



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 14.04.72 (P. 154718)

Pierwszeństwo: _____

Zgłoszenie ogłoszono: 15.11.73

Opis patentowy opublikowano: 31.12.1976

MKP C12k 5/00

Int. Cl.² C12K 5/00

CZYTELNIA

Urząd Patentowy
Polskiej Rzeczypospolitej Ludowej

Twórcy wynalazku: Renata Zahorska, Kazimierz Zakrzewski, Włodzimierz Madaliński, Natalia Mazur, Helena Wrzos, Elżbieta Żurek

Uprawniony z patentu: Centralne Laboratorium Surowic i Szczepionek, Warszawa (Polska)

Sposób otrzymywania szczepionki przeciw ospie

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania szczepionki przeciw ospie, polegający na tym, że materiał wyjściowy (tzw. miazga krowiankowa) jest wyjaławiany czynnikami chemicznymi przez stosunkowo długi okres czasu, a następnie poddawany działaniu enzymów proteolitycznych, co zapewnia otrzymanie szczepionki bezpiecznej, o należytej skuteczności i ekonomicznej w produkcji.

Szczepienia przeciw ospie należą do ważniejszych zabiegów profilaktycznych, zabezpieczających populację przed epidemiami tej choroby. Szczepienia były stosowane w prymitywnej formie zapewne już w zamierzalnych czasach, a w obecnej postaci datują się od przełomu 18 i 19 wieku.

Szczepionki przeciw ospie stosowane obecnie na całym świecie nie różnią się zasadniczo od szczepionki, stosowanej w początkach 19 wieku. Szczepionką jest rozdrobniona zawiesina wykwitów chorobowych, powstałych na skórze zwierząt (najczęściej bydła rogatego, lecz również owiec, wielbłądów i in.).

Szczepionka ta wykazuje wiele niekorzystnych cech: jest nietrwała w przechowywaniu, zawiera domieszkę żywych bakterii i nie stanowi jednolitej zawiesiny. Obecność żywych bakterii w szczepionce wynika z faktu, że wykwity chorobowe jako zbierane ze skóry zwierząt, nigdy nie są wolne od zakażenia bakteryjnego.

Wprawdzie obecność chorobotwórczych bakterii w szczepionkach przeciwospowych jest rygorystycz-

2

nie kontrolowana, ale nawet w przypadku nieobecności tych bakterii inne drobnoustroje, nawet nie chorobotwórcze, sprawiają, że gojenie miejsca zaszczepionego u ludzi przebiega trudniej i często z komplikacjami.

Niejednorodność zawiesiny, stanowiącej szczepionkę, wynika z faktu, że wirusowi, zawartemu w szczepionce, towarzyszą produkty destrukcji tkanki skóry zwierzęcia, użytego do produkcji szczepionki.

Dla usunięcia tych niekorzystnych cech szczepionki próbowano wielu sposobów. Jednym z nich jest namnażanie wirusa krowianki nie na zwierzętach, ale na hodowlach kurzych komórek zarodkowych, w warunkach ściśle jałowych. Jednak szczepionki takie mają niższą wartość uodporniającą, niż szczepionki wyprodukowane na skórze zwierzęcia.

Inną drogą dla usunięcia trudności przy zachowaniu właściwości uodporniających wirusa krowianki, jest wyodrębnienie wirusów, zawartych w skórnych wykwitach zwierząt za pomocą traktowania surowego materiału wyjściowego niektórymi węglowodorami. Jest to jednak metoda kłopotliwa, prowadząca do dużych strat wirusów i budząca zastrzeżenia ze względu na możliwość przetrwania w szczepionce śladowych ilości węglowodorów, użytych w procesie produkcyjnym.

Metoda będąca przedmiotem wynalazku usuwa ujemne cechy wyżej opisanych, dotychczas używa-

ných sposobów. Materiałem wyjściowym jest pełnowartościowa pod względem zawartości wirusa i mocy immunogennej miazga krowiankowa, tzn. zebrane i zhomogenizowane wykwity skórne zwierząt, naskórnice zakażonych wirusem krowianki, zawierające obok wirusów krowianki dość znaczne ilości produktów destrukcji tkanek oraz pewne ilości bakterii. Ten materiał wyjściowy w pierwszym etapie jest poddawany wyjałowieniu chemicznemu, mającemu na celu zabicie towarzyszących wirusom bakterii, co pozwala na ostateczne uzyskanie szczepionki jałowej.

