



NORGE

(19) [NO]

STYRET FOR DET
INDUSTRIELLE RETTSVERN

[B] (12) UTLEGNINGSSKRIFT (11) Nr. 167123

(51) Int. Cl.⁸ A 61 K 39/02

(83)

(21) Patentsøknad nr. 862448
(22) Inngivelsesdag 19.06.86
(24) Løpedag 19.06.86
(62) Avdelt/utskilt fra søknad nr.

(86) Internasjonal søknad nr. -
(86) Internasjonal inngivelsesdag -
(85) Videreføringsdag -

(71)(73) Søker/Patenthaver ISSLEDOVATELSKI ZENTAR PO
BIOTECHNOLOGIA,
Tschapaev-Str. 55,
Sofia, BG

(41) Alment tilgjengelig fra 22.12.86
(44) Utlegningsdag 01.07.91

(72) Oppfinner IVAN NIKOLOV IVANOV, Sofia,
AZARYA CHELEBI POLIKAR, Sofia,
PLAMEN HRISTOV NENKOV, Sofia,
TODOR HRISTOV VITANOV, Sofia,
BG

(74) Fullmektig Bryns Patentkontor A/S, Oslo.

(30) Prioritet begjært 20.06.85, BG, nr 70761.

(54) Oppfinnelsens benevnelse FREMGANGSMÅTE TIL FREMSTILLING AV
EN LEVENDE VAKSINE MOT LISTERIOSE
HOS SAUER OG GEITER.

(57) Sammendrag Fremgangsmåte til fremstilling av en levende vaksine mot listeriose hos sauer og geiter innbefatter at svekkede stammer av arten *Listeria monocitogenes* kultiveres i en kjøtt-pepton-buljong med 8-20 g/l glukose. Kultiveringen av stammene foregår i en fermentator under opprettholdelse av følgende karakteristiske betingelser: luft 3-5 l/min., blandeverk med 300-1000 omdr./min., temperatur på 35-37°C, pH-verdi fra 7-7,6, mengden av inokulatet er 1:20 til 1:100 av arbeidsinnholdet i fermentatoren; etter avsluttet kultivering fortynnes den fremstilte biomassen avhengig av tettheten, med et beskyttelsesmedium, homogeniseres deretter og lyofiliseres. Lyofiliseringen gjennomføres i et beskyttelsesmedium, som oppviser en sammensetning fra 2-17% natrium-glutamat, fra 5-20% sakkarose og 0,5-5% destruktureret gelatin. Ved den anvendte lyofiliseringsfremgangsmåten for vaksinen sikres ikke mindre enn 80% overlevende celler av begge serotyper.

(56) Anførte publikasjoner Ingen.

167123

1

Foreliggende oppfinnelse vedrører en fremgangsmåte til fremstilling av en levende vaksine mot listeriose hos sauer og geiter.

En fremgangsmåte til fremstilling av en vaksine mot listeriose hos sauer og geiter er kjent, hvorved stammen *Listeria monocytogenes* 1/2a nr. 326 og 4b nr. 125 benyttes, deponert i Nationalbank für industr. Mikroorganismen und Zellkulturen under nr. 251, 252 som kan kultiveres statisk i en kjøtt-pepton-buljong eller kjøtt-pepton-agar. Ulempene ved denne fremgangsmåten for fremstilling av vaksinen består i at den bakterielle suspensjonen som fremstilles ved den statiske kultiveringen av buljongen oppviser en lav tetthet, hvilket vanskeliggjør fremstillingen av en lyofilisert vaksine. Kultiveringen på agar er arbeidskrevende, med en høy prosentandel som må kastes på grunn av forurensning med andre bakterier og den byr ikke på noen mulighet for en industriell fremstilling av vaksinen. Videre går en del av bakteriecellene tapt ved den statistiske kultiveringen i løpet av kultiveringsprosessen. Etter lyofiliseringen utgjør de overlevende listeriose-cellerne fra 30 til 50%.

