

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

88864

Patent dodatkowy
do patentu nr _____

MKP C12k 5/00

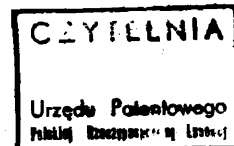
Zgłoszono: 16.11.68 (P. 130094)

Pierwszeństwo: 17.11.67 Hiszpania

Int.Cl.² C12K 5/00

Zgłoszenie ogłoszono: 26.02.73

Opis patentowy opublikowano: 16.05.1977



Twórca wynalazku: _____

Uprawniony z patentu: Bayer AG., Leverkusen (Republika Federalna Niemiec)

Sposób wytwarzania szczepionki przeciwko pomorowi świń

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania szczepionki przeciwko pomorowi świń, zawierającej żywy wirus.

Stosowanie środków immunizujących przeciwko pomorowi świń na bazie żywego wirusa, osłabionego pasażami przez króliki, znane jest z publikacji W. H. Hagen i D. W. Brunner „The Infectious Diseases of Domestic Animals”, III Wydanie (1957) strona 829, Comstock Publ. Ass, Ithaca N.Y. Znane środki immunizujące składają się z krwi i wyciągów z narządów królików, zakażonych wirusem pomoru świń, przy czym wirus w zależności od szczepu poddaje się zmiennej ilości pasażu. Od roku 1947, kiedy J. A. Baker, Jour. Am. Vet. Med. Ass. (1947) 3, strona 503 uzyskał przy zastosowaniu wirusa do królików, wytworzono szeregi szczepionek tego typu. Chociaż wirus, osłabiony pasażowaniem przez króliki, nie jest patogenny w stosunku do młodych i dorosłych świń, J. H. Sauter, G. A. Young, A. J. Luedke i R. L. Kitchell, Proc. 90th Ann. Meeting, Am. Vet. Med. Ass. (1953), strona 147, podali, że może on infekować płód, co wywołuje obrzęk, puchlinę brzuszną i wrodzone zniekształcenie. Zmiany te zostały opisane także przez autorów hiszpańskich (M. Cordero i A. Sánchez Franco, Anales de la Facultad de Veterinaria de León, strony 183—194 (1956); M. Cordero, Memoria de la Estación Pecuaria Regional de León (1956). Fakty te oraz trudności z uzyskaniem krwi królików zwróciły uwagę przy wytwarzaniu szczepionek przeciwko pomorowi

2

świń na nowoczesne metody kultury komórkowej. W związku ze ścisłym powinowactwem wirusa pomoru świń do świń i spokrewnionych gatunków pierwsze kultury komórkowe, zastosowane do produkcji szczepionek przeciwko tej chorobie, były kulturami komórkowymi rozmaitych narządów świń (W. A. Hagen i D. W. Brunner „The Infectious Diseases of Domestic Animals, III-cie wydanie (1957), strony 829—830, Comstock Publ. Ass. Ithaca N.Y.).

W ostatnim czasie, jak podano przez R. Lang, E. Lefteriotis, E. i C. Mackowiak, C.R.hebd.Séanc. Acad. Sci. Paryż, 253 (1960) strona 1593, udało się wychodować zmodyfikowany wirus pomoru świń w kulturach komórek nerkowych królika w ilości, wystarczającej do produkcji szczepionek. Szczepionki, otrzymane zarówno na kulturach komórkowych świń, jak też na kulturach komórkowych królika, mają różne wady. Mogą one przenosić inne choroby świń, wywołane wirusem, różne od pomoru świń, np. afrykański pomór itd., lub wykazują takie same wady, jak szczepionki, uzyskane przez pasażowanie.

Szczepionka według wynalazku nie wykazuje wyżej podanych wad, odznaczając się zaletami doskonałej szczepionki. Jest ona wytwarzana przy stosowaniu komórek zwierząt przeżywających, co zapobiega przenoszeniu jakiegokolwiek specyficznego wirusa świni. Podatność komórek zwierząt przeżywających na zmodyfikowany wirus pomoru świń jest wystarczająca, aby uzyskać stężenie wi-

rusa, potrzebne do otrzymania szczepionki o wyższej zdolności immunizacyjnej, niż większość stosowanych dotychczas szczepionek.

