

URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

60 449

Patent dodatkowy
do patentu _____

Zgłoszono: 05.VII.1967 (P 121 543)

Pierwszeństwo: _____

Opublikowano: 10.VII.1970

Kl. 30 h, 6

MKP C 12 k, 5/00

UKD

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

Sposób otrzymywania szczepionki różyczki

1

Wynalazek dotyczy otrzymywania szczepionki różyczki zawierającej osłabiony żywy wirus różyczki.

Dzięki temu, że szczepionka zawiera wirus w osłabionej formie, powoduje ona niewielką gorączkę i nieznaczne kliniczne reakcje organizmu. Wytwarza ona natomiast dostateczną ilość przeciwciał w organizmie człowieka i zwierzęcia, wystarczającą do zabezpieczenia organizmu przed infekcją wirusową. Różyczka jest zwykle łagodnie przebiegającą chorobą u dzieci, chociaż może powodować komplikacje artretyczne, zapalenie nerwów, zapalenie mózgu. Choroby umysłowe zdarzają się rzadziej niż w przypadku odry. Infekcja kobiety w pierwszych trzech miesiącach ciąży, może spowodować opóźnienia w okresie dojrzewania płodu. Wirus atakuje zarodek powodując niewłaściwy rozwój embrionu, co w efekcie powoduje takie defekty jak: mikrocefal, głuchotę, defekty oczu, nieprawidłowy rozwój serca i układu zębowego. Niebezpieczeństwo wirusa różyczki dla płodu w pierwszych dwóch lub trzech miesiącach ciąży jest tak wielkie, że młode dziewczęta powinny być zaszczepione przed uzyskaniem dojrzałości płciowej. Szczepionka osłabionego wirusa zgodnie z niniejszym wynalazkiem może uodpornić organizm.

Celem wynalazku jest wynalezienie sposobu otrzymywania szczepionki wywołującej powstawanie przeciwciał zwalczających wirus różyczki.

2

Cel ten osiągnięto dzięki temu, że wirus różyczki izoluje się z materiału klinicznego przez zaszczepienie hodowli tkankowej embrionu kaczki lub hodowli tkankowej nerki małpy i inkubację tej hodowli w temperaturze 30—38°C, następnie sukcesywnie pasażuje się wymieniony wirus dostateczną ilość razy w ośrodku hodowlanym w celu osłabienia wirusa, przy czym przynajmniej dziesięć z wymienionych pasażów dokonuje się w środowiskach zawierających hodowlę pokrajane-
go i potraktowanego trypsyną dziesięcio- lub jedenastodniowego, pozbawionego głowy i kończyn embrionu kaczki, w środowisku wzrostu komórek w temperaturze 30 ÷ 38°C, a jednocześnie po każdym wspomnianym pasażu przeprowadza się oznaczenie zdolności zakażenia na zbiorach próbnych w odstępach dwu do czternastu dni, które to zbiory zamraża się do momentu dokonywania pomiaru, przy czym w przypadku jeżeli wirusy wykazują zbyt duży stopień wirulentności, podaje się go ponownemu pasażowaniu w środowisku hodowlanym.

Sposób według wynalazku obejmuje następujące etapy: A, izolacji złośliwego wirusa w jakiegokolwiek odmianie komórek w hodowli, jego adaptacji do hodowli komórkowej embrionu kaczki; B, rozwoju osłabionego żywego wirusa poprzez szereg etapów rozwoju w tkance kaczego embrionu i C, przygotowanie szczepionki opartej na wy-

żej wspomnianym wirusie. Etapy te są poniżej oddzielnie opisane.

A. Izolacja i adaptacja złośliwego wirusa.

Można dokonać izolacji i adaptacji wirusa różyczki w hodowli tkankowej embrionu kaczki, używając materiału klinicznego (na przykład tamponu za pomocą którego pobiera się wymaz z gardła) lub za pośrednictwem uprzednio rozprze-
strzenionego wirusa w innym typie hodowli komórkowej, takiej jak nerka małpy lub zapłodnione jajka. Można przeprowadzać inkubację zainfekowanych hodowli w temperaturze pomiędzy 30°C a 38°C, najlepiej w 30–34°C (optymalna 32°C) lub w temperaturze 35–38°C (optymalna 36°C).

