



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

258922

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.⁴

A 61 K 35/56

(22) Přihlášeno 16 09 85

(21) PV 6552-85

(40) Zveřejněno 15 02 88

(45) Vydáno 14 04 89

(75)

Autor vynálezu

KUDRNA KAREL RNDr., PROKOPIČ JAN, člen korespondent, ČESKÉ BUDĚJOVICE

(54) Vakcína proti infekci vyvolané tasemnicí *Taenia crassiceps* a způsob její výroby

Řešení se týká vakcíny proti infekci vyvolané parazitickým helmintem druhu *Taenia crassiceps* a způsobu její výroby. Tato vakcína obsahuje suspenzi živých buněk larválních stadií této tasemnice ve fyziologickém roztoku v množství 10^4 až 10^6 v 1 ml. Způsob výroby spočívá v tom, že se larvy *Taenia crassiceps* promývají minimálně 1x fyziologickým roztokem, homogenizují se tak, aby larvy praskaly a uvolnila se měchýřková tekutina, potom se larvy dále homogenizují a nebo protlačují kovovým sítem tak, aby se uvolnily jednotlivé buňky, buněčná suspenze se minimálně 1x promývá fyziologickým roztokem a koncentrace živých buněk se upraví na 10^4 až 10^6 /ml.

Vynález se týká vakcíny proti infekci vyvolané tasemnicí *Taenia crassiceps* a způsobu její přípravy.

Výzkum terapie infekcí způsobených parazitickými helminty probíhá v několika směrech. Za poslední desetiletí byla provedena řada pokusů o vyvinutí účinných a bezpečných vakcín, avšak těžiště současné terapie spočívá stále na chemoterapii. Intenzivní výzkum látek synteticky připravených vede k postupnému odstraňování vedlejších účinků na hostitele a k stále vyššímu stupni účinnosti.

Jedním z nejmodernějších prostředků pro léčení parazitárních infekcí je paraziquantel - (2-cyklohexylkarbonyl)-1,2,3,6,7,11b-hexahydro-2-pyrazino(2, 1a)isoquinolin-4, s nepatrnými vedlejšími účinky (Nash T. E. a kol., Am. J. Trop. Med. Hyg., 1982, 31, 977-982). V krátké době po podání se látka kumuluje v parazitujícím organismu (Xiao, S. H. a kol., Acta Pharmacol. Sinica, 1981, 2, 204-211) a její účinnost je téměř 100% prakticky u všech druhů parazitických helmintů.

Množství dalších chemoterapeutik se liší v účinnosti na jednotlivé druhy helmintů a v toxicitě pro hostitelský organismus.

Přes vysokou účinnost chemoterapie však existuje celá řada důvodů pro výzkum a vývoj vakcín. Nevýhodou chemoterapeutik je, že lze léčit až v okamžiku, kdy se infekce projeví klinicky. Od okamžiku invaze až po manifestaci klinických symptomů onemocnění však uplyne určitá doba, v průběhu které paraziti poškozuji hostitelský organismus, snižují užitek hospodářských zvířat apod. (Dela Cruz B. a kol., Proc of Symp. Vienna, 29 June - 3 July 1981 (AIEA, FAO, UNEP), International Atomic Agency, Vienna, 1982, 127-133).

Byly popsány případy inoperabilní hydatidosy léčené chemoterapeuticky, kde došlo k prasknutí cysty a k alergické reakci. Rovněž chirurgické zákroky u hydatidosy mnohdy končí fatálně. Pacienti se pomalu zotavují a v některých případech nejsou schopni vykonávat původní práci. Velmi obtížně léčitelné jsou neurocysticerkózy a intraokulární cysticerkózy, doprovázené často komplikacemi - epilepsie, vysoký krevní tlak atd.

Dalším problémem spojeným s chemoterapií je opakování infekce. Byla např. sledována reinfekce pasoucích se telat helminty rodu *Cooperia*, *Oesophagostomum*, *Haemonchus*, *Bunostomum*, a *Trichostrongylus* po léčení tetramisol hydrochloridem a febendazolem a bylo zjištěno, že přibližně po 6 týdnech byl stupeň infekce u léčených telat stejný jako u neléčených (Lima W. a kol., Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnica, 1983, 35, 101-112). Dalším ze závažných problémů při použití chemoterapie je schopnost helmintů stát se rezistentními na anthelmintika (Dias L. C. a kol., Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 1982, 76, 652-659).

