



УКРАЇНА

(19) UA (11) 69107 (13) A

(51) 7 C12N5/00, C12N5/02

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ КУЛЬТИВУВАННЯ ПОВЕРХНЕВО-ЗАЛЕЖНИХ КУЛЬТУР КЛІТИН ТВАРИН ТА ЛЮДИНИ

1

(21) 20031211040

(22) 05.12.2003

(24) 16.08.2004

(46) 16.08.2004, Бюл. № 8, 2004 р.

(72) Дзюблик Ірина Володимирівна, Трохименко
Олена Петрівна, Білоткач Катерина Михайлівна,
Салюк Анатолій Іванович(73) КІЇВСЬКА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ ПІСЛЯДИП-
ЛОМНОЇ ОСВІТИ ІМ. П.Л. ШУПИКА(57) 1. Спосіб культивування поверхнево-залежних
культур клітин тварин та людини шляхом внесення

2

інокуляту цих клітин, суспендованих у ростовому живильному середовищі, у посудину для культивування з наступним їх культивуванням при 37 °С, який відрізняється тим, що як поверхню росту використовують подрібнену полімерну плівку, сформовану у структуру з хаотично орієнтованими та ущільненими стрічками.

2. Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що стрічки полімерної плівки мають довжину не меншу ніж 20 мм і ширину не більшу за 2 мм.

Винахід відноситься до біотехнології, медицини та вірусології, а саме до способу культивування поверхневозалежних культур клітин тварин та людини, і може бути застосований у ветеринарії та медичній промисловості при отриманні вірусних вакцин, сироваток, а також біологічно-активних речовин (БАР): гормонів, цитокінів і факторів росту.

Відомі способи культивування поверхневозалежних культур клітин у стаціонарних умовах на внутрішній поверхні спеціальних культуральних посудин. При цьому використовуються великі об'єми ростових живильних середовищ, а кількість одержаних клітин обмежена площею поверхні їх росту. Для збільшення поверхні росту стаціонарних клітинних культур на практиці використовують спеціальні блоки з великою кількістю пластин, що значно збільшують її. Наприклад, блок A/S NUNC має робочу поверхню 600 см², для культивування витрачають 2000 мл ростового середовища при загальному об'ємі посудини для культивування 12500 см³. Проте такі блоки не доступні на ринку України, оскільки вони виключно іноземного виробництва, мають високу вартість і придатні тільки для одноразового використання.

Способи культивування клітин у бутлях, що обертаються (ролерне культивування), дозволяють значно підвищити вихід клітин за рахунок використання всієї площі внутрішньої поверхні бутлів та мінімізувати витрати ростових живильних середовищ. Ролерне культивування добре піддається автоматизації і широко застосовується при

промислового вирощуванні поверхневозалежних клітинних культур з метою подальшого культивування в них вірусів, одержання вірусних антигенів та інших БАР.

Проте обладнання для ролерного культивування має високу вартість і мало доступне на ринку України [1].

Існує спосіб культивування поверхневозалежних клітинних культур на скляних трубках, що поєднує принципи стаціонарного і ролерного культивування. У бутель, що обертається вміщують пучок паралельних скляних трубок малого діаметру, розділених силіконовими прокладками або кільцями. При цьому додатково застосовують перфузію живильного середовища із зовнішнього резервуару [2]. При використанні таких системи можна, наприклад, одержати 3,2*10⁹ клітин Vero (2,3*10⁵ кл/см² поверхні росту) за умов культивування впродовж 6 діб та використання 6,5 л ростового живильного середовища. Обладнання для такого культивування виробництва фірми Belco Glass Inc. має високу вартість і не доступне на ринку України.

Використання різних носіїв, що збільшують поверхню росту для культивування поверхневозалежних культур клітин дозволяє значно оптимізувати процеси як отримання самої біомаси клітин, так і продуктів, що синтезуються ними: антитіл, антигенів, інших БАР та вірусів, при цьому досягається зниження трудомісткості біотехнологічного процесу в результаті того, що відношення поверхні росту до об'єму культивування значно збільшується.

(13) A

(11) 69107

(19) UA

ся, можливо автоматизувати контроль та керування процесом культивування.

