

РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ



(19) BG

(11) 62176 B1

6(51) C 12 N 7/00

C 12 N 7/02

C 12 N 7/04

ОПИСАНИЕ КЪМ ПАТЕНТ

ЗА

ИЗОБРЕТЕНИЕ

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Регистров № 99227

(22) Заявено на 01.12.94

(24) Начало на действие
на патента от: 26.05.93

Приоритетни данни

(31) 893295 (32) 04.06.92 (33) US
894039 04.06.92 US

(41) Публикувана заявка в
бюлетин № 7 на 28.07.95

(45) Отпечатано на 15.06.99

(46) Публикувано в бюлетин № 4
на 30.04.99

(56) Информационни източници:
US 3985615
US 4008317

(62) Разделена заявка от рег. №

(73) Патентоприитежател(и):

MERCK & CO., INC.,
RAHWAY, NJ (US)

(72) Изобретател(и):

Philip J. Provost
David L. Krah, Lansdale, PA
Paul A. Friedmann, Rosemont, PA (US)

(74) Представител по индустриална
собственост:

Румяна Стефанова Слабова,
1124 София, ул. "Леонардо да Винчи" 3

(86) № и дата на PCT заявка:

PCT/US93/04986, 26.05.93

(87) № и дата на PCT публикация:

WO93/24616, 09.12.93

(54) МЕТОД ЗА ПОЛУЧАВАНЕ НА АТЕНЮИРАНА ВАКСИНА ОТ ВАРИЦЕЛА ЗОСТЕР
ВИРУС

(57) Методът намира приложение за масова продукция на жива ВЗВ ваксина. Установени са оптимизирани условия за отглеждане на монослойни клетъчни култури, при които се максимализира клетъчната плътност в монослой и се повишава продукцията на вирусна ваксина. Клетъчната плътност достига до 500 000 клетки/см² в конвенционални съдове за култивиране на клетки.

8 претенции, 5 фигури

BG 62176 B1

(54) МЕТОД ЗА ПОЛУЧАВАНЕ НА АТЕНДЖИРАНА ВАКСИНА ОТ ВАРИЦЕЛА ЗОСТЕР
ВИРУС

ПРЕДШЕСТВУВАЩО СЪСТОЯНИЕ НА ТЕХНИКАТА

Варицела зостер вирус (ВЗВ) причинява заболяванията дребна шарка и херпес зостер. Дребната шарка е силно заразно заболяване, което се наблюдава при хора без имунитет по отношение на ВЗВ. Повече от 90% от населението е застрашено от този вирус по време на първите две десетилетия от живота си. Заболяването е сериозна заплаха за хора с подтисната имунна система и за възрастни. В много случаи ВЗВ става латентен в ганглиевите клетки на дорзалните коренчета. Херпес зостер, който представлява едно болезнено хронично състояние, се появява когато ВЗВ се реактивира от латентното си състояние.

Предпазването от дребна шарка чрез ваксиниране е желателно, като за целта се използва повсеместно ваксиниране на деца с латенжирана ваксина от вируса, причинител на варицела.

Обикновено към тази цел се подхожда, като се отглежда ВЗВ в различни клетъчни култури, след което се използват живите атенюирани извънклетъчни ВЗВ в качеството на ваксина. Патент от Съединените Американски Щати 3, 985, 615, описва получаването в първични ембрионални клетки от морско свинче на атенюирани ВЗВ от щам Ока, подходящи за приготвяне на ваксина. Патент от Съединените Американски Щати 4, 008, 317, описва култивирането на температурно устойчив мутант от ВЗВ в WI-38 клетки, който може да се използва като стабилизатор на ваксини. Вещества, подходящи за поддържане на жизнени ВЗВ, като например SPGA, също са известни в тази насока.

Основното ограничение за производствено получаване на ВЗВ ваксина е добива на извънклетъчните ВЗВ от клетъчните култури. Този добив се подобрява с фактор от около 5 до 20 пъти при прилагане на новия метод, описан в това изобретение.

Следователно, настоящото изобретение предлага метод за получаване на жива, атенюирана ваксина от извънклетъчни ВЗВ при високи добиви.

Методите, при които се използват монослойни клетъчни култури, обикновено дават добиви от около 80 000 до 160 000 клетки/см² [Mann, Dev. Biol. Stand. 37, 149-152 (1977); Wood and Minor, Biologicals 18, 143-146 (1990)]. Използването на монослойни клетъчни култури за получаването на вирусни антигени се затруднява от ограничената плътност, до която клетките от тези култури могат да се отглеждат.

Опитите за увеличаване плътността на клетъчната култура в миналото се свеждат главно до използване на специализирани перфузионни съдове за клетъчно култивиране, за да се увеличи плътността на насищане до около 1×10^6 клетки на см². [Mann, Dev. Biol. Stand. 37, 149-152 (1977)]. Настоящото изобретение

предлага уникален начин за увеличаване на клетъчния добив при използване на съществуващите системи за клетъчно култивиране.

Това изобретение предлага метод, при който захванатите за субстрата клетки могат да бъдат отглеждани до много по-високи плътности, отколкото беше възможно преди, което дава възможност да бъдат получени и много по-високи добиви от вируси, култивирани в монослойни клетъчни култури за получаване и производство на ваксина.

ТЕХНИЧЕСКА СЪШНОСТ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО

Това изобретение се отнася до метод за култивиране на монослойни клетъчни култури. Методът изисква използването на богата хранителна среда за клетъчно култивиране, за разлика от обикновен() използваната минимална хранителна среда и добавянето на оптимални концентрации липиди към богатата хранителна среда. Съгласно настоящето изобретение, използването на нова хранителна среда, съдържаща средата SRFE-2 с добавка на около 0,02 до 0,4 г/мл соеви липиди, води до значително повишаване на плътността на монослойната клетъчна култура. Полученото по този начин увеличение на плътността на монослойната клетъчна култура е полезно за повишаване продукцията на вирусни антигени и съответно за производство на антивирусна ваксина.

Приложено за получаване на ваксина, това изобретение предлага метод за получаване на големи количества жива атенюирана ваксина от екстрацелуларни ВЗВ, която може да се използва за предпазване от дребна шарка. Това изобретение предлага метод за оптимално размножаване на ВЗВ в клетъчна култура и събиране на вируса при условия, които максимализират

добива и стабилността на ВЗВ. Отделните стъпки в този оптимизиран процес се състоят в:

- а/ Култивиране на клетки, податливи на инфекция с ВЗВ, селектирани от човешки диплоидни клетки, такива като например MRC-5, до конfluентност, в монослойна култура при използване на големи обеми хранителна среда или богата хранителна среда и с добавяне на неметаболически дизахарид, като например захароза;
- б/ Инфектиране на клетките, култивирани съгласно етап /а/ в състояние възможно най-близко до конfluентност с максимална практически възможна множественост на инфекцията с ВЗВ-инфектирани клетки;
- в/ Поддържане на инфектираната с ВЗВ култура в състояние на богато подхранване за около 22 до 96 часа и събиране на клетките в точката на максимална продукция на ВЗВ;
- г/ Промиване на инфектираната с ВЗВ култура с физиологичен разтвор, обикновено съдържащ лизозотропен агент, като например амониев хлорид или хлорокин, преди да бъдат събрани клетките инфектирани с ВЗВ.
- д/ Събиране на клетките, инфектирани с ВЗВ, в минимален обем стабилизиращ разтвор след което те се разрушават веднага или се замразяват за по-късно разрушаване;
- е/ Разрушаване на клетките, инфектирани с ВЗВ, с цел оптимално освобождаване на вирусите които се намират в тях, след което клетъчните остатъци се премахват, за да се получат окончателно препарати, съдържащи извънклетъчни ВЗВ.

КРАТКО ОПИСАНИЕ НА ПРИЛОЖЕНИТЕ ФИГУРИ

Фигура 1. ВЗВ PFU добив в хранителна среда с добавка на захароза.

Фигура 2. Добив на извънклетъчен ВЗВ антиген.

Фигура 3. Стабилност на ВЗВ в SPGA стабилизатор на -20°C или на 4°C .

Фигура 4. ВЗВ PFU добиви получени при използване на различни хранителни среди за култивиране.

Фигура 5. Ефект на добавяне на свързани с клетките MOI върху добива от извънклетъчни ВЗВ.

ПОДРОБНО ОПИСАНИЕ НА ТЕХНИЧЕСКАТА СЪШНОСТ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО

Това изобретение се свежда до предлагане на метод за отглеждане на клетки в монослойна култура. Цета на изобретението е да се постигне повишена клетъчна плътност на клетки, които в култура растат прикрепени за субстрата. Тази цел се постига чрез добавяне на обогатена среда за култивиране, допълнена с липид в оптимизирана концентрация. Чрез отглеждане на монослойни клетъчни култури, съгласно настоящето изобретение в среда с ново липидно съдържание, се увеличава значително добива на вирусни единици или продукцията на вирусен антиген. По този начин, продукцията на вирусни ваксини получени от хепатит А вирус, варицела зостер вирус, рубеола, ротавирус, заушка, морбили, полиомиелит и други, може да бъде подобрена чрез прилагане на метода за клетъчно култивиране, предложен в това изобретение.

Една предпочитана обогатена хранителна среда за използване в този метод е SRFE-2 (търговски достъпна от Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, S2138 или от Serva Fine Chemicals, Heidelberg, Germany 47523). Тази среда е била описана от Weiss et al. [*In Vitro* 16 (7), 616-628 (1980)]. Други еквивалентни среди или такива като SRFE-2 с някои малки промени в състава,

могат да се използват по същия начин както е описано в приложенията на настоящето изобретение.

Голям брой от известните липидни добавки могат да бъдат използвани с успех в това изобретение. Например богати на холестерол липиди от говежди серум (Sigma Chemical CO., catalog # L-4646), EX-CYTE липид I или липид с много ниско ендотоксиново съдържание (MILES Inc., catalog #'s 82-004-7 до 8 и 82-019-1) се оказаха ефективни като добавки за обогатяване на хранителната среда. Една предпочитана липидна добавка е търговско достъпният соев липиден екстракт, който може да бъде получен от Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis IN, catalog # 1074 482. Този или подобен материал е описан от Iscove и Melchers [J. al. Exp. Medicine, 147, 923-933, (1979)], като заместител на серума в една В-лимфоцитна култура. Там няма направено никакво предположение, нито пък в каталога на Boehringer Mannheim, че соевата липидна добавка би била полезна при добавяне към обогатените хранителни среди. Съгласно тези източници, липидът е предназначен за заместител на серума в културите отглеждани в минимални хранителни среди. Съгласно използването си в това изобретение, липидът се явява добавка към обогатените среди. Освен това, съгласно публикувани вече източници, липидът се използва в концентрация от 10 до 100 мкг/мл. Съгласно настоящето изобретение, оптималните концентрации на използване на липида са 2-3 пъти по-високи отколкото концентрациите предложени в литературата или от производителя. Освен това, съгласно настоящето изобретение, липидната добавка може да се използва не вместо серума, а като добавка към него.

В изпълнението на това изобретение, в съдовете за култивиране се посяват клетки като MRC-5, WI-38, Vero клетки или някои други типове клетки, които са подходящи за размножаване на

вируса. Началната фаза на посяване на клетките се провежда или в минимална хранителна среда, като EMEM или EBME или в обогатена среда, като SRFE-2 без липидна добавка. Полезно е още добавянето на около 10% FCS (фетален телешки серум), антибиотик от типа на неомицина (около 50 мкг/мл) и L-глутамин (около 2мМ). Клетките се отглеждат при температура подходяща за развитието както на клетките, така и на вирусите - обикновено около 34-37°C, за предпочитане около 35°C, в зависимост от вида на вируса който трябва да бъде получен, в продължение на няколко дни.

След като клетките ясно се прикрепят към дъното на съда и монослоят се оформи добре, се премахва минималната или обогатената среда и се замества с прясна обогатена среда със оптимизирана концентрация на липиди.

След известен период на по-нататъшно нарастване, хранителната среда може да бъде премахната отново и заменена със свежа, богата хранителна среда без липидна добавка. Добавянето на липидите, след като клетките са наближили или достигнали конfluентност е отрицателен фактор, който намалява максималните клетъчни добиви.

Когато клетъчните монослоеве трябва да бъдат инфектирани с вирусна посявка, липидната добавка се елиминира и вирусният причинител се въвежда с прясна, обогатена хранителна среда. Остъствието на липид в това повторно захранване, позволява да се получи значително клетъчно нарастване, без липид-индуцираното намаление за което стана дума по-горе.

Следвайки метода, описан в предходните параграфи, се получава значително повишаване на добива от клетки и вируси. По този начин, за вируса-причинител на варицела, който се размножава в MRC-5 клетки се получава значително увеличаване на B3B PFU добива, в сравнение със случая когато MRC-5 клетки се

отглеждат в минимална или SRFE-2 среда. От друга страна, WI-38 клетки, които са удобни за продукция на вируса причинител на варицела или рубеола, нарастват до значително по-големи плътности, когато бъдат култивирани съгласно този нов метод.

Когато това изобретение бъде приложено за производство на определена ваксина, новият метод, предложен в това изобретение включва размножаването на ВЗВ в клетъчната култура и събиране на получения ВЗВ при условия, които оптимизират добива и стабилността на вируса. Предимствата които бяха установени за продукция на ВЗВ могат да бъдат използвани за получаване на вируси, индуциращи херпеси различни от ВЗВ, заушка, морбили или рубеола.

Крайната цел на това изобретение е да бъде предложен метод, който позволява ефективна продукция на ВЗВ, като същият бъде използван за ваксина. Успеха на този метод беше преценен по добива на извънклетъчни ВЗВ, които бяха получени при оптимизиране на всеки етап от този метод. Добивът беше определян чрез титърът на инфекциозност на крайния препарат, съдържащ извънклетъчни ВЗВ. Титрите на инфекциозност на препаратите съдържащи ВЗВ бяха определяни чрез тестовете с агарозно или течностно надсложаване, описани от Krah et al. (J. Virol. Methods, 1990, 27: 319-326). Накратко, този метод се състои в култивиране на MRC-5 клетки, които са податливи на инфектиране с ВЗВ, до етап, при който клетките са 50-80% конфлуентни. След това вирусът се надсложва върху клетъчния монослой в минимален обем, дава му се възможност да се захване за клетките и след това се добавя допълнителна хранителна среда. След няколко дни на нарастване, клетките се подлагат на оцветяване с багрило за белтъци и се преброяват неочетените области /плаките/. По такъв начин, за известен обем от вирусна посевка, броят на единиците,

образуващи плаки (PFU) на милилитър представлява една добра мярка за оценяване на вирусния добив. Общият брой на PFU може да бъде пресметнат, като се умножи тази стойност по общият обем от извънклетъчни вируси от всеки вирусен препарат.

