



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

206598

(11) (B1)

(51) Int. Cl.³
A 61 K 39/165

/22/ Přihlášeno 19 07 77
/21/ /PV 4805-77/

(40) Zveřejněno 15 09 80

(45) Vydáno 15 12 82

(75)
Autor vynálezu

HRISTOV ODISSEEV HRISTO dr., SOFIA a DEMIREV PETROV GRIGOR dr.,
PLOVDIV /BLR/

(54) Způsob výroby živé vakcíny příušnic

1

Vynález se týká způsobu výroby živé vakcíny příušnic.

Epidemická parotitis je velmi rozšířeným onemocněním na celém světě. V Bulharsku je každoročně registrováno průměrně více než 25 000 případů. Kromě mírné klinické formy jsou často pozorována vážná onemocnění četných orgánů a systémů často končících trvalým poškozením jako paralýzou, neplodností, cukrovkou, thyreoiditidou, hluchotou, poruchou ledvin, kardiovaskulárního systému, poškozením plodu u těhotných žen atd. Epidemie se vyskytují ve městech a na vesnicích běžně a ve větších městech přetrvávají epidemie celý rok. Proto je zapotřebí vyvinout účinné prostředky proti infekčnímu zánětu příušnic.

První pokusy o dosažení profylaxe proti epidemické parotitidě za použití terapeutického séra byly neúspěšné. Navržené vakcíny připravené z usmrcených virů nebyly účinné a nemohly se použít v praxi.

Ukázalo se, že nejperspektivnější je živá vakcína. Avšak žádné z těchto vakcín nebyly doposud mezinárodně uznány. První pokusy, které provedl Enders a spol. (Enders et al. J. Immunol., 54, 1946, 281-291), zůstaly ve sféře pouze pokusů. Desetiroční studium živé vakcíny, získané z "Leningradského" kmene (Proceedings of the EMI Institute "Pirogov" v. 16, 1958, 116-122, Klyachko N. S., A. A. Smorodintzev - Acta virol., 1958, 3, 145-151), které provedli Smorodintzev A. a Klyachko, nebylo ukončeno praktickou aplikací. Podobný osud měla vakcína získaná Copelovicem a spol. (Copelovic et al. Cercetari asupra valorii - Immunogene a uni vaccin antiurlian preparat cutulpini autochtoni, stuor. Cercetari inframicrobiologici, 1962, 4, 473-480).

Další pokusy Nassibova a Smorodintzeva (Nassibov M. N., A. A. Smorodintzev, Voprosi vi-

rusologii, 1968, 3, 336-340) and of Andjaparidze and assoc. (Andjaparidze et al. - Rev. children's infections, 1971) s novými kmeny "Leningrad 1, 2 a 3" jsou stále ve stádiu laboratorních experimentů. Ve stádiu experimentace jsou také pokusy Starkeho a spol. (Starke G. et al. Verfahren zur Herstellung von mumps - lebcenvirus implet. off. Pat. NDR č. 88169) s kmenem "Leningrad 3" pěstovaným na ledvině štěněte. V počátečním stádiu pokusů jsou také práce japonských autorů s kmeny Towata a Urabe (Hosai et al. Studies of live attenuated mumps virus vaccine. Biven j 13, 1970, 2, 121-126).

Pouze Hilleman a spol. ve Spojených státech dělají pokusy ve velkém měřítku s kmenem Jeryl Lynn a se získanou vakcínou (Bujnak E., B. Hilleman MR, Mem anor. Co. Patent USA č. 3 555 149). I Endersův kmen nemá větší použití z důvodů pouze známých jeho autorům. Kmen "Leningrad" se nepoužívá, protože je izolován na kuřecích zárodcích, z čehož se také získá vakcína. Kuřecí zárodky jsou nositeli virů kuřecí leukemie, proto stále trvá velké nebezpečí kontaminace vakcíny těmito viry. Později bylo zjištěno, že tento kmen má nízkou imunogenitu. Stejněmu nebezpečí jsou vystaveny kmeny Copelovice a spol.

