



(19) REPUBLIKA HRVATSKA  
DRŽAVNI ZAVOD ZA  
INTELEKTUALNO VLASNIŠTVO



(21) Broj prijave:

HR P20040641A A2

HR P20040641A A2

## (12) PRIJAVA PATENTA

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>: **C 12 N 5/06**  
**C 12 N 7/00**

(22) Datum podnošenja prijave patenta u HR: 13.07.2004.

(43) Datum objave prijave patenta u HR: 31.10.2004.

(86) Broj međunarodne prijave: PCT/US02/40567

Datum podnošenja međunarodne prijave 18.12.2002.

(87) Broj međunarodne objave: WO 03/055988

Datum međunarodne objave 10.07.2003.

(31) Broj prve prijave: 60/343,339

(32) Datum podnošenja prve prijave: 21.12.2001.

(33) Država ili organizacija podnošenja prve prijave: US

(71) Podnositelj prijave:

**WYETH, Five Giralda Farms, Madison, 07940 NJ, US**

(72) Izumitelj:

**David Lou Wederquist, 2624 SW Wintercreek Drive, Lee's Summit, 64081 MO, US**

(74) Punomoćnici:

Dina KORPER ŽEMVA, Zagreb, HR

Zdenko HARAMIJA, Zagreb, HR

(54) Naziv izuma:

**ZRNASTA MASA PTIČJEG EMBRIJA ZA PROIZVODNJU ANTIGENA VIRUSA**

(57) Sažetak: Ovaj izum daje biomasu koja sadržava čestice embrija koje imaju veličinu čestica oko 0,5 mm do 10,0 mm, i njihovu uporabu u postupku za proizvodnju antigena virusa. Isto tako, daje se postupak za dobivanje cjepiva korisna za ublažavanje i prevenciju neke virusne bolesti.

HR P20040641A A2

## OPIS IZUMA

5 Konvencionalne su metode za proizvodnju antigena virusa proizvodnja u jajetu, tj. proizvodnja unutar inficiranog embrija u jajetu; ili proizvodnja iz stanične kulture, tj. inficiranih primarnih stanica ili vrste stanica. Tipična metoda za proizvodnju antigena u jajetu sastoji se od mnogo koraka koje je teško automatizirati, a zahtijevaju mnogo rada, utrošenog vremena, a podložna je kontaminaciji. Obično, proizvodnja stanične kulture iziskuje uporabu pojedinačnih stanica i agregata stanica koji su izuzetno mali, a koji zahtijevaju da se tkivo razbije ili disosira do krajnje mjere, mehanički ili enzimatski. Ovakav tretman može dovesti do propadanja mnogih stanica, što za rezultat ima visok stupanj kontaminacije staničnih proteina koji se teško izdvajaju iz željenog proizvoda. Metode za proizvodnju cjepiva antigena virusa encefalitisa od krpelja i virusa gripe, opisane su u patentima US 5,391,491 i US 5,698,433, respektivno. Ove metode koriste agregate stanica ptičjeg embrija koji imaju polumjer >100 μm, a <1000 μm, i zahtijevaju enzimatski korak.

15 Prema tome, predmet ovoga izuma je davanje biomase koja je korisna za proizvodnju antigena virusa koja eliminira nedostatke proizvodnje antigena u jajetu i proizvodnje antigena koja koristi pojedinačne stanice, vrste stanica ili agregate stanica mikronskih dimenzija.

20 Slijedeći je predmet ovoga izuma davanje metode za proizvodnju antigena virusa koja vodi većoj proizvodnji antigena virusa, a koja se može koristiti na komercijalnoj skali.

Prednost ovoga izuma je da se s biomasom lako rukuje, a metoda proizvodnje antigena nudi ekonomične korake i znatno smanjuje priliku za kontaminaciju.

25 Karakteristika je ovoga izuma da se cjepivo, učinkovito protiv virusnih infekcija i bolesti, može proizvesti lakše i ekonomičnije.

Slijedeći predmeti i karakteristike ovoga izuma biti će jasniji iz detaljnog opisa koji slijedi u nastavku.