Hensikten med foreliggende oppfinnelse var å tilveiebringe en fremgangsmåte for fremstilling av en levende bivaksine mot listeriose hos sauer og geiter, hvorved det fremstilles en enhetlig biomasse som har en stor tetthet, oppviser en høy prosentandel levende celler, uten at det foregår en forurensning ved en sideflora, hvorved utgangsegenskapene for den svekkede vaksinasjonsstammen opprettholdes etter lyofiliseringen.

Dette oppnås ved en fremgangsmåte til fremstilling av en levende vaksine mot listeriose hos sauer og geiter, ifølge hvilken svekkede stammer av arten *Listeria monocytogenes*, deponert ved NBIMCC for stammen 1/2a under nr. 251 og for stammen 4b under nr. 252, kultiveres i en kjøtt-pepton-buljong med 8-20 g/l glukose. Fremgangsmåten er kjennetegnet

167123

2

ved at kultiveringen av stammene foregår i en fermentator under opprettholdelse av følgende betingelser: luft 3-5 l/min., blandeverk med 300-1000 omdr./min., temperatur på 35-37°C, pH-verdi på 7-7,6, mengden av inokulatet er 1:20 til 1:100 av arbeidsinnholdet i fermentatoren og tettheten til biomassen etter fermentering er på 12 milliarder/cm³ levende bakterieceller; etter avsluttet kultivering fortyndes den fremsstilte biomassen til en tetthet på minst 1 milliard/cm³ levende bakterieceller, med et beskyttelsesmedium som oppviser en sammensetning på 2-17% natriumglutamat, 5-20% sakkarose og 0,5-5% destrukturert gelatin, homogeniseres og lyofiliseres.

Under lyofiliseringen holdes temperaturen av produktet med sublimering under -30°C. Etter at denne prosessen er avsluttet, forhøyes temperaturen til 40°C. Vakuumet i kammeret er fra 0,1 til 0,05 torr. Temperaturen av kondensatoren er under -45°C. Etter at tørkingen er avsluttet, brytes vakuumet ved hjelp av en nøytral gass med hvilken pakningene fylles.

Fordelene ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen er følgende:

- En automatisering av produksjonsprosessen muliggjøres.
- Den fremstilte biomassen er enhetlig, uten en forurensning forårsaket av en sideflora og med en høy tetthet.
- Den anvendte lyofiliseringsfremgangsmåten for vaksinen sikrer ikke mindre enn 80% overlevende celler av begge serotyper. Dette muliggjør fremstillingen av et stabilt produkt med hensyn på de levende cellene, med immunogene egenskaper, uskadelighet og renhet, samt også oppnåelsen av begge stammene som finnes i vaksinen i like andeler.

Oppfinnelsen skal i det følgende beskrives nærmere ved hjelp av de angitte eksemplene.

Eksempel 1

Kultivering i en fermentator av stammen 1/2a og 4b *Listeria monocytogenes* for et arbeidsinnhold på 7 liter.

De lyofiliserte ampullene med de vaksinale stammene resuspenderes og inokuleres med en 1% glukoseholdig kjøtt-pepton-buljong. Denne inkuberes i 24 timer, deretter tilberedes underkulturene, disse bringes inn i fermentatoren i en mengde på 1/20 av arbeidsinnholdet for fermentatoren. Kultiveringen gjennomføres ved følgende betingelser: luft 3-5 l/min., blandeverk 300 omdr./min., temperatur 37°C, pH-verdi 7,2.

I hvert arbeidstrinn undersøkes renheten ved hjelp av et ifølge "Gram" farget preparat og en poding av Petri-skålene med kjøtt-pepton-buljong foretas.

Ved avslutningen av fermentator-kultiveringen, som avbrytes ved avslutningen av forsinkelsesfasen av formerings-hastigheten, får man en biomasse med en tetthet på inntil 12 milliarder/cm³ levende bakterieceller. Tettheten av den bakterielle suspensjonen av underkulturene og fermentator-biomassen bestemmes også med en "Spekol" på en kurve bearbeidet på basis av den 5. internasjonale optiske standarden for uklarhet.

