



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

58130

Patent dodatkowy
do patentu

Kl. 30 h, 6

Zgłoszono: 4.IX.1965 (P 110 707)

Pierwszeństwo: 14.IX.1964 dla zastrz. 2
i 5

MKP C 12 k 5/00

21.XII.1964 dla zastrz 1,
3 i 4

Opublikowano: 10.II.1970 Stany
Zjednoczone
Ameryki

UKD

Współtwórcy wynalazku: Louis Greenberg, Margaret Ivonne Cooper

Właściciel patentu: Canadian Patents and Development Limited, Ottawa (Kanada)

Sposób wytwarzania somatycznych, antygenowych szczepionek

1

Wynalazek dotyczy sposobu wytwarzania somatycznych, antygenowych szczepionek. Szczepionki te są preparatami rozpuszczonych, nieczynnych bakterii, powodującymi u chorych wytwarzanie się przeciwciał.

Typowym sposobem wytwarzania szczepionek bakteryjnych jest wyhodowanie bakterii na odpowiedniej pożywce, zebranie uzyskanego zbioru, ustalenie stężenia organizmów, a później pozbawienia aktywności lub zabicie bakterii za pomocą ciepła, środka konserwującego lub łącznie ciepła i środka konserwującego.

Szczepionki bakteryjne mogą być uzyskiwane z laboratoryjnych szczepów bakterii lub z bakterii, otrzymanych wprost od pacjenta, któremu stosuje się szczepionkę. W ostatnim przypadku nazywa się je szczepionkami autogennymi. Szczepionki, zawierające kilka szczepów bakterii nazywa się szczepionkami wielowartościowymi. Szczepionki, zawierające bakterie, należące do dwóch lub więcej rodzajów, nazywa się szczepionkami mieszanymi. Szczepionki mogą być także uzyskiwane z frakcji bakterii lub bakteryjnych produktów wydzielania. Przykładami tego ostatniego jest otrzymywanie szczepionek z trujących wydzielin błonicy i tężca.

W szczepionkach wytwarzanych sposobem według wynalazku bakterie są całkowicie rozpuszczone, tak, że wszystkie antygeny bakteryjne, wewnętrzne i zewnętrzne, obecne są w szczepionce w skutecznej postaci. Ten typ szczepionki nazywa się szcze-

2

pionką somatyczną, antygenową. Szczepionki, uzyskane według wynalazku, mogą być jednowartościowe, wielowartościowe lub typu mieszanego.

W związanym patencie nr 260 057, zgłoszonym 20 lutego 1963 roku w Stanach Zjednoczonych Ameryki ujawniono sposób wytwarzania somatycznych, antygenowych szczepionek, który dotyczy rozpuszczania martwych komórek bakterii patogennych przez poddanie ich działaniu enzymu proteolitycznego, takiego jak dezoksyrybonukleaza (Dornase), która powoduje rozpuszczenie komórek bez zniszczenia antygenowości.

Obecnie stwierdzono, że rozpuszczanie (liza) komórek może być w dużej mierze ułatwione przez wzrost komórek w środowisku, zawierającym jeden lub więcej aminokwasów, pobudzające rozwój osłabionych ścian komórek. Rezultatem tego jest fakt, że osłabione bakterie bardzo łatwo ulegają rozpuszczeniu, skoro tylko pozbawiono je aktywności odpowiednim środkiem konserwującym lub bakteriobójczym, jak np. „Thimerosal” (handlowa lub ogólna nazwa dla tiosalicylanu rtęciowego sodowo-etylowego). Zaleca się stosowanie tego środka jako środka konserwującego lub bakteriobójczego, można stosować jednak także inne środki jak tymokrezol, chlorek benzalkoniowy (mieszania chlorków alkilodwumetylobenzylaminowych) oraz fenol. W sposobie według wynalazku zastosowano Thimerosal, wyprodukowany przez firmę Eli

Lilly and Company, pod handlową nazwą „Merthiolate”.

