



**POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA**



**URZĄD
PATENTOWY
PRL**

OPIS PATENTOWY

58475

Patent dodatkowy
do patentu: _____

Kl. 30 h, 6

Zgłoszono: 02. VIII. 1966 (P 115 898)

Pierwszeństwo: 13. VIII. 1965 Stany
Zjednoczone
Ameryki

MKP C 12 k 5/00

Opublikowano: 30. X. 1969

UKD

Właściciel patentu: Merck and Co., Inc., Rahway (Stany Zjednoczone Ameryki)

Sposób wytwarzania szczepionki przeciw śwince

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania szczepionki przeciw śwince, zawierającej osłabiony żywy wirus świnki. Na skutek osłabienia, wirus świnki zawarty w szczepionce nie wywołuje reakcji klinicznych lub wywołuje te reakcje tylko w niewielkim stopniu, natomiast w wysokim stopniu powoduje w ludzkim organizmie wytwarzanie przeciwciał przeciw wirusowi świnki i tym samym stanowi istotną ochronę przed infekcją wirusem i przed chorobą.

Świnkę, podobnie jak i odrę, zwykle traktuje się jako jedną z mniej poważnych chorób okresu dziecięcego. W typowym przypadku klinicznym tak jest istotnie. Jednak w przypadkach klinicznie nietypowych, konsekwencje infekcji wirusem świnki mogą być ciężkie, a następstwa choroby mogą być równie niszczące jak i w przypadku odrę z komplikacjami.

W typowym przypadku świnki ostry etap gorączkowy następuje po 18—21 dniowym okresie inkubacyjnym. Zasadniczymi objawami klinicznymi są: gorączka wraz z jednostronnym lub dwustronnym opuchnięciem przyusznym, a niekiedy i powikłania, obejmujące gruczoł podżuchwowy i gruczoł podjęzykowy.

Infekcji wirusem świnki zwykle towarzyszy wirurgia jak również mogą nastąpić powikłania w szeregu takich organów i układów jak epidymis, stercz, jajniki, wątroba, trzustka, śledziona, tarczyca, nerki, błędnik uszny, oczy, grasicca,

2

osierdzie, gruczoły piersiowe i centralny system nerwowy. Do najważniejszych objawów chorobowych należą: encephalitis, encephalomyelitis, zapalenie nerwów twarzowych, trójdzielczego lub ocznych, aseptyczne zapalenie opon mózgowych (0,5—10% przypadków), scleritis, pancreatitis prowadzące niekiedy do cukrzycy oraz architis lub ovaritis prowadzące niekiedy do atrofii i nieplodności. U dzieci poważne komplikacje występują rzadko. Znacznie groźniejsze niebezpieczeństwa towarzyszą infekcji u ludzi dorosłych, którzy uniknęli tej choroby w dzieciństwie.

Bezkomplikacyjna świnka u dzieci wyczerpuje i męczy rodziców i powoduje dłuższą absencję w szkole. Natomiast świnka z komplikacjami, zarówno w wieku dziecięcym jak i dorosłym może mieć zakres od lekkich dolegliwości z pozornym wyzdrowieniem, aż do zniszczenia i spowodowania niewydolności podstawowych systemów organizmu, co może spowodować śmierć lub trwałe kalectwo.

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania szczepionki przeciw śwince, zawierającej osłabiony żywy wirus świnki i powodującej powstawanie w organizmie ludzkim przeciwciał przeciw wirusowi świnki, bez równoczesnego wywoływania ciężkich objawów choroby. Sposób ten polega na tym, że zjadliwy wirus świnki izoluje się i prowadzi do przeprowadzając co najmniej 10, a korzystnie 15 kolejnych pasażów w zapłodnionych jajach

kurzych otoczonych skorupą, powodując stopniowe osłabienie wirusa, który następnie rozmnaża się w temperaturze 30—38°C w kulturze zawierającej tkankę 9—11-dniowego zarodka kurczęcia. W ostatniej fazie procesu z osłabionego, żywego wirusa wytwarza się szczepionkę.

Wyodrębnianie i adaptację zjadliwego wirusa do dalszej hodowli prowadzi się w kulturze z zarodka kurczęcia, stosując jako źródło wirusa materiał kliniczny, na przykład tampony z gardła osób chorych na świnkę lub wirus uprzednio hodowany w zapłodnionych jajach kurzych. Inkubację zakażonych kultur prowadzi się w temperaturze 30—34°C, korzystnie w temperaturze 32°C, albo w temperaturze 35—38°C, korzystnie 36°C. Typowe metody wyodrębniania są następujące. Metoda pierwsza polega na wyodrębnianiu wirusa w zapłodnionych jajach kurzych z materiału klinicznego, to jest od osób chorych na świnkę. Druga metoda polega na wyodrębnianiu wirusa w kulturze tkankowej z zarodka kurczęcia, w oparciu o materiał kliniczny.

