



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENÍU

230296
(11) (B1)

(22) Prihlášené 20 01 83
(21) [PV 389-83]

(40) Zverejnené 28 10 83

(45) Vydané 15 10 86

(51) Int. Cl.³
C 12 N 7/00

(75)

Autor vynálezu

SLÁVIK IVAN MUDr. CSc., BRATISLAVA

(54) Spôsob produkcie vírusu kliešťovej encefalitídy in vitro

1

2

Vynález sa týka biológie, biochémie a imunológie.

Vynález rieši problém účinnej produkcie vírusu kliešťovej encefalitídy v bunkových kultúrach. Vyznačuje sa prípravou vírusu o vysokom stupni očistenia od kontaminujúcich materiálov pri porovnaní s doteraz najúčinnejším spôsobom pomnoženia vírusu v mozgoch cicajúcich hlodavcov. Účinná produkcia vírusu na jednovrstvách buniek sa dosahuje optimalizáciou podmienok produkcie in vitro. Postup pozostáva z použitia hustých jednovrstiev buniek inokulovaných nízkou multiplicitou infekcie a infikovaním ostatných buniek v jednovrstve vírusom v nej pomnoženým. Produkovaný vírus sa zbiera medzi 24. až 72. hodinou po infekcii v krátkych časových intervaloch 5 až 12 hodín do minimálneho objemu média neobsahujúceho sérum a pufrovaného puframi umožňujúcimi prácu v nehermeticky uzatvorených nádobách a zabezpečujúcimi minimálne výkyvy pH kultúry v rámci biologických rytmov buniek aj v priebehu spracovania. Postup súčasne znamená štandardizáciu produkcie vírusu kliešťovej encefalitídy in vitro.

Vynález má využitie v humánnej a veterinárnej medicínskej praxi, pripravený vírus možno použiť ako séroprofylaktický alebo diagnostický antigén.

Vynález sa týka optimalizácie a štandardizácie produkcie vírusu kliešťovej encefalitídy (KE) v bunkových kultúrach za účelom získania vysokého množstva vírusu o značnej východiskovej čistote.

Produkcía vírusu KE in vitro je podmienkou výreby živých, formolizovaných, alebo subjednotkových (chemo-) vakcín, prípadne antigénov vírusu pre diagnostické účely, v laboratórnom, poloprevádzkovom, či priemyselnom rozsahu. Kritériami kvality produkčného postupu by mali byť: — vysoký výťažok vírusu vyhovujúcej až vysokej východiskovej čistoty, — nízke produkčné náklady a — nízky stupeň prácností a pracovného rizika.

Z doteraz známych postupov produkcie vírusu KE in vitro, aj v priemyselnom rozsahu, spomenutým kritériám najlepšie vyhovuje postup produkcie v rollerových fľašiach (F. Heinz, Ch. Kunz, *Acta Virol.*, 21: 301—307, 1977; *ibid.*, 23: 189—197, 1979).

Na produkciu vírusu slúžia uzatvorené nádoby, pufrovanie médií sa robí HEPES-pufrom a z pomnoženého vírusu sa po jeho očistení a opracovaní kationickým detergentom pripravuje chemovakcína.

Podstatou vynálezu je optimalizovanie podmienok produkcie vírusu in vitro tak, aby sa zabránilo stratám pomnoženého vírusu v dôsledku jeho pH-lability a termolability a zároveň sa zohľadnili potreby produkujúcich buniek. Vypracovaný postup zároveň rieši problém štandardizácie produkcie vírusu KE in vitro.

K experimentálne overeným zásadám produkcie vírusu KE in vitro patria: — použitie hustých jednovrstiev buniek (nie je možné pri použití rollerovej techniky); — práca s vodorovne uloženými jednovrstvami buniek za účelom minimalizácie objemu nutrientu potrebného na prekrytie jednovrstiev; — inokulácia buniek lyofilizovaným zásobným vírusom o známom a dlhodobu udržateľnom infekčnom titri; — pufrovanie živných médií puframi o vysokej pufrovačnej kapacite, zabezpečujúcimi malé výkyvy pH, a to iba v mierne alkalickú oblasť, v rámci biologických rytmov buniek v priebehu ich kultivácie, aj v rámci vlastného spracovávanía bunkových kultúr a umožňujúcimi kultiváciu buniek v neprítomnosti vzduchu obohateného 5% CO₂; — zber vírus obsahujúceho média v krátkych, 5- až 12-hodinových intervaloch; — použitie médií neobsahujúcich sérum za účelom prevencie uplatnenia sa v sérach prítomných proteáz; — zníženie produkčnej teploty o 1 °C, teda na 36 °C.