Stosowanie glicyny w rozrywaniu komórek opisał uprzednio E. S. Maculla i P. B. Cowles w *Rocznikach Nauki*, tom 107, strona 376, 1948 rok. Według tej publikacji glicynę dodaje się w stosunkowo wysokich stężeniach do masy komórek po zbiorze. Tym niemniej, jak to oceniono badaniami mikroskopowymi, rozerwanie komórek jest minimalne, a otrzymanie ekstraktów zawdzięcza się prawdopodobnie eluowaniu materiału międzykomórkowego w roztworze glicyny. W korzystnej postaci wykonania wynalazku glicynę dodaje się początkowo do środowiska rozwojowego, aby uzyskane bakterie posiadały ścianki komórek podatne na rozpuszczanie. Stwierdzono, że w pewnych przypadkach takie komórki ulegają dostatecznej autolizie dla uniknięcia konieczności dodatkowego traktowania.

Próby wyprodukowania somatycznych, antygenowych szczepionek techniką Maculli i Cowlesa nie zostały w tym laboratorium uwieńczone sukcesem. Wykonano serię doświadczeń z pewnymi organizmami *Staphylococcus* przez dodanie glicyny do żywych kultur, w stężeniu 0,5–3,5%. Inne doświadczenie przeprowadzono z bakteriami tyfusu, stosując w tym przypadku glicynę w stężeniu 7,5%. W żadnym z tych doświadczeń nie nastąpiło rozpuszczenie komórek, ani nie uzyskano ich rzeczywistego rozerwania, chociaż przypuszcza się, że stężenie azotu proteinowego w wyklarowanym roztworze musiało wzrosnąć. Późniejsze próby skuteczności na zwierzętach doświadczalnych wykazały, że ani szczepionki przeciw bakteriom *Staphylococcus* ani tyfusowe, przygotowane w ten sposób nie wykazują znacznego, uodporniającego działania.

Wynalazek niniejszy zapewnia ulepszony sposób wytwarzania somatycznych, antygenowych szczepionek z bakterii. W sposobie tym bakterie należące do grupy *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Neisseriaceae*, *Escherichia coli* i *Clostridium* lub szczepki tych bakterii hoduje się na odpowiedniej pożywce zawierającej jeden lub więcej aminokwasów używanych przez te bakterie lub współdziałających w syntezie budowy komórek bakteryjnych w ilości dostatecznej dla uzyskania rozwoju bakterii posiadających osłabione ścianki komórek, dzięki czemu są one podatne na rozpuszczenie. Następnie wyhodowane bakterie zbiera się, pozbawia je aktywności odpowiednim środkiem bakteriobójczym, po czym poddaje je rozpuszczeniu, ewentualnie przyspieszając ten proces przez potraktowanie pozbawionych aktywności bakterii enzymem litycznym.

Sposób według wynalazku polega na tym, że w celu uzyskania bakterii o osłabionych ściankach komórkowych, bardziej podatnych na rozpuszczanie, stosuje się aminokwasy w ilości 1–5% wagowych w stosunku do ilości pożywki hodowlanej. Jako aminokwas stosuje się glicynę lub też L-prolinę, D,L-walinę, L-histydynę, D,L-asparaginę i L-arginę. Jako pożywkę hodowlaną stosuje się zmodyfikowaną pożywkę Frantza, a jako środek bakteriobójczy tiosalicylan rtęciowo-sodowo-etylowy o nazwie handlowej „Thimerosal” lub „Mer-

thiolate”. Jako enzym lityczny stosuje się enzym proteazę.

Postać wykonania wynalazku stanowi wytwarzanie szczepionki przeciw zapaleniu gruczołu sutkowego, którą stosuje się dla uodpornienia krów przeciwko zapaleniu wymion. Zapalenie to powodują zwykle bakterie *Staphylococcus* lub *Streptococcus* lub też mieszanina obu tych rodzajów bakterii. Przynajmniej częściowo zapalenie wymion mogą powodować inne organizmy, jak *Escherichia coli*. Stosownie do tego, szczepionka według wynalazku przeciw zapaleniu wymion, może być szczepionką przeciw bakteriom *Staphylococcus*, *Streptococcus*, mieszaną szczepionką przeciw tym dwóm bakteriom lub jedną z tych trzech, z dodatkiem somatycznej, antygenowej szczepionki przeciw *Escherichia coli*. Somatyczną, antygenową szczepionkę przeciw *Escherichia coli* według wynalazku, przygotowuje się przez kombinację początkowego wzrostu w glicynie i następnie rozpuszczenie w obecności odpowiedniego, proteolitycznego enzymu, jak na przykład *Pronase* (znak towarowy). Dalszą postacią wykonania wynalazku jest wytwarzanie somatycznej, antygenowej szczepionki z dodatkiem *Clostridium*, na przykład szczepionkę *Clostridium chauvoei* przeciw szelestnicy u bydła (*gangrena emphysematosa*). Przygotowuje się ją w podobny sposób jak szczepionkę przeciw *Escherichia coli* i uzyskuje się również zadowalające rezultaty.

