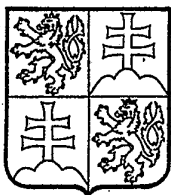


ČESKÁ A SLOVENSKÁ  
FEDERATIVNÍ  
REPUBLIKA  
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD  
PRO VYNÁLEZY

# POPIS VYNÁLEZU 272 935

## K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

(21) PV 770-89.U  
(22) Přihlášeno 06 02 89

(40) Zveřejněno 13 06 90  
(45) Vydáno 16 12 91

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl<sup>5</sup>  
A 61 K 47/00//  
A 61 K 37/12

(75) Autor vynálezu

DVOŘÁK RASTISLAV MVDr., BRNO,  
POLÁČEK RADOMIL. ing., VYŠKOV,  
PETRÁŠ JOSEF MVDr., BRNO,  
JIRAN EDUARD MVDr., CSc., LITOMĚŘICE,  
KRUPKA VRATISLAV MVDr., VYŠKOV

(54)

Adjuvans pro virové vakcíny

(57) Řešení se týká adjuvans tvořeného 1,5 až 4,5 % hmot. vodorozpustného štěpeného ho-  
vězího kolagenu o molekulové hmotnosti  
30 000 až 40 000, v kombinaci s 0,15 až  
0,45 % hmot. rostlinného saponinu v konečné  
formě vakcíny. Toto adjuvans zesiluje imuno-  
genní odpověď na aplikovaný antigen a nemá  
nepříznivý vliv na organismus.

Vynález se týká adjuvans pro virové vakcíny. Řeší u nich zasílení imunogenní odpovědi na podaný antigen. Adjuvantního účinku se u vakcín dosahuje obsahem 1,5 až 4,5 % hmot. vodorozpustného hovězího kolagenu v kombinaci s 0,15 až 0,45 % hmot. rostlinného saponinu.

Antigen aplikovaný do organismu parenterálně vyvolává určitý stupeň imunity. Za účelem zvýšení jeho působení se přidávají adjuvantní látky (Ramon, G.: C.R. Acad. Sc. 181, (1925), 157; Ramon, G.: Bull. Soc. Centr. Méd. Véter. (1925), 101, 227).

Celosvětově se ustálilo používání zejména gelu hydroxidu hlinitého, minerálních olejů a saponinu (Ramon, G., Richon, R., Thiery, J.P., Gerbeaux, Cl.: D Immunologie (1943) 13, 301. Klasické adjuvans typu parařinového oleje je Freundovo adjuvans (Freund, J.: Ann. Rev. Microbiol. 1 (1947) 291; Freund, J.: A.J. Clin. Path. 21 (1951) 645), které se obohacuje případnými emulgátory. Tyto přípravky mají vedle adjuvantního účinku některé vedlejší nežádoucí účinky. Jsou to především reakce v místě aplikace, ale také v posledních letech - v souvislosti se zhoršující se ekologickou situací a zvyšující se vnímavostí zvířat - celkové reakce anafylaktoidního charakteru, které se vyskytují hlavně u skotu. Některé případy končí úhynem.

Uvedené nedostatky odstraňuje adjuvans pro virové vakcíny podle vynálezu, jehož podstatu spočívá v tom, že obsahuje 1,5 až 4,5 % hmot. vodorozpustného štěpeného hovězího kolagenu o molekulové hmotnosti 30 000 až 40 000 a 0,15 až 0,45 % hmot. rostlinného saponinu.

Adjuvans pro virové vakcíny podle vynálezu má oproti dosud používaným adjuvacím následující výhody:

Je neantigenní povahy, při parenterálním podání je u zvířat bezvýhradně snášeno, potencuje imunogenní účinek živých i inaktivovaných antigenů lépe než dosud známá adjuvancia, je snadno vstřebatelné a v místě vpichu nezanechává rezidua a následky.