Použitie nízkej multiplicity infekcie, teda 0,03—0,05 infekčných jednotiek na bunku s následným infikovaním ostatných buniek v jednovrstve vírusom v nej pomnoženým umožňuje lyofilizovať primerane malé objemy zásobného vírusu, znamená vnesenie malého množstva cudzorodého materiálu v inokule do produkčného systému a

zvyšuje stupeň očistenia povrchu bunkových jednovrstiev výmenou média v 24. hodine po infekcii. Inokulácia buniek štandardnou infekčnou dávkou umožňuje zber vírusu ako v širšom časovom rozpätí, teda medzi 24. až 72. hodinou po infekcii, tak aj v optimálnom období vrcholu vírusovej produkcie, teda okolo 40. až 66. hodiny po infekcii. Pritom je možné robiť časté výmeny nutrientu s médiom o zníženom obsahu aminokyselín až o 80 %, bez nebezpečia zníženia vírusovej produkcie či poškodenia produkčných buniek.

Napríklad, ak sme robili produkciu vírusu na primárnych kuracích embryonálnych bunkách v jednovrstve o ploche 2250 cm² obsahujúcej asi $1,3 \times 10^9$ buniek a zbierali sme v nevýhodne dlhých 24-hodinových intervaloch, po očistení vírusu v ultracentrifúge sa darilo detegovať okolo 1,1 mg vírusovej hmoty. Pritom sa v priebehu 1. dňa kultivácie darilo detegovať 4 %, v priebehu 2. dňa 70 % a v priebehu 3. dňa 26 % produkovanej vírusovej hmoty. Pri voľbe kratších zberových intervalov je dôvodné predpokladať vyššie výťažky vírusu, nakoľko počas stálosti vírusu pri produkčnej teplote je krátky — okolo 3 hodín. Približne za túto dobu ubudne polovica biologickej aktivity vírusu KE, na ktorú zmenu bezprostredne naväzuje fyzická dezintegrácia vírusových častíc.

V nasledujúcom texte sa používajú v odborných textoch bežné skratky: KE — kliešťová encefalitída, KEB — kuracie embryonálne bunky; BHK—21 — stabilná bunková línia ľadvín novorodeného škrečka; PS — stabilná bunková línia prasačích ľadvín; BEM — bazálne Eaglovo médium; TBS — fyziologický roztok pufrovaný 7 mM Tris-HCl pufrum; PBS — fosfátovým pufrum pufrovaný fyziologický roztok.

Príklad 1

Do sklenených alebo jednorázových nádob s rovným dnom (napr. Petriho misky, Rouxové fľaše opatrené buničinovou zátkou a pod.) o ľubovoľnej kultivačnej ploche sa zasejú KEB v BEM, Parkerovom médiu 199, alebo Eaglovom médiu s obsahom 10 % inaktivovaného teľacieho séra a pufrovanom 7 mM Tris-HCl pufrum pH 7,7 pri 24 °C v dávke cca $6,5 \times 10^5$ buniek na 1 cm². Bunky sa súmerne rozvrstvia po celej ploche dna kultivačnej nádoby v takom objeme média, aby výška vrstvy média nad bunkami bola 1 mm. Bunky sa kultivujú 16—20 hodín pri 37 °C. Aby sa zabránilo podchladeniu a následnému odlučovaniu hustých jednovrstiev od dna kultivačných nádob, v ďalšom sa pracuje s roztokmi predhriatymi na 30—36 °C.

