



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

(61)

(23) Výstavná priorita

(22) Prihlášené 14 06 82

(21) PV 4381-82

(40) Zverejnené 13 01 84

(45) Vydané 01 04 86

230 757

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.³ C 12 N 11/12,
C 12 M 3/04

(75)

Autor vynálezu

VEBER PAVEL RNDr. CSc.,
KUNIAK ĽUDOVÍT ing. CSc.,
SZANTÓ JÁN MUDr. DrSc.,
HÁNA LADISLAV ing. CSc.,

ANTAL MIROSLAV prom.chem. CSc., BRATISLAVA,
BENEŠ MILAN ing. CSc., PRAHA

(54)

Spôsob pestovania buniek in vitro na celulóзовých mikronosičoch

Predmetom vynálezu je pestovanie živočišných buniek na mikronosičoch aminoderivátov celulózy v guľčikovej forme tak, že aminoderivát celulózy typu dietylaminoetylcelulózy, dietylamino-2-hydroxypropylcelulózy, alebo trimetylamónium-2-hydroxypropylcelulózy vo forme guľčiek o veľkosti 70 až 300 μm sa použije ako pevný nosič, na ktorom sa pestované bunky prichytávajú vo forme monovrstvy. Možno pracovať suspenznou technikou, prípadne rolerovou technikou. Optimálna výmenná kapacita aminoderivátu je okolo 1,0 mekv/g.

Vynález má využitie v humánnej a veterinárnej medicíne pri diagnostike roznych ochorení, resp. pri príprave roznych biologicky aktívnych látok.

230 757

Vynález sa týka spôsobu pestovania buniek in vitro na mikronosičoch aminoderivátov celulózy.

Metóda pestovania bunkových kultúr sa používa jednak pri štúdiu základných otázok v biologicko-lekárskejších a veterinárnych oboch ako sú napr. diagnostika vírusových ochorení ľudí a zvierat, ako aj pri priemyselnej výrobe rôznych biologicky aktívnych látok, ako sú napr. ľudské a zvieracie vírusové vakcíny, interferóny, hormóny, enzýmy, nukleové kyseliny a iné.

Pri priemyselnej príprave biologicko aktívnych látok je potrebné napestovať obyčajne veľké množstvo bunkového substrátu. K týmto účelom boli vypracované rôzne laboratórne techniky pestovania buniek (kultivácia buniek v suspenzii ; pestovanie buniek rolerovou technikou; pestovanie buniek stacionárne na povrchu kultivačných nádob) ako aj zariadenia pre veľkokapacitné pestovanie buniek. Najefektívnejšia technika veľkokapacitného pestovania buniek in vitro je rast buniek v suspenzii. Týmto spôsobom vo vhodných zariadeniach je možné získať viac ako tisíc litrov bunkovej suspenzie. Všetky bunkové kultúry však nie je možné adaptovať na pestovanie v suspenzii. Na tento spôsob pestovania je možné adaptovať napr. bunky L (stabilná bunková línia myších fibroblastov), bunky Hela (ľudské bunky karcinómu krčka maternice), bunky BHK (stabilná bunková línia z obličiek sýrskeho škrečka) a ďalšie. Väčšinou sa jedná o bunkové kultúry so zmenenou sadou chromozómov, ktoré často pri injekčnej aplikácii spôsobujú u experimentálnych zvierat nádory.

Niektoré bunkové kultúry nie je možné adaptovať na rast v suspenzii, lebo potrebujú k svojmu deleniu vhodný kultivačný povrch, na ktorý sa prichytia a vytvárajú tu bunkovú jednovrstvu. Väčšinou sa jedná o primárne bunky získané z orgánov, tkanív, alebo celých embryí rôznych živočíchov (napr. primárne kuracie embryonálne bunky; primárne embryonálne myšie bunky) a diploidné bunky, ktoré majú diploidný počet chromozómov, napr. bunky LEP (diploidné bunky získané z pľúc ľudského embrya) a ďalšie. Tieto bunkové kultúry sa veľkokapacitne pestujú stacionárnou technikou vo veľkých sklenených kultivačných nádobách (napr. Roux flaše 1 200 ml a 2 000 ml) a niektoré je možné pestovať vo valcovitých nádobách na ktorých sa bunková jednovrstva vytvára po celej cylindrickej ploche horizontálne sa otáčajúcej valcovitej nádoby (rollerova technika); van Wetzel [Nature 216, str. 64-65, (1967)] ako prvý použil pre rast primárnych a diploidných buniek mikronosiče DEAE Sephadexu A 50.

