



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

203708

(11) (B1)

(51) Int. Cl.³
A 61 K 39/02

(22) Přihlášeno 09 02 79
(21) (PV 906-79)

(40) Zveřejněno 30 06 80

(45) Vydáno 15 05 83

(75)
Autor vynálezu

ŠOUREK JIŘÍ RNDr. PhMr. CSc.
a VÝMOLA FRANTIŠEK MUDr. CSc., PRAHA

[54] Vakcína k prevenci pseudomonádových infekcí

1

Vynález se týká vakcíny k prevenci pseudomonádových infekcí. Tyto infekce, jak je známo, představují závažný zdravotnický problém, protože narůstá počet smrtelných případů v důsledku rezistence původců těchto infekcí na antibiotika. Ohrožení bývají zejména pacienti hospitalizovaní. Krajně nebezpečné jsou tyto infekce pro novorozence, hlavně pro předčasně narozené. Původci pseudomonádových infekcí se mohou patogeneticky uplatnit i v malformované a funkčně defektní tkáni a v tkáni postižené malignitou.

U oslabeného organismu je mortalita osob postižených pseudomonádovými infekcemi při akutním průběhu vysoká (více než 70 %). Není-li tato infekce včas zvládnuta účinnými antibiotiky, je naděje na záchranu života u akutních forem minimální. U chronických stavů je antibiotická léčba nesmírně nákladná a naděje na trvalé vyřízení bývá často problematická.

Se zřetelem k narůstající rezistenci původců pseudomonádových infekcí na většinu dříve účinných antibiotik, se jako nejúčinnější opatření jeví prevence, která brání narůstání multirezistence na antibiotika a zejména předchází uplatnění patogenních kmenů *Pseudomonas* v patogeneze.

K preventivním opatřením proti vzniku

2

pseudomonádových infekcí patří jako velmi významná složka profylaktická vakcinace. Přístup k přípravě vakcíny, určené k profylaxi, není jednotný. Připravují se vakcíny buď korpuskulární, solubilní, nebo smíšené, a to ze živé bakteriální suspenze nevirulentních kmenů nebo z kultury usmrčené teplem, popřípadě inaktivované formaldemem, fenolem či etanolem, nebo fenolem a teplem. Jindy se dává přednost očkovací látce připravené z filtrátu pseudomonádových kultur, z extraktu buněčných stěn nebo z mukozní substance. Autoři, kteří považují za imunogenní antigeny získávané z buněčných stěn (blíže nedefinované), doporučují, aby byly připraveny ze 3 až 16 reprezentativních sérotypů. Jde tedy v tomto případě o vakcínu trihepta nebo multivalentní.

Dosažené výsledky, publikované dosud v odborné literatuře, ukázaly dobré profylaktické účinky v závislosti na kmenech *Pseudomonas* použitých v experimentech na laboratorních zvířatech. Proti vysece patogenním a virulentním kmenům *Pseudomonas aeruginosa*, schopným produkovat kompletní exotoxin a endotoxin, se stávající zmíněné očkovací látky, určené k profylaxi, ukázaly být málo přesvědčivě účinné, pouze v omezeném měřítku. Navíc vakcíny

dosavadního typu příliš zatěžují ochranné mechanismy organismu množstvím povrchových antigenů.

Nevýhody dosavadních očkovacích látek odstraňuje vakcína k prevenci pseudomonádových infekcí podle vynálezu; její podstata spočívá v tom, že jako účinnou složku obsahuje komplex antigenů *Pseudomonas aeruginosa*, adsorbovaný na fyziologicky nezávadný anorganický nosič, s výhodou hydroxid hlinitý, ve vodném prostředí s hodnotou pH 7,1 až 7,2.

Základní podmínkou, aby vakcína měla požadované vlastnosti, je výběr vhodného výchozího materiálu. Volí se kmen *Pseudomonas aeruginosa*, získaný z klinického materiálu, vykazující vysoce patogenní virulentní vlastnosti, zjištěné experimentálně, jenž se pasáže na syntetických médiích, která indukují vlastnosti antigenů potřebné k imunizaci.

Vakcína k prevenci pseudomonádových infekcí podle vynálezu obsahuje antigeny, resp. komplex antigenů získaných pouze z jednoho produkčního kmene *Pseudomonas aeruginosa* a je solubilního typu.

Vakcína je určena k prevenci pseudomonádových infekcí především v nemocničních zařízeních, kde snížení výskytu pseudomonádových infekcí představuje zároveň i snížení nemoci, pyogenních komplikací a smrtelnosti. Její praktické uplatnění představuje významný ekonomický efekt, znamená výrazný podíl v boji proti narůstání bakteriální multirezistence na antibiotika a chemoterapeutika a snížení výskytu pseudomonádových infekcí zejména v nemocničních zařízeních.

Bližší podrobnosti způsobu přípravy vakcíny podle vynálezu vyplývají z následujícího příkladu provedení.