Dodatkowym aspektem wynalazku jest sposób wytwarzania somatycznej, antygenowej szczepionki przeciw bakteriom, wybranym z grupy *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Neisseria* i *Clostridium*, przy czym w środowisku hodowli obecna jest glicyna, w ilości dostatecznej dla spowodowania rozwoju bakterii, posiadających osłabione ścianki komórek, a ułatwiających przez to rozpuszczanie (liżę) tych komórek, skoro tylko bakterie pozbawi się aktywności przez dodanie odpowiedniego środka konserwującego. Korzystne środowisko odżywcze zawierać powinno około 1–5,0% wagowych glicyny.

Poniżej podano przykład sposobu wytwarzania somatycznych, antygenowych szczepionek i ich badania, nie ograniczające w żadnym razie zakresu wynalazku.

Przypuszcza się, że wysoki poziom antygenowości, wykazany przez szczepionki wytwarzane sposobem według wynalazku wynika z zatrzymania w szczepionce tych antygenowych substancji, które uważane są za wywołujące uodpornienie. Ogólnie biorąc szczepionki są względnie przezroczyste i zasadniczo wolne od osadu i całych komórek.

Optimum stężenia glicyny może zmieniać się w szerokim zakresie, w zależności od rodzaju bakterii. Dla większości badanych bakterii optymalne stężenie glicyny mieści się w zakresie 1–5,0% wagowych pożywki hodowlanej. Zaobserwowano, że ogólnie biorąc im wyższa jest zawartość aminokwasów, jaka może być zastosowana bez ujemnego oddziaływania na rozwój bakterii, tym szybsze jest później ich rozpuszczanie.

Przykład I. Jako pożywkę hodowlaną, stosuje się w szeregu przykładów zmodyfikowaną

pożywkę Frantza (Watson & Scherp, Journal Immunol. 81, strona 331 (1958 r.) niemniej zaleca się także stosowanie w pewnych okolicznościach innych pożywek.

Roztwór A

kwasy kazeinoaminowe (techniczne)

DIFCO 10 g

cystyna (1,2% roztwór w 0,1 normalnym

HCl) 1,0 ml

chlorek potasowy (KCl) 0,090 g

ortofosforan dwusodowy $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ 6,5 g

czerwień fenolowa (0,1% roztwór) 8,0 ml

woda destylowana do 1000 ml

Roztwór B

siarczan magnezowy $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 2,4 g

glukoza 20,0 g

woda destylowana do 100 ml

Kwasy kazeinoaminowe są to hydrolizaty kazeiny, zawierające produkt o niskim ciężarze cząsteczkowym. Każdy roztwór nastawia się na pH = 7,4 przez dodawanie roztworu wodorotlenku sodowego i utrzymuje w ciągu 15 minut w autoklawie w temperaturze 121°C.

Zwykle, przy stosowaniu pożywki Frantza dla ogólnego użytku roztwór B dodaje się aseptycznie do roztworu A w dawkach 25 ml/l. Doświadczenie wykazuje, że niektóre postacie bakteryjne lepiej działają, jeśli tę proporcję zmienić, przy czym stwierdzono, że korzystne są następujące proporcje dla podanych bakterii:

bakterie Neisseria — 50 ml roztworu B/1 litr roztworu A

bakterie Staphylococcus — 15 ml roztworu B/1 litr roztworu A

bakterie Streptococcus — 40 ml roztworu B/1 litr roztworu A

Przykład II. Wytwarzanie szczepionki przeciw zapaleniu opon mózgowych (spowodowanej bakteriami Meningococcus).

