

ÖZET

Bir Bovine Papillomavirus (BPV) İnaktif Aşı Üretim Yöntemi

Bovine papillomavirus (BPV) kaynaklı gelişen siğillerin terapötik ve/veya profilaktik tedavisi için bir inaktif BPV aşısı üretim yöntemidir. Söz konusu yöntem Buzağı

- 5 fibropapillomundan standart BPV ve Turkey_BUR2_Teat_BPV MZ265290, Turkey_BUR4_Teat_BPV MZ265291, Turkey_BUR7_Teat_BPV MZ265292, Turkey_BUR1_Teat_BPV MZ2650293, Turkey_BUR5_Teat_BPV MZ265294, Turkey_BUR6_Teat_BPV MZ265295, Turkey_BUR3_Teat_BPV MZ265296, Turkey_BUR1_BPV_Skn MW767171, Turkey_BUR2_BPV_Skn MW767174,
- 10 Turkey_BUR3_BPV_Skn MW767172, Turkey_BUR4_BPV_Skn MW767173 ve bunların kombinasyonları içeren bir guptan seçilen sahadan izole edilen izolat BPV içeren BPV karışımının L-929 fare (*Mus musculus*) hücre hattında üretilmesi, Antijen BPV'nin L-929 fare (*Mus musculus*) hücre hattından elde edilmesi, Antijen BPV'nin inaktivasyonu, Mineral olmayan bir yağ solüsyonunda anhidroz mannitol oleik esterleri
- 15 ve/veya immün stimüle komplekslerin inaktif antijen BPV'ye ilave edilmesi adımlarını içermektedir.

İSTEMLER

1. Bovine papillomavirus (BPV) kaynaklı gelişen siğillerin terapötik ve/veya profilaktik tedavisi için bir inaktif BPV aşısı üretim yöntemi olup aşağıdaki adımları içermektedir.
- 5 A. Buzağı fibropapillomundan standart BPV ve Turkey_BUR2_Teat_BPV MZ265290, Turkey_BUR4_Teat_BPV MZ265291, Turkey_BUR7_Teat_BPV MZ265292, Turkey_BUR1_Teat_BPV MZ2650293, Turkey_BUR5_Teat_BPV MZ265294, Turkey_BUR6_Teat_BPV MZ265295, Turkey_BUR3_Teat_BPV MZ265296, Turkey_BUR1_BPV_Skn MW767171, Turkey_BUR2_BPV_Skn MW767174, Turkey_BUR3_BPV_Skn MW767172, Turkey_BUR4_BPV_Skn MW767173 ve bunların kombinasyonları içeren bir guptan seçilen sahadan izole edilen izolat BPV içeren BPV karışımının L-929 fare (*Mus musculus*) hücre hattında üretilmesi
- 10 B. Antijen BPV'nin L-929 fare (*Mus musculus*) hücre hattından elde edilmesi
- 15 C. Antijen BPV'nin inaktivasyonu
- D. Mineral olmayan bir yağ solüsyonunda anhidroz mannitol oleik esterleri ve/veya immün stimüle komplekslerin inaktif antijen BPV'ye ilave edilmesi
- 20 2. İstem 1'e göre sunulan bir inaktif BPV aşısı üretim yöntemi olup **özelligi** L-929 fare (*Mus musculus*) hücre hattının erkek fareye ait subkutanöz bağ dokusundan elde edilmiş olmasıdır.
- 25 3. İstem 1 veya 2'ye göre sunulan bir inaktif BPV aşısı üretim yöntemi olup **özelligi** L-929 fare (*Mus musculus*) hücre hattı için kullanılan besiyerinin DMEM/Ham's F12 (L-Glutamine), FCS; tercihen %1-10 aralığında, %0,01-0,05 Tripsin-EDTA; tercihen %0,01-0,05 aralığında içermesidir.
- 30 4. Yukarıdaki istemlerin herhangi birine göre sunulan bir inaktif BPV aşısı üretim yöntemi olup **özelligi** BPV antijenin inaktivasyonu (C) adımı BEI (binary etilenimin), tercihen %0.01-3 aralığında hidrojen peroksit (H₂O₂) veya bunların bir kombinasyonunun kullanılmasıdır.
5. Yukarıdaki istemlerin herhangi birine göre sunulan bir inaktif BPV aşısı üretim yöntemi olup **özelligi** mineral olmayan bir yağ solüsyonunda anhidroz mannitol

oleik esterlerinin ve/veya immün stimüle komplekslerinin antijen BPV süspansiyonuna karışım oranları 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 veya 1:5 aralığında olmasıdır.

- 5 6. Yukarıdaki istemlerin herhangi birine göre sunulan bir inaktif BPV aşısı üretim yöntemi olup **özelliği** inaktif BPV aşısının liyofilize formülasyonunda %1 ila %5 aralığında LAH (Laktalbumin hydrolisate) ve %2 ila %10 aralığında sükroz içermesidir.
- 10 7. Yukarıdaki istemlerden herhangi birine göre elde edilen bir aşının Bovine papillomavirus (BPV) kaynaklı gelişen siğillerin terapötik ve/veya profilaktik tedavisine yönelik kullanımı.