30 Ovaj izum daje biomasu koja proizvodi antigen virusa, a koja se sastoji od čestica ptičjeg embrija, a veličina ovih čestica je oko 0,5 mm do 10,0 mm, pri čemu su te čestice inficirane virusom.

Ovaj izum isto tako daje postupak za proizvodnju antigena virusa koji se sastoji od:

- a) Inficiranja čestica ptičjeg embrija, a veličina ovih čestica je od oko 0,5 mm do 10,0 mm, s virusom, u mediju kulture za formiranje biomase;
- 35 b) dodavanja kisika spomenutoj biomasi na povišenoj temperaturi, uz formiranje smjese s dodatkom kisika; i
- c) filtriranja spomenute smjese, dajući filtrat koji sadržava željeni proizvod antigena virusa.

Ovaj izum još daje postupak za dobivanje cjepiva koji se sastoji od:

- 40 a) inficiranja čestica ptičjeg embrija, a veličina ovih čestica je od oko 0,5 mm do 10,0 mm, protiv virusa, u mediju kulture za formiranje biomase;
- b) dodavanja kisika spomenutoj biomasi na povišenoj temperaturi, uz formiranje smjese s dodatkom kisika;
- c) filtriranja spomenute smjese dajući filtrat koji sadržava kao proizvod željeni antigen virusa;
- d) miješanja spomenutog filtrata s farmakološki prihvatljivim tekućim nosačem; i
- 45 e) opcijskog dodavanja adjuvanta za stimuliranje antigeniciteta.

Konvencionalne metode za proizvodnju antigena virusa su proizvodnja inficiranih embrija jajeta, kao što je kokošje jaje, proizvodnja kulture primarnih stanica koje su inficirane, ili inficirane vrste stanica, ili proizvodnja agregata stanica ptičjeg embrija mikronskih dimenzija. Sve ove metode sadržavaju više koraka i/ili enzimsko kidanje i tehnike razdvajanja, kao što su centrifugiranje, sedimentacija i slično.

50 S iznenađenjem sada je otkriveno da se biomasa, koja sadržava čestice ptičjeg, poželjno pilećeg, embrija, s dimenzijama čestica od oko 0,5 mm do 10,0 mm, poželjno oko 1,0 mm do 3,0 mm, pri čemu su te čestice inficirane virusom, može učinkovito upotrebljavati za efikasno dobivanje antigena virusa. Čestice ptičjeg embrija ove biomase, u skladu s ovim izumom, mogu se dobiti konvencionalnim postupcima mehaničkog smanjivanja veličine, kao što je miješanje s visokim smicanjem, brzo miješanje s miješalicom s više lopatica, homogenizacijom i slično, poželjno homogenizacijom. Na primjer, ptičji embriji uzeti između 9-12 dana, poželjno 11 dana starih inkubiranih kokošnjih jaja, mogu se oprati sterilnom otopinom pufera, razrijediti medijem kulture, kao što je juha triptosa fosfata, koncentrirati na oko 50 do 250, poželjno oko 80-120, poželjnije oko 100 embrija na litru, pa im se mehanički smanjiti veličina, dajući suspenziju čestica ptičjeg embrija s veličinom čestica oko 0,5 do 10,0 mm, poželjno od 1,0 mm do 3,0 mm. Ova se suspenzija može zatim inficirati virusom ili zametkom originalnog virusa, dajući biomasu u skladu s ovim izumom. Pogodni su virusi, bilo koji virus ili antigen koji je u stanju da reproducira stanice ptičjeg embrija, kao što su Reovirus, virus infektivne bolesti burze (IBDV), virus Marek-ove bolesti (MDV), virus bolesti Newcastle (NDV), virus infektivnog bronhitisa (IBV),

virus boginja, virus pileće anemije (CAV), sindrom ispuštanja jaja (EDS), virus purećeg rinotraheitisa (TRT), pneumovirus, virus infektivnog laringotraheitisa (ILT), virus encefalomielitisa, virus gripe, virus bjesnoće, virus štenećaka, virus hemoragičnog enteritisa, virus hepatitisa, *Clamylidia Psittaci*, *Haemophilus Paragallinarum* i slično, poželjno ptičji virusi, poželjnije virus infektivne bolesti burze.

