



Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 1676/85

(51) Int.Cl.6

C 12 N 5/06

(22) Indleveringsdag: 12 apr 1985

(41) Alm. tilgængelig: 14 okt 1985

(45) Patentets meddelelse bkg. den: 20 jan 1997

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 13 apr 1984 DE 3413960

(73) Patenthaver: *BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT; D-W 3550 Marburg 1, DE

(72) Opfinder: Hans-Joachim *Bengelsdorff; DE, Eckhard *Koschel; DE

(74) Fuldmægtig: Budde, Schou & Co. A/S

(54) Fremgangsmåde til udvinding af en cellekultur ved oplukning af nyrer fra slagtesvin ved hjælp af et enzym

(56) Fremdragne publikationer

Andre publikationer: J. Clin. Microbiol. 9, 731-733 (1979).

(57) Sammendrag:

1676-85

Fremgangsmåde til udvinding af en cellekultur ved oplukning af nyrer fra slagtesvin gennemføres enzymatisk ved hjælp af collagenase.

Denne cellekultur kan med fordel anvendes til formering af vira, hvor den giver en bedre titer, og den er billig og let at fremstille i effektiv form.

Opfindelsen angår en fremgangsmåde til udvinding af en cellekultur ved oplukning af nyrer fra slagtesvin ved hjælp af et enzym.

5 Fremgangsmåder under anvendelse af cellekulturer, også cellekulturer af svinenyrer, til udvinding af virus-suspensioner som vaccine-antigener, er kendte. De baseres eksempelvis på anvendelsen af svineembryonyrer, unggrise-nyrer, permanente svinenyre-cellestammer eller slagtesvine-nyrer.

10 Ulemper ved fremgangsmåderne ifølge teknikkens stade for den industrielle produktion er: svineembryonyrer kan i industriel produktionsmålestok ikke tilvejebringes i tilstrækkelig mængde og til de ønskede tidspunkter. Unggrise-nyrer er relativt små, dvs., at de resulterer i kun et
15 ringe celleudbytte ved ganske vist god cellevækst. Desuden er den tilhørende dyrekrop efter udtagelsen af nyrerne som regel uanvendelig som næringsmiddel. Permanente svinenyre-cellestammer såsom PK 15, IB S 2, STA eller SK 6 kan ganske vist formeres i store mængder, men de er hyppigt kontamine-
20 rede med fremmedlegemer såsom mycoplasma eller vira, således at deres industrielle udnyttelse ved fremstillingen af immunbiologiske produkter indebærer forhøjet risiko. Den udgift, der er forbundet med at holde cellestammen, herunder de løbende kvalitetskontroller, er også betydelig. Hertil
25 kommer desuden, at mange vira på permanente cellestammer ikke formerer sig eller i sammenligning med primære cellekulturer af organceller kun formerer sig dårligt på grund af deres genetiske forandringer.

Slagtesvinenyrer er en billig cellebasis. Nyrer fra
30 fuldvoksne slagtesvin resulterer dog i sammenligning med embryonale eller unggrisenyrer i kun relativt få celler med celledelingsaktivitet. Når dernæst slagtesvinenyrer desuden på traditionel vis oplukkes med det cellebeskadigende fordøjelsesenzym trypsin, reduceres således antallet af levedygtige celler i en således anlagt cellekultur drastisk én
35 gang til. Derigennem bliver det klart, at på traditionel måde fermentativt oplukkede suspensioner af nyreceller fra

slagtesvin kun med betydeligt resourceforbrug såsom ved substrat-skift, forøget serumtilsætning til dyrkningssubstratet eller specielle dyrkningssubstrater og efter langvarig dyrkning fører til for det meste kun delvist sammenhængende cellemåtter.

Cellekulturer af slagtesvinenyrer, fremstillet ved den gangse trypsinoplukning af organerne, er således problematiske med henblik på deres voksevillighed. Disse vækstvanskeligheder træder især frem, når dyrkningsbeholderne med tryptisk oplukkede slagtesvinenyreceller omvæltet for at få en optimal udnyttelse af dyrkningsarealet.

Der er derfor yderligere et behov for en også teknisk tilfredsstillende fremgangsmåde til udvinding af cellekulturer af nyreceller fra svin.

Der er nu overraskende blevet tilvejebragt en fremgangsmåde, som tillader nyreceller fra slagtesvin uden særlige substrattilsætninger og uden substrat-skift i løbet af fra 5 til 8 dage i stationære eller omvæltede kulturer at vokse ud til tætte cellemåtter, og som til oplukning af nyrerne til enkelte celler anvender en collagenase-opløsning.

