

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

89 652

Patent dodatkowy
do patentu _____

Zgłoszono: 04.11.71 (P. 151390)

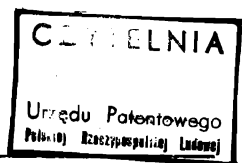
Pierwszeństwo: 25.11.70
Stany Zjednoczone Ameryki

Zgłoszenie ogłoszono: 20.04.73

Opis patentowy opublikowano: 30.07.1977

MKP
C12k 7/00

Int. Cl.².
C12K 7/00



Twórca wynalazku: _____

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

Sposób otrzymywania trwałej bezkomórkowej i o wysokim mianie zawiesiny zdolnych do życia wirusów

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania trwałej, bezkomórkowej i o wysokim mianie zawiesiny, zdolnych do życia wirusów, wiążących się z komórkami. W szczególności wynalazek odnosi się do sposobu ekstrakcji wiążących się z komórką wirusów z zainfekowanych komórek, przy czym wirusy te utrzymuje się w stanie zdolnym do życia. Zawiesina wiążącego się z komórką wirusa, uzyskiwana sposobem według wynalazku, jest trwała i odznacza się działaniem nawet po liofilizacji. Można ją przechowywać przez dłuższy okres czasu w temperaturach lodówki oraz można ją przesyłać w różne miejsca bez niedogodnego do realizacji zamrożenia. Zawiesinę, otrzymaną sposobem według wynalazku, można stosować w badaniach naukowych, przysyłać bez kłopotu na duże odległości i przechowywać przez dłuższy okres czasu w lodówce. Sposób według wynalazku można również stosować do ekstrakcji wiążących się z komórką wirusów z komórek, w których wirus osłabiono albo z mało złośliwego szczepu, antygenicznie związanego z konkretną chorobą. Otrzymane w ten sposób bezkomórkowe zawiesiny wirusów można stosować do przygotowania szczepionek ochronnych przeciw chorobom.

Z uwagi na oczywiste powiązanie przyczynowe z leukozą u ptactwa wiele wirusów, wiążących się z komórką, jest ostatnio przedmiotem intensywnych badań. W ostatniej publikacji, Witter i in., Avian Dis., 13, 171–184 (1969), opisano wirus typu opryszczki jako etiologiczny czynnik choroby Marek'a, będącej chorobą zakaźną kurczaków, u których w różnych organach występują nowotwory limfoidalne. Występowanie choroby Marek'a ma poważne znaczenie ekonomiczne na świecie, gdyż jest ona bardzo zaraźliwa i w pewnych przypadkach wywołuje wśród drobiu 50-cio procentową lub wyższą śmiertelność zbiorową, oraz wysoki procent odrzutów w drobiu, zabijanego na mięso.

Ze względu na wielką wagę badań nad zapobieganiem chorobie Marek'a należało najpierw ustalić czynnik ją wywołujący, wyizolować go, poddać ją testom kontrolnym, oraz różnym badaniom w celu pełniejszego zrozumienia istoty tej choroby.

Dotychczasowe próby wyizolowania i oddzielenia wirusa z zainfekowanych komórek doprowadzały niestety do kompletnego zaniku zakaźności wirusa.

Konieczność pozostawiania wirusa w stanie związanym z komórką, o ile chciało się zachować jego moc i zdolność do życia, całkowicie hamowała wszelkie próby uzyskania trwałych szczepionek.

Celem niniejszego wynalazku było opracowanie sposobu otrzymywania zawiesin wirusa, wiążącego się z komórkami, tak, aby zawiesiny te nie zawierały komórek i były przy tym trwałe, nadające się do przechowywania lub liofilizacji, a jednocześnie, aby wirusy nie utraciły nic ze swoich właściwości i siły działania.

Sposób według wynalazku polega na zmieszaniu komórek, zainfekowanych wirusem wiążącym się z komórkami z czynnikiem stabilizującym, zawierającym albuminę lub kazeinę w ilości wystarczającej do wytworzenia homogenicznej zawiesiny zainfekowanych komórek w czynniku stabilizującym, po czym otrzymaną homogeniczną zawiesinę poddaje się niszczeniu komórek tak, aby nastąpiło ich rozerwanie. W ten sposób uwalnia się nienaruszony, zdolny do życia wirus. Uzyskaną bezkomórkową zawiesinę wirusa w czynniku stabilizującym ewentualnie poddaje się liofilizacji.

Dotychczas było wiadomo, że wirusy, wiążące się z komórką, traciły swoją zdolność do życia i moc po oddzieleniu ich od komórki. Zaskakujący jest w związku z tym fakt, że produkt, uzyskany sposobem według wynalazku, nie zawierający komórek, wykazuje znacznie większą zdolność do życia i działania, niż preparaty, nie zawierające czynnika stabilizującego i ekstrahowane z komórki. Inną, nieoczekiwaną zaletą wirusowych produktów, uzyskiwanych sposobem według wynalazku jest fakt, że pomimo, iż na ogół wiele typów wirusów, wiążących się z komórką, wymaga zamrażania do krańcowo niskich temperatur, aby zachować ich stabilność, to produkt, otrzymywany według wynalazku, można utrzymywać w stanie zamrożenia w znacznie wyższych temperaturach w dłuższych okresach czasu bez utraty zdolności do życia i działania. Ponadto, liofilizowane produkty, uzyskiwane zgodnie ze sposobem według wynalazku, można przechowywać przez dłuższy okres czasu w temperaturach lodówki bez znacznych strat ich zdolności do życia i działania.