5

U skladu s tim, ovaj izum daje postupak za proizvodnju antigena virusa koji sadržava inficirane čestice ptičjeg embrija, veličine čestica oko 0,5 mm do 10,0 mm, poželjno oko 1,0 mm do 3,0 mm, s virusom, poželjno ptičjim virusom, poželjnije s virusom infektivne bolesti burze, u kulturi medija za formiranje biomase; dovođenja kisika spomenutoj biomasi na povišenoj temperaturi uz formiranje smjese s dovedenim kisikom; i filtriranja spomenute smjese, dajući filtrat koji sadržava kao proizvod željeni antigen virusa.

10

Pogodan medij kulture koji se koristi u ovome izumu je juha triptoza fosfata, EMEM, DMEM (koje proizvodi Anhui Chemicals), ili bilo koji konvencionalni medij koji je pogodan za biološke kulture, poželjno juha triptoza fosfata.

15

Povišene su temperature, pogodne za uporabu u ovome izumu temperature oko 32° do 43°C, poželjno oko 35° do 41°C, poželjnije oko 37° do 39°C.

Smjese s dodatkom kisika dobivene postupkom iz ovoga izuma sadrže od 40% do 60%, poželjno od 45% do 55%, poželjnije 50% otopljenog kisika.

20

U stvarnoj praksi, suspenzija čestica ptičjeg embrija, s veličinom čestica oko 0,5 mm do 10,0 mm, poželjno oko 1,0 mm do 3,0 mm, u mediju kulture kao što je juha triptoza fosfata, s koncentracijom oko 50 do 250, poželjno oko 80-120, poželjnije oko 100 embrija na litru medija kulture, inficira se virusom, poželjno ptičjim virusom, poželjnije virusom infektivne bolesti burze, dajući biomasu; spomenutoj se biomasi dodaje kisik na povišenoj temperaturi od oko 32°C do 43°C, poželjno oko 35° do 41°C, poželjnije oko 37° do 39°C, dajući smjesu s dodatkom kisika koja ima oko 40% do 60%, poželjno od 45% do 55%, poželjnije 50% otopljenog kisika; ova smjesa s dodatkom kisika filtrira se kroz sito od oko 50 µm do 100µm, poželjno oko 70 µm do 80 µm, poželjnije oko 75 µm, dajući filtrat koji sadržava željeni antigenski proizvod. Ovako se dobivena antigenska polazna otopina može tretirati s konvencionalnim dodacima, kao što su stabilizatori, antioksidansi, agensi protiv pjenušanja ili slično, pa skladištiti smrzavanjem ili liofilizacijom, do uporabe u budućem dobivanju cjepiva, ili se mogu koristiti kao takovi, za dobivanje cjepiva.

25

30

U skladu s tim, ovaj izum daje isto tako postupak za dobivanje cjepiva koji se sastoji od miješanja polazne antigenske otopine, dobivenog gore opisanim postupkom, s farmakološki prihvatljivim nosačem i opcijski, uz dodatak adjuvanta koji stimulira antigenicitet.

35

Farmakološki su prihvatljivi nosači, pogodni za uporabu u postupku za dobivanje cjepiva iz ovoga izuma, bilo koji konvencionalni tekući nosač, pogodan za veterinarske farmaceutske preparate, poželjno uravnotežena slana otopina, pogodna za uporabu u mediju kulture medija.

