecke der Impfstoffherstellung bzw. zur Abtrennung der für die Mehrzahl der Nebenreaktionen verantwortlichen Lipide, gehen entweder davon aus, durch die Einwirkung oberflächenaktiver Substanzen das HA und NA unter Erhaltung ihrer Integrität aus der Lipidhülle herauszulösen, oder das gesamte Virus mittels eines Lipidlösungsmittels (z.B. Diaethyläther oder Tri-n-butylphosphat) bzw. einer Kombination eines Lipidlösungsmittels und einer oberflächenaktiven Substanz (z.B. Tween 80) zu spalten. Bei dem zuletzt genannten Verfahren wird nach der Spaltung durch die Gewinnung der wässrigen Phase eine Impfstoffpräparation erhalten, die außer den Lipiden der Virushülle alle Virusbestandteile enthält.

Dagegen können nach Anwendung von oberflächenaktiven Substanzen die aus der Lipidhülle herausgelösten Spikes vom Restvirus, z.B. durch Ultrazentrifugation, getrennt werden. Angewendet werden anionische (z.B. Salze der Desoxycholsäure), kationische (z.B. Cetyltrimethylammoniumbromid) und neutrale (z.B. Triton N 101) oberflächenaktive Substanzen. Verbindungen der Desoxycholsäure werden in Australien zur Herstellung von Influenzaimpfstoffen mit hohem Reinheitsgrad und guten immunogenen Eigenschaften angewendet.

Bei bekannten Verfahren zur Herstellung von Influenza-Spaltimpfstoffen auf der Grundlage der Behandlung mit Salzen der Desoxycholsäure (W.G. Laver, R.G. Webster, Virology 69(1976), 511-522; DE OS 1 617 288 vom 18.02.1971) ist das Problem der Abtrennung der Lipide von den zu isolierenden Oberflächenantigenen nur ungenügend gelöst. Die angegebenen Ultrazentrifugationstechniken zur Isolierung des Hämagglutinins und der Neuraminidase von den übrigen Viruskomponenten über Saccharosegradienten erweisen sich als zeitaufwendig und in der Kapazität begrenzt. Ein Arbeiten im geschlossenen System ist nicht möglich.

Die Lipidentfernung durch Adsorption der immunogen wirksamen Komponenten HA und NA an anorganischen Aluminiumverbindungen (DD PS 146 386 vom 11.02.1981) schließt eine Sterilfiltration der Präparate aus.

Durch eine Spaltung in kontinuierlich beschickten Dichtegradienten bei Verwendung von Durchflußzonalrotoren sind diese Nachteile zu umgehen. Bei den bisher beschriebenen Verfahren (DE OS 2 449 530 vom 30.04.1975) werden zur Spaltung inaktivierte Virusantigene und homogene Tensidkonzentrationen im Gradienten benutzt. Die Spaltung führt unter diesen Bedingungen nur zu vergleichsweise niedrigen Ausbeuten an HA und NA.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist ein im industriellen Maßstab einsetzbares Verfahren zur Gewinnung eines inaktivierten Influenzaimpfstoffes, der im wesentlichen nur die immunologisch bedeutsamen Oberflächenantigene Hämagglutinin und Neuraminidase enthält und der durch seine lokale und allgemeine Verträglichkeit eine Anwendung in allen Altersgruppen gestattet.

Wesen der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Erreichung des genannten Zieles so zu entwickeln, daß eine Produktion im geschlossenen System, insbesondere eine Sterilfiltration des Finalbulks, möglich ist, die für die Auslösung von Nebenreaktionen verantwortlichen Lipide entfernt werden und die Konzentration der zur Spaltung verwendeten oberflächenaktiven Substanzen auf einfache Weise auf nichttoxische Werte reduziert wird.

Erfindungsgemäß wurde gefunden, daß nach Einleiten einer konzentrierten und gereinigten Suspension des nicht inaktivierten Influenzavirus in einem Medium geringer Ionenstärke (z.B. ein 10-15 mM Phosphatpuffer, pH 7,2 bis pH 8) in einem Zonalrotor, der mit einem Rohrzuckergradienten beladen ist und der gleichzeitig einen geeigneten Gradienten eines Salzes der Desoxycholsäure enthält, eine Spaltung der Viruspartikel erfolgt und die Lipide der Hülle, die Oberflächenantigene und das Restvirus entsprechende Banden bilden.

