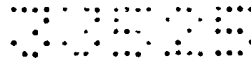


6111/91



SEJTMENTES MAREK-FÉLE BETEGSÉG VÍRUS VAKCINA

Akzo N.V., Arnhem, Hollandia

A bejelentés napja: 1991. 12. 23.

Elsőbbsége: 1990. 12. 24. (90314297.4) Európa

Kivonat

A találmány egy a baromfiakat a Marek-féle betegségtől megvédő vakcinával foglalkozik. A találmány szerinti sejtmentes vírus megkönnyíti a vakcina kezelését, és lecsökkenti a hibás használat eshetőségét. A találmány továbbá bivalens vagy polivalens vakcinákra is vonatkozik, melyek a Marek-féle betegség vírus csoport egyéb vírusait, például HVT-t tartalmaznak.

444/91

3035

Képviselő:

DANUBIA SZABADALMI ÉS VÉDJEKY IRODA KFT

SEJTMENTES MAREK-FÉLE BETEGSÉG VÍRUS VAKCINA

Akzo N.V., Arnhem, Hollandia

Feltaláló:

BAXENDALE William, Buckden,

Nagy-Britannia

A bejelentés napja: 1991. 12. 23.

Elsőbbsége: 1990. 12. 24. (90314297.4) Európa

A találmány baromfiakat a Marek-féle betegség ellen védő vakcinával és ilyen vakcina előállításával foglalkozik.

74212-760-GI

A Marek-féle betegség (MD) a baromfiak rosszindulatú, limfoproliferatív elváltozással járó betegsége, melyet egy herpesz vírus, a Marek-féle betegség vírusa (MDV) okoz. Az MD általánosan elterjedt betegség, világszerte előfordul a baromfitermelő országokban. Intenzív termelési rendszerben nevelt csirkéknél az MD elkerülhetetlen veszteségeket okoz. Az MD kb. 6 hetes kortól érinti a csirkéket, a leggyakoribb az előfordulása a 12-24 hetes kor között.

Klinikailag az MD három formája ismeretes, a klasszikus MD, a heveny MD és az átmeneti bénulás.

A klasszikus MD-t a limfoid beszűrődés és a mielin hüvely pusztulása okozta perifériás idegmegvastagodás jellemzi, és a fő klinikai tünete a bénulás. Az elhullás mértéke változó, de általában 10-15 % alatti.

A heveny formában a zsigeri szervekben gócos és diffúz limfomatózis daganatok találhatóak. Az MD ezen formájában az elhullás általában magasabb, mint a klasszikus formában. Vakcinázatlan állományokban az elhullás gyakran 10-30 %-ban fordul elő, és számolhatunk az állomány 70 %-át érintő járvány kitörésével. A kórbonctani leletek mind a klasszikus, mind a heveny formában lényegében hasonlóak, malignusan transzformált T-limfoblasztok szűrik át a szöveteket, a klasszikus formában a perifériás idegeket, a heveny formában a zsigeri szerveket.

Az MDV-ről kimutatták továbbá, hogy felelős a fiatal csirkék hirtelen bénulással jellemzett agyvelőgyulladásáért. Az MD-vel kapcsolatos vírusok szerológiai csoportosítása három szerotípust eredményezett:

- I. típus: az MD természetben előforduló virulens törzsei, amelyek csirkékben patogének, és daganatot képeznek, és az azokból származó attenuált, nem patogén törzsek;
- II. típus: az MDV természetben előforduló nem patogén törzsei;
- III. típus: a pulykák herpesz vírusa ("HVT"), amely csirkékben nem patogén.

Napjainkban számos a Marek-féle betegség elleni vakcina típus van használatban. Ezek közé tartoznak a patogén, I. szerotípusú törzsekből származó vakcinák. E törzsek a sorozatos passzálás során elvesztették kórokozó és daganatképző tulajdonságukat, de immunogenitásukat nem. Az MD vakcinák prototípusát képező, HPRS-16 törzsből eredő attenuált vírus [Churchill, A. E. és munkatársai, J. Gen. Virol. 4, 557, (1969)] és a CVI-988 törzs kereskedelmi forgalomban van mint élő, I. szerotípusú MD vakcina.

A II. szerotípusú MD vírusok eredendően nem onkogének, így nem képesek tumort okozni vakcinázott csirkékben. Így, ezeknél a vírusoknál nincs szükség mesterséges attenuálásra sorozatos passzálások révén, és miután természetes állapotban vannak, nem képesek virulens formává visszaalakulni. Az SB-1 törzs (4 160 024 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás) mellett, amely 1983 óta védett az Amerikai Egyesült Államokban, a HN-1 törzsről is kimutatták, hogy vakcinázás céljára sikeresen alkalmazható. Ezidáig az I. és II. szerotípusú vakcinákat mint sejthez kötött készítményeket kellett alkalmazni [Powell, P.C., World's Poultry

Science Journal 42, 205, (1986); Witter R.L., és munkatársai, Avian Diseases 31, 829, (1987); Schat, K.A., Internews 3, 13, (1989)]. A gyakorlatban ez azt jelenti, hogy az említett vakcinákat -196 °C-on folyékony nitrogénben kell tárolni és szállítani.

A vakcina tárolásánál és kezelésénél előforduló hibák az MD vírusok életképességének csökkenését és a vakcinálás meg hiúsulását okozzák. Különösen olyan országokban, ahol a folyékony nitrogénes tárolás gyakorlatilag lehetetlen, a sejthez kötött MD vakcinák nem használhatók. Ráadásul, egy sejthez kötött vakcina precipitátumban szuszpendált, MDV-t tartalmazó részecskéket a szuszpenzió beadása előtt homogenizálni kell. A nem megfelelő homogenizálás a vakcina helytelen adagolását és az immunizálás sikertelenségét eredményezi. Ezenfelül, az említett vakcina szigorúan sejthez kötött természete felelős a vakcinák fizikai behatásokkal szembeni érzékenységeért. A fertőzött sejtek szuboptimális összegyűjtése és a fagyasztási eljárások által okozott károsodás, valamint az ampullák helytelen olvasztása és a vakcina helytelen kezelése a keltetőkben a sejtek károsodását és pusztulását, következésképp a vakcina titerének csökkenését eredményezi.