Další vývoj vakcín, schopných zabránit vývoji parazitů v ranném stádiu má proto svoje opodstatnění. Příprava vakcín je však u helmintů komplikována komplexností parazitárního organismu, antigenními změnami v průběhu ontogeneze a také nedostatkem výchozího materiálu. Dosud používané vakcíny lze, podle použitého imunogenu, rozdělit na dvě skupiny:

1) Vakcinace celým parazitárním organismem a 2) vakcinace antigeny. V prvním případě byly vyzkoušeny vakcíny připravené z živých, a nebo zářením inhibovaných červů. Použití živých, neinhibovaných červů je výhodné z hlediska nezměněných povrchových antigenů a je velmi účinné. Bylo zjištěno např. že myši, kterým byly subkutánně implantovány 3 živé larvy tasemnice *Taenia crassiceps* až v 99 % případů byly rezistentní proti sekundární infekci (Siebert A. E. Jr. a kol., Int. J. Parasitol., 1978, 8, 39-43).

Rovněž byla implantována subkutánně živá vajíčka tasemnice *Taenia pisiformis* a bylo zjištěno, že sekundární infekce byla likvidována téměř ve 100 % případů. Nevýhoda těchto způsobů vakcinace je, že celé larvy nebo vajíčka helmintů použita jako imunizační prostředek

se vyvíjejí a mohou infikovat celý hostitelský organismus. Z těchto důvodů byli paraziti předem ozařováni buď x-paprsky nebo ultrafialovým zářením. Účinnost těchto vakcín je v průměru 80% (Urban J. F. Jr., Tromba F. G., Vet. Immunol. Immunopathol., 1982, 3, 399-409).

Podobných výsledků bylo dosaženo použitím antigenů ať už ve formě hrubého homogenátu parazitárního organismu a nebo antigenů purifikovaných. Poměrně vysoké účinnosti, kolem 80%, bylo dosaženo aplikací antigenů uvolňovaných do kultivačního média a při in vitro kultivaci onkosfér *T. ovis* a larev *T. saginata* (Rickard M. D., Fourth. Inter. Congr. Parasit., Section C, 1978, 134-135).

Nevýhody dosud používaných způsobů terapie lze shrnout takto:

A. Chemoterapie.

- 1) Vedlejší účinky chemoterapeutik na hostitele.
- 2) Poškození hostitele způsobené vyvíjejícími se parazity.
- 3) Opakující se infekce.

B. Vakcinace.

- 1) Při použití živých neinhibovaných vajíček nebo larev dochází k jejich vývoji de facto infekci.
- 2) Při použití ozařených vajíček nebo larev pro imunizaci je vakcína méně účinná.
- 3) Při použití antigenů je účinnost také nižší.

Tyto nevýhody odstraňuje vakcína proti infekcím vyvolaným tasemnicí *Taenia crassiceps*, jejíž podstatou je, že obsahuje suspenzi živých buněk larválních stádií tasemnice ve fyziologickém roztoku v množství 10^4 až 10^6 buněk v 1 ml. Suspenze buněk ve fyziologickém roztoku se aplikuje injekčně do peritoneální dutiny nebo intramuskulárně, nebo subkutánně.

Podstatou způsobu přípravy je, že se larvy nebo dospělí jedinci *Taenia crassiceps* promývají minimálně 1x fyziologickým roztokem, protlačují kovovým sítem tak, aby se uvolnily jednotlivé buňky, buněčná suspenze se minimálně 1x promývá fyziologickým roztokem a koncentrace živých buněk se upravuje na 10^4 až 10^6 buněk na mililitr.

Výhody navrhovaného postupu jsou zejména tyto:

- 1) Antigeny na povrchu buněk jsou v nezměněné podobě.
- 2) Nemůže dojít k infekci, protože z těchto buněk se paraziti nemohou vyvinout.
- 3) Odpadají nároky na ozařovací zařízení.
- 4) Odpadají nároky na zařízení pro purifikaci antigenů.
- 5) Buňky lze využít také pro diagnostiku.

Dále je uveden příklad způsobu výroby a použití prostředku dle vynálezu.

P ř í k l a d L

Larvy tasemnice *Taenia crassiceps* byly vymyty z peritoneální dutiny fosfátovým fyziologickým roztokem (PBS) a homogenizovány ve skleněném homogenizátoru tak, že larvy popraskaly a uvolnila se z nich měchýřková tekutina. Suspenze byla 5x promyta PBS, zbytky larev byly protlačeny ocelovým sítem (100 mesh). Uvolněné buňky byly 3x promyty PBS a jejich koncentrace upravena na 10^5 živých buněk/ml.

