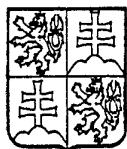


ČESKÁ
A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ
ÚŘAD PRO
VYNÁLEZY

(21) Číslo přihlášky: **1814-91**
(22) Přihlášeno: 13. 06. 91
(40) Zveřejněno: 16. 12. 92
(47) Uděleno: 31. 12. 92
(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 17. 03. 93

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁵:
A 61 K 39/05
A 61 K 39/085

(73) Majitel patentu:
Lékařská fakulta UP, Olomouc, CS;

(72) Původce vynálezu:
Koukalová Dagmar MUDr., Olomouc, CS;
Hájek Václav doc. MUDr. CSc., Olomouc,
CS;
Malota Horymír doc. MUDr. CSc., Olomouc,
CS;
Horák Vladimír ing., Olomouc, CS;

(54) Název vynálezu:
**Vakcína k prevenci, profylaxi a terapii
infekčních onemocnění kostí**

(57) Anotace:
Vakcína, určená k prevenci a profylaxi
infekčních komplikací ortopedických operací,
především při zavedení endoprotézy kyčelního
kloubu a k léčbě vleklých zánětů kostní dřeně,
obsahuje 3 kmeny *Staphylococcus aureus* s 3
kmeny *Propionibacterium acnes* v hmot. pomě-
ru 1:1, přičemž podíl obsahu jednotlivých
komponent se liší nejvýše o 10 %.

Oblast techniky

Vynález se týká bakteriální vakciny, obsahující kmeny *Staphylococcus aureus* a *Propionibacterium acnes*. Vakcína je určena svou specifickou i nespecifickou imunostimulační aktivitou k prevenci a profylaxi infekčních komplikací kostních a kloubních operací, především zavedení endoprotéz kyčelního kloubu, a k léčbě vleklých zánětů kostní dřeně.

Dosavadní stav techniky

U ortopedických operací sterilních onemocnění kostí se profylakticky používají antibiotika. Jsou ekonomicky náročná. Jejich účinky jsou krátkodobé, často potlačují imunitní odpověď organismu a vyvolávají vedlejší nežádoucí změny.

V léčbě infekčních onemocnění kostí se většinou kombinují antibiotika s chirurgickým výkonem. Tento postup, často i opakovaně prováděný, není vždy efektivní a potom je nutné přistoupit k amputaci končetiny. U postižených dochází ke změnám společenského postavení (invalidní důchod, nové rodinné a sociální poměry, psychická alterace a podobně), které ve svém důsledku vedou k dalším ekonomickým ztrátám.

Podstata vynálezu

Vakcína podle vynálezu upravuje specifickou reaktivitu na *Staphylococcus aureus* představující nejčastější etiologické agens zánětů kostní dřeně. Kmeny *Propionibacterium acnes* působí jako adjuvans, stimulují i nespecifickou složku imunity především v oblasti monocytomakrofágového systému.

Vakcína obsahuje 3 kmeny druhu *Propionibacterium acnes* (PA 3, PA 17, PA 530) v neomezeném hmot. poměru a 3 kmeny druhu *Staphylococcus aureus* (SAX 44, SAX 52, SAX 63) v neomezeném hmot. poměru. Druhoví směsi jsou zastoupeny v hmot. poměru 1:1.

Použití vakciny k prevenci a profylaxi infekčních komplikací ortopedických operací je ekonomicky méně náročné, její příznivý efekt je dlouhodobý a bez nežádoucích vedlejších účinků.

Vakcína při terapii vleklých zánětů kostní dřeně účinně doplňuje dosavadní způsob léčby a výrazně snižuje počet radikálních amputací. Podávání antibiotik u vakcinovaných pacientů je omezeno na krytí nezbytných chirurgických výkonů (nejčastěji odstranění sekvestrů).

Vakcína podle vynálezu se dá použít ve zdravotnictví. V humánní medicíně je určena k prevenci a profylaxi infekčních komplikací ortopedických operací a k léčbě vleklých zánětů kostní dřeně.

Vakcína se s výhodou aplikuje perorálně například ve formě enterosolventních dražé nebo kapslí, popřípadě kapek. Aplikační formy se připravují tak, aby jedna denní dávka obsahovala 5 mg bakteriální směsi nebo poloviční množství v aplikačních formách pro děti.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Bakteriální kmeny *Staphylococcus aureus* č. SAX 44, SAX 52, SAX 63 byly kultivovány celofánovou technikou na krevním agaru při 37 °C po dobu 24 h, ve vzdušné atmosféře obsahující 10 % CO₂.

Bakteriální těla byla po pomnožení spláchnuta destilovanou vodou a dezintegrována opakovaným hlubokým zmrazováním. Získaný lyzát byl inaktivován zahřátím na teplotu 60 °C po dobu 1 h, nejméně 3x v intervalu 24 h. Po kontrole sterility byl veškerý materiál lyofilizován.

Bakteriální kmeny *Propionibacterium acnes* č. PA 3, PA 17, PA 530 byly kultivovány celofánovou technikou na VL agaru s 10 % beraní krve po dobu 48 h při 37 °C, v dusíkové atmosféře s 10 % CO₂. Po pomnožení byla bakteriální těla spláchnuta a extrahována destilovanou vodou 24 h při 4 °C. Získaný bakteriální lyzát byl inaktivován zahřátím na teplotu 60 °C po dobu 1 h, opakovaně nejméně 3x v intervalu 24 h. Po kontrole sterility byl veškerý materiál lyofilizován.

