



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

224511

(II) (B1)

(22) Přihlášeno 03 12 81
(21) (PV 8950-81)

(51) Int. Cl.³
A 61 K 35/76

(40) Zveřejněno 25 03 83

(45) Vydáno 15 12 85

(75)
Autor vynálezu

KUTINOVÁ LUŽA RNDr., HIRSCH IVAN RNDr. CSc.,
VONKA VLADIMÍR MUDr. DrSc., PRAHA

(54) Způsob odstranění desoxyribonukleové kyseliny ze subvirové vakcíny proti viru herpes simplex

Vynález se týká přípravy subvirové vakcíny proti viru herpes simplex. Řeší odstranění desoxyribonukleové kyseliny (DNK) z antigenních směsí připravených z buněk infikovaných virem herpes simplex (HSV).

Vzhledem k tomu, že jak HSV, tak sama virová DNK jsou schopny vyvolávat nádorovou transformaci buněk, je nepřítomnost desoxyribonukleové kyseliny v preparátu jedním ze základních požadavků na subvirovou vakcínu proti viru herpes simplex. Pro odstraňování DNK z vyvíjených HSV subvirových vakcín se v cizině prozatím používá ultracentrifugace v gradientech CsCl nebo sacharózy v kombinaci s opracováním preparátů enzymem desoxyribonukleázou (DNázou) a formaldehydem (Cappel, 1976, Arch. Virol. 52, 29-35; Cappel a spol. 1978, Dev. Biol. Standard. 43, 381-385; Cappel a spol., 1980, Arch. Virol. 65, 12-23; Conard a spol. 1980, Internat. Confer. Human Herpesviruses, Atlanta, USA; Kitces a spol., 1977, Infect. Immun. 16, 955-960; Lehman a spol., 1980, Internat. Confer. Human Herpesviruses, Atlanta, USA; Salerno a spol., 1980, Internat. Confer. Human Herpesviruses, Atlanta, USA; Skinner a spol., 1978, Med. Microbiol. Immunol. 166, 119-132; Skinner a spol., 1980, Med. Microbiol. Immunol. 169, 39-51; Thomson a spol., 1980, Internat. Confer. Human Herpesviruses, Atlanta, USA).

Ultracentrifugace v hustotních gradientech je nevýhodná kvůli nutnosti dlouhodobé centrifugace a velkých ztrát v důsledku nehomogenity preparátů a inaktivace antigenů centrifugačním médiem. Opracování DNázou u subvirových preparátů obsahujících větší množství DNK v našich pokusech nikdy nevedlo k úplnému odstranění frakce DNK nerozpustné v kyselinách.

Vzhledem k tomu, že pro přípravu vakcíny by bylo nutno používat DNázy čištěné a tedy dražší, vedlo by to k podstatnému zvýšení výrobních nákladů. Použití samotného formaldehydu bez desoxyribonukleázy je sporné, neboť kontrola likvidace biologické aktivity DNK pomocí formaldehydu je dlouhodobá a značně nestandardní.

224511

Výše uvedené nedostatky jsou odstraněny užitím kombinace rychlostní centrifugace a afinitní chromatografie. Při rychlostní ultracentrifugaci sedimentuje většina DNK do peletu, zatímco antigen zůstává v supernatantu. DNK zbývající v supernatantu je z preparátu odstraněna při afinitní chromatografii na sloupci gelu tvořeného kuličkami CNBr-aktivované agarózy s navázaným lektinem (velikost kuliček 60 až 140 μm , agarózová koncentrace 4%, koncentrace vázaného lektinu 2 až 8 mg/ml gelu). V několika pracích bylo využito vazebnosti glykoproteinových antigenů HSV na lektin pro izolaci glykoproteinů (Lehman a spol., Salerno a spol., Thomson a spol., - 1980, Internat. Conf. Human Herpesviruses, Atlanta, USA; Zwernik a spol., 1981, Infect. Immun. 31, 267 až 275). Zjistili jsme, že za stejných podmínek DNK s lektinem ani s agarózou neresaguje a kolonou volně protéká.

Použití rychlostní centrifugace je výhodnější než ultracentrifugace v hustotních gradientech z důvodů časových a ekonomických (menší opotřebování centrifug, nižší spotřeba energie, nižší ztráty antigenů). Vzhledem k tomu, že lektin vázaný na agarózu je používán při další izolaci protektivních antigenů (které jsou glykoproteinové povahy), lze odstranění DNK docílit pouhým důkladným proplachováním sloupce gelu s vázanými glykoproteiny acetatovým pufrům bez použití dalších chemikálií nebo procedur. Náplň kolony je možno mnohonásobně regenerovat.

Popis konkrétního provedení

Extrakty připravené z buněk infikovaných HSV jsou zbaveny buněčných jader nízkoobrátkovou centrifugací a pak centrifugovány při 60 až 150 000 x g při 0 až 10 °C 1 až 2 hod. (s výhodou 1 hod. při 100 000 x g a 4 °C). Supernatanty se opatrně odeberou, přičemž se nad sedimentem nechává 1/12 objemu původního materiálu, aby se vyloučila možnost kontaminace supernatantu sedimentovanou DNK. Antigenní směs, která po tomto zpracování obsahuje 0,2 až 1 % DNK, se 1/2 až 5 hodin inkubuje při pokojové teplotě nebo při 0 až 10 °C s agarózou s vázaným lektinem (buď na koloně nebo sádkově).

Po skončení inkubace se z gelu připraví kolona, která se při uvedených teplotách důkladně propláchne acetatovým pufrům pH 5,5 až 6,5 (s výhodou pH 6,0) obsahujícím 0,2 % Triton X 100. Objem vyplachovacího pufru závisí na množství DNK zbylé po ultracentrifugaci. Běžně se používá 5 až 20 ml acetatového pufru na 0,1 ml gelu. Glykoproteinová směs, která je v další fázi uvolňována z lektinu pomocí α -metyl manosidu nebo jiného cukru, je prostě DNK. Účinnost procedury se monitoruje na paralelním vzorku, ve kterém byla DNK HSV označena ³H-thyminem.

Uvedený postup je použitelný obecně pro přípravu jakékoliv subvirové vakcíny (připravené buď rozštěpáním viru nebo infikovaných buněk), která má být prostě virové DNK a u které jsou protektivní antigeny glykoproteinové povahy.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob odstraňování desoxyribonukleové kyseliny ze subvirové vakcíny proti viru herpes simplex vyznačený tím, že se antigenní extrakty 1 až 2 hodiny, s výhodou 1 hod. ultracentrifugují při 60 až 150 000 x g, s výhodou 100 000 x g a teplotě 0 °C až 10 °C a supernatanty zbavené centrifugací většiny DNK se inkubují s gelem tvořeným kuličkami CNBr-aktivované agarózy s navázaným lektinem při velikosti kuliček 60 až 140 μm , agarózové koncentraci 4 % hm. a koncentraci vázaného lektinu 2 až 8 mg/ml gelu, přičemž se DNK z kolony odstraní acetatovým pufrům pH 5,5 až 6,5.