Danach können die Fraktionen, welche die Oberflächenantigene enthalten, gesammelt werden.

Die Lipide der Hülle, die bei den erforderlichen hohen Tensidkonzentrationen weitgehend von den Viruscores abgelöst werden, bilden eine relativ eng begrenzte Zone im geringer konzentrierten Gradientenbereich und unterliegen der Flotation, wobei auch ein Teil des Tensids dem Gradienten entzogen wird.

Um ein Absinken der Desoxycholol-Konzentration zu verhindern, wird der Tensidgradient so gestaltet, daß bei den höchsten Rohrzuckerkonzentrationen (etwa 50 - 60 % w/w) die Tensidkonzentration auf das 1,2 bis 1,5fache des in der Spaltungszone (ca. 20 bis 40 % w/w) vorhandenen Tensids gesteigert wird.

Ferner wurde gefunden, daß eine Gelbildung im Gradienten, hervorgerufen durch Salze der Desoxycholsäure, vermieden werden kann, wenn der Spaltprozeß im Bereich niedriger Ionenstärke verläuft. Nach erfolgter Spaltung kann das Salz der Desoxycholsäure entweder durch Erhöhung der Ionenstärke zur Ausflockung gebracht werden, oder es kann durch Ultrafiltration weitgehend entfernt werden.

Die Entfernung des Rohrzuckers erfolgt durch Ultrafiltration gleichzeitig mit der Entfernung des überschüssigen Flockungsmittels des Desoxycholats bzw. mit der Entfernung des Desoxycholats. Zur Vermeidung von Verlusten an Antigen werden der Lösung mit der Entfernung des Rohrzuckers und des Desoxycholats Stabilisatoren zugesetzt.

Das gesamte erfindungsmäßige Verfahren kann im geschlossenen System geführt werden, so daß die Gefahren sekundärer Verunreinigungen weitgehend ausgeschlossen werden.

Ausführungsbeispiel 1:

Als Ausgangsmaterial für das erfindungsgemäße Verfahren verwendet man Influenzavirus, das nach Vermehrung in der Allantoishöhle embryonierter Hühnereier, durch eines der üblichen Verfahren, vorzugsweise durch Ultrazentrifugation im Rohrzuckergradienten (9×10^4 g), konzentriert und von begleitenden Proteinen weitgehend befreit wurde. Aus dem in einer 38 - 45 %igen Konzentration von Rohrzucker vorliegenden Viruskonzentrat wird durch Verdünnung mit 10 mM Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7.2 eine Virussuspension hergestellt, deren Rohrzuckerkonzentration ca. 2 % beträgt. Diese Virussuspension wird in einen Zonalrotor einer Zentrifuge eingeführt, der zum kontinuierlichen Betrieb geeignet ist (z.B. der CF 32-Rotor der Fa. Beckman). Dieser Rotor ist mit einem Rohrzuckergradienten, der gleichzeitig einen Natriumdesoxycholatgradienten in einer Konzentration von 0,5 bis 2 % w/w enthält, beladen.

Zur Herstellung des Gradienten wird wiederum ausschließlich der oben beschriebene Phosphatpuffer verwendet. Die beschriebene Virussuspension wird nunmehr mittels einer Peristaltikpumpe über den Gradienten gepumpt. Nach Beendigung der Zonalzentrifugation wird der Inhalt des Rotors in Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen, welche die Oberflächenantigene enthalten, werden zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Zur Verarbeitung zu einem Impfstoff werden die Fraktionen, welche die Oberflächenantigene enthalten, vereinigt. Es wird nunmehr eine Bestimmung des HA-Gehaltes mit einem der bekannten Verfahren, z.B. der einfachen Radialdiffusion, durchgeführt.

Auf der Grundlage dieser Bestimmung wird mit phosphatgepufferter isotonischer Natriumchloridlösung so verdünnt, daß eine HA-Konzentration von mindestens $100 \mu\text{g}$ pro 1,00 ml entsteht. Danach erfolgt eine Diafiltration unter Verwendung einer phosphatgepufferten isotonischen Natriumchloridlösung als Dialysierflüssigkeit.

