



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 18.09.1969 (P. 135883)

Pierwszeństwo: 19.09.1968 Stany
Zjednoczone
Ameryki

Zgłoszenie ogłoszono: 30.05.1973

Opis patentowy opublikowano: 28.02.1976

MKP C12k 5/00

Int. CL². C12K 5/00

CZYTELNIA

Urzędu Patentowego
Państwa Republiki Polskiej

Twórcy wynalazku: Maurice R. Hilleman, Alfred A. Tytell, Allen
F. Woodhour

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

Sposób wytwarzania szczepionki przeciw grypie

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania szczepionki przeciw grypie, zawierającej antygeny i substancję pomocniczą.

Antygeny są substancjami, które stymulują wytwarzanie przeciwciał, te zaś stanowią ważny element mechanizmu obronnego ciała przeciwko procesom infekcyjnym i alergicznym. Ostrożne użycie substancji antygenowych może wywołać w żywym organizmie zjawisko jego uodpornienia i odczulenia. W tym celu stosuje się odpowiednie szczepionki, preparaty alergenowe i tym podobne. Często jednak napotyka się w praktyce przy stosowaniu substancji antygenowych na trudności, uzyskując tylko słabe lub zadowalające wyniki wzbudzenia reakcji antygenowej. Trudności tych można uniknąć stosując substancje znane jako substancje pomocnicze, które mają zdolność zwiększania efektu antygenowego. Według wynalazku szczepionkę wytwarza się dodając substancje, które w połączeniu z substancjami pomocniczymi jeszcze bardziej potęgują ich działanie.

Braun i Nakano w swej pracy opublikowanej w Science, 157 (1967), 819, opisali wyniki stosowania pewnych polinukleotydów jako stymulatorów mechanizmu uodporniania. Zaobserwowali oni, że pewne związki kompleksowe polinukleotydów zwiększają początkową szybkość wzrostu liczby komórek śledziony produkujących przeciwciała u myszy uodpornionych za pomocą czerwonych

2

ciałek krwi owczej lub innych określonych antygenów.

Badania prowadzone nad opracowaniem nowych sposobów wytwarzania preparatu według wynalazku, wykazały, że dodanie wysoko cząsteczkowego polinukleotydu do wodnego roztworu szczepionki, albo nie daje efektu stymulującego albo obniża wytwarzanie antyciał.

Braun i Nakano [Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 119, 701—705 (1965)] opublikowali również wyniki badań, wykazujących, że oligodezoksyrybonukleotydy, o 2—5 jednostkach nukleotydów mogą stymulować wytwarzanie przeciwciał wobec antygenów w ciągu tylko około 48 godzin po podaniu i że obecność wysokocząsteczkowych oligodezoksyrybonukleotydów może kolidować z aktywnością stymulującą.

Doświadczenia prowadzone zgodnie z wynalazkiem wskazywały, że oligodezoksyrybonukleotydy nie wzmagają aktywności znanych środków pomocniczych. Z drugiej strony dodanie materiału polinukleotydowego w nowych preparatach typu szczepionek zwiększa wytwarzanie antyciał do poziomu znacznie wyższego od osiąganego przez samą szczepionkę z środkiem pomocniczym, przy czym poziom antyciał utrzymuje się w ciągu dłuższego okresu czasu, od poziomu uzyskiwanego przez znane typy szczepionek lub szczepionki z środkami dodatkowymi.

Według wynalazku szczepionkę przeciw grypie wytwarza się następująco:

Do szczepionki zawierającej antygen i środek pomocniczy w postaci emulsji dodaje się w ilości od 1 mikrograma do 10 miligramów materiał polinukleotydowy, taki jak homopolimer, wybrany z grupy składającej się z poli I, poli C, poli A, poli U, poli X, poli G i poli DHU o ciężarze cząsteczkowym $1 \times 10^5 - 1,5 \times 10^6$, podwójnie skręconego kompleksu dwóch polimerów, kopolimeru przemiennego, takiego jak poli IC, poli AU, poli AI, poli IU, poli CU, poli AC, poli GU, poli AG o ciężarze cząsteczkowym $1 \times 10^5 - 1,5 \times 10^6$, występującego w postaci naturalnej DS — RNA o ciężarze cząsteczkowym $1 \times 10^5 - 1,5 \times 10^6$, hybrydu podwójnie skręconych polimerów, takich jak poli G:dc, poli dG:C, poli I:dc i poli dI:C, przy czym każdy z homopolimerów poli dC, poli dG i poli dI ma ciężar cząsteczkowy $1 \times 10^5 - 1,5 \times 10^6$ i chemicznie przemiennego homopolimeru, takiego jak poli N₁ -metyloadenylan, poli „6-metyloadenylan”, poli N₇ -metyloinozynian, poli N₇ -metyloguanylan, poli 5-metylourydylan, poli 5-fluorourydylan, poli 5-bromourydylan, poli 5-jodourydylan, poli 5-bromocytydylan i poli 5-jodocytydylan.

Kolejność łączenia z sobą składników szczepionki nie wpływa absolutnie na synergizm. W związku z tym można również według wynalazku najpierw połączyć materiał polinukleotydowy z środkiem pomocniczym, a następnie połączyć z antygenem. Wyniki w obu przypadkach otrzymuje się analogiczne.