TARİFNAME

Bir Bovine Papillomavirus (BPV) İnaktif Aşı Üretim Yöntemi

Teknik Alan

Mevcut buluş, bir inaktif aşı üretimine ilişkindir. Mevcut buluş özellikle hayvanların meme, vücut derisi, genital bölge ve iç organlarında Bovine papillomavirus (BPV) kaynaklı gelişen siğillerin terapötik ve profilaktik tedavisine yönelik bir inaktif aşı üretimine ilişkindir.

Tekniğin Bilinen Durumu

Bovine papillomatozis (BP) enfeksiyonunun etkeni Bovine Papillomavirus (BPV)'dur. Bu virüs, genellikle siğirlerin kutanöz bölgelerinde iyi huylu tümöral oluşumların meydana gelmesine yol açmaktadır. Epitelyal hiperplaziler ve bağdoku proliferasyonları şeklinde göz, baş, meme ucu, vajina, penis, tırnak arası ve derinin diğer bölgelerinde oluşmaktadır. Bu tümörler pirinç tanesi ve sivri çivi görünümünde olup, büyümeleri sebebiyle (karnabahar büyüklüğü, ceviz büyüklüğü) hayvanların hem iç hem de dış organlarında hayati fonksiyonları engelleyebilmektedir. Bu durum ağırlık kaybı ve süt veriminde azalmaya neden olabilmektedir. Siğillerin meme ve meme başında görülmesi sonucu mastitis, meme tıkanması ve sütün az gelmesi, meme körleşmesi, süt sağımının yapılamaması ve yeni doğan buzağların memeden süt emmemesi gibi sorunlar nedeni ile süt üretimini ve verimini azaltmaktadır. Vücudun diğer yerlerinde (göz, vajina, penis, meme vb.) görülmesi sonucunda fonksiyon bozukluklarına yol açabilmektedir. Bu durumlarda da tedavi maliyetleri nedeni ile ekonomik kayıplara neden olmaktadır.

Ülkemizde ve dünyada meme ve vücut siğilleri oldukça yaygın olarak seyretmektedir. Oluşan siğiller süt verimini etkilemediği, fonksiyon bozukluğuna yol açmadığı, sürüde yaygınlaşmadığı, hayvan satışı yapılmadığı durumlarda yetiştiriciler ve veteriner hekimler tarafından göz ardı edilmekte ve tedavi yapılmamaktadır. Ancak, her yetiştirici bu siğillerden kurtulmak da istemektedir. Bununla beraber deride oluşturduğu lezyonlar derinin kalitesini bozmakta ve önemli ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Sürü içerisinde BPV taşıyıcı hayvanların bulunması diğer hayvanlara bulaşma riskini arttırmakta ve hastalık sürü içerisinde hızla yayılmaktadır.

BPV'nin siğirlerde bugüne kadar 31 adet alt tipi tespit edilmiştir. BPV enfeksiyonunda dört klinik form şekillenmektedir. Bunlar; fungiform deri papillomatozisi, filiform deri

papillomatozisi, mukoza papillomatozisi ve visseral papillomatozistir. Papillomlar lokal ve tek olarak meydana gelirler. BPV'nin kontakt temas, sivrisinek aracılığı veya subkutan yolla enjeksiyonu sonucu, deride *stratum spinosum* ve *stratum corneum* arasında gelişen fibroblast proliferasyonu şekillenmektedir. Gelişen primer düğümcükler büyüyerek keratinize hal alırlar. BPV neden olduğu siğiller en çok baş, boyun, omuz, göz, karın altı ve meme derisinde görülmektedir.

BPV, deride sıyrık ve açıklıklardan vücuda girmektedir. Hayvanlar arasında enfeksiyon direkt veya indirekt temas ile gerçekleşir. Hayvanın bulunduğu ortamda yaralanmaya neden olan her türlü alet, dikenli teller, cerrahi yaralar, yularlar, burun halkaları ve yemlikler gibi yaralayıcı etmenler kontaminasyon meydana gelmesine yol açmaktadırlar. BPV kulak küpeleme ve boynuz koter işlemleri ya da damar içi enjeksiyon sonrasında kontamine ekipmanlar ile bütünlüğü bozulmuş deriden vücuda girmektedir.

Hayvanlarda papillomlar görüldüğü zaman, çevreye yayılımı en aza indirmek için, yaralanmaya müsait her türlü alet ve malzemenin ortamdaki uzaklaştırılması ve ortak kullanılan malzemelerin kullanımının yasaklanması gerektiği bildirilmiştir. Hastalığın enfekte sığırlardan süt sağımı yapan kişilere de bulaştığı rapor edilmiştir. Yapılan çalışmalarda uzun süre güneş ışığına maruz kalmanın, papillomatoz oluşumunda önemli bir risk faktörü olduğu ve lezyonların kışın gerileyip yazın tekrarladığı bildirilmektedir.