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania szczepionki do uodporniania świń przeciwko pomorowi świń, w którym inokulum szczepu specjalnie modyfikowanego i adoptowanego wirusa klasycznej dżumy świńskiej wprowadza się do zawiesiny żywych komórek w środowisku odżywczym, następnie zaszczerpioną kulturę komórek, rozmnaża się w temperaturze 35–37,5°C do uzyskania ustalonej pożądanej liczby obumarłych komórek (to jest do około 90%, moment ten ustala się przez zabarwienie barwnikami witalnymi) po czym naczynia szklane, zawierające hodowlę wyjmuje się z cieplarki i zawartość zamraża do temperatury –40°C, potem odmraża i miesza z roztworem stabilizatora, standaryzuje, liofilizuje i doprowadza do użycia, polegający na tym, że jako żywe komórki stosuje się żywe komórki przeżywaczy.

W sposobie tym jako żywe komórki przeżywaczy stosuje się komórki śledziony koziej, komórki kostne owcy lub komórki śledziony płodu bydłowego. Skuteczność szarży produkcyjnej na szereg świń zdrowych i podatnych na pomór ustala się na próbce hodowli. Badanie na skuteczność polega na oznaczeniu zawartości ogólnej antygenów lub ustaleniu dawki śmiertelnej (LD_{50}). W pierwszej próbie przyjmuje się jako jednostkę miary minimalną dawkę ochronną (UMP). Minimalną dawkę ochronną (UMP) stanowi najmniejsza ilość wirusa szczepionki, która chroni wszystkie szczepione nią świnię przeciw zakażeniu próbnemu 100 000 jednostkami minimalnej dawki śmiertelnej wirusowego wirusa pomoru świń. Tym sposobem oznacza się stężenie wirusa w każdej szarży produkcyjnej. Po tym badaniu ciecz zawierającą wirus odtaja się i sący w celu usunięcia resztek komórek. Na podstawie oznaczenia ogólnej zawartości antygeny zestawia się partię szczepionki przez zmieszanie zawiesiny wirusa z roztworem stabilizatora, otrzymując mieszaninę o jednakowym zawsze stężeniu wirusa.

Stwierdzono, że idealną dawką jednostkową do szczepień jest dawka, zawierająca 800 U.M.P. Tak wytworzona mieszanina, to jest roztwór kultury komórkowej, zawierającej wirus, zmieszany w odpowiednim stosunku ilościowym z roztworem stabilizatora, stanowi po liofilizacji nową szczepionkę przeciwko pomorowi świń.

Przykład I. Wirus klasycznej dżumy świńskiej (KSP), wysuszony w znany sposób (J. A. Baker. J. Am. Vet. Med. Ass. 3.503 (1947), wprowadza się w postaci wyciągu śledzion i chłonek zwojów nerwowych zakażonych królików w stosunku objętościowym 1 zawiesiny wirusowej do 20 objętości zawiesiny komórkowej komórek śledziony koziej, miesza się i wylęga w temperaturze 37°C. Codziennie bada się ilość przeżycia komórek w próbach poprzez zabarwienie barwnikiem żywotnym, a po obumarciu 90% komórek, przeważnie w 5-tym dniu, przerywa się rozmnażanie i zawiesinę zamraża się w temperaturze –40°C.