Jako podwójnie skręcony kompleks dwóch polimerów stosuje się poli I:C lub A:U.

Połączenie materiału polinukleotydowego z środkiem pomocniczym daje w rezultacie wzmoczoną reakcję immunologiczną, podczas gdy reakcja antyciał w stosunku do wodnego typu antyciał jest hamowana przez rodzaj i ilość polinukleotydów. Tak więc uzyskany poziom antyciał jest większy od otrzymywanego przez stymulującą obecność samego materiału polinukleotydowego lub przez sam środek pomocniczy.

Stosowane według wynalazku środki pomocnicze są znanymi w immunologii dodatkami typu emulsyjnego. Takimi znanymi emulsjami są emulsje typu woda/olej roślinny, woda/olej mineralny i olej roślinny/woda. Wszystkie w zasadzie znane oleje roślinne można stosować do preparatów iniekcyjnych zgodnie z Farmakopeą St. Zjedn. Am., a więc takie jak, olej z orzechów ziemnych, olej kukurydziany, olej z oliwek, olej sezamowy, olej „chaulmoogra”, olej z ziarn bawełny, olej z słodkich migdałów, olej perski itd.

Antygeny użyteczne w sposobie według wynalazku można stosować z środkiem pomocniczym emulsyjnym i mogą być w postaci antygenów czystych lub częściowo oczyszczonych, pochodzących z organizmów bakterii, wirusów, bakterii typu pleuropneumonia (PPLO), riketsji lub ich produktów, lub antygen może być alergenem, takim jak pył, zdenerwowanie lub w postaci trucizny lub jadu. We wszystkich przypadkach antygeny występujące w postaci, w której ich właściwości toksyczne i złośliwe są zmniejszone lub rozłożone,

wprowadzone do organizmu żywego wzbudzają aktywne uodpornienie przez wytworzenie się antyciał wobec tych mikroorganizmów w postaci ekstraktu lub produktów mikroorganizmów użytych w preparacie antygenowym, a w przypadku alergenów powstaje złagodzenie alergii. Antygeny stosuje się pojedynczo albo w połączeniu, np. można stosować antygeny wielu bakterii, wielu wirusów, wielu riketsji, wielu trucizn bakteryjnych lub wirusowych. Wiele alergenów lub połączenia tych antygenów można wprowadzać do wodnej fazy środka pomocniczego. Szczególnej wagi antygenami są te, które pochodzą z bakterii takich jak H. pertussis Leptospira pomona i icterohaemorrhagiae, S. typhosa, S. paratyphi A i B, C. tetani, C. botulinum, C. perfringens, C. Feseri i innych bakterii zgorzeli gangrenowej, B. anthracis, P. pestis, P. multocida, V. cholerae itp. z wirusów, takich jak poliovirus (typ wielokrotny), adenowirus (typy wielokrotne), wirus parainfluenzy (typy wielokrotne), wirus odry, świnki, wirus zespólni oddechowej, grypy (różne typy), wirusa gorączki (SP 4), wirusa zachodniej lub wschodniej encefalomyelitis, Japanese B. encefalomyelitis, Rosyjska wiosenno-letnia encefalomyelitis, wirusa cholery u świń, wirusa choroby Newcastle, wirusa zakaźnej choroby wysypkowej u drobiu, u królików, wirusa nosówki kocięj i psiej itp., z riketsji epidemicznego i endemicznego tyfusu i z grupy innych wirusów powodujących gorączkę z jądów pajków i węży lub innych znanych alergenów, np. z szmat, kurzu domowego, pyłku kwiatowego, pyłku drwa itp.

Materiałem polinukleotydowym stosowanym według wynalazku są homopolimery, podwójnie skręcone kompleksy homopolimerów, kopolimery przemiennne, kopolimery o przypadkowym rozmieszczeniu, podwójnie skręcone, występujące w stanie naturalnym kwasy rybonukleinowe, hybrydowe podwójnie skręcone kompleksy homopolimerów i chemicznie przekształconych polinukleotydów.

Homopolimerami występującymi w preparatach według wynalazku są polinukleotydy takie, jak kwas poliinozynowy (I), kwas policytydylowy (C), kwas poliadenylowy (A), kwas poliurydylowy (U), kwas poliksantylowy (X), kwas poliguanylowy (G) i kwas polidehydrourydylowy (DHU). Związki te są dobrze znane w tej dziedzinie, łatwo dostępne w handlu i wykazują obszar ciężarów cząsteczkowych trudny do dokładnego określenia. Badania wykazują, S₂₀^w o wartościach od około 3 do około 12, co wskazuje na ciężar cząsteczkowy od w przybliżeniu 1×10^5 do $1,5 \times 10^6$.

Podwójnie skręcone kompleksowe homopolimery są kompleksami utworzonymi z dwóch różnych homopolimerów, jako takie można wymienić poli I:C i poli A:U, jako kompleksy kwasu poliinozynowego (I) i kwasu policytydylowego (C) oraz kompleksu kwasu poliadenylowego (A) i kwasu poliurydylowego (U). Wynalazek obejmuje wszystkie możliwe ich kombinacje. Podwójnie skręcane kompleksy i ich wytwarzanie jest dobrze znane fachowcom. Zwykle stosowany sposób polega na zmieszaniu dwóch wybranych homopolimerów w

ilościach równoważnikowych w solance buforowanej fosforanem, o wartości $\text{pH} = 7,0$ (0,006 mola fosforanu sodowego i 0,015 mola chlorku sodu). Kompleks powstaje natychmiast po zmieszaniu, co wskazuje efekt hipochromowy.