Manapság egy gyakran használt MD vakcina a HVT-ből származik. A HVT-t először pulykákból izolálták, pulykákban és baromfiakban nem patogén, és antigén-szerkezetileg rokon az I. és II. szerotípusú MD vírusokkal. A HVT-t kiterjedten használják MD elleni vakcinaként, a legszélesebb körben a FC126 törzset. A HVT-t általában mint sejthez kötött készítményként használják.

ményt használják, de mivel a fertőzött sejtekből jelentős mennyiségű sejtmentes vírust lehet kivonni, liofilizált, sejtmentes vakcinaként is felhasználható.

Az MD okozta gazdasági veszteségek csökkentésére irányuló törekvések szükségessé teszik az MD vakcinák hatékonyságának folyamatos javítását. Különösen napjainkban, amikor a baromfitermelésben igen virulens MD vírus törzsek okozta nagyarányú veszteségekről számoltak be mind az USA-ban, mind Európában. Ezideig, a HVT vakcinázás nem nyújtott megfelelő védelmet ezen izolátumokkal szemben, még nagy dózisokban, vagy a vakcinázás és fertőzés között eltelt hosszabb időtartamok esetén sem. Ezeknek a nagyon virulens vad MD vírus törzseknek a terjedését elősegíti a kizárólag HVT-vel történő relatív hatástalan vakcinázás.

A nagyon virulens MD vírus fertőzések okozta betegség leküzdésére napjainkban rendelkezésre álló hasznos módszer a bivalens vagy polivalens, az MD vírus csoport különböző szerotípusaihoz tartozó vakcina vírusok keverékét tartalmazó vakcinák használata. Úgy találtuk, hogy a HVT vírust és az SB-1 vírust vagy más II. szerotípusú MD vírust tartalmazó bivalens vakcina jobb védelmet nyújt, mint bármelyik víruskomponens külön-külön. Ezt a jelenséget neveztük "protektív szinergizmusnak", mely azt a mechanizmust jelöli, mely szerint egy MD vakcina által elért védelem nagyságát egy másik vakcina vírus hozzáadása megnöveli [Witter, R. L., Avian Pathology 11, 49, (1982); Witter R. L., és Lee, L. F., Avian Pathology 13, 75, (1984); Witter, R. L., Avian Diseases 31, 752, (1987); Schatt, K. A. és munkatársai, Avian Pathology

11, 593, (1982)]. A módszer hátránya, hogy e szinergizmus előnyeinek kihasználása érdekében, a bivalens vakcinának sejthez kötött készítménynek kell lennie, mivel eddig sejtmertes II. szerotípusú MD vírus vakcina nem állt rendelkezésre.

MDA (maternális/anyai eredetű ellenanyagok) minden MD vírus szerotípus ellen gyakoriak a forgalmazott csirkékben, a tenyészetek MD vírusokkal való természetes fertőződésének és/vagy a tenyészetek I., II. és III. szerotípusú vírusokkal való vakcinázásának köszönhetően. A homológ MDA kedvezőtlen hatása a vakcinázásra közismert. Az MDA ellenanyagok a (sejtmertes) HVT vakcinával csak kis mértékben interferálnak. Így előnyös, ha a tenyészállományokat HVT-mentes MD vírus vakcinákkal tudjuk vakcinázni, hogy az utódok HVT-vel szemben inkább védetté tehetőek legyenek. Ennek az úgy nevezett váltakozó generációs vakcinázásnak a potenciális előnyei megvannak még akkor is, ha az utódokat HVT-tartalmú bivalens vagy polivalens vakcinákkal vakcinázzák. Azonban, ezen vakcinázási stratégia alkalmazása feltételezi a megfelelő, HVT-mentes vakcina hozzáférhetőségét [Witter, R. L. és Lee, L. F. Avian Pathology 13, 75, (1984)]. Egy sejtmertes II. szerotípusú MD vírust, pl. SB-1-t tartalmazó vakcina hozzáférhetősége nagyon hasznos lenne az említett váltakozó generációs vakcinázásban.

A találmány tárgya a baromfiak MD elleni védelmét szolgáló vakcina, amely sejtmertes, II. szerotípusú MD vírusokat tartalmaz, gyógyszertanilag elfogadható hordozó mellett.

Az I. és II. szerotípusú MD vírusokkal való korábbi mun-

ka azt mutatta, hogy a sejtmentes vírus mennyisége (meghatározva mint elsődleges plakk formáló egység: pfu) titere elégtelen volt ahhoz, hogy vakcinázási célokra felhasználható legyen [4 895 718 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás; Witter, R. L. és munkatársai, Avian Diseases 31, 829, (1987); Powell, P. C., World's Poultry Science Journal 42, 205, (1986); Schatt, K. A., Internews 3, 13, (1989)]. Különösen az SB-1 vírussal kapcsolatban mutatták ki, hogy nem képez jelentős mennyiségű sejtmentes vírust.

Azóta kiderült, hogy a II. szerotípusú MD vírusok további passzálása során a sejtmentes vírus mennyisége nagymértékben megnőtt, és az így nyert sejtmentes vírusok megtartották védő tulajdonságukat.

Ez az észlelés annál meglepőbb, mert Witter [Avian Diseases 31, 752, (1987)] világosan kimutatta a sorozatos passzálás negatív hatását a sejthez kötött II. szerotípusú MD vírusok védő képességére.