Avhengig av tettheten av den oppnådde biomassen, hvori forholdet mellom de vaksinale stammene er 1:1, fortynnes biomassen med et beskyttelsesmedium, som består av 2-17% natriumglutamat, 5-20% sakkarose og 0,5-5% destrukturerert gelatin. Etter homogenisering av biomassen med beskyttelsesmediet ristes vaksinen i flakonger eller doser avhengig av forbrukerens behov.

Eksempel 2. Lyofilisering av vaksinen.

Vaksinen innfrysas først statisk eller roterende avhengig av forpakningen. For tørkingen av vaksinen anvendes spesielle kammer-apparater for lyofiliseringen. Under prosessen holdes

167123

4

temperaturen for produktet ved sublimering under -30°C . Etter avslutning av denne prosessen forhøyes temperaturen inntil 40°C . Vakuemet i kammeret er $0,1-0,05$ torr. Temperaturen for kondensatoren ligger under -45°C . Etter at tørkingen er avsluttet, oppheves vakuemet ved hjelp av en nøytral gass (nitrogen), hvormed pakningene fylles. Disse lagres på et tørt og mørkt sted, ved en temperatur på $4-8^{\circ}\text{C}$. Som oppløsningsmiddel tjener en fysiologisk oppløsning som inneholder $0,1$ g/l Saponin med en pH-verdi på $7,2$. Etter resuspendering inneholder vaksinen ikke mindre enn 1 milliard/ cm^3 levende bakterieceller av begge serotyper i tilnærmet like mengder.

Etter lyofiliseringen undersøkes vaksinen med henblikk på:

- Antall levende bakterieceller ved inokulering av Petri-skåler;
- Uskadelighet (på marsvin)
- Immunogene egenskaper.

Ved konjunktival behandling av marsvin ved Anton-fremgangsmåten opptrer ingen konjunktivitt, hverken ved den første inndryppingen i øyet med bivaksine, heller ikke ved den andre inndryppingen; etter minst 12 dager, med kulturer av patogene *Listeria monocytogenes* 1/2a og 4b, mens kontroll-dyrene, som opprinnelig ikke ble behandlet med bivaksine i øynene, utviklet en tydelig utpreget materiekonjunktivitt.

Eksempel 3

Vaksinen anvendes en gang på sauer, geiter, lam og killinger, som er over 6 uker gamle, i en dose på 2 ml. Dyrene injiseres subkutant bak albuledet. Immuniteten opptrer etter den 12. dagen og varer i 10 måneder.

P a t e n t k r a v

Frengangsmåte til fremstilling av en levende vaksine mot listeriose hos sauer og geiter, ifølge hvilken svekkede stammer av arten *Listeria monocytogenes*, deponert ved NBIMCC for stammen 1/2a under nr. 251 og for stammen 4b under nr. 252, kultiveres i en kjøtt-pepton-buljong med 8-20 g/l glukose, k a r a k t e r i s e r t v e d at kultivering av stammene foregår i en fermentator under opprettholdelse av følgende betingelser: luft 3-5 l/min., blandeverk med 300-1000 omdr./min., temperatur på 35-37°C, pH-verdi på 7-7,6, mengden av inokulatet er 1:20 til 1:100 av arbeidsinnholdet i fermentatoren; og tettheten til biomassen etter fermentering er på 12 milliarder/cm³ levende bakterieceller; etter avsluttet kultivering fortynnes den fremstilte biomassen til en tetthet på minst 1 milliard/cm³ levende bakterieceller, med et beskyttelsesmedium som oppviser en sammensetning på 2-17% natriumglutamat, 5-20% sakkarose og 0,5-5% destrukturert gelatin, homogeniseres og lyofiliseres.

Fremtrukne publikasjoner:

1. Ivanov I. Study of the Active Immunoprophylaxis of Sheep Listeriosis Proceedings of the VII Intern. Symposium of Listeriosis, 1979.
2. Ozebold, J.W. Di Capra HA to J. Bact., 95, 2153, 1968.