Kopolimery przemienne stosowane w sposobie według wynalazku, są kopolimerami dwóch różnych nukleotydów, w których dwie zasady azotowe występują w sposób regularnie przemienny, określa się je jako poli CU, poli IU, poli AC, poli GU, poli AG, poli IC, poli AU, poli AI itd., co oznacza przemienne kopolimery C i U, I oraz U, A i C, G i U, A i G, I i C, A i U oraz A i I. Tego typu kopolimery są również znane fachowcom w tej dziedzinie i można je wytworzyć przez działanie polimerazą RNA. W tym przypadku ciężary cząsteczkowe homopolimerów nie są jednolite i wynoszą od 1×10^5 do $1,5 \times 10^6$. Polimery te naśladują działanie podwójnie skręconych kompleksów homopolimerów przez podwójne skręcanie poprzez wiązanie wodorowe dopełniających zasad.

Według wynalazku stosuje się również występujący w stanie naturalnym podwójnie skręcony kwas rybonukleinowy (Ds-RNA) o ciężarze cząsteczkowym od 1×10^5 do $1,5 \times 10^6$. Jest to znany produkt, wytwarzany również w znany sposób.

Hybrydowe podwójnie skręcane polimery stosowane według wynalazku są podobne do kompleksowych homopolimerów wyżej opisanych, lecz różnią się tym, że jeden z homopolimerów jest polidezoksyrybonukleotydem adeniny (dA), tyminy (dT), cytozyny (dC), uracylu (dU), hypoksantyny (dI) lub guaniny (dG), o ciężarze cząsteczkowym o zakresie od 1×10^5 do $1,5 \times 10^6$. Te polidezoksyrybonukleotydy są znanymi związkami i hybrydowe podwójnie skręcone polimery, takie jak poli G:dC, poli dG:C i poli dI:C są znanymi kompleksami i wytwarza się je w sposób podobny do podwójnie skręconych kompleksowych polimerów.

Chemicznie przekształcone polinukleotydy stosowane w sposobie według wynalazku są znanymi związkami, takimi jak poli N_1 -metyloadenylan, poli „6-metyloadenylan”, poli N_7 -metyloinozynylan, poli N_7 -metyloguanylan, poli 5-metylourydylan, poli 5-fluorourydylan, poli 5-bromourydylan, poli 5-jodourydylan, poli 5-bromocytydylan i poli 5-jodocytydylan.

Wytwarzanie nowych szczepionek według wynalazku polega na zmieszaniu trzech komponentów: środka dodatkowego, wodnego antygenu i materiału polimerycznego w odpowiednich ilościach, w sposób konwencjonalny.

Stężenie polimerów wynosi od mikrograma do poniżej poziomu, który wykazuje toksyczność tkanki w organizmie ludzkim lub zwierzęcym, to jest do około 10 mg/dawka. Dawka waha się w zależności od organizmu, od natury środka dodatkowego, wybranego polinukleotydu i antygenu.

Stężenie antygenu w każdym poszczególnym preparacie, zawierającym substancję pomocniczą, można nastawić na poziomie równym preparatowi wodnemu, uzyskując wzrost reakcji przeciwciał dzięki działaniu substancji pomocniczej, lub też stęże-

nie to można ograniczyć do poziomu niższego niż w preparacie wodnym w celu zaoszczędzenia antygenu, zachowując aktywność antygenową porównywalną z aktywnością preparatu wodnego. Wskutek tego widoczne korzyści wynikające z działania substancji pomocniczej zostają zaakcentowane przez późniejszy dodatek polinukleotydów.

Braun i Nakano (Science 157, 819 (1967)) stwierdzili, że stosowanie polinukleotydów jest immunologicznie korzystne, gdyż przez ich połączenie z antygenem uzyskuje się wzrost szybkości tworzenia się przeciwciał. Ważną cechą wynalazku stanowi fakt, że aktualna ilość pobudzonych przeciwciał ulega synergistycznie zwiększeniu, jeśli polinukleotydy połączy się z substancjami pomocniczymi. Jak stwierdzono wyżej, nadzwyczaj mały dodatek wybranego polinukleotydu do szczepionki znanego typu, to jest sporządzonej z antygenu i substancji pomocniczej, powoduje synergistycznie wzrost reakcji przeciwciał. Ten stymulacyjny efekt działania polinukleotydu można uzyskać, stosując go w ilości wynoszącej od ułamka mikrograma do dziesięciu miligramów na aplikowaną dawkę jednostkową.

W niżej podanych przykładach występują jako antygeny wirusy grypy oznaczone odpowiednimi symbolami.

