

POLSKA  
RZECZPOSPOLITA  
LUDOWAURZĄD  
PATENTOWY  
PRL

## OPIS PATENTOWY

60826

Patent dodatkowy  
do patentu \_\_\_\_\_

Zgłoszono: 11.VIII.1967 (P 122 157)

Pierwszeństwo: 22.V.1967 Stany  
Zjednoczone  
Ameryki

Opublikowano: 20.XI.1970

Kl. 30 h, 6

MKP C 12 k, 5/00

UKD

Współtwórcy wynalazku: Eugene B. Buynak, Maurice R. Hilleman

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

## Sposób otrzymywania szczepionki różyczki

1

Przedmiotem wynalazku jest otrzymywanie szczepionki różyczki, poza zakażonym organizmem ludzkim, a w szczególności etap rozmnażania wirusa różyczki w sztucznym środowisku.

Wynalazek umożliwia hodowlę wirusa różyczki o słabym działaniu w celu otrzymania szczepionki w laboratorium lub w warunkach przemysłowych.

Dotychczas hodowla tego wirusa była utrudniona z powodu wolnego rozmnażania się wirusa albo też z powodu niestandardowego środowiska, w którym wirus był hodowany. Wynalazek niniejszy umożliwia użycie kurczęcia jako pożywki dla hodowli wirusa w celu otrzymania szczepionki. Przed dokonaniem niniejszego wynalazku uważano, że kurczęta, a ściśle biorąc ich jaja nie nadają się do rozmnażania wirusa różyczki.

Hodowla laboratoryjna lub przemysłowa wirusa różyczki jest ważnym etapem w procesie produkcji szczepionki immunizującej. Różyczka jest na ogół łagodną chorobą występującą u dzieci, jednak choroba ta może spowodować komplikacje, jak: zapalenie mózgu, zapalenie stawów i zapalenie nerwów. Osłabienie władz umysłowych przy różyczce występuje rzadziej niż przy odrze.

Poważne objawy występują przy zakażeniu kobiet zwłaszcza w pierwszym kwartale ciąży. Wirus powoduje zakażenie płodu i niewłaściwy rozwój zarodka, między innymi małogłowie, głuchotę i niemotę czynnościową, wady wzroku, zniekształcenie serca i nieprawidłowość uzębienia. Niebezpieczeń-

2

stwo powodowane różyczką jest tak poważne, że wysunięto sugestię, by młode dziewczęta były poddawane procesowi chorobowemu przed okresem macierzyńskim.

5 Hodowla wirusa, według niniejszego wynalazku, umożliwia w dalszym ciągu procesu otrzymywanie szczepionki uodporniającej, na znanej zasadzie. Ogólnie biorąc, przedmiotem wynalazku jest adaptacja i rozmnażanie wirusa różyczki w hodowlach tkankowych, przygotowanych z zarodków jaj ku-  
10 rzyczych, która jest podstawowym etapem otrzymywania szczepionki.

Przedmiotem niniejszego wynalazku jest sposób wytwarzania szczepionki z osłabionego żywego wirusa różyczki, w drodze pasażowania wirusa w ho-  
15 dowlu tkankowej zarodka kurzego, przy czym ogólnie wirus różyczki izoluje się z materiału klinicznego przez zaszczepienie go bądź w hodowli tkankowej zarodka kurzego, bądź też hodowli tkankowej małpy „Cercopithecus aethiops” i poddanie tej  
20 hodowli inkubacji w temperaturze 30–38°, a następnie sukcesywnie pasażuje się wirus w środowiskach hodowlanych dostateczną ilość razy w celu osłabienia wirusa, przy czym co najmniej dziesięć z wymienionych pasażów dokonuje się w środowisku  
25 dziesięcio – do – jedenastodniowego embrionu kurczęcia w środowisku wzrostu komórki w temperaturze 30–38°C.

Po każdym pasażu dokonuje się oznaczenia zdol-  
30 ności na zbiorach pobranych w odstępach 2–14 dni

zamrożonych do chwili przeprowadzania pomiarów. O ile pomiary wykazują zbyt duży stopień wirulencji wirusa, poddaje się go ponownemu pasażowaniu w środowisku hodowlanym. Ten sposób wytwarzania szczepionki polega na przeprowadzeniu następujących etapów: A — wyizolowaniu wirusa złośliwego w jednej z odmian komórek w hodowli i jego adaptację do hodowli komórek embrionu kurzego, B — wytworzeniu osłabionego żywego wirusa w drodze seryjnych pasażów w tkance embrionu kurzego; C — przygotowaniu tego osłabionego żywego wirusa do użytku.

