



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 23.02.74 (P. 169031)

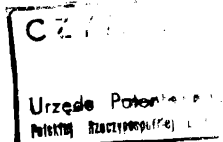
Pierwszeństwo: 24.02.73
Republika Federalna Niemiec

Zgłoszenie ogłoszono: 01.03.75

Opis patentowy opublikowano: 15.03.1977

MKP A61k 27/00
C12k 5/00

Int. Cl.² A61K 39/06
C12K 5/00



Twórca wynalazku: _____

Uprawniony z patentu: Bayer AG., Leverkusen (Republika Federalna Niemiec)

Sposób wytwarzania preparatów farmaceutycznych

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania preparatów farmaceutycznych z zastosowaniem środka inaktywującego przy wytwarzaniu substancji immunizujących (antygenów względnie immunogenów) dla preparatów farmaceutycznych, na przykład szczepionek wirusowych i bakteryjnych. Wiadomo, że do wytwarzania wyżej wymienionych preparatów farmaceutycznych potrzebne są sposoby, względnie środki inaktywujące, które skutecznie niszczą zakaźność stosowanych wirusów lub bakterii, lecz pozostawiają całkowicie nienaruszone ich własności antygenowe.

Celem wytworzenia skutecznie zinaktywowanych preparatów, proces ten musi przebiegać jako reakcja pierwszego rzędu, aby można było z całą pewnością ustalić moment całkowitej utraty zakaźności. Nie ma to miejsca przy licznych stosowanych sposobach inaktywowania (za pomocą ciepła, światła nadfioletowego) względnie przy środkach inaktywujących (formaldehyd, nadtlenek wodoru, β -propiolakton). Inne znane substancje, nie posiadające tej wady, są chemicznie nietrwałe, jak na przykład acetyloetylenoiminy (opis patentowy RFN nr 1 041 648) lub też wymagają dłuższego czasu działania i/lub wyższych stężeń, jak na przykład w przypadku etyloetylenoiminy (zgłoszenie patentowe RFN P 19 24 303.9).

Stwierdzono, że do wytwarzania substancji immunizujących (antygenów względnie immunogenów) dla preparatów farmaceutycznych można stosować

2

znaną etylenoiminę o wzorze podanym na rysunku.

Niespodziewanie etylenoimina nie wykazuje wyżej wymienionych wad znanych środków inaktywujących. Etylenoimina jest technicznie bardzo łatwo dostępna, jest bardzo trwała i daje się dobrze składować i umożliwia w reakcji pierwszego rzędu szybkie i pewne inaktywowanie zakaźnych drobnoustrojów, nie wpływając ujemnie na ich właściwości antygenowe, względnie immunizujące. W ciągu 5 10 krótkiego czasu reakcji przy porównywalnie niskim stężeniu inaktywowanie przebiega szczególnie łagodnie w stosunku do inaktywowanego materiału. Zastosowanie etylenoiminy jako środka inaktywującego przy wytwarzaniu substancji immunizujących dla preparatów farmaceutycznych stanowi 15 więc wzbogacenie farmacji.

Etylenoiminę dodaje się do inaktywowanych zawiesin wirusów, względnie bakterii do osiągnięcia stężenia końcowego 0,005—2% (obj/obj), zwłaszcza 20 0,01—0,5% (obj/obj). Czas trwania reakcji wynosi, w zależności od warunków doświadczenia, kilka godzin do dwóch dni. Stosuje się temperatury 0—45°C, zwłaszcza 20—37°C.

Szczepiny wirusów i bakterii inaktywowane etylenoiminą można stosować do zapobiegania i leczenia 25 zakażeń wirusami, i bakteriami zarówno w medycynie, jak i w weterynarii. Antygeny wirusowe lub bakteryjne, wytworzone sposobem według wynalazku, można przerabiać na leki w znany sposób i stosować w postaci roztworu, syropu, emulsji, zawie- 30

siny, spray'u, maści, pasty, kremu, płynu do zmywania, aerozolu, tabletki itp.

Preparaty wytwarza się w znany sposób, na przykład przez rozcieńczanie preparatów wirusowych lub bakteryjnych, inaktywowanych sposobem według wynalazku, odpowiednimi rozpuszczalnikami i /lub obojętnymi, nietoksycznymi, stałymi, półstałymi lub ciekłymi nośnikami, stosując ewentualnie środki emulgujące i/ lub dyspergujące rozpylające i pędne oraz przy zastosowaniu odpowiednich stabilizatorów.