Princípom pestovania buniek na mikronosičoch je rast a vytváranie bunkovej jednovrstvy na mikroguličkách, ktoré sa obvykle miešajú v kultivačnom médiu v špeciálnych suspenzných fľašiach alebo fermentoroch. Priemer mikroguličiek sa väčšinou pohybuje od 100 až 300 μm . Výhodou tohto spôsobu pestovania je to, že mikroguličky na ktorých sa bunky množia majú veľkú kultivačnú plochu, čo dovoľuje získať veľké množstvo buniek v malom objeme kultivačného média. (3 mg mikronosičov Cytodex 1 1 ml média má plochu 30 cm^2 ; 1 g mikronosičov Cytodex 1 v 1 000 ml kultivačného média má plochu ako 327 Petri misiek o priemere 10 cm, alebo ako 21 rollerových kultivačných nádob 1 000 ml).

Pri pestovaní buniek na mikronosičoch v suspenzii sa získa 2 až 4 krát väčšie množstvo buniek ako pri pestovaní buniek stacionárnou technikou. Pestovanie buniek na mikronosičoch znižuje prácnosť pri veľkokapacitnom pestovaní buniek, nároky na prípravu sterilného kultivačného skla, nároky na médium, a tiež znižuje možnosti kontaminácie buniek. N.A. de Bruyne, B.J. Morgan [Amer. Lab. 35, 251 (1981)] uvádzajú súčasných výrobcov mikronosičov.

Výrobca	Krajina	Firemné označenie	Zloženie	Priemer mikronosičov μm
Bio-Rad	USA	Bio-Carriers	polyakrylamid	120 - 180
Flow Labs	USA	Superbead	DEAE-Sephadex (dietylamino-etyl-dextran)	135 - 205
Lux	USA	Cytospere	modifikovaný polystyrén	160 - 230
NUNC	Dánsko	Biosilon	modifikovaný polystyrén	160 - 300
Pharmácia	Švédsko	Cytodex	modifikovaný Sephadex (dietylamino-etyl-dextran)	160 - 230

Ceny uvádzaných komerčných mikronosičov sú veľmi vysoké, čo je ich hlavná nevýhoda, ktorá obmedzuje ich širšie priemyselné aplikácie. Tieto nedostatky odstraňuje pestovanie buniek podľa vynálezu.

Podstata vynálezu spočíva v tom, že ako mikronosiče pre pestovanie buniek sa používa guľčková forma aminoderivátov celulózy typu dietylaminoetylcelulózy, alebo dietylamino-2-hydroxypropylcelulózy alebo trimetylamónium-2-hydroxypropyl celulózy s výmennou kapacitou 0,3 až 1,5 mekv/g s veľkosťou častíc 70 až 300 μm .

Mikroguľčičky aminoderivátov celulózy pripravené podľa A.O. č.

212 131 sa premývajú cez nerezové sito z polyamidovej tkaniny o veľkosti pórov 70 až 350 nm. Takto sa získa frakcia mikroguľčičiek o veľkosti 70 až 350 μm . V sklenenej posilikónovanej nádobe sa frakcia premyje fosfátmi pufrovaným roztokom podľa R. Dulbecca (Proc. Nat. Acad. Sci. 38, 747, 1952) - roztok PBS-A v množstve 100 až 300 ml/g mikroguľčičiek. Po sedimentácii mikroguľčičiek na dno nádoby sa roztok odsaje a opätovne sa pridá roztok PBS-A v množstve 30 až 50 ml/g mikroguľčičiek. Potom sa mikroguľčičky sterilizujú autoklávaním pri 120 °C po dobu 20 minút. Pred použitím mikroguľčičiek na pestovanie buniek sa roztok PBS-A odsaje a pridá sa kultivačné médium zohriate na teplotu 37 °C v množstve

30 až 50 ml/g mikroguličiek. Mikroguličky sa v kultivačnom médiu premiešajú a nechajú sa usadiť na dno nádoby. Kultivačné médium sa odsaje a opätovne sa pridá rovnaké kultivačné médium v množstve 10 až 20 ml/g mikroguličiek. Takto pripravené sterilné mikroguličky sa použijú na pestovanie buniek suspenznou technikou, rolervou technikou, alebo na pestovanie buniek na mikronosičoch v kolóne, kde mikroguličky sú vo vznose perfúziou kultivačného média alebo plynu, obvykle 95 % vzduchu a 5 % oxidu uhličitého.