40

Adjuvanti koji stimuliraju antigenicitet, pogodni za uporabu u postupku za dobivanje cjepiva iz ovoga izuma, bilo su koji spoj koji je u stanju pojačavati ili stimulirati imuni odgovor u životinji, kada se ordiniraju u kombinaciji s antigenom, kao što su surfaktanti, tj. heksadecilamin, oktadecilamin, lizolecitin, dimetildioktadecilamonij-bromid, N,N-dioktadecil-N'-N-bis-(2-hidroksietil-propandiamin), metoksiheksadecilglicerol, Pluronic® poliol, saponin, Quil® A, ili slično; Polianioni, kao što su piran, dekstransulfat, polinukleotidni kompleks polinozinilne-policiklotidilne kiseline, poliakrilna kiselina, carbopol, aluminij-hidroksid, aluminij-fosfat ili slično; peptidi, kao što je muramildipeptid, dimetilglicin, tuftsin ili slično; uljne emulzije; imunomodulatori, kao što je interleukin-1, interleukin-2, interleukin-12, GM-CSF ili slično; ili neka njihova kombinacija.

45

U stvarnoj praksi, polazna otopina antigena virusa, poželjno ptičjeg antigena virusa, poželjnije antigena virusa infektivne bolesti burze, dobivena u skladu s postupkom za proizvodnju antigena iz ovoga izuma opisana gore, pomiješa se s farmakološki prihvatljivim nosačem, kao što je otopina slanog fosfatnog pufera i opcijski, adjuvanta za stimulaciju antigeniciteta, daje kao proizvod cjepivo koje ima koncentraciju antigena oko 1,2 log gornje minimalne zaštitne doze.

50

Ovako se dobiveno cjepivo može još tretirati s konvencionalnim dodacima, koji se obično koriste u veterinarskim cjepivima, kao što su stabilizatori, antioksidansi, agensi protiv pjenušanja i slično.

55

U jednoj realizaciji ovoga izuma polazna otopina antigena virusa može se inaktivirati prije dobivanja cjepiva. Polazna otopina antigena virusa, dobivena u skladu s postupkom za proizvodnju antigena iz ovoga izuma, može se inaktivirati konvencionalnim načinima inaktiviranja, na primjer kemijskom inaktivacijom, koristeći kemijske agense za inaktivaciju, kao što su binarni etilenamin, beta-propiolakton, formalin, mertiolat, glutaraldehid, natrij-dodecilsulfat ili slično, ili njihove smjese, poželjno formalin. Spomenuti se antigen može isto tako inaktivirati toplinom ili psoralenom, uz prisustvo ultraljubičaste svjetlosti.

60

Za jasnije razumijevanje ovoga izuma, u nastavku se daju slijedeći primjeri. Ovi primjeri samo su ilustrativni i ne treba ih shvatiti da na bilo koji način ograničavaju obim i osnovne principe ovoga izuma. Doista, iz slijedećih primjera i prethodnog opisa, onima koji su verzirani u stanje tehnike jasne su razne modifikacije ovoga izuma, uz one koje su ovdje pokazane i opisane. Namjera je da te modifikacije pripadnu obimu priključenih patentnih zahtjeva.

Ukoliko se drugačije ne kaže, svi su dijelovi maseni dijelovi.

### **Primjer 1**

#### **Dobivanje antigena virusa infektivne bolesti burze (IBDV)**

Prikupe se embriji kokošnjih jaja, koji su 11 dana inkubirani na 37°C, tri puta operu otopinom gentamicina u otopini fosfatnog pufera (30 mg/mL), na sobnoj temperaturi. Oprani embriji se razrijede, približno 100 embrija na litru juhe triptoza fosfata. Ovako se razrijeđeni embriji homogeniziraju do veličine čestica 1,0 do 3,0 μm, koristeći model homogenizatora W250V (Gilfford-Wood), koji proizvodi Chemineer (Greerco), prethodno podešen na 3,0 mm. Dobivena se suspenzija 20–30 min mehanički miješa s 0,1 mL po embriju zasijane radne vrste X-4 Lukert (IBDV dozvoljene od USDA-APHIS) (5,5 TCID<sub>50</sub>/mL). Dobivenoj se smjesi dodaje kisik na pH 7,1, pod tlakom 0,2 bar, na 38,0°C i koncentraciji od 20 embrija/L, dok konačni sadržaj otopljenog kisika ne bude 50% DO. Poslije 48 h, smjesa s ovakvim dodatkom kisika filtrira se kroz sito od 75 μm, pomiješa u odnosu 1:1 sa stabilizatorom H<sup>1</sup> i miješa 1 h na sobnoj temperaturi, pa se čuva na ≤ 4°C.