Jako rozpuszczalniki, nośniki, środki emulgujące, względnie dyspergujące można wymienić wodę, nietoksyczne organiczne rozpuszczalniki względnie rozcieńczalniki takie, jak parafiny, na przykład frakcje ropy naftowej, oleje roślinne, na przykład olej z orzeszków ziemnych, olej sezamowy, alkohole, na przykład alkohol etylowy, gliceryna, glikole, na przykład glikol propylenowy, glikol polietylenowy i wodę. Jako stałe nośniki stosuje się na przykład naturalne mączki mineralne, na przykład kwas krzemowy o wysokim stopniu dyspersji, krzemiany, cukry, na przykład cukier trzcinowy, mlekowy i grochowy, wodorotlenek glinowy, wielocukry, na przykład dekstryny, agar.

Jako środki emulgujące stosuje się emulgatory niejonotwórcze i anionowe, na przykład estry polioksyetylenowe kwasów tłuszczowych, estry polioksyetylenowe alkoholi tłuszczowych, sulfoniany alkilowe i sulfoniany aryłowe, jako środki dyspergujące stosuje się na przykład ligninę, ługi posiarczynowe, metylcelulozę, skrobię i poliwinylpirolidon, a jako środki zwiększające poślizg na przykład stearynian magnezowy, tak, kwas stearynowy i laurylosiarczany sodowy.

Jako stabilizatory można wymienić aminokwasy, cukry, białka, wielocukry, glikole polialkilenowe. Stabilizatory te można dodawać zarówno w roztworze wodnym, jak też liofilizowane. Inaktywowane sposobem według wynalazku szczepki wirusów lub bakterii, względnie wytworzone z nich sposobem według wynalazku środki lecznicze można stosować w znany sposób, na przykład doustnie, domięśniowo, dootrzewnowo, podskórną, miejscowo, zwłaszcza na wszelkie błony śluzowe ciała ludzkiego i zwierzęcego. Poniższe przykłady wyjaśniają bliżej sposób według wynalazku.

Przykład I. Do roztworu wirusa choroby pyśki i racie (MKS), typ C, wartość $\text{pH} = 8,0$, w postaci odwirowanej cieczy hodowlanej z zakażonej ciągłej hodowli komórek jąder cięłych, dodaje się 2% (obj/obj) zubożonego roztworu etylenoiminy do stężenia końcowego 0,03% (obj/obj). Mieszaninę utrzymuje się, mieszając, w temperaturze 37°C . Po upływie określonych odstępów czasu pobiera się z tego roztworu próbki. Reakcję inaktywowania zatrzymuje się za każdym razem przez dodanie 10% objętościowych 20% roztworu tiosiarczany sodowego.

Pobranymi próbkami, nierozcieńczonymi i rozcieńczonymi dziesięciostopniowo, zaszczepia się po 10 próbek z hodowlą tkankową pierwotnych komórek nerki cięłej w ilości 0,1 ml. Oznaczone przy tym miana wirusowe wykazują z upływem czasu spadek, odpowiadający reakcji pierwszego rzędu.

Po upływie 3 godzin działania nie można było już wykazać zakaźności, nawet po zaszczepieniu 0,5 ml. Rysunek pokazuje przebieg inaktywacji wirusa MKS, typ C w temperaturze 37°C i przy wartości $\text{pH} = 8,0$. Na osi rzędnych odkłada się logarytm jednostek zakaźnych, na osi odciętych czas oddziaływania w godzinach. Krzywa 1 pokazuje przebieg inaktywowania przy stężeniu końcowym 0,03% (obj/obj).

Roztwór wirusów, traktowany w ten sposób w ciągu 4 godzin, zaszczepia się w ilości 0,1 ml 20-myszom w wieku 3—4 dni dootrzewnowo i w ilości 1,5 ml 5 świnkom morskim podskórną. Żadne ze zwierząt nie wykazało jakichkolwiek objawów choroby. Po upływie 3 tygodni po szczepieniu można było wykazać w surowicy wszystkich świnek morskich zubożniające przeciwciała przeciw nietraktowanemu uprzednio zakaźnemu wirusowi wyjściowemu.

Roztwór wirusów, inaktywowany w ten sposób, wykazał również wysoką zdolność wiązania dopełniacza, jak nietraktowany, aktywny wyjściowy roztwór wirusów.

Przykład II. Równolegle i w bezpośrednim porównaniu ze sposobami, opisanymi w przykładzie I stosuje się zamiast 0,03% (obj/obj) etylenoiminy następujące substancje i stężenia:

- 0,05% (obj/obj) etylenoiminy (patrz rysunek, krzywa 2)
- 0,05% (obj/obj) etyloetylenoiminy patrz rysunek, krzywa 3)
- 0,05% (obj/obj) N-acetyloetylenoiminy (patrz rysunek, krzywa 4)
- 0,05% (obj/obj) 2,2'-dwumetyloetylenoiminy (patrz rysunek, krzywa 5)
- 0,05% (obj/obj) izopropylloetylenoiminy patrz rysunek, krzywa 6)

Rysunek pokazuje przebieg inaktywacji. Przy etylenoiminie (krzywa 2) nie można było po upływie 1,5 godziny wykazać obecności wirusa, zdolnego do wywołania zakażenia, przy pozostałych substancjach osiągnęto ten stan dopiero po 7—8 godzinach, względnie po 11 godzinach.