Araştırmalarda BPV'nin papillom dokularının dışında kanda da bulunduğu belirlenmiştir. Ayrıca süt, idrar, semen, uterus lavajları ile bulaşabileceği ve vertikal bulaşmanın görüldüğü de belirtilmiştir. Yavru atıklarında ve kanlarında da viral genom varlığına rastlanmıştır. Bu nedenle sağım makinaları, iğne ve enjektörler, koterizasyon aleti, suni tohumlama ekipmanları, doğum esnasında kullanılan aletler önemli risk faktörüdür.

Persiste BPV'lerin neden olduğu lezyonlar kansere dönüşme riskine sahiptir. Eğrelti otu çok sayıda mutajen ve immünosüpresant içermektedir ve bu nedenle eğrelti otu sığırlarda BPV'nin neden olduğu kanserlerde önemli bir çevresel ko-faktör olarak tanımlanmıştır. Ayrıca eğrelti otunun neden olduğu immünsüpresyonda polimorf nükleer lökositlerde önemli oranda azalma ve oluşan şiddetli akut immünsüpresyon alimenter bakterilerin kana geçmesine ve sepsisemiden ölüme yol açabilir. Ayrıca, dolaşımda bulunan lenfositlerde meydana gelen kronik azalma görülebilir. Eğrelti otu ile beslenen hayvanlarda üst ve alt gastrointestinal sistem kanserleri, kronik enzootik hematüri, idrar kesesi kanserleri ve kromozomal anomaliler gelişebilmektedir. Bu yüzden eğrelti otu BPV persistenliğine yol açabilmektedir. BPV'ye bağlı papillom lezyonlarının

şekillenmesinden sineklerin, ekolojik değişikliklerin, hormonal dengesizliklerin, beslenme şartlarının (vitamin yetersizlikleri vb.), genetik yapı ve mutasyonların, coğrafi koşulların, işletme koşullarının da etkili olduğu bildirilmiştir. BPV bulaşmasında, atlar ve sığırlar arasında arthropodların vektör olabileceği bildirilmektedir. Tavşan papillomlarında deneysel olarak *Aedes egypti*, *Rhodinus prolixus* ve *Triatoma infestans* gibi insekt ve kenelerin bulaşmada vektör olarak rol oynayabileceklerini göstermişlerdir.

BPV tiplerinin sığırlardan başka diğer hayvan türlerinde de lezyonlara neden olduğunu ve bunların tümünün Deltapapillomavirüs cinsinde yer aldığı bildirilmiştir. Etkilenen türler arasında kedi, köpek, tavşan, rakun, fare, kuş, samur, rat, maymun, zürafa, antilop, insan, manda, geyik, at, koyun, keçi bulunduğu rapor edilmiştir.

BPV kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde pek çok yöntem uygulanmaktadır. Lezyonun koterizasyonu, kriyoterapi, lokal anestezi ile lezyonların operatif olarak total veya kısmi eksizyonu, elle bükme, ligatür, otohemoterapi, immün sistemi spesifik olmayan uyaran ilaçlar (levamizol, theranekron, zylexis, ivermektin vb.), damar içi novokain uygulaması, triklorasetikasit, salisilik asit, *Thuja occidentalis*, podofilin, antihistamin ve antiamolin kullanılması, homeopatik uygulamalar (Thuza, antim crud ve sülfür oral uygulamaları), lithium antimony thiomalate uygulamaları, magnezyum klorid uygulamaları, sekonder bakteriyel enfeksiyonlara karşı antibiyotik pomatlar ve iyotlu antiseptik uygulamaları gibi pek çok yöntem kullanılmaktadır.

Ülkemizde son yıllarda piyasaya çıkan yeni bir ürün (PAPILEND™,®), sığırlarda görülen siğil benzeri oluşumları yumuşatmak ve sertleşerek rahatsız edici etkisini azaltmak amaçlı geliştirilmiştir. Krem formatında olan ürünün içerisinde glasiyel asetik asit, salisilik asit ve bitkisel yağların olduğu bildirilmektedir. Kremin sığırlarda siğil oluşumları üzerine veya köküne sabah ve akşam birer kez uygulanarak kullanıldığı ifade edilmektedir.

BPV iyi bir immünojen değildir. Erken dönemde çift sarmal DNA aşaması olmadığından uyarı gelişmemektedir. Nükleoproteinler salgılanmamakta ve yanıt oluşmamaktadır. BPV, doğal süreçte hücre ölümüne yol açmaktadır. Bu durumda, keratinositlerin farklılaşması sürecinde viral proteinlerin nükleer yoğunlaşmayı geciktirmesi sonucunda hücre ölümü gerçekleşir. BPV'ye karşı yangı olmadığı için virüsün varlığı ile ilgili immün sistemi uyaracak sinyal oluşmamaktadır. Ancak, BPV'nin lokal hücresel immunitiyi uyardığı bildirilmektedir. Hücresel yanıt sonucunda lezyonlar geriler ve serum nötralizan antikor gelişimi sağlanabilir. Serum nötralizan antikorlar, L1 kapsit proteinine karşı oluşmaktadırlar. Yüzey epitel hücreler içerisindeki virüs partikülleri APC hücrelerinden etkilenmezler. Antijen üretimi düşük olduğu için T ve B hücrelerinin aktive olması