Zásobný vírus KE sa skladuje pri —18 °C v lyofilizovanom stave v ampulkách zatavených za vákua. Použitý genetický homo-

génny a na genetické markery analyzovaný klon P—III E kmeňa Hypr vírusu klieštovej encefalitídy (Mayer, V., Acta Virol., 6: 309—316, 1962) sme pripravili vo forme 20 % (v/o) suspenzie z mozgov agonických cicajúcich krýs v TBS pH 8,0, opracovali v konečnej koncentrácii 0,5 % (v/o) síranom protamínu po dobu 30 minút pri 4 °C, centrifugovali pri 1500 g 15 minút a supernatant sme rozplnili po 0,4 ml do ampuliek. Lyofilizovali sme 6 hodín nad kyslíčnikom fosforečným. V jednej ampulke sa nachádzalo okolo 10^8 LD₅₀, ktoré množstvo infekčných jednotiek dosťovalo na inokuláciu buniek prichytených na ploche 2200—3000 cm². Zásobný roztok síranu protamínu (5%, v/o) sa kontroluje a upravuje na pH 8—8,5. Rovnako možno lyofilizovať vírus pomnožený v bunkových kultúrach po opracovaní média 0,025 % protamínu.

Zásobný vírus sa resuspenduje v PBS pH 7,2—7,4 a aplikuje sa v objeme prekrývajúcom jednovrstvu buniek do výšky 0,7 mm. Po 90 minútach pri 25—36 °C, za občasnej agitácie produkčných nádob sa inokulum odstráni, bunky možno premyť raz či niekoľko razy polovičným objemom predhriateho PBS, a nakoniec sa prevrstvia do výšky 0,7 mm živným médiom bez obsahu séra. Pufrovanie médií je rovnaké ako pri zasievaní buniek. Bunkové jednovrstvy sa kultivujú pri 36 °C, médium z prvých 24 hodín kultivácie sa vylieva. Možno opakovať premytie povrchu jednovrstiev PBS, prípadne odstrániť ešte aj živné médium v 36. hodine po infekcii. Tým sa dosiahne vysoký stupeň očistenia povrchu jednovrstiev od zvyškov prípadne na ich povrch adsorbovaných materiálov zo séra, inokula a nevitálnych buniek. V tomto časovom úseku, teda na začiatku zberu vírus obsahujúceho média, je možné začať pracovať s médiami o zníženom obsahu aminokyselín až o 80 %, výšku vrstvy média nad jednovrstvami voľiť medzi 0,7 až 0,5 mm a zbery média robiť v krátkych 5- až 12-hodinových intervaloch. V prípade opakovaného preplachovania buniek pomocou PBS je vhodné pridať do produkčných médií minimálne množstvo kyslého uhličitanu sodného nevedúce k zásadným zmenám pH v nehermeticky uzavretých produkčných nádobách. Pri vysokých nárokoch na sterilitu produktu je možné použiť prachotesne uzatvorené a sterilizované podnosy, v ktorých sa produkčné nádoby vkladajú do termostatu. Ak sa počíta s opracovaním vírus obsahujúcich médií 0,25 % síranom protamínu a následnou purifikáciou vírusového produktu, je možné produkčné nádoby voľne ukladať na ekvilibrizované rovné podnosy z tvrdého materiálu (napr. perforované sklo hrúbky 6—10 mm) v termostate opatrenom tesnením proti prieniku prachu a udržiavanom v patričnej čistote.

Pomnožený vírus obsahujúce médium sa ihneď po zbere schladí a až do spracovania

sa skladuje pri 4 °C. Množstvo pomnoženého vírusu sa stanoví menej presne titráciou jeho infekčnej alebo hemaglutinačnej aktivity, alebo presnejšie po čiastočnej purifikácii v ultracentrifúge, ktoroukoľvek vhodnou metódou na stanovenie proteínu.

Ak sa jedná o živú očkovaciu látku oslabeného vírusu pre veterinárne účely, zozbieraný vírus možno okamžite lyofilizovať a stanoviť jeho biologické aktivity až v lyofilizáte. Z pomnoženého vírusu možno pripraviť formolizovanú alebo (formolizovanú) subjednotkovú vakcínu po jeho očistení a koncentrácii v ultracentrifúge. Pre prípravu vírusu KE určeného pre humánne použitie sa na inokuláciu bunkových jednovrstiev použije v bunkách produkovaný vírus a bunkový substrát sa pripravuje z primerane kontrolovaných kuracích embryí.