Поради вариабилност на самия експеримент, увеличението на PFU, получено при оптимизирането на всеки етап се определя като съотношение към някой по слабо оптимизиран етап. Отразяването на резултатите в пъти увеличение на вирусния добив, следователно анулира всяка вариабилност на самия PFU тест. На края, отделните стъпки на описания метод, имат като резултат увеличение от около 16-20 пъти в добива на ВЗВ. Такова "пъти" увеличение не е описано в литературата и то представлява значителен принос в умението да се продуцира ВЗВ ваксина.

Тъй като тестовете по определяне на плаките, образувани от ВЗВ отнема много време, той не се оказва особено подходящ за контрол в рамките на процеса. Една бърза ELISA на ВЗВ антигена позволява измерване на количеството му, което дава възможност да се проследи растежа на вируса по време на производството на жива ваксина. Освен това този тест може да се използва за да се установят количествата на ВЗВ антигена в озвучени и пречистени сборни препарати и дава възможност да се измери антигена в подготвените съдове, съдържащи лиофилизирана ваксина. Накратко, този тест се провежда чрез инкубиране на ВЗВ антигена от пробите с анти-ВЗВ серум в разтвор. На останалото свободно антитяло се дава възможност да се свърже с ВЗВ антигена, имобилизиран върху ELISA микротитърни плата. Количеството антитяло, способно да се свърже с платата е обратно пропорционално на количеството антиген в пробите. Количествата на антитялото свързано към платата се определя чрез реакция с ензимно свързано анти човешко

антитяло и подходящ субстрат, така че да се получи оцветен продукт който се околичествява спектрофотометрично.

ELISA теста на ВЗВ и теста по формиране на плаки от ВЗВ по принцип трябва да дадът корелативна информация, но трябва да се има предвид, че количеството на ВЗВ антигена отразява наличието както на нежизнени така и на жизнени ВЗВ. Тъй като имунният отговор предизвикан от убити ВЗВ не е така ефективен, както отговора към жив, атенюиран вирус, опитите по формиране на плаки се явяват критични при определяне на необходимата доза от вирус при приготвянето на ВЗВ ваксини. Все пак, опитът по определяне на антигена е ценен с това, че предлага начин за измерване на тоталния антиген, въвеждан в реципиента на ВЗВ ваксината, той е по-бърз от опита по определяне на PFU и следователно позволява проследяване на самия процес на получаване на ВЗВ. Освен това при този тест се наблюдава корелация поне до точката на максимална продукция на ВЗВ, което позволява да се определи оптималното време за получаване на вируса.

Успеха на настоящето изобретение силно нараства и от следните критични параметри, всеки един от които е в рамките на обсега на това изобретение:

а/ Култивиране на клетки податливи на инфектиране с ВЗВ селектирани от човешки диплоидни клетки, като например MRC-5, до конfluентност в монослойна клетъчна култура, използвайки големи обеми за култивиране или обогатена хранителна среда за култивиране, с цел постигане висока степен на репликация и добавяне на неметаболизируем дизахарид, като захароза.

Голям брой от известните клетъчни култури могат да бъдат използвани за получаване на ВЗВ. Така бяха използвани Vero клетки, WI-38 клетки, MRC-5 клетки и редица други клетъчни

типове. Ние използвахме MRC-5 клетки, които са подходящи за получаване на ваксина предназначена за хора. Твърде е възможно, добивите на извънклетъчни ВЗВ да бъдат повишени над нивото наблюдавано от нас, ако например се използват и други типове клетки освен MRC-5. Това изобретение обхваща приложението на предложения метод към определени клетки, както и степента до която определена клетъчна линия може да бъде адаптирана за използване при този метод.

Сравнение на добива от извънклетъчни вируси, получени от субконфлуентни или конфлуентни MRC-5 клетки, инкубирани на 35°C, при 5% CO₂ в Eagle's Minimal Essential Medium (ЕМЕМ) с 2% или 10% фетален телешки серум (FCS), показва ефекта на клетъчната конфлуентност върху добива на извънклетъчни ВЗВ PFU (виж Пример 2 и Таблица 1).

Използването на конфлуентни клетъчни монослоеве дава възможност да се получи около 2-3 пъти увеличение на добива от извънклетъчни PFU/мл в сравнение с добива, получен при инфектиране на субконфлуентни култури, без значение дали те са активно пролифериращи (10% серум) или не (2% серум). Следователно, конфлуентни, но не активно пролифериращи клетки се оказват необходими за повишаване добива на ВЗВ в процеса на получаване на ваксина.

Процентът фетален телешки серум, присъстващ по време на растежа на вируса няма сериозен ефект върху добива от извънклетъчни PFU. Така, по време на фазата на клетъчно нарастване FCS се добавя в размер на около 10%, докато по време на фазата на растеж на вирусите, FCS е около 2%, което може да се използва при минимална среда като ЕМЕМ или ЕВМЕ или обогатена среда, като SRFE-2.

Освен FCS, към хранителната среда за клетъчно и вирусно култивиран се добавя и около 50 мкг/мл антибиотик от типа на неомицина и глутамин (около 2мМ).

1. Фаза на клетъчно посяване

Съдовете за клетъчно култивиране (флаσκοвете, ротационни бутилки или някакви функционални еквиваленти на тези съдове за клетъчно култивиране) се засяват с MRC-5 или някакви други диплоидни клетки, така че първоначалната концентрация на клетките да бъде между 10 000 и 40 000 клетки /см². Клетките се подхранват с хранителна среда с добавка на около 10% фетален телешки серум, обгазена с 5%CO₂ и се инкубират при около 30-37°C, за предпочитане 35°C.

Клетките могат да бъдат посяти във възможно малък обем, такъв какъвто е необходим за пълното покриване на клетки в стационарна клетъчна култура. Едно работно съотношение на обем към повърхност е около 0,5 мл култивационна среда на квадратен сантиметър от растежна повърхност. Когато клетките се отглеждат в ротационни бутилки, може да се използва и 125 мл на 850 см² но за предпочитане е 425 мл/см².

Търговско достъпните минимални хранителни среди, известни като Eagle's Minimal Essential Medium (EMEM) или Eagle's Basal Medium допълнена с Earle's Salts (EBME), могат да бъдат използвани с около 10% фетален телешки серум (FCS) за фазата на клетъчно посяване. От друга страна може да бъде използвана и една по-богата хранителна среда за по-доброто протичане на тази фаза. Средата SRFE [Weiss, et al., In vitro 16 (7), 616-628 (1980)], която може да бъде закупена от Sigma, е всъщност една богата среда, която може да бъде използвана с успех на този етап, но във всеки случай, богатата среда не е абсолютно задължителна на този етап от процеса.

2. Фаза на клетъчен растеж

На този етап е много съществено да има достатъчно захранване на клетъчната култура, за да могат клетките да достигнат до конfluентност. Това може да бъде постигнато чрез добавяне на голямо количество минимална среда или по-малък обем обогатена среда. Клетките се отглеждат при около 30-37°C, като за предпочитане е около 32-35°C.

След като се осигури един адекватен период за прикрепване към субстрата и нарастване на клетките, клетъчната култура може да бъде захранена отново чрез заменяне на хранителната среда и последващо инкубиране. Средата може да бъде премахната чрез аспириране или някакъв друг начин, който не нарушава интегритета на клетъчния монослой. За MRC-5 клетките, които са посяти както беше описано по-горе, повторното захранване може да бъде предприето около 72 часа след въвеждане на клетките в съда за култивиране. Обемът на култивационната среда, който е сменен, може да бъде същият, като обемът използван за фазата на посяване на клетките. За предпочитане е обаче за фазата на клетъчен растеж да бъде използван по-голям обем от този, използван за фазата на засяване на клетките. Това е особено важно, когато клетките се култивират в някоя от минималните среди от типа на EMEM или EBME с добавка на FCS. Големият обем при култивиране е един от начините да бъде осигурено адекватно захранване на клетките.

Изискването за голям обем може да не се спазва при положение, че средата в която се осъществява растежната фаза е богата. Особено предпочитана среда за тази цел е SRFE-2 (Sigma). Използването на богата среда в тази фаза, а не на минимална, значително повишава плътността на клетъчния монослой при конfluентност. Тази увеличена клетъчна плътност съответно

повишава добива на ВЗВ получен от инфектирана клетъчна култура, растяща в обогатена хранителна среда. По такъв начин, използването на богата среда през време на фазата на клетъчен растеж е причини повишаване на крайния добив на ВЗВ около 2 до 4 пъти, в сравнение с добива при клетки отглеждани в минимална хранителна среда на този етап.

В един подобен вариант, SRFE-2 се обогатява с липиди. За тази цел могат да бъдат използувани различни липидни добавки. Като подходящи добавки на богата или минимална хранителна среда бяха установени обогатените с холестерол липиди от говежди серум (Sigma Chemical Co.) или липиди с много ниско съдържание на ендотоксин (VLE, MILES). Търговско достъпният соев липид [Boehringer Manneheim, виж също Iscove et al., *J. Exp. Med.* 147, 923-933 (1978)] се оказва много полезна в концентрации около 0,2 мг/мл. При използването на SRFE-2 с добавка на липиди и FCS бяха получени клетъчни плътности достигащи до около 500 000 клетки/см². Повишен добив на ВЗВ се наблюдава и когато липида се добавя без оглед на това дали клетките са отглеждани в минимална или богата хранителна среда. Търговско достъпният материал се продава като 20мг/мл липид в 100мг/мл говежди серумен албумин. За удобство, този материал се използва в крайно разреждане 1:100. Когато SRFE-2 средата беше обогатена с 0,2 мг/мл соеви липиди по време на клетъчния растеж, крайният добив от ВЗВ се увеличи около 9 пъти в сравнение с добива на ВЗВ само от ЕМЕМ и около 3,3 пъти в сравнение с SRFE-2 без липидна добавка.

3. фаза предшестваща инфекцията

Ние установихме, че крайният добив на ВЗВ може да бъде допълнително увеличен, когато към култивираните клетки се добавя неметаболически нетоксичен дизахарид в оптимална концентрация

преди инфектирането с ВЗВ. Един много успешен вариант представлява добавянето на около 20-60мМ захароза около 72 часа след засяването на клетките и за предпочитане около 24-96 часа преди инфектиране на културата с ВЗВ. От практическа гледна точка, добавянето на около 50мМ захароза при първата смяна на средата на етап 2, отговаря на тези критерии и намалява броят на необходимите стерилни манипулации, като на практика прави тази и предишните стъпки конкурентни.

Други дизахариди, включително лактоза, целобиоза и малтоза, също повишават крайния добив на ВЗВ, но все пак захарозата остава за предпочитане. Изследваните монозахариди, като например фруктоза и рибоза не повишиха добива на ВЗВ (рибозата може да се окаже даже токсична). Оказва се, че дизахаридите се концентрират в лизозомите на растящите клетки, поради което те набъбват и образуват вакуоли [DeCourcy and Storrie, Exp. Cell Res. 192 52-60 (1991)]. Този ефект на дизахаридите върху добива на ВЗВ може също така да се дължи на атенюиране на лизозомното увреждане от ВЗВ. Освен дизахаридите, три- и тетразахаридите също биха могли да индуцират подобен ефект, тъй като според Cohn and Ehrenreich [J. Exp. Med. 129, 201-222 (1969)], идентична вакуолизация се установява, когато макрофаги са били захранвани с тези висши захари или захароза, при условие че захарите не са били метаболизирани от тези клетки.

б/ Инфектиране на клетките съгласно етап а/ в състояние най-близко до точката на конfluентност с най-висока практически възможна мултипленост на инфекцията на ВЗВ инфектирани клетки:

Ние установихме, чрез повторени експерименти, че средният добив от ВЗВ PFU/мл от клетки, които са престояли 48 час след достигане на конfluентност е около 50% от добива, получен от

свежо конfluентни клетки, инфектирани с ВЗВ. Следователно, важно е, така да се прецени заразяването с ВЗВ по време, че да съвпадне максимално с конfluентността. За съжаление, конfluентността е параметър който варира в зависимост от типа на хранителната среда, типа на култивираните клетки, както и редица други условия на култивиране. За MRC-5 клетките, посяти съгласно етап (а) (1) горе, клетките обикновено се инфектират в точката на достигане на конfluентност.

Вирусът варицела зостер (ВЗВ) е за предпочитане от щам Ока описан в U.S. патент 3, 985, 615, депозиран в ATCC. Този вирус е адаптиран да расте в ембрионални клетки от морско свинче, както и в човешки диплоидни белодробни фибробласти (напр. MRC-5 клетки).

Запас от инфекциозни, живи, заразени с варицела клетки, може да бъде приготвен чрез инфектиране на MRC-5 клетки при MOI от около 1:125, поддържайки инфектираните клетки в състояние позволяващо репликация на вируса, трипсинизирайки клетките и използвайки освободените клетки веднага като посевка или съхранявайки ги за по-късна употреба чрез бавно замразяване с криопротектант като DMSO или глицерол при плътност от около 10^7 клетки/мл. Замразените, заразени с ВЗВ клетки, могат да бъдат размразени и добавени към конfluентна клетъчна култура за да се инициира инфектирането с ВЗВ.

Алтернативно, ВЗВ инфектирани клетки, могат да бъдат лиофилизирани съгласно метода описан от Hondo et. al., [Archiv fur die gesamte Virusforschung 40, 397-399 (1973)], което позволява дългосрочно съхранение при 4°C на лиофилизирания клетъчен материал. Също така е възможно да бъдат използвани и извънклетъчни ВЗВ като посевка, но поради загуби в добива на

вируса в процеса на добиването му, за предпочитане е използването на клетъчно-свързани посевки.