Sposób według wynalazku można stosować ogólnie do wirusów, wiążących się z komórkami, a zwłaszcza do preparatów wirusowych w postaci suchej lub wodnej, które są albo zaraźliwe albo mogą być stosowane do wytwarzania szczepionek za pomocą uprzedniego osłabienia wirusa znanymi metodami, albo za pomocą zastosowania wirusa, antygenicznie związanego z konkretną chorobą. Wiadomo na przykład, że żywy, osłabiony wirus typu opryszczki choroby Marek'a, tj. szczep HPRS-16, można stosować do uodpornienia przeciw chorobie Marek'a, co opisali Churchill i in., *J. Gen. Virol.* 4, 577–564 (1969) i *Nature*, 221, 744–747 (1969). Wiadomo również, że szczepienie szczepem FC-126 wirusa opryszczki indyka zabezpiecza przeciw chorobie Marek'a.

Sposób według wynalazku znajduje zatem szerokie zastosowanie do związanych z komórkami wirusów, a w tym żywych wirusów złośliwych, żywych osłabionych wirusów, żywych wirusów, antygenicznie związanych z chorobą Marek'a i do zabitych wirusów. Dla przykładu, niektóre z wielu wiążących się z komórkami wirusów, do których stosuje się sposób według wynalazku, należą do grupy B wirusa opryszczki, które opisał Melnick, *J. Immunol.* 92, 595–601 (1964).

Szczególnie korzystne wyniki uzyskuje się, stosując w sposobie według wynalazku takie wirusy, wiążące się z komórkami, jak wirus varicella herpes zoster, cytomegalovirus, wirus Burkitt lymphoma, wirus Lucke tumor, wirus opryszczki indyka i wirus choroby Marek'a.

Czynnikami stabilizującymi, stosowanymi w sposobie według wynalazku, są substancje białkowe, takie jak albumina i kazeina, ewentualnie w połączeniu z innymi dodatkowymi składnikami. Ich stabilizujące działanie pozwala na utrzymywanie wysokiego miana wirusa podczas i/lub po rozerwaniu komórek. Czynnikiem stabilizującym może prócz albuminy lub kazeiny zawierać pochodną skrobi, korzystną szczególnie w przypadkach, gdy mieszanka ma być poddana liofilizacji. Czynnikiem stabilizującym może także zawierać inne środki pomocnicze, takie jak czynniki buforowe. Jako źródło albuminy korzystnie stosuje się surowicę wołową, a jako źródło kazeiny – mleko w proszku.

Ilość stosowanego czynnika stabilizującego zależy od gęstości materiału komórkowego, względnego stężenia występującego wirusa i innych podobnych czynników. Korzystnie dodaje się czynnik stabilizujący w postaci suchego proszku lub rozcieńczonego roztworu wodnego do materiału komórkowego, jednocześnie mieszając w niskiej temperaturze, do uzyskania homogenicznej zawiesiny substancji komórkowej w czynniku stabilizującym.

Ogólnie, zainfekowany materiał komórkowy rozprowadza się w wodnym roztworze, zawierającym substancję białkową w niskim stężeniu (około 0,1% wagowych/objętość). Stężenie w procentach wagowych (objętość oznacza stosunek suchej masy substancji, zawierającej białka, wyrażonej w gramach, do objętości roztworu w mililitrach, w którym zawiera się substancję komórkową. W celu uzyskania płynnej, homogenicznej zawiesiny można czynnik stabilizujący stosować w mniejszym stężeniu, takim jak 0,05% wagowych/objętość. Dopuszczalne są stężenia substancji, zawierającej proteiny, około 1% wagowych/objętość. Można również stosować wyższe

stężenia, pod warunkiem, że substancja białkowa zasadniczo rozpuszcza się w wodnym środowisku. Ogólnie stężenie substancji, zawierającej białka, wyrażone w procentach wagowych/objętość, jest takie, aby uzyskać homogeniczną zawiesinę substancji komórkowej w czynniku stabilizującym.

Może być korzystne takie nastawianie stężenia substancji komórkowej, żeby uzyskać określone miana wirusa. Wpływ czynnika stabilizującego, zawierającego białka, pozostaje jednak niezmieniony, dopóki stężenie jest zgodne z powyższymi ustaleniami.

Jeżeli uzyskana sposobem według wynalazku bezkomórkowa zawiesina wirusów ma być poddana liofilizacji, to jej zdolność działania w znacznej mierze zabezpiecza i utrzymuje dodanie do ciekłego preparatu (przed suszeniem) pochodnej skrobi lub mieszaniny pochodnych skrobi. Pochodną skrobi można dodawać do gotowego preparatu bezkomórkowego lub przed rozerwaniem komórek, łącznie z wymienionym czynnikiem stabilizującym. Większość pochodnych skrobi można stosować razem z substancją, zawierającą białka. Można np. łączyć produkty hydrolizy skrobi, jak sacharoza, dekstroza lub glikoza z albuminą lub kazeiną. Najkorzystniejsze jest zastosowanie sacharozy jako pochodnej skrobi.

W celu utrzymania wysokiego miana preparatu w trakcie liofilizacji wystarczające jest stężenie pochodnej skrobi około 2% wagowych na objętość (tj. suchej masy pochodnej skrobi w gramach do objętości wodnego roztworu w mililitrach). Można jednak stosować i wyższe stężenia. Stężenie substancji białkowej nie jest bezpośrednio związane ze stężeniem pochodnej skrobi. Tak więc, do homogenicznej zawiesiny bezkomórkowej, każda ilość homogenicznie zawieszona czynnika stabilizującego i każda ilość pochodnej skrobi, 2% wagowych/objętość lub większa, będzie skuteczna do zabezpieczenia mocy i trwałości preparatu.

Czynnik stabilizujący może ewentualnie zawierać małe dodatkowe ilości buforów, wystarczające do utrzymania względnie optymalnego pH wirusa w czynniku stabilizującym, tj. pH=6,5–7,5. Tak np. korzystny czynnik stabilizujący zawiera mieszaninę albuminy wołowej, sacharozy i takiego buforu, jak fosforany metali alkalicznych. Można również dodawać glutaminiany metali alkalicznych, chociaż nie są one konieczne do uzyskania efektu stabilizującego.