Terminologia wirusów przez dłuższy czas była nieuporządkowana. Wynikało to z dużej dowolności określeń stosowanych przez różnych badaczy wirusów. W wielu przypadkach używano do tego celu inicjałów lub nazwisk pacjentów, w innych wskazywano miejsce wyizolowania wirusa lub numer nadany w laboratorium. Prowadziło to do licznych rozbieżności. Andrewes, Bang i Burnett uznali, że wirusy grypy, świnki (mumsa), choroby Newcastle i pomoru ptasiego posiadają dostateczną ilość wspólnych właściwości, uzasadniających ich zaklasyfikowanie do wspólnej grupy Myxovirus. Grupa ta dzieli się na dwie podgrupy, przy czym wirus grypy jest zaliczany do pierwszej podgrupy. Klasyfikacja wirusów jest oparta na fizyko-chemicznych właściwościach składnika rybonukleoproteinowego wirusa. Identyfikacja wirusa grypy uzależniona jest od stwierdzenia, czy jego antygen S, występujący w zainfekowanej tkance, odpowiada klasycznym typom. Ponieważ antygen S nigdy nie spotyka się w tkance niezainfekowanej wirusem grypy, jego obecność w serum jest uważana za absolutny dowód uprzedniej infekcji wirusem grypy. Antygen S jest bardzo trwały i łatwy do wykrycia. Jego właściwości stanowią doskonałą podstawę do podziału na 3 typy A, B i C. Te trzy typy dzielą się dalej na podtypy zgodnie z właściwościami serologicznymi kompleksu antygenu V, który jest związany z zewnętrznym składnikiem cząstki wirusa. Te dane doprowadziły do przyjęcia nowego systemu określania wirusów. W tym układzie na pierwszym miejscu wskazuje się typ serologiczny (np. A), oparty na właściwościach składnika rybonukleoproteinowego (antygen S) po czym kolejno wymienia naturalnego gospodarza (ludzie, zwierzęta, ptactwo), serologiczny podtyp (antygen V), miejsce wyizolowania,

numer seryjny wyizolowanego szczepu oraz rok jego wyizolowania. Tak więc np. pierwotny szczep WS będzie określony jako A/human O/London/1/33, a pierwotny szczep azjatycki — A/human 2/Singapore/1/57.

System ten nie jest doskonały. Miejsce wyizolowania wirusa bywa przez różnych badaczy podawane dowolnie jako kraj lub miasta. Numer seryjny jest prawie zawsze dla większości celów zbędny i zwykle jest opuszczany. Naturalnego gospodarza też zwykle pomija się, jeśli infekcje występują wyłącznie wśród ludzi, np. w przypadku wirusa grypy.

Na tych zasadach oparta jest terminologia stosowanych w niżej podanych przykładach wirusów jako antygenów.

Niżej podane przykłady wyjaśniają bliżej wynalazek.

Przykład I. Środek pomocniczy 65 przygotowany przez zmieszanie 86% objętościowych oczyszczonego oleju arachidowego, 10% objętościowych jednoolęinianu mannitu (Arlacel A) i 4% objętościowych jednostearynian glinu. Wodną szczepionkę wirusa grypy, zawierającą 4800 CCA (aglutynacja komórek kurczęcia) na 1 ml antygenów wirusa grypy A₂ (Japonia) 170/62, 800 CCA/ml; A₂ (Taiwan) 1/64, 800 CCA jednostek (ml; A/PR) 8/34, 1600 CCA jednostek/ml; i B (Mass) 3,66, 1600 CCA jednostek/ml lub 1200 CCA jednostek antygenów wirusa grypy na 1 ml. Utworzono emulsję wodną w oleju zawierającą końcowe stężenie antygenów 600 CCA jednostek/0,5 ml lub 150 CCA jednostek/0,5 ml.

Sporządzono również antygenowo porównywalną szczepionkę wodną.

Każdą ze szczepionek stosowano z polinukleotydem (poli- I:C lub poli A:U), jak wskazują tablice Ia—Id, lub bez polinukleotydu. Gdy polinukleotydy były dodane, stężenie ich wynosiło 260 mg/dawka.

Preparaty te wstrzykiwano domięśniowo świnkom morskim w dawce jednorazowej 600 CCA jednostek (tablica Ia) lub dwukrotnie w odstępie miesiąca (tablica Ib), lub w dawce jednorazowej 150 CCA jednostek (tablica Ic), lub dwukrotnie w odstępie miesiąca (tablica Id).

Wszystkim zwierzętom pobrano krew bezpośrednio przed szczepieniem oraz w odstępach miesięcznych przez nieograniczony okres czasu.

Surowiec poddawano badaniom serologicznym na zawartość przeciwciał metodą inhibicji procesu aglutynacji czerwonych ciałek krwi (metodą HI). Wyniki przedstawiono w tablicach Ia—Id. Wskazują one na to, że polinukleotydy nie zwiększają działania antygenowego szczepionki grypy typu wodnego, jeśli się ją aplikuje tylko w jednej dawce, natomiast zauważa się pewien wzrost po szczepieniu dwukrotnym. Z drugiej strony szczepionka z substancją pomocniczą 65 bez dodatku polinukleotydów i zastosowana w jednej lub dwóch dawkach podwyższa antygenowość i pobudza wytwarzanie przeciwciał do poziomu o wiele wyższego, niż uzyskiwany po zastosowaniu szczepionki typu wodnego. Dodatek polinukleotydów do

szczepionki zawierającej substancję pomocniczą 65 jeszcze bardziej wzmacnia działanie tej substancji pomocniczej. Wszystkie typy wirusa grypy użyte w różnych preparatach, zachowywały się podobnie.