engellenir ve düşük düzeyde immün yanıt oluşur. Bu bağlamda, profilaktik amaçlı hazırlanan BPV aşıları virüsün L1 ve kısmen de L2 proteinlerine karşı nötralizan antikor üretimini hedef almaktadır. BPV E5, epitel hücrelerinde *majör histocompatibility complex* (MHC) ekspresyonu sınırlıdır. Bu sayede, BPV immün sistemden kaçarak etkilenmemektedir. Ayrıca rekombinant DNA teknolojisi ile hazırlanan aşılar attenüe edildiği için (viral genom içermezler) vücuda zararlı değildirler ve yüksek titrede antikor sentezi sağlanmaktadır. Terapötik amaçlı BPV aşılamlarında; hücresel immünite uyarılmaktadır ve CD4 ve CD8 T hücreleri uyarılarak sitotoksikite ve sitokinler (IL2, IL3, IL4 ve TNF-alfa) aracılığıyla viral DNA'ya entegre olmuş E6 ve E7 proteinlerini (erken proteinler) aşırı üreten enfekte hücreler ölürler. Sonuç olarak, BPV aşıları ile keratinositlere virüsün tanıştırılması temel hedeftir.

BPV tiplerine yönelik, özellikle BPV-2 ve BPV-4 ile ilgili profilaktik ve terapötik amaçlı aşılar üzerinde çalışılmıştır. BPV-2 üzerinde çalışmalar virüsün kutan ve mukozal tipleri, BPV-4 üzerinde ise mukozal tiplerine yönelmiştir. Profilaktik aşılamlarda; virüs aşıları, subünit aşılar ve bakteriyel üretilmiş kapsit proteinleri (BPV-2 ve BPV-4), terapötik aşılamlarda; BPV-2, BPV-4 ve VLP (virüs benzeri partikül) kullanılmıştır. BPV-2 için BPV-1'de olduğu gibi BPV-2'nin L1 proteinine karşı nötralizan antikor sentezine yönelik ve enfeksiyona karşı korumayı amaçlayan subünit aşılar kullanılmaktadır. BPV-2 L2 proteini ile hazırlanan aşılar, virüse karşı etkili değildir ancak papillomların erken gerilemesine yol açarlar.

Aşılanmış hayvanlarda antijene karşı antikor oluşumu gözlenir. Fakat bunlar nötralizan antikor değildirler. Bu bölgedeki papillom lezyonlarında çok sayıda lenfosit ve makrofaj görülmüştür. Bu tip aşılamlarda hücre aracılı immün cevap oluşur ve sadece enfeksiyondan korunma sağlanabilir. BPV-4'ün neden olduğu papillomatozislerden korunmak için BPV-4 L2 ile aşılama uygulaması gerektiği bildirilmektedir. BPV-4 L2 tarafından oluşturulan immünite uzun süre kalıcıdır ve aşılanan hayvanlar aşılamadan 1 yıl sonra ikinci bir virüs karşılaşmasına karşı dirençlidirler. İmmünite L2'nin N-ucu tarafından oluşturulur ve aşılanan buzağılarda virüs nötralize eden antikorlar oluşur.

Ökaryotik hücrelerde BPV çoğaldığında, BPV kapsit proteinleri boş virüs benzeri partiküller (VLPs) içinde kendiliğinden toparlanır. VLPs yapısal ve antijenik olarak virüslere ve epitoplarına benzerler. BPV-4 VLPs L1 ve L2 proteinlerini bulundurur ve sadece L1 proteinleri aşılarda koruyucu potansiyele sahiptir. Bu yüzden, BPV-4'e karşı koruyucu immünite yalnızca L2'ye veya L1'e karşı meydana gelmektedir. BPV-4 L2 proteinlerine yönelik hazırlanan aşılar etkili koruyucu olmasına karşın, enfeksiyon veya

hastalık oluşumunu engelleyemezler. BPV-4 E7 ile aşılanan buzağılarda enfeksiyona karşı korunma sağlanmamıştır. Ancak, aşılanan hayvanlarda papillom gelişimi daha yavaştır ve kontrol grubu hayvanlara göre papillomlar daha kısa süre kalıcıdır. Aşılanmış buzağılarda papillomların gelişimlerinin son aşamasına ulaşamadıkları ve erken dönemde gerilemeye başladıkları bildirilmiştir. Üç immunodominant B-hücre epitopuna karşı yüksek titrede antikor oluştuğu ve iki T hücre epitopuna karşı kuvvetli hücresel immün yanıt geliştiği bildirilmiştir. Doğal olarak gerileyen papillomlarda çok sayıda infiltrat olmuş aktif lenfosit görülmektedir. Ancak, aşılanmış buzağılarda oluşan hücresel immünitenin doğal olarak gerilemiş papillomlara benzer olup olmadığı ya da lenfosit yöneliminin viral antijenlere karşı olup olmadığı bilinmemektedir.