Příklad provedení

Výchozí vybraný kmen *Pseudomonas aeruginosa* se naočkuje na pevné kultivační médium tohoto složení (ve hmotn. procentech):

glutamát sodný	20
glukosa	0,5
síran hořečnatý kryst. ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)	0,01
dusičnan vápenatý	0,0001
síran železnatý kryst. ($\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)	0,000005
fosforečnan sodný sek. ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$)	0,563
fosforečnan draselný prim. (KH_2PO_4)	0,0252
agar	1,5
voda destilovaná	do 100 ml

pH média se upraví na hodnotu 7,6. Po 18 hodinách inkubace při 37 °C se kultura spláchne destilovanou vodou. Smyv kultury se inaktivuje při teplotě 65 °C 45 minut,

po této době musí být kultura usmrcena. Bakteriální masa se lyofilizuje.

14,8 g suché bakteriální masy se zhomo-genizuje ve 150 ml bezpyrogenní redestilované vody. Suspenze se zahřeje ve vodní lázni na 65 °C za stálého míchání, přidá se 150 ml 90% fenolu předem ohřátého na tutéž teplotu. Poté se směs ochladí a při teplotě kolem 4 °C se vodná fáze nechá oddělit (vrchní vrstva). Po 86 hodinách se vodná fáze odstředí a supernatant se dialyzuje po dobu 1 týdne proti bezpyrogenní destilované vodě při 4 °C. Po ukončení dialýzy se dialyzát odstředí při 11 000 ot/min. po dobu 20 minut. Čirý supernatant se lyofilizuje. Získaný produkt (sušina 1) se uchová jednak pro přípravu vlastní vakcíny a jednak pro další purifikaci.

Purifikace sušina 1

a) Na kolonu naplněnou dextranovým gelem [Sephadex G 200], velikost 25 × 1000 mm, se nanese roztok 70 mg sušiny 1 v 5 ml 0,1% vodného roztoku chloridu sodného, předem vyčerený odstředěním při 10 000 ot/min. po dobu 10 minut. Substance se z kolony vymývá 0,1% vodným roztokem chloridu sodného, obsahujícím 0,1 % hmotn. azidu sodného. Eluát se automaticky jímá po 5 ml frakcích a spektrofotometricky vyhodnocuje při 280 nm. Frakce s vyšší optickou denzitou se spojí, dialyzují 5 dnů proti bezpyrogenní destilované vodě při 4 °C a lyofilizují. Získá se bílý pavučinovitý hygroskopický produkt (sušina 2).

b) Roztok 50 mg sušiny 1 v 5 ml 0,25% roztoku glycinu v 0,001 M kyseliny ethylendiamintetraoctové, s hodnotou pH 8,0, vyčerený odstředěním při 10 000 ot/min. po dobu 10 minut, se nanese na kolonu dextranového gelu [Sephadex 4 B] a potom se vymývá pyridin-acetátovým pufrem s hodnotou pH 4,26. Eluát se automaticky jímá po 3 ml frakcích, které se spektrofotometricky hodnotí při vlnové délce 280 nm. Frakce s vyšší optickou denzitou se spojí, dialyzují 5 dnů proti bezpyrogenní destilované vodě při 4 °C a lyofilizují. Získaný produkt představuje bílou velmi hygroskopickou sušinu (sušina 3).

Získané sušiny 1, 2 a 3 nesmí být toxické pro myši o váze 18 až 20 g po intraperitoneální aplikaci dávky 600 µg/0,2 ml.

Příprava vakcíny

Podle potřeby se sušina 1, 2 nebo 3, získaná některým z popsaných způsobů, rozpustí v pufrovaném fyziologickém roztoku s pH 7,1 až 7,2 a přidá se vodná suspenze hydroxidu hlinitého v takovém množství, aby konečný obsah hliníku byl 2 mg/ml suspenze. Nechá se stát 24 hodin při teplotě místnosti a upraví se do konečné aplikační formy, například tekuté nebo lyofilizované

injekce, obsahující 50, 500 nebo 2500 $\mu\text{g/ml}$ sušiny. Aplikuje se dávka 0,2 ml na 1 zvíře (myš).

U připravené vakcíny se kontroluje sterilita, obsah dusíku, proteinů a pyrogenita, zjišťuje se reaktivita kožním testem, sub-

kutánní a intramuskulární aplikací bílým myším, morčatům a králíkům.

Experimentálně bylo prokázáno, že vakcína podle vynálezu chrání ve třech dávkách pokusná zvířata výrazně účinněji než dosud používané očkovací látky.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Vakcína k prevenci pseudomonádových infekcí vyznačující se tím, že jako účinnou složku obsahuje komplex antigenů *Pseudomonas aeruginosa*, adsorbovaný na fyzio-

logicky nezávadný anorganický nosič, s výhodou hydroxid hlinitý, ve vodném prostředí s hodnotou pH 7,1 až 7,2.