Korzystnie stosuje się następujące mieszaniny:

- albuminę i sacharozę,
- albuminę, sacharozę i glutaminiany metali alkalicznych,
- kazeinę i sacharozę,
- kazeinę, aminę N–Z i glikozę,
- albuminę, sacharozę i fosforany metali alkalicznych,
- albuminę wołową, sacharozę, fosforany i glutaminiany metali alkalicznych.

Najkorzystniejszym praktycznie stabilizatorem jest mieszanina, ogólnie znana pod nazwą „SPGA”, opisana przez Bovarnicka i in., J.Bact., 59, 509–522 (1950). Mieszanina ta zawiera 7,46% sacharozy, 0,05 g fosforanu jednopotasowego, 0,16 g fosforanu dwupotasowego, 0,01 g jednosodowej soli kwasu glutaminowego i 0,1 g proszku albuminy wołowej, przy czym wszystkie te składniki są rozpuszczone w 100 ml wody destylowanej. Doskonałe wyniki uzyskuje się, stosując stężenie około 10 części wagowych opisanej „SPGA” na 1 część materiału komórkowego. Zadowalające wyniki otrzymuje się również przy zastosowaniu czynnika stabilizującego „SPGA” o stężeniu, dochodzącym do 150 części wagowych. Jest rzeczą oczywistą, że odpowienie wartości stężenia substancji białkowej i pochodną skrobi w „SPGA” zawierają się w ustalonych powyżej zakresach.

Sposobem według wynalazku można też otrzymać bardzo silnie działające suche produkty, stabilizowane przez normalne suszenie preparatów ciekłych, takie jak suszenie ze stanu zamrożenia i liofilizacja. Cały proces korzystnie prowadzi się w warunkach aseptycznych, stosując uprzednio wysterylizowane składniki.

Sposób według wynalazku ilustrują następujące przykłady, nie ograniczając jego zakresu. Jeśli tego nie zaznaczono odrębnie, stężenie składników podano w procentach wagowych/objętość.

Opis stosowanych wirusów. W celu ilustracji sposobu według wynalazku stosowano trzy szczepy, silnie wiążących się z komórkami wirusów opryszczki. Szczepy tych wirusów zidentyfikowano jako szczep FC-126 wirusa opryszczki indyka, szczep JM choroby Marek’a i szczep GA choroby Marek’a.

a) Szczep JM wirusa choroby Marek’a wiąże się silnie z komórkami i jest antygenicznie związany z wirusem opryszczki indyków, ale różni się wyraźnie od zakaźnych wirusów zapalenia tchawicy i wirusów zapalenia jelit u kaczek. Wirus ten oznaczono jako szczep JM i zgłoszono bez ograniczeń w American Type Culture Collection, Washington, D.C., pod numerem stałego zbioru wirusów A.T.C.C. VR No. 585. Złożono go również w składnicy Cornell University, gdzie jest dostępny pod oznaczeniem Accession No. RT-711. Szczegółowy opis preparatu i charakterystykę szczepu JM podał Sevoian in., Vet. Med., 57, 500–501 (1962).

b) Szczep FC126 wirusa opryszczki indyka wiąże się silnie z komórkami i jest antygenicznie spokrewniony z wirusem choroby Marek’a u kurczaków. Opisano działanie zabezpieczające tego wirusa przeciw chorobie

Marek'a, jeśli jest zaszczepiony jednodniowym kurczętom i później styka się z wirusem choroby Marek'a. Ten wirus opryszczki oznaczono symbolem FC126 (HVT) i złożono bez ograniczeń w American Typo Culture Collection, Washington, D.C., gdzie znajduje się w stałym zbiorze wirusów pod numerem A.T.C.C. VR No. 584. Złożono go również w składnicy Cornell University, gdzie jest dostępny pod znaczeniem Accession No. RT-720. Dokładniejszy opis szczepu podali Witter i in., *Am.J.Vet. Res.* 31, 525–538 (1970) i Okzaki i in., *Avian Dis.*, 14, 413–429 (1970).

c) Szczep GA wirusa choroby Marek'a również silnie wiąże się z komórkami. Wirus ten oznaczono jako szczep GA i złożono bez ograniczeń w American Type Culture Collection, Washington, D.C., gdzie znajduje się w stałym zbiorze wirusów pod numerem A.T.C.C. VR No. 624. Złożono go także w składnicy Cornell University, gdzie jest dostępny pod oznaczeniem Accession No. RT-743. Dokładniejszy opis szczepu GA i sposobu jego otrzymywania podał Edison i in., *Avian Dis.*, 12, 467–475 (1968).

Przykład I. W opisanych poniżej próbach 1–3 stosowano podany powyżej wirus szczepu JM. Szczep wirusa otrzymuje się z 2 partii skóry bezpośrednio przedtem zabitych kurczaków, zainfekowanych szczepem JM choroby Marek'a. Paski skóry, z której usunięto upierzenie, miesza się w stosunku 1:5 lub 1:10 z zawierającym sól buforem fosforanowym o pH=6,8, miele się, homogenizuje w ciągu 5 minut w mieszarce Sorvall Omni-Mixer, Ivan Sorvall, Inc., Norwalk, Conn. i rozdrabnia się przy użyciu drgań dźwiękowych w ciągu 2 minut przy ustaleniu zasilania na pozycji 7 (26–32 ma), stosując aparat Model W 140 D Sonifer Cell Disrupter (Heat Systema Ultraconics, Inc., Plainview, Long Island, N.Y.). Zawiesinę klaruje się przez odwirowania przy szybkości 650 x C i ciecz sklarowaną zamraża się do temperatury -65°C. Uważa się, że tak uzyskane zawiesiny nie zawierają zdolnych do życia komórek. W próbach 1 do 3, zawiesiny wirusa odmraża się i po różnych, opisanych zabiegach próbki o objętości 1 lub 2 ml zamraża się.