Koristeći gornji postupak, dobije se polazna otopina antigena IBDV koja ima jačinu od 9,2 TCID<sub>50</sub>/mL. TCID označava kulturu infektivne doze tkiva.

Sastojak	masa/volumen
pročišćena voda	0,5 kg/L
Pharmatone, proizvodi American Labs	5,0 g/L
Peptone Bacto, proizvodi Becton Dickinson	45,0 g/L
saharoza	50,0 g/L
N-Z-Amine Type Yt, proizvodi Quest International	25,0 g/L
mononatrij-glutamat	5,0 g/L
pročišćena voda	q. s.

### **Primjer 2**

#### **Dobivanje antigena virusa**

Koristeći u biti isti postupak koja je opisana u primjeru 2, a koristeći odgovarajući virus, dobiju se polazne otopine antigena koji su prikazani u Tablici I.

#### **TABLICA I.**

Antigen	Jačina
Reovirus	8,26 TCID <sub>50</sub> /mL
Virus infektivne bolesti burze	9,20 TCID <sub>50</sub> /mL
Virus bolesti Newcastle	8,60 EID <sub>50</sub> /mL <sup>1</sup>

<sup>1</sup> EID = infektivna doza embrija

### **Primjer 3**

#### **Dobivanje cjepiva virusa infektivne bolesti burze**

Polazna otopina antigena infektivne bolesti burze, koja je dobivena u skladu s postupkom opisanim u Primjeru 1 i smrznuta, otopi se na sobnoj temperaturi, pa razrijedi smjesom 1:1 stabilizatora H i D-mem<sup>2</sup>, do konačne koncentracije antigena od 1,2 log minimalne zaštitne doze. Razrijeđena se početna otopina najmanje 15 min miješa, pa se prebacuje u fiole za jediničnu ili višestruku dozu.

<sup>1</sup> Formulacija stabilizatora H: Pomiješaju se dolje navedeni sastojci, redom kako su navedeni. Svaki je sastojak potpuno otopi prije nego što se doda slijedeći. Ako je potrebno primijeni se zagrijavanje najviše do 60°C.

<sup>2</sup> D-mem je minimalni esencijalni medij koji proizvodi JRH Bioscience.

