



Ausschliessungspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

ISSN 0433-6461

(11)

209 738

Int.Cl.³

3(51)

A 61 K 39/255

C 12 N 7/00

MT FUER ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

1) AP A 61 K/ 2500 832
107322

(22) 21.04.83
(32) 22.04.82

(44) 23.05.84
(33) RO

1) siehe (73)

2) PATRASCU, IONEL-VICTOR, RO;

3) CENTRUL DE CERCETARI SI BIOPREPARATE PENTRU PASARI SI ANIMALE MICI VOLUNTARI, BUKAREST, RO

4) VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG DES IMPFSTOFFES GEGEN DIE MAREK'SCHE KRANKHEIT

7) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Impfstoffes gegen die Marek'sche Krankheit aus einem Stamm des Putenherpesvirus, der aus Zellkulturen von Hühnerembryos gewonnen wurde. Gegenüber dem bekannten Verfahren wird eine Verbesserung der Herstellungstechnologie erreicht. Erfindungsgemäß werden die z. B. auf Dextranträgern in Form von Mikrokugeln erhaltenen Kulturen, wenn diese 80% des Zellrasens gebildet haben, mit einem Putenherpesvirus vom Stamm FC-126, Klon 1, III b (Sammlung des Forschungs- und Präparatzentrums für Geflügel und Kleintiere, Bukarest) infiziert und in SPGA, welches Saccharose, Phosphate, Kaliumglutamat und Rindereiweiß enthält, gewonnen, sobald der zytopathische Effekt des Impfvirus 80% beträgt. Sodann erfolgt dreimal eine 1minütige Ultraschallbehandlung mit anschließender Pause von 2 Minuten. Anschließend wird durch Zentrifugieren eine erste Impfstoffausbeute erhalten. Das Sediment wird erneut mit SPGA aufgeschwemmt und erneut der dreimaligen Ultraschallbehandlung unterzogen, wobei man eine zweite Impfstoffausbeute gewinnt. Die beiden Ausbeuten werden vereinigt und bei -100°C bis zur Bestimmung der erforderlichen Virusmenge eingefroren, dann schnell in SPGA verdünnt und sterilisiert.

250083 2

Verfahren zur Herstellung eines Impfstoffes gegen die Marek'sche Krankheit

Anwendungsgebiet der Erfindung:

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung eines Impfstoffes gegen die Marek'sche Krankheit.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen:

Zur Herstellung des obengenannten Impfstoffes ist es bekannt, Gewebekulturen aus SPF-Embryos so vorzubereiten, daß sie eine Dichte von 2×10^6 Zellen/Milliliter, verteilt in Spezialbehältern aus Glas oder Kunststoff aufweisen, wobei diese im statischen System erhalten bleiben. Das Kulturmedium wird dann von Zeit zu Zeit erneuert, und zwar in Abhängigkeit von der Entwicklung des zytopathischen Effekts der mit dem Impfvirus infizierten Kulturen. Der Auszug des Putenherpesvirus wird sodann aus einer Zellaufschwemmung in einer SPGa-Schutzlösung, die Saccharase, Phosphate, Kaliumglutamat und Rindereiweiß (Fraktion V) enthält, gewonnen.

Die Abtrennung des Virus erfolgt durch Ultraschallbehandlung, und zwar wie folgt: 1 Minute Behandlung, 5 Minuten Pause und 1 Minute Kältebehandlung bei der biologischen Höchstgrenze. Anschließend wird der azelluläre Herpesvirus innerhalb kürzester Zeit bei -80°C eingefroren und bei dieser Temperatur konserviert, bis die Viruskonzentration pro ml bestimmt wird.

Das Verfahren erfordert anschließend ein nachträgliches Auftauen, eine erneute Dispergierung durch eine 10 Sekunden dauernde Ultraschallbehandlung, eine Verdünnung in einer entsprechenden Menge (1000 Dosen pro Behälter) und die Lyophilisierung des Produkts.

Dieses Verfahren hat folgende Nachteile: das statische System für die Gewebekulturen benötigt einen zusätzlichen Arbeitsaufwand, es ist ein großes Speichervermögen des Thermostaten erforderlich, es wird eine große Anzahl von Behältern mit Gewebekulturen benötigt, und es ist eine mehrmalige Erneuerung des Kulturmediums in der Replikationsperiode des Impfvirus erforderlich. Außerdem setzt die Ultraschallbehandlung keine ausreichend große Menge von infektiösen Impfpartikeln frei.