W próbach 4 do 8 postępuje się trochę inaczej. Źródłem wirusów JM, GA i FC126 są znacznie zainfekowane (powyżej 75 %CPE) hodowle na płytkach Petriego o średnicy 50 mm. Oba szczepy wirusa choroby Marek'a rozwijają się w hodowli na nerce kurczaków. W grupach 643 i 659 wirusy opryszczki indyka rozrastają się w komórkach nerki kurczaka. W grupie 654 wirus opryszczki indyka rozwija się w embrionalnych fibroblastach kurczaka. Sklarowaną ciecz odciąga się i zastępuje 2 ml (próba 6), 2,5 ml (próby 4, 5, 7) lub 5 ml (próba 8) kultury jednego z dwóch mediów w postaci zawiesiny. Wolne komórki zeskrobuje się gumową pałeczką do zbiorów z 4 lub 5 hodowli (1 hodowla na obróbkę w próbie 8). Każdą zawiesinę rozdrabnia się przy pomocy drgań dźwiękowych w ciągu 2 minut i próbki o objętości 1 ml zamraża się do temperatury -65°C lub liofilizuje się.

Komórki z innych hodowli zbiera się i zamraża do temperatury -65°C. Stosuje się procedurę, przeznaczoną do zabezpieczenia całości komórek, z zastosowaniem sulfotlenku dwumetylu jako środka zabezpieczającego według metody, opisanej przez Spencera i in., *Avian Dis.* 11, 274–287 (1967).

W próbach 9 i 10, zawiesinę embrionalnych fibroblastów kurczaka, zainfekowaną wirusem HVT, zamraża się jako całość komórek do temperatury -196°C, odmraża się i rozcieńcza w stosunku 1:30 (próba 9) lub 1:40 (próba 10) w różnych cieczach dyspergujących, patrz tabela 3. Porcje po 5 ml rozdrabnia się przy użyciu drgań dźwiękowych w ciągu 1 minuty i próbki o objętości 1 ml zamraża się do temperatury -65°C lub liofilizuje się. W pierwszej próbie stosowano następujące roztwory:

Stabilizatory i rozcieńczalniki.

1. 20 %glikozę,
2. Stabilizator, składający się z 8% odtłuszczonego mleka w proszku i 2% aminy N–Z typu AS (Sheffield Chemical, Norwich, N.Y.) z buforem Sorensena o pH=6,2 i z dodatkiem 5% glikozy,
3. Stabilizator „SPGA”, opisany przez Bovarnicka i in., *J.Bact.*, 59, 509–522 (1950); mieszanina zawierała 0,218 m sacharozy, 0,0038 m fosforanu jednopotasowego, 0 0072 m fosforanu dwupotasowego, 0,0049 m jednosodowej soli kwasu glutaminowego i 1 %proszku albuminy wołowej.
4. Aminę „SPG–NZ” tj. taką samą mieszaninę, jak SPGA, z tym, że zamiast albuminy wołowej zawiera ona 1% aminy N–Z typu B (pozostałość po trawieniu trzustkowym kazeiny) pH różnych roztworów wynosiło 6,2–7,0 tj. mieściło się w zakresie, w którym nie wpływa ono na miano wirusa.

W drugiej i trzeciej próbie przeprowadza się dodatkowe testy ze stabilizatorem SPGA.

W próbach 4–8 stosuje się dwa roztwory: zawierający sól buforanowy (PBS) o pH=6,8 oraz SPGA.

W próbach 9 i 10 stosowano następujące roztwory w buforze fosforanowym (0,0038 m fosforanu jednopotasowego i 0,0072 m fosforanu dwupotasowego):

- a) 0,218 m sacharozy (S),
- b) 0,0049 jednosodowej soli kwasu glutaminowego (G),
- c) Si G,
- d) 1% proszku albuminy wołowej (A),
- e) A i S,
- f) A i G,
- g) A, G i S,
- h) 8% odtłuszczonego mleka w proszku, 2% aminy N-Z typu AS oraz
- i) 8% odtłuszczonego mleka w proszku.

Stosowano również:

- a) nierozcieńczoną surowicę płodową (wołową /BFS),
- b) 15% BFS w środowisku hodowli tkankowej nr 99 (M 199),
- c) 10% sulfotlenku dwumetylu i 10% brzołeczki fosforanowego tryptozy w M 199.

We wszystkich próbach, próbki poddane liofilizacji rekonstruuje się przy użyciu wody destylowanej.

Liofilizacja. Liofilizację przeprowadza się w aparacie Virtis Model USM-15 Freeze-Dryer (Virtis Co., Inc. Gardiner, N.Y.). Próbki, umieszczone w 5 mililitrowych buteleczkach na surowicę z przerwanyymi zamknięciami gumowymi, zamraża się wstępnie w oddzielnym zamrażalniku mechanicznym do temperatury -65°C lub zamraża się do temperatury -60°C na półkach chłodniczych urządzenia do odparowania ze stanu zamrożenia. Próbki suszy się pod próżnią w temperaturze 38°C w ciągu 24 godzin, doprowadzając ciepło do półek suszarniczych, a następnie suszy się jeszcze w ciągu około 15 godzin w temperaturze półek 21°C . Buteleczki uszczelnia się pod próżnią i do chwili przeprowadzenia analizy przechowuje się w temperaturze 4°C . Analizę przeprowadza się po upływie 1 do 10 dni od momentu przygotowania wirusa.