BPV enfeksiyonuna yönelik terapötik ve profilaktik amaçlı otojen veya heterojen aşılama, tür spesifik aşılama ve sürü spesifik aşılama yöntemleri saha koşullarında oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu konuda birçok çalışma da yapılmıştır. BPV inaktif aşılar, rekombinant aşılar, VLP (virüs benzeri partikül) temelli aşılar ve DNA aşılar ile deneysel amaçlı çalışmalar yapılmış veya halen yapılmaktadır. Ancak hiçbir ticari olarak üretilmemiş ve sahada kullanılmamaktadır.

Buluşun Kısa Açıklaması

Yukarıda bilimsel temellere dayalı olarak açıklaması yapılan BPV kaynaklı oluşan siğillere yönelik saha koşullarında yaygın olarak kullanılabilir ve üretimi kolay bir inaktif aşı üretim yöntemine ihtiyaç vardır.

Buluş özellikle çiftlik hayvanlarından sığırlarda BPV kaynaklı gelişen siğil lezyonlarının terapötik tedavisinde veya profilaktik olarak enfekte olmayan sığırların korunması için geliştirilmiştir. Buluş; BPV'nin farklı bir hücre tabanına adapte edilmiş ve uygun prosedürler dahilinde diğer yardımcı maddelerle zenginleştirilmiş (kuvvetlendirilmiş) inaktif aşıdır.

Buluşun Detaylı Açıklaması

Mevcut buluş genel olarak hayvanların, tercihen sığırların; meme, vücut derisi, genital bölge ve iç organlarında Bovine papillomavirus (BPV) kaynaklı gelişen siğillerin terapötik ve profilaktik tedavisine yönelik geliştirilmiş inaktif aşı ile ilgilidir.

Mevcut buluş ile geliştirilen aşı; herhangi bir yan etkisi olmayan, güvenilir, etkili ve maliyeti düşük bir teknolojiye sahiptir.

BPV inaktif aşı üretim yönteminde kullanılan BPV; buzağı fibropapillomundan elde edilen standart BPV (BPV ATCC® VR-703) ve sahadaki hayvanların dokularından izole edilen izolat BPV' leri (izolat BPV) içermektedir. Tarifname boyunca tek başına kullanılan "standart BPV" terimi; Buzağı fibropapillomundan standart BPV'yi ifade etmektedir.

- 5 Tarifname boyunca tek başına kullanılan "izolat BPV" terimi; saha hayvan dokularından izole edilmiş izolat BPV'yi ifade etmektedir. Tarifname boyunca tek başına kullanılan "BPV" terimi; standart BPV ve izolat BPV karışımını ifade etmektedir.

Sahadaki hayvanların dokularından izole edilen izolat BPV' lerin gen dizilimleri yapılmış ve GenBank'a kaydedtirilmiştir (31.05.2022). Söz konusu izolat BPV'lerin GenBank numaraları aşağıdaki gibidir.

- 15 Turkey_BUR2_Teat_BPV MZ265290, Turkey_BUR4_Teat_BPV MZ265291, Turkey_BUR7_Teat_BPV MZ265292, Turkey_BUR1_Teat_BPV MZ2650293, Turkey_BUR5_Teat_BPV MZ265294, Turkey_BUR6_Teat_BPV MZ265295, Turkey_BUR3_Teat_BPV MZ265296, Turkey_BUR1_BPV_Skn MW767171, Turkey_BUR2_BPV_Skn MW767174, Turkey_BUR3_BPV_Skn MW767172, Turkey_BUR4_BPV_Skn MW767173.

- 20 Dolayısıyla söz konusu izolat BPV'ler, Turkey_BUR2_Teat_BPV MZ265290, Turkey_BUR4_Teat_BPV MZ265291, Turkey_BUR7_Teat_BPV MZ265292, Turkey_BUR1_Teat_BPV MZ2650293, Turkey_BUR5_Teat_BPV MZ265294, Turkey_BUR6_Teat_BPV MZ265295, Turkey_BUR3_Teat_BPV MZ265296, Turkey_BUR1_BPV_Skn MW767171, Turkey_BUR2_BPV_Skn MW767174, Turkey_BUR3_BPV_Skn MW767172, Turkey_BUR4_BPV_Skn MW767173 ve bunların kombinasyonlarını içeren bir gruptan seçilmektedir.

- 25 BPV'nin L-929 fare (*Mus musculus*) hücre kültüründen izole edilerek elde edilen BPV; antijen BPV olarak ifade edilmiştir. Benzer olarak standart BPV ve izolat BPV, sırasıyla antijen standart BPV ve antijen izolat BPV olarak ifade edilmiştir.