Ziel der Erfindung:

Ziel der Erfindung ist es, die Mängel des Standes der Technik zu beseitigen.

Darlegung des Wesens der Erfindung:

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Herstellung eines Impfstoffes gegen die Marek'sche Krankheit aus einem Stamm des Putenherpesvirus, der aus primären Zellkulturen von Hühnerembryos, frei von spezifischen pathogenen Erregern gezüchtet wurde, so abzuwan-

deln, daß der zusätzliche Aufwand zur Aufrechterhaltung des statischen Systems für die Gewebekulturen entfällt und auch einfachere Vorrichtungen verwendet werden können.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß die auf geeigneten Mitteln, z.B. Dextranträgern in Form von Mikrokugeln erhaltenen Kulturen, wenn diese 80 % des Zellenrasens gebildet haben, mit einem Putenherpesvirusstamm FC-126, Klon 1, III b (Sammlung des Forschungs- und Biopreparatezentrums für Geflügel und Kleintiere, Voluntari, Bukarest/Rumänien) infiziert und in SPGA, welches Saccharase, Phosphate, Kaliumglutamat und Rindereiweiß (Fraktion V) enthält, gewonnen werden, sobald der zytopathische Effekt des Impfvirus 80 % beträgt, daß sodann dreimal hintereinander eine Ultraschallbehandlung von einer Minute Dauer mit anschließender Pause von zwei Minuten Dauer erfolgt, daß anschließend aus der Primäraufschwemmung durch Zentrifugieren eine erste Impfstoffausbeute erhalten wird, daß sodann das erhaltene Sediment in einer SPGA-Verdünnung erneut aufgeschwemmt und diese Aufschwemmung erneut der vorerwähnten dreimaligen Ultraschallbehandlung unterworfen wird, woraufhin man durch Zentrifugieren eine zweite Impfstoffausbeute erhält, die nach Vereinigung mit der ersten Impfstoffausbeute bei -100°C bis zur Bestimmung der erforderlichen Virusmenge gefroren wird, die dann innerhalb einer möglichst kurzen Zeit in SPGA verdünnt und abschließend lyophilisiert wird.

Ausführungsbeispiel:

An einem Ausführungsbeispiel soll die Erfindung nachfolgend näher erläutert werden.

Aus Hühnerembryos, die frei von spezifischen pathogenen Erregern (SPF) sind, werden primäre Zellkulturen z.B. auf Mikrodextrankugeln hergestellt. Nach 20 bis 24 Stunden,

wenn sich zu 80 % ein Zellenrasen gebildet hat, wird das Kulturmedium durch frisches Kulturmedium ersetzt, in das auch das Inokulum des Impfvirus vom Zellentyp eingeführt wurde.

Die Zellkulturen werden auf einem Fermenter oder dgl. mit periodischer Kontrolle ohne Auswechslung des Nährmediums gehalten, bis der charakteristische zytopathische Effekt der Infektion mit dem Putenherpesvirus 80 % der Kulturoberfläche ausmacht.

Sodann vom Zellenrasen die Zellen durch übliche Behandlung durch Trypsinisieren gewonnen. Die Zellen werden durch Zentrifugieren bei + 4 °C und 1200 U/min abgetrennt.

Die Zellen aus dem Sediment können im Gefriermedium nochmals aufgeschwemmt und bei einer Temperatur bis zu -196 °C eingefroren werden. Besser ist es jedoch, die Zellen in einem Spezialverdünner, der Saccharase, Phosphate, Kaliumglutamat und Rindereiweiß (Fraktion V) (SPGA) enthält, aufzuschwemmen, woraufhin der Virus durch Ultraschallbehandlung aus den Zellen freigesetzt wird und zwar durch 1 Minute Ultraschallbehandlung und 2 Minuten Pause, wobei diese Behandlung dreimal wiederholt wird, und zwar bei +40 °C. Die Suspension wird bei +4 °C und 1200 U/min zentrifugiert. Das erhaltene Serum wird keimfrei gewonnen und bildet die erste Impfstoffausbeute. Anschließend wird das Zellsediment in SPGA aufgeschwemmt und es wird dieselbe Ultraschallbehandlung wie vorher durchgeführt. Die nach der zweiten Behandlung erhaltene Suspension bildet die zweite Impfstoffausbeute und wird mit der ersten Ausbeute vereinigt.

Die Virusaufschwemmung wird bei -100°C in geeigneten Behältern, z.B. Kunststoffröhrchen eingefroren. Die in den Kunststoffröhrchen enthaltenen Proben werden aufgetaut, und es werden bakteriologische, virologische und mykologische Kontrollen durchgeführt. Ferner erfolgt die quantitative Bestimmung des Impfvirus.