Zawiesinę komórkową wytwarza się poprzez wyjęcie w warunkach sterylnych śledziony świeżo ubitej kozy, rozdrabnia się ten organ poprzez pociecie na małe kawałeczki o średnicy mniej więcej 2–3 mm i przez wylugowywanie na ciepłoty tych kawałeczków w roztworze 0,2% trypsyny w temperaturze 37°C, przy tym komórki z tych kawałeczków zostają wprowadzone do zawiesiny. Po zakończeniu traktowania trypsyną oddziela się komórki na drodze odwirowywania od roztworu trypsyny i zawiesza się je tak w roztworze pożywkowym Parkera 199, zawierającym 5% surowicy końskiej, że 1 ml zawiesiny zawiera 3,10⁶ komórek. W odmrożonej próbce określa się zawartość antygenów. Otrzymuje się 2.10⁶ U.M.P. na ml roztworu. Rozmrożony roztwór wirusowy rozcieńcza się roztworem stabilizatora, zawierającym 2% cukru trzcinowego, w taki sposób, że w 3 ml roztworu (odpowiadającym 25 dawkom szczepienia) zawartych jest 20.000 U.M.P. Mieszaninę napełnia się buteleczki, każdą po 3 ml, zamraża się natychmiast i liofilizuje. Butelki zamyka się w próżni. Tak otrzymaną szczepionkę rozpuszcza się przed użyciem w 50 ml wody sterylnej i szczepi się nią po 2 ml na 1 świnię.

Przykład II. Ze świeżo ubitej owcy wyjmuje się w warunkach sterylnych długie kości, jak np. kość łydkową, kość udową i piszczel, rozluępuje się je, wydrapuje się biały szpik kostny i zawiesza się go w zawieszynie pożywkowej Parkera 199 w 10% surowicy końskiej tak, że w 1 ml zawiesiny zawartych jest 1.10⁶ komórek. Zawiesinę rozlewa się do naczyń kultury komórkowej i wylęga się w temperaturze 37°C, aż komórki zakleszczą się na powierzchni szklanej i poprzez przemycie utworzą całkowitą łąkę komórkową, co ma miejsce po 6 dniach. Następnie zastępuje się środowisko pożywkowe środowiskiem, zawierającym pożywkę Parkera 199 z 5% surowicy końskiej. Dodaje się do tego 5% objętości zawiesiny wirusowej (patrz przykład I). Kultury wylęga się w ciągu dalszych 5 dni w temperaturze 37°C, przy czym wirus rozmnaża się w komórkach, po czym zostaje zamrożony w temperaturze –40°C i ustala się w rozmrożonej próbce zawartość U.M.P. Znajduje się go do 1.2.10⁶ U.M.P. na 1 ml. Dalszą przeróbkę prowadzi się tak samo, jak w przykładzie I.

Przykład III. 5-letni płód, uzyskany przy ubiciu ciężarnej krowy, zostaje w warunkach sterylnych otwarty i wyjmuje się zeń nerki i śledzionę. Organy rozdrabnia się tak, jak opisano w przykładzie I i uzyskuje się z nich przez traktowanie trypsyną zawiesinę komórkową, którą rozcieńcza się w środowisku Parkera 199 z dodaniem 10% surowicy końskiej w taki sposób, że 1 ml zawiesiny zawiera 1.10⁶ komórek. Zawiesinę rozdziela się do naczyń kultury komórkowej i wylęga się w temperaturze 37°C, aż utworzy się po 6 dniach zamknięta łąka komórkowa. Dalsze traktowanie w sposób, jak opisano w przykładzie II. Otrzymuje się roztwór wirusowy, który zawiera 1,8.10⁶ U.M.P. na 1 ml i który przerabia się dalej analogicznie, jak opisano w przykładzie I.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania szczepionki przeciwko pomorowi świń, zawierającej żywy wirus, polegający na wprowadzeniu inokulum osłabionego wirusa klasycznej dżumy świńskiej do zawiesiny żywych komórek w środowisku odżywczym, rozmnażaniu w temperaturze 35—37,5°C prowadzonym tak długo, aż obumrze do około 90% żywych komórek, następnie zamrożeniu otrzymanej za-

wiesiny wirusowej w temperaturze -40°C , jej odmrożeniu i zmieszaniu z roztworem stabilizatora, standaryzowaniu, liofilizowaniu i doprowadzeniu do użycia, **znamienny tym**, że jako żywe komórki stosuje się żywe komórki przeżuwaczy.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako żywe komórki przeżuwaczy stosuje się komórki śledziony koziej, komórki kostne owcy lub komórki śledziony płodu bydłęcego.