Друга възможност за получаване на вирусно инфектирани посевки е да се инициира клетъчното нарастване за продукция на вирусната посевка преди продуциращите клетки да бъдат посети. В момента на инфектиране с ВЗВ-инфектирани клетки, посяването на продуциращите клетки може да бъде иницирано по такъв начин, че да се достигне конfluентност по същото време, когато вирусната посевка достига максимален ВЗВ титър. По-малко оптимално, но по-удобно е, клетките от посевката и продуциращите клетки да бъдат посети по едно и също време в малък обем култивационна среда (около 125 мл на 850 см² ротационна бутилка). След около два до три дни на нарастване, обемът на средата в бутилките, предназначени за продукция на ВЗВ посевки, беше увеличен до 425 мл, или клетките бяха захранени с богата среда, която да позволи нарастването им до конfluентност. Продуциращите клетки бяха оставени в относителен покой в малък обем от минимална хранителна среда (включващ около 10% FCS) до около два дни преди работните клетки за посевка да бъдат инфектирани с ВЗВ инфектирани клетки. В този момент, обемът на хранителната среда на продуциращите клетки беше повишен до около 425 мл, или те бяха захранени с богата среда, като например SRFE-2 плюс оптимално количество соеви липиди и фетален телешки серум. При тези условия продуциращите клетки ще нарастват до пълна конfluентност. Два дни след захранването на продуциращите клетки, работните клетки за посевка, които са вече конfluентни, бяха инфектирани с ВЗВ-инфектирани клетки при MOI от 1:125 или по-високи и репликацията на ВЗВ беше оставена да продължи за около два до три дни. По времето на достигане на пика от продукция на ВЗВ в посевните култури, продуциращите клетки ще са

достигнали конfluентност. След това посевните клетки бяха събрани и добавени към продуциращите клетки.

Колкото и време да е необходимо за получаване на посевния материал, подходящо време след инфекцията с ВЗВ, средата се премахва от инфицираната с ВЗВ посевна култура, инфектирания с ВЗВ посевен материал се събира чрез трипсинизиране (около 0,25% трипсин) или друго щадящо ги средство и продуциращите клетъчни култури се инфектират при известно MOI.

Schmidt, N. S. and Lennette, E. H., [Infection and Immunity 14, 709-715 (1976)] отбелязаха значението на високия MOI за високия добив от ВЗВ, но не са направили стриктно сравнение при инфектиране с ниски стойности на MOI. Настоящото изобретение прави точно това сравнение.

Клетките се инфектират с ВЗВ чрез премахване на растежната среда от клетъчните култури и заместването и със свежа среда, съдържаща известно количество инфектирани с ВЗВ клетки, получени съгласно описанието по-горе. Желателно е вирусният материал да бъде титруван за определяне на варицелните плаки формиращи единици (PFU,s) и реципиентните клетки да бъдат преброени за да може да се околичестви мултиплеността на инфекцията (MOI). MOI се изразява като отношението между ВЗВ инфектираните клетки в посевката и броят на неинфектираните клетки в монослойната култура. Следователно MOI от 1:10 е високо, докато 1:625 е ниско. Висока MOI е желателна, но от практическа гледна точка, добър ВЗВ добив може да бъде постигнат и от ниска MOI като 1:125.

MOI между 1:7 и 1:625 дават добив между 500 000 PFU/мл при висока MOI и около 100 000 PFU/мл при ниска MOI (виж Таблица 3 от Пример 5). Колкото по-висока е MOI, толкова по-късо е необходимото време на инкубация за достигане на пикови стойности

на PFU и толкова по-голям е добива. Следователно може да бъде получена крайна стойност на PFU която варира в диапазон от около 5 пъти, в зависимост от MOI и от времето на получаване.

в/ Поддържане на ВЗВ инфектираните култури в състояние на високо подхранване за около 22-96 часа и събиране на добива по време на пика на ВЗВ продукция:

Култивирането на клетки, инфектирани с ВЗВ, продължава приблизително от 22 до 96 часа след инфектирането. Много съществено е да се поддържа адекватно хранене на този етап на вирусен растеж. Желателно е обезпечаването на по-големи количества минимална хранителна среда, като EMEM плус 2-10% FCS, или по-малко количество от богатата хранителна среда, за предпочитане е SRFE-2 плус 2-10% FCS без липидна добавка. Беше забелязано, че добавката на липид на този етап намалява добива от ВЗВ.

По време на 22-96 часа от постинфекционното култивиране, ВЗВ се реплицира в клетките които са били инфектирани и се разпространява за да инфектира прилежащите клетки. Обаче, старите инфектирани клетки не дават възстановяеми, извънклетъчни PFU. Кривата на растеж на ВЗВ, както и последващото намаление могат да бъдат доста стръмни. Следователно, правилната преценка на времето на събиране на материала е критичен параметър за максимализиране на добива от ВЗВ и това може да бъде акуратно възпроизведено на използваната множественост на инфекцията, храненето и времето на инкубация. Освен това, бързата ELISA на ВЗВ антигена може да бъде използвана за да се оптимизира времето на получаване на материала, тъй като инфекциозния ВЗВ корелира с продукцията на ВЗВ антигена поне до точката в която започва да се наблюдава смъртта на вируса (виж фигури 5 и 6).

При MRC-5 клетките, инфектирани с ВЗВ и събрани около 72 часа след инфектирането, при които всяка следваща стъпка е оптимизирана (т.е. растеж в богата хранителна среда и преинфекционно третиране на клетките с 50 mM захароза за 72 часа), крайният добив на извънклетъчни ВЗВ се увеличава с около шестнадесет пъти в сравнение с добива, получен в минимална среда и събиране на вируса след 48 часа и дори с повече в сравнение с добива след 96 часа (виж Пример 8, Фигура 1). Добивът на ВЗВ при същите оптимизирани условия беше само около 4 пъти по-висок от добива в минимална среда, когато вирусът се добива 48 часа след инфектиране, но все пак беше значително подобрен в сравнение с добива в минимална среда след 96 часа. Следователно, вирусният добив е значително по-голям и вирусната смърт е значително намалена в обогатена среда и там не се наблюдава такъв стръмен спад на вирусния добив във времето. Множествеността на инфекцията също се оказва по-малко критична в богатата хранителна среда.

г/ Промиване на ВЗВ инфектираната култура с физиологичен разтвор, който съдържа лизозотропен агент като амониев хлорид или хлорокин, пред събирането на ВЗВ инфектираните клетки:

За да се премахнат серума, липида и клетъчните остатъци, монослойната клетъчна култура се промива с физиологичен буфер, който не лизира клетките. Фосфатно забуферираният физиологичен разтвор (PBS) е много подходящ за тази цел. Клетките могат да бъдат промити няколко пъти, като промивания разтвор се отлива, аспирира или се премахва по някакъв друг начин, който не нарушава интегритета на монослоя.

Ако клетките се освободят по химичен път от съда в който растат, те трябва да бъдат концентрирани чрез центрофугиране и физиологичния буфер трябва да бъде заменен със стабилизатор.

Добавянето на амониев хлорид или хлорокин преди събирането на клетките подобрява значително крайния добив на ВЗВ. Kielian et al., [EMBO J. 5, 3103-3109 (1986)] е използвал амониев хлорид за контрол на вътрешното рН на клетъчните ендозومي, където инфектиращите вируси прекарват известно време от техния вътреклетъчен живот. Възможно е механизма на повишаване на добива на ВЗВ при експониране на клетките на лизозомотропни агенти да е свързан с индуциране на по-мека ендозомална среда. Пре инфекционното натоварване на клетките с не-токсични, не-метаболизируеми дизахариди, като например захароза, както и експонирането на клетките на амониев хлорид или хлорокин, може следователно да действуват по аналогични механизми. Във всеки случай, било е потвърдено емпирично, че крайният добив от ВЗВ се повишава когато се добави амониев хлорид в концентрации между 1-100 mM, като за предпочитане е да бъде в интервала 20-50 mM и за предпочитане е да бъде добавен при около 4°C за около 20-25 мин преди разрушаването на клетките. Вторият лизозомотропен агент - хлорокин, приложен в концентрация около 230 мкМ, също така повишава добива от ВЗВ PFU/мл.

д/ Събиране на клетките, инфектирани с ВЗВ в минимален обем от стабилизиращ разтвор, като клетките или се разрушават веднага, или се замръзват и се разрушават по-късно

След промиването на инфектираните с ВЗВ клетки, те могат да бъдат събрани чрез остъргване, ако съда в който са отглеждани позволява това, или чрез освобождаване на клетките по химичен път. Ензимното освобождаване на клетките е по-малко желателно, тъй като остатъчният ензим може да понижи вирусният добив след

като клетките са разрушени. Както вече беше отбелязано, ако клетките се получават във физиологичен разтвор, те се концентрират чрез центрофугиране и физиологичния разтвор се заменя с минимален обем от разтвор стабилизиращ ВЗВ. Едно добро съотношение между обема и повърхността на която растат клетките е 40 мл стабилизатор на 850 см².

Вирусните стабилизатори са известни. Например, стабилизиране в 5% захароза във физиологичен разтвор, буфериран с фосфат е бил предложен в U.S. патент 3, 985, 615, докато други автори препоръчват по-сложни стабилизатори, като например SPGA.

След като клетките, инфектирани с ВЗВ, се ресуспендират в стабилизиращ разтвор, те могат да бъдат разрушени веднага, или в случаите, когато се получават големи количества от ВЗВ, клетките могат да бъдат замразени при -70°C за по-нататъшно използване. Добивът на ВЗВ на см² от растящите клетки ще бъде малко по-голям ако клетките се разрушат незабавно, но етапа на замразяване обикновено не причинява загуби от повече от 10% от добива, получен при незабавно използване на клетките.

е/ Разрушаване на ВЗВ инфектираните клетки за оптимално освобождаване на извънклетъчни ВЗВ и премахване на клетъчните остатъци за получаване на препарат от извънклетъчни ВЗВ

Както беше описано по-горе, за предпочитане е средата да бъде отделена от клетките преди те да бъдат разрушени и да бъде заменена с минимален обем стабилизатор на ВЗВ в който клетките се остъргват или се освобождават по някакъв друг начин. Клетъчната суспензия се охлажда до 0-4°C и клетките се разрушават по подходящ начин, като например озвучаване, хомогенизиране с хомогенизатор на Даунс, с други начини на

разрушаване цялостта на клетките или с комбинация от всички тези техники.

Ние установихме, че ако се прилага само озвучаване, то не дава оптимално получаване на извънклетъчни ВЗВ. Всъщност, когато се използва хомогенизиране с хомогенизатор на Даунс като първоначална стъпка на разрушаване на клетките, последвано от центрофугиране, запазване на супернатантата като супернатанта I, последвано от озвучаване на утайката и центрофугиране за да се получи супернатанта II, добивът на ВЗВ значително се увеличава.

След разрушаването на клетките, премахването на клетъчните отпадъци се извършва чрез центрофугиране, филтриране или може да се приложи всеки един известен начин за премахване на клетъчните остатъци, при условие, че ВЗВ остава незасегнат. Полученият по този начин извънклетъчен вирусен препарат се разрежда със стабилизиращ разтвор и се разделя на порции за да бъде използван като ваксина. За предпочитане е, когато трябва да бъде съхраняван за по-дълги периоди от време, ВЗВ препаратата да бъде лиофилизиран по някой от известните за това начини.

В резюме, приблизителният потенциален добив се увеличава, когато се следват оптимизираните етапи на този процес, в сравнение с получаването на ВЗВ от клетки растящи в минимална хранителна среда. Увеличенията са представени по-долу:

Етап на процеса	Пъти PFU
Среда/Добавки	увеличение
1. MOI	2-5
2. Конфлуентност на клетките	2-3
3. SRFE-2 среда + липиди	2-3
3. Захароза в пре-инфекциозната фаза	2-5
4. Оптимален обем на средата	1-2

Общо потенциално увеличение при комбинирани
среда/стабилизатор добавки и оптимизирани
условия на инфекцията ≥ 8

Наблюдавано увеличение при комбинация от
3, 4 и 5 в ротационни бутилки. 16

6. Комбинирано разрушаване/озвучаване
за освобождаване на извънклетъчни ВЗВ 1,5

Общо потенциално увеличение в сравнение
с неоптимизирания процес ≥ 18

Използване на този метод за получаване на ваксина

Беше показана възможността за използването на атенюирани, извънклетъчни ВЗВ като ваксина за предпазване от дребна шарка. Многократните клинични изпитания убедително са доказали, че това използване е възможно и това е широко документирано [виж напр. *Pediatrics* 88 (3), 604-607 (1991); *Pediatrics* 87, (5) 604-610 (1991)]. Следователно, огромният принос на това изобретение е, че то определя един високо ефективен процес за получаване на високи добиви от жив, атенюиран ВЗВ. Вирусът, получен съгласно това изобретение, може да бъде формулиран като ваксина, съгласно известните в тази област методи и процедури и може да бъде въведен в организма съгласно установените за това правила. Например, живият атенюиран извънклетъчен ВЗВ, получен съгласно това изобретение, може да бъде разреден със стабилизатор, разфасован и лиофилизиран в единични дози за съхранение при около 4°C или по-ниски температури, като една доза от около 1 000 PFU ще бъде достатъчна когато е необходимо да бъде

използвана. Ваксината съдържаща ВЗВ, получена съгласно метода, изложен в това изобретение, може да бъде използвана в единични дози за ваксиниране на хора за да индуцира имунен отговор срещу инфекция с вирулентни щамове от ВЗВ. За предпочитане е, минималната доза, която се въвежда подкожно или вътремускулно да бъде около 2 000 PFU/мл (доза - 1 000 PFU/ 0,5 мл). Също така са били използвани и са допустими между 15 000 и 20 000 PFU.

Предлагайки един оптимизиран процес за получаване на атенюиран ВЗВ вирус, това изобретение дава възможност той да бъде използван за индуциране на анти-ВЗВ имунен отговор за предпазване от дребна шарка.

Следните примери се дават за илюстрация на настоящето изобретение и те не трябва да бъдат считани за ограничителни при прилагането му.