Z tablic Ic i Id widocznym jest, że wprowadzenie poli A:U do szczepionki całkowicie hamuje reakcję antyciał wobec wszystkich czterech antygenów wirusa grypy po jednym lub dwóch szczepieniach. Z drugiej strony dodanie poli I:C do szczepionki ani nie hamuje ani nie pobudza reakcji antyciał w porównaniu do reakcji antyciał w przypadku samej szczepionki. Aktywność środka dodatkowego 65 jest jasno wykazana jako dalsze zwiększenie reakcji antyciał przez dodanie polinukleotydów.

Przykład II. Środek pomocniczy 65 szczepionki zawierający lub bez poli I:C (240 mg/dawka) lub szczepionki typu grypy sporządzono, jak w przykładzie I, tak że zawierał 600 CCA jednostek antygenów wirusa grypy i zaszczepiono domięśniowo afrykańskie małpy zielone. Zwierzętom badano krew bezpośrednio przed szczepieniem i w miesiąc po szczepieniu. Serum badano serologicznie na HI reakcję antyciał. Wyniki są podane w tablicy II, z której widocznym jest, że szczepionka z substancją pomocniczą odznaczała się wspomagającym działaniem antygenów grypy bez dodatku kompleksu polinukleotydowego w stosunku do samej szczepionki. Efekt ten znacznie zwiększyło dodanie do szczepionki poli I:C, przy czym wszystkie szczepy wirusa grypy zachowywały się podobnie.

Przykład III. Oczyszczoną trójskładnikową szczepionkę grypy (B) Mass, A₂ (Japan) 170 i A₂ (Taiwan) zemulgowano niepełnym środkiem pomocniczym Freuda, zawierającym lub bez poli I:C i wytworzono szczepionkę z lub bez poli I:C. Świnki morskie zaszczepiono domięśniowo raz lub dwukrotnie dawką o zawartości 600 CCA jednostek wirusa i 263 µg poli I:C, zwierzętom badano krew bezpośrednio przed szczepieniem i każdego miesiąca po szczepieniu. Serum badano serologicznie metodą HI.

Wyniki podane w tablicy III, wykazują bardzo efektywną aktywność niepełnego środka pomocniczego Freuda. Zwiększony efekt jest oczywisty. Znowu nie było zwiększenia antygenowego w przypadku szczepionki z dodatkiem poli I:C.

Przykład IV. Postępowano jak w przykładzie III, z tym, że środek pomocniczy Freuda (emulsja woda/olej mineralny) zastąpiono emulsją oleju roślinnego w wodzie, składającą się z 9 części oczyszczonego oleju z orzechów ziemnych, 0,4 części Arlacel A i 0,6 części Tween 60 zemulgowanych taką samą objętością wodnej szczepionki.

Wyniki podane w tablicy IV wskazują na bardzo nieznaczny efekt środka pomocniczego typu emulsji olej/woda w stosunku do wodnej szczepionki z obu szczepami A₂ wirusa grypy lecz bez szczepu B. Jednakże dodanie poli I:C do emulsji olej/woda wykazało zasadniczą aktywność środka pomocniczego wobec wszystkich antygenów.

Przykład V. Trójskładnikową szczepionkę wirusa grypy (A₂/Japan) 170, A₂/Taiwan i B(Mass)

typu wodnego, z ałunem jako środkiem pomocniczym lub szczepionkę z środkiem pomocniczym 65, przy różnych kombinacjach i różnych koncentracjach, poli I, poli C i poli I:C, szczepiono domięśniowo świnki morskie (10 zwierząt w grupie) dawką 600 CCA jednostek. Zwierzętom badano krew bezpośrednio przed szczepieniem i w miesiąc potem, serologicznie metodą SHI. Właściwości dawki i wyniki miana antyciał HI podano w tablicy V.

Tablica ta wskazuje, że 260 mg poli I całkowicie hamuje aktywność antygenową wirusów A i B typu grypy stosowanych w wodnym preparacie. Podwójna redukcja poli I, zasadniczo eliminuje działanie hamujące. Nie występowała ani aktywność hamująca ani pobudzająca, wywoływana przez poli C lub połączone poli I:C, przy zastosowaniu z szczepionką typu wodnego. Nieco inną sytuację stwierdzono przy stosowaniu szczepionki z ałunem. Wystąpił wówczas wzrost aktywności antygenicznej szczepionki z ałunem jako środkiem pomocniczym bez polinukleotydu, w stosunku do szczepionki typu wodnego. Dodanie poli I, poli C lub poli I:C ani nie zahamowało ani nie zwiększyło aktywności ałunu jako środka pomocniczego z każdym z pośród szczepów wirusa grypy. Aktywność antygenowa szczepionki z środkiem pomocniczym 65 bez polinukleotydu była większa niż szczepionki wodnej lub szczepionki z ałunem.

Nie zaobserwowano znaczącego wzrostu zwiększenia działania antygenowego z jakimkolwiek szczepem wirusa grypy przez dodanie samego poli I lub poli C. Dodanie kompleksu poli I:C znacznie zwiększyło aktywność antygenową, pobudzającą wytwarzanie antyciał do poziomu daleko wyższego od osiąganego za pomocą szczepionki typu wodnego lub szczepionki z ałunem jako środkiem pomocniczym.

