ROYAUME DU MAROC

OFFICE MAROCAIN DE LA PROPRIETE INDUSTRIELLE ET COMMERCIALE
---

(19)

المملكة المغربية

المكتب المغربي للملكية الصناعية و التجارية
---

(12) FASCICULE DE BREVET

(11) N° de publication :
MA 33429 B1

(51) Cl. internationale :
C12N 7/02; A61K 39/13

(43) Date de publication :
03.07.2012

(21) N° Dépôt :
34534

(22) Date de Dépôt :
13.01.2012

(30) Données de Priorité :
16.07.2009 EP 09165620.7 ; 16.07.2009 US 61/271,038

(86) Données relatives à l'entrée en phase nationale selon le PCT :
PCT/EP2010/059796 08.07.2010

(71) Demandeur(s) :
CRUCELL HOLLAND B.V., Archimedesweg 4 NL-2333 CN Leiden (NL)

(72) Inventeur(s) :
LEWIS, John, Alfred

(74) Mandataire :
SABA & CO

(54) Titre : **PRODUCTION DE POLIOVIRUS À TITRES ÉLEVÉS POUR LA PRODUCTION DE VACCINS**

(57) Abrégé : Cette invention concerne un procédé de production de poliovirus consistant à : a) fournir une culture cellulaire en suspension sans sérum, les cellules étant des cellules PER.C6, b) infecter lesdites cellules avec le poliovirus avec une densité cellulaire comprise entre 2 x 10

الملخص

يوفر الاختراع عملية لإنتاج فيروس شلل الأطفال، تتضمن خطوات : أ) توفير مزرعة خلايا من معلق خالي من المصل، حيث تكون خلايا PER.C6، ب) إصابة الخلايا المذكورة بفيروس شلل الأطفال، بكثافة خلية بين 2×10^6 خلية/ مل و 150×10^6 خلية/ مل، و ج) تجميع فيروس شلل الأطفال خلال مدة زمنية بين 12 و 48 ساعة بعد الإصابة.

(TRENTE DEUX PAGES)

CRUCELL HOLLAND B.V.
P. P. SABA & CO., Casablanca

03 JUIL 2012

الوصف الكامل

يتعلق الاختراع بمجال زراعة الخلايا و إنتاج فيروس شلل الأطفال. بتحديد أكثر، يتعلق بطرق محسنة لزراعة الخلايا و إنتاج فيروس شلل الأطفال منها لإنتاج لقاحات شلل الأطفال.

خلفية الاختراع

فيروسات شلل الأطفال هي أحد أعضاء جنس الفيروس المعوي من عائلة الفيروسات البيكورناوية. وفيروسات شلل الأطفال عبارة عن فيروسات صغيرة غير مغلفة مع قفيصات تتضمن جينوم RNA الإحساس الإيجابي أحادي الطيقان. يوجد ثلاثة أنواع من فيروسات شلل الأطفال: النوع 1 و 2 و 3. يمكن أن تؤدي إصابات الأفراد العرضة لفيروس شلل الأطفال إلى الإصابة بشلل الأطفال. يكون مرض شلل الأطفال معدي جدا. تم تطوير لقاحين شلل أطفال مختلفين، لقاح شلل الأطفال المعطل (IPV) من Salk ولقاح شلل الأطفال الحي الموهن للإعطاء عبر الفم (OPV) من Sabin. يكون كلا اللقاحين أمن وفعال. كل منها له مميزاته وعيوبه الخاصة، وكلاهما يلعب دورا هاما في التحكم بإصابات شلل الأطفال. لمراجعة حوالي فيروسات شلل الأطفال و لقاحات شلل الأطفال، انظر، على سبيل المثال، Kew et al, 2005.

لقاح شلل الأطفال للإعطاء عبر الفم (OPV) رخيص و ملائم، و تم استخدامه على نطاق واسع. ومع ذلك، يعاني المتلقون أحيانا من الشلل الناتج عن فيروس شلل الأطفال المتعلق باللقاح (VAPP) بسبب الانعكاس في اللقاح. علاوة على ذلك، تمت ملاحظة في التكاثر أنها تكون مستمنعة بالكامل حيث تتعرض لسلالات فيروس شلل الأطفال Sabin الموهنة لتغيرات طفرية كافية لإحداث تفشي في مرض شلل الأطفال التي لا يمكن تميزها سريريا و وبائيا من مرض شلل الأطفال من النوع البري طبيعي الحدوث؛ تدعى تلك الطفرات فيروسات شلل الأطفال مشتقة من لقاح نشر أو cVDPVs (انظر على سبيل المثال، Kew et al, 2005; Wright and Modlin, 2008; Yakovenko et al, 2009).