Próby z wirusami. We wszystkich próbach, próbki zaszczepia się bezpośrednio po odmrożeniu lub rekonstrukcji do dwóch wysuszonych hodowli nerki kurczaka, rozwijanych w ciągu 24 godzin. W przypadku wirusów choroby Marek'a, ekstrahowanych z zainfekowanych komórek hodowli, w celu zwiększenia czułości analizy dodaje się czasem 0,2% etylenodwuaminy kwasu czteroocowego (EDTA). W celu uzyskania takiej szybkości zainfekowania, która umożliwia zliczanie poszczególnych ognisk, w pewnych przypadkach wszczepia się próbki w dziesięciokrotnym rozcieńczeniu. Rozcieńczalnikiem jest środowisko dyspergujące. Metody komórkowej hodowli do analizy stosuje się zgodnie z opisem Calneka i in., J.Nat.Cancer Institut., 45, 341-351 (1970). Uszkodzenie ogniskowe zlicza się po upływie 8 dni po zaszczepieniu (wirus choroby Marek'a) lub po upływie 6 dni (wirus opryszczki indyka). Do oceny liczby ognisk (FFU) na mililitr nierozcieńczonego wirusa stosuje się przeciętną zliczeń ognisk z dwóch jednakowych hodowli oraz współczynnik rozcieńczenia.

Wyniki. Wyniki przedstawiono w tabelach 1, 2 i 3. Badania wirusa JM choroby Marek'a, wyizolowanego z ekstraktów skóry, (tablica 1) wskazują, że: okres przetrwania wirusa po liofilizacji jest trochę przedłużony przy użyciu 20%-owej glikozy jako stabilizatora oraz wyraźnie dłuższy przy zastosowaniu SPGA lub aminy SPG-NZ, dodatek SPGA do neliofilizowanej zawiesiny wirusa ponad dwukrotnie podwyższa jego miano, najwyższe zawartości uzyskuje się z liofilizowanych próbek przy użyciu SPGA.

Z prób, przeprowadzonych z wirusem, pochodzącym z hodowli komórkowej, (tablica 2) wynika jasno, że 1) ekstrakcja obu szczepów wirusa choroby Marek'a prowadzi do wyższych mian przy użyciu SPGA, niż PBS jako środowiska dyspergującego oraz, że 2) dla wirusa choroby Marek'a z powodzeniem można przeprowadzać liofilizację przy użyciu SPGA, jako stabilizatora, ponadto, że 3) wydajności, uzyskiwane z ekstraktu hodowli, zainfekowanych wirusem opryszczki indyka, są znacznie większe, niż dla hodowli zainfekowanych wirusem choroby Marek'a, chociaż miana zależności w stanie związanym z komórkami były zbliżone do siebie, oraz, że 4) miana ekstraktu za pomocą PBS wirusa opryszczki indyka są podobne do mian uzyskiwanych w przypadku zastosowania do ekstrakcji środowiska hodowli komórkowej, opisanego przez Wittera i in., Am.J.Vet.Res., 31, 525-538 (1970). Miana ekstraktu SPGA są często 30-50 razy większe, niż dla ekstraktów PBS oraz procent przetrwania po liofilizacji wynosi zazwyczaj 30-40 lub więcej, podczas gdy dla innych ekstraktów wynosi poniżej 1%.

Ponowne analizy wirusa liofilizowanego w próbach 2, 4, 6 i 7 przeprowadzano po okresie przechowywania 17 do 44 dni w temperaturze 4°C . Miano wirusa w tych próbach nie ulega zmianie w stosunku do oznaczeń pierwotnych.

Z wyników prób 9 i 10 (tablica 3) wnioskuje się, że sama albumina lub z sacharozą i/lub solami kwasu glutaminowego jest odpowiednim stabilizatorem przy ekstrakcji wirusa. Dodatek sacharozy jest jednak korzystny

w celu zwiększenia ilości wirusa, zdolnego do przetrwania w trakcie liofilizacji. Odtłuszczone mleko w proszku, samo lub w połączeniu z aminą N-Z jest również odpowiednim stabilizatorem wdo ekstrakcji i wirus można potem liofilizować. Stwierdzono częściowo działanie stabilizujące w czasie ekstrakcji i innych substancji, np. surowicy (płodowej) wołowej, 10% BFS w M 199 lub 10% sulfotlenku dwumetylu i 10% brzezki fosforanu tryptozy w M 199; są one jednak gorsze od wymienionych powyżej substancji lub ich połączeń.

Tablica I

Wpływ różnych sposobów obróbki i stabilizatorów na miano preparatu bezkomórkowego wirusa opryszczki szczepu JM choroby Marek'a, ekstrahowanego ze skóry*

Próba	Sposób obróbki		FFU/ml nierozcieńczonego wirusa	
	Partia wirusa	Rozcieńczalnik i rozcieńczenie	Nie liofilizowany	Liofilizowany. Rekonstruowany wodą
1	X-300	bez rozcieńczalnika	2800	100
		20% glikozy, 1:2	1680	690
		mleko odtłuszczone		
		5% glikozy, 1:5	2400	360
		SPGA, 1:5	5600	4900
2	X-311	SPG-amina N-Z, 1:5	4800	3120
		bez rozcieńczalnika	690	10
3	X-300	SPGA, 1:5	1330	480
		bez rozcieńczalnika	2160	—
		PBS, 1:10	2880	—
		SPGA, 1:10	4000	—

* Skróty: FFU, liczba ognisk,
PBS, zawierający sól bufor fosforanowy (pH=6,8),
SPGA i SPGA-amina N-Z, stabilizatory (patrz tekst),
— nie badane

Tablica II

Wpływ różnych sposobów obróbki i stabilizatorów na miano preparatów bezkomórkowych wirusa opryszczki choroby Marek'a (MDHV) (szczepy JM i GA) oraz szczepu FC-126 wirusa opryszczki indyka (HVT) ekstrahowanych z hodowli zainfekowanych komórek*