Nach der Feststellung der Viruskonzentration pro ml wird die Virusaufschwemmung aufgetaut, mit SPGA verdünnt und lyophilisiert.

Jeder Behälter muß 250, 500 oder 1000 Impfdosen enthalten und jede Impfdosis 1200 PFE (Plaque formende Einheiten).

Der lyophilisierte Impfstoff wird bis zum Gebrauch bei $+4^{\circ}\text{C}$ konserviert.

Die erhaltene Impfstoffproduktion, im Vergleich mit dem Verfahren der Haupterfindung und dem Verfahren der gegenwärtigen Erfindung (Variante I und Variante II), ist folgende:

Spezifikation	Gesamt ml	PFE/ml	Impfstoffdosis nach der Lyophilisierung
1. Impfstoff Variante I	100	5×10^6	66.000 ^{a)}
2. Impfstoff Variante II mit der Ultraschall- behandlung des Zellensediments			80.000
- Überstand	100	5×10^6	
- Zellensediment	20	$4,5 \times 10^6$	

a) eine Impfdosis enthält 1200 PFE

Als Medium für die Zellkulturen dient TC 199 ohne Purin, Pirimidin und Nukleotide, unter Zusatz von Phosphattryptose, Natriumbikarbonat, Antibiotika und Fötualserum.

Als Impfvirus wird der Putenherpesvirus vom Stamm FC-126, Klon 1, frei von Mykoplasma, verwendet, der unter der Nr. III b, Klon 1, in das Register des Forschungs- und Biopräparatzentrums für Geflügel und Kleintiere, Voluntari, Bukarest, eingetragen ist. Der Putenherpesvirus FC-126 ist für Hühnerküken nicht krankheitserregend. Der Klon 1 ist frei von Mykoplasma und ruft in Kulturen von Fibroblastzellen aus Totalembryo oder in Kükennierenzellkulturen einen charakteristischen zytopathischen Effekt hervor. Die mit dem Putenherpesvirus vom Stamm FC-120 geimpften Küken widerstehen einer späteren Infizierung mit dem krankheitserregenden Virus der Marek'schen Krankheit. Auch entwickeln sich keine Geschwüre.

Das erfindungsgemäße Verfahren weist folgende Vorteile auf:

- die Impfstoffherstellung erfordert keine komplizierte Methodik und ermöglicht eine kontinuierliche, halbautomatische Technologie;
- die Aufschwemmung der Viren ist nach der Ultraschallbehandlung äußerst homogen;
- es können beide Impfstoffformen, nämlich gefroren oder lyophilisiert, hergestellt werden.

Erfindungsanspruch:

Verfahren zur Herstellung eines Impfstoffes gegen die Marek'sche Krankheit aus einem Stamm des Putenherpesvirus, der aus primären Zellkulturen von Hühnerembryos, frei von spezifischen pathogenen Erregern gezüchtet wurde, gekennzeichnet dadurch, daß die auf Rollern oder Dextranträgern in Form von Mikrokugeln erhaltenen Kulturen, wenn diese 80 % des Zellenrasens gebildet haben, mit einem Putenherpesvirusstamm FC-126 Klon 1, III b (Sammlung des Forschungs- und Biopräparatezentrums für Geflügel und Kleintiere, Voluntari, Bukarest/Rumänien) infiziert wird in SPGA, welches Saccharase, Phosphate, Kaliumglutamat und Rindereiweiß (Fraktion V) enthält, gewonnen werden, sobald der zytopathische Effekt des Impfvirus 80 % beträgt, daß sodann dreimal hintereinander eine Ultraschallbehandlung von einer Minute Dauer mit anschließender Pause von zwei Minuten Dauer erfolgt, daß anschließend aus der Primäraufschwemmung durch Zentrifugieren eine erste Impfstoffausbeute erhalten wird, daß sodann das erhaltene Sediment in SPGA-Verdünnung erneut aufgeschwemmt und diese Aufschwemmung erneut der vorerwähnten dreimaligen Ultraschallbehandlung unterworfen wird, woraufhin man durch Zentrifugieren eine zweite Impfstoffausbeute erhält, die nach Vereinigung mit der ersten Impfstoffausbeute bei -100°C bis zur Bestimmung der erforderlichen Virusmenge gefroren wird, die dann innerhalb einer möglichst kurzen Zeit in SPGA verdünnt und abschließend lyophilisiert wird.