



POLSKIEJ RZECZYPOSPOLITEJ LUDOWEJ

OPIS PATENTOWY

Nr 45165

Kl. 30 h, 6

American Cyanamid Company

Nowy Jork, Stany Zjednoczone Ameryki

Sposób wytwarzania trójwartościowej szczepionki przeciw chorobie Heinego-Medina

Patent trwa od dnia 7 czerwca 1960 r.

Pierwszeństwo: 22 czerwca 1959 r. (Stany Zjednoczone Ameryki).

Wynalazek dotyczy sposobu wytwarzania trójwartościowej żywej szczepionki poliomyelitis, odpowiedniej do podawania doustnego w postaci jednostki dawkowania.

Stosowanie szczepionki osłabionego żywego wirusa polio przedstawia wiele korzyści w stosunku do szczepionki wirusa zabitego stosowanego przez dr Salk'a. Bezpieczeństwo stosowania szczepionki osłabionego żywego wirusa, jeśli podaje się ją doustnie, zostało sprawdzone badaniami na więcej niż sześciuset tysiącach pacjentów bez wywołania wypadku paralytic polio wskutek szczepionki. Osiągano doskonałą reakcję przeciwciała i wysoki stopień odporności. Wielka ilość szczepień, była przeprowadzona przez podawanie doustnie szczepionki z oddzielnych szczepów osłabionego wirusa w krótkich odstępach. Ponieważ wymaga to tylko trzech podań doustnych przedstawia przez to rzeczywistą korzyść wobec konieczności stosowania trzech,

lub czterech zastrzyków szczepionki a zabitego wirusa. Nie jest to jeszcze doskonałym osiągnięciem, ponieważ potraja czas wymagany do szczepienia i powiększa możliwość zapominania pacjentów do powtórzenia jednego lub dwóch ostatnich szczepień.

Dalsze badania prowadzono w kierunku wyhodowania trójwartościowej szczepionki, to znaczy szczepionki, która byłaby mieszaniną osłabionych szczepów wszystkich trzech typów wirusa polio. Niestety usiłowania wyhodowania praktycznie zdatnej do stosowania trójwartościowej szczepionki napotykały na poważne trudności, polegające na zjawiskach wzajemnego oddziaływania szczepów i wynikającej z tego braku skuteczności.

Zjawiska wzajemnego oddziaływania poszczególnych szczepów zaobserwował dr Sabin stosując w szczepionce trzy osłabione szczepy typu I, II i III wirusa polio uprzednio wyhodo-

wane. Stwierdził on bardzo poważne oddziaływanie wzajemne, ponieważ tego osłabiony szczep Typu II okazał się dominującym i hamującym, lub zmniejszającym bardzo poważnie rozwój zakażeń przez Typ I i Typ III polio, a przez to i wytwarzanie przeciwciał tych trzech typów.

Było to szczególnie niekorzystne, ponieważ Typ II ma mniejsze znaczenie w porównaniu z Typami I i III. Typ I stanowi wielkie zagrożenie wskutek swego wielkiego rozpowszechnienia i przeważającego powiązania z polio paralitic. Typ III jest drugim co do znaczenia, a tym II ma znacznie mniejsze znaczenie, ponieważ wywołuje bardzo mały procent schorzeń paralitycznych. Wskutek tego trójwartościowa szczepionka Sabina była praktycznie bezużyteczna i w opisie jego doświadczeń w Journal of the American Medical Association, tom 172, str 1589 - 1956 stwierdza on, że uodpornienie przeciwko trzem typom wirusa polio przez proste podawanie mieszaniny tych trzech szczepów jest nie do rozwiązania. Dlatego poleca on, żeby te trzy szczepy podawać oddzielnie w przerwach trzytygodniowych w kolejności: Typ I, Typ III i w końcu Typ II.