Kultury nasienne pobiera się bezpośrednio z liofilizowanych ampulek do kolb, zawierających po 250 ml pożywki z przykładu I i inkubuje się w temperaturze 37°C przez noc (około 18 godzin), wstrząsając na wstrząsarce o 40 wahanach na minutę. 20 ml z zasianych kolb zaszczepia się do kolb jednolitrowych, zawierających po 500 ml zmodyfikowanej pożywki Frantza, a posiadającej w swym składzie 1% wagowych glicyny. Glicynę można dodać do roztworu A w czasie jego sporządzania lub aseptycznie mieszaniny przed jej zaszczepieniem. Kolby z zaszczepionymi kulturami poddaje się inkubacji w ten sam sposób jak poprzednio po zasianiu, a więc w ciągu 18—20 godzin na wstrząsarce o 40 wahanach na minutę. Po inkubacji kolby usuwa się z inkubatora i dodaje się roztworu 1/100 „Merthiolate” do każdego 500 ml roztworu w kolbie uzyskując końcowe stężenie Merthiolate 1:10 000. Kolby pozostawia się następnie w temperaturze pokojowej na okres 1 tygodnia. W okresie tym szczepionka, która na początku ma zwykle wartość odczytową na nefelometrze Mc Farlanda równą standardowi 3, klaruje się całkowicie i daje w końcu na nefelometrze wartość 0.

Szczepionki bada się następnie na jałowość, nie-

szkodliwość, toksyczność, pyrogeny i siłę działania (patrz przykład VI). Meningococcus to powszechnie używana nazwa dla bakterii Neisseria, z rodziny Neisseriaceae, powodujących zapalenie opon mózgowych. Stosuje się na przykład następujące szczepy Meningococcus:

M 1027 (S. Branham)

Z 1 (Lapeyssonnie)

M 129 (Lapeyssonnie)

Przykład III. Wytwarzanie szczepionki przeciw bakteriom Staphylococcus.

Szczepionki przeciw bakteriom Staphylococcus wytwarza się zasadniczo podobnie jak w przykładach I i II, lecz stwierdzono, że dla optymalnego rozpuszczenia wymagane są różne stężenia glicyny dla różnych szczepów bakterii, jak następuje:

Fag — grupa	Szczep	Typ fagu	% glicyny	% szczepu w szczepionce dla ludzi
I	584763	(80/81)	3,5	30
II	596535	(3A/3B/3C)	3,5	30
III	596510	7/47/53/54/75 +	3,5	30
IV	596297	42D	4,5	5
V	6032	KS6	3,5	5

Stwierdzono, że szczepionki Staphylococcus zachowują swoją aktywność po ogrzewaniu przez 15 minut w autoklawie, w temperaturze 120°C, pod ciśnieniem 1,4 kG/cm².

Przykład IV. Wytwarzanie szczepionki przeciw zapaleniu gruczołu sutkowego (Mastitis).

Technika wytwarzania tej szczepionki, będącej kombinacją szczepionek przeciw bakteriom Staphylococcus i Streptococcus różni się tym, że bakterie hoduje się na stałej pożywce szybciej niż na pożywce płynnej.

Zasiane szczepy hoduje się wpraw w 2% odżywczych odpadkach agarowych, przez 18 godzin, w temperaturze 37°C, a zbiór przemywa się albo wyjałowioną wodą destylowaną, albo 0,5% roztworem soli. Rozpuszczanie trwa dłużej, jeśli stosuje się roztwór soli. Zebrane bakterie mają stężenie około 3×10^{10} organizmów na 1 ml i dają wartość odczytową 10 na nefelometrze Mc Farlanda. Zaleca się jako korzystne, hodowanie bakterii na odżywczym bulionie, zamiast na stałym odżywczym agarze, gdyż w ostatnim przypadku stężenie komórek może być niższe, około 1×10^8 do 1×10^9 na 1 ml.