ПРИМЕР 1

Тест за определяне добива от ВЗВ

Инфекциозните титри на препаратите от варицела зостер вирус бяха определени при използване на методите по агарозно или течностно надсложаване, както са описани от Krah et al. (J Virol Methods, 1990, 27: 319-326). Теста беше проведен по следния начин:

MRC-5 клетки бяха посадени в 60мм петрита за клетъчно култивиране при гъстота 6×10^5 клетки в пет милилитрови обеми от BME (Basal Medium Eagle със Hank's balanced salt solution) с добавка на 100мг/л галактоза, 50мкг/мл неомицин, 2мМ L-глутамин и бяха инкубирани на 35°C в 5% CO₂ атмосфера. След инкубиране за 24 до 48 часа, клетките достигаха 50 до 80% конfluентност. Хранителната среда беше премахвана чрез аспириране и клетките бяха инфектирани със 100мкл от разтвора на ВЗВ, разреден с

подходящ вирусен разредител, като например SPGA буфер или среда за поддържане в течност /СПТ/. SPGA буферът съдържаше 7,5% (w/v) захароза, 11мМ калиев фосфат, 0,1% (w/v) натриев глутамат и 1% човешки серумен албумин. На вирусите беше дадена възможност да се заловят за клетките чрез инкубация за повече от 1 час на 35°C в 5% CO₂ атмосфера. След това ВЗВ-инфектираните клетки бяха надслоени с агарозна надслояваща среда /АНС/ или среда за поддържане в течност /СПТ/. Агарозната надслояваща среда представляваше смес от два разтвора - течна надслояваща среда /ТНС/ и агарозен разтвор. ТНС съдържаше MEM (minimal essential medium with Earl's salts), 2% топлинно инактивиран фетален телешки серум, 50мг/мл неомицин сулфат и 2мМ L-глутамин. Агарозният разтвор беше приготвен в 100мл MEM за 15 мин на 121°C и оставен да се изстуди до 45°C. АНС беше приготвена чрез смесване на един обем от агарозния разтвор с четири обема от 1,25х концентрирана ТНС на 45°C. Петритата бяха изстудени до 23-25°C за да се даде възможност на АНС да се втвърди. Културите бяха инкубирани за да се даде възможност за развитие на плаките. След 6 до 7 дни петритата, които бяха залети с АНС, бяха надслоени с фосфатно забуфериран физиологичен разтвор (PBS), агарозата беше отделена от краищата на петрито със стъклена Пастъорова пипета и премахната. При петритата, които бяха надслоени със СПТ, средата беше отстранена чрез аспириране и плаките бяха визуализирани чрез оцветяване на клетките с разтвор на 0,2% (w/v) Coomassie Blue R-250 в етанол - 1% оцетна киселина. Броят на преброените плаки беше усреднен от 4 до 5 повторения и представен като плаки-формиращи единици на милилитър (PFU/ml).

Поради потенциалната вариабилност на теста, повишаванията в добива от ВЗВ са представени в сравнение с резултатите от идентични тестове при неоптимизирани условия.

ПРИМЕР 2

Добив от ВЗВ, като функция от клетъчната конfluентност по време на инфектирането.

MRC-5 клетки бяха засадени при плътност 4×10^6 клетки/ 150 cm^2 и бяха оставен да нарастват за три дни в EBME (Earl's salts supplemented with Eagles Basal Medium) в присъствие на 10% фетален телешки серум (FCS). При достигане на субконfluентна клетъчна плътност от около 12×10^6 клетки/ 150 cm^2 , клетките бяха захранвани отново със свежа EBME среда, допълнена или с 2% FCS или с 10% FCS. След този момент, субконfluентните клетки бяха оставяни за по-нататъшно нарастване в присъствие или отсъствие на инфекция с ВЗВ (MOI = 1:125) и увеличаването на клетъчната плътност и вирусният добив беше проследен след 48 часа. Беше установено, че неинфектираните клетки, отглеждани в 2% FCS, увеличиха своята плътност само с 33%, докато клетките в 10% FCS, показаха увеличение от 92%. Клетките от инфектираните култури не увеличиха своя брой.

Други клетъчни култури бяха оставени да нарастват за още два дни в 10% FCS до около 20×10^6 клетки / 150 cm^2 (условия на конfluентност) и след това бяха захранени отново със свежа EBME хранителна среда допълнена или с 2% FCS или с 10% FCS. Една част от тях бяха инфектирани с ВЗВ (MOI 1:125), а другата беше оставена без инфектиране. Увеличението на клетъчната плътност и вирусния добив беше установен след 48 часа. Беше установено, че неинфектираните клетки, отглеждани в 2% FCS не бяха повишили клетъчната си плътност, докато клетките отглеждани в 10% FCS се бяха увеличили само с 15%. По такъв начин, нито едно условие не беше способно да предизвика клетъчна репликация. Вирусният добив при 2% FCS и при 10% FCS беше еднакъв и в двата случая беше увеличен около три пъти над добива, получен от клетки

инфектирани при условия на субконфлуентност (виж таблица I). По този начин беше установено предпочитателното използване на свежи конфлуентни клетъчни монослоеви пред активно реплициращи се субконфлуентни клетъчни монослоеви по отношение получаване на оптимални добиви от свободни от клетки ВЗВ.

ТАБЛИЦА I

Състояние на клетъчния монослой по време на инфекция	%FCS по време на вирусното нарастване	Свободни от клетки PFU/мл		Репликационен клетъчен потен- циал по време на вирусното нарастване
		<u>Експеримент</u>		
		А	Б	
Суб-	2	44 000	30 000	33%
конфлуентен	10	33 000	27 000	92%
Свежо	2	119 000	117 000	0%
конфлуентен	10	123 000	100 000	15%

ПРИМЕР 3

Сравнение на добива от ВЗВ от свежо конфлуентни и остарели конфлуентни клетъчни култури:

Ротационни бутилки (850 см²) бяха засадени с MRC-5 клетки при концентрация от около 26 000 клетки/см². Всички клетки бяха отглеждани в ЕВМЕ хранителна среда съдържаща 10% (v/v) фетален телешки серум (FCS₁₀) в 5% CO₂ атмосфера на 35°C. Ротационните бутилки бяха разделени на две групи в зависимост от времето на инфекция с ВЗВ. Клетките от група I бяха оставени да нарастват за пет дни като в края на този период клетъчните монослоеви бяха

конфлуентни. По това време средата беше премахната и клетките бяха инфектирани с клетъчно-асоциирани ВЗВ при MOI от 1:125, разредени в ЕМЕМ плъс 2% FCS. Беше добавена допълнителна среда и клетките бяха инкубирани за още 48 часа. Клетките от група II бяха отглеждани за допълнителни 48 часа преди инфектирането при MOI = 1:125.

Продукцията на ВЗВ от клетките от групи I и II беше определена както следва: средата беше премахната от ротационните бутилки, клетките бяха промити с фосфатно забуфериран физиологичен разтвор, остъргани от бутилките със стъклени зърна в същия обем стабилизатор и изстудени до 4°C. Клетките от студената клетъчна суспензия бяха разрушени чрез озвучаване. Остатъците от клетките бяха премахнати от вирусите чрез нискоскоростно центрофугиране (325 x g за 10 мин) и вирусната супернатанта беше запазена. Продукцията на ВЗВ беше измерена чрез теста за формиране на плаки. Както е показано на Таблица 2, увеличение на добива, доближаващо се до два пъти беше получено когато свежо конфлуентни клетъчни монослое бяха инфектирани с ВЗВ.

ТАБЛИЦА 2

	<u>Експеримент 1</u>	<u>Експеримент 2</u>
<u>Условия</u>		<u>PFU/мл</u>
Свежо конфлуентни	121 000	190 000
Остарели конфлуентни	82 000	85 000

ПРИМЕР 4Ефект на обема на културата върху добива от ВЗВ PFU/мл

MRC-5 клетки (10 милиона) бяха суспендирани в 125 милилитрови обеми от ЕВМЕ, 10% FCS, 50 мкг/мл неомицин, 2мМ L-глутамин и бяха засадени в 850 см² ротационни бутилки след което бяха инкубирани на 35°C за три дни. След добавяне на триста милилитра свежа хранителна среда, клетъчните култури бяха инкубирани на 35°C за още 4 дни. След това хранителната среда беше премахната и подменена със 125 мл или 425 мл от ЕМЕМ, 2% топлинно инактивиран фетален телешки серум, 50 мкг/мл неомицин и 2мМ L-глутамин. ВЗВ инфектирани MRC-5 клетки бяха добавени (MOI около 1:125), клетките бяха обгазени с 5% CO₂ и върнати за инкубиране на 35°C за 48 часа. След този период, хранителната среда беше премахната, клетките бяха промити 4 пъти със сто милилитрови обеми от фосфотно забуфериран физиологичен разтвор и остъргани от бутилките с помощта на стъклени зърна в 43 мл обеми от стабилизатор. Клетките бяха замръзени на -70°C. Извънклетъчни вируси бяха приготвени чрез озвучаване. Количествата на инфекциозните вируси в пречистената (чрез центрофугиране) смес, получена след озвучаването, бяха измерени чрез тест за формиране на плаки от ВЗВ.

Резултати:

<u>Обем на средата (мл)</u>	<u>ВЗВ PFU/мл*</u>	
125	55 000	45 000
425	153 000	103 000

*Резултатите са от двойни култури :

Заклучение: Използуването на по-голям обем хранителна среда довежда до увеличаване около 2 пъти на добива от инфекциозните ВЗВ получени от MRC-5 клетъчни култури.

ПРИМЕР 5Ефект на ВЗВ MOI върху добива от ВЗВ PFU/мл

Ротационни бутилки бяха засадени с MRC-5 клетки, които бяха оставени да нарастват до конfluентност. Хранителната среда беше премахната и клетките бяха инфектирани с ВЗВ при различни стойности на MOI. Продукцията на ВЗВ от инфектираните клетъчни култури беше определена при използване на теста по формиране на плаки чрез периодично събиране и тестиране както в Пример 1. Както е показано на Таблица 3 и Фигура 5, получаването на извънклетъчни инфекциозни ВЗВ беше по-голямо и се постигаше за по-кратък инкубационен период, когато се използваха по-високи MOI. При много ниски MOI, такива като например 1:625, антигенната продукция беше забавена и под оптималните нива (виж Фигура 6).

Ефект на прилаганите клетъчно-асоциирани MOI върху добива от екстрацелуларни ВЗВ от MRC-5 монослойни клетъчни култури.

MOI	Титър на извънклетъчните ВЗВ			
	<u>PFU/мл x 10⁻³</u>			

		Време на събиране			
		22 часа		37 часа	
42 часа	60 часа				
	1:25	100	450	50	nd
	1:125	nd	150	325	100
	1:625	nd	nd	100	90

ПРИМЕР 6Увеличаване стабилността на ВЗВ в стабилизатор на -20°C

Инфектираните клетъчни култури бяха озвучени в SPGA и бяха промити с фосфатно забуфериран физиологичен разтвор. След това клетъчно-свързаните вируси бяха освободени чрез озвучаване и остатъците от клетките бяха премахнати чрез центрофугиране. Концентрацията на извънклетъчните вируси беше доведена до известна стойност на PFU/мл и аликвоти от вирусите, разтворени в стабилизатор, бяха лиофилизирани и пазени на 4°C или -20°C. На едномесечни интервали, за общ период от 14 месеца, препаратите бяха разтваряни и остатъчният PFU/мл титър беше определян отново. Резултатите от този експеримент са илюстрирани на фигура 3.

Очевидно е значителното предимство за увеличаване на стабилността на ВЗВ при съхраняване на -20°C, в сравнение със съхраняването на 4°C.

ПРИМЕР 7Ефект върху крайният добив от ВЗВ в зависимост от количеството и времето на добавяне на захароза през пре инфекционната фаза на клетъчно нарастване

1. Фаза на клетъчно засяване:

MRC-5 клетки (5 мл) бяха засадени при концентрация от 120 000 клетки/мл (600 000 клетки общо) в 60мм петрита с EBME хранителна среда, съдържаща 10% FCS, 50мг/мл неомицин, 2мМ L-глутамин и инкубирани на 35°C при 5% CO₂.

2. Фаза на клетъчно нарастване/пре-инфекция:

Клетките бяха конfluентни на третия ден след засяването. Хранителната среда от 48 петрита беше аспирирана и подменена с 8

милилитрови обеми от хранителна среда съдържаща или EBME или SRFE-2 допълнена с 10% FCS, 50мг/мл неомицин, 2мм L-глутамин и 0,2мг/мл соеви липиди/1мг/мл BSA със или без 50мм захароза. След добавяне на свежата хранителна среда, клетките бяха инкубирани за още три дни на 35°C при 5%CO₂.

3. ВЗВ инфекция:

Средата от всяко петри беше премахната и заменена с 8 мл от EMEM вместо EBME и SRFE-2 вместо SRFE-2 плюс соеви липиди. Феталният телешки серум беше намален до 2% за всички петрита, но другите добавки - неомицин, глутамин и захароза, бяха същите, както през фазата на нарастването. След това към всяко петри бяха добавени по 333 мкл от 1:16 разредени ВЗВ инфектирани клетки (47 000 PFU/мл) в EMEM, 2% FCS, неомицин и глутамин. ВЗВ бяха оставени да се реплицират за два дни на 35°C при 5%CO₂ и след това средата от две петрита, от всяко от различните експериментални условия, беше премахната и петритата бяха измити четири пъти с фосфатно забуфериран физиологичен разтвор. Клетките бяха остъргани в 1,2 мл/петри от изстуден на лед стабилизатор. Добивът от двете петрита беше събран в 50 милилитрови конични центрофужни епруветки и замръзен на -70°C.

Същата процедура, като описаната в предишния параграф, беше повторена за две петрита от всяко от експерименталните условия, на третия, четвъртия и петия ден след ВЗВ инфекцията и събраните добиви от всеки набор от две петрита беше запазен на -70°C.

Всеки от добивите, приготвен по описания по-горе начин, по-късно беше размразен, озвучен на лед за 30 сек и пречистен чрез центрофугиране на 1 000 x g за 10 мин на 4°C. Аликвоти от супернатантите бяха взимани за тестиране по отношение

формирането на плаки. Резултатите от този тест, проведен както е описано в Пример 1, са представени на фигура 1.