Kmeny "Leningrad 1 a 2" jsou také izolovány na kuřecích zárodcích a proto nemají ze stejného důvodu použití. Kmen "Leningrad 3" je vypěstován na fibroblastech buněk kultury a japonských křepelek, avšak jeho široké použití je momentálně brzděno technologickými, vědeckými a organizačními důvody. Aplikace vakcíny získané z kmene "Leningrad 3-Pankov" vypěstovaného na ledvinách čerstvě narozených štěňat, byla zastavena pro potíže vědeckého původu. Kmen "Jeryl Lynn" je izolován na kuřecích zárodcích z aleukemických ptáků, tzv. "zlatých vajec", kde se také získá vakcína, což činí její výrobu nákladnější. Vakcíny z kmenů Towata a Urabe se získají na stejných vejecích.

Předmětem vynálezu je způsob výroby živé vakcíny příušnic s domácím kmenem, který má být areotogennický, imunogennický a epidemiologicky účinný. Použil se kmen Sofia 6, uložený 7. prosince 1976 pod číslem 111 v bulharské mikrobiologické sbírce v "Institute for Control on the Medicaments, 26, Vl. Zainov. Blv., Sofia, Bulgaria."

Způsob výroby živé vakcíny příušnic se vyznačuje tím, že se použije kmen Sofia 6 ICM č. 111, který se izoluje od pacienta na vláknité kultuře z ledviny čerstvě narozených morčat a zředí se 12 až 25násobným pasážováním na stejné kultuře a 3. až 5. den po přípravě kultury se tato infikuje při 0,01 až 1,00násobné dávce, kapalina obsahující virus se sbírá 3x bez monobuněčné vrstvy a následuje lyofilizace po 48 hodin při teplotě kondenzátoru -50 °C, vakuu sušicí komory až 100 mikrometrů a teplotě produktu v komoře na konci sušení až 25 °C.

Konečný produkt také prochází dalšími kontrolami na biologickou aktivitu, sterilitu, neškodnost, atoxicitu, reaktogenní a imunogenní vlastnosti. Vakcína tvoří světle růžové tablety v ampulích a má 1 rok účinnosti. Před použitím se vakcína rozpustí v destilované vodě a infikuje se subkutánně v 0,5 ml objemu, obsahujícím 1 000 až 10 000 infekčních jednotek.

Při imunizaci se nezvyší teplota a nenastanou žádné obecné a místní reakce. Pouze v některých případech se pozoruje zvýšení teploty, avšak může se také zaznamenat při kontrole, což ukazuje, že teplota je následkem některých dalších příčin, nejčastěji katarů horních dýchacích cest.

U imunizovaných lidí se zvýší protilátkový titr na 95 %, s geometrickým středem titru virů neutralizovaných protilátkami 1:22,6 a hemaglutinační inhibice protilátky na 83,5 %, s geometrickým středem titru 11,3.

Uspokojivá epidemiologická účinnost vakcíny je potvrzena její aplikací v ohnisku epidemie a také jejím masovým použitím.

Po aplikaci vakcíny v ohniscích epidemie se epidemický proces rychle přeruší, počet pacientů klesne a zkrátí se doba karantény. V ohnisku, kde se aplikovala vakcína, trvala epidemie průměrně 30 dní, zatímco u kontrol trvala téměř 120 dní.

Při masové aplikaci vakcíny byla také prokázána její vysoká účinnost. Nyní, po úplné vakcinaci ve městě Plovdivu, se u všech dětí od 1 do 12 let, které neměly epidemickou parotitidu, snížila nemocnost 12 až 17násobně. Pro tuto oblast měla vakcína index účinnosti nad 10 a koeficient ochrany až 97 %. V minulosti zaujímala infekční parotitida v určitých letech 1., 2. nebo 3. místo na seznamu nakažlivých onemocnění, zatímco nyní je jednou z posledních na seznamu. Dříve představovala epidemická parotitis 22,3 % ze všech infekcí a 25,8 % z kapénkových infekcí, zatímco v r. 1973 představovala 2,9 % až 4,6 %. V minulosti tvořilo ohnisko se 4 a více případy nad 90 %, zatímco po imunizaci klesl jejich počet na 5 %. Doposud získané výsledky ukazují perspektivnost vakcíny v boji proti epidemické parotitidě v této zemi.

Způsob má následující výhody:

Pro vakcínu bylo použito domácího kmene, který se izoluje na kultuře, na které se později získá samotná vakcína, zabezpečená tímto způsobem od vedlejší kontaminace. Použije se domácí substrát, tj. ledviny morčat, na kterých se také získá vakcína spalničkového viru a které jsou zárukou čistoty a na druhé straně je snadno dostupný a levný. Technologie pro přípravu vakcíny byla vypracována při zajištění vysoké a levné produkce, několikanásobně levnější než dosud používaná. Způsob zajišťuje produkci areaktogenicky, imunogenicky a epidemiologicky účinné vakcíny při účinnosti alespoň jednoho roku.

