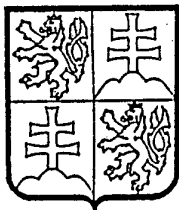


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA

(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

PATENTOVÝ SPIS 276 109

(21) Číslo přihlášky : 104-90.G

(22) Přihlášeno : 08 01 90

(30) Prioritní data :

(13) Druh dokumentu : B 6

(51) Int. Cl.⁵ :
A 61 K 39/05

(40) Zveřejněno : 16 07 91

(47) Uděleno : 21 02 92

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku : 15 04 92

(73) Majitel patentu : BEDNÁŘ MAREK MUDr.CSc.,
SRBOVÁ HANA PhMr.CSc., PRAHA

(72) Původce vynálezu : BEDNÁŘ MAREK MUDr.CSc.,
SRBOVÁ HANA PhMr.CSc., PRAHA

(54) Název vynálezu : Způsob stabilizace lyofilizované vakciny
z kmene *Propionibacterium acnes* 26/78

(57) Anotace :

Způsob stabilizace lyofilizované vakciny *Propionibacterium acnes* 26/78 spočívá v homogenizaci suspenze bakterinu *Propionibacterium acnes* 26/78 s antiseptikem, glycinem a lidským albuminem, přičemž hmotnostní poměr sušiny suspenze bakterinu a lidského albuminu činí 1 : 2,85 až 5 a hmotnostní poměr glycinu a lidského albuminu činí 1 : 2 až 4 a vzniklá směs se doplní vodou pro injekce v hmotnostním poměru k sušině bakterinu 55 až 60 : 1, načež se tato směs podrobí lyofilizaci.

Vynález se týká způsobu stabilizace lyofilizované vakciny z kmene *Propionibacterium acnes* 26/78.

Při přípravě lyofilizovaných vakcin se používají stabilizátory nejrozličnějšího složení. Zpravidla jde o některé cukry, například sacharózu, dále se používá želatina nebo hovězí albumin. Množství přidávané stabilizující příměsi je různé. Často se používá více různých látek k dosažení žádoucího stabilizujícího účinku. Jejich poměr se stanovuje empiricky individuálně pro jednotlivá různá léčiva.

Lyofilizovaná vakcína *Propionibacterium acnes* musí obsahovat kromě účinné látky a konzervační přísady také příměs vhodného stabilizátoru, který zajistí dobrý vzhled konečného výrobku, jeho dobrou rozpustnost a dlouhodobou stabilitu. Pro nově vyvíjenou vakcínu *Propionibacterium acnes* 26/78 byly zkoušeny různé stabilizátory a jejich směsi. Výsledky byly proměnlivé. Největším nedostatkem byla špatná rozpustnost výrobku a jeho krátkodobá stabilita. Z firemní literatury je znám způsob stabilizace obdobné vakciny přidáním glycinu v koncentraci 2,3 % hmot. Tento způsob stabilizace má však za následek nedokonalou rozpustnost lyofilizátu a pokles stability přípravku při pokojové teplotě.

Tyto nedostatky odstraňuje způsob stabilizace lyofilizované vakciny *Propionibacterium acnes* 26/78 podle vynálezu. Jeho podstata spočívá v tom, že se kultura po fermentaci a tepelné inaktivaci, bakterin *Propionibacterium acnes* 26/78, zhomogenizuje s antiseptikem, glycinem a lidským albuminem, přičemž hmotnostní poměr sušiny bakterinu a lidského albuminu činí 1 : 2,85 až 5 a hmotnostní poměr glycinu a lidského albuminu činí 1 : 2 až 4 a vzniklá směs se doplní vodou pro injekce v hmotnostním poměru k sušině bakterinu 55 až 60 : 1. Jako antiseptikum je vhodné použít merthiolát sodný. Po přidání antiseptika a stabilizačních přísad k suspenzi bakterinu se směs podrobí lyofilizaci.

Tyto stabilizační přísady přidané v určeném poměru chrání jednotlivé lyofilizované buňky před vzájemným slepením. Použitím lidského albuminu je docíleno úplné rozpustnosti lyofilizátu a dlouhodobé stability přípravku při pokojové teplotě. To umožňuje skladování přípravku i mimo ledničku bez nebezpečí ztráty účinku. Použitím lidského albuminu nevzniká u léčených osob nebezpečí sensibilizace.

Lyofilizovaná vakcína *Propionibacterium acnes* 26/78 stabilizovaná způsobem podle vynálezu se vyznačuje těmito vlastnostmi:

- rozpustnost do 1 minuty po přidání fyziologického roztoku
- rozpuštěná vakcína je zcela homogenní i při mikroskopickém zkoumání; mikroskopický vzhled rozpuštěné vakciny je shodný se vzhledem téže vakciny před lyofilizací
- biologická aktivita vakciny je na velmi dobré úrovni
- všechny výše uvedené vlastnosti se nemění ani po 20 měsících skladování lyofilizované vakciny při teplotě 37 °C.

Způsob stabilizace lyofilizované vakciny z kmene *Propionibacterium acnes* 26/78 je blíže objasněn na následujících příkladech.

Příklad 1

Kultivace *Propionibacterium acnes* 26/78 byla ukončena po dosažení stacionární fáze růstové křivky, poté se teplota fermentační nádoby zvýšila na 60 °C po dobu 1 h a následně zchlazena na pokojovou teplotu. Získaný bakterin byl centrifugován, promyt destilovanou vodou a resuspendován v destilované vodě.