Wyodrębniony i zidentyfikowany wirus świnki wprowadza się do szklanych kolb, zawierających kultury tkankowe z zarodka kurczęcia. Kultury te sporządza się z posiekanych i poddanych działaniu trypsyny, w przybliżeniu 10-dniowych zarodków kurczęcia. Środowiskiem kulturowym może być dowolne medium podtrzymujące wzrost komórek, na przykład tak zwane medium 199, z dodatkiem surowicy cielęcej. Medium 199, opisane szczegółowo w opisach patentowych Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 3 143 470 i nr 3 249 504, zawiera aminokwasy, witaminy, niebiałkowe czynniki wzrostowe, cukry i sole nieorganiczne oraz ewentualnie antybiotyki, na przykład penicylinę lub streptomycynę.

Po wprowadzeniu wirusa, zakażone kultury poddaje się inkubacji w kolejnych pasażach w temperaturze 30—38°C, w ciągu różnych okresów czasu, przy czym wirus rozmnaża się i ulega osłabieniu. Płyny zawierające wirus gromadzi się i przechowuje w stanie zamrożonym lub w temperaturze odpowiednio niskiej, aby zachować zakaźne właściwości preparatu. Kolejne pasaży przeprowadza się stosując rozcieńczony materiał zarodnikowy i w różnych okresach dokonując wielokrotnie zbiorów. Określanie siły działania zakaźnego przeprowadza się przy użyciu kultury HeLa albo kultury tkankowej z nerki małpy lub z zarodnika kurczęcia.

Stwierdzono, że wirus świnki zebrany po powtarzanym pasażu seryjnym nie działa patogenicznie na małpki i gryzonie, u ludzi nie wywołuje reakcji klinicznych lub reakcje te są bardzo słabe, natomiast powoduje znaczną produkcję przeciwciał. Działanie wirusa utrwała się za pomocą odpowiednich stabilizatorów takich jak sacharoza, albumina ludzka, glutamina, fosforany oraz ich mieszaniny. Po określeniu siły działania, partię hodowlaną rozdziela się do ampulek przeznaczonych do użytku. Produkt można przechowywać i rozprowadzać w stanie zamrożonym lub najkorzystniej w stanie liofilizowanym.

Wynalazek jest bliżej wyjaśniony w niżej podanych przykładach.

Przykład I. Materiał posiewowy otrzymuje się pierwszą z dwóch wyżej podanych metod. Dziewięć-jedenastodniowe zarodki kurczęcia pozbawia się głów i kończyn i drobno sieka w warunkach ściśle aseptycznych, po czym rozdrobnioną tkankę wielokrotnie przemywa się roztworem Hanks'a. Następnie przemytą tkankę poddaje się działaniu trypsyny w ciągu 2—3 godzin w temperaturze 36°C, przy czym stosuje się 0,25% trypsyny (Difco 1:250) w solankowym roztworze buforowym. Zawieszinę trypsynowanych komórek filtruje się przez sterylne płótno serowarskie o dwóch gęstościach i następnie odwirowuje w ciągu 5 minut przy 1500 obr/min.

Zebrane komórki ponownie przeprowadza się w stan zawiesiny w medium wzrostowym, w celu ich policzenia. Jako medium wzrostowe stosuje się medium 199 z dodatkiem 2% gamma — surowicy cielęcej, ogrzanej do temperatury 56°C w ciągu 30 minut 50 mcg/ml neomycyny. Kultury w szklanych kolbach hodzi się przy zawartości 350 000 zdolnych do życia komórek w 1 ml. Po 48—72, a korzystanie po 60 godzinach inkubacji w temperaturze 36°C, kultury te można użyć do pasażu seryjnego lub do wytwarzania szczepionki.

Kultury oparte na tkance z zarodka kurczęcia sporządza się w szklanych kolbach stosując jako medium wzrostowe medium 199, zawierające 2% pozbawionej aktywności surowicy cielęcej. Po upływie 3—4 dni od rozpoczęcia hodowli, odciąga się medium wzrostowe aseptycznie, przemywa kultury czterokrotnie roztworem Hanks'a w porcjach po 100 ml i szczepi, stosując 2,5 ml rozcieńczonej kultury posiewowej wirusa świnki na 1 kolbę. Następnie dodaje się 70 ml medium 199 zawierającego 10% odpowiedniego środka stabilizującego działanie zakaźne wirusa, po czym kultury poddaje się inkubacji w temperaturze 32°C.

Do medium wzrostowego i podtrzymującego wprowadza się neomycynę w takiej ilości, aby jej stężenie wynosiło 50 mcg/ml. Wielokrotnych zbiorów dokonuje się w odstępach 2—4-dniowych, przy czym kultury zasila się świeżą pożywką podtrzymującą, która zawiera wyżej wspomniany stabilizator. Przeprowadza się 10 kolejnych pasaży, wszystkie w temperaturze około 32°C. Oznaczanie działania zakaźnego dokonuje się w kulturze HeLa lub tkankowej z nerki małpy. Każdy zbiór gromadzi się w warunkach aseptycznych w sterylnym zbiorniku i pobiera próbki w celu sprawdzenia sterylności mikrobiologicznej zaś pozostałość zamraża w mieszaninie oziębiającej suchy lód — alkohol. Przed selekcją zbioru lub zbiorów dla sporządzania szczepionki płyny zawierające wirus przechowuje się w temperaturze —70°C w elektrycznej zamrażarce.