Příklad 1 objasňuje bez omezení způsob podle vynálezu.

P ř í k l a d 1

Příprava kmene Sofia 6.

Kmen Sofia 6 se izoluje z dítěte nemocného pravostrannou epidemickou parotitidou. Třetí den nemoci se odebere dítěti slina, která se po úpravě kultivuje v pěti zkumavkách na kultuře z ledvin morčat. Infikované buňky neukazují žádné morfologické změny. Hemadsorpce vyvolaná 4., 6., 8. a 10. den je negativní. Desátý den se vytvoří směs z kapalných kultur ve zkumavkách. Reakce hemagglutinace je negativní. Proveďte se nová infekce pěti nových zkumavek "slepý pokus". Infikované kultury neukazují žádné morfologické změny, avšak zkoušky hemadsorpce ukazují 4. den pozitivní výsledky. Sebraná kapalná kultura je 8. den počátečním materiálem na následující pasáž. Kmen se podrobí celkem 25 pasážím na tkáňové kultuře z ledvin morčat při jediném výběru každé z nich, aby nastalo zředění. Materiál z poslední pasáže slouží jako vakcinální kmen pro výrobu vakcíny.

Popis výroby vakcíny v sériích:

Pro výrobu poloproduktu pro 1 sérii vakcíny se připraví kultura z ledvin čerstvě narozených morčat ve 30 nádobách o kapacitě 1 200 ml a 3 nádobách o kapacitě 150 ml. 4. den po vytvoření monovrstvy se infikuje 27 velkých nádob s kulturou vakcinálním virem. Zbývá kultura v 3 velkých nádobách a 3 malých nádobách se nechá neinfikovaná, tj. připraví se jako kontrola. Udržovací prostředí kultury je podle Parkera (prostředí 199) bez telecího séra. 2., 4. a 6. den se kapalina obsahující virus shromáždí a v prvních 2 případech se přidá nová kultura, zatímco ve 3. případě se kultura po odebrání tekutiny odstraní. V takto shromážděném poloproduktu se stanoví titr viru (ne menší než $10^{4.5} \text{XAD}_{50}/0.5 \text{ ml}$), sterilizuje (bez jakýchkoli infekčních zárodků), obsah albuminu (ne větší než 0,10 mg/ml podle Lowry), specifita (případně neutralizováno specifickým sérem), neškodnost a atoxičita vůči zvířatům.

Na konec kultivace se přikapou do 3 malých nádob lidské, kuřecí a morčecí erythrocyty, aby se zjistila případná vedlejší hemadsorpce virů a tekutina ve 3 velkých kontrolních nádobách se zkouší na sterilitu a nepřítomnost dalších virů. Po zkoušce kontrolních vzorků se poloprodukt shromáždí do série a přidá se stabilisátor, sacharosa a želatina, načež se rozlije do 1 ml ampulí a lyofilizuje se. Suchý produkt se zkouší opět na sterilitu (bez jakýchkoliv infekčních zárodků), biologickou aktivitu (titr nesmí být menší než $10^{3.7}$ XAdB₅₀/- /0,5 ml), neškodnost a atoxicitu na laboratorních zvířatech, reaktogenní a imunogenní vlastností u 20 dětí (jsou přípustny slabé symptomy příušnic bez napadení jakéhokoliv dalšího orgánu do 1 % imunizovaných a konverse síry větší než 80 %, stanoveno podle reakce pro neutralizaci viru). Potom se označí série, dávka na ampulích a doba účinnosti a produkt je připraven pro použití.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob výroby živé vakcíny příušnic, vyznačený tím, že se použije kmen Sofia 6, ICM č. 111, který se izoluje od pacienta na vláknité kultuře z ledviny čerstvě narozených morčat a zředí se 12 až 25násobným pasážováním na stejné kultuře a 3. až 5. den po přípravě kultury se tato infikuje při 0,01 až 1,00násobné dávce, kapalina obsahující virus se sbírá 3x bez monobuněčné vrstvy a následuje lyofilizace po 48 hodin při teplotě kondenzátoru -50 °C, vakuu sušicí komory až 100 mikrometrů a teplotě produktu v komoře na konci sušení až 25 °C.