Finální forma vakcíny byla připravena:

- I. 1. Smícháním sušin kmenů *Staphylococcus aureus* č. SAX 44, SAX 52, SAX 63 v hmot. poměru 1:1:1.
2. Smícháním sušin kmenů *Propionibacterium acnes* č. PA 3, PA 17, PA 530 v hmot. poměru 1:1:1.
- II. Smícháním sušin 1. a 2. v hmot. poměru 1:1.

Příklad 2

Bakteriální kmeny *Staphylococcus aureus* č. SAX 44, SAX 52, SAX 63 byly kultivovány fermentorovou technikou v BHI při 37 °C po dobu 24 h. Po pomnožení byla bakteriální těla oddělena od živného média promytím v destilované vodě centrifugací při 2 000 až 2 500 G. Izolovaná bakteriální těla byla dezintegrována hlubokým zmrazováním a inaktivována formolem (0,1 ml 4 % formolu na 1 ml suspenze). Po kontrole sterility byl veškerý materiál lyofilizován.

Bakteriální kmeny *Propionibacterium acnes* č. PA 3, PA 17, PA 530 byly kultivovány fermentorovou technikou ve VL bujonu po dobu 48 h při 37 °C. Po pomnožení byla bakteriální těla oddělena od živného média opakovaným promytím v destilované vodě centrifugací při 2 000 až 2 500 G. Izolovaná bakteriální těla byla extrahována 24 h při 4 °C. Získaný lyzát byl inaktivován zahřátím na teplotu 60 °C po dobu 1 h, nejméně 3x v intervalu 24 h. Po kontrole sterility byl veškerý materiál lyofilizován.

Finální forma vakcíny byla připravena:

- I. 1. Smícháním sušin kmenů *staphylococcus aureus* č. SAX 44, SAX 52, SAX 63 v hmot. poměru 1:1:1.
2. Smícháním sušin kmenů *Propionibacterium acnes* č. PA 3, PA 17, PA 530 v hmot. poměru 1:1:1.
- II. Smícháním sušin 1. a 2. v hmot. poměru 1:1.

Farmakologické testy

Byla zkoumána nespecifická protekční účinnost vakcíny u SPF myši při rozličných infekčních podnětech. Současně byl ověřován

její vliv na retikuloendotelový systém. Jednorázová dávka 1,5 mg byla podávána intraperitoneálně skupinám po 20 myších.

Vakcinovaná zvířata byla v různých časových intervalech infikována intraperitoneálně a intravenózně. Získané výsledky prokázaly, že bylo dosaženo statisticky významné ochrany proti infekcím bakteriálními kmeny *Pasteurella multocida*, *Klasiella pneumoniae* a kvasinkou *Candida albicans*.

U SPF myší, kterým byla podána vakcína, byla provedena histologická vyšetření sleziny a jater. Získané výsledky prokázaly silnou stimulaci retikuloendotelového systému.

U myší očkovanych vakcinou podle vynálezu byl zaznamenán zvýšený počet slezinných lymfocytů. Počet lymfocytů ve slezinách vakcinovaných myší se pohyboval v rozmezí 2,9 až 3,2 x 10⁹/1 l, průměrný počet lymfocytů u kontrolních nevakcinovaných myší byl 3,9 x 10⁷/1 l.

Dále byla zjišťována specifická účinnost vakciny na imunitní systém u morčat a králíků. Obě skupiny zvířat byly imunizovány vakcinou podanou intramuskulárně v denní dávce 4 mg, celkem 10x v desetidenních intervalech. Metodou ELISA byla v séru vakcinovaných zvířat potvrzena tvorba specifických protilátek proti teichoové kyselině *Staphylococcus aureus*.

Adjuvanční účinek vakciny byl ověřován také u morčat a králíků. Skupiny zvířat byly imunizovány a/ usmrcenými kmeny druhu *Staphylococcus aureus*, b/ usmrcenými kmeny druhu *Staphylococcus aureus* s inkompletním Freundovým adjuvans, c/ vakcinou podle vynálezu. Pouze imunizace vakcinou podle vynálezu vedla k významnému zvýšení hladiny specifických protilátek proti druhu *Staphylococcus aureus*.

Klinické testy

Preventivní a profylaktické podání vakciny u kostních a kloubních operací:

Počet pacientů	84
Antibiotika nemusela být podána, pacienti se zhojili bez infekčních komplikací	
Léčebné podání vakciny u vleklých zánětů kostní dřeně:	
Počet pacientů	121
Zhojení kostního i kožního postižení	71 %
Zhojení kostního postižení, přetrvávání kožních reziduí	13 %
V léčení (dosud nehodnoceno)	16 %

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Vakcína k prevenci, profylaxi a terapii infekčních onemocnění kostí, vyznačující se tím, že obsahuje 3 synergisticky působící kmeny *Propionibacterium acnes* v neomezeném hmot. poměru a 3 kmeny druhu *Staphylococcus aureus* v neomezeném hmot. poměru s tím, že druhové směsi jsou zastoupeny v hmot. poměru 1:1, přičemž podíl obsahu jednotlivých druhů se liší nejvýše o 10 % a celkové množství bakteriální sušiny v 1 léčebné dávce je 4,5 až 5,5 mg.
2. Vakcína podle bodu 1, vyznačující se tím, že obsahuje kmeny *Propionibacterium acnes* č. PA 3, PA 17, PA 530 a kmeny *Staphylococcus aureus* č. SAX 44, SAX 52, SAX 63.

Konec dokumentu