- 30 Teknikte, BPV'nin izolasyonu ve üretiminde kullanılan primer hücre kültürleri; primer kuzu testis, kuzu böbrek, sığır testis, fetal sığır kas, fetal sığır akciğer, koyun fetal türbinat, fetal kuzu kas, sığır böbrek, sığır akciğer, koyun böbrek (Shk), saiga böbrek (SK) hücreleridir. En erken 1-3, en geç 5-7 gün içinde BPV sitopatojenik etki (CPE) göstermektedir. Meydana getirmiş olduğu CPE'ler; hücre yuvarlaklaşması, hücrelerin multinükleasyonu ve yüzeyden hücrelerin ayrılması şeklinde görülmektedir. BPV'nin

5 üretiminde; Madin Darby bovine kidney (MDBK), Madin Darby ovine kidney (MDOK), Madin Darby canine kidney (MDCK), rabbit kidney (RK-13), human embriyonic kidney (HEK), He-La, human monocytic hücresi (THP-1), baby hamster kidney (BHK-21), fetal lamb kidney (CSL), ovine testis (OT) ve African green monkey kidney (Vero), Macr-145, yeni doğan sığır testis hücrelerinin immortalize hücre hattına çevrilmesi sonucu elde edilen hTERT-NBSC devamlı hücre kültür hatları, fare leydig hücre tümörü (MA), FLK-BLV-044 kuzu embriyo böbrek, fetal kuzu akciğer (CSL-503), insan sünnet derisi fibroblast hücresi (HFF-1), CSL503 hücresi, sığır böbrek (BK-KI-3A) ve MA-104 kullanılmaktadır. Ayrıca BPV, embriyo tavuk yumurtalarının koriyo allantoik membranları ve ördek embriyonik fibroblast (DEF) hücrelerinde de izole edilmiştir.

15 Mevcut buluşta, BPV inaktif aşı üretim yönteminde BPV izolasyonu ve BPV üretimi aşamaları için kullanılan hücre hattı; L-929 fare (*Mus musculus*) (NCTC clone 929, ATCC, CCL-1™) devamlı fibroblast hücre hattıdır. Mevcut buluşun tercih edilen bir yapılanmasında, söz konusu hücre hattı, *Mus musculus* cinsi erkek fareye ait subkutanöz bağ dokusundan elde edilen fibroblast hücre kültüründen elde edilmektedir. Bu hücrelerin monolayer kültür ortamlarında flasklarda tipik fibroblast hücre üremeleri yassı uzun ve oval olarak gözlenmektedir. BPV üretimi (çoğaltılması) ve ardından izolasyonu için L-929 hücre hattı -teknikte kullanılan diğer hücre hatları ile kıyaslandığında beklenmedik bir şekilde iyi sonuçlar vermiştir.

20 BPV üretiminde teknikte kullanılan besiyerleri; DMEM + %15 fetal dana serumu (FCS), Eagle's minimum esansiyel besiyeri (EMEM), EMEM + %2-10 FCS, Glasgow Minimum esansiyel besiyeri (GMEM), MEM + %8-10 yeni doğmuş sığır serumu (NBCS) + 2mmol/l glutamin, Medium199 (M199) + %10 sığır serumu + Hank's balanced salt solution (HBSS) (pH 7,2-7,4) + laktalbumin hidrolizat (%0,5) + %10 FCS, DMEM/Ham's F12 + %2-10 FCS, %0,37 laktalbumin hidrolizat içeren Earl's, MEM + sığır, at serumlarının %1-30 oranında tercihen %2-10 kullanılmaktadır.

30 Mevcut buluşun bir yapılanmasında BPV; hücre, titrasyon, MOI, pürifikasyon, virus çoğalma eğrisi, inaktivasyon kinetiği ve adjuvant sonrası aşı formülasyonları aşamalarında besiyeri olarak; DMEM/Ham's F12 (L-Glutamine), FCS; tercihen %1-10 aralığında, %0,01-0,05 Trypsin-EDTA; tercihen %0,01-0,05 aralığında içeren besiyeri kullanılmıştır. Bu besiyerinin L-929 hücre hattı ile birlikte kullanılmasının dikkat çekici şekilde verimlilik sağlayan bir sinerji olduğu görülmüştür.

Mevcut buluşun bir yapılanmasında standart BPV ve izolat BPV 'nin, L-929 fare (Mus musculus) devamlı fibroblast hücre hatlarına ekimleri gerçekleştirilir. Bu ekim sonucunda fibroblastların yassı uzun ve oval formasyonun bozulmasına bağlı olarak polimorfik hücre oluşumu ve odaklanma, dev hücre gelişimi, nüklei genişlemesi, periferel sitoplazmada vakuol oluşumları ve yer yer hücre açıklıklarının şekillenmesi olarak sitopatolojik efekt (CPE)'ler meydana gelmiştir. Bu morfolojik değişimin derecesi; BPV dozu ve BPV karışımı (standart ve izolat) durumuna göre değişkenlik gösterdi.

Mevcut buluşun bir yapılanmasında L-929 hücre hattından antijen standart BPV, antijen izolat BPV ve bunların karışımı antijen BPV izolasyonla elde edilmiştir.