Ráadásul, Witter (ugyanott, 1987) kimutatta, hogy a passzálások számát növelve a szinergizmus csökken: a tovább passzált, sejthez kötött II. szerotípusú MD vírusok nem növelték az FC126 HVT törzs hatásosságát, összehasonlítva az alacsony passzálási számú sejthez kötött II. szerotípusú MD vírussal.

Meglepetésre azt találták, hogy a sejtmentes HVT-vel elért védelem mértékét növelte a sejtmentes II. szerotípusú MD vírusok hozzáadása.

A találmány értelmében a vakcina úgy állítható elő, hogy alacsony passzálási számú II. szerotípusú MD vírusokat -

például olyan II. típusú MD vírusokat, melyek megfelelő sejttenyészetben tenyésztve nem termelnek elegendő, vakcinázásra hasznosítható sejtmentes vírust - sorozatos passzálásnak vetünk alá, az így nyert vírusokat tenyésztjük, majd a tenyészetből nyert sejtmentes vírusokat immunizáló tulajdonsággal bíró készítménnyé alakítjuk.

A találmány szerinti sejtmentes vakcina bármely II. szerotípusú MD vírus törzsből, pl. a HPRS B-24 törzsből, az SB-1 törzsből (Schat és munkatársai, 4 160 024 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás; a kereskedelemben hozzáférhető az Intervet Inc.-től), a HN-1 törzsből [Cho, B. R. és Kenzy, S. G., Appl. Microbiol. 24, 299, (1972)] vagy a Witter által leírt izolátumokból, mint a 30/B/1 törzs [4 895 718 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás; Avian Diseases 31, 752, (1987)], előállítható. Jelenleg az SB-1 törzs a legelőnyösebb törzs.

A II. szerotípusú MD vírus sorozatos passzálására a gyakorlatban használhatók az erre a célra ismert módszerek. Röviden, a vírusokat a megfelelő sejttenyészetben szaporítjuk, onnan összegyűjtjük, és friss sejttenyészetet tartalmazó tápfolyadékba oltjuk. A II. szerotípusú MD vírusokat néhány egymást követő passzálásnak vetjük alá sejttenyészetben, amíg abból használható mennyiségű sejtmentes vírust nem nyerünk, majd vakcinává alakítjuk.

A sorozatos passzálási folyamatra felhasználható sejttenyészetek többek között a csirke vese (CK), csirke embrió fibroblaszt (CEF) és a kacsas embrió fibroblaszt (DEF) tenyészetek.

Pontosabban a II. szerotípusú MD vírusok 24-48 órás egyrétegű CK, CEF vagy DEF tenyészetekre olthatók, melyeket aztán néhány napig 37 °C-on tartunk, miközben a tápfolyadékot időnként kicseréljük. A megfelelő tápfolyadék összetétele pl. Eagles alap tápfolyadék (BME), triptóz-foszfát leves, nátrium-bikarbonát, borjúsérum és antibiotikumok. A sejteket tovább passzáljuk, ha az egyrétegű sejttenyészet 75 %-a mutat citopátiás elváltozást. Az inkubációs szakasz végén az egész sejtömeget foszfát-pufferes fiziológiás sóoldattal mossuk, tripszinnel diszpergáljuk, és kis mennyiségű tápfolyadékban szuszpendáljuk, és a fenti módon friss egyrétegű sejt kultúrába átoltjuk és szaporítjuk. Az egymást követő passzálások száma a tenyészetből nyerhető sejtmentes vírusok mennyiségétől, és a passzált vírus immunogén és fertőző tulajdonságainak megtartásától függ. Az utolsó passzálás sejtjeit mossuk, tripszinezük, centrifugáljuk, és kis térfogatú dimetil szulfoxidot (DMSO) tartalmazó tápfolyadékban diszpergáljuk. Ezt a készítményt lassan folyékony nitrogén hőmérsékletére (-70 °C) fagyaszthatjuk, amely azután vírus törzstenyészetként használható.

A fent leírt módszerrel olyan sejtmentes készítmények nyerhetők, melyek titere  $10^4$ -től  $10^7$  pfu/ml-ig terjed.

Az elégséges mennyiségű sejtmentes vírust adó, II. szerotípusú MD vírusok nyéréséhez szükséges passzálások száma függ többek között az adott II. szerotípusú MD törzstől, és a sejtmentes vírus kívánt mennyiségétől vagy titerétől.

A II. szerotípusú MD vírusok, a találmány szerinti vakcina előállításához megkívánt összes passzálásainak tipikus

száma 25 és 40 között változik, és kedvező esetben 28 és 35 között van.

Ezután, a II. szerotípusú MD vírusok szaporítása céljából CEF sejtekkel beoltott görgő tenyészetek fertőzhetőek 24 órás inkubáció után sejthez kötött vagy sejtmentes vírussal, amint azt fent leírtuk. Néhány napos további inkubációs periódus után a felülúszót leöntjük, a sejteket tripszín-verzén keverékkel eltávolítjuk, majd a sejtek centrifugálással üleptíthetők, és a felülúszó eltávolítható.

Hogy sejtmentes készítményt állítsunk elő, az üleptített sejteket pufferben, pl. foszfát-pufferes fiziológiás sóoldatban (PBS) vagy előnyösen stabilizátort tartalmazó tápoldatban (PBS) vagy előnyösen stabilizátort tartalmazó tápoldatban szuszpendáljuk, az SPGA [Bovarnik és munkatársai, J. Bacteriology 59, 509, (1950)] a legelőnyösebb stabilizátor.