Způsob stabilizace 1. účinného bakterinu připraveného z kmene *Propionibacterium acnes* 26/78 probíhal následovně. Množství jednotlivých složek směsi před lyofilizací: bakterin 7 mg suché hmotnosti, merthiolát sodný 0,04 mg, glycin 9,2 mg. Směs byla doplněna do 400 mg vodou pro injekce. Merthiolát sodný je přidáván jako antiseptikum. Směs byla lyofilizována do zbytkové vlhkosti 2,1 % hmot., zatavena v atmosféře dusíku a skladována při 37 °C.

Sledování kvality stabilizované lyofilizované vakcíny z kmene *Propionibacterium acnes* 26/78 probíhalo v časovém úseku 12 měsíců hodnocením doby rozpustnosti lyofilizátu v sekundách (R), maximálního počtu bakterií v mikroaglutinátech (A) a relativní imunostimulační aktivity v % (I) vztaženo k počáteční hodnotě (M=0).

Hodnocení kvality vakcíny stabilizované způsobem 1.

M	0	1	3	6	12
R	12	30	30	30	35
A	20	50	100	100	100
I	100	101	96	80	84

kde M je délka skladování v měsících.

Příklad 2

Při kultivaci bylo postupováno stejně jako v příkladu 1. Stabilizace byla provedena způsobem podle vynálezu. Způsob stabilizace před lyofilizací 2. spočíval v homogenizaci účinného bakterinu připraveného z kmene *Propionibacterium acnes* 26/78 v množství 7 mg suché hmotnosti, merthiolátu sodného jako antiseptické přísady v množství 0,04 mg, 9,2 mg glycinu a 25 mg lidského albuminu. Ostatní podmínky lyofilizace, skladování i hodnocení stabilizované vakcíny byly shodné s příkladem 1.

Hodnocení kvality vakcíny stabilizované způsobem 2.

M	0	1	3	6	12
R	30	25	30	30	30
A	5	5	5	5	15
I	100	105	104	99	101

kde M je délka skladování v měsících

R - doba rozpustnosti lyofilizátu v sekundách

A - maximální počet bakterií v mikroaglutinátech

I - relativní imunostimulační aktivita v %
vztaženo k počáteční hodnotě (M=0)

Příklad 3

Bylo postupováno shodně jako v příkladu 2. Stabilizace byla provedena způsobem 3. podle vynálezu s tím, že směs před lyofilizací obsahovala 35 mg lidského albuminu. Ostatní podmínky byly shodné s příkladem 2.

Hodnocení kvality vakcíny stabilizované způsobem 3.

M	0	1	3	6	12
R	40	35	40	40	35
A	5	5	5	5	15
I	100	97	102	106	103

kde M je délka skladování v měsících

R - doba rozpustnosti lyofilizátu v sekundách

A - maximální počet bakterií v mikroaglutinátech

I - relativní imunostimulační aktivita v %
vztaženo k počáteční hodnotě (M=0)

Příklad 4

Bylo postupováno stejně jako v příkladu 1. Způsob stabilizace 4. spočíval v homogenizaci směsi sestávající se z 7 mg suché hmotnosti účinného bakterinu připraveného z kmene *Propionibacterium acnes* 26/78, merthiolátu sodného jako antiseptické přísady v množství 0,04 mg a 35 mg lidského albuminu. Ostatní podmínky byly shodné.

Hodnocení kvality vakciny stabilizované způsobem 4.

M	0	1	3	6	12
R	120	140	180	180	180
A	5	10	5	10	20
I	100	89	103	93	92

kde M, R, A a I mají význam jako v předchozích příkladech.

Z hodnocení vyplývá, že způsob stabilizace 1., kdy homogenizovaná směs před lyofilizací neobsahovala lidský albumin má za následek sice dobrou rozpustnost, ale problémy při skladování, kdy dochází k poklesu imunostimulační aktivity. Způsobem stabilizace 4., kdy homogenizovaná směs neobsahuje glycin, se získá vakcína, jejíž kvalita se skladováním podstatně nemění, ale lyofilizát je velmi špatně rozpustný. Tyto vlastnosti uvádí do souladu způsob stabilizace lyofilizované vakciny 2., 3. podle vynálezu.

Způsob stabilizace lyofilizované vakciny *Propionibacterium acnes* 26/78 podle vynálezu je určen pro přípravu léčiva vyráběného z kmene *Propionibacterium acnes*. Lze jej však využít i pro přípravu obdobných korynebakterilních vakcín z jiných kmenů.

P A T E N T O V É M Á R O K Y

Způsob stabilizace lyofilizované vakciny *Propionibacterium acnes* 26/78 přidavkem antiseptika a glycinu k bakterinu, vyznačující se tím, že se suspenze bakterinu *Propionibacterium acnes* 26/78 zhomogenizuje s antiseptikem, glycinem a lidským albuminem, přičemž hmotnostní poměr sušiny suspenze bakterinu a lidského albuminu činí 1 : 2,05 až 5 a hmotnostní poměr glycinu a lidského albuminu činí 1 : 2 až 4 a vzniklá směs se doplní vodou pro injekce v hmotnostním poměru k sušině bakterinu 55 až 60 : 1, načež se tato směs podrobí lyofilizaci.