Bakterie — Szczep	% glicyny	% szczepu w szczepionce przeciw Mastitis
Staphylococcus — szczep 584763	3,0	15
Staphylococcus — szczep 596535	3,0	10
Staphylococcus — szczep 596510	3,0	15
Staphylococcus — szczep 6032	3,5	20
Staphylococcus — szczep 596297	3,5	10
Staphylococcus — szczep Dog (psi)	1,5	10
Streptococcus — szczep A 36 (1118)	1,5	10
Streptococcus — szczep C 30 (1628)	1,5	10

Po dodaniu „Merthiolate” do końcowego stężenia roztworu 1:10 000, komórki zostają zasadniczo rozpuszczone całkowicie w okresie 7—10 dni. Optymalne stężenie glicyny dla pobudzenia rozpuszczania zmienia się z rodzajem bakterii. W tym doświadczeniu najbardziej odpowiednie są podane stężenia glicyny dla różnych szczepów, rozwijanych na odżywczym agarze.

Jeśli pominie się bakterie Streptococcus ze szczepów A 36 (1118) i 30 C (1628), odpowiednie stężenia glicyny przedstawiają się następująco:

Szczep bakterii Staphylococcus	% glicyny	% szczepu w szczepionce przeciw zapaleniu gruczołu sutkowego (Mastitis)
584763	3,0	15
596535	3,0	15
596510	3,0	25
6032	3,5	30
596297	3,5	10
psi (Dog)	1,5	5

Przykład V. Wytwarzanie szczepionki przeciw bakteriom Streptococcus.

Stosowane ludzkie szczepy bakterii:

Typ A 36	1118
Typ A 19	616
Typ A 12	602

Liofilizowane ampułki umieszcza się w kolbach z bulionem z naparem z serca i hoduje się wzrastające bakterie przez noc w temperaturze 37°C. 10 ml zasianej hodowli dodaje się do każdej partii 500 ml pożywki Frantza, zawierającej 2% glicyny i następnie bakterie poddaje się przez 20 godzin inkubacji w temperaturze 37°C, na wstrząsarce. Następnie przeprowadza się wyliczenie bakterieryne żywych organizmów i dodaje się dostateczną ilość roztworu 1/100 „Merthiolate”, aby uzyskać jego końcowe stężenie 1:10 000. Kolby utrzymuje się następnie w temperaturze pokojowej do zakończenia rozpuszczania, co trwa 7—10 dni. Po całkowitym rozpuszczeniu organizmów wykonuje się badania jałowości, toksyczności, bezpieczeństwa stosowania i siły działania szczepionki.

Przykład VI.

Wyniki

W tabelach I i II podano przykłady wyników, otrzymanych w badaniach przeprowadzonych na królikach, przy zastosowaniu szczepionki przeciw zapaleniu gruczołu sutkowego (Mastitis), przygotowanej zarówno z bakterii Staphylococcus jak i Streptococcus. Każdą próbę przeprowadza się na czterech królikach. Każdemu królikowi podaje się domięśniowo 1 ml szczepionki, a podskórnie do każdej z pięciu plamek na grzbiecie królika 0,2 ml szczepionki. Dwa tygodnie później dwa z badanych zwierząt zakaża się podskórną dawką 0,1 ml 15 różnymi szczepami bakterii Staphylococcus, a pozostałe dwa zwierzęta zakaża się podskórną dawką 0,1 ml 15 różnymi szczepami bakterii Streptococcus. Dalszym czterem kontrolnym (nie

szczepionym) królikom wstrzykuje się identyczną dawkę tych samych szczepów bakterii, w tym samym czasie i w ten sam sposób jak zwierzętom szczepionym, przy czym dwom królikom wstrzykuje się bakterie Staphylococcus, a dwom bakterie Streptococcus. Króliki obserwuje się dwa do czterech dni. Pod koniec tego okresu nie szczepione króliki kontrolne powinny wykazać duże martwicze plamy wokół miejsc wstrzykiwania, podczas gdy miejsca te u uodpornionych przez zaszczepienie królików powinny pozostać czyste lub względnie czyste. W przytoczonych tabelach podano rozmiary plam (pasm), otrzymanych w aktualnych badaniach. Wielkości podane są w milimetrach, a „x” oznacza wydzielanie ropy i obumarcie tkanki.