- 10 BPV inaktif aşı üretim yönteminde kullanılan titrasyon testi, tercihen mikrotitrasyon testidir. Buluşun bir yapılanmasında, antijen izolat BPV tiplerine ait dokulardan hazırlanan inokulumlar ve antijen standart BPV için mikrotitrasyon testleri yapılır. Bu testler sayesinde antijen BPV'lerin kantitatif olarak enfeksiyözite gücü belirlenmiştir. İzolat BPV tiplerine ait titreler $10^{8,5}$ - $10^{14,5}$ DKID₅₀/ml ve standart BPV (ATCC VR-703™) titresi 10^{16} DKID₅₀/ml olarak belirlenmiştir.

En verimli şekilde virüs üretimi yapabilmek amacıyla çalışılan virüs suşunun optimal MOI değerleri belirlenmelidir. Mevcut buluşun bir diğer yapılanmasında BPV üreme karakterleri de dikkate alınarak MOI 1,0; 0,1; 0,01; ve 0,001 değerlerinde hazırlanan virüs sulandırılmaları kullanılmıştır. En ideal MOI değerinin 0,1 veya 0,01 olduğu belirlenmiştir.

- 20 Mevcut buluşun bir diğer yapılanmasında antijen standart BPV ve antijen izolat BPV için çoğalma eğrisi belirleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla bir gün önceden 24 gözlü kültür plakasına hazırlanan hücrelere 0,1 veya 0,01 MOI düzeyinde virüs ekimi yapılmıştır. Standart BPV ve izolat BPV *in vitro* replikasyonlarında en yüksek titre değerlerinin 96. ve 108. saatte elde edilirken, sonraki zaman dilimlerinde düzenli bir azalış olduğu görülmüştür.

Mevcut buluşun tercih edilen bir yapılanmasında antijen standart BPV ve antijen izolat BPV 'nin pürifikasyonu için ultrafiltrasyon (membran materyali PES, 50000 MWCO) yöntemi kullanılmıştır. Bu sayede protein ve benzeri istenmeyen maddeler uzaklaştırılmış ve antijen BPV saflaştırılmıştır.

- 30 Teknikte, BPV inaktivasyon kinetiği belirleme çalışmalarında genellikle kullanılmış inaktivanlar; Furokumarin (1-1000 mikrogram/ml), UV ışını (300-400 nm dalga boyu

aralığında 2-20 saat süreyle 0°-10°C ortamda), 30°C'lik ısı uygulaması, ≤%0,02 oranında formaldehit, %0,1-0,25 betapropiolakton (BPL)'dir.

Mevcut buluşun bir diğer yapılanmasında buluş konusu BPV inaktif aşı üretim yönteminde virüs inaktivasyon kinetiği belirleme çalışmaları yapılmıştır. Bu sayede aşı oluşturulması öncesi antijen standart BPV ve antijen izolat BPV 'nin enfeksiyözite gücünün hangi saatte zayıflatıldığı belirlenmiştir. Tercih edilen bir yapılanmada inaktivasyon aşamasında BEI (binary etilenimin) veya %0.01-3 hidrojen peroksit (H₂O₂) kullanılmıştır. Tercih edilen bir diğer yapılanmada BEI (binary etilenimin), tercihen %0.01-3 aralığında hidrojen peroksit (H₂O₂) veya bunların bir kombinasyonunun kullanılmıştır.

Teknikte adjuvan olarak genellikle Montanide ISA206, mineral yağlar, bitkisel yağlar, mineral tuzlar, immunstümulantlar, kullanılmaktadır.

Mevcut buluşun bir yapılanmasında ise aşılarda etkinliğini arttırmak ve uzun süre bağışıklık sağlamasını gerçekleştirilmek amacıyla kullanılan adjuvantlar, mineral olmayan bir yağ solüsyonunda anhidroz mannitol oleik esterleri ve/veya immün stimüle kompleksleridir. Anhidroz mannitol oleik esteri olarak teknikte iyi bilenen Montanide ISA207 kullanılabilir. İmmün stimüle kompleksleri yani ISCOM da teknikte iyi bilinen adjuvanlardandır. Buluşun tercih edilen bir yapılanmasında Montanide ISA206, Montanide ISA207, GAHOL, Quil A (ISCOMS), QS-21 ve Monophosphoryl lipid A (MPL) veya ASO4 (3-O-desacyl-4-monophosphoryl lipid A) MPL adjuvandır. Buluşun tercih edilen bir yapılanmasında bu adjuvanların antijen BPV süspansiyonuna karışım oranları 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 aralığında olduğunda en iyi sonuçların alınacağı gözlemlenmiştir.