Selekcji tej dokonuje się po zebraniu wyników z określania działania zakaźnego, wytypowany materiał wyjmuje się z zamrażarki i doprowadza do odtajania, po czym pobiera się próbkę do badania kontrolnego i określenia czy materiał jest bezpieczny. Resztę płynu klaruje się i ponownie

pobiera próbkę do sprawdzenia na małpach czy materiał jest bezpieczny. Z kolei do płynu dodaje się dodatkowego odpowiedniego stabilizatora, rozlewa do osobnych fiolek i suszy. Po zakończeniu suszenia, fiołki kapsluje się i uszczelnia. Szczepionkę odtwarza się przez dodanie do fiołki sterylnej wody.

Próby na ludziach. Dawkę szczepionki zawierającej osłabiony wirus świnki otrzymało pozajelitowo około 150 dzieci, które uprzednio nie chorowały na świnkę. W ciągu miesiąca od szczepienia wszystkie dzieci zareagowały wyraźnym odczynem przeciwciałowym. Przy tym w zależności od szczepu wirusa świnki i ilości pasażu w zapłodnionych kurzych jajach lub w kulturze tkankowej zarodka kurczęcia, u dzieci wystąpiły bardzo słabe objawy kliniczne choroby lub w ogóle objawy te nie wystąpiły.

Przykład II. Powtarza się tok postępowania opisany w przykładzie I z tym, że inkubację przeprowadza się w temperaturze 36°C.

Przykład III. Postępuje się w sposób podany w przykładzie I, lecz stosując posiew wirusa świnki otrzymany drugą z wyżej opisanych metod.

W celu osłabienia wirusa można dokonać więcej lub mniej pasażu wirusa w kulturze tkankowej z zarodka kurczęcia. Można również przeprowadzić to seryjnymi pasażami w zapłodnionych jajach kurzych. Taki tok postępowania ilustrują poniższe przykłady, w których ZJK oznacza zapłodnione jaja kurze, zaś KTZK oznacza kulturę opartą na tkance zarodka kurczęcia. Szczególnie dobre wyniki uzyskuje się w warunkach podanych w przykładach Va i Vb.

Przykład IV. 3 ZJK w temperaturze 36°C + 1 KTZK w temperaturze 36°C.

Przykład V. 10 ZJK w temperaturze 36°C + 10 KTZK w temperaturze 36°C.

Przykład Va. 10 ZJK w temperaturze 36°C + 2 KTZK w temperaturze 36°C.

Przykład Vb. 15 ZJK w temperaturze 36°C + 2 KTZK w temperaturze 36°C.

Przykład VI. 20 ZJK w temperaturze 36°C + 2 KTZK w temperaturze 36°C.

Przykład VII. Bezpośrednie wyodrębnienie z KTZK w temperaturze 36°C + 1 KTZK w temperaturze 32°C.

Przykład VIII. Bezpośrednie wyodrębnienie z KTZK w temperaturze 36°C + 10 KTZK w temperaturze 32°C.

Przykład IX. Bezpośrednie wyodrębnienie z KTZK w temperaturze 36°C + 1 KTZK w temperaturze 36°C.

Przykład X. Bezpośrednie wyodrębnienie z KTZK w temperaturze 36°C + 10 KTZK w temperaturze 36°C.

W celu osłabienia wirusa świnki szczególną uwagę poświęcono w niniejszym opisie dziesięciu pasażom seryjnym poprzez KTZK, lecz zrozumiałym jest, że dla osłabienia wirusa wystarczyć może także i mniejsza liczba pasażu. Również pojedyncza inkubacja w KTZK pozwala uzyskać wirus, który w organizmie ludzkim wywołuje produkcję przeciwciał z jednoczesnym obniżeniem symptomów choroby. Kolejne pasażu po pierwszej hodowli w KTZK powodują dalsze osłabienie wirusa.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania szczepionki przeciw śwince, zawierającej osłabiony żywy wirus świnki, **znamienny tym**, że zjadliwy wirus świnki hodzi się przeprowadzając co najmniej 10 kolejnych pasażu w zapłodnionych jajach kurzych, co powoduje stopniowe osłabianie wirusa, a następnie rozmnaża się go w temperaturze 30—38°C, w kulturze zawierającej tkankę 9—11-dniowego zarodka kurczęcia.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że przeprowadza się 15 kolejnych pasażu zapłodnionych jajach kurzych i dwukrotny zabieg rozmnażania w kulturze zawierającej tkankę zarodka kurczęcia.