Według wynalazku problem wzajemnego oddziaływania zostaje całkowicie rozwiązany przez dostarczenie trójwartościowej, żywej szczepionki poliomyelitis, odpowiedniej do doustnego podawania w postaci jednostki dawkowania, zawierającej mieszaninę:

- a) osłabionego wirusa Typu I poliomyelitis nie zjadliwego dla ludzi,
- b) osłabionego wirusa Typu III poliomyelitis nie zjadliwego dla ludzi,
- c) osłabionego wirusa Typu II adaptowanego w embrionie kurczęcia i nie zjadliwego dla ludzi i który nie hamuje zakażeń nie zjadliwymi wirusami Typu I i Typu III, przy czym mieszanina ta posiada wstępnie oznaczone miano każdego typu wirusów.

Ten osłabiony wirus Typu II wyhodowano w Lederle Laboratories of American Cyanamid Company, przy czym osłabienie osiągnięto w sposób niżej opisany, przez kolejne pasażę wirusa przez tkankę nerwową młodych gryzoniów aż do przystosowania do wzrostu w embrionach kurcząt, a następnie przez kolejne pasażę poprzez embriony kurcząt aż staje się nie zjadliwy dla ludzi.

Szczepy wirusa Typu II, które rozwijają się

w tkance centralnego układu nerwowego gryzoniów łatwo otrzymuje się z różnych źródeł. Ten materiał, zazwyczaj w postaci wodnej zawiesiny ze zmielonej tkanki nerwowej stanowiący posiew wirusowy, zaszczepia się do mózgów młodym, ssącym gryzoniom, korzystnie chomikom w wieku około 1 do 12 dni. Stosowanie innych młodych ssących gryzoniów, lub w innym wieku do hodowli szczepu aż do uzyskania miana LD_{50} dla myszy i przystosowanie go do wzrostu w tkance embrionowej jajka nie jest wykluczone. Wirusowi temu pozwala się wzrastać w młodych ssących gryzoniach aż do zaobserwowania choroby u co najmniej kilku zwierząt, które były zaszczepione. Czas, który powinien być rzędu 48 godzin na początku seryjnych pasażów redukuje się później do około 18 - 24 godzin, gdy wirus przekształca się w szeregu pasażów w młodym ssącym gryzoniu. Jeśli objawy choroby występują u kilku zaszczepionych młodych ssących, zabija się całą partię, usuwa się ich tkankę centralnego układu nerwowego i wytwarza zawiesinę zazwyczaj w izotonicznym roztworze soli i dalej kontynuuje się szczepienie nie uodpornionych, młodych ssących gryzoni. Zakażona tkanka powinna być zebrana dokładnie w czasie wcześniejszym od tego, w którym zaszczepione ssące młode zaczynają wykazywać objawy paraliżu. Większe stężenie cząsteczek żywego wirusa występuje w tkance nerwowej w czasie wcześniejszym od widocznych już objawów paraliżu. Dlatego przez zabijanie młodych ssących gryzoni właśnie przed rozwinięciem się objawów można otrzymać z ich tkanki nerwowej większe stężenie cząsteczek wirusa. Odpowiednia droga ustalenia czasu zbierania tkanki centralnego układu nerwowego polega na zaszczepieniu znacznej ilości młodych ssących gryzoniów w tym samym czasie i zbieranie zakażonej tkanki nerwowej całej grupy, gdy pierwszy z nich wykaże kliniczne objawy choroby. W ten sposób większość pozostałych gryzoniów będzie uśmiercona i ich tkanka nerwowa zostanie usunięta w czasie, gdy miano wirusa jest w pobliżu maksimum. Proces szczepienia młodych ssących gryzoniów, wytworzenie zawiesiny z ich tkanki nerwowej i zaszczepienie nieuodpornionych młodych ssących, prowadzi się seryjnie w sposób opisany przy stałym obserwowaniu miana LD_{50} dla myszy, wytworzonej zawiesiny. Stwierdzono, że jako wynik tej metody hodowli wirusa, miano preparatu LD_{50} dla myszy wykazuje stałą dążność do zwiększania poziomu aż do 10^{-5} , a nawet do