Відомі способи культивування клітин людини та тварин на частках спіненого еластичного полімерно-поліефірного поліуретану [3] та спосіб культивування клітин на нетканому розпушеному вуглецевому сорбенті. Перед інокуляцією клітин носії попередньо обробляють спеціальними розчинами для полегшення адгезії, прикріплення та розплавлення клітин [4]. Проте, суттєвими недоліками застосування цих способів культивування клітин є необхідність використання спеціально виготовлених матеріалів та додаткова модифікація поверхні росту шляхом її обробки високо вартісними сполуками біологічного походження, що вимагають спеціальної технології виготовлення.

Найбільш близьким до способу, що заявляється, є спосіб культивування поверхнево-залежних культур клітин на волокнах з алюмоборосилікатного, натрієвоборосилікатного чи кварцового скла діаметром 5-45 мкм і насипною густиною 2-40 г/дм³, що обробляються стандартними методами підготовки скла до культивування клітин (скляні волокна промивають, знежирюють та стерилізують) [5].

Спосіб виконують так. Оброблені волокна розміщують у посудину для культивування об'ємом 5 л. Суспензію клітин ПО-2 (нирки вівці) або ПТ (нирки теляти) у посівній концентрації $1,2 \cdot 10^5$ 2,0 $\cdot 10^5$ кл/мл у ростовому живильному середовищі з 10% сироватки великої рогатої худоби, об'ємом 1 л, вносять у посудину для культивування. Клітини культивують 96 годин при 37°C, повністю заміняючи кожної доби середовище культивування на свіже. Після закінчення культивування, клітини, що виростили, знімають з поверхні волокон 0,25% розчином трипсину і підраховують їх кількість відомими методами. При цьому кількість одержаних клітин в 10-15 разів перевищує початкову кількість клітин, взятих для культивування.

Недоліками описаного способу культивування клітин є небезпека вдихання дрібнодисперсних скляних волокон під час їх підготовки, складність відмивання цих волокон від ростового живильного середовища, необхідність застосування додаткового фільтрування для відділення решток скляних волокон від цільового продукту, механічного травмування уламками волокон клітин під час маніпуляцій.

Задача винаходу полягає у підвищенні продуктивності систем культивування поверхнево-залежних культур клітин тварин і людини шляхом застосування поширеного, дешевого і безпечного матеріалу у якості носія, спрощення стадій заміни культурального середовища та відмивання клітин від ростового середовища, що містить сироватку, зменшенні вартості цільового продукту.

Вирішення поставленої задачі досягається тим, що у запропонованому способі культивування поверхнево-залежних культур клітин тварин та людини, шляхом внесення інокуляту цих клітин, суспендованих у ростовому живильному середовищі, у посудину для культивування з наступним їх культивуванням при 37°C, у якості носіїв використовують доступні дешеві полімерні матеріали та їх відходи, зокрема подрібнену полімерну плівку,

сформовану у структуру з хаотично орієнтованими та ущільненими стрічками, при цьому стрічки полімерної плівки мають довжину не менш ніж 20 мм і ширину не більше за 2 мм.

Спосіб здійснюється наступним чином.

Полімерну плівку із поліетилену, поліпропілену або полістиролу подрібнюють (нарізають) на стрічки довжиною не менш, ніж 20 мм та шириною до 2 мм. Стрічки промивають проточною водою і знежирюють у 20-40% водному розчині сірчаної кислоти з додаванням біхромату калію впродовж хвилин 1-30 хвилин. Ущільнену масу стрічок полімерної плівки промивають від кислоти проточною, а потім дистильованою водою, стерилізують кип'ятінням, гама-опромінюванням чи автоклавуванням при 0,5 атм. Стрічки полімеру вміщують у посудину для культивування, формуючи просторову структуру із розвинутою поверхнею росту та хаотично орієнтованими ущільненими частками.

Суспензію клітин визначеної концентрації у ростовому живильному середовищі вносять у посудину для культивування на підготовлені поліетиленові стрічки і культивують при 37°C впродовж 2 діб. Далі продовжують культивування ще 3 доби, повністю або частково заміняючи кожної доби середовище культивування на свіже.

Після закінчення культивування стрічки полімеру промивають розчином Хенкса або фізіологічним розчином натрію хлориду і фарбують 0,2% розчином кристалічного фіолетового. Якість утвореного клітинного моношару оцінюють при мікроскопічному дослідженні.