Jako czynników wyjaławiających używa się estrów kwasu benzoowego, azydku sodu lub ich mieszaniny, jak również konwencjonalnych związków wyjaławiających takich, jak fenol i krezole. Czynniki te nie działają szybko na bakterie, a przy przedłużonym działaniu mogą również uszkadzać wirusa. Zastosowanie jednak wg wynalazku temperatury nieznacznie powyżej 0°C, korzystnie 2—6°C, umożliwia stosowanie przez okres 3 i więcej dni stosunkowo dużego stężenia czynnika bez niepożądanego efektu na aktywność wirusa.

W drugim etapie, wyjałowiony ale zawierający produkty destrukcji tkanek materiał wyjściowy, poddaje się trawieniu za pomocą enzymów proteolitycznych, a zwłaszcza proteaz serynowych takich, jak tripsyna, chymotrypsyna, elastaza lub ich mieszaniny. W wyniku trawienia, wielkocząsteczkowe, a częściowo nierozpuszczalne produkty destrukcji tkanek stają się materiałem rozpuszczalnym, co następnie umożliwia oddzielenie od nich wirusa przez wirowanie szybkoobrotowe, pozwalające na uzyskanie przyspieszenia nie mniej niż 40 000 g. W trzecim etapie, jednorodną zawiesinę wirusów, pozbawioną przez wirowanie zarówno zdepolimeryzowanych produktów rozpadu tkanki, jak i enzymów proteolitycznych, liofilizuje się w ampulkach, stanowiących ostateczne opakowanie szczepionki.

Przykład: 10,0 g miazgi krowiankowej o mianie 10⁸ PFU/g zhomogenizowano w 90 ml zbuforowanego fosofranami 10% roztworu NaCl. Do uzyskanej zawiesiny dodano 20 ml 5% roztworu fenolu. Całość odstawiono do chłodni o temperaturze 4°C. Po czterech dniach zawiesinę poddano wirowaniu z siłą 40 000 g przez 60 minut w temperaturze 4°C. Supernatant usunięto, a osad zawieszono, posługując się homogenizatorem w 90 ml 0,29% roztworu tripsyny w zbuforowanym roztworze

NaCl. Zawiesinę wirusa w roztworze tripsyny inkubowano wśród ciągłego mieszania w temperaturze 37°C przez trzy godziny. Następnie zawiesinę ochłodzono do 4°C i wirusy odwirowano z siłą 40 000 g przez 60 minut w temperaturze 4°C.

Supernatant usunięto, a osad wirusa zawieszono, posługując się homogenizatorem w 90 ml zbuforowanego roztworu NaCl. Z zawiesiny usunięto większe agregaty przez wirowanie z siłą 2000 g przez 10 minut w temperaturze 4°C. Opalizujący ale wykazujący cechy jednorodnej zawiesiny supernatant, zlano znad osadu i dodano do niego 10 ml 50% roztworu sacharozy. Tak uzyskaną zawiesinę wirusa rozlano do ampulek à 0,3 ml i poddano liofilizacji. Po całkowitym usunięciu wody ampulki zatopiono w warunkach próżniowych; każda ampulka zawierała nie mniej niż $0,5 \times 10^7$ PFU wirusa krowianki.

Wytworzona tym sposobem szczepionka wykazywała wszystkie cechy wymagane w stosunku do szczepionki przeciwoospowej w badaniach zarówno in vivo, jak i in vitro, włącznie z trwałością miana przy przedłużonym przechowywaniu w temperaturze 37°C. Zastosowana u ludzi dawała prawidłowy obraz pozytywnego wyniku szczepienia, bez zakażenia przyszczepiennego i z bardzo dobrze gojącym się ubytkiem skórny.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania szczepionki przeciw ospie, **znamienny tym**, że zhomogenizowane wykwity skórne zwierząt naskórnice zakażonych wirusem krowianki wyjaławia się wstępnie za pomocą czynników chemicznych takich, jak fenol, krezol, estry kwasu benzoowego, azydek sodu, po czym traktuje się enzymami proteolitycznymi z grupy proteaz serynowych, a następnie oddziela wirusy od roztworu czynników wyjaławiających, od enzymów proteolitycznych i od zdepolimeryzowanych produktów destrukcji tkanki zwierzęcej, stosując wirowanie z siłą nie mniejszą niż 40 000 g.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że wyjałowienie przeprowadza się w temperaturze 2—6°C w czasie co najmniej 72 godzin.

3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako enzymy proteolityczne stosuje się tripsynę, chymotrypsynę, elastazę lub ich mieszaniny.