يوجد هناك إجماع متنامي حيث يمكن أن يساهم لقاح فيروس شلل الأطفال المعطل (IPV) في استئصال أكثر سرعة لفيروس شلل الأطفال من النوع البري والتحكم في cVDPV الفجائي عند استخدامها بالترافق مع استراتيجيات OPV (Wright and Modlin, 2008; John, 2009).

مع ذلك، يكون إنتاج IPV أكثر تكلفة (انظر على سبيل المثال، John, 2009) و أيضا يمكن أن تكون باهظة التكلفة للدول الأقل والأدنى تطور، حيث توجد حاجة قوية للقاحات فيروس شلل الاطفال. تساعد أنظمة الزراعة لإنتاج مادة كتلة فيروس شلل الأطفال التي يمكن استخدامها في لقاح، بصفة محددة فيروس شلل الأطفال غير الموهن، في الظهور الكبير للتكاليف العالية نسبيا.

وبالتالي، تبقى هناك حاجة في الفن لوجود أنظمة زراعة كافية لإنتاج فيروس شلل الأطفال للاستخدام في لقاحات.

تم وصف تكاثر فيروس شلل الأطفال في خلايا HEK293 بكونها نظام لدراسة الأنماط الظاهرية للتنسخ المحدد اللخلايا العصبية لفيروس شلل الأطفال، و تم وصفها بأنه الصور الموهنة من فيروس شلل الأطفال، مثل فيروس شلل الأطفال بما في ذلك الطفرات النقطية في عنصر IRES كما هي موجودة في سلالات Sabin، التي توضح تكاثر منخفض في خلايا HEK293 (Campbell et al, 2005).

وقد تم وصف خلايا شبكية جنين بشري بخلد E1 (HER)، بصفة خاصة خلايا PER.C6، بأنها مناسبة لتكاثر فيروسات مختلفة، مع التركيز على فيروس الإنفلونزا (Pau et al, 2001؛ WO 01/38362). على الرغم من أن WO 01/38362 تصف أمثلة عملية لتكاثر سلالات مختلفة من فيروس الإنفلونزا، و من فيروس Herpes Simplex Virus (HSV) بالأنواع 1 و 2، فيروس الحصبة و فيروس الروتا في خلايا PER.C6، تم عرض تكاثر فيروس شلل الأطفال في WO 01/38362. علاوة على ذلك، تم وصف ظروف تنسخ فيروس شلل الأطفال في تلك الخلايا، ولا يمكن توقعها بسهولة بناء على تنسخ الفيروسات ليس ذات علاقة في تلك الخلايا. وبالتالي، لم يعرف حتى الآن سواء أنها سوف يكون من المجدي الإنتاج الاقتصادي لفيروس شلل الأطفال بنطاق صناعي لإنتاج أغراض لقاح في تلك الخلايا.

بالنسبة لتصنيع واسع النطاق للقاحات شلل الأطفال المعطلة، يتم نشر فيروس شلل الأطفال بصورة عامة في خلايا Vero، حيث تكون مشتقة من قرد. تم استخدام خلايا Vero على نطاق كبير لإنتاج لقاح، بما في ذلك معطلة بالإضافة إلى لقاحات شلل الأطفال حية موهنة، وبالتالي أيضا تمثل سلالات الخلية المستمرة المقبولة الأكثر انتشارا من قبل السلطات المنظمة لتصنيع لقاحات فيروسية، و يعتقد زيادة استخدام تلك الخلايا لإنتاج لقاح بواسطة الخبراء بالمجال (Barrett et al, 2009).

تم وصف زراعة مادة حاملة دقيقة بنطاق كبير لخلايا Vero للقاح شلل الأطفال معطل بواسطة Montagnon et al, 1982 and 1984. تم وصف عملية لإنتاج واسع النطاق للقاح شلل الأطفال باستخدام خلايا Vero، و اللقاح الناتج، أيضا في براءة الاختراع الأمريكية رقم 4,525,349.

تم وصف إنتاج عيارات حجمية فيروس شلل الأطفال أعلى (Sabin من النوع 1) (تقريبا 2 × 10^9 $TCID_{50}$/ مل) بواسطة (Merten et al, 1997) للظروف عندما زراعة خلايا Vero على المواد الحاملة الