



Государственный комитет
СССР
по делам изобретений
и открытий

О П И С А Н И Е ИЗОБРЕТЕНИЯ

К ПАТЕНТУ

(11) 1003738

(61) Дополнительный к патенту —

(22) Заявлено 21.12.79(21) 2854825/28-13

(51) М. Кл.³

(23) Приоритет — (32) 22.12.78

А 61 К 39/12

(31) А9220/78 (33) Австрия

Опубликовано 07.03.83 Бюллетень № 9

(53) УДК 615.372
(088.8)

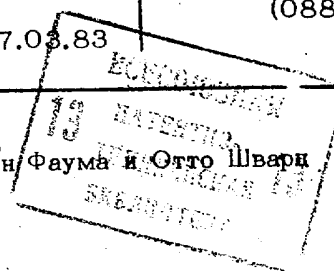
Дата опубликования описания 07.03.83

(72) Авторы
изобретения

Иностранцы
Франц Хайнц, Кристиан Кунц, Йоханн Фаума и Отто Шварц
(Австрия)

(71) Заявитель

Иностранная фирма
"Иммуно АГ фюр Хемиш-медицинише Produkte"
(Австрия)



(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ВАКЦИНЫ ТАЕЖНОГО ВЕСЕННЕ-ЛЕТНЕГО ЭНЦЕФАЛИТНОГО ВИРУСА

1

Изобретение относится к производ-
ству вакцин.

Известен способ получения вакцины
таежного весенне-летнего энцефалитного
вируса путем культивирования вируса в
культуре ткани или в суспензии эмбрио-
нальных клеток птиц с последующим от-
делением вирусосодержащей жидкости цент-
рифугированием, инактивацией вируса и
получением целевого продукта [1].

Однако известный способ не обеспечи-
вает высокой чистоты целевого продукта.

Целью изобретения является повыше-
ние чистоты целевого продукта.

Поставленная цель достигается тем,
что при осуществлении способа получения
вакцины таежного весенне-летнего энце-
фалитного вируса путем культивирования
вируса в культуре ткани или в суспензии
эмбриональных клеток птиц, с последую-
щим отделением вирусосодержащей жидкос-
ти центрифугированием, инактивацией
вируса и получением целевого продукта

2

вирусосодержащую жидкость инактивир-
формалином или бета-пропиолактоном,
затем обрабатывают протаминсульфатом,
очистку осуществляют при непрерывном
центрифугировании с градиентом плотно-
сти сахарозы от 0 до 50%, отбирают
фракции, имеющие повышенную экстинкцию
при 260 нм и содержащие частицы с
константой седиментации в области
200S и полученные фракции разводят
буферным раствором, преимущественно
фосфатным буферным раствором pH 7,6.

Кроме того, с целью стабилизации
целевого продукта фракции разводят
буферным раствором, содержащим 0,1%
человеческого альбумина.

Способ осуществляют следующим об-
разом.

Эмбриональные клетки кур суспенди-
руют в среде культуры клеток TCM 199
(Tissue Culture Medium 199), инфициру-
ют вирусом и держат в суспензии при
аэробных условиях при температуре в пре-
делах 25-38°C в течение 1-5 дней.

Затем клетки и остатки клеток отделяют путем центрифугирования. Полученную суспензию вируса инактивируют с помощью формалина или β -пропиолактона и после этого концентрируют путем ультрафильтрации. Стадии инактивации и концентрирования можно также проводить в обратной последовательности. Суспензия наряду с ТВЛЭ-вирусом содержит различные примеси, которые седиментируют частично быстрее или медленнее чем ТВЛЭ-вирус. Предпочтительно отделяют быстрее седиментирующие части путем осаждения с помощью протаминсульфата, прежде чем осуществляют собственный непрерывный способ ультрацентрифугирования с распределением градиентов плотности.

Способ, в частности, осуществляют таким образом, что в роторе ультрацентрифуги, наполненном раствором буфера, целесообразно раствором фосфатного буфера, при 3000 оборотов в минуту половина буферного раствора вытесняется 50%-ным раствором сахарозы, и образуется благодаря этому градиент плотности 0-50% сахарозы. После этого суспензии, содержащей вирус, дают стечь через ротор при скорости вращения ротора 35000 оборотов в минуту со скоростью истечения предпочтительно 3 л/ч. При выбранных условиях большая часть вирусных частиц входят в градиенты плотности. Как только весь материал прошел аппарат, центрифугируют еще один час, причем одновременно дают протекать раствору фосфатного буфера. Затем осторожно проводят ротор в состояние покоя и содержащее его разделяют на отдельные фракции. После этого в каждой фракции определяют экстинкцию при 260 нм и одновременно устанавливают содержание сахарозы во фракции. Локализация вируса в градиентах плотности делается возможной благодаря его экстинкции при 260 нм. Вирус связывается в области при содержании сахарозы примерно 40% и обуславливает здесь отчетливое увеличение экстинкции при 260 нм.

На чертеже представлена диаграмма этой зависимости, откуда видна экстинкция отдельных фракций по отношению к градиентам плотности. Градиент плотности раствора сахарозы составляет 0-50%. Штрихпунктирная кривая показывает распределение экстинкции при 260 нм в отдельных фракциях. В области около 40% сахарозы фракции 10, 11 и 12 имеют

повышенную, а фракция 11 максимальную экстинкцию. В этой фракции находятся почти исключительно частицы вируса с константой седиментации 200 S без седиментирующих заметно быстрее или медленнее чем вирус примесей. Пик соответствует концентрации сахарозы 39%. Другой пик у фракции номер 25, соответствующий концентрации сахарозы менее чем 10%, указывает на наличие примесей, которые отбрасываются. На диаграмме наглядно показано относительное протективное действие (определенное в прямом опыте защиты мышей) отдельных фракций с помощью различной высоты колонн. Фракция 11, следовательно, имеет самое высокое относительное защитное действие.

Собранные содержащие вирус фракции теперь предпочтительно разбавляют буфером, содержащим человеческий альбумин для того, чтобы улучшить стабильность вирус-антигена, и затем обычным способом перерабатывают далее в вакцины.

Полученные вакцины имеют более высокую чистоту и лучше переносятся человеком, чем препараты, изготовленные обычным способом.

В таблице приведены сравнительные результаты переносимости препаратов, полученных известным и предложенным способами, причем в первой графе приведены реакции с вакцинами, изготовленными известным способом, а во второй графе — реакции с вакцинами, полученными предложенным способом. В случае прививок с помощью полученных согласно изобретению вакцин не могли наблюдаться никакие нежелательные реакции — ни локальные, ни системные.

Полученные согласно предложенному способу вакцины отличаются незначительным содержанием протеина, не принимая во внимание добавленный человеческий альбумин. Это содержание протеина при равном антигенном действии во много раз (по меньшей мере в 10) меньше, чем в случае до сих пор применяемых препаратов.

Пример. Суспензию эмбриональных клеток кур в TCM 199 (TJSSUE-культура-среда) инфицируют ТВЛЭ-вирусом. После выдержки в течение 4 сут при 33°C содержащую вирус суспензию собирают и центрифугированием при 3000 г в течение 15 мин при 4°C отделяют клетки.

К полученной суспензии вируса прибавляют формалин в таком количестве, чтобы конечное разбавление составляло 1:2000, и затем суспензию выдерживают в течение 30 мин при 37°C и 48 ч при комнатной температуре.

Затем инаktivированную суспензию вируса смешивают с 0,5 мг/л протаминсульфата и смесь выдерживают в течение ночи при 4°C. Образовавшийся осадок отделяют посредством центрифугирования при 10000 г в течение 30 мин при 4°C. Предварительно обработанная указанным способом суспензия представляет собой исходный материал для непрерывного ультрацентрифугирования в градиенте плотности.

Суспензию вируса со скоростью потока 3 л/ч пропускают с помощью насоса через центрифугу, в которой в качестве сахарозного градиента плотности содержится 0-50% сахарозы в фосфатном буферном солевом растворе при pH 7,6.

Объем составляет 4,5 л, время центрифугирования 1,5 ч. После остановки центрифуги содержимое ротора выкачивают и при этом разделяют на 16 фракций по 100 мл. Для каждой отдельной фракции определяют экстинкцию при 260 нм на спектрофотометре и удельную плотность на рефрактометре. При этом наблюдает-

ся распределение, показанное на диаграмме. Пиковые фракции 10, 11 и 12 с концентрацией сахара около 40% объединяют и разбавляют до 1:10 фосфатным буферным солевым раствором при значении pH 7,6, в котором содержится 0,1% человеческого альбумина.

Защитную активность полученного препарата определенным способом определяют в прямом защитном опыте на мышах. Подвергаемый исследованию препарат разбавляют (1:3; 1:9; 1:27; 1:81; 1:243) и смешивают с 0,2% гидроокиси алюминия, примененной в качестве средства, усиливающего действие препарата. При применении в каждом случае 0,2 мл указанных разбавленных растворов 2 раза с промежутком в 1 неделю подкожно иммунизируют по 10 мышей (весом примерно по 10 г). Через две последующие недели мышей инфицируют 100-1000 LD₅₀ ТВЛЭ-вирусом и рассчитывают защитную дозу LD₅₀ по методу Риды и Мюнха после наблюдения в течение 3 недель.