Кількість одержаних живих клітин підраховують у гемоцитометрі після попереднього зняття їх з поверхні стрічок сумішшю розчинів Версену та трипсину та фарбування мортальним або вітальним барвниками.

Приклад 1.

Полімерну плівку з поліетилену, поліпропілену, полістиролу із загальною площею поверхні росту 50 см нарізають на стрічки довжиною не меншою ніж 20 мм та шириною до 2 мм, промивають у проточній водопровідній воді і вміщують на 30 хв. у 20-40% водний розчин сірчаної кислоти з додаванням біхромату калію. Стрічки полімерної плівки промивають від кислоти проточною, а потім дистильованою водою. Одержані стрічки вміщують у посудину для культивування, формуючи просторову структуру із розвинутою поверхнею росту та хаотично орієнтованими ущільненими частками носія. Посудину заповнюють 0,9% розчином натрію хлориду та стерилізують автоклавуванням при 0,5 атм. Після стерилізації розчин виливають а поверхню росту обробляють ростовим живильним середовищем на основі середовищ ДЕММ і 199 у рівних співвідношеннях з додаванням 5% сироватки крові ембріонів корів та антибіотиків (100 Од/мл пеніциліну і 100 мкг/мл стрептоміцину).

Готують суспензію перещеплювальних клітин свинячої нирки ембріональної версенізованої (СНЕМ) у посівній концентрації $1,5 \cdot 10^5$ кл/мл у ростовому живильному середовищі зазначеного вище складу. Готову клітинну суспензію, об'ємом 40 мл, вносять у посудину для культивування, місткістю 100 см³ і культивують при 37°C впродовж 2 діб без заміни ростового живильного середовища, а потім

продовжують культивування ще 4 доби, при 37°C із заміною середовища культивування кожної доби. Тривалість культивування разом становить 6 дб.

Після закінчення культивування стрічки полімерної плівки, яку використовують у якості поверхні росту, разом з клітинами, що виростили, двічі промивають фізіологічним розчином і фарбують впродовж 15 хвилин 0,2% водно-спиртовим розчином кристалічного фіолетового. Одержані препарати досліджують під мікроскопом при збільшенні $\times 80$ та фотографують. На Фіг.1 показаний загальний вигляд полімерної плівки, що використовується у якості поверхні росту для культивування поверхневозалежних культур клітин тварин і людини. На Фіг.2. показано формування моношару поверхневозалежної клітинної культури СНЕВ на поверхні поліетиленової плівки, що використовується у якості поверхні росту. Клітини прикріплюються, розпластуються та утворюють моношари, при мікроскопічному дослідженні яких не виявляється порушень цілісності клітинного моношару на появи вогнищ дегенерації клітин. Це свідчить про нетоксичність полімерної плівки для поверхневозалежних клітин тварин.

Формування клітинних моношарів відбувається на обох поверхнях стрічок, клітини займають усі доступні площини, досягаючи у такий спосіб більшої концентрації біомаси на одиницю об'єму середовища культивування.

Приклад 2. Спосіб виконують як у прикладі 1, але після закінчення культивування середовище росту видаляють, стрічки полімерної плівки з клітинами двічі промивають розчином Хенкса. Потім їх переносять у іншу посудину більшого об'єму, куди додають суміш 0,02% розчину Версену і 0,25% розчину трипсину у рівних співвідношеннях в об'ємі, рівному об'єму інокуляту (40 мл). Носій розпушують і витримуючи його 10-15 хв. при 37°C, періодично перемішуючи. В одержаній суспензії клітин підраховують їх кількість у гемоцитометрі після фарбування клітин 0,5% розчином мортального барвника трипанового синього. Підраховують загальну кількість клітин, одержаних при культивуванні. Результати виконання способу представлені в таблиці.

Приклад 3. Спосіб виконують як у прикладі 2, але посівна концентрація клітин у інокуляті становить $2,5 \cdot 10^5$ кл/мл. Результати виконання способу

представлені в таблиці.

Приклад 4. Спосіб виконують як у прикладі 2, але посівна концентрація клітин у інокуляті становить $5,0 \cdot 10^5$ кл/мл.

Приклад 5. Спосіб виконують як у прикладі 1, але загальна площа стрічок полімерної плівки становить 200 cm^2 . Результати виконання способу представлені в таблиці.