Tabela I

Króliki kontrolne		Króliki szczepione szczepionką P.S.A. przeciw bakt. Staphylococcus partia 7—3 (sucha)			
Królik nr 4 Staphylococcus	Królik nr 3 Staphylococcus	Królik nr 5 Staphylococcus	Królik nr 6 Staphylococcus		
20x 10 20x	25x 15x 20x	0 0 0	0 0 0		
15x 15x 25x	20x 20x 25x	0 5 0	0 0 5		
15x 10 25x	15 10 25x	0 0 0	5 0 0		
20x 20x 25x	15x 15 25x	5 0 5	5 5 5		
25x 25x 20x	25x 25x 15x	10 10 0	5 5 0		

Króliki zaszczepione szczepionką przeciw bakteriom Staphylococcus (ludzka) i zakażone przez wstrzykiwanie 15 szczepami bakterii Staphylococcus z liofilizowanych ampulek, w ilości 0,1 ml na każdą plamkę, przy stosowaniu rozcieńczenia 1:75.

Tabela II

Króliki kontrolne		Króliki szczepione szczepionką przeciw Mastitis nr 4—36	
Staphylococcus	Streptococcus	Staphylococcus	Streptococcus
10 25x 20x	20x 15 10	0 0 10	20x 0 5
25x 30x 0	30x 25x 20	10 10 5	0 10 5
5 50x 10	10 15 10	10 5 5	0 0 0
35x 20x 40x	10 20x 10x	10 0 5	0 0 0
40x 30x 30x	25x 20x 15	5 5 5	0 0 0
	zaobserwowano różowe zabarwienie		nie zaobserwowano zaczerwienienia

Króliki szczepione szczepionką przeciw zapaleniu gruczołu sutkowego (Mastitis) i zakażone przez wstrzykiwanie 15 szczepami bakterii Staphylococcus lub 15 szczepami bakterii Streptococcus.

Uwaga do tabeli II:

Wstrzykiwanie 15 szczepów bakterii Staphylococcus w rozcieńczeniu 1:75 0,1 ml na plamkę

Wstrzykiwanie 15 szczepów bakterii *Streptococcus* w rozcieńczeniu 1:50 0,1 ml na płamkę

Z tabeli wynika, że stopień uodpornienia, uzyskanego przy użyciu szczepionek według wynalazku, jest wysoki. Stwierdzono także, że somatyczne, antygenowe szczepionki, wytworzone sposobem według wynalazku, w ogólności uodporniają silniej niż odpowiednie konwencjonalne szczepionki pełnobakteryjne oraz, że szczepionki według wynalazku powodują mniejsze objawy uboczne u ludzi niż konwencjonalne szczepionki pełnobakteryjne.

Sposób postępowania w badaniu szczepionki przeciw bakteriom *Meningococcus* polega na uodpornianiu 60 myszy, przy użyciu po 20 myszy na każde z trzech oddzielnych rozcieńczeń szczepionki, jak pokazano w tabeli III. 20 myszy pozostawia się dla kontroli. Dwa do trzech tygodni później zwierzętom wstrzykuje się żyjący, złośliwy szczep bakterii *Meningococcus* (*Neisseria meningitidis*) i zwierzęta obserwuje się w ciągu 1 tygodnia. Wyniki typowego badania zwierząt zestawiono w tabeli III.

Wstrzykiwany szczep bakterii w tym badaniu to szczep Z 1, wyhodowany przez Laboratorium Higieny Departamentu Zdrowia i Opieki Społecznej Kanady. Używa się czterogodziną hodowlę rozwiniętą na pożywce Frantza na wstrząsarce i inkubowaną w temperaturze 37°C. Wstrzykiwana dawka stanowi zawiesinę w 4% mucynie i podawana jest do wewnątrzotrzewniowo w ilości 0,1 ml na mysz.

Tabela III

Szczepionki		Wyniki śmiertelne				
Rozcieńczenie		Po godzinach:				Pozostało żywych
		24	48	72	144	
Szczepionka przeciw bakteriom <i>Meningococcus</i> P.S.A. nr 1 złożone	nie-rozcień.	0/20	2/20	2/20	2/20	18/20
	1:5	3/20	6/20	6/20	6/20	14/20
	1:10	6/20	7/20	9/20	10/20	10/20
Szczepionka przeciw bakteriom <i>Meningococcus</i> P.S.A. nr 1 złożone	nie-rozcień.	2/18	2/18	2/18	2/18	16/18
	1:5	0/20	0/20	0/20	0/20	20/20
	1:10	5/20	11/20	11/20	11/20	9/20
Króliki kontrolne		15/20	18/20	18/20	18/20	2/20

Wyniki, podane w tabeli III wykazują, że somatyczna, antygenowa szczepionka przeciw bakteriom *Meningococcus* daje dobre uodpornienie myśli.