Príklad 2

Stabilné bunkové línie (BHK—21, PS, a pod.) sa zasejú v množstve 40—60 000 buniek na 1 cm² a ponechajú sa pri 37 °C do vytvorenia jednovrstvy. Výška vhodného média s obsahom séra sa volí do 1,3 mm. Bunkové jednovrstvy sa infikujú ako predošle, avšak nároky na pufrovanie médií sú väčšie, nakoľko stabilné línie buniek vykazujú v priebehu kultivácie výraznejšie metabolické účinky na posuny pH živných médií. Preto sa volí buď vyššia koncentrácia Tris-HCl pufru pH 7,7 pri 24 °C (10—15 mM), alebo sa použije pufr o vyššej pufovej kapacite (napr. HEPES pufr v 10 mM koncentrácii a pufrovaný kyslým uhličitanom sodným na pH 7,6 pri 24 °C). Stabilné línie buniek môžu byť náročnejšie na kvalitu živných médií, preto sa použitie médií so zníženým obsahom aminokyselín volí opatrne po predchádzajúcom preskúšaní konkrétneho typu média. Výška vrstvy zberového média nie je nižšia ako 0,7 mm nad jednovrstvami buniek. Optimálny časový interval zberu sa má taktiež predom preskúšať s konkrétnym médiom a konkrétnym klonom stabilných bunkových línií. Inak je postup prác rovnaký ako v prípade primárnych KEB.

Opísaný postup produkcie vírusu KE in vitro má oproti všetkým postupom pomnoženia vírusu v hermeticky uzatvorených nádobách alebo v systémoch pracujúcich pod tlakom (rollerové, suspenzné kultúry, perfúzny systém) výhodu vo vysokom stupni bezpečnosti práce a praktickej nemožnosti produkčnej havárie s možným onemocnením obsluhujúceho personálu. Stupeň čistoty a výťažku pomnoženého vírusu možno ľahko voľiť podľa konečného účelu jeho použitia. Produkčné náklady postupu sú minimálne.

Spôsob produkcie vírusu KE na jednovrstvách buniek môže nájsť uplatnenie všade tam, kde sa má pripraviť živý či usmrtený antigénny materiál vírusu pre humánne alebo veterinárne séroprofylaktické a diagnostické účely.

PREDMET VYNÁLEZU

1. Spôsob produkcie vírusu kliešťovej encefalitídy in vitro na jednovrstvách primárnych kuracích embryonálnych buniek alebo stabilných bunkových línií vyznačujúci sa tým, že sa husté jednovrstvy buniek inokulujú nízkou multiplicitou 0,03 až 0,05 infekčných jednotiek na bunku, ostatné bunky v jednovrstve sa infikujú vírusom v nej pomnoženým v priebehu kultivácie 22 až 30 hodín pri 36 °C, v živnom médiu neobsahujúcom sérum a pufrovanom v rozmedzí pH 7,3 až 7,7 pufrom zabezpečujúcim nízke výkyvy pH počas kultivácie aj spracovania kultúr, že sa médium odstráni a pokračuje sa s vlastnou produkciou s čerstvým bezsérovým médiom, pričom sa vírus obsahujúce médium zbiera v 5- až 12-hodinových intervaloch v časovom období medzi 24. až 72. hodinou po infekcii a jednovrstvy buniek sa kultivujú pri 36 °C s minimálnym objemom

živného média, umožňovaným vodorovným uložením bunkových jednovrstiev.

2. Spôsob produkcie vírusu podľa bodu 1 vyznačujúci sa tým, že sa môže výhodne pracovať s nehermeticky uzatváranými kultivačnými nádobami.

3. Spôsob produkcie vírusu podľa bodu 1 vyznačujúci sa tým, že od 24. až 36. hodiny po infekcii možno produkujúce bunky kultivovať v médiách so zníženým obsahom amínokyselín až o 80 %.

4. Spôsob produkcie vírusu podľa bodu 1 vyznačujúci sa tým, že zber vírus obsahujúceho média možno optimálne robiť na vrchole produkcie vírusu, teda u kuracích embryonálnych buniek okolo 40. až 66. hodiny po infekcii.

5. Spôsob produkcie vírusu podľa bodu 1 vyznačujúci sa tým, že je možné výhodné použitie geneticky homogénnych a analyzovaných klonov kmeňa Hypr.