Приклад 6. Спосіб виконують як у прикладі 1, але загальна площа стрічок полімерної плівки становить 400 cm^2 . Результати виконання способу представлені в таблиці.

Приклад 7. Спосіб виконують як у прикладах 2-6, але при цьому використовують клітини поверхневозалежної перещеплювальної культури клітин аденокарциноми гортані людини (HEP-2). Результати виконання способу представлені в таблиці.

З результатів виконання способу, представлених в таблиці, випливає, що в усіх прикладах приріст клітин становить від 1,9 до 5,8 разів; кількість одержаних клітин в перерахунку на 1 cm^2 поверхні росту коливається в межах від $3,16 \cdot 10^5$ до $9,0 \cdot 10^5$; в перерахунку на 1 мл використаного живильного середовища, кількість одержаних клітин в усіх прикладах знаходиться в межах від $1,39 \cdot 10^5$ до $3,0 \cdot 10^5$. Ці показники залежать від кількості клітин в інокуляті, загальної площі поверхні росту стрічок полімерної плівки і виду використаних клітин. Проте вихід цільового продукту обмежений конструктивними особливостями посудини для культивування.

Література:

1. Alan Doyle & J. Bryan Griffiths. Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology. - John Wiley & Sons.: Chichester - New York - Wenham - Brisbane - Singapore - Toronto. - 1998. - 332 p.
2. Фрешни Р. Культура животных клеток: Методы. - М.: Мир, 1989. - 332 с.
3. Патент РФ, RU 2014359 Трехмерный биоактивный носитель для культивирования животных клеток и тканей от 15.06.94., Бюл. № 11.
4. А. с. СССР, SU 1578192, от 15.07.90., Бюл. № 26.
5. А. с. СССР, SU 1182817, от 15.10.94., Бюл. № 19.

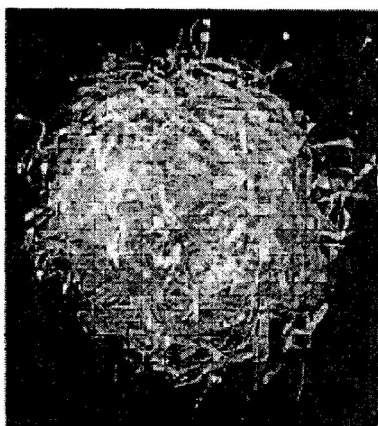
Таблиця

Приклади виконання способу культивування поверхневозалежних перещеплювальних культур клітин тварин та людини

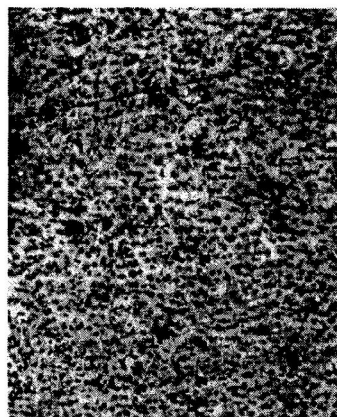
Загальна площа поверхні росту, cm^2	Культура клітин	Посівна концентрація кл/мл	Об'єм культуральної посудини, мл	Об'єм інокуляту, мл	Загальна кількість клітин в інокуляті	Кількість одержаних клітин	Одержаний приріст клітин, разів	Кількість одержаних клітин в перерахунку на 1 cm^2 поверхні росту	Загальна кількість затраченого ростового живильного середовища	Вихід клітин у перерахунку на 1 мл ростового живильного середовища
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Belco Glass Inc. Культивування клітин на скляних трубках //Фрешни Р. Культура животных клеток. Методы. - М.: Мир, 1989. - 316 с.										
10000	Vero	$0,3 \cdot 10^5$	6500	6500	$2,0 \cdot 10^8$	$2,30 \cdot 10^9$	+10	$2,30 \cdot 10^5$	6500	$5,38 \cdot 10^5$
Виконання способу за прототипом // А.с. СССР, SU 1182817 от 15.10.94, Бюл. № 19.										
$15,4 \cdot 10^8$	ПТ	$2,0 \cdot 10^5$	5000	1000	$2 \cdot 10^8$	$4,2 \cdot 10^9$	+21,0	2,7	52500	$0,008 \cdot 10^5$
$2,3 \cdot 10^8$	ПО2	$1,2 \cdot 10^5$	500	150	$1,8 \cdot 10^8$	$2,4 \cdot 10^9$	+13,3	0,1	750	$0,82 \cdot 10^5$
Приклади виконання способу культивування поверхневозалежних клітин тварин і людини, що заявляється										
50	СНЕВ	$1,5 \cdot 10^5$	100	40	$6,00 \cdot 10^8$	$3,3 \cdot 10^9$	+5,50	$6,60 \cdot 10^5$	160	$2,06 \cdot 10^5$
		$2,5 \cdot 10^5$	100	40	$1,00 \cdot 10^9$	$3,4 \cdot 10^9$	+3,40	$6,80 \cdot 10^5$	160	$2,13 \cdot 10^5$

