



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

233 279

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavná priorita

(22) Prihlášené 16 09 83

(21) (PV 6759-83)

(51) Int. Cl. A 61 K 39/193;
C 12 R 1/91

(40) Zverejnené 14 05 84

(45) Vydané 01 04 87

(75)

Autor vynálezu

GREŠÍKOVÁ MILOTA MUDr. DrSc.,
SEKEYOVÁ MAGDALÉNA PhMr.,
BIELIKOVÁ VALÉRIA,
RUSS GUSTÁV RNDr. CSc., BRATISLAVA

(54) Spôsob prípravy subjednotkovej vakcíny proti kliešťovej encefalitíde

Vynález sa týka spôsobu prípravy subjednotkovej vakcíny ku kliešťovej encefalitíde. Podstatou vynálezu je, že termosenzitívny kmeň vírusu kliešťovej encefalitídy Skalica Cl. gl. 53 sa pomnožuje na tkanivových kultúrach kuračích embryonálnych buniek, vírus sa semipurifikuje diferenciálnou centrifugáciou, sediment se resuspenduje do fyziologického roztoku, štiepi sa trikrát éterom, ktorý sa odstráni, vakcína sa lyofilizuje. Vynález má použitie v humánnej a veterinárnej praxi.

Vynález sa týka spôsobu prípravy subjednotkovej vakcíny proti klieštovej encefalitíde.

E. N. Levkovič a tiež Ch. Kunz pripravili inaktivované vakcíny proti klieštovej encefalitíde na kuracích embryonálnych bunkách s následnou inaktiváciou formaldehydom. [E. N. Levkovič: Biology of the tick-borne encephalitis complex. Czechoslovak Acad. Sci. 317 (1962); Ch. Kunz: Arzneim. Forsch. Drug. Res. 28, 10, 1806, (1978)]. Nevýhodou inaktivovaných vakcín je ich príprava s plne virulentným kmeňom vírusu klieštovej encefalitídy. Mayer a Mitrová pripravili živú atenuovanú vakcínu s kmeňom Langat [Mayer a Mitrová: Biological works. Slovak Acad. Sci. Bratislava, (1977)]. Nevýhodou atenuovanej vakcíny je, že kmeň Langat revertoval a nemôže sa použiť k príprave živej očkovacej látky.

Uvedené nevýhody v podstatnej miere odstraňuje spôsob prípravy subjednotkovej vakcíny proti klieštovej encefalitíde, ktorého podstata spočíva v tom, že termosenzitívny kmeň vírusu klieštovej encefalitídy (Cl. gl. 53) sa pomnožuje na tkanivových kultúrach kuracích embryonálnych buniek; vírus sa semipurifikuje diferenciálnou centrifugáciou, resuspenduje do fyziologického roztoku, štiepi sa 3 krát éterom, ktorý sa odstráni, vakcína sa vyčíri a lyofilizuje.

Výhoda navrhovaného spôsobu prípravy subjednotkovej vakcí-

ny je, že sa pracuje s termosenzitívnym kmeňom vírusu kliešťovej encefalitídy, ktorý je nepatogenný po podkožnom podaní bielym dospelým myšiam, čo je významné z hľadiska bezpečnosti pri práci. Vakcína obsahuje subjednotky vírusu, ktoré indukujú tvorbu protilátok a je zbavená balastných látok. Tento spôsob prípravy je ekonomicky nenáročný. Vakcínu možno skladovať po lyofilizácii.