A sejtroncsolás több módszerrel elérhető, pl. ultrahanggal vagy fagyasztás-olvasztással. Esetleges ép sejtek jelenléte megálapítható hemocitóméterben való vizsgálattal. Az ultrahanggal kezelt vagy gyorsfagyasztott készítmény ampullákba osztható és fagyasztva szárítható, kívánt esetben EDTA jelenlétében. Adott esetben a fagyasztva szárítás előtt a sejttörmelék szűréssel vagy centrifugálással eltávolítható.

A fenti módszerrel nyerhető sejtmentes II. szerotípusú MD vírusok vakcinákhoz adhatók, mint élő vírusok vagy mint inaktivált vírusok.

Az élő vírust tartalmazó vakcinák előállíthatók és forgalmazhatók szuszpenzió formájában vagy liofilizálva.

A liofilizát vakcinák előnyösen egy vagy több stabilizá-

tort tartalmazhatnak. Megfelelő stabilizátorok, pl. az SPGA [Bovarnik és munkatársai, J. Bacteriology 59, 509, (1950)] szénhidrátok (mint pl. szorbit, mannit, keményítő, szacharóz, dextrán vagy glükóz), proteinek (mint pl. albumin vagy kazein) vagy ezek lebontási termékei és pufferek (mint pl. alkálifém-foszfátok). Kívánt esetben egy vagy több adjuváns hatású összetevő is hozzáadható. Erre a célra alkalmas vegyületek pl. az E-vitamin-acetát olaj/víz-emulziója, alumínium-hidroxid, -foszfát vagy -oxid, ásványi olaj, (mint a Bayol F(R), Marcol 52(R)) és szaponinok.

Az MD vírusok inaktiválásának célja, hogy megszüntessük a vírusok szaporodását. Általánosságban ez elérhető kémiai vagy fizikai úton. A vírusok kémiai inaktiválása pl. enzimekkel, formaldehiddel, béta-propiolaktonnal, etilén-iminnel vagy ennek származékával, organikus oldószerrel, (mint pl. halogénezett szénhidrogénekkal) és/vagy detergenssel (mint pl. Tween(R)-nel, Triton X(R)-szel, nátrium-dezoxikoláttal, szulfobetainnal vagy cetil-trimetil-ammónium-sókkal) való kezelésével érhető el. Amennyiben szükséges, az inaktiváló komponenst utólag neutralizáljuk; a formaldehiddel inaktivált anyag pl. tioszulfáttal neutralizálható. Fizikai inaktiválás előnyösen úgy végezhető, hogy a vírusokat nagy energiájú sugárzásnak tesszük ki, ilyen például az UV fény, röntgen-sugárzás vagy gamma-sugárzás. Kívánt esetben a pH visszaállítható 7 körüli értékre a kezelés után.

Rendszerint egy adjuvánst (pl. a fent említetteket) és kívánt esetben egy vagy több emulgeálószerrel mint pl. Tween(R)-t és Span(R)-t is adunk az inaktivált vírusokhoz.

A vakcinát a vírus-komponens hatásos dózisában adagoljuk a kezelendő állatnak, pl. az immunizáló sejtmentes vírusnak olyan mennyiségét adagoljuk, amely a virulens MD vírussal való fertőzés ellen immunitást hoz létre a csirkében. Immunitásként a védelemnek azt az indukált szintjét tekintjük, amely a csirke populációban a vakcinázás után szignifikánsan magasabb, mint a nem vakcinázott csoport esetén.

Élő vakcináknál az egy csirkére eső dózis tartomány 1-6 log pfu.

A találmány szerinti élő vakcinát tipikusan legalább 2,2 log pfu sejtmentes vírus dózisban adjuk be, előnyösen legalább 3,2 log pfu dózisban.

Természetes úton történő fertőzés esetén (aeroszol, szem- és orrcsepp)  $10^6$ - $10^7$  pfu /csirke adható be.

Inaktivált vakcinák 3-7 log pfu-nak megfelelő antigént tartalmazhatnak madarankénti dózisban, előnyösen 4-6 log pfu közötti dózist.

A találmány szerinti vakcinák beadhatók aeroszolként magas titerben, szemcseppként, orrcseppként, szájon át (pl. ivóvízzel) vagy izomba, bőr alá vagy a tojásba oltva bármely életkorban, miután a csirke immunkompetensé vált.

A vakcinát általában 24-48 órával a kikelés után adjuk be a csirkének.

A találmány tárgya továbbá sejtmentes II. szerotípusú MD vírus és sejtmentes HVT kombinációja mint bivalens vakcina. Meglepetésre, azt találtuk, hogy a sejtmentes II. szerotípusú MD vírusok még képesek a HVT hatásosságának fokozására, a passzálások megnövelt száma ellenére.

Különösen az SB-1 törzs II. szerotípusú sejtmentes MD vírusait használhatjuk sejtmentes HVT-vel kombinálva. A találmány szerinti vakcinába alkalmazható HVT vírus bármely törzs lehet, így például az FC126 vagy THV PB1 törzsek (forgalmazza az Intervet Inc.). A HVT vírus adott esetben tartalmazhat egy baromfi kórokozó antigénjét kódoló idegen gént a vírus genomában, ezáltal polivalens vakcinát képezve.

A találmány tárgykörébe tartoznak továbbá olyan kombinált vakcinák is, amelyek a sejtmentes II. szerotípusú MD vírus anyag mellett a baromfiak egyéb fertőző kórokozóiból származó vakcinákat is tartalmaznak. A sejtmentes II. szerotípusú MD vírus kombinálható a baromfipestis vírussal (NDV), a fertőző légcsőgyulladás vírussal (IBV) és a Gumboró betegség vírussal (IBDV).

A találmány szerinti megoldást a következő példákkal szemléltetjük.