Mevcut buluşun tercih edilen bir yapılanmasında biri sıvı ve diğeri liyofilize olmak üzere 2 adet aday aşı formülasyonu oluşturulmuştur. Liyofilize aşı formülasyonu; %1 ila %5 aralığında LAH (Laktalbumin hydrolisate) ve %2 ila %10 aralığında sukroz içermektedir. Aday BPV inaktif aşı (sıvı) titrelerinin 10¹² ve üzeri DKID₅₀/ml ve BPV inaktif aşı (liyofilize) titrelerinin 10⁸ ve üzeri DKID₅₀/ml olması gereklidir.

2 aday aşının ön kontrol testlerinde (fizikokimyasal ve sterilite) uygun sonuçlar alınmasını takiben laboratuvar hayvanlarında zararsızlık ve immunojenite testlerine başlanılmıştır. Bu aşamadaki zararsızlık testlerinde fare ve diğer kobay hayvanları kullanılabilir. Bu amaçla her aday aşıdan 10 adet fareye intraperitoneal yolla 0,2 ml ve 2 adet kobaya kas içi yolla 1 ml enjekte edilir. Tüm deney hayvanları 7 gün süreyle gözlemlenerek bulgular

takip edilir. Hayvanlarda patolojik bulgu ve ölüm görülmemesi üzerine aşı formülasyonlarının güvenli olduğu değerlendirilir. Takip eden aşamada kobaylarda uygulanan immunojenite deneylerine geçilir. Her aday aşıdan en az 5'er adet kobaya arka bacak bölgesinden kas içi yolla veya sırt bölgesinden derialtı yolla uygulanır.

- 5 Deneme kapsamında her gruba 10 kobay konulurken, kontrol grubu olarak 5 kobaya PBS verilir. İlk enjeksiyondan 2 hafta sonra hayvanlara 2. doz aşı uygulaması yapılır. İmmunojenite çalışmasında kullanılan kobaylardan alınan kan örneklerinden hazırlanan serumlarda serolojik testler ile IgM ve IgG antikor düzeyleri belirlenir. BPV için ELISA titreleri belirlenerek aday aşılardan immunojenik etkinlik düzeyleri gösterilir.

- 10 Buluş; sıvı aşı adayı terapötik amaçlı BPV seropozitif, PCR pozitif ve siğil lezyonu olan hedef hayvanlarda (sığır ve manda) uygulanır. Sıvı aşı adayının ilk dozu 10 ml sağ ve 10 ml sol scapula bölgesinden deri altı ve ikinci dozu (15 gün sonra) 10 ml sağ ve 10 ml sol scapula bölgesinden deri altı yapılır. Bu hayvanlarda 21. günde ve 42. günlerde kan alınarak VNT/ELISA ile BPV IgG miktarı belirlenir. Bu hayvanlarda klinik enfeksiyon ve hastalık iyileşme süreci takip edilir.
- 15 Buluş; sıvı aşı adayı profilaktik amaçlı BPV seronegatif, PCR negatif ve siğil lezyonu olmayan hedef hayvanlarda (sığır ve manda) uygulanır. Sıvı aşı adayının ilk dozu 5 ml sağ veya sol scapular bölgeden deri altı ve ikinci dozu (15 gün sonra) 5 ml sağ veya sol scapular bölgeden deri altı yapılır. Bu hayvanlarda 21. günde ve 42. günlerde kan alınarak VNT/ELISA ile BPV IgG miktarı belirlenir. Bu hayvanlarda da klinik enfeksiyon ve hastalık iyileşme süreci takip edilir.
- 20

- Buluş; liyofilize aşı adayı profilaktik amaçlı BPV seronegatif PCR negatif ve siğil lezyonu olmayan hedef hayvanlarda (sığır ve manda) uygulanır. Liyofilize aşı adayının ilk dozu 5 ml sağ veya sol scapular bölgeden deri altı ve ikinci dozu (15 gün sonra) 5 ml sağ veya sol scapular bölgeden deri altı yapılır. Bu hayvanlarda 21. günde ve 42. günlerde kan alınarak VNT/ELISA ile BPV IgG miktarı belirlenir. Bu hayvanlarda klinik enfeksiyon takibi yapılır. Buluş; liyofilize aşı adayı terapötik amaçlı BPV seropozitif, PCR pozitif ve siğil lezyonu olan hedef hayvanlarda (sığır ve manda) uygulanır. Liyofilize aşı adayının ilk dozu 5 ml sağ ve 5 ml sol scapular bölgeden deri altı, ikinci dozu (15 gün sonra) 5 ml sağ ve 5 ml sol scapular bölgeden deri altı ve üçüncü dozu (15 gün sonra) 5 ml sağ ve 5 ml sol scapular bölgeden deri altı yapılır. Bu hayvanlarda 21. günde ve 42. günlerde kan alınarak VNT/ELISA ile BPV IgG miktarı belirlenir. Bu hayvanlarda klinik enfeksiyon takibi yapılır.
- 25
- 30

Buluş bir diğer açıdan yukarıdaki yapılanmalardan herhangi birine göre elde edilen bir aşının Bovine papillomavirus (BPV) kaynaklı gelişen siğillerin terapötik ve/veya profilaktik tedavisine yönelik kullanımına ilişiklidir.

5

10

15

20

25