При этом защитную дозу LD₅₀ определяют при разбавлении 1:30.

Предложенный способ позволяет повысить чистоту и стабильность вакцины таежного весенне-летнего энцефалитного вируса.

Показатели	Препараты	
	Полученные согласно известному способу	Полученные согласно изобретению
Локальная боль, %	До 72	36
Общие реакции (головная боль, усталость), %	До 64	25
Повышенная температура тела (объем), %	До 68	19
37,3-38°C	До 36	14
38-39°C	До 27	4
Выше 39°C	До 9	1

Ф о р м у л а и з о б р е т е н и я

1. Способ получения вакцины таежного весенне-летнего энцефалитного вируса путем культивирования вируса в культуре ткани или в суспензии эмбриональных клеток птиц, с последующим отделением вирусосодержащей жидкости центрифугированием, инаktivацией вируса и получением целевого продукта, отличающийся тем, что, с целью повышения чистоты целевого продукта, вирусосодержащую жидкость инаktivируют формалином или бета-пропиолактаном, затем обрабатывают протаминсульфатом, очистку осуществляют при непрерывном центрифугировании с градиентом плотности сахарозы

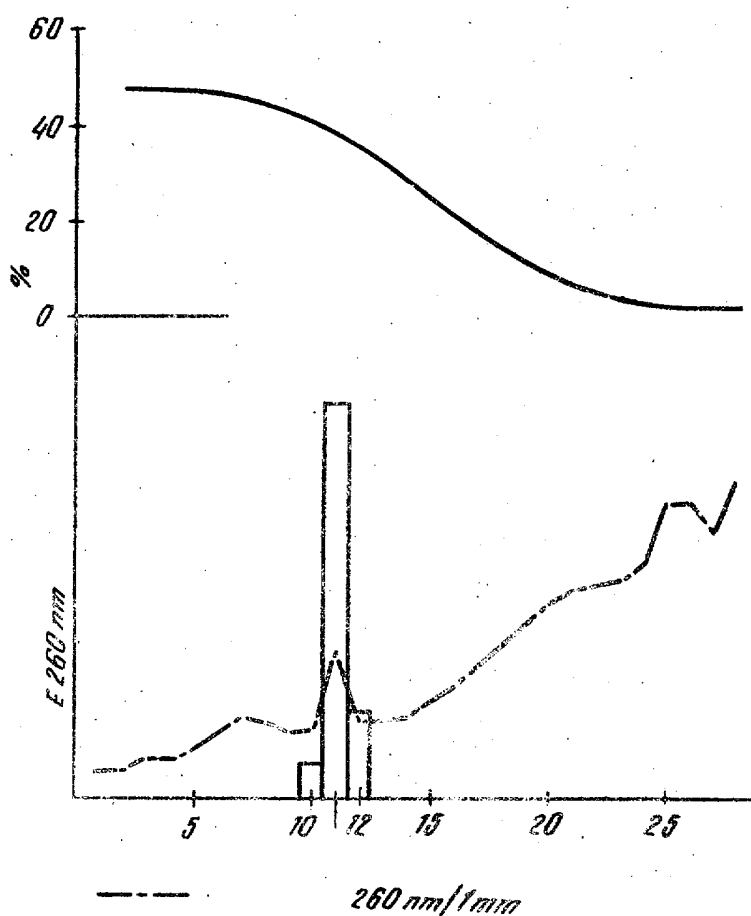
от 0 до 50%, отбирают фракции, имеющие повышенную экстинкцию при 260 нм и содержащие частицы с константой седиментации в области 200S и полученные фракции разводят буферным раствором, преимущественно фосфатным буферным раствором pH 7,6.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что, с целью стабилизации целевого продукта, фракции разводят буферным раствором, содержащим 0,1% человеческого альбумина.

Источники информации,

принятые во внимание при экспертизе

1. Патент Великобритании № 1453035, кл. А5В, 1977.



Составитель С. Малюгина

Редактор Л. Алексеенко

Техред А. Бабинец

Корректор С. Шекмар

Заказ 1598/49

Тираж 711

Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета СССР
по делам изобретений и открытий

113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Филиал ППП "Патент", г. Ужгород, ул. Проектная, 4