10^{-7,5} przy ciągłych pasażach seryjnych. Gdy miano LD₅₀ myszy zawiesiny wytworzonej z tkanki centralnego układu nerwowego osiągnie wartość co najmniej 10⁻⁵, można wirus przenieść do inkubowanych jaj, po czym prowadzić seryjne pasáže w embrionie kurczęcia, aż wirus zostanie zmodyfikowany tak, że można go bezpiecznie stosować jako żywą szczepionkę u ludzi i innych z rzędu naczelnych. Opisane to jest w artykułach Roca — Garcia i innych: Poliomyelitis II: Propagation of MEF₁ Strain of poliomyelitis Virus in Developing Chick Embryo by Yolk Sac Inoculation, Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. 81 : 519, 1952 Cabasso i innych: Poliomyelitis II: Propagation of MEF₁ Strain of Poliomyelitis Virus in Developing Chick by Allantoic Cavity Inoculation, Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. 81 : 525, 1952 i Cabasso i innych: Poliomyelitis IV: Some Culture and Other Characteristics of Chick Embryo Adapted Type II Strain of Poliomyelitis Virus, Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. 85 : 167 — 171, 1954.

Potrójne szczepionki przygotowane z osłabionego szczepu Typu II i osłabionego wirusa Typu I szczepu SM i wirusa Typu III szczepu Fox'a, rozwiniętych w Lederle Laboratories, a także opisane np. na stronkach 134—136 w University of Minnesota Medical Bulletin, tom 29, grudzień 1957 r. nie wykazują dominowania Typu II, który powodował niepowodzenie eksperymentów Sabin'a lecz przedstawiają inny problem. Jeżeli podaje się w stężeniu mniejszym od miliona TCD₅₀ każdego typu wirusa, procentowość jednostek w surowico ujemnej grupie dorosłych, rozwijających antyciała była niezadowolająca. Stężenie szczepionki zwyczajowo odnosi się do zwykłego logarytmu dawek zakażających i ta terminologia jest stosowana w opisie i w zastrzeżeniach. Doświadczenia na znacznej ilości dorosłych ze szczepionką zawierającą każdy z trzech typów wirusa o log. 5,8 wykazują rozwój antyciał surowiczo ujemnych z szybkością 71% dla Typu I, 87% — dla Typu II i 75% dla Typu III. Powyższe wyniki były u dorosłych, u których jest trudniej wywołać reakcję antyciał szczepionką żywego wirusa. Podczas, gdy to nie daje niekorzystnego porównania z wynikami otrzymanymi ze szczepionki z zabitego wirusa, nawet jeśli poddaje się trzykrotnemu szczepieniu, to jeszcze pozostawia niebezpiecznie wielki stosunek niechronionych surowiczo ujemnie, szczególnie przeciw Typom I i III, które są istotnie niebezpieczne.

Nieoczekiwanie stwierdzono, że jest bardzo ostry próg przy log. 6. Przy log. 6,1 procento-

wość u dorosłych była 96% dla Typu I i 100% dla Typu III. Typ II wzrósł do 78% i może być zwiększony przez jeszcze większe dawki. Powyższe badanie obejmuje rutynowe szczepienie w szpitalach w Minnesota brzemiennej kobiet, które są szczególnie bardziej podatne na polio paralitic. Wskutek tego korzystna jest w początkowym okresie potrójna szczepionka dająca prawie 100%-ową ochronę surowiczo czynną przed niebezpiecznymi szczepami Typu I i III i zasadniczą ochronę przed stosunkowo o wiele mniej niebezpiecznym Typem II.

Wynalazek zależy w swych szerszych aspektach od stosowania zmodyfikowanego w tkance nerwowej młodego ssącego gryzonia szczepu Typu II, który nie wykazuje dominowania w szczepionce oraz od dawek nie mniejszych od log. 6. Dlaczego zmodyfikowany w młodym ssącym gryzoniu wirus Typu II i szczególnie ten, który wykazuje przystosowanie do wzrostu w embrionie kurczęcia nie wykazuje właściwości dominowania, wykazywanej przez zmodyfikowany szczep Typu II dr Sabin'a, nie wiadomo. Wirusów nie można analizować chemicznie, można je tylko charakteryzować przez ich właściwości biologiczne i historię ich rozwoju. Dlatego wynalazek nie może być ograniczony żadną teorią wyjaśniającą, dlaczego modyfikowany wirus Typu II według wynalazku nie jest dominujący. Podobnie istnienie ostrego progu przy stężeniu równym log. 6 jest całkowicie nieoczekiwane i dotychczas nie wyjaśniono, dlaczego taki próg istnieje dla trójwartościowej szczepionki otrzymanej sposobem według wynalazku, ze szczególnym rodzajem modyfikowanego szczepu Typu II, który nie jest dominującym. Obydwa czynniki są konieczne, ponieważ potrójna szczepionka dr Sabin'a podawana przy stężeniu log. 6 nie dawała wyników.