Przykład VII. Szczepy bakterii *Escherichia coli* rozwija się na zmodyfikowanej pożywce Frantza, podobnie jak w przykładzie I i II. Dodaje się dostateczną ilość glicyny dla uzyskania jej stężenia w pożywce 1,5% wagowych. Inkubację prowadzi się na wstrząsarce w temperaturze 37°C, w ciągu 18–24 godzin. Następnie dodaje się „Merthiolate” do uzyskania końcowego stężenia tego środka 1:10 000. Hodowlę inkubuje się dalej na wstrząsarce w 18 do 24 godzin. W tym stadium wykonuje się następnie badania żywotności bakterii, aby upewnić się, że wszystkie bakterie pozabawione zostały aktywności. Stałe wstrząsając na wstrząsarce dodaje się do kolby, w jednym lub dwóch stadiach, enzym proteazę, uzyskaną z *Streptomyces griseus*. Całość 10 mikrogramów enzymu dodaje się, wstrząsając przez 24 godziny między jednym, a drugim dodawaniem. Wstrząsanie kontynuuje się w ciągu 1–3 dni, aż rozpuszczanie będzie zasadniczo zakończone. Otrzymuje się względnie czystą szczepionkę, która badana na siłę działania na myszach, wykazuje skuteczność uodpornienia myszy przeciw zakażeniu szczepami bakterii *Escherichia coli*, pochodnymi szczepom stosowanej szczepionki. Przykłady typowego badania pokazano w tabeli IV. Szczepionkę można dodawać w małych proporcjach do szczepionki przeciw zapaleniu gruczołu sutkowego (Mastitis) ponieważ bakterie *Escherichia coli* powodują także pewne przypadki zapalenia wymion u bydła. Można stosować ją także dla zabezpieczenia ludzi przed biegunką niemowlęcą, spowodowaną przez bakterie *Escherichia coli*.

Tabela IV

Szczep bakterii <i>Escherichia coli</i>		Wyniki wstrzykiwań		
Szczep nr	Szczepionka	Wstrzykiwanie	Ilość myszy w doświadczeniu	Ilość myszy pozostałych przy życiu
A 634760	0–26	0–26	10	9
Kontrola	—	0–26	10	0
B 634760	0–26	0–26	9	7
Kontrola	—	0–26	10	0

Przykład VIII. Wytwarzanie szczepionki przeciw szeleśnicy u bydła.

Pięć szczepów bakterii *Clostridium chauvoei* np. „WHW”, „F”, „Deal”, „Oklahoma” i „Tosper” hoduje się przez 24 godziny, w temperaturze 37°C na bogatym w tioglikolan bulionie. Te zasiane kultury stosuje się następnie do zaszczepienia pożywki produkcyjnej w dawkach 0,1 ml na 100 ml pożywki. Skład pożywki produkcyjnej jest następujący:

Składniki	% wagowo/objętościowe
trypton	4,0
chlorek sodowy	0,5
ekstrakt drożdżowy	0,5 (Amber X)
cysteina	0,5
glicyna	0,25—0,75 (wartość zmienia się w zależności od szczepu)
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,5
dekstroza	0,5 (dodana aseptycznie z jałowego 50% roztworu podstawowego)

Wartość pH roztworu nastawia się na 7,8 przez dodanie 5 n NaOH, po czym pożywkę sterylizuje się w ciągu 15 minut w autoklawie, w temperaturze 121°C. Literatura: Journal Comp. Path. 67, 157 (1957).

Wytwarzanie.

Kultury produkcyjne hoduje się w temperaturze 37°C w ciągu 24 godzin, a później pozbawia się je aktywności przez dodanie 0,5% formaliny. Następnie dodaje się enzymu „Pronase” w ilości 5 mikrogramów/ml, z roztworu podstawowego, zawierającego 0,25 mg. na 1 ml. Po dodaniu enzymu wartość pH roztworu nastawia się na 8, stosując 5 n NaOH. Roztwór utrzymuje się na łaźni wodnej w temperaturze 45°C w celu uaktywnienia enzymu, po czym pozostawia się w temperaturze pokojowej w ciągu 7—10 dni, kontrolując codziennie pH i nastawiając je w razie potrzeby oraz obserwując postęp rozpuszczenia. Po zakończeniu lizy roztwór bada się na jałowość, bezpieczeństwo stosowania i siłę działania, stosując znane metody badań.