A — wyodrębnianie i adaptacja wirusa różyczki mogą być wykonane w hodowli tkankowej embrionu kurzego przy użyciu materiału klinicznego lub wirusa uprzednio rozmnożonego w innym rodzaju hodowli tkankowej, jak nerki małpy lub embrionu kaczki. Inkubacji zakażonych hodowli dokonuje się w temperaturze 30–34°C (optymalnie 32°C) lub 35–38°C (optymalnie 36°C). Przykładowo procedury wyodrębniania wirusa są następujące:

Procedura 1. Wirus różyczki izoluje się w hodowli tkankowej nerki małpy „*Cercopithecus aethiops*” i następnych pasażach na zarodkowych jajach kurzych hodowli tkankowej nerki małpiej, hodowlach tkankowych embrionu kaczki i embrionu kurzego.

Procedura 2. Wirus różyczki izoluje się w hodowli tkankowej nerki małpy „*Cercopithecus aethiops*” oraz pasażach hodowli tkankowych nerki małpiej i hodowli tkankowej embrionu kurzego.

Procedura 3. Wirus różyczki wyodrębnia się z materiału klinicznego w hodowli tkankowej embrionu kaczki i hodowli tkankowej embrionu kurzego w następnych pasażach.

B. Wytwarzanie szczepionki z osłabionego żywego wirusa różyczki polega na tym, że rozpoznany w etapie A jako wirus różyczki wprowadza się do butelek szklanych, zawierających hodowlę tkankową embrionu kurzego, przygotowaną z posiekanych instrypsynowanych dziesięciodniowych embrionów kurzych. Środowiskiem hodowli może być każde środowisko sprzyjające rozwojowi komórek, na przykład znane środowisko 199, do którego dodano surowicę cielęcą. Skład środowiska 199 został opisany w np. publikacji *Diagnostic Procedures for Rickettsial Diseases*, 1964, str. 158–163.

Po wprowadzeniu wirusa, zakażone hodowle komórkowe poddaje się inkubacji w kolejnych pasażach w temperaturze 30–38°C korzystnie 30–34°C (optymalnie 32°C) oraz 35–38°C (optymalnie 36°C) znanym sposobem na przykład wstrząsając lub stacjonarnie w zmiennych okresach czasu, w których wirus rozmnaża się w znacznych ilościach, a jednocześnie osłabia się.

Powyższe seryjne pasaży były dokonywane przy użyciu rozcieńczonego lub nierozcieńczonego materiału zakażonego do szczepienia (inoculum), przy czym uzyskano wielokrotne zbiory w różnych okresach czasu. Oznaczenie miana dokonywane było w hodowlach tkankowych małpy „*Cercopithecus aethiops*”.

W odpowiednich okresach czasu hodowle były traktowane przy użyciu 1000 TD<sub>50</sub> wirusa powodującego, wykazującego własności oddziaływania

(Buyamwera). Hodowle nie wykazujące objawów cytopatologicznych powodującego wirusa w ciągu 3–4 dni po traktowaniu, uważane były za zakażone wirusem różyczki.

Wirus następnie zabierano i przechowywano w stanie zamrożonym lub w niskiej temperaturze, w celu utrzymania jego zakaźności.

C. Przygotowanie do użytku wirusa różyczki, polega na tym, że wirus zebrany po tym powtarzalnym pasażu stabilizuje się przy użyciu odpowiedniego stabilizatora, jak cukru trzcinowego, białka ludzkiego, glutaminy, fosforanu lub mieszaniny tych substancji. Po oznaczeniu miana w celu ustalenia jego mocy, materiał wirusowy dzieli się i wlewa do ampulek, do bezpośredniego użytku.

Produkt należy przechowywać i rozprowadzać w stanie zamrożenia lub w postaci liofilizowanej. Należy przechowywać go bez dostępu wilgoci.