Základní složkou je vodorozpustný štěpený hovězí kolagen o molekulové hmotnosti 30 000 až 40 000. V koncentracích do 10 % hmot. je tekutý při teplotách do  $-10^{\circ}\text{C}$ . Na četná vazebná místa se poměrně pevně vážou antigenní částice. Druhou složkou je rostlinný saponin. Směs těchto složek je možno sterilizovat varem, autoklávováním, radiačně nebo podle potřeby přidávkou antiseptik. Směs se připravuje v destilované vodě, ve fyziologickém roztoku nebo v puřrovaném fyziologickém roztoku, popřípadě přímo v roztoku antigenu.

Adjuvans s antigeny se v organismu pozvolna rozkládá a zajišťuje tak dlouhodobý adjuvantní účinek. Vyvolává imunitní odpověď, která je stejná nebo vyšší než u vakcín s olejovým adjuvans, a to bez nebezpečí vedlejších reakcí, ke kterým po olejových adjuvans někdy dochází, a vyšší než u adjuvans s hydroxidem hlinitým, po jehož aplikaci zůstávají rezidua hlíníku a poškození tkáně.

Titry dokumentující účinnost jsou uvedeny v příkladech.

Výhodně se vhodným poměrem kolagenové a saponinové složky využívá adjuvantního účinku v komplexním působení, jako důsledku depotního a imunostimulačního účinku.

Následující uvedené příklady ilustrují, ale neomezují předmět vynálezu.

#### Příklad 1

##### Příprava vodorozpustného kolagenu

30 kg nativní hovězí párkové kolagenní hmoty (Cutisin Jilemnice) se vložilo do baňky objemu 50 litrů, přidalo se 10 litrů destilované vody a za stálého míchání se rozpustilo při pokojové teplotě. Po dobu 2 hodin se sledovalo pH upravovalo se přidávkou 20 % hmot. hydroxidu sodného na hodnotu 7,0. Po ustálení pH se teplota zvýšila na  $37^{\circ}\text{C}$  a přidal se 1 g trypsinu (Bioveta Terezín). Teplota v nádobě se udržovala na  $37^{\circ}\text{C}$  za stálého míchání až do vymizení všech pevných částí kolagenu (12 h). Potom se teplota zvýšila po dobu 20 minut na  $80^{\circ}\text{C}$ , čímž došlo k inaktivaci trypsinu a proces krakování kolagenu se zastavil. Po vychladnutí se

roztok filtroval, rozplnil do pracovních nádob a stanovil se obsah kolagenu. Roztok, který obsahoval 7 % hmot. kolagenu, se ředěním upravil na 6 % hmot. roztok, který se použil k dalšímu zpracování.

#### Příklad 2

Příprava tekuté inaktivované vakciny proti infekční bovinní rinotracheitidě

Připravilo se 10 000 ml suspenze kmenů IBR v koncentraci  $1 \cdot 10^7/\text{cm}^3$  a smísilo se s 10 000 ml 6 % hmot. roztoku kolagenu připraveného podle příkladu 1. Přidalo se 60 g mydlicového saponinu (tj. do výsledné koncentrace 0,3 % hmot.) a konzervovalo se 2 g merthiolátu (tj. do výsledné koncentrace 0,01 % hmot.). Po homogenizaci se připravená vakcína rozplnila do lékovek. Vakcinační dávka pro skot byla  $5 \text{ cm}^3$  s revakcinací za 21 dní stejnou dávkou. Ověření takto připravené vakciny provedl VÚV Brno se závěrem, že její i.m. aplikace vyvolala tvorbu specifických protilátek, jejichž koncentrace v séru kulminovala za 5 týdnů po vakcinaci. Úroveň protilátkové odpovědi a její dynamika byla adekvátní imunitní reakci navozené aplikací vakcíny obsahující olejové adjuvans, avšak bez nepříznivých průvodních jevů.

Tab.č.1

| Druh adjuvans                    | Výsledný titr protilátek |
|----------------------------------|--------------------------|
| Olejová adjuvans                 | 45                       |
| Kolagenové adjuvans se saponinem | 48                       |

#### Příklad 3

Příprava lyofilizované vakciny proti infekční bovinní rinotracheitidě

Vakcína připravená podle příkladu 2 a rozplněná do lékovek se zamrazila na teplotu minus  $40^\circ\text{C}$  a byla zlyofilizována. Lékovky byly uzavřeny ve vakuu. Před použitím byl obsah lékovek doplněn destilovanou vodou na původní objem. Použití vakciny bylo stejné jako u příkladu 2 a stejné byly i výsledky (uvedené v tabulce č.1).