Продовження таблиці

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	HEP-2	$5 \cdot 10^5$	100	40	$2,00 \cdot 10^7$	$4,4 \cdot 10^7$	+2,20	$8,80 \cdot 10^8$	160	$2,75 \cdot 10^5$
		$1,5 \cdot 10^5$	100	40	$6,00 \cdot 10^8$	$3,48 \cdot 10^7$	+5,80	$6,90 \cdot 10^8$	160	$2,18 \cdot 10^5$
		$2,5 \cdot 10^5$	100	40	$1,00 \cdot 10^7$	$4,2 \cdot 10^7$	+4,20	$8,40 \cdot 10^8$	160	$2,63 \cdot 10^5$
200	CHEB	$5 \cdot 10^5$	100	40	$2,00 \cdot 10^7$	$4,6 \cdot 10^7$	+2,30	$9,20 \cdot 10^8$	160	$2,88 \cdot 10^5$
		$1,5 \cdot 10^5$	500	150	$2,25 \cdot 10^7$	$1,08 \cdot 10^8$	+4,80	$5,75 \cdot 10^8$	600	$1,80 \cdot 10^5$
		$2,5 \cdot 10^5$	500	150	$3,75 \cdot 10^7$	$1,20 \cdot 10^8$	+3,24	$6,00 \cdot 10^8$	600	$2,00 \cdot 10^5$
	HEP-2	$5 \cdot 10^5$	500	150	$7,50 \cdot 10^7$	$1,80 \cdot 10^8$	+2,40	$9,00 \cdot 10^8$	600	$3,0 \cdot 10^5$
		$1,5 \cdot 10^5$	500	150	$2,25 \cdot 10^7$	$1,15 \cdot 10^8$	+5,11	$5,75 \cdot 10^8$	600	$1,92 \cdot 10^5$
		$2,5 \cdot 10^5$	500	150	$3,75 \cdot 10^7$	$1,58 \cdot 10^8$	+4,21	$8,00 \cdot 10^8$	600	$2,63 \cdot 10^5$
400	CHEB	$5 \cdot 10^5$	500	150	$7,50 \cdot 10^7$	$1,75 \cdot 10^8$	+2,33	$8,75 \cdot 10^8$	600	$2,92 \cdot 10^5$
		$1,5 \cdot 10^5$	1000	300	$4,50 \cdot 10^7$	$1,44 \cdot 10^8$	+3,20	$3,6 \cdot 10^8$	1200	$1,20 \cdot 10^5$
		$2,5 \cdot 10^5$	1000	300	$7,50 \cdot 10^7$	$2,10 \cdot 10^8$	+2,80	$5,25 \cdot 10^8$	1200	$1,75 \cdot 10^5$
	HEP-2	$5 \cdot 10^5$	1000	300	$1,50 \cdot 10^8$	$2,85 \cdot 10^8$	+1,90	$7,13 \cdot 10^8$	1200	$2,38 \cdot 10^5$
		$1,5 \cdot 10^5$	1000	300	$4,50 \cdot 10^7$	$1,67 \cdot 10^8$	+3,70	$4,16 \cdot 10^8$	1200	$1,39 \cdot 10^5$
		$2,5 \cdot 10^5$	1000	300	$7,50 \cdot 10^7$	$1,88 \cdot 10^8$	+2,50	$4,67 \cdot 10^8$	1200	$1,57 \cdot 10^5$
		$5 \cdot 10^5$	1000	300	$1,50 \cdot 10^8$	$2,85 \cdot 10^8$	+1,90	$7,13 \cdot 10^8$	1200	$2,38 \cdot 10^5$



Фіг. 1



Фіг. 2