Przykład III. Sposób, opisany w przykładzie I, powtarza się w temperaturze reakcji 27°C zamiast 37°C . Z upływem czasu stwierdza się również liniowy spadek zakaźności. Po upływie 16 godzin nie można było już wykazać obecności zakaźnego wirusa.

Przykład IV. Sposób, opisany w przykładzie I, przeprowadza się, stosując roztwór wirusa MKS typ C. Po okresie reakcji wynoszącym 4 godziny, nie można już było stwierdzić zakaźności.

Przykład V. Roztwory wirusa MKS typ C i typ 0, inaktywuje się w każdym przypadku sposobem, opisanym w przykładzie I, w ciągu 5 lub 6 godzin. Znany sposób za pomocą glikolu polietylenowego wytwarza się z nich koncentraty wirusowe, którymi zaszczepia się w każdym przypadku domięśniowo po 1 ml 5 wrażliwym, prosiętom. Gdy więc w okresie 10 dni nie pojawiły się żadne objawy chorobowe, miesza się w każdym przypadku równe części inaktywowanych koncentratów wirusowych z adjuwantem i wstrzykuje domięśniowo 20 świniom. Wszystkie zwierzęta wytworzyły zobo-

jętniające przeciwciała w stosunku do obydwu aktywnych typów wirusów. Po upływie 8 tygodni po zaszczepieniu 10 zwierząt spośród 10 było zimmunizowanych w stosunku do aktywnego wirusa MKS typ C, a w stosunku do aktywnego wirusa MKS typ 0₁ było zimmunizowanych 9 na 10 zwierząt, jedno z nich zachorowało, jednakże w stopniu znacznie lżejszym, niż zwierzęta kontrolne, nie traktowane uprzednio.

Przykład VI. Sposób, opisany w przykładzie I, stosuje się do inaktywowania zakaźnej bydłowej Rhinotracheitis (IBR)-przedstawiciela wirusów zawierających kwas desoksyrybonukleinowy — zamiast wirusa MKS, zawierającego kwas rybonukleinowy. Również w tym przypadku stwierdza się liniowy spadek miana zakaźności tak, że po 6 godzinach trwania reakcji nie można było wykazać zakaźności. 10 świnkom morskim wstrzykuje się domięśniowo po 2 ml roztworu wirusa, traktowanego w ciągu 6 godzin. Po upływie 3 tygodni po szczepieniu wykazano w surowicy tych zwierząt przeciwciała zobojętniające w stosunku do wirusa IBR.

Przykład VII. Do zawiesiny bakterii *Pasteurella haemolítica*, zawierającej około 10¹⁰ bakterii (ml, dodaje się analogicznie do sposobu, opisanego w przykładzie I, etylonoiminę do stężenia końcowego 0,05% (obj/obj). Po upływie 14 godzin w temperaturze 37°C odwirowuje się masę bakteryjną

i ponownie zawiesza w jałowym roztworze soli kuchennej, zawierającym bufor fosforanowy.

Próbką tak wytworzonego preparatu zaszczepia się 3 rozmaite pożywki z bakteriami i inkubuje w temperaturze 37°C. W ciągu 6 dni nie stwierdza się wzrostu bakterii.

Inną próbę wstrzykuje się w dawkach po 0,1 ml dootrzewnowo 20 myszom. Po upływie 24 i 48 godzin zwierzęta nie wykazały żadnych objawów chorobowych, podczas gdy z 20 zwierząt, którym wstrzyknięto tę samą, lecz nie traktowaną zawieszynę bakterii, zginęło 15 zwierząt w ciągu 16 godzin i 5 zwierząt w ciągu 24 godzin.

Inną próbkę miesza się z taką samą obojętnością adjuwanta. Zaszczepia się podskórnie po 1,5 ml tej szczepionki 5 królikom. Szczepienie powtarza się po 14 dniach. U żadnego z tych zwierząt nie stwierdza się bakteremii. W surowicy tych zwierząt można było ustalić za pomocą testu aglutynacyjnego miano przeciwciała w stosunku do tych samych bakterii, przy czym po szczepieniu przypominającym miano to uległo wyraźnemu podwyższeniu.

Zastrzeżenia patentowe

Sposób wytwarzania preparatów farmaceutycznych, zawierających antygeny, ~~znalenny~~ tym, że zakaźne drobnoustroje i/lub ich antygeny poddaje się działaniu etylonoiminy.