Przykład VI. Siedmioskładnikową szczepionkę dróg oddechowych zawierającą wirus grypy B (Maas) 100 CCA (dawka), wirus grypy A₂ (Taiwan) 100 CCA (dawka) wirus parainfluenzy typu 1/2 × 10¹⁰ cząstek (dawka) wirus paragrypy typu 2/2 × 10¹⁰ cząstek (dawka), wirus paragrypy typu 3/2 × 10¹⁰ cząstek (dawka) wirus syncytialowy dróg oddechowych /2 × 10¹⁰ cząstek (dawka) i Mycoplasma pneumoniae (Eaton PPLO, 35 µg, DNA) + (dawka) wytworzono jako szczepionkę z środkiem pomocniczym 65, o zawartości 260 µg (dawka) poli I:C i bez poli I:C. Szczepionkę szczepiono domięśniowo świnki morskie (6 zwierząt w grupie). Zwierzętom badano krew w dniu zerowym

i następnie co miesiąc. Serum badano serologicznie na antyciała w sposób wskazany w tablicy VI.

Wyniki podano w tablicy VI wskazywały, że dodanie poli I:C zwiększało aktywność środka pomocniczego ze wszystkimi komponentami szczepionki.

Przykład VII. Postępując na ogół w sposób opisany w przykładzie I, różne połączenia trójskładnikowej wodnej szczepionki wirusa grypy /A₂ (Japan) 170, A₂ (Taiwan i B/Mass), lub szczepionkę z środkiem pomocniczym 65 bez lub z poli I:C w różnych stężeniach zaszczepiano domięśniowo świnkom morskim (12 zwierząt w grupie). Próby na zahamowanie hemoaglutynacji antyciał przeprowadzono na surowicy krwi pobranej przed rozpoczęciem badań i w 1 miesiąc później: charakter dawki i wyniki prób serologicznych podano w tablicy VII, z której widocznym jest, że dodanie ilości tak małej jak 2,6 µg poli I:C na dawkę znacznie zwiększało aktywność szczepionki wirusa grypy typu A, nawet wtedy gdy stosowano ją w stężeniu tak małym, jak 10 CCA jednostek. Szczep B wirusa grypy nie dawał takiej reakcji w tych samych warunkach. Stosowanie tak małych ilości jak 2,6 µg poli I:C znacznie zwiększa aktywność obu szczepów A:B wirusa grypy, gdy używa ich się w tak małym stężeniu jak 5 CCA jednostek na dawkę. Zaobserwowano, że nieznaczna korzyść daje zwiększenie stężenia poli I:C z szczepem typu B wirusa grypy, która nie występuje przy użyciu szczepu typu A.

Szereg przeprowadzonych badań dotyczących przypadków, w których zastąpiono wirusy i Mycoplasma pneumoniae stosowane w przykładach I—VII innymi znanymi antygenami ludzkimi i zwierzęcymi, w celu wytworzenia szczepionek do stosowania ludziom i zwierzętom, zawierającym dodatkowo oprócz antygeny i środka pomocniczego polinukleotyd lub kompleks polinukleotydowy, dał wyniki pozytywne.

Podobnie inne przykłady dotyczące przypadków, w których kompleksy homopolimerów i homopolimery z przykładów I—VIII zastąpiono równoważnymi ilościami funkcjonalnie równoważnikowych przemiennych kopolimerów, kopolimerów o przypadkowym rozmieszczeniu, podwójnie skreślonych występujących w stanie naturalnym kwasów rybonukleinowych, hybrydowych podwójnie skreślonych kompleksów homopolimerów i chemicznie przemienionych polinukleotydów świadczą korzystnie o szczepionkach, otrzymywanych sposobem według wynalazku.

Tablica Ia

Reakcje przeciwciał świnek morskich na 1 zastrzyk 600 jednostek CCA szczepionki wirusa grypy użytej w różnych zestawieniach

Preparat szczepionki wirusa grypy	Średnia geometryczna HI miana przeciwciał w poszczególnych miesiącach									
	A/PR/S					A2/Jap/170				
	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
Wodny	1*	69	64	9	11	1	8	6	9	8

c. d. tablicy Ia

Wodny + poli A:U	1	80	40	20	17	1	5	8	20	11
Wodny + poli I:C	1	69	30	14	9	1	15	2	13	6
Środek pomocniczy 65	1	548	208	69	32	1	181	111	91	49
Środek pomocniczy 65 + poli A:U	1	546	320	128	64	1	256	274	158	128
Środek pomocniczy 65 + poli I:C	1	832	416	223	137	1	631	274	223	194
A2/Taiwan						B/Mass				
	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
Wodny	1	5	2	3	5	1	5	1	2	1
Wodny + poli A:U	1	5	4	15	6	1	8	1	3	2
Wodny + poli I:C	1	8	1	5	6	1	7	23	1	2
Środek pomocniczy 65	1	80	91	97	56	1	91	34	5	20
Środek pomocniczy 65 + poli A:U	1	137	274	194	128	1	137	111	97	69
Środek pomocniczy 65 + poli I:C	1	631	274	223	194	1	776	239	223	194

*) Wszystkie miana wyrażono jako odwrotność rozcieńczenia surowicy.