Poniżej podano typowe procedury etapu A

Procedura 1. Wirus różyczki izoluje się w hodowli tkankowej embriona kaczki z materiału klinicznego, na przykład z gardła osoby zarażonej różyczką.

Procedura 2. Wirus różyczki z klinicznego materiału jest wyizolowany w hodowli tkankowej nerki małpy.

B. Rozwój szczepionki osłabionego żywego wirusa różyczki

Wirus, po jego zidentyfikowaniu w etapie A, dodaje się do szklanych butelek zawierających hodowlę tkankową embrionu kaczki przygotowaną z rozdrobnionego i potraktowanego trypsyną dziesięciodniowego embrionu kaczki. Środowisko hodowlane może być jednym z jakichkolwiek środowisk podtrzymujących wzrost komórki. Może to być na przykład środowisko 199, do którego została dodana surowica cielęca. Skład tego środowiska opisany został np. w publikacji Diagnostic Procedures for Viral and Rickettsial Diseases, 1964, str. 158–163. Po dodaniu wirusa, zainfekowane hodowle komórkowe poddaje się inkubacji w sukcesywnych etapach, w temperaturze pomiędzy 30°C a 38°C (optymalna 36°C). Podczas powyższego procesu, wirus rozmnaża się w wielkich ilościach i zostaje osłabiony. Powyższe sukcesywne etapy zostały przeprowadzone przy zastosowaniu rozcieńczonej lub nierozcieńczonej szczepionki (inoculum). Pobierano w różnorodnych odstępach czasu różne próbki. Przeprowadzono następnie, miareczkowanie w hodowlach tkankowych nerki małpy. W odpowiednich okresach czasu, hodowle były traktowane około 1000 TDID₅₀ wirusa prowokującego, mającego właściwości oddziaływania (ECHO₁₁, Bunyamwera, itd.). Hodowle w próbkach nie wykazujące objawów cytopatologicznych prowokującego wirusa — w ciągu 3–4 dni po potraktowaniu, uważane były za zakażone wirusem różyczki. Wirus zbiera się następnie i przechowuje w niskiej temperaturze, aby utrzymać jego zakaźność.

C. Stwierdzono, że wirus różyczki otrzymany po szeregu etapach rozwoju był niepatogeniczny dla

małp i gryzoni, i powodował lekką chorobę u ludzi oraz powstawanie pożądanej ilości neutralizujących przeciwciał. Zdolność infekcyjną wirusa stabilizuje się za pomocą odpowiedniego stabilizatora takiego jak sacharoza, ludzka albumina, glutamina lub fosforan lub ich mieszanina. Po operacji miareczkowania ustalającego jego moc, masę wirusa dzieli się i napełnia nią ampułki przeznaczone do późniejszego użycia. Produkt można przechowywać w stanie zamrożonym w suchym otoczeniu pozbawionym wilgoci.

Poniższe przykłady wyjaśniają bliżej sposób według wynalazku.

Przykład I. Jako wyjściowe inoculum stosuje się materiał otrzymany w sposób opisany w procedurze 1. Embriony kaczki 9–11-dniowe, po odłączeniu głowy i części wystających (odnóżą) dokładnie się rozdrabnia w warunkach aseptycznych, a rozdrobnioną tkankę przemywa szereg razy w świeżym płynie Hanksa BBS. Wymytą tkankę następnie traktuje się 0,25% trypsyną w temperaturze 36°C (Difco 1:250) w mieszaninie trzech soli buforowych (sól trypsynowa), w tym przypadku w ciągu dwóch i pół godzin.

Skład mieszaniny soli:

1,0 litr roztworu

30	NaCl	8,00 g
	KCl	0,38 g
	Na ₂ HPO ₄	0,10 g
	dekstroza	1,00 g
35	trójhydroksymetyloaminometan	3,00 g
	trypsyna	2,50 g

Wartość pH nastawia się na 7,4 przed dodaniem trypsyny. Następnie, zawiesinę komórek potraktowanych trypsyną odsiewa się poprzez dwie grubości wysterylizowanej gazy i odwirowuje przy 1500 obr/min w ciągu 5 minut. Upakowane komórki umieszcza się w ośrodku wzrostowym w celu policzenia. Środowisko wzrostowe składa się ze środowiska 199 (Morgan, J. F. Morton. H. J. and Parker, R. C. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 73:1–8, 1950) zawierającego 2% surowicy cielęcej agamma (Surowica cielęca agamma oznacza surowicę cielęcą, z której usunięto globulinę gamma w procesie frakcjonowania) ogrzewanej w temperaturze 56°C w ciągu 30 minut i 50 mcg/ml neomycyny. Hodowle w butelkach posiewa się w celu otrzymania stężenia 350 000 zdolnych do życia komórek na ml. Po operacji inkubacji w temperaturze 36°C w ciągu 36–48 godzin, hodowle butelkowe można zastosować w seryjnym etapie rozwoju lub do przygotowania szczepionki.

Hodowle tkankowe embrionu kaczki przygotowuje się w szklanych butelkach przy zastosowaniu środowiska 199, zawierającego 2% dezaktywowanej cielęcej surowicy jako środowiska wzrostowego. Trzy do czterech dni po posianiu, odciąga się w aseptycznych warunkach środowisko wzrostowe, a hodowle butelkowe przemywa cztery razy BBS Hanksa, 100 ml na jedno przemycie, a następnie zaszczepia 2,5 milimetrami wyżej wspom-

nianego nierozcieńczonego wirusa różyczki na butelkę. Sześćdziesiąt ml środowiska 199, zawierającego 10% sorbitolu w charakterze stabilizatora zakaźności, dodaje się do każdej hodowli butelkowej, a następnie butelki poddaje się inkubacji w temperaturze 30–34°C. Neomycynę o stężeniu 50 mcg/ml włącza się do środowiska wzrostowego. Przeprowadza się szereg zbiorów w odstępach czasu 2–4 dni, przy czym butelki z hodowlą są powtórnie wypełniane świeżym środowiskiem, zawierającym wyżej wspomniany czynnik stabilizujący. Kolejne etapy rozwoju odbywają się w temperaturze 32°C. Przeprowadza się miareczkowanie zdolności infekcyjnej każdego zbioru w hodowlach tkankowych nerki małpy. Każdy zbiór gromadzi się w warunkach aseptycznych w wysterylizowanym pojemniku. Zostają pobrane próbki do mikrobiologicznych badań wysterylizowania, pozostałość tworzy zamrożoną warstwę w suchej kąpieli zamrożonego alkoholu.

Płyny zawierające wirus są magazynowane w temperaturze –70°C w elektrycznym urządzeniu chłodniczym, przed selekcją odsiewu lub odsiewów po dokonaniu kompletnych operacji miareczkowania mających na celu określenie stopnia zakażenia. Wybrany materiał następnie usuwa się z urządzenia chłodniczego i rozmraża. Przeprowadza się kontrolę i próby bezpieczeństwa próbki. Pozostałą ciecz oczyszcza następnie, a próbkę podaje się próbom bezpieczeństwa na małpach. Do pozostałej cieczy dodaje się dodatkowo odpowiedni czynnik stabilizujący. Ciecze rozprawdza się do poszczególnych ampulek, a następnie suszy. Po procesie osuszenia, ampulki kapsluje się i zatapia z możliwością uzyskania szczepionki po dodaniu wyjałowionej wody. Moc produktu ocenia się na podstawie zdolności infekcyjnej hodowli komórkowych. Dodatkowo osłabiona szczepionka, zaszczepiona małpom pozajelitowo w sposób regularny, powoduje powstawanie dużej ilości specyficznych neutralizujących przeciwciał, które zostają w organizmie w niezmięnionej ilości przez przynajmniej rok.

Doświadczenia z ludźmi. Siedmiorgu dzieciom nie zakażonym uprzednio wirusem różyczki podano pozajelitowo szczepionkę osłabionego wirusa różyczki. W organizmie wszystkich powstała duża ilość neutralizujących przeciwciał (1:16 — 1:64) w okresie jednego miesiąca po szczepieniu. Ilość tych przeciwciał równa się z grubsza ilości, która jest wytwarzana przy rozwoju choroby naturalnej. Niektóre dzieci miały gorączkę niewielką, niewielką i przemijającą wysypkę i klinicznie słabo zaznaczoną limfodemopatię.