Próba	Typ i szczep wirusa	Obróbka	FFU/ml Ekstrakcja z rozcieńczalnikami		
			Zawiesina całych komórek	PBS	SPGA
4	MDHV/JM/	Zamrażanie	58000	120	220
		Liofilizacja	—	0**	820**
5	MDHV/GA/	Zamrażanie	94000	170	—
		Liofilizacja	—	0**	3850**
6	HVT/FC 126/	Zamrażanie	68000	1370	398000
		Liofilizacja	—	0	125000
7	HVT/FC 126/	Zamrażanie	190000	910	147000
		Liofilizacja	—	5	72000
8	HVT/FC 126/	Zamrażanie	240	49400	144000
		Liofilizacja	—	0	96000

* Skróty: PBS, zawierający sól bufor fosforanowy,
SPGA, stabilizator,
FFU— liczba ognisk,
— nie badano

** — Analiza przeprowadzona z dodatkiem 0,2% EDTA do inokulum

T a b l i c a I I I

Wpływ różnych składników środowiska dyspergującego na miano preparatu bezkomórkowego szczepu FC126 wirusa opryszczki indyka /HVT/, ekstrahowanych z zainfekowanych hodowli komórkowych*/1,2

Ciecz dyspergująca	FFU/ml, Ekstrakcja z rozcieńczalnikiem			
	Próba 9		Próba 10	
	Zamrożona	Liofilizowana	Zamrożona	Liofilizowana
Tylko bufor fosforanowy	10	0	0	0
Składniki buforu fosforanowego:				
Sacharoza /0,218 m/	10	0	—	—
Glutaminian /0,0049 m/	10	0	—	—
Sacharoza i glutaminian	10	0	—	—
Albumina wołowa /1%/	3500	25	—	—
Albumina wołowa i sacharoza	3950	1200	—	—
Albumina wołowa i glutaminian	1925	75	—	—
Albumina wołowa, sacharoza i glutaminian /SPGA/	5650	560	2400	1520
Odtłuszczone mleko zbierane /8%/				
i amina N-Z /2%/	2760	85	—	—
Odtłuszczone mleko zbierane /6%/	—	—	840	110
Różne substancje				
Nierozcieńczona surowica wołowa płodowa /BFS/	100	0	—	—
BFS /15%/ w hodowli tkanki				
Med 199 /M 199/	50	0	—	—
Dwumetylosulfotlenek /10%/				
i brzeczka fosforanu tryptozy w M 199	35	0	—	—

* /1 : Skróty: FFU — liczba ognisk, — nie badano

* /2 Dane tej tabeli są wynikami doświadczeń, w których substancję komórkową (źródło wirusa) zamrażano w postaci zawiesiny całych komórek przy użyciu dwumetylosulfotlenku jako środka zabezpieczającego. Następnie odmrażano ją, przemylano w buforze i przed ekstrakcją w różnych cieczach rozcieńczano w stosunku 1:30 (próba 9) lub 1:40 (próba 10) przy użyciu drgań dźwiękowych.

Wyniki te wskazują, że wirus choroby Marek'a lub wirus opryszczki można uzyskać z dużymi wydajnościami przez ekstrakcję w obecności lub po rozcieńczeniu w stabilizatorze wirusa, przy czym można następnie przeprowadzić liofilizację bez dostrzegalnego zmniejszenia miana wirusa. Z powyższych danych widać, że trwała, bezkomórkowa zawiesina wirusa, wytwarzana sposobem według wynalazku, wykazuje miano 10^3 lub większe w przypadku wirusów choroby Marek'a, a miano zawiesiny wirusa opryszczki indyka wynosi 10^5 lub więcej. Wyniki tych doświadczeń wykazały ponadto, że przy ekstrakcji, prowadzonej w obecności surowicy płodowej wołowej, z zastosowaniem lub bez środowiska hodowli tkankowej otrzymuje się bardzo małe miano wirusa, co oznacza prawie całkowitą jego bezużyteczność jako szczepionki.

Sposób według wynalazku okazał się nieoczekiwanie bardzo skuteczny do ekstrakcji wirusa, wiążącego się z komórkami z zainfekowanych komórek.

Rozerwanie i pęknięcie komórek, powodujące uwolnienie nienaruszonego, zdolnego do życia wirusa z komórek, wywoływano w czasie przykładowych doświadczeń metodą drgań dźwiękowych. Wiadomo, jednak, że można w tym celu stosować inne znane sposoby, takie jak zamrażanie i odmrażanie, homogenizację niskotemperaturową itp.

Jedynym ograniczeniem procesu ekstrakcji sposobem według wynalazku jest konieczność przeprowadzenia rozerwania i pęknięcia komórek wówczas, gdy komórki są zdyspergowane w czynniku stabilizującym wirus, gdyż tylko to zapewnia utrzymanie wirusów, uwolnionych z komórki w stanie zdolnym do życia.

P r z y k ł a d I I. Moc, tj. miano zakaźności preparatów bezkomórkowych z komórek, zainfekowanych wirusem opryszczki, otrzymanych przez poddanie drganiom dźwiękowym roztworów, zawierających w różnych stężeniach albuminę wołową (frakcja surowicy V) jako czynnik stabilizujący, określa się następującym sposobem:

Podstawowe hodowle komórek embrionalnych fibroblastów kurczaka /CEF/ szczepi się szczepem FC-126 wirusa opryszczki indyka. Po okresie 3-dniowej inkubacji, zainfekowane komórki zbiera się znanymi metodami trypsinowymi z 210 płytek Pertiego o średnicy 60 mm i uzyskuje się $1,4 \cdot 10^9$ komórek. Objętość osadu komórek po odwirowaniu z szybkością 1200 obrotów na minutę w ciągu 10 minut wynosi około 3 ml. Odwirowane komórki rozprowadza się w 60 ml środowiska hodowli tkankowej (środowisko nr 199 plus 10% brzeczki fosforanu tryptozy). Sześć próbek po 10 ml ponownie umieszcza się w probówkach i odwirowuje. Objętość osadu komórek w każdej probówce wynosi około 0,5 ml. Ciecz sklarowaną nad komórkami odprowadza się i zainfekowane komórki dysperguje się w 2,0 ml buforu fosforanowego zawierającego różne ilości albuminy tak, aby uzyskać rozcieńczenie 1:5 (stosunek objętościowy). Następne rozcieńczenia otrzymuje się z tych zawiesin i w odpowiednich rozcieńczalnikach wynoszą one 1:10 i 1:100 objętościowo.