Nach der Diafiltration wird, wiederum nach Bestimmung des HA-Gehaltes, mit phosphatgepufferter Stabilisatorlösung so verdünnt, daß eine HA-Konzentration von mindestens 30 µg pro 1,00 ml entsteht.

Die Konzentrationen an Thiomersal und Formaldehyd dürfen 0,1 g pro 1000,0 ml nicht übersteigen. Die auf diese Weise hergestellte Präparation ist mit dem monovalenten Bulk identisch.

Ausführungsbeispiel 2:

Die Gewinnung der Oberflächenantigenfraktionen verläuft analog wie im Beispiel 1 beschrieben. Den gepoolten Fraktionen wird soviel einer gesättigten Natriumchloridlösung zugesetzt, daß eine NaCl-Konzentration von 1 - 2 molar resultiert. Dadurch wird das Natriumdesoxycholat zur Ausflockung gebracht. Nach etwa 12-stündiger Aufbewahrung bei + 5°C wird das Präzipitat mit physikalischen Methoden (Filtration oder niedertourige Zentrifugation) entfernt, wobei die Oberflächenantigene im Überstand verbleiben. Dieser wird einer Diafiltration mit einem Puffer geringer Ionenstärke als Dialysierflüssigkeit unterzogen. Der Prozeß wird solange fortgesetzt, bis die erreichte Natriumchloridkonzentration einer isotonischen Lösung entspricht und die Rohrzuckerkonzentration den für den Impfstoff festgelegten Grenzwert nicht übersteigt. Nach Zugabe des Stabilisators und Verdünnung auf die vorgesehene HA-Konzentration entspricht die Präparation ebenfalls dem monovalenten Bulk.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung eines Influenza-Spaltimpfstoffes, der im wesentlichen nur die Oberflächenantigene des Influenzavirus enthält, durch Spaltung mit einem Salz der Desoxycholsäure, gekennzeichnet dadurch, daß die nach bekannten Methoden vorgereinigten, nicht inaktivierten Viruspartikel, suspendiert in einem Puffer mit einer Ionenstärke unterhalb 15 mM, vorzugsweise Phosphatpuffer 10 bis 15 mM und einem pH-Wert im Bereich von 7.2 bis 8.0, im Zonalrotor einer Ultrazentrifuge, der mit einem Dichtegradienten, bestehend aus Rohrzuckerlösung und einem Gradienten aus Ammonium- oder Alkali-Desoxychololat in einem Puffer mit einer Ionenstärke unterhalb 15 mM, vorzugsweise Phosphatpuffer 10 bis 15 mM und einem pH-Wert im Bereich von 7.2 bis 8.0 beladen ist, in Fraktionen gespalten werden, worauf die Fraktion, die die Oberflächenantigene enthält, in an sich bekannter Weise aufgearbeitet wird.
2. Verfahren nach Punkt 1 gekennzeichnet dadurch, daß die Konzentration der zur Spaltung verwendeten Salze der Desoxycholsäure 0.5 bis 2 %, vorzugsweise 1 %, bezogen auf das im Gradienten enthaltene Desoxychololat, beträgt.
3. Verfahren nach den Punkten 1 und 2 gekennzeichnet dadurch, daß die Tensidkonzentration im Bereich der Rohrzuckerkonzentration von 50 bis 60 % w/w bis 1.5-fach höher als im Bereich der Rohrzuckerkonzentration von etwa 20 bis 40 % w/w ist.

4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Punkte, gekennzeichnet dadurch, daß das zur Virusspaltung verwendete Salz der Desoxycholsäure durch Erhöhung der Ionenstärke zur Ausflockung gebracht und danach entfernt wird.
5. Verfahren nach Punkt 4, gekennzeichnet dadurch, daß zur Ausflockung des Salzes der Desoxycholsäure Natriumchlorid verwendet wird.
6. Verfahren nach Punkt 5, gekennzeichnet dadurch, daß die zur Fällung des Desoxycholsalzes notwendige Konzentration an Natriumchlorid durch Dialyse gegen phosphatgepufferte Natriumchlorid-Lösung oder durch Verdünnung auf den isotonischen Wert gebracht wird.
7. Verfahren nach den Punkten 1 - 6, gekennzeichnet dadurch, daß mit zunehmender Entfernung von Desoxycholat und Rohrzucker Stabilisatoren zur Verhinderung von Antigenverlusten zugesetzt werden.