Резултатите на фигура 1 потвърждават няколко извода:

1. Пре-инфекционното инкубиране на клетките с 50мМ захароза е много полезно за крайния добив от ВЗВ. Във всяка среда, ЕМЕМ или SRFE-2, добивите от ВЗВ бяха по-високи, когато клетките бяха третирани със захароза преди инфектирането. При 72 часа след инфекцията, добивът от ВЗВ измерен като PFU, от SRFE-2 отглеждани клетки, третирани със захароза, се увеличи около 16 пъти в сравнение с добива от клетки, отглеждани в минимална хранителна среда без захароза.
2. Използването на богата среда (SRFE-2 с добавка на соеви липиди по време на нарастването и SRFE-2 по време на вирусния растеж) е полезно за добива от ВЗВ и свързано със захарозния ефект осигурява продукция на ВЗВ с един порядък повече. Така, очевидно е, че богатата хранителна среда действа синергично със захарозния ефект.
3. Времето на събиране на ВЗВ е от много голямо значение. Дори при оптимизирани условия на клетъчно култивиран е- SRFE-2, захароза и др., пекът на добива от ВЗВ не се достига до 48 часа след инфекцията. В този момент се достига само до четирикратно увеличение над добива, получен от минимална хранителна среда. Обаче, 72 часа след инфекцията се установява увеличение на добива от ВЗВ от около 16 пъти.

В други експерименти, добивът от ВЗВ не беше толкова повишен, когато 50мМ захароза беше добавена по време на инфекцията, за разлика от добавянето на захароза 72 часа преди инфекцията, показвайки по този начин важността на продължителността на пре-инфекционната фаза за вътреклетъчното акумулиране на захарозата. Ние също установихме, че добавянето

на 25мМ или 100мМ захароза има по-малък ефект от 50мМ захароза. Същата концентрация е приложима при използване на лактоза, целобиоза и малтоза.

ПРИМЕР 8

Ефект на множествено повишените параметри на процеса върху добива от ВЗВ

За установяване ефекта на различните изменения на процеса (хранителна среда, добавка на захароза, добавяне на NH_4Cl към стабилизатора, хомогенизиране с Даунс хомогенизатор или озвучаване за освобождаване на вирусите от клетките) върху добивите от извънклетъчни ВЗВ PFU, беше проведен експеримент с ротационни бутилки. Клетъчните култури бяха засадени при плътност 80×10^3 клетки /мл в 125 мл ЕВМЕр 10% FCS на ротационна бутилка. Същите бяха доляти до 425 мл с ЕВМЕ или повторно захранени със среда съдържаща SRFE плюс соеви липиди и инфектирани с работна посявка от ВЗВ в 125 ("малък обем") или 425 ("голям обем") мл ЕМЕМ или SRFE хранителна среда (без соеви липиди). Времето за посочените смени на хранителните среди и инфектирането беше както е описано в Пример 7. По различно време преди инфекцията (96 или 24 часа преди инфекцията, или по време на инфекцията) беше добавяна захароза (зах.) с концентрация от 50 мМ. Клетъчните култури, получили захароза преди инфектирането, също получиха захароза във вирусната инфекционна среда. Всички клетъчни култури бяха инфектирани при $\text{MOI}=1:125$ с ВЗВ инфектирани клетки от ЕМЕМ култури и бяха събрани след 46 часа в постинфекционен стабилизатор, съдържащ 20 мМ NH_4Cl (N) или без тази добавка. Всички препарати бяха замразени на -70°C и след това вирусите бяха освободени от клетките или чрез

сонификация или чрез хомогенизиране в Даунс хомогенизатор. Всички препарати бяха пречистени чрез центрофугиране на 1 000g за 10 мин.

PFU резултатите, получени от препарати, които бяха озвучени, дадоха възможност да се направят следните изводи:

1. Използването на "голям" обем хранителна среда EMEM повиши ВЗВ PFU два пъти. В случая със средата SRFE, резултатите от този и други експерименти показаха, че оптимални PFU добиви се постигат с обеми близки до "малкия" обем хранителна среда. В някои случаи, добивите от "големите" обеми на хранителна среда са по-ниски от оптималните.
2. NH_4Cl не е критичен за възстановяване високите стойности на PFU.
3. Захарозата повишава PFU добивите два пъти, когато се използва EBME/EMEM и пет пъти, при SRFE културите. Установихме, че ефекта на захарозата върху PFU, зависи от времето на добавянето и. В една част от този експеримент, PFU добивите бяха 94×10^3 за SRFE плюс соеви липиди/SRFE култури, които не получиха захароза и 296×10^3 , 427×10^3 и 671×10^3 за културите към които беше добавена захароза съответно по време на инфекцията, 24 часа преди инфекцията и 96 часа преди инфекцията.
4. Захарозно третираните култури показаха значително по-малко цитопатични ефекти отколкото съответните култури, които не получиха захароза. В други експерименти, захарозно третираните клетки не показаха дегенеративно цитопатични ефекти дори една седмица след инфекцията, докато контролите без захароза бяха напълно лизирани. Поради това, възможно е захарозно третираните клетки да акумулират повече ВЗВ (антиген и особено PFU) при по-дълги инкубационни времена (повече от 46 часа до събирането на клетките от експеримента с ротационните бутилки).

5. В този експеримент MOI не беше подготвен за високи клетъчни концентрации, поради нарастването на клетките в SRFE хранителна среда. Така, дори по-високи PFU добиви могат да бъдат получени ако този параметър бъде оптимизиран.

ПРИМЕР 9

Добив от извънклетъчни ВЗВ, получен чрез механично разрушаване, сонификация или комбинация от тези методи

Беше проведен голям експеримент, подобен на експеримента описан в Пример 8, при използване на различни множествени условия за продукция на ВЗВ. В този експеримент беше анализиран един нов параметър - начинът на разрушаване на клетките. Резултатите са представени по-долу, като сравнение на добива от извънклетъчни ВЗВ получени чрез хомогенизиране с хомогенизатор на Даунс, сонификация и комбинация от Даунсово хомогенизиране и озвучаване. Описаните условия на култивиране на ВЗВ културите са за клетки отглеждани в минимална хранителна среда (EBME/EMEM) или богата хранителна среда (SRFE-2 плюс соеви липиди/SRFE-2 плюс 50 mM захароза по време на пре-инфекционната фаза). Клетките бяха отглеждани и събирани, както е описано в Пример 8 и ВЗВ PFU/мл беше определяно чрез тестовете описани в Пример 1.

ТАБЛИЦА 4

<u>Извънклетъчни PFU/мл ($\times 10^3$)</u>				
Условия	Даунс	Озвучена Даунсова утайка	Общо	Само озвучена
EBME/EMEM	42	7	49	38
EBME/EMEM	64	4	66	46
SRFE-2/зах	154	47	201	42

От тези данни е очевидно, че значително увеличение на добива от ВЗВ може да се достигне, когато механичното разрушаване на клетките се комбинира и със сонификацията им.

ПРИМЕР 10

Приложение на хранителната среда SRFE-2 и добавката от соеви липиди за постигане на повешено възстановяване на жива варицелна ваксина от MRC-5 клетки

MRC-5 клетки бяха засадени в 25 см² Т-съдове за клетъчно култивиране в EBME и бяха инкубирани за три дни на 35°C. Средата беше премахната и заменена с 12,5 мл свежа EMEM или SRFE среда с 10% FCS, неомецен, глутамин, без или с 1:200 разредени липиди. Културите бяха инкубирани за още 3 допълнителни дни на 35°C. След това средата беше премахната и към клетките бяха добавени ВЗВ инфектирани MRC-5 клетки и 12,5 милилитрови обеми от 2% фетален телешки серум, неомицин и глутамин в EMEM или SRFE-2. Клетъчните култури, отглеждани при условия, означени като "SRFE-2" получиха SRFE-2 по време на клетъчното и вирусното култивиране. "SRFE+липиди" показва препарати култивирани в условия на SRFE-2 среда и 1:200 разредени соеви липиди по време на клетъчното култивиране и само SRFE-2 среда по време на вирусното култивиране. След отглеждане за 48 часа, средата беше премахната, клетките бяха измити 4 пъти с 5 милилитрови обеми PBS и остъргани в 1,2 милилитрови обеми от стабилизатор. Препаратите от дублицирани съдове за култивиране бяха събрани и замразени на -70°C. След последващо размразяване, клетките бяха разрушени чрез озвучаване, пречистени чрез центрофугиране (1 000g за 10 мин) и супернатантите бяха замразени на -70°C за

последващо определяне на вирусните инфекционни титри. Резултатите са показани на фигура 4.

Изводи: Използването на SRFE-2 хранителна среда, вместо ЕМЕМ, доведе до увеличаване от 2,5 пъти на възстановяването на живата варицела. Използването на SRFE-2 хранителна среда, допълнена със соеви липиди по време на клетъчното култивиране, позволи допълнително увеличаване от 2,7 пъти на вирусното възстановяване или общо увеличение от 7 пъти над това, постигнато при използване на ЕМЕМ по време на процеса на вирусно нарастване.

ПРИМЕР 11

Конкурентна ELISA за околичествяване на ВЗВ антигена

Тъй като тестовете по определяне на плаките, образувани от ВЗВ отнема много време, той не се оказва особено подходящ за контрол в рамките на процеса. Една бърза ELISA на ВЗВ антигена позволява измерване на количеството му, което дава възможност да се проследи растежа на вируса по време на производството на жива ваксина. Освен това този тест може да се използва за да се установят количествата на ВЗВ антигена в озвучени и пречистени сборни препарати и дава възможност да се измери антигена в подготвените съдове, съдържащи лиофилизирана ваксина. На кратко този тест се провежда чрез инкубиране на ВЗВ антигена от пробите с анти-ВЗВ серум в разтвор. На останалото свободно антитяло се дава възможност да се свърже с ВЗВ антигена, имобилизиран върху ELISA микротитърни плата. Количеството антитяло, способно да се свърже с платата е обратно пропорционално на количеството антиген в пробите. Количествата на антитялото свързано към платата се определя чрез реакция с ензимно свързано анти човешко

антитяло и подходящ субстрат, така че да се получи оцветен продукт който се околичествява спектрофотометрично.

ELISA теста на ВЗВ и теста по формиране на плаки от ВЗВ по принцип трябва да дадът корелативна информация, но трябва да се има предвид, че количеството на ВЗВ антигена отразява наличието както на нежизнени така и на жизнени ВЗВ. Тъй като имунният отговор предизвикан от убити ВЗВ не е така ефективен, както отговора към жив, атенюиран вирус, опитите по формиране на плаки се явяват критични при определяне на необходимата доза от вирус при приготвянето на ВЗВ ваксини. Все пак, опитът по определяне на антигена е ценен с това, че предлага начин за измерване на тоталния антиген, въвеждан в реципиента на ВЗВ ваксината.

Процедура за тестване:

1. Платата за ELISA бяха покрити с гликопротеини (gps) от ВЗВ инфектирани или неинфектирани MRC-5 клетки и върху това покритие беше нанесен 1% говежди серумен албумин [фракция V, # A-9647, Sigma], 0,1% NaN_3 , за да се намали неспецифичната абсорбция на антитела към плаката. Част от редиците на платата бяха покрити с ВЗВ, а друга част - с контролен антиген (например редици А, С, Е и G получиха ВЗВ гр, а редици В, D, F и H получиха MRC-5 гр антигени).
2. Пречистен (3250g-мин) тестов антиген беше разреден в стабилизатор в 12x75 мм епруветки или микроепруветки. Стандартен вирусен антигенен препарат (26 единици/мл ВЗВ антиген определен чрез "дот-блот" тест) беше разреден 1:10 и след това последователно 1:1,25 пъти, така че да се получат антигенни концентрации от 2,6; 2,1; 1,7; 1,3; 1,1 и 0,9 единици/мл. Допълнителни разреждания могат да бъдат включени, така че да се осигурят 0,7 и 0,5 единици/мл антиген. Тези серии от разреждания бяха използвани за да се

получи стандартна крива за измерване количествата антиген в тестваните препарати.

3. Човешки анти-ВЗВ серум беше разреден в стабилизатор до два пъти от крайното желано разреждане.

4. Триста микролитрови обеми от разредения антиген бяха нанесени в микроепруветките, смесени с 300 мкл разреден анти-ВЗВ серум и инкубирани на 35°C за 15-22 мин. Контролите включваха човешки анти-ВЗВ серум и разредител (без антиген).

5. Сто микролитрови аликвоти от всяка смес от серум и антиген бяха добавени към 2 дуплицирани ямки покрити с ВЗВ гликопротеин (ВЗВ гр) и две дуплицирани ямки, покрити с MRC-5 гр (четири ямки на препарат) (напр.: препарат 1 в колона 1, редици А, В, С и D; препарат 2 в колона 2, редици А, В, С и D и т.н.).

6. Платата бяха инкубирани за 15 мин на 35°C, за да се даде възможност на свободното антитяло (което не е било комплексирано с антигена в разтвор) да се залови за вирусния антиген имобилизиран върху плаката.

7. Несвързаното антитяло беше премахнато чрез промиване и в ямките беше поставено козе анти-човешко IgG, конюгирано с алкална фосфатаза, за да се установи свързаното човешко антитяло.

8. След инкубиране за 15 мин на 35°C, несвързаният конюгат беше премахнат чрез промиване. Свързаният конюгат беше установен чрез инкубиране за 15 мин на 35°C със субстрата р-нитрофенил фосфат, разреден в диетаноламинов буфер.

9. След прекъсване на субстратната реакция чрез добавяне на 50 мкл/ямка от 3 М NaOH, оцветяването (OD при 405 nm) беше околичествено при използване на спектрофотометър за плата.

Пресмятане и интерпретиране на резултатите от теста

1. Съответните дублицирани OD стойности за дублицираните ВЗВ и MRC-5 покрити ямки бяха усреднени. Опитът показва, че MRC-5 OD е почти постоянна величина при различните препарати и разреждания. По тази причина MRC-5 стойностите за цялото плато бяха усреднени и използвани за да се корегира неспецифичното свързване на първото анти тяло или конюгата към екстрактите от неинфектирани клетки. Усреднената MRC-5 стойност беше изваждана от съответните усреднени ВЗВ OD стойности за да се получат ВЗВ специфичните OD (Δ OD) стойности.