#### 1. példa

##### A) II. szerotípusú, SB-1 és B-24 MD vírusok passzálása

Sejthez kötött SB-1 vagy B-24 vírust 24 óráig, SPF csirkeembrióból származó, 6 cm átmérőjű Falcon Petri-csészékben növesztett sejttenyészetbe oltunk ( $1,5 \times 10^6$  CEF [Csirke Embrionális Fibroblaszt]/csésze). Legalább 100 pfu-t tartalmazó inokulum 0,1 ml-ét a csészékben levő 5 ml tápfolyadékba oltjuk. A sejthez kötött vírus leülepszik az egyrétegű sejtszőnyegre és azt megfertőzi.

5 napig 38,5 °C-on, 5 % CO<sub>2</sub>-t tartalmazó légtérben tör-

ténő inkubálás után a sejteket az alábbiak szerint eltávolítjuk a csészékből: 1. leöntjük a tápfolyadékot; 2. helyébe verzen tripszin PBS oldatot mérünk, ezáltal fellazítjuk a sejtek tapadását a Petri-csészén; 3. elöntjük a verzen/tripszin PBS keveréket, mielőtt a sejtek leválnak Petri-csészéről; 4. a sejteket tápfolydékkal lemoszuk a csészéről.

A 4. lépésben kapott, sejthez kötött vírus szuszpenzióját inokulumként használjuk a következő passzáláshoz CEF sejteken. A vírusokat ötször passzáltuk a fentiek szerint. A hatodik passzálástól (plusz a kezdeti passzálások) négy napos inkubációs időre tértünk át.

Eredmények:

SB-1

A Cornell Egyetemről kapott SB-1 vírus már 10 passzáláson átesett (7 szövettenyészet passzálás CEF és CK sejteken, ezt követte 2 passzálás SPF csirkékben, és egy további passzálás CEF sejteken).

Amikor a Petri-csészéből származó, erősen fertőzött sejteket (10. passzálási szint) sejtmentes vírus nyerése céljából kezeltük, és 5 ml térfogatú SPGA-ban újra szuszpendáltuk, a vizsgálat szerint  $10^{-2}$  hígításban nem mutattunk ki sejtmentes, élő vírust.

Amikor az SB-1 törzset a Cornell Egyetemről való érkezése után összesen 21-szer passzáltuk, és hasonlóképpen kezeltük,  $10^{4,9}$  pfu/ml titerű élő, sejtmentes vírust kaptunk. Az összesen 26-szor passzált SB-1 vírusok  $10^{6,0}$  pfu/ml titerű

sejtmentes vírust eredményeztek. Ezek a sejtmentes SB-1 vírusok még mindig fertőzőképesek voltak csirkékben, virémiát idéztek elő, az érintkező madarakra átterjedtek, és képesek voltak védő immunválaszt kiváltani.

B-24

Amikor a 9. passzálásból származó B-24-gyel erősen fertőzött sejteket sejtmentes vírus nyerése céljából a fentiek szerint kezeltük, a titer alacsonyabb volt  $10^2$  pfu/ml-nél. Mikor a 35. passzálásból származó erősen fertőzött sejteket vizsgáltunk,  $10^{4,7}$  pfu/ml titert kaptunk.

B) SB-1 sejtmentes, II. szerotípusú MD vakcina készítése

Két,  $200 \times 10^6$  CEF sejttel beoltott görgő tenyészetet ( $1750 \text{ cm}^2$ ) fertőztünk a fent leírt módon kapott, 24 órás inkubálás után  $10^5$  pfu/ml titerű, 1 ml sejthez kötött SB-1 törzs vírussal.

Egy további 5 napos inkubálás után a felülúszó tápfolyadékot elöntöttük, és a sejteket tripszin verzén keverékkel eltávolítottuk. A sejteket centrifugálással ülepítettük, a felülúszót elöntöttük, és a sejteket elkevertük 20 ml SPGA stabilizátorban, majd 20 másodpercig ultrahanggal kezeltük.

Az ultrahanggal kezelt készítményt 1 ml-es adagokban ampullákba töltöttük, és fagyasztva szárítottuk.

Fagyasztva szárítást megelőző titer	$10^{4,8}$ pfu/ml
Fagyasztva szárítást követő titer	$10^5$ pfu/ml.

2. példa

A II. szerotípusú, sejtmentes MD vakcina hatékonysága

Három, az I., a II. és a III. szerotípus ellen MDA-val rendelkező, 10 broiler csirkéből álló csoportot kezeltünk sejtmentes SB-1 különböző dózisaival egy napos korban (im). Az alkalmazott dózisek 176 pfu/csirke, 460 pfu/csirke és 1520 pfu/csirke voltak. A vakcinák hatékonyságát a virémia meghatározásával vizsgáltuk. Mivel korábbi kísérleteink alapján megállapítottuk, hogy ha nem vakcinázott csirkék SB-1-gyel vakcinázott csirkékkel érintkeznek, hátról egy érintkező madárnál áttérjedést észlelünk két héttel az oltás után, amennyiben a vakcinázás dózisa 200 pfu sejthez kötött vírus, elhatároztuk, hogy két hét után nem vizsgálunk virémiára. A vakcinázást követő első és második héten fehérvérsejt réteget vettünk, és azt standard eljárás szerint CEF sejteken SB-1 vírusra vizsgáltuk. A tenyészeteket egy héttig inkubáltuk, mielőtt az eredményt leolvastuk. Az alábbi, 1. táblázatban közölt eredmények azt mutatják, hogy a 176 pfu/csirke adagot kapott csirkéknél a virémia arány legalább 56 %, míg a 460 pfu/csirke vagy a 1520 pfu/csirke dózisban történt vakcinázás után minden csirke virémiás lett.