Wynalazek wyjaśniają bardziej szczegółowo następujące przykłady.

Przykład I. Wytwarzanie osłabionego wirusa.

Typ I, szczep Sickles — Mahony, pochodzący z mieszaniny szczepu Sickles, otrzymanego przez dr Alberto Sabin'a i szczepu Mahony, od dr Browna z Uniwersytetu w Michigan przepuszczono kolejno 26 razy przez tkankę rdzenia pacierzowego myszy. Po tym nastąpiło 10 kolejnych pasażów kultury przez tkankę nerkową małpki, w tym czasie wirus został przystosowany do rozwoju w embrionie kurczęcia. Wirus przeprowadzono kolejno 14 razy przez tkanki embrionu kurczęcia, po czym nastąpiły na zmianę przejścia kilkakrotne przez tkankę nerkową

małpki i tkankę embriona kurczęcia. To doprowadziło do wytworzenia niezjadliwego posiewu Typu I, który następnie rozwijał się w tkance nerkowej małpki, wytwarzając duże ilości materiału odpowiedniego do zastosowania w końcowej szczepionce.

Wirus Typu II otrzymano biorąc szczep MEF₁ (pierwotnie wyisobniony w Middle East w 1942 roku). Przeprowadzono go dziewięć razy śród-mózgowo przez myszy, po czym 157 razy przez tkankę nerwową młodych ssących chomików. Po tych pasażach wirus został przystosowany do rozwoju w embrionie kurczęcia, przeprowadzono go więc seryjnie 17 razy przez embrion kurczęcia i 11 razy przez tkankę nerkową małpki. Następnie wirus był hodowany na komórkach nerki małpki, pasażowany dwukrotnie, po czym operację tę jeszcze raz powtórzono. Wytworzony nie zjadliwy wirus był wirusem posiewowym do produkowania szczepionki Typu II przez hodowanie na tkance nerkowej małpki.

Wirus Typu III otrzymano biorąc szczep Fox'a nie zjadliwego wirusa. Był on jedynie hodowany przez okolicznościowe pośrednie hodowanie na komórkach nerki małpki i wytworzono materiał posiewowy dla szczepionki Typu III, który następnie rozwijał się na tkance nerkowej małpki.

Ciekłą twardą kulturę ze zbioru każdego wirusa rozcieńczono taką samą objętością 70%-owego roztworu wodnego sorbitolu. Następnie ciecz rozcieńczono 35%-owym roztworem wodnym sorbitolu; rozcieńczalnik na podstawie z syropu miał następujący skład i był przygotowywany jak niżej:

Podstawa syropowa 35% sorbitolu składników na litr

p-hydroksybenzoesan etylu (Metyloparabens U.S.P.)	0,44 g
p-hydroksybenzoesan propylu (propyloparabens U.S.P.)	0,11 g
fosforan sodowy, jednozasadowy	2,76 g
fosforan sodowy, dwuzasadowy	11,36 g
Givandan Cherry Flavor (substancja o smaku wiśniowym)	0,26 g
woda destylowana	500,00 g
roztwór sorbitolu 70%-owego q.s.	500,00 g

Sposób wytwarzania roztworu sorbitolu jest następujący: ogrzewa się destylowaną wodę do temperatury 90–95°C, dodaje p-hydroksybenzoesanu etylu i propylu i mieszając, rozpuszcza je, z kolei dodaje się fosforanów i rozpuszcza je,

po czym dodaje się Givandan Cherry Flavor, oziębia do temperatury 25°C, doprowadza do pożądanego objętości roztworem 70%-owego sorbitolu, przesącza i wartość pH doprowadza do 7,0±0,2, nalewa do sterylnej naczynia i zaznacza liczbę log. i datę. Otrzymany końcowy produkt stanowi trójwartościową szczepionkę o mianie log. 5,8 na 1 cm³ każdego rodzaju wirusa.