Każdą próbkę poddaje się w ciągu 45 sekund działaniu drgań dźwiękowych i bezpośrednio potem rozcieńcza się w stosunku 1:10 (objętościowo) w czynniku stabilizującym, składającym się z 6,7% sacharozy, 1% albuminy wołowej w buforze fosforanowym oraz następnie zamraża się do temperatury -70°C .

W celu przeprowadzenia analizy próbki o dziesięciokrotnym rozcieńczeniu wszczepia się do podwójnych, wydrenowanych hodowli pierwotnych komórek CEF. Po upływie 5 dni od zaszczepienia zlicza się ogniska.

Tablica IV

Stosunek komórek do rozpuszczalnika /objętościowo/	Liczba ognisk/ml / $\times 10^6$ / po działaniu drganiami dźwiękowymi w rozcieńczalniku, zawierającym wskazane ilości albuminy*				
	1%	0,5%	0,25%	0,1%	0,05%
1:5	5,5 /27,5/	5,5 /27,5/	6,0 /30,0/	5,5 /27,5/	2,3 /11,5/
1:10	1,4 /14,4/	1,8 /18,0/	2,2 /21,6/	2,8 /27,8/	1,0 /9,6/
1:100	0,17 /16,8/	0,24 /24,0/	0,26 /26,4/	0,28 /27,6/	0,14 /14,4/
Przeciętna wydajność na mililitr osadu komórek /FFU $\times 10^6$ /	19,6	23,2	26,0	27,6	11,8

* Liczby w nawiasach wskazują liczbę ogniska / $\times 10^6$ / na mililitr osadu komórek (liczba na mililitr razy współczynnik rozcieńczenia).

Z danych, przedstawionych w tabeli 4, widać, że stosunek komórek do rozcieńczalnika nie jest czynnikiem krytycznym (wydajności odpowiadają liczbie występujących komórek wirusa) i już tak niska zawartość albuminy, jak 0,1%, daje wystarczający efekt zabezpieczający wirus, umożliwiający utrzymanie dużego miana wirusa w trakcie i po rozerwaniu komórek. Można zauważyć, że przy stężeniu 0,05% również uzyskuje się pewien efekt zabezpieczający, choć nie tak duży, jak przy stężeniach 0,1 do 1,0%.

Przykład III. Następującym sposobem określa się okres stopień przeżycia bezkomórkowego wirusa opryszczki indyka, ekstrahowanego przy użyciu drgań dźwiękowych z zainfekowanych komórek CEF, zdyspergowanych w jednym z czynników stabilizujących, stosowanych w sposobie według wynalazku (sacharoza, bufor fosforanowy i albumina wołowa), a następnie liofilizowanych po uprzednim rozcieńczeniu w stosunku 1:10 w roztworach o różnych stężeniach sacharozy i albuminy wołowej w buforze fosforanowym.

Podstawowe hodowle komórek CEF, zainfekowanych wirusem opryszczki indyka (szczep FC-126, taki jak opisano w przykładzie II), rozcieńcza się w czynniku stabilizującym, składającym się z 7,6% sacharozy i 1% albuminy wołowej, frakcji surowicy V w buforze fosforanowym /SPA/ przy stosunku objętościowym 1 część osadu komórek do 20 części czynnika stabilizującego SPA. Zawiesinę poddaje się drganiom dźwiękowym w ciągu 1,5 minuty i następnie zamraża się na okres nocy w temperaturze -70°C . Po odmrożeniu zawiesinę bezkomórkową frakcji wirusa rozcieńcza się w stosunku 1:10 w każdym z następujących 4 rozcieńczalników: 10% sacharoza, 10% sacharoza plus 1% albuminy, 1% albuminy (wszystkie w buforze fosforanowym) lub w samym buforze fosforanowym. Przez zmieszanie odpowiednich ilości wirusa, rozcieńczonego w 10% sacharozie i albuminie, z wirusem, rozcieńczonym w samej albuminie, otrzymuje się próbki o różnych stężeniach sacharozy przy tym samym stężeniu albuminy. Przygotowuje się podobne mieszaniny wirusa w sacharozie lub w buforze fosforanowym. Stężenie albuminy w tych próbkach wynosi 0,1%, ponieważ stosuje się rozcieńczenie albuminy w wirusie 1:10.

Każdą z próbek o objętości 1 ml liofilizuje się. W celu przeprowadzenia analizy, każdą próbkę w fiolce rekonstruuje się przy użyciu 1 ml wody destylowanej. Następnie po 10-krotnym rozcieńczeniu szczepi się po dwie wydrenowane, pierwotne hodowle CEF, rozwijane w ciągu 24 godzin. Po upływie 5 dni od zaszczepienia zlicza się ogniska i dla każdej próbki oblicza się liczbę ognisk /FFU/ na mililitr. Uzyskuje się następujące wyniki (tablica V).

Tablica V

Końcowe stężenie sacharozy	FFU/ml w roztworach sacharozy, zawierających wskazane ilości albuminy	
	1% albuminy	0,1% albuminy
10%	44400	43200
8%	36000	35200
6%	45600	56000
4%	31200	44800
2%	35200	33600
1%	14000	13600

Powyższe wyniki wskazują, że zastosowanie sacharozy już w stężeniu 2% wagowych dobrze zabezpiecza wirus, związany z komórkami, w trakcie liofilizacji, przy czym stężenie albuminy wynosi 1,0 lub 0,1% wagowych.