1. táblázat

Vakcina adag	Madarak száma (pozitív/vizsgált) 14. nappal a vakcinázás után
176 pfu	5/9
460 pfu	10/10
1520 pfu	7/7

3. példa

A sejtmentes HVT és a HVT/SB-1 vakcinák által kiváltott  
immunitás összehasonlítása MDA pozitív csirkékben

Vírusok - Az alábbi vírustörzseket használtuk:

HVT - Az Intervet PBI THV törzs

SB-1 - Ezt a törzset tovább passzáltuk, amíg a  
vírus gyors szaporodásúvá vált és sejt-  
mentes vírus nem szabadult fel.

A sejtmentes készítményeket fertőzött CEF sejtek SPGA  
stabilizátorban történő ultrahangos kezelésével készítettük.

Két-három napos, az I., a II. és a III. szerotípusokkal  
szembeni anyai eredetű ellenanyagokkal (MDA) rendelkező  
broiler csirkéket 3 csoportra osztottunk.

A csoport	37 csirke	vakcina nélkül,
B csoport	42 csirke	1000 pfu/csirke HVT vakcinával oltva,
C csoport	42 csirke	1000 pfu/csirke HVT vakcina 250 pfu SB-1 vírussal együtt oltva.

A csoportokat 9 napos korban virulens RBIB vírussal fertőztük. A kísérlet során minden csoportból időről-időre meg kellett ölünk csirkéket, hogy elkerüljük a túlnépesedést az izolátorba. Minden elpusztult vagy levágott csirkét megvizsgáltunk Marek betegség (MD) makroszkópos és mikroszkópos elváltozásaira nézve.

A fertőzést követően mindegyik vakcinázott csoportból egy csirke elpusztult négy nappal a fertőzés után (pc[post challenge]) és öt csirke az ötödik és kilencedik nap között a nem vakcinázott csoportból. A szövettani vizsgálat limfoid sorvadást mutatott ki, különösen a (Fabricius) tömlőben, de a tímuszban is. Ezek a megfigyelések az elhullások időpontjával együtt arra mutatnak, hogy azok az MD citolitikus hatásának következményei. Az 1. ábrán látható oszlopdiagram a fertőzés után alkalmanként leölt madarak számát és a későbbi post mortem vagy a szövettani vizsgálat szerint Marek féle betegségnek bizonyult esetek számát mutatja. A 2. ábrán látható oszlopdiagram a fertőzés utáni MD előfordulását mutatja vakcinázott és nem vakcinázott csirkékben.

A nem vakcinázott csoportban (1. és 2. ábrák) az MD gyakori előfordulását figyeltük meg. A 11. pc napon leölt 7

csirkéből háromnak volt MD daganata. Az MD-nek tulajdonítható elhullások a pc 11. napon kezdődtek. A pc 28. napon 8 beteg csirkét leöltünk, és a pc 32. napon a fennmaradó 8 madarat is levágtuk, mivel kettő kivételével súlyosan betegnek tűntek. Mind a 16 csirkének MD daganata volt a májban, vesében és egyéb szerveiben. Az összesen 37 madárból 5 láthatólag "citolitikus MD"-ben múlt ki, 27-nek MD daganata volt, vagy MD-ben pusztult el. A 4 csirkét, amelyeknek nem voltak MD elváltozásai a pc 11. napon vágtuk le, ezáltal nem adtunk elegendő időt az MD kifejlődéséhez. (Egy csirke nem jellemző okból múlt ki).

A HVT vakcinát kapott csoportban makroszkópos MD daganatokat először a 21. napon láttunk, 10 leölt csirkéből kettőnél, valamint két madárban, amelyek ugyanakkor pusztultak el. Öt, a 32. és a 42. napon leölt beteg állat post mortem vizsgálata azt mutatta, hogy valamennyinek MD daganata volt. Összesen 7 madár pusztult el MD következtében a kísérlet során. A pc 53. napon leölt 8 megmaradt madár nem mutatta az MD jeleit. Az összesen 42 csirkéből 16-nak volt MD daganata, amikor azokat leöltük, vagy MD következtében elpusztultak. A pc 11. napon leölt 10, a pc 21. napon leölt 8 és a pc 53. napon leölt 8 csirkében nem találtunk elváltozásokat.

A kettős vakcinával oltott csoportban az MD előfordulása nagyon alacsony volt, csak egy madárban voltak MD daganatok a májban, a pc 53. napon való leöléskor. Az összesen 42 csirkéből 4 nem jellemző okból elhullott, egy közülük elpusztulhatott "citolitikus MD"-ben. Nem találtunk MD tüneteket a pc 11. nap leölt 10, a pc 21. napon leölt 11, a pc

42. napon leölt 3 és a pc 53. napon leölt 14 csirkéből 13 madárban. Az eredmények azt mutatják, hogy a sejtmentes SB-1/HVT kettős vakcina magas szintű védelmet nyújtott egy súlyos RB1B fertőzés ellen olyan broiler csirkékben, melyek az I., a II. és a III. szerotípusú vírusok ellen MDA-val rendelkeztek.

A HVT vakcina szignifikáns védelmet nyújt ezen súlyos fertőzés ellen, de a csirkék kb. 37 %-a az MD néhány jelét mutatta. Meg kell jegyezni, hogy mivel a túlélő, nem vakcinázott csirkék az MD kifejezett tüneteit mutatták a pc 4. hét körül, azokat a pc 32. napon mind leöltük. A pc 53. napon, a kísérlet befejezésekor megfigyeltük, hogy a kettős vakcinát kapott csirkék nehezebbek voltak, mint a csak HVT-vel vakcinázottak. Ez azért meglepő, mert a 8 HVT-vel vakcinázott csirke egyikénél sem voltak MD-re jellemző nyilvánvaló szignifikáns jelek a leöléskor.