Tablica Ib

Reakcje przeciwciał u świnek morskich po 2 zastrzykach po 600 jednostek CCA miesięcznie tej samej szczepionki wirusa grypy użytej w różnych zestawieniach

Preparat szczepionki wirusa grypy	Średnia geometryczna HI miana przeciwciał w poszczególnych miesiącach									
	A/PR/8					A2/Jap/170				
	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
Wodny	1	56	64	12	9	1	14	34	34	17
Wodny + poli A:U	1	60	137	28	18	1	1	51	28	34
Wodny + poli I:C	1	52	160	45	28	1	12	239	104	69
Środek pomocniczy 65	1	446	388	137	56	1	239	320	223	160
Środek pomocniczy 65 + poli A:U	1	640	416	223	181	1	223	320	388	194
Środek pomocniczy 65 + poli I:C	1	640	724	362	239	1	512	640	478	362
A2/Taiwan						B/Mass				
	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
Wodny	1	7	11	11	9	1	10	23	8	5
Wodny + poli A:U	1	1	40	28	24	1	7	52	39	16
Wodny + poli I:C	1	7	69	60	49	1	11	45	34	28
Środek pomocniczy 65	1	119	208	223	111	1	104	160	223	111
Środek pomocniczy 65 + poli A:U	1	181	320	548	223	1	274	548	274	181
Środek pomocniczy 65 + poli I:C	1	320	548	416	320	1	274	274	416	239

Tablica Ic

Reakcja przeciwciał u świnek morskich na 1 zastrzyk 150 jednostek CCA szczepionki wirusa grypy użytej w różnych zestawieniach

Preparat szczepionki wirusa grypy	Średnia geometryczna HI miana przeciwciał w poszczególnych miesiącach									
	A/PR/8					A2/Jap/170				
	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
Wodny	1	64	45	8	6	1	7	10	11	9

c.d. tablicy Ic

Wodny + poli A:U	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Wodny + poli I:C	1	40	34	5	6	1	12	2	13	7
Środek pomocniczy 65	1	478	181	28	28	1	97	181	64	40
Środek pomocniczy 65 + poli A:U	1	388	223	79	40	1	256	80	80	56
Środek pomocniczy 65 + poli I:C	1	546	362	128	119	1	549	388	181	137
A2/Taiwan						B/Mass				
	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
Wodny	1	7	3	6	10	1	8	1	2	2
Wodny + poli A:U	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Wodny + poli I:C	1	4	2	6	3	1	6	1	3	2
Środek pomocniczy 65	1	45	56	56	40	1	40	24	20	28
Środek pomocniczy 65 + poli A:U	1	160	80	64	56	1	64	223	64	28
Środek pomocniczy 65 + poli I:C	1	320	274	194	160	1	223	128	111	60

Tablica II

Reakcja przeciwciał u małp na jednorazowe szczepienie 600 CCA szczepionki wodnej wirusa grypy lub preparatem z środkiem pomocniczym 65 z lub bez polinukleotydów

Preparat szczepionki wirusa grypy	Średnia geometryczna HI miana przeciwciał w poszczególnych miesiącach													
	A2/Jap/170							A2/Taiwan						
	0	1	2	3	4	5	6	0	1	2	3	4	5	6
wodny	1*	12	1	1	1	1	1	1	4	2	2	1	1	1
środek pomocniczy 65	1	160	80	86	26	12	7	1	16	70	70	26	9	9
środek pomocniczy 65 + poli I:C	1	557	735	243	137	80	60	1	557	485	279	137	80	69
	A/PR/8							B/Mass						
	0	1	2	3	4	5	6	0	1	2	3	4	5	6
	1	10	2	3	1	1	3	1	3	1	1	1	1	1
środek pomocniczy 65	1	243	92	70	30	12	17	1	211	121	92	26	18	30
środek pomocniczy 65 + poli I:C	1	557	965	422	208	119	104	1	640	965	485	208	160	137

*/ — Odwrotność rozcieńczenia początkowego surowicy

W/O — emulsja woda/olej

Tablica III

Reakcje przeciwciał u świnek morskich po jednorazowym zastrzyku 600 CCA jednostek szczepionki wirusa grypy, użytej w różnych zestawieniach

Preparat szczepionki wirusa grypy	Średnia geometryczna HI miana przeciwciał w poszczególnych miesiącach											
	A2/Jap./170				A2/Taiwan				B/Mass			
	0	1	2	4	0	1	2	4	0	1	2	4
Wodny	1*	9	6	6	1	28	20	20	1	6	7	7
Wodny + poli I:C	1	11	8	9	1	42	30	32	1	6	3	5

c. d. tablicy III

Olej mineralny **) (W/O)*	1	548	1096	1024	1	1096	1436	1096	1	776	1434	1946
Olej mineralny + poli I:C (W/O)	1	388	2355	1741	1	766	3072	2510	1	1260	4383	2510

*) W/O = emulsja woda/olej

**) Olej mineralny = niepełna emulsja typu Freuda

*) Odwrotność rozcieńczenia początkowego surowicy

Tablica IV

Reakcje przeciwciał u świnek morskich po jednorazowym zastrzyku 600 CCA jednostek szczepionki wirusa grypy, użytej w różnych zestawieniach

Preparat szczepionki wirusa grypy	Średnia geometryczna HI miana przeciwciał w poszczególnych miesiącach											
	A2/Japan/170				A2/Taiwan				B/Mass			
	0	1	2	4	0	1	2	4	0	1	2	4
Wodny	1*	9	6	6	1	28	20	20	1	6	7	7
Wodny + poli I:C	1	11	8	9	1	42	30	32	1	6	3	5
Olej z orzechów ziemnych (O/W)*	1	39	24	17	1	79	40	40	1	2	6	6
Olej z orzechów ziemnych (O/W)* poli I:C	1	40	49	39	1	128	97	60	1	24	20	20