1 cm³ powyższej mieszaniny podano szeregowi przeważnie dorosłych osób, przy czym procentowość wieku osób poddawanych szczepieniu była następująca: 8–10 lat – 7 %; 11–20 lat – 17%; 21–30 lat – 22%; 31–40 lat – 33%; 41–50 lat – 14% 51–60 lat – 5% i 61–65 lat – 2%.

Dwa procent spośród poddawanych szczepieniu było surowiczo ujemnych w stosunku do wszystkich trzech typów, 10% było ujemnych wobec dwóch typów, a 21% – wobec jednego typu. Dotyczy to odpowiednio potrójnie ujemnych, podwójnie ujemnych i pojedynczo ujemnych. Po podaniu szczepionki 71% surowiczo ujemnych Typu I, 67% surowiczo ujemnych Typu II i 75% surowiczo ujemnych Typu III wytworzyło odpowiednie przeciw ciała.

Przykład II. Powtórzono proces z przykładu I, lecz w tym przypadku dawkę końcowej szczepionki stanowiło 2 cm³, przy czym dla każdego typu wirusa miano wynosiło log. 6,1. Ilość osób poddawanych szczepieniu była w przybliżeniu cztery razy większa od ilości w przykładzie I, a procentowość wieku wynosiła, jak następuje: 4–10 lat – 2%; 11–20 lat – 5%; 21–30 lat 33%; 31–40 lat – 44%; 41–50 lat – 10% i 50–60 lat – 5%. Około 5% było potrójnie ujemnych, 18% podwójnie ujemnych i 26% pojedynczo ujemnych w stosunku do wszystkich trzech typów. Po zaszczepieniu 96% surowiczo ujemnych Typu I, 78% surowiczo ujemnych Typu II i 100% surowiczo ujemnych Typu III wytworzyło przeciwciała.

Przykłady obejmują szczepionki wytwarzane w postaci wodnych roztworów sorbitolu. Jest to prosta, niezawodna i nadająca się do podawania postać, lecz rozumie się, że wynalazek nie jest nią ograniczony i potrójną szczepionkę można wprowadzić przez absorpcję na bezwodnej żelatynie, lub zmieszać z innymi nadającymi się do podawania rozcieńczalnikami w postaci stałej lub ciekłej. Naturalnie rozcieńczalniki muszą być nie tylko nieszkodliwe dla ludzi, lecz także muszą być nietoksyczne wobec osłabionych wirusów w szczepionce.

Zastrzeżenia patentowe

Sposób wytwarzania trójwartościowej żywej szczepionki poliomyelitis odpowiedniej do podawania doustnego w postaci dawki jednostkowej, znamieny tym, że miesza się osłabiony wirus poliomyelitis Typu I, niezjadliwy dla ludzi z osłabionym wirusem poliomyelitis Typu III, niezjadliwym dla ludzi, oraz z osłabionym wirusem poliomyelitis, Typu II, adaptowanym w embrionie kurczęcia i niezjadliwym dla ludzi, który nie hamuje zakażenia przez niezjadliwe wirusy Typu I i Typu III i z otrzymanej mieszaniny wytwarza jednostki dawkowania, z których każda zawiera co najmniej log. 6 każdego typu wirusa.

Sposób według zastrz. 1, znamieny tym, że

wirusy tych trzech typów dysperguje się w wodnym roztworze sorbitolu.

3. Sposób według zastrz. 1 i 2, znamieny tym, że osłabienie wirusa Typu II przeprowadza się przez kolejne pasaży w tkance nerwowej młodych ssących gryzoniów, aż do adaptacji w embrionie kurczęcia, a następnie przez kolejne pasaży w embrionie kurczęcia aż do osiągnięcia niezjadliwości wobec ludzi.

4. Sposób według zastrz. 1—3, znamieny tym, że jako wirus Typu I stosuje się szczep SM osłabiony przez kolejne pasaży w tkance nerwowej gryzoni, a jako wirus Typu III stosuje się wirus szczepu Fox'a.

American Cyanamid Company

Zastępca: mgr Józef Kamiński
rzecznik patentowy