#### 4. példa

Sejtmentes SB-1 vírussal és HVT/SB-1 vakcinával  
előidézett immunitás összehasonlítása MDA-mentes  
csirkékben

20 napos SPF csirkéket oltottunk bőr alá 200 pfu fagysztva szárított sejtmentes SB-1 vírussal, amelyet 0,1 ml/csirke SPGA-ban rekonstituáltunk. A csirkék második csoportja 200 pfu SB-1 vakcinát kapott, 1000 pfu HVT vakcina vírussal együtt. Egy hét után ezeket a csirkéket 20 azonos eredetű és korú nem vakcinázott csirkével együtt, a virulens

RBIB törzs izomba való oltásával fertőztünk. Hat héten át a Marek betegségben elhullott csirkék csoportonkénti számát meghatároztuk.

2. táblázat

Vakcina	Madarak száma: elhullott/vizsgált
kontroll	20/20
SB-1	6/20
HVT/SB-1	0/20

### Szabadalmi igénypontok

1. Vakcina baromfik Marek-féle betegség elleni védelmére, azzal jellemezve, hogy sejtmentes II. szerotípusú Marek-féle betegség vírusait tartalmazza, a gyógyszergyártásban szokásos hordozó-, hígító- és/vagy egyéb segédanyagok mellett.

2. Az 1. igénypont szerinti vakcina, azzal jellemezve, hogy sejtmentes SB-1 vírusokat tartalmaz.

3. Az 1. igénypont szerinti vakcina, azzal jellemezve, hogy sejtmentes B-24 vírusokat tartalmaz.

4. Az 1. igénypont szerinti vakcina, azzal jellemezve, hogy a sejtmentes II. szerotípusú Marek-féle betegség vírus dózisa legalább 2,2 pfu/csirke.

5. A 4. igénypont szerinti vakcina, azzal jellemezve, hogy a vírus dózisa legalább 2,7 pfu/csirke.

6. Az 5. igénypont szerinti vakcina, azzal jellemezve, hogy a vírus dózisa legalább 3,2 pfu/csirke.

7. Az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti vakcina, azzal jellemezve, hogy sejtmentes HVT-t is tartalmaz.

8. Az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti vakcina, azzal jellemezve, hogy liofilizált formában van.

9. Eljárás baromfiak Marek-féle betegség elleni védelmére szolgáló vakcina előállítására, azzal jellemezve, hogy

a) II. szerotípusú Marek-féle betegség vírust olyan sejttenyészetben növesztünk, amelyről hatásos immunizáló dózishoz szükséges mennyiségű sejtmentes vírus nyerhető,

- b) a sejteket elroncsoljuk,
- c) a sejtmentes vírusokat összegyűjtjük, és
- d) a c) lépésben kapott anyagot az alábbi kezelések

legalább egyikének vetjük alá:

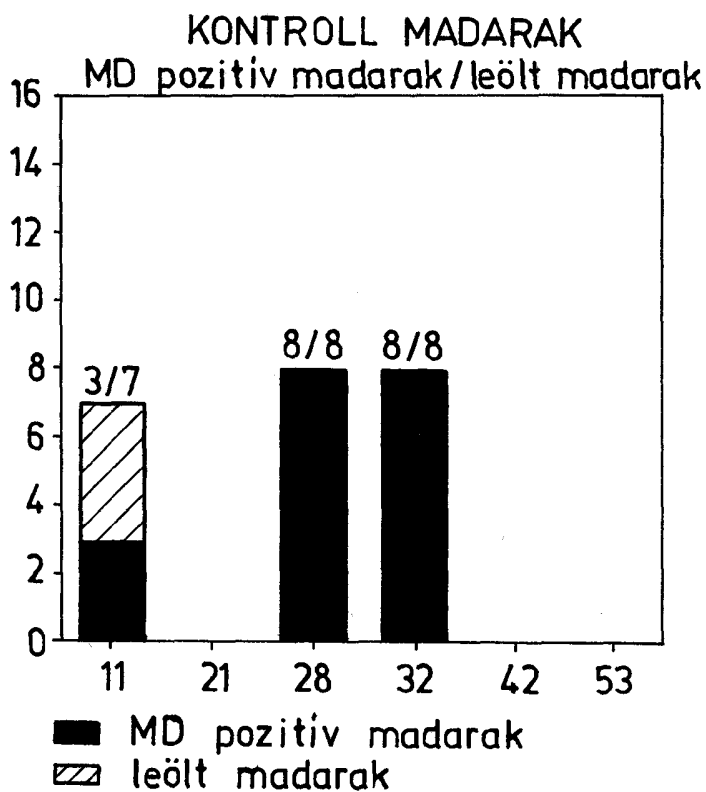
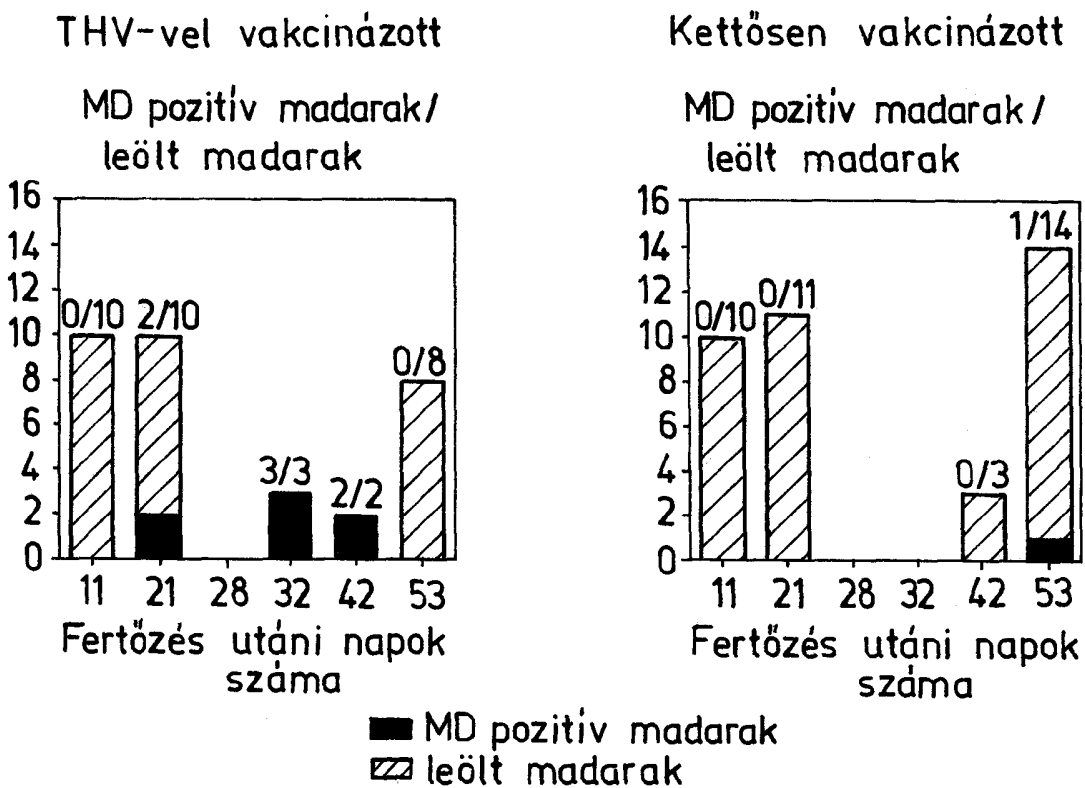
- i) tisztítás centrifugálással és/vagy szűréssel;
- ii) puffer hozzáadása;
- iii) stabilizáló anyag hozzáadása;
- iv) az anyag ampullába töltése;
- v) fagyaszva szárítás.