Den foreliggende opfindelse angår i overensstemmelse hermed en fremgangsmåde til udvinding af en cellekultur ved oplukning af nyrer fra slagtesvin ved hjælp af et enzym, og denne fremgangsmåde er ejendommelig ved, at man lader en collagenase-opløsning med en koncentration fra 100 til 150 mg pr. liter indvirke på de findelte nyrer i 12 til 24 timer ved 16 til 22°C under omrøring, og at man lader de således udvundne svinenyreceller vokse ud til cellekulturer på kendt måde.

Fra J. Clin. Microbiol. 9, nr. 6, 731-733 (1979) kendes der en fremgangsmåde til udvinding af en cellekultur ved oplukning af nyrer fra heste ved hjælp af collagenase. Ved denne fremgangsmåde skal blandingen af nyrestykker og collagenaseopløsning opvares til ca. 37°C, den ovenstående væske skal hver gang med tidsintervaller på 10-30 minutter skilles fra nyrestykkerne, og cellerne skal til opnåelse af

deres vitalitet fraskilles fra den ovenstående væske af det collagenaseholdige medium og skal efter gensuspendering i serumholdigt cellevækstmedium opbevares til videreforarbejdning. I forhold hertil behandler man ved fremgangsmåden
5 ifølge den foreliggende opfindelse nyrestykkerne ved ca. 20°C uden yderligere mellemtrin uafbrudt i 12-24 timer, uden at der kan iagttages en formindskelse i udbyttet af vitale celler.

En anvendelig collagenase kan eksempelvis udvindes
10 af *Chlostridium histolyticum* og anvendes i en koncentration på fra 10 til 15, fortrinsvis 12,5 mg (svarende til 6.250 Mandl-enheder) pr. 100 ml phosphatpufret saltopløsning (PBS, pH-værdi fra 7,0 til 7,5). Af særlig betydning for udvindingen af store mængder af vitale, mitoseaktive enkeltceller
15 er den ovenfor nævnte indvirkningsvarighed af collagenaseopløsningen på fra 12 til 24 timer under omrøring ved fra 16 til 22°C på de findelte nyrer.

De således udvundne enkeltceller renses derefter på kendt måde ved centrifugering ved ca. 800 g og vaskning med
20 PBS. Det centrifugerede celled sediment suspenderes derefter igen i et forhold fra fortrinsvis 1:250 til 1:350 i kendte dyrkningssubstrater såsom Eagles minimum essential medium (Eagles MEM) eller TCM 199 med tilsætning af 100 ml pr. 1 kalveserum, portioneres i dyrkningsbeholdere, som ved 37°C
25 henstår stationært eller omvæltet. I løbet af fra 8 til 16 timer begynder talrige af de på glasarealet sedimenterede nyreceller at dele sig. Dette forløb kan iagttages mikroskopisk og viser, at der er en signifikant forskel i antallet af nyreceller med evne til at dele sig og i hastigheden
30 i celledelingssekvenserne i sammenligning med celleudgangsmaterialer ved traditionelle dyrkningsfremgangsmåder. Mitoseaktiviteten af de med collagenase behandlede nyreceller fra svin leder til hurtig tæthedsvækst i cellemåttten uden nogen yderligere hjælpeforanstaltninger for cellekulturen.
35 Herigennem kan man - som nedenstående eksempler belyser det - i hurtig rækkefølge fordelagtigt fremstille store mængder cellekulturer til den industrielle virusdyrkning.

0

Eksempel 1.

Slagtesvinenyrer oplukkes ved de traditionelle fremgangsmåder med 2 g pr. liter trypsinopløsning til enkelte celler, vaskes efter centrifugering ved ca. 800 g med PBS og centrifugeres atter. Cellesedimentet suspenderes i forholdet 1:300 i Eagles MEM, hvortil der er sat 2,5 g pr. liter lactalbuminhydrolysat (LAH) og 100 ml pr. liter kalveserum. Denne suspension fyldes i mængder på 600 ml i sterile 5 liters glaskolber. Kulturerne dyrkes under omvæltning ved 37°C. I løbet af fra 10 til 14 dage dannes kun delvist sammenhængende cellemåtter. Efter skiftning af vækstsubstratet til serumfrit substrat (Eagles MEM med 2,5 g pr. liter LAH) inficeres kulturerne med reovirus af serotyperne 1 og 3 og henstår i fra 3 til 5 dage ved 37°C, indtil kulturen er moden til høst. Virusindholdet i kulturernes fradekanterede væsker afprøves efter fjernelse af celleresterne ved hjælp af centrifugering og derpå filtrering på gængs måde ved podning af fortyndingsniveauer på cellekulturer.