Przykład II. Postępuje się jak w przykładzie I, z tym, że inkubacja wirusa różyczki odbywa się w temperaturze około 36°C.

Przykład III. Postępuje się jak w przykładzie II, z tym, że trzy seryjne inkubacje wirusa przeprowadza się w temperaturze 36°C, a następnie siedem w temperaturze 32°C. Aby dodatkowo osłabić wirus, można przeprowadzać więcej niż dziesięć sukcesywnych etapów rozwoju wirusa w hodowli tlenkowej embrionu kaczki. Etapy te

mogą obejmować inkunację w hodowlach w nerkach małpy lub w zapłodnionych jajach kurzych. Jest to zilustrowane w następujących przykładach w których:

GMK oznacza hodowlę nerki małpy
EAM oznacza zapłodnione jaja kurze
DEF oznacza hodowlę tkankową embrionu kaczki

Przykład IV. 2 GMK ÷ 1 EAM ÷ 9 GMK ÷ 5 DEF (36°C) ÷ 5 DEF (32°C)

Przykład V. 2 GMK ÷ 1 EAM ÷ 13 GMK ÷ 2 DEF (36°C) ÷ 8 DEF (32°C)

Przykład VI. 2 GMK ÷ 1 EAM ÷ 17 GMK ÷ 10 DEF (32°C)

Przykład VII. 21 GMK ÷ 3 DEF 36°C) ÷ 7 DEF (32°C)

W wyniku postępowania opisanego w przykładach IV, V, VI i VII otrzymuje się szczepionki których moc przedstawiono w poniższym zestawieniu. Moc szczepionki wyrażona jest w postaci miana zakaźności, które odpowiada stężeniu zakażającego drobnoustroju w środowisku. Miano to można określić również jako minimalną dawkę zakażającą kulturę tkankową. Zazwyczaj określa się je jako odwrotność rozcieńczenia.

Jednostka TCID₅₀ (dawka zakażająca kulturę tkankową w odniesieniu do 50%) jest miarą stężenia wirusa. Tak więc np. sporządza się dwukrotne rozcieńczenie zawiesiny wirusowej, której miano ma się określić i bada się ich stopień zakaźności tkanek, przy czym dla każdego rozcieńczenia stosuje się kilka próbek. Za jednostkę zakaźności przyjmuje się dawkę wirusa w takim rozcieńczeniu, które wywołuje rozpad tkanek w połowie próbek. Miano wyrażone w TCID₅₀ na ml zawiesiny oblicza się jako wielokrotność tej dawki.

Przykład	Moc (TCID ₅₀)
IV	10–2.5/1,0 ml
V	10–4.0/1,0 ml
VI	10–2.5/1,0 ml
VII	10–2.8/1,0 ml

Wynalazek został opisany w odniesieniu do dziesięciu seryjnych etapów przejścia przez DEF, w celu zapewnienia osłabienia wirusa, lecz może okazać się wystarczająca również mniejsza ich ilość.

Wynalazek może także obejmować pojedynczy proces inkubacji w DEF w celu osiągnięcia żądanej formy wirusa, który spowoduje powstanie przeciwciał w organizmie, przeciwdziałających ciężkim objawom choroby. Można oczekiwać, że następne etapy rozwoju po procesie pierwszego wzrostu w DEF mogą dać w wyniku zwiększone osłabienie 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 kaczki lub hodowli tkankowej nerki małpy i inkubację tej hodowli w temperaturze 30—38°C, następnie sukcesywnie pasażuje się wymieniony wirus dostateczną ilość 5 razy w środowiskach hodowlanych w celu osłabienia wirusa, przy czym przynajmniej dziesięć z wymienionych pasażów dokonuje się w środowiskach zawierających hodowlę pokrajanego i potraktowanego trypsyną dziesięcio- lub jedenasto- 10 dniowego, pozbawionego głowy i kończyn embrionu kaczki, w środowisku wzrostu komórek, w temperaturze 30—38°C, a jednocześnie po każdym wymienionym pasażu przeprowadza się oznaczenie zdolności zakażenia na zbiorach próbnym w od- 15

stępach 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 kaczki.

3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że 10 inkubację prowadzi się na etapie pasażowania w temperaturze 35—38°C.

4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że 15 inkubację prowadzi się na etapie pasażowania w temperaturze 30—34°C.