Príklad 1

Pripravujú sa tkanivové kultúry z 11 dňových C/E kuracích embryí, z ktorých sa odstránia oči a vnútornosti. Tkanivové kultúry sa kultivujú v bazálnom Eaglovom médiu (BEM) s prímесou 5 % fetálneho telacieho séra a antibiotík (penicilín a streptomycín). Po 24 hodinovej kultivácii sa médium odstráni a tkanivové kultúry sa infikujú vírusom kliešťovej encefalitídy (kmeň Skalica, ktorý je uložený v čs. zbierke arbovirusov Virologického ústavu SAV pod číslom Cl. gl. 53) so 7,5 log LD₅₀/0,01 ml. Adsorbcia prebieha po dobu 90 min pri teplote 37 °C. Potom sa pridá čerstvé BEM s prímесou 5 % inaktivovaného séra a antibiotík. Na prvý deň sa médium stiahne a vyčíri. Purifikácia vírusu sa robí diferenciálnou centrifugáciou pri 25.000 ot. za min. po dobu 2 h. Odstráni sa supernatant a sediment sa resuspenduje do 100 krát menšieho objemu izotonického fyziologického roztoku o pH 7,2 s prímесou 50 µg gentamycínu na 1 ml. Po vyčírení sa určuje titer vírusu pomocou hemaglutinačného testu. Preparát sa za stáleho miešania 3 krát štiepi éterom, 1 krát počas 5 min, druhý krát rovnakým dielom počas 18 h pri teplote 4 °C, 3 krát počas 5 min. Po vyčírení sa éter odsaje, zvyšky éteru sa odstránia dusíkom. Vakcína sa lyofilizuje a skladuje pri teplote -20 °C. Skúšky neškodnosti vakcíny sa robia intracerebrálnou

inokuláciou očkovacej látky po 0,1 ml ďalšej skupine bielych myší. Počas pozorovacej doby 14 dní sa u žiadneho z pokusných zvierat neobjavilo poškodenie zdravotného stavu, ktoré by súviselo s aplikáciou skúšaného preparátu. Skúška na neprítomnosť živého vírusu sa robí na 5 až 8 g bielych myšiach. Myšiam sa inokuluje po 0,03 ml intracerebrálne vakcíny neriedenej a ďalšej skupine myší sa inokuluje po 0,03 ml vakcína riedená 1:10. Po 7 dňoch sa odoberie od poloviny myší mozog na ďalšiu pasáž. Celkove sa robia 2 pasáže. Sledovanie tvorby protilátok sa robí na 15 g myšiach, ktorým sa podá intraperitoneálne vakcína po 0,1 ml, 7 dní po prvej dávke sa odoberie od myší krv a sérum sa vyšetruje v hemaglutinačno-inhibičnom teste. Druhá dávka vakcíny sa podá po 1 mesiaci. 7 dní po prvej vakcinácii sa vyšetruje sérum myší na prítomnosť hemaglutinačno-inhibičných protilátok. Ochranný test sa robí na dospelých bielych myšiach, ktoré sa imunizujú jednou dávkou vakcíny intraperitoneálne po 0,1 ml. Po 7 až 8 dňoch sa robí challenge živým vírusom. Myši sú chránené proti 100 LD₅₀ (myšie smrteľné dávky) vírusu. Skúška sterility vakcíny sa robí podľa Čsl. 3.

Príklad 2

Postupuje sa ako v príklade 1 s tým rozdielom, že sa vírus kultivuje pri 37 °C počas 48 h.

Príklad 3

Postupuje sa ako v príklade 1 s tým rozdielom, že sa vírusové partikule separujú v sacharózovom gradiente hustoty (10 až 30 % sacharóza/).

Príklad 4

233 279

Postupuje sa ako v príklade 1 s tým rozdielom, že finálny preparát po extrakcii éterom sa opracuje formalínom v konečnom riedení 1:2 000, udržiava sa po dobu 3 dní pri teplote 4 °C, formalín sa odstráni tak, že k 100 ml vzorky sa pridá 1,7 ml 5 % pyrosiričitanu sodného. Po zmiešaní sa vzorka naplní do dialyzačného sáčku a tento sa dialyzuje v 8. litroch fyziologického roztoku pri teplote 4 °C po dobu 20 hodín. Vakcína sa po dialýze lyofilizuje.

Vynález môže nájsť široké použitie v medicíne, ako vakcína proti vírusu kliešťovej encefalitídy.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

233 279

Spôsob prípravy subjednotkovej vakcíny proti klieštovej encefalitíde vyznačujúci sa tým, že termosenzitívny kmeň, vírus klieštovej encefalitídy Cl. gl. 53 Skalica sa pomnožuje na tkanivových kultúrach kuracích embryonálnych buniek, vírus sa semipurifikuje diferenciálnou centrifugáciou, resuspenduje do fyziologického roztoku, štiepi sa 3 krát éterom, ktorý sa odstráni, vakcína sa vyčíri a lyofilizuje.