Bunkové kultúry sa pestujú na mikronosičoch aminoderivátov celulózy v kultivačných médiách pozostávajúcich z anorganických solí, aminokyselín, vitamínov, koenzýmov ako napr. Bazálne Eaglovo médium, minimálne esenciálne Eaglovo médium, médium RPMI 1640, médium CMRL 1969, médium 1999, médium Leibovitz 15, médium NTC 109 a ďalšie. Médium sa dopĺňa živočišnými sérami ako napr. telacím inaktivovaným sérom, fetálnym boviným sérom, kuracím sérom a pod. v koncentrácii 1 až 20 %. V niektorých prípadoch sa dopĺňajú médiá bielkovinnými hydrolyzátmi ako napr. laktábumínhydrolyzát, sojový peptón, kvasničný autolyzát a ďalšie. Kultivačné médiá majú optimálne pH v rozmedzí 7,0 až 7,6, osmomolalitu 260 až 350 mOsm/kg. Teplota pri kultivácii kultúr na mikronosičoch aminoderivátov celulózy sa pohybuje v rozmedzí 35 až 40 °C, podľa druhu bunkových kultúr. V niektorých prípadoch sa používa atmosféra 95 % vzduchu a 5 % oxidu uhličitého.

Príklad 1

Do suspenznej fľaše s magnetickým miešadlom o objeme 500 ml sa pridá 150 ml Bazálneho Eaglovho média s 10 % hmotnostnými traptózu fosfátového bujónu a s 10 % hmotnostnými inaktivovaného telacieho séra a 5 g mikronosiča guľčkovvej dietylaminoetylcelulózy o veľkosti častíc 70 až 300 μm a s výmennou kapacitou 0,3 mekv/g. Potom sa inokuluje 1×10^4 až 4×10^8 buniek. Suspenzia buniek a mikronosičov v kultivačnom médiu sa mieša magnetickým miešadlom (rýchlosť otáčok 20/minútu) po dobu 2 minúty. Po tomto čase sa miešadlo zastaví. V nasledujúcich 4 hodinách sa každú hodinu nechá miešať suspenziou buniek a mikronosičov po dobu 2 minút rovnakými otáčkami. Po štyroch hodinách sa pridá do kultivačnej nádoby 350 ml

kultivačného média a ďalej sa uvedie miešadlo do pohybu rýchlosťou otáčok 50/minútu. Tretí deň kultivácie sa vymení 1/3 objemu kultivačného média. Po vytvorení bunkovej jednovrstvy (t.j. 5. až 7. deň) sa bunky z mikronosičov uvoľnia 0,25 %-ným roztokom trypsínu a spočítajú sa v Burkerovej komôrke.

Príklad 2

Pri použití rolerovej techniky pestovania buniek na mikronosičoch sa do valcovitej nádoby o objeme 2 000 ml pridá kultivačné médium v množstve 200 až 500 ml a mikronosiča dietylamino-2-hydroxypropylcelulózy o výmennej kapacite 1,5 mekv/g v množstve 0,5 až 20 g/ml média. Potom sa inokuluje bunková kultúra v množstve 1×10^3 až 8×10^5 buniek/ml média. Po dobu piatich hodín sa nechá válcovitá nádoba otáčať v horizontálnej polohe v roleri rýchlosťou 0,5 až 8 otáčok za hodinu. Po tomto čase dôjde k prichyteniu buniek na mikronosič. Potom sa nechá valcovitá nádoba ďalej otáčať v roleri až do vytvorenia bunkovej jednovrstvy na kultivačnom povrchu nádoby a mikronosičoch. Bunky z kultivačnej nádoby a z mikronosičov je možné priamo infikovať vírusom, prípadne ich použiť na prípravu iných biologicko aktívnych látok. V prípade potreby je možné počas dlhodobej kultivácie vymieňať kultivačné médium.

Príklad 3

Postup podľa príkladu 1 s tým rozdielom, že ako mikronosič sa použije guľčková dietylamino-2-hydroxypropylcelulóza s výmennou kapacitou 1,0 mekv/g a veľkosťou častíc 70 až 250 μm .

Príklad 4

Postup podľa príkladu 2 s tým rozdielom, že ako aminoderivát celulózy sa použije guľčková trietylamónium-2-hydroxypropylcelulóza o výmennej kapacite 0,9 mekv/g a s veľkosťou častíc 70 až 250 μm .

Vynález má využitie všade kde sa pestujú laboratórne alebo priemyslovo živočíšne bunky či už pre diagnostické účely alebo pre účely priemyslovej výroby rôznych biologicky aktívnych látok ako sú ľudské a zvieracie vírusové vakcíny, interferóny, hormóny, enzýmy, nukleové kyseliny a iné.

PREDMET VYNÁLEZU

230 757

Spôsob pestovania buniek in vitro na celulóзовých mikronosičoch vo forme mikroguličiek, v y z n a č e n ý tým, že ako mikronosič sa používa aminoderivátov celulózy typu dietylaminoetylcelulózy alebo dietyamino-2-hydroxypropylcelulózy alebo trimetylamónium-2-hydroxypropylcelulózy s výmennou kapacitou 0,3 až 1,5 mekv/g a veľkosťou častíc 70 až 300 μm .