#### Příklad 4

Příprava tekuté vakciny proti moru a myxomatóze králíků

$10 \text{ cm}^3$  vhodné orgánové suspenze s obsahem inaktivovaného viru moru králíků se smíchalo s  $10 \text{ cm}^3$  roztoku obsahujícího:

- 3 % hmot. vodorozpustného kolagenu podle příkladu 1 (0,3 g)
- 0,30 % hmot. prvosenkového saponinu (0,03 g)
- 100 vakcinačních dávek viru myxomatózy MXT ( $1,8 \text{ cm}^3$ )
- voda do  $10 \text{ cm}^3$ .

Tím vzniklo  $20 \text{ cm}^3$  vakcíny, ve které byla jako adjuvans použita koncentrace kolagenu 1,5 % hmot. a saponinu 0,15 % hmot. Dávka pro jednoho králíka činila  $0,2 \text{ cm}^3$  perkutánně. Ověření takto připravené vakcíny bylo provedeno přímým průkazem účinnosti - čelenží - proti moru králíků a proti myxomatóze. Všichni vakcinovaní králíci přežili experimentální infekci, všichni kontrolní nevakcinovaní králíci uhynuli. Výsledek prokázal, že adjuvans potencuje účinek antigenu v tvorbě specifických protilátek proti moru králíků a současně proti myxomatóze stejně dobře jako dosud používaný gel hydroxidu hlinitého se saponinem, a to bez nepříznivých jevů poškozené tkáně a kůže v místě vpichu.

#### Příklad 5

Příprava vakcíny proti rota a korona infekcím novorozenečtěl

Smíchalo se  $280 \text{ cm}^3$  inaktivovaného rotaviru hodnoty RVK 1 : 16 s  $280 \text{ cm}^3$  inaktivovaného ko-

ronaviru s hemaglutinačním titrem 128. Přidalo se 200 cm<sup>3</sup> 6 % hmot. kolagenu podle příkladu 1 a 1,14 g kaštanového saponinu. Dále se přidalo 100 000 m.j. draselné soli G Penicilinu, 0,1 g síranu streptomycinu, 3 cm<sup>3</sup> 1 % hmot. roztoku fungicidinu a 2,5 cm<sup>3</sup> 10 % hmot. roztoku hydroxidu sodného. Vakcína byla rozplněna po 25 cm<sup>3</sup>. Jedna vakcinační dávka byla 2,5 cm<sup>3</sup>. V tomto případě adjuvans tvořil kolagen o koncentraci 1,5 % hmot. a saponin o koncentraci 0,15 % hmot.

Tato vakcína byla přezkoušena na pokusných zvířatech v porovnání s vakcinou s olejovým adjuvans s tímto výsledkem.

| Adjuvans                | Pokus<br>č. | Výsledné průměrné titry protilátek |                         |
|-------------------------|-------------|------------------------------------|-------------------------|
|                         |             | antirotavirové<br>ELISA            | antikoronavirové<br>HIT |
| Kolagen se<br>saponinem | 1           | 1 : 16                             | 1 : 128                 |
|                         | 2           | 1 : 16                             | 1 : 64                  |
| Olejové                 | 1           | 1 : 16                             | 1 : 64                  |
|                         | 2           | 1 : 8                              | 1 : 64                  |

Imunitní odpověď kolagenového adjuvans je stejná nebo vyšší jako po dosud používaném olejovém adjuvans a je bez vedlejších nežádoucích účinků.

#### PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Adjuvans pro virové vakcíny, vyznačující se tím, že obsahuje 1,5 až 4,5 % hmot. vodorozpustného štěpeného hovězího kolagenu o molekulové hmotnosti 30 000 až 40 000 a 0,15 až 0,30 % hmot. rostlinného saponinu.