## PATENTNI ZAHTJEVI

1. Biomasa za proizvodnju antigena virusa, **naznačena time**, što sadržava čestice ptičjeg embrija s veličinom čestica oko 0,5 mm do 10,0 mm, gdje su spomenute čestice inficirane nekim virusom.
- 5 2. Biomasa prema Zahtjevu 1, **naznačena time**, što je veličina čestica oko 1,0 mm do 3,0 mm.
3. Biomasa prema Zahtjevu 1, **naznačena time**, što ptičji embrij predstavlja pileći embrij.
4. Biomasa prema Zahtjevu 1, **naznačena time**, što se spomenuti virus bira iz grupe koju čine Reovirus, virus infektivne bolesti burze, virus Marek-ove bolesti, virus bolesti Newcastle, virus infektivnog bronhitisa, virus boginja, virus pileće anemije, sindrom ispuštanja jaja, virus purećega rinotraheitisa, pneumovirus, virus infektivnoga laringotraheitisa, virus encefalomielitisa, virus gripe, virus bjesnoće, virus štenećaka, virus hemoragičnog enteritisa, virus hepatitisa, *Haemophilus Paragallinarum* i *Clamidia Psittaci*.
- 10 5. Biomasa prema Zahtjevu 1, **naznačena time**, što spomenuti virus predstavlja neki ptičji virus.
6. Biomasa prema Zahtjevu 5, **naznačena time**, što spomenuti virus predstavlja virus infektivne bolesti burze.
7. Postupak za proizvodnju antigena virusa, **naznačen time**, što se sastoji od:
  - 15 a) inficiranja čestica ptičjeg embrija, a veličina ovih čestica je od oko 0,5 mm do 10,0 mm, s virusom, u mediju kulture za formiranje biomase;
  - b) dodavanja kisika spomenutoj biomasi na povišenoj temperaturi, uz formiranje smjese s dodatkom kisika; i
  - c) filtriranja spomenute smjese, dajući filtrat koji sadržava željeni proizvod antigena virusa.
8. Postupak prema Zahtjevu 7, **naznačen time**, što su spomenute čestice embrija oko 1,0 mm do 3,0 mm.
- 20 9. Postupak prema Zahtjevu 7, **naznačen time**, što spomenuti medij kulture predstavlja juha triptoza fosfata.
10. Postupak prema Zahtjevu 7, **naznačen time**, što spomenuta smjesa koja sadržava kisik ima oko 40% do 60% otopljenog kisika.
11. Postupak prema Zahtjevu 7, **naznačen time**, što je povišena temperatura od oko 35°C do 41°C.
12. Postupak prema Zahtjevu 7, **naznačen time**, što se virus bira iz grupe koju čine Reovirus, virus infektivne bolesti burze, virus Marek-ove bolesti, virus bolesti Newcastle, virus infektivnoga bronhitisa, virus boginja, virus pileće anemije, sindrom ispuštanja jaja, virus purećega rinotraheitisa, pneumovirus, virus infektivnoga laringotraheitisa, virus encefalomielitisa, virus gripe, virus bjesnoće, virus štenećaka, virus hemoragičnog enteritisa, virus hepatitisa, *Haemophilus Paragallinarum* i *Clamidia Psittaci*.
- 25 13. Postupak prema Zahtjevu 7, **naznačen time**, što virus predstavlja neki ptičji virus.
- 30 14. Postupak prema Zahtjevu 13, **naznačen time**, što virus predstavlja virus infektivne bolesti burze.
15. Postupak za dobivanje cjepiva protiv virusa, **naznačen time**, što se sastoji od:
  - a) inficiranja čestica ptičjeg embrija, a veličina ovih čestica je od oko 0,5 mm do 10,0 mm, virusa u mediju kulture za formiranje biomase;
  - b) dodavanja kisika spomenutoj biomasi na povišenoj temperaturi, uz formiranje smjese s dodatkom kisika;
  - 35 c) filtriranja spomenute smjese dajući filtrat koji sadržava kao proizvod željeni antigen virusa;
  - d) miješanja spomenutog filtrata s farmakološki prihvatljivim tekućim nosačem;
  - i
  - e) opcijskog dodavanja adjuvanta za stimuliranje antigeniciteta.
- 40 16. Postupak prema Zahtjevu 15, **naznačen time**, što se virus bira iz grupe koju čine Reovirus, virus infektivne bolesti burze, virus Marek-ove bolesti, virus bolesti Newcastle, virus infektivnog bronhitisa, virus boginja, virus pileće anemije, sindrom ispuštanja jaja, virus purećega rinotraheitisa, pneumovirus, virus infektivnoga laringotraheitisa, virus encefalomielitisa, virus gripe, virus bjesnoće, virus štenećaka, virus hemoragičnog enteritisa, virus hepatitisa, *Haemophilus Paragallinarum* i *Clamidia Psittaci*.
17. Postupak prema Zahtjevu 15, **naznačen time**, što virus predstavlja neki ptičji virus.
- 45 18. Postupak prema Zahtjevu 17, **naznačen time**, što virus predstavlja virus infektivne bolesti burze.
19. Postupak prema Zahtjevu 18, **naznačen time**, što čestice spomenutog ptičjeg embrija imaju veličinu čestica oko 1,0 mm do 3,0 mm.
20. Postupak prema Zahtjevu 19, **naznačen time**, što spomenute čestice predstavljaju čestice pilećeg embrija.

50

## SAŽETAK

55 Ovaj izum daje biomasu koja sadržava čestice embrija koje imaju veličinu čestica oko 0,5 mm do 10,0 mm, i njihovu uporabu u postupku za proizvodnju antigena virusa. Isto tako, daje se postupak za dobivanje cjepiva korisna za ublažavanje i prevenciju neke virusne bolesti.