2. Построяване на стандартна крива за измерване на антигенните количества:

Стойностите Δ OD за построяване на стандартната крива бяха нанесени спрямо известните антигенни концентрации (единици ВЗВ/мл). Данните бяха заложи в подходяща компютърна графична програма (например Cricket Graph version 1.3, Cricket Software, Malvern PA), беше идентифицирана линейната част от кривата (трябва да включва поне 4 точки) и беше получено уравнението на правата ($y = a + bx$).

3. Изчисляване на антигенните количества в тестваните препарати:

Стойността на y (Δ OD) беше известна, а стойностите за a и b бяха получени от уравнението на правата. Останалата неизвестна стойност x , представляваща единици/мл антиген можеше да бъде изчислена и корегирана за разреждането на препарата, така че да се получи антигенната концентрация в неразредения препарат. Едно общо изчисление на препарата е следното:

Препаратен Разреждане OD ед./мл антиген ед./мл
 антиген
 от уравни. на права корекция за
 разреждане

А 1:2 у $x = (y - a)/b$
 (x)*(фактор на разр.)

Посочената антигенна концентрация е получена при най-малкото
 разреждане на препарата осигуряващо OD стойност в линейната
 част на стандартната крива.

ПРИМЕР 12

ELISA на ВЗВ антигена и сравнение с добива от PFU

Препаратите от извънклетъчни ВЗВ, получени според Пример 7
 и за които добива от PFU/мл е представен на фигура 1, бяха
 тествани чрез ELISA на ВЗВ антигените, както е описано в Пример
 11. Резултатите от тези тестове са представени на фигура 2.

Видно е, че ВЗВ антигенът продължава да нараства при 96
 часа, въпреки че според данните от фигура 1, PFU/мл намалява.
 Видно е също, че нивата на ВЗВ антигена в SRFE-2 с добавка на
 соеви липиди и захароза не се доближава до 16 пътното увеличение
 на антигенното ниво в ЕМЕМ (фигура 2), но все пак нивото на
 живите извънклетъчни ВЗВ PFU/мл е (фигура 1). От това сравнение
 се вижда, че захарозният ефект е основният участник в
 поддържането на живи ВЗВ на 72 час след инфекцията.

ПРИМЕР 13

Увеличаване на нарастването на MRC-5 клетки чрез използване на SRFE-2 хранителна среда и добавка на соеви липиди

MRC-5 клетки бяха засадени в 25 см² Т-съдове за култивиране
 при гъстота 53 000 клетки/мл в 12,5 милилитрови обеми от ЕВМЕ,

10% FCS, 50 мкг/мл неомицин, 2мМ L-глутамин и бяха инкубирани на 35°C. След 2-3 дни средата беше премахната и подменена (смяна 2) с 12,5 мл от свежа среда или SRFE-2 среда, съдържаща 10% FCS, 50 мкг/мл неомицин, 2мМ L-глутамин и различни количества соеви липиди. Неразредените соеви липиди съдържаха 20 мг/мл липиди и 100 мг/мл говежди серумен албумин.

Средата беше премахната на 6-тия ден след първоначалното засаждане на клетките и сменена с 12,5 милилитрови обеми от 2% FCS, 50 мкг/мл неомицин, 2мМ L-глутамин в EMEM или SRFE-2 среда, допълнена с различни количества соеви липиди. Клетките от определени съдове бяха освободени чрез третиране с трипсин и бяха преброени в хематоцитометър. Броят на клетките в останалите съдове беше определен след допълнително култивиране за 2 дни на 35°C, а обобщените резултати от експеримента са представени на Таблица 5.

ТАБЛИЦА 5

Използуване на SRFE хранителна среда и соеви липиди за увеличаване плътността на MRC-5 клетки

	Експеримент 1	Експеримент 2
СРЕДА		
ЕМЕМ (Е)	2,3	1,5
SRFE (S)	4,0	3,8
S + 1:100 липиди	N.D.	7,6
S + 1:200 липиди	7,9	7,6
S + 1:500 липиди	5,9	3,7
S + 1:2 000 липиди	5,0	3,8

Смяна на средата 1 = заменяне на средата с посочения тип среда, допълнена с 10% FCS, 2 до 3 дни след засаждане на клетките.

Смяна на средата 2 = заменяне на средата с посочения тип среда, допълнена с 2% FCS, 6 дни след засаждане на клетките.

N.D. = не е определяно

Закljučения: Използуването на SRFE-2 хранителна среда без липидна добавка доведе до увеличение от около 2 пъти на броя на клетките в сравнение с този, получен при използване на ЕМЕМ. Клетъчният добив беше увеличен още повече, когато се използваше добавка от соеви липиди. Максимални клетъчни добиви бяха постигнати при използване на комбинация от средата SRFE-2 и около 200-400 мкг/мл липиди.

ПРИМЕР 14

Нарастване на WI-38 клетки съгласно метода предложен от настоящето изобретение

WI-38 клетки бяха засяти в 25 см² съдове за клетъчно култивиране при концентрация 53 000 клетки/мл в 12,5 милилитрови обеми от ЕВМЕ, 10% FCS, 50 мг/мл неомицин и 2 mM L-глутамин и бяха инкубирани на 35°C. След два дни средата беше премахната и заменена с 12,5 мл от SRFE-2 с добавка на 50 мг/мл неомицин и 2 mM L-глутамин и 1:200 разредени соеви липиди. Контролните клетки получиха среда без липидна добавка. След 5 дневно култивиране при 35°C, средата беше премахната, клетките бяха отделени от съдовете за култивиране чрез третиране с трипсин и бяха преброени в хематоцитометър. Останалите съдове с клетъчни култури бяха култивирани за още 3 допълнителни дни преди преброяването на клетките. Резюме на получените резултати е представено по-долу:

ТАБЛИЦА 6

Клетъчна линия	Липидна добавка	клетки/съд x 10 ⁻⁶ след	
		5 дни	8 дни
1	-	4,2	4,8
	+	9,5	10,2
3	-	4,1	4,9
	+	9,3	12,5

Заклучение: Добавянето на соев липид към богатата среда за клетъчно култивиране повиши добива от WI-38 клетки около 2 пъти. Следователно, използването на тази клетъчна линия за получаване на ВЗВ се очаква да бъде аналогично на използването на MRC-5 клетките.

ПРИМЕР 15

Метод за преценяване увеличението на растежа на MRC-5 клетки

MRC-5 клетки бяха посяти в 25 см² съдове за култивиране при гъстота около 53 000 клетки/мл в 12,5 милилитрови обеми от Basal Medium Eagle с Earl's Salts (EBME), 10% фетален телешки серум (FCS), 50 мг/мл неомицин сулфат (нео) и 2 mM L-глутамин (Gln). Културите бяха инкубирани на 35°C за три дни за което време клетъчните монослоеви достигаха около 50-70% конфлуентност. Средата беше премахната и подменена с 10 до 12,5 милилитрови обеми от SRFE-2 среда съдържаща 10% FCS, 50 мг/мл нео и 2 mM Glu ± соеви или други липиди и клетките бяха върнати за инкубиране на 35°C.

Преброяването на клетките беше извършвано през различни интервали от време след трипсинизиране на клетките (2,5 мл от 0,25% цитратен разтвор на трипсин) и преброяване в

хематоцитометър. Броят на живите клетки беше определян чрез оцветяване с 0,2% разтвор на трипаново синьо.

Резултатите от преброяването на клетките бяха използвани за определяне на клетъчната концентрация, която на свой ред беше коригирана към крайния обем клетъчна суспензия, за да се получи клетъчният добив от един съдв който са били култивирани клетките.

При някои експерименти, културите бяха поставяни в среда с 2% FCS, 3-4 дни след замяна на средата и броят на клетките беше определян след допълнителна инкубация за около 2 дни.

ПРИМЕР 16

Ефект от продължително експониране на култивирани клетки на липидни добавки

MRC-5 клетки бяха посяти в T25 съдове за клетъчно култивиране, захранени отново след 3 дни (първо захранване) и преброени след още 3 дневен растеж. В допълнителни T25 съдове, клетките бяха оставени да продължат своя растеж чрез повторно захранване $\pm$ (второ захранване), след което клетките бяха оставени да нарастват за още 2 допълнителни дни. След този период, клетките бяха освободени с трипсин. Получените добиви бяха $2,6 \times 10^6$ за клетките посяти в EBME и растящи в EMEM, докато клетките, отглеждани в SRFE-2 плюс 1:100 разредени соеви липиди достигнаха $6,6 \times 10^6$ и $7,7 \times 10^6$. Клетките, нарастваха за още два допълнителни дни дадоха добив $2,7 \times 10^6$ при EBME/EMEM, докато в EBME/SRFE-2 без липидна добавка, добивът беше $9,2 \times 10^6$ и $7,87 \times 10^6$ клетки на T25 съд. Добивът при клетки, растящи в EBME/SRFE-2 + 1:100 соеви липиди, беше $2,48 \times 10^6$ и $2,28 \times 10^6$.

Тези данни показват, че продължителното експониране (около 5 дни след второто захранване) на високи липидни концентрации, може евентуално да доведе до понижени клетъчни добиви, дължащо се вероятно на клетъчна смърт. Следователно, най-общо казано, клетките се захранват с богата хранителна среда без липидни добавки. Това преминаване към богата хранителна среда, без липидни добавки, е особено важно, когато се инициира фазата на вирусен растеж, тъй като липида може да бъде токсичен за него или поддържането на непрекъсната клетъчна жизненост по време на вирусната атака.

ПРИМЕР 17

Ефект на различни липидни концентрации върху клетъчния растеж в богата и минимална хранителна среда

Следвайки същата процедура, както и повторното захранване и околичествяване на клетъчните добиви, описани в Пример 16 за MRC-5 клетъчни култури, бяха получени следните клетъчни добиви (забележка: символите (+) и (-) след описанието на средата показва присъствието или отсъствието на означеното количество соев липид (sl) в мг/мл в средата за второто захранване.

<u>Хранителна среда</u>	<u>Тотални T25 съдове</u>	
	<u>MRC-5 клетъчен добив $\times 10^6$</u>	
	<u>Дни след второто захранване</u>	
	<u>3</u>	<u>5</u>
EBME/EMEM (3 експ.)	4,3; 2,46; 1,52	2,94; 3,50
EBME/SRFE-2	3,80	
EBME/SRFE-2 - 0,4 sl		13,69; 11,09
EBME/SRFE-2 + 0,4 sl	11,7	11,65
EBME/SRFE-2 - 0,2 sl	5,10	8,51; 6,27

EBME/SRFE-2	+	0,2 sl	7,62; 9,7	9,66
EBME/SRFE-2	-	0,1 sl	3,52	
EBME/SRFE-2	+	0,1 sl	4,94	
EBME/SRFE-2	-	0,04 sl	3,10	
EBME/SRFE-2	+	0,04 sl	3,16	
EBME/SRFE-2	-	0,01 sl	2,90	
EBME/SRFE-2	+	0,01 sl	3,82	

Данните резюмирани по-горе съвпадат с наблюденията, посочени в Пример 16, а именно, че продължителното експониране на клетките на високи липидни концентрации не е особено ефективно, въпреки че токсичният ефект, посочен в Пример 16, е по-слабо изразен при тези резултати. При по-ниски липидни концентрации, по-продължителното експониране на клетките на липид е по-малко вредно и може да бъде полезно за повишаване на клетъчния добив на cm^2 от растителната повърхност.

ПРИМЕР 18

Ефект на концентрацията на фетален телешки серум върху добива на клетки

В този експеримент беше изследван ефектът на добавянето на 2% или 10% фетален телешки серум в присъствието на липидни добавки. MRC-5 клетките бяха засяти в EBME, повторно захранени 3 дни по-късно с SRFE-2, към която бяха добавени различни количества соеви липиди и бяха захранени отново 2 дни по-късно с SRFE-2 със същата концентрация липид, както в първото захранване. Клетъчните добиви в 10% фетален телешки серум бяха $9,5 \times 10^6$, $11,3 \times 10^6$ и $12,2 \times 10^6$ за култури към които беше добавен съответно 0,1, 0,2 и 0,4 мг/мл липид. Когато беше използван 2%

FCS, добивите на клетките бяха съответно $6,5 \times 10^6$, $8,8 \times 10^6$ и $3,2 \times 10^6$.

Този експеримент показва полезният ефект върху растежа на клетките, предизвикан от добавянето както на фетален телешки серум, така и на липид. Какъвто и токсичен ефект да имат върху клетките повишените липидни концентрации, този ефект се елиминира при добавянето на достатъчни количества фетален телешки серум.

ПРИМЕР 19

Ефекти на различните липидни добавки върху растежа на MRC-5 клетки

MRC-5 клетки бяха посяти в T25 съдове за култивиране при използване на EBME. На третия ден клетките бяха захранени повторно със среда SRFE-2, съдържаща 10% фетален телешки серум, към която бяха добавени различни количества липиди. Соев липид от Buehringer Mannheim, липиди богати на холестерол от говежди серум (Sigma), EX-CYTE I или говежди липопротеин с много ниско съдържание на ендотоксин (VLE) на Miles/Pente бяха добавени в указаните концентрации. Броят на клетките, при повторното захранване, в милиони беше 1,19. След 5 дни клетките бяха преброени отново. Клетките в EMEM бяха $2,97 \times 10^6$; в SRFE-2 или SRFE-2 плюс 0,4 мг/мл, 0,2 мг/мл или 0,1 мг/мл соев липид, бяха съответно $4,83 \times 10^6$, $10,44 \times 10^6$, $8,67 \times 10^6$ и $8,04 \times 10^6$. Добавянето на EX-CYTE I при 1:50, 1:100 и 1:200, доведе до получаването съответно на $5,37 \times 10^6$, $4,80 \times 10^6$ и $4,74 \times 10^6$ клетки. Добавянето на EX-CYTE VLE при разреждания от 1:25, 1:50 и 1:100, допринесе за получаването съответно на $5,49 \times 10^6$, $7,23 \times 10^6$ и $7,92 \times 10^6$ клетки. Броят на клетките, към които бяха добавени липиди с високо

съдържание на холестерол (Sigma) при разреждания 1:25, 1:50, и 1:100, беше съответно $6,87 \times 10^6$, $7,56 \times 10^6$ и $7,65 \times 10^6$.