Ponieważ stwierdzono, że produkt nie jest choro-robotwórczy dla małpy i gryzoni, celowe jest jego wypróbowanie na człowieku, w celu ustalenia własności immunizacyjnych. Wynalazek jest bliżej wyjaśniony w następujących przykładach:

Przykład I. Jako wyjściowe inoculum stosuje się materiał otrzymany w procedurze 1. Dziewięć do jedenastodniowe embriony kurze po usunięciu głów i kończyn, sieka się w warunkach aseptycznych, a rozdrobnioną tkankę przemywa się kilkakrotnie w płynie Hanksa BSS. Przemytą tkankę trypsynuje się w temperaturze 36°C przy użyciu trypsyny 0,25% (firmy Difco 1:250) w zbuforowanym roztworze solnym trzech soli w ciągu dwóch do trzech godzin.

Skład mieszaniny trzech soli jest następujący:

|                                  |                                              |
|----------------------------------|----------------------------------------------|
| Sole — mieszanina                | 1 litr roztworu                              |
| NaCl                             | 8,00 g                                       |
| KCl                              | 0,38 g                                       |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 0,10 g                                       |
| dekstroza                        | 1,00 g                                       |
| trójhidroksymetyloaminometan     | 3,00 g                                       |
| trypsyna                         | 2,50 g                                       |
| wartość pH ≠                     | nastawia się na 7,4 przed dodaniem trypsyny. |

Zawiesinę komórek trypsynowej zbiera się za pomocą dwóch warstw gazy jałowej i odwirowuje się przy 1500 obr/min w ciągu 5 min. Komórki przeprowadza się ponownie w zawiesinę w środowisku hodowli w celu ich przeliczenia. Środowisko hodowli składa się ze środowiska 199 (Morgan, J. F., Morton, H. J. i Parker, R. C. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 73: 1–8, 1950), zawierającego 2% surowicy cielęcej agamma ogrzanej do temperatury 50°C w ciągu 30 minut i 50 mcg/ml neomycyny. Surowica agamma jest to surowica, z której usunięto gamma globulinę w procesie frakcjonowania.

Hodowle butelkowe posiewa się tak, aby uzyskać stężenie 350.000 żywych komórek na ml. Po inkubacji w temperaturze 36°C w ciągu 48–96 godzin, hodowle butelkowe mogą być użyte do seryjnego pasażowania lub przygotowania szczepionki.

Hodowle tkankowe embrionu kurzego przygotowuje się w butelkach szklanych, przy zastosowaniu środowiska 199, zawierającego 2% inaktywowanej agamma surowicy cielęcej, jako pożywki wzrostowej.

Po trzech lub czterech dniach od rozpoczęcia hodowli, wybiera się pożywkę wzrostową w warunkach aseptycznych, a hodowlę butelkową przemywa się cztery razy płynem Hanksa BSS, 100 ml na jedno przemycie i następnie zaszczenia 2–3 ml wyżej wymienionego posiewu wirusa różyczki, na jedną butelkę.

Siedemdziesiąt do stu ml pożywki 199, zawierającej 10% odpowiedniego stabilizatora zakaźności na przykład sorbitolu lub albumisolu na fiolkę dodaje się do każdej hodowli butelkowej a butelki poddaje się inkubacji w temperaturze 30–34°C. Do pożywki wzrostowej i utrzymującej dodaje się neomycynę w stężeniu 50 mcg/l.

Wielokrotne zbiory dokonuje się w odpowiednich odstępach czasu, od 2 do 4 dni, a hodowlę butelkową ponownie zasila się świeżą pożywką, zawierającą wyżej wymieniony stabilizator.

Oznaczenia wskaźnika zakażenia każdego zbioru wykonywane są w hodowlach tkankowych nerki małpy „Cercopithecus aethiops”. Każdy zbiór dokonywany jest w warunkach aseptycznych i umieszczany w wyjałowionych naczyniach, próbki pobiera się do wyjałowienia a resztę zamraża się w kąpeli alkoholowej przy użyciu suchego lodu.

Płyny zawierające wirusy przechowuje się w temperaturze –70°C w elektrycznych chłodziarkach, do czasu wybrania zbioru lub zbiorów do przygotowania szczepionki. Odpowiedni zbiór lub zbiory wybiera się po oznaczeniu zdolności zakażenia.