Tento vzorek byl použit u myši kmene NIH ve stáří 6 až 10 týdnů (samice), které byly imunizovány intraperitoneálně. V nultý den byly myši kontrolní skupiny injikovány pouze PBS. Další dvě skupiny myši byly imunizovány živými buňkami v koncentraci 10^4 /myš.

Po 14 dnech byly kontrolní myši injikovány PBS a dále jedna z experimentálních skupin byla imunizována živými buňkami v koncentraci 10^4 a druhá 10^5 buněk na myš. 28. den byly všechny myši všech tří skupin infikovány 3 larvami tasemnice *Taenia crassiceps*. Počty larev byly stanoveny 2 měsíce po invazi.

Experimentální výsledky jsou uvedeny v následující tabulce:

1. skupina		2. skupina		3. skupina	
myš č.	PBS	myš č.	10^4	myš č.	10^5
1	339	6	202	11	0
2	110	7	0	12	0
3	494	8	147	13	0
4	257	9	0	14	27
5	322	10	0	15	0

a - počty larev

PBS - kontroly injikované pouze PBS a poté infikovány 3 larvami

10^4 - myši imunizované 10^4 buněk/myš.

10^5 - myši imunizované 10^5 buněk/myš.

Z tabulky je patrné, že zvýšenou dávkou živých buněk se zvyšuje účinnost vakcíny.

V tabulce 2 jsou shrnuty výsledky experimentů, ve kterých byly imunizovány myši proti infekci *Taenia crassiceps*. Vzhledem k použitému kmeni myši (outbrední ICR myši, samice, ve stáří 6 až 10 týdnů) a jejich vyšší odolnosti proti infekci, byly počty larev kontrolovány až 3 měsíce po infekci. Myši skupiny 3 a 4 byly imunizovány stejně jako v prvním experimentu (viz. text k první tabulce), myši skupiny 2 byly imunizovány antigenem z larev *T. crassiceps* (hrubý homogenát, lyofilizovaný) a myši skupin 5 až 7 byly injikovány zvýšenou dávkou 5×10^5 a 10^6 buněk/myš. Kromě toho byly myši skupiny 6 imunizovány subkutánně a myši skupiny 7 intraskulárně.

T a b u l k a 2

Počty nalezených larev v outbredních myších kmene ICR 3 měsíce po infekci.

Skupina	Počet myší	Imunizační dávka	Počet inf. myší	Počet larev
1	13	2xPBS	5	30+18
2	10	0,2 a 1 mg	2	1 430
3	13	2×10^4	3	13+10
4	24	10^4 , 10^5	3	20+10
5	18	10^4 , 10^6	0	0
6	11	10^4 , 5×10^5	0	0
7	5	10^4 , 5×10^5	0	0

Z výsledků vyplývá, že imunizační postup použitý u skupin 5 až 7 je optimální, neboť 100 % myší bylo úplně rezistentních proti infekci.

P R E D M Ě T V Y N Á L E Z U

1. Vakcína proti infekci vyvolané parazitickým helmitem druhu *Taenia crassiceps* vyznačující se tím, že obsahuje suspenzi živých buněk tasemnice ve fyziologickém roztoku v množství 10^4 až 10^6 v 1 ml.

2. Vakcína podle bodu 1, vyznačující se tím, že se použijí živé buňky larválních stádií nebo dospělých jedinců tasemnice.

3. Způsob přípravy vakcíny podle bodu 1, vyznačující se tím, že se larvy nebo dospělí jedinci *Taenia crassiceps* promývají minimálně 1x fyziologickým roztokem, homogenizují se tak, aby larvy popraskaly a uvolnila se měchýřková tekutina, potom se larvy dále homogenizují a nebo protlačují kovovým sítím tak, aby se uvolnily jednotlivé buňky, buněčná suspenze se minimálně 1x promývá fyziologickým roztokem a koncentrace živých buněk se upraví na 10^4 až 10^6 /ml.

4. Způsob přípravy podle bodu 3 se vyznačuje tím, že se larvy protlačují ocelovým sítím o velikosti ok 100x100 μ m.

5. Způsob přípravy podle bodu 3 vyznačující se tím, že se larvy protlačují bronzovým sítím o velikosti ok 100x100 μ m.

6. Způsob přípravy podle bodu 3 vyznačující se tím, že na promývání se použije fosfatový roztok.

7. Způsob přípravy podle bodu 3 až 6 vyznačující se tím, že případné zbytky larvální tkáně se odstraní filtrací nebo centrifugací.