Badanie siły działania.

Pięć świnek morskich szczepi się domięśniowo 1,0 ml szczepionki przeciw bakteriom *Clostridium chauvoei*, przygotowanej z rozpuszczonych całkowicie komórek, jak wyżej opisano. Po 10 dniach wstrzykuje się w podobny sposób 1,0 ml zastrzyku pobudzającego. Po następnych 10 dniach, zarówno tym świnkom morskim jak i pięciu kontrolnym, nie szczepionym świnkom, wstrzykuje się domięśniowo 0,5 ml standardowej, zarodnikowej zawiesiny bakterii *Clostridium chauvoei*, zawierającej 10 M.L.D. w zawieszynie. Cztery (80%) na pięć szczepionych świnek morskich pozostały przy życiu. Żadna z pięciu nie szczepionych świnek nie przeżyła doświadczenia.

Przykład IX. Rozpuszczanie innymi aminokwasami.

Chociaż zaleca się glicynę do stosowania jako aminokwas, także inne aminokwasy mogą ułatwiać w podobny sposób rozpuszczenie komórek bakterieryjnych w celu wytworzenia użytecznych szczepionek. Wyniki zestawiono w tabeli V.

Tabela V

	Aminokwas	Stężenie	Liczba bakterii		Rozpuszczanie
			Staphylococcus Szczep nr 584763	Staphylococcus Szczep nr 596297	
5	L-argenina 1	1,0	7 × 10 ⁷	8,5 × 10 ⁷	+
10	Kwas D i L-asparaginowy	2,5	1 × 10 ⁷	3 × 10 ⁷	+
	L-histydyna	1,5	1 × 10 ⁷	8 × 10 ⁷	+
	D i L-walina	3,0	5 × 10 ⁷	8 × 10 ⁷	+
	L-prolina	3,0	2 × 10 ⁷	6 × 10 ⁷	+
15	Glicyna (porównanie)	3,5	2 × 10 ⁷	12 × 10 ⁷	+

Dodatkowymi szczepami bakterii, stosowanymi w wytwarzaniu użytecznych szczepionek są następujące:

20 *Staphylococcus* szczepy 1645, 591714, 598022, 597497, 595354, 598074 i 6003.

Streptococcus szczepy 1510 T 35, 589 T1, 601 T11, 618 T22 i 599 T9.

25 *Meningococcus* szczepy D2 (Lapeyssonnie), M 111, N1 (Lapeyssonnie), 962 (Brannon) M 132 (Lapeyssonnie).

30 Szczególnie interesującymi są bakterie z rodzin *Micrococcaceae*, *Lactobacteriaceae*, *Bacillaceae* i *Enterobacteriaceae*, do których należą rodzaje: *Neisseria*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Escherichia coli* i *Clostridium*.

Zastrzeżenia patentowe

35 1. Sposób wytwarzania somatycznych antygenowych szczepionek z rozpuszczonych, pozbawionych aktywności bakterii chorobotwórczych należących do grupy takich jak *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Neisseriaceae*, *Escherichia coli* i *Clostridium*, przez hodowanie wymienionych bakterii na odpowiedniej pożywce zawierającej jeden lub więcej aminokwasów używanych przez te bakterie lub współdziałających w syntezie budowy komórek, zebranie bakterii, pozbawienie ich aktywności i

45 2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że w przypadku wytwarzania szczepionek z bakterii należących do grupy *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Neisseria* i *Escherichia coli* jako aminokwas stosuje się glicynę.

55 3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako aminokwas stosuje się L-prolinę, D,L-walinę, L-histydynę, D,L-asparaginę i L-arginę.

60 4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że rozpuszczanie bakterii przyspiesza się przez podziałanie na nie enzymem litycznym, po uprzednim pozbawieniu ich aktywności odpowiednim środkiem bakteriobójczym.

65 5. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako pożywkę hodowlaną stosuje się zmodyfikowaną pożywkę Frantza.