Най-голямо повишение на клетъчния добив беше наблюдавано при добавяне на соеви липиди от Boehringer Manneheim, въпреки че EX-CYTE VLE и липидите от Sigma бяха почти толкова ефективни. Следователно ефекта на увеличение не е уникален за соевия липид

ПРИМЕР 20

Увеличение на растежа на MRC-5 клетки при използване на високи концентрации соев липид

MRC-5 клетки бяха посяти в 25 cm^2 съдове за култивиране и бяха захранени на ден 3 и 6, както е описано в Пример 13. Добивът от клетките на 6-тия ден за EBME/EMEM, SRFE-2 плюс 1/100 соеви липиди или SRFE-2 плюс 1/50 соеви липиди бяха съответно $4,3 \times 10^6$, $9,7 \times 10^6$ и $11,7 \times 10^6$. Клетъчната преживяемост беше $> 99\%$ (определена чрез оцветяване с трипаново синьо) за всички култури. Средата беше сменена с нова, със или без соев липид и клетките бяха инкубирани за 2 допълнителни дни, след което бяха определени добивите. Клетъчните добиви на култивационен съд бяха $2,9 \times 10^6$ и $3,5 \times 10^6$ за дуплицираните култури EBME/EMEM, $11,65 \times 10^6$ – за SRFE-2 плюс 1/50 соев липид, докато културите (дуплицирани) отглеждани в SRFE-2 плюс 1/50 соев липид и захранени със същата хранителна среда без соев липид дадоха $13,69 \times 10^6$ и $11,09 \times 10^6$ клетки, $9,66 \times 10^6$ за SRFE-2 плюс 18100 соев липид и повторно захранените със същата среда без липид (дуплицирани) даде $8,51 \times 10^6$ и $6,27 \times 10^6$.

От този експеримент става ясно, че добивите при MRC-5 клетките се повишават с увеличаване количествата на соевия липид. Максимални клетъчни добиви бяха получени при използване

на разреждания на соевия липид от 1:50 (най-високата тествана концентрация). Включването на липиди във втората хранителна среда, води до умерено повишаване на клетъчния добив. Обаче, данните показват, че максималният добив може да бъде получен при използването на 1/50 липид в първата среда за захранване. В такъв случай, липидната добавка може да бъде пропусната във втората среда за захранване. Тъй като високите концентрации на липидите могат да бъдат вредни за развитието на вирусите, може да се окаже желателно да се пропуска липида в средата която се използва във фазата на вирусния растеж.

Патентни претенции

1. Метод за получаване на жива ваксина от варицела зостер вирус (ВЗВ), който включва следните етапи:

а/ култивиране на клетки, податливи на инфектиране с ВЗВ, селектирани от човешки диплоидни клетки, до конfluентност в монослойна култура, в условия на достатъчно богато подхранване, за да се получи висока степен на клетъчна репликация и с добавки на неметаболически дизахарид;

б/ инфектиране на клетките, култивирани съгласно етап (а) в момент, който е възможно най-близък до точката на конfluентност, с ВЗВ-инфектирани клетки при практически възможно най-високата множественост на инфекцията;

в/ поддържане на културата, инфектирана с ВЗВ в състояние на богато хранене за около 22-96 часа и събиране на клетките в момента на максимално продуциране на инфекциозен ВЗВ;

г/ промиване на културата, инфектирана с ВЗВ, с физиологичен разтвор, обикновено съдържащ лизозотропен агент, като амониев хлорид или хлорокин, преди събиране на клетките, инфектирани с ВЗВ;

д/ събиране на клетките, инфектирани с ВЗВ, в минимален обем от стабилизиращ разтвор, като клетките се разрушават веднага или се замразяват за по-късно разрушаване;

е/ разрушаване на клетките, инфектирани с ВЗВ, с цел оптимално освобождаване на интерцелуларният ВЗВ и отстраняване на клетъчните остатъци, за да се получи препарат от екстрацелуларен ВЗВ.

2. Метод за получаване на жива, атенюирана ваксина от екстрацелуларен ВЗВ, който обхваща следната последователност от етапи:

а/ култивиране на клетки, податливи на инфектиране с ВЗВ, до състояние на конfluентност, като споменатото култивиране обхваща: фаза на посяване на клетките; фаза на клетъчен растеж или в толкова голям обем от хранителна среда, колкото е подходящо от практическа гледна точка, или в по-малък обем от богата хранителна среда и пре-инфекционна фаза, състояща се от експониране на клетките на нетоксичен, неметаболичен дизахарид;

б/ инфектиране на клетките, култивирани съгласно етап (а) в момент, който е възможно най-близък до точката на конfluентност, с атенюиран ВЗВ-инфектирани клетки при практически възможно най-високата множественост на инфекцията;

в/ поддържане на културата, инфектирана с ВЗВ, в голям обем минимална хранителна среда или в по-малък обем богата хранителна среда за около 22-96 часа до точката на максимална продукция на ВЗВ;

г/ промиване на културата, инфектирана с ВЗВ, с физиологичен разтвор, съдържащ лизозомотропен агент, преди събиране на клетките;

д/ събиране на клетъчната култура, инфектирана с ВЗВ, чрез: отстраняване на течността; добавяне на минимален обем стабилизиращ разтвор, остъргване или освобождаване по химичен път на клетките, инфектирани с ВЗВ и възможно замразяване на освободените клетки, инфектирани с ВЗВ, при -70°C ;

е/ разрушаване на освободените клетки, инфектирани с ВЗВ, до оптимално освобождаване на интерцелуларният ВЗВ, премахване на клетъчните остатъци и евентуално лиофилизиране на екстрацелуларните ВЗВ или съхраняването им в течна замразена форма.

3. Метод съгласно претенция 1, където клетките, податливи на инфектиране с ВЗВ, са MRC-5, атенюираният ВЗВ е от щам Ока на варицела зостер вирус, температурата на култивиране е между $30-37^{\circ}\text{C}$, дизахаридът е захароза, добавена в концентрация около 20-60 mM, температурата на

култивиране е около 35°C, множествеността на инфекцията е между 1:25 и 1:625, лизозомотропният агент е амониев хлорид, добавен в концентрации около 20-50 mM или хлороквин, в концентрация около 230 мкМ.

4. Метод съгласно претенция 3, където богатата хранителна среда е SRFE-2, евентуално допълнена с около 0,02 - 0,4 мг/мл соеви липиди, като вирусът се освобождава от клетките чрез сонификация или хомогенизиране с хомогенизатор на Даунс или и по двата начина.

5. Метод за получаване на жива, атенюирана ваксина от екстрацелуларен варицела зостер вирус (ВЗВ), който обхваща следната последователност от етапи:

а/ култивиране на MRC-5 клетки до конfluентност, където това култивиране се състои от: фаза на клетъчно посяване в EBME; фаза на клетъчен растеж в SRFE-2, към която са добавени около 0,2 мг/мл соеви липиди, която започва около 3 дни след посяването; и пре-инфекционна фаза, състояща се от експониране на MRC-5 клетките на 20 - 50 mM захароза за около 24 - 96 часа;

б/ инфектиране на клетките, култивирани съгласно етап (а), в момент, когато те са максимално близко до точката на конfluентност с толкова висока множественост на инфекцията с инфектираните с атенюиран ВЗВ MRC-5 клетки, колкото е подходяща от практическа гледна точка;

в/ поддържане на ВЗВ инфектирана култура за около 37-96 часа и събиране на клетките в точката на максимална продукция на ВЗВ;

г/ промиване на културата с фосфатнобуферен физиологичен разтвор, с евентуално добавени 1 - 100 mM NH_4Cl или хлороквин;

д/ събиране на ВЗВ-инфектираните MRC-5 клетки чрез: премахване на течността; добавяне на минимален обем стабилизатор, евентуално съдържащ 1 - 100 mM NH_4Cl или хлорокин около 230 мкМ; остъргване на клетките или освобождаването им по химичен път и евентуално замразяване на освободените клетки, инфектирани с ВЗВ, при -70°C;

е/ разрушаване на освободените клетки, инфектирани с ВЗВ чрез хомогенизиране с хомогенизатор на Даунс, утаяване на клетъчните остатъци и запазване на супернатантата; сонификация на утайката и повторно утаяване и комбиниране на супернатантите от последните два етапа;

ж/ разреждане на продукта от стъпка (е) в стабилизатор и разфасоване на продукта в единични дози за лиофилизиране и съхранение на 4°C или по-ниски температури, така че да се пада по не по-малко от 1 000 PFU на единична доза по времето, когато ще бъдат употребявани.

6. Метод за култивиране на клетки в монослой, който се състои от следната последователност от етапи:

а/ посяване на клетките в съд за култивиране в минимална или богата хранителна среда и оставяне на клетките да растат около 24 - 72 часа;

б/ премахване на средата от културата от етап (а) и заместването ѝ с нова, богата хранителна среда, допълнена с оптимизирана концентрация на липиди и евентуално включване на серумна добавка;

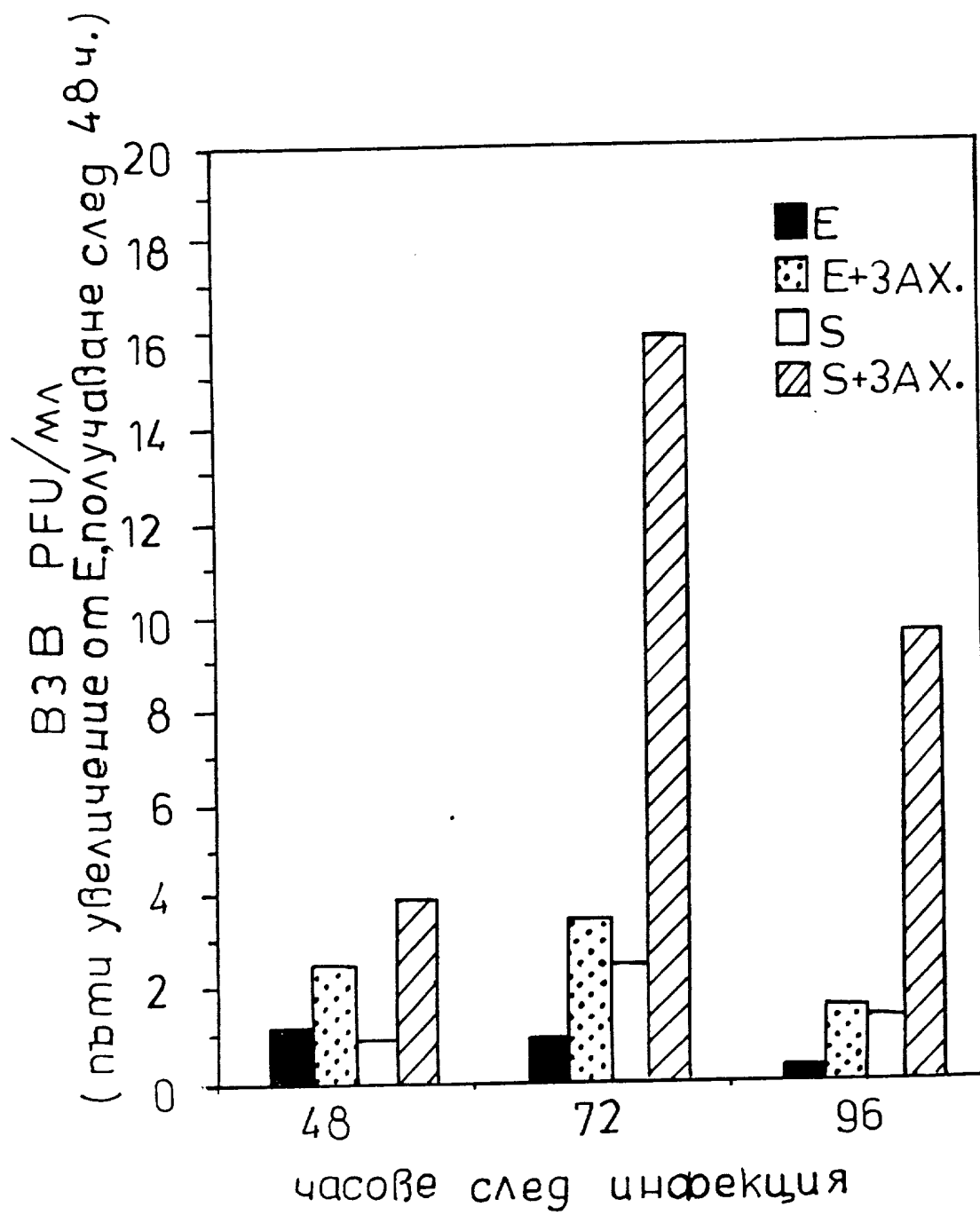
в/ отглеждане на клетъчната култура в богата хранителна среда, допълнена с липиди;

г/ евентуално заменяне на средата от етап (в) с нова среда, не съдържаща липидни добавки, след около 24-72 часа.