*) O/W = emulsja olej/woda

Tablica V

Reakcja przeciwciał u świnek morskich na szczepionkę o 600 CCA jednostkach wirusa grypy stosowaną w różnych zestawieniach z lub bez polinukleotydów

Szczepionka wirusa grypy	Stężenie poli-nukleotydów mcg/			Średnia geometryczna HI miana przeciwciał w poszczególnych miesiącach															
				A2/Jap./170					A2/Taiwan					B/Mass					
	poli I	poli C	poli I:C	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
Wodna	260	—	—	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	130	—	—	1	18	12	5	3	1	8	1	2	2	1	1	1	1	1	
	—	260	—	1	7	14	12	11	1	10	6	3	2	1	1	1	1	1	
	—	130	—	1	21	23	16	8	1	7	12	5	3	1	1	1	2	2	
	—	—	260	1	8	30	11	17	1	1	12	3	7	1	1	1	3	2	
	—	—	—	1	23	12	4	4	1	6	4	1	3	1	2	1	2	1	
Alum*)	260	—	—	1	60	45	32	30	1	34	20	11	9	1	28	33	26	18	
	130	—	—	1	73	45	42	40	1	37	23	20	21	1	39	43	32	30	
	—	260	—	1	37	30	26	24	1	32	14	17	8	1	37	53	24	16	
	—	130	—	1	45	45	34	37	1	37	37	24	23	1	26	61	30	30	
	—	—	260	1	64	42	34	45	1	34	24	15	15	1	14	25	11	14	
	—	—	—	1	28	34	32	24	1	26	21	26	18	1	24	12	30	34	

c. d. tablicy VII

1	2	3	4	5	6	7	8
Środek pomocniczy 65 bez poli I:C	500	1	91	1	194	1	34
	100	1	128	1	137	1	20
	50	1	80	1	137	1	23
	10	1	69	1	39	1	17
	0	1	1	1	1	1	1
Środek pomocniczy 65 z 260 mcg poli I:C	500	1	446	1	274	1	97
	100	1	274	1	274	1	39
	50	1	320	1	194	1	49
	10	1	388	1	137	1	23
	0	1	1	1	1	1	1
Środek pomocniczy 65 z 26 mcg poli I:C	500	1	388	1	256	1	56
	100	1	512	1	274	1	49
	50	1	274	1	362	1	56
	10	1	256	1	362	1	24
	0	1	1	1	1	1	1
Środek pomocniczy 65 z 2,6 mcg poli I:C	500	1	362	1	256	1	28
	100	1	111	1	194	1	10
	50	1	256	1	137	1	17
	10	1	320	1	128	1	3
	0	1	1	1	1	1	1

Zarówno z podanych przykładów jak i danych zamieszczonych w tablicach, opartych na przeprowadzonych badaniach wynika wyższość szczepionki przeciw grypie otrzymywanej sposobem według wynalazku, nad znanymi dotąd szczepionkami.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania szczepionki przeciw grypie składającej się z antygeny i środka pomocniczego w postaci emulsji, **znamienny tym**, że do szczepionki dodaje się w ilości od 1 mikrograma do 10 miligramów materiał polinukleotydowy, taki jak homopolimer wybrany z grupy składającej się z poli I, poli C, poli A, poli U, poli X, poli G i poli DHU o ciężarze cząsteczkowym 1×10^5 — $1,5 \times 10^6$, podwójnie skręconego kompleksu dwóch polimerów, kopolimeru przemennego, takiego jak poli IC, poli AU, poli AI, poli IU, poli CU, poli AC, poli GU, poli AG o ciężarze cząsteczkowym od 1×10^5 do $1,5 \times 10^6$, występującego w postaci naturalnej DS-RNA o ciężarze cząsteczkowym od 1×10^5 do $1,5 \times 10^6$, hybrydu podwójnie skręconych polimerów, taki jak poli G:dc, poli dG:C, poli I:dc i poli dI:C, przy czym każdy z homopolimerów

poli dC, poli DG i poli DI ma ciężar cząsteczkowy od 1×10^5 do $1,5 \times 10^6$ i chemicznie przemennego homopolimeru, takiego jak poli N₁-metyloadenylan, poli „6-metyloadenylan”, poli N₇-metyloinozynian, poli N₇-metyloguanylan, poli 5-metylourydylan, poli 5-fluorourydylan, poli 5-bromourydylan, poli 5-jodourydylan, poli 5-bromocytydylan i poli-5-jodocytydylan.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako podwójnie skręcony kompleks dwóch polimerów stosuje się poli I:C lub poli A:U.

3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że środek pomocniczy stosuje się w postaci emulsji typu woda/olej.

4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stosuje się antygen pochodzący z wirusa grypy.

5. Sposób według zastrz. 3, **znamienny tym**, że stosuje się środek pomocniczy w postaci emulsji typu woda/olej roślinny.

6. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że stosuje się podwójnie skręcony kompleks homopolimerów w ilości od mikrograma do około 10 miligramów, taki jak poli I:C i poli A:U przy czym ciężar cząsteczkowy każdego z homopolimerów wynosi od 1×10^5 do $1,5 \times 10^6$.