10. A 9. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a b) lépésben legalább 4 log pfu/ml sejtmentes vírus-titerrel rendelkező terméket állítunk elő.

11. Eljárás baromfiak Marek-féle betegségének leküzdésére, azzal jellemezve, hogy az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti vakcinát adagoljuk.

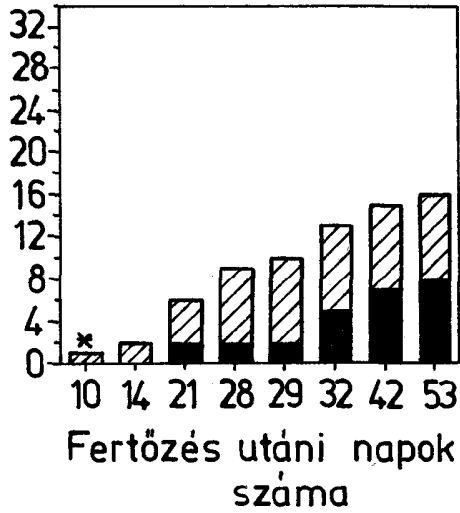
A meghatalmazott:

DANUBIA  
Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.  
2.

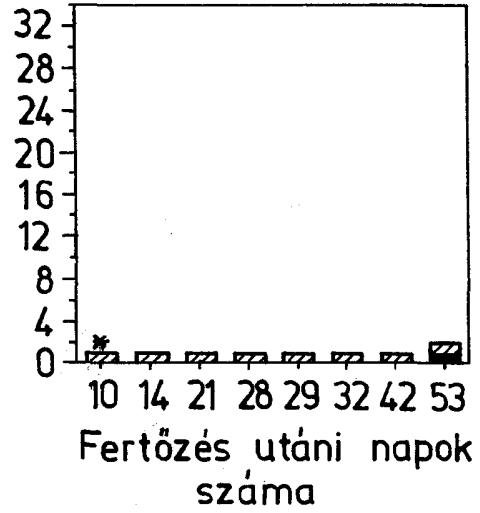


1. ábra

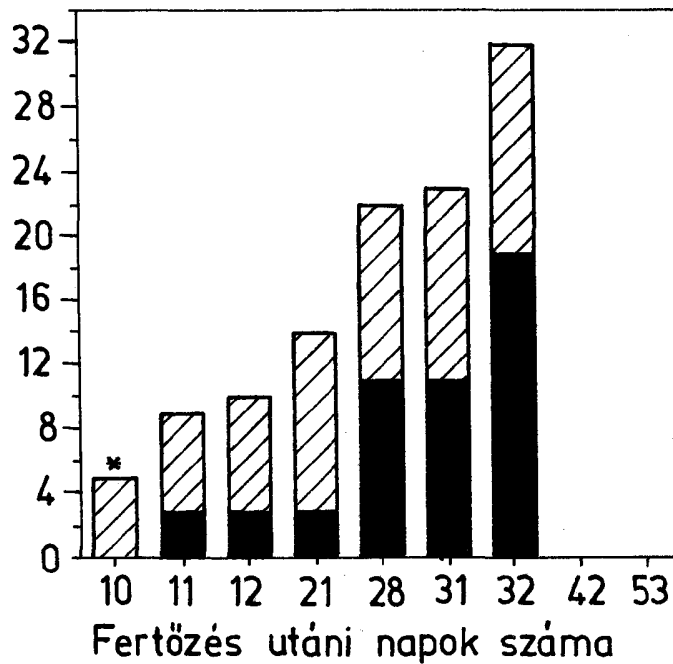
THV-vel vakcinázott  
MD pozitív madarak



Kettősen vakcinázott  
MD pozitív madarak



Leölt madarak  
 Elpusztult madarak  
 Leölt és elpusztult összesen  
 Kontroll MD pozitív madarak



Leölt madarak  
 Elpusztult madarak  
 Leölt és elpusztult összesen

\* Citolitikus MD következtében elpusztult madarak

2. ábra

DANUBIA  
 Állatorvosi és Védőanyag Kut.  
 8.