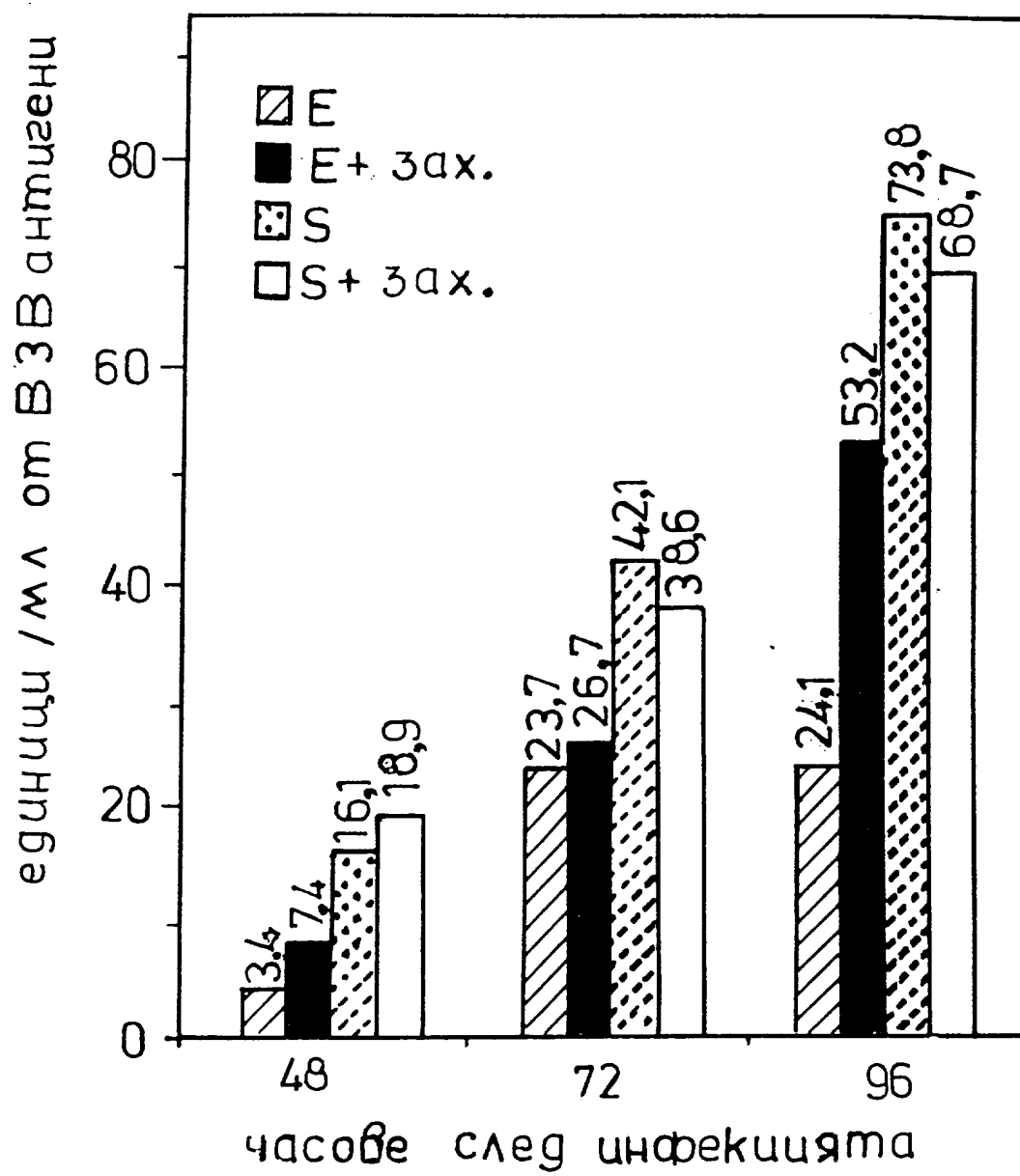
7. Метод съгласно претенция 6, при който богатата хранителна среда е SRFE-2, евентуално снабдена с фетален телешки серум, като липидната добавка е между 0,02 мг/мл и 0,4 мг/мл и клетките са MRC-5, WI-38 или Vero клетки.

8. Състав за отглеждане на клетки в монослойна култура, който се състои от хранителна среда SRFE-2, в която са добавени около 0,02 - 0,4 мг/мл липиди.

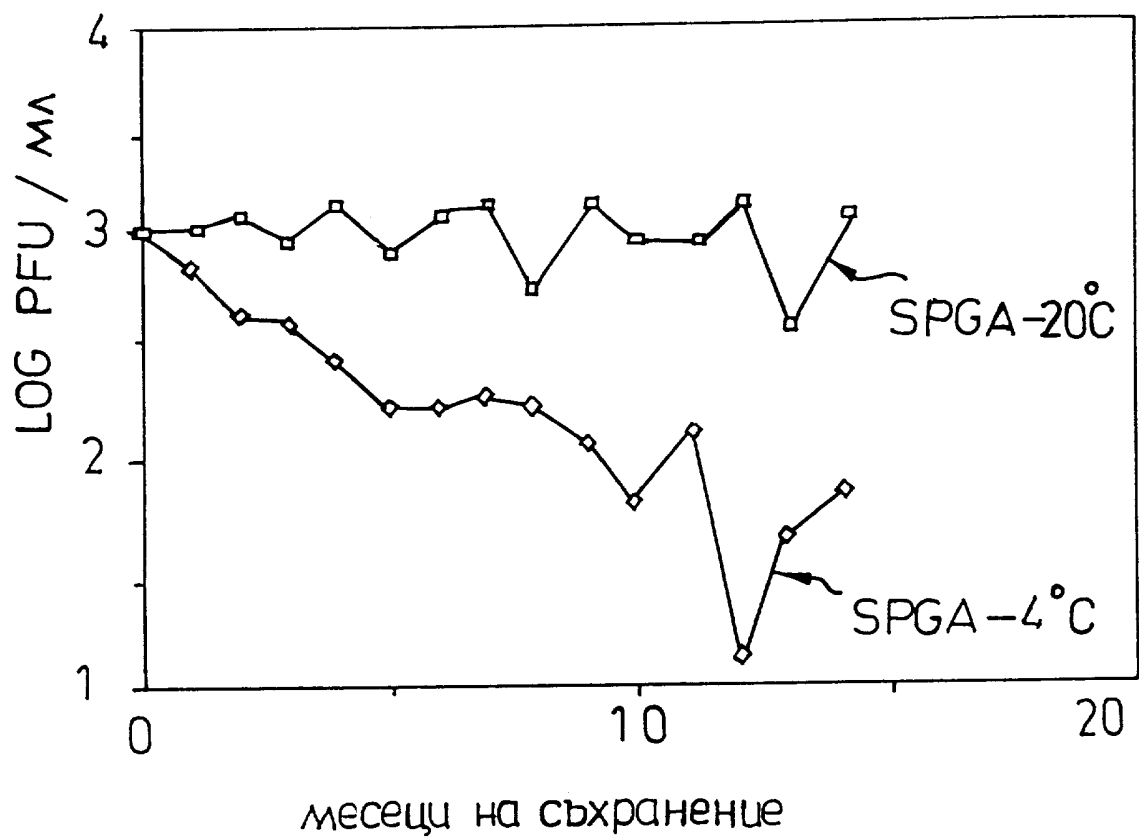
ПРИЛОЖЕНИЕ: 5 ФИГУРИ



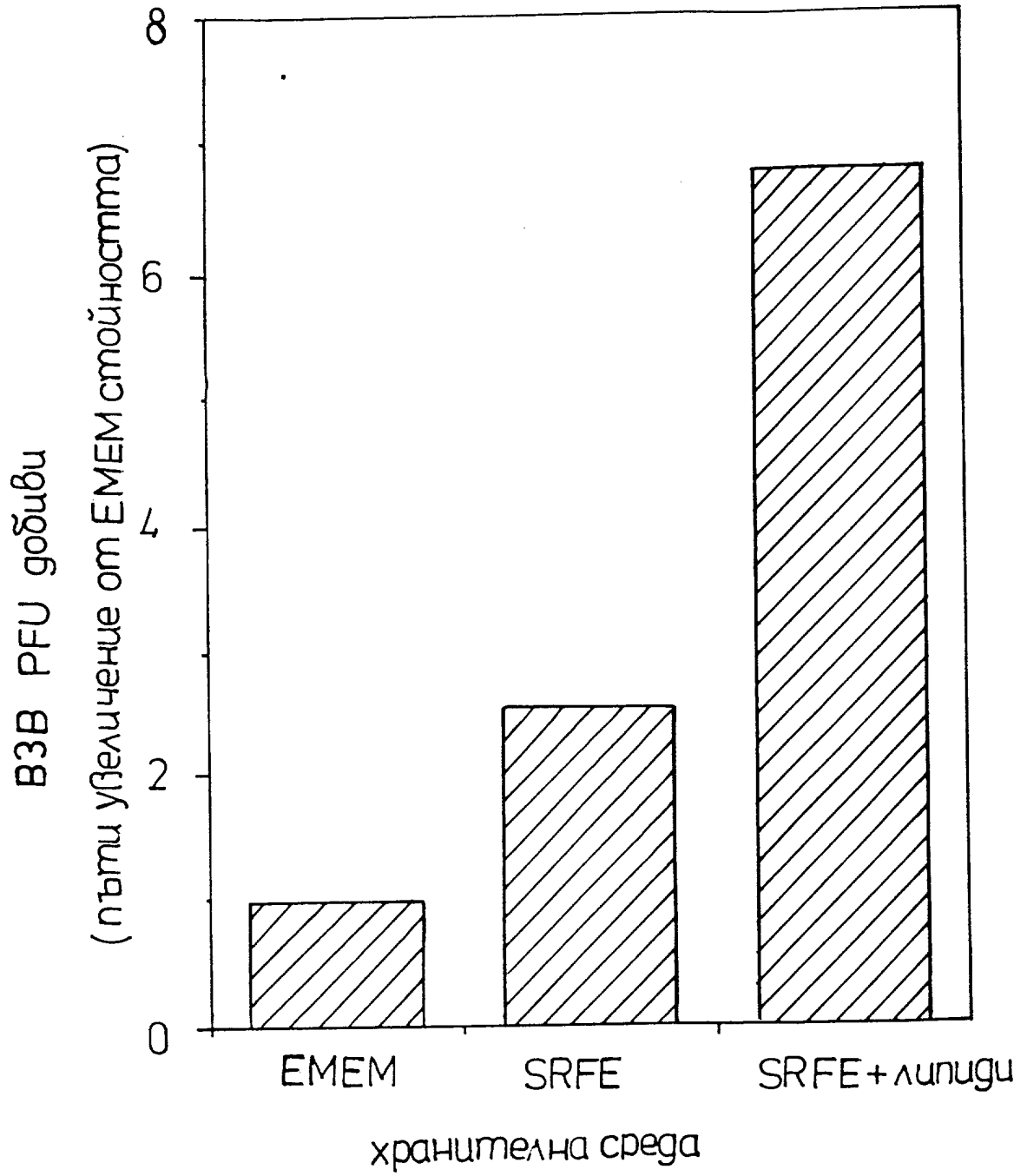
фиг. 1



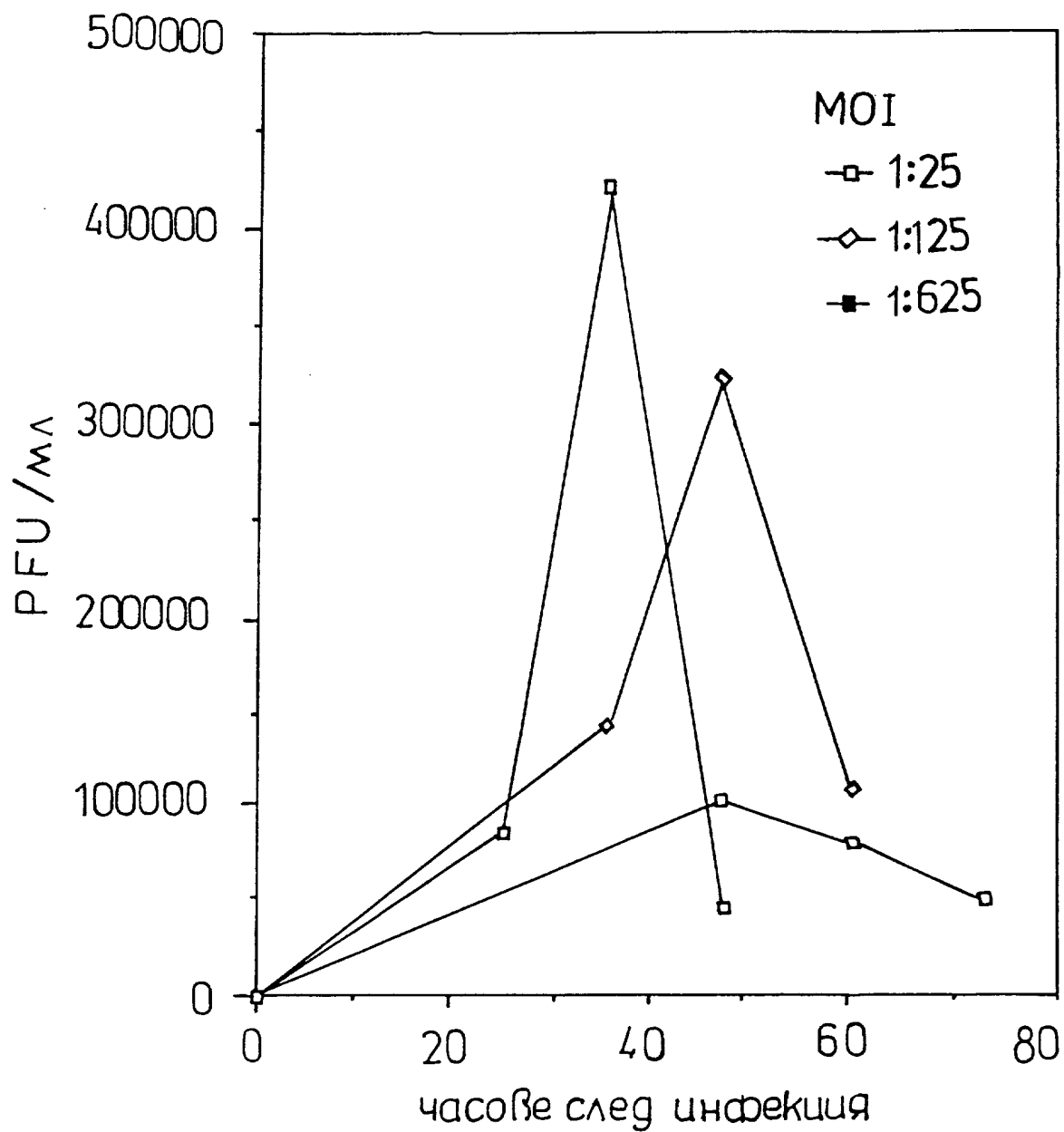
ФИГ. 2



ФИГ.3



фиг. 4



ФИГ.5

Издание на Патентното ведомство на Република България
1113 София, бул. "Д-р Г. М. Димитров" 52-Б

Експерт: Ст. Стефанова

Пор. № 39493

Тираж: 40 ЗС