Wybrany materiał usuwa się z chłodziarki i odmraża się. Następnie pobiera się próbkę w celu kontroli. Do pozostałego płynu dodaje się dodatkowo odpowiedni wspomniany stabilizator. Materiał następnie oczyszcza się, po czym pobiera się próbkę do próbnego zaszczepienia małpy. Po osuszeniu, fiolki kapsluje się, lakuje i przechowuje się aż do chwili użycia szczepionki po dodaniu wody sterylizowanej.

Moc produktu ocenia się na podstawie zdolności infekcyjnej hodowli komórkowych.

Przykład II. Przeprowadza się procedurę jak w przykładzie I, lecz inkubacja wirusa różyczki odbywa się w temperaturze 35–38°C, najkorzystniej około 36°C.

Można wykonać ponad dziesięć pasażów wirusa na hodowli tkankowej embrionu kurzego, w celu dalszego osłabienia wirusa. Seryjne pasażę mogą obejmować również inkubację hodowli nerki małpy „Cercopithecus aethiops” lub zarodkowych jaj kurzych, co wyjaśnione jest na następujących przykładach:

GMK — oznacza hodowlę małpy „Cercopithecus aethiops”.

EAM — oznacza zarodkowe jaja kurze.

CEF — oznacza hodowlę tkankową embrionu kurzego.

DEF — oznacza hodowlę tkankową embrionu kaczki.

Przykład III. 2 GMK — i EAM — 9 GMK — 5 DEF (36°C) — 26 DEF (32°C) — CEF (32°C).

Przykład IV. GMK — CEF (32°C; 36°C).

Przykład V. 77 GMK — 3 DEF — CEF (32°C)

Przykład VI. Materiał kliniczny (wypluczyny z gardła) — DET — CEF (32°C).

Przykład VII. 5 GMK — 1 CEF — 2 DEF — CEF (32°C).

Wynalazek został opisany ze szczególnym uwzględnieniem dziesięciu seryjnych pasażów przez hodowlę tkankową embrionu kurzego w celu osłabienia wirusa, jednak wystarczająca jest mniejsza ilość operacji.

Tak więc, wynalazek przewiduje pojedynczą inkubację w hodowli tkankowej embrionu kurzego, w celu otrzymania wirusa wywołującego reakcję przeciwciała wirusa u człowieka, przy zmniejszeniu poważnych objawów choroby występujących w normalnych jej przebiegu.

Następne procesy po pierwszym wzroście w hodowli tkankowej embrionu kurzego, mogą przyczynić się do dalszego osłabienia wirusa.

#### Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania szczepionki różyczki, **znamienny tym**, że wirus różyczki izoluje się z materiału klinicznego przez zaszczepienie go w hodowli tkankowej embrionu kurzego lub w hodowli tkankowej małpy „Cercopithecus aethiops” i inkubację wymienionej hodowli w temperaturze 30–38°C, następnie sukcesywnie pasażuje się wymieniony wirus w środowiskach hodowlanych w celu osłabienia wirusa, przy czym co najmniej dziesięć z wymienionych pasażów dokonuje się w środowisku zawierającym hodowlę dziesięcio- do jedenastodniowego embrionu kurczęcia, pozbawionego głowy i kończyn, posiekanego i strypsynowanego, w środowisku wzrostu komórki w temperaturze 30–38°C, a jednocześnie po każdym pasażu dokonuje się oznaczenia zdolności zakażenia na zbiorach próbnych, pobranych w odstępach 2–14 dni, przy czym zbiory te zamraża się do momentu dokonywania pomiaru, zaś jeżeli wirusy wykazują zbyt duży stopień wirulentności, poddaje się je ponownemu pasażowaniu w środowisku hodowlanym.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stosuje się dziesięciodniowy embrion kurzy.

3. Sposób według zastrz. 1 lub 2, **znamienny tym**, że inkubację wirusa zarówno w etapie izolacji jak i pasażowania prowadzi się w temperaturze 30–34°C.

4. Sposób według zastrz. 1 lub 2, **znamienny tym**, że inkubację wirusa zarówno w etapie izolacji jak i pasażowania prowadzi się w temperaturze 34–38°C.