Przykład IV. Przykład przedstawia skuteczność liofilizowanej frakcji bezkomórkowej wirusa typu herpetycznego indyka /HVT/ jako szczepionki, zabezpieczającej kurczaki przeciw chorobie Marek'a. W tym celu jednodniowe i trzytygodniowe, podatne kurczaki szczepi się różnymi dawkami wirusa i po upływie 20 lub 22 dni szczepione i nieszczepione kurczaki poddaje się działaniu złośliwego wirusa choroby Marek'a. Wyniki przedstawiono w tablicy 6.

Tablica VI

Zakaźność i odporność przy zwalczaniu złośliwego wirusa choroby Marek'a u kurczaków, szczepionych liofilizowanym bezkomórkowym preparatem wirusa opryszczki indyka (szczep FC-126).

Próba	Wiek podczas szczepienia	Rozcieńczenie wirusa	Dawka /FFU/	Testy na zaraźliwość*/1 przy użyciu HVT		Wrażliwość na zwalczanie*/2 wirusa choroby Marek'a	
				Zakażone	Wytrącone precypityną	Zarażone kurczaki	Niezakażone kurczaki
1	1 dzień	1:50	6000	9/9	0/10	0/10	...*/3
		1:500	600	10/10	0/10	0/10	...
		1:5000	60	9/9	0/10	1/9	...
		1:50000	6	8/10	0/10	1/8	2/2
		—	żadna	0/10	0/10	...	9/9
3	3 tygodnie	1:50	2700	10/10	1/10	0/10	...
		1:500	270	10/10	0/10	0/10	...
		1:5000	27	10/10	0/10	0/9	...
		1:50000	2,7	1/10	0/10	1/7	3/3
		—	żadna	0/10	0/10	...	0/10

*/1 Badano po okresie 20 dni (próba 1) lub 22 dni (próba 2) od zaszczepienia. Analizę na zakażenie wirusem HVT przeprowadzono z nierozrywami komórkami w stanie świeżym (próba 1) lub zamrożonym przy użyciu DMSO jako środka zabezpieczającego (próba 2).

*/2 Wszystkie kurczaki szczepiono dojrzałe przy użyciu komórek, zainfekowanych wirusem JM w dawce 10 000 FFU. Kurczaki, które padły /MD/ lub wykazywały całkowicie zmiany patologiczne /MD/ w 8 tygodni po zaszczepieniu uważa się za podatne.

*/3 ... — nie ma drobiu w tej kategorii.

Z tabeli 6 wynika, że już małe dawki 2, 7 i 6 jednostek, tworzących ogniska, są zaraźliwe dla większości szczepionych kurczaków, a większa dawka — dla wszystkich kurczaków. Widać również, że prawie wszystkie zainfekowane kurczaki są odporne na złośliwy wirus choroby Marek'a podczas, gdy prawie wszystkie kurczaki nie szczepione padają w identycznej próbie.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania trwałej, bezkomórkowej i o wysokim mianie zawiesiny zdolnych do życia wirusów, wiążących się z komórkami, z n a m i e n n y t y m, że komórki zainfekowane wirusem, wiążącym się z komórkami, miesza się z czynnikiem stabilizującym, zawierającym albuminę lub kazeinę, w ilości, wystarczającej do wytworzenia homogenicznej zawiesiny zainfekowanych komórek w czynniku stabilizującym, po czym otrzymaną homogeniczną zawiesinę poddaje się niszczeniu komórek tak, aby nastąpiło ich rozerwanie, przy czym następuje uwolnienie nienaruszonego, zdolnego do życia wirusa z komórek, a następnie uzyskaną bezkomórkową, zdolną do życia zawiesinę wirusa w czynniku stabilizującym poddaje się ewentualnie liofilizacji.

2. Sposób według zastrz. 1, z n a m i e n n y t y m, że stosuje się komórki, zainfekowane wirusem opryszczki grupy B.

3. Sposób według zastrz. 1, z n a m i e n n y t y m, że stosuje się komórki, zainfekowane wirusem opryszczki indyka.

4. Sposób według zastrz. 3, z n a m i e n n y t y m, że stosuje się komórki, zainfekowane wirusem FC 126, wyizolowanym z wirusa opryszczki indyka.

5. Sposób według zastrz. 1, z n a m i e n n y t y m, że stosuje się komórki, zainfekowane wirusem, wyizolowanym z grupy wirusów JM i GA, wyizolowanych z wirusa opryszczki choroby Marek'a.

6. Sposób według zastrz. 1, z n a m i e n n y t y m, że stosuje się czynnik stabilizujący, zawierający dodatkowo pochodną skrobi, zwłaszcza sacharozę.

7. Sposób według zastrz. 1, z n a m i e n n y t y m, że stosuje się czynnik stabilizujący, składający się z mieszaniny albuminy lub kazeiny oraz jednej lub więcej substancji, takiej jak sacharoza, fosforany, glutaminiany, glikoza i aminy N—Z.

8. Sposób według zastrz. 1, z n a m i e n n y t y m, że stosuje się substancje białkowe w takiej ilości, aby ich stężenie w otrzymanej zawiesinie wynosiło co najmniej 0,05% wagowych/objętość, obliczonych w g suchej masy w stosunku do objętości w ml roztworu.

9. Sposób według zastrz. 6, z n a m i e n n y t y m, że stosuje się pochodną skrobi, a zwłaszcza sacharozę w takiej ilości, aby jej stężenie w otrzymanej zawiesinie wynosiło co najmniej 2% wagowych/objętość, obliczonych w g suchej masy w stosunku do objętości w ml roztworu.