Til sammenligning behandles sterilt findelte slagtesvinenyrer med collagenase-opløsning, som indeholder 12,5 mg collagenase pr. liter (svarende til 6.250 Mandl-enheder pr. 100 ml). Efter en indvirkningsvarighed på 18 timer ved 18°C forarbejdes de til enkeltceller oplukkede nyreceller yderligere på samme måde som ovenfor. Dyrkningssubstraterne, dyrkningsbeholdere, de aftappede mængder af cellesuspension og dyrkningen er de samme. I modsætning til cellekulturerne ved den traditionelle fremgangsmåde er mitoser mikroskopisk tydelige allerede efter få timers forløb ved de nyreceller, som er oplukket ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen. De enkelte mitoseaktive celler ligger også særdeles tæt sammen, da antallet af beskadigede og derfor amitotiske celler er stærkt reduceret i forhold til den traditionelle oplukningsfremgangsmåde. På grund af de særdeles tidligt påbegyndte og særdeles talrige mitoseforløb er tæt sammenhængende infektionsdygtige vævskulturer tilstede efter 5 til højst 8 dages forløb efter opstart af cellekulturen. Infektionen af vævskulturerne samt virushø-

0

sten og -afprøvningen sker på analog måde som ved de ved den traditionelle fremgangsmåde fremstillede kulturer.

Ved begge de beskrevne fremgangsmåder fremstilles hver gang 5 kulturudgangsblandinger i teknisk målestok, på 5 hvilke der hver gang dyrkes fra 150 til 300 liter reovirus af serotyperne 1 og 3. Virusindholdene af sammenligningsudgangsblandingerne bestemmes med hensyn til permanente abenyreceller (veroceller). For reovirus af serotype 3 har der vist sig op til 14,5 gange og for serotype 1 fra 5,6 10 til 6,3 gange højere titer, når man arbejder ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen i stedet for fremgangsmåden ifølge teknikkens stade.

15 Eksempel 2.

Til fremstilling af 40 liter af en suspension af rhinopneumonititisvirus (fremkalder af abort hos hopper) på unggrisenyreceller er det nødvendigt med 20 unggrise, medens der ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen i eksempel 1 20 kun er brug for 2 nyrepar fra slagtesvin. Der konstateres ingen kvalitative ulemper ved det virus, der fremstilles ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen.

Eksempel 3.

25 Aujeszky-viruset er som herpesvirus et dårligt antigen, og derfor får et højt virusindhold i vaccinen en stor betydning. Man gennemfører sammenlignende Aujeszky-virusdyrkingen på nyrekulturer fra slagtesvin, som for det første fremstilles ved den traditionelle fremgangsmåde med trypsinoplukkede nyreceller og for det andet ved fremgangsmåden 30 ifølge opfindelsen (eksempel 1). Medens virustiteren pr. ml af de ved den traditionelle fremgangsmåde fremstillede kulturer ligger på $10^{-7,5}$, er den ved de ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen fremstillede kulturer i gennemsnit 35 $10^{-8,5}$, dvs., at der syntetiseres ca. 10 gange mere virus fra de yngre (fra 5 til 8 dage gamle) og tætte vævskulturer end fra de ældre (fra 10 til 14 dage gamle) og i reglen ikke tætte kulturer ifølge teknikkens stade.

0

Eksempel 4.

Svineparvovirus (PPV) anses som fremkalder af SMEDI-syndromet hos avlssøer, og dette syndrom er karakteriseret ved aborter, dødfødsler, fødsel af små grise med ringe levedygtighed og sterilitet hos søer. PPV formerer sig kun i unge, endnu voksende vævskulturer fra svin, fortrinsvis i svinenyrekulturer.

Forsøg med dyrkning af PPV i vævskulturer fra slagtesvin, fremstillet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, viser, at sådanne cellekulturer er særligt velegnede til formeringen af denne virus. Der påvises en haemagglutinationstiter fra 1:2048 til 1:16.384, medens en virustiter på blot 1:1024 for PPV, formeret ifølge teknikkens stadi i embryonale svinenyrecellekulturer eller permanente svine-nyrecellestammer anses som god.

20

25

30

35

P A T E N T K R A V.

Fremgangsmåde til udvinding af en cellekultur ved oplukning af nyrer fra slagtesvin ved hjælp af et enzym, k e n d e t e g n e t ved, at man lader en collagenase-
5 -opløsning med en koncentration fra 100 til 150 mg pr. liter indvirke på de findelte nyrer i 12 til 24 timer ved 16 til 22°C under omrøring, og at man lader de således udvundne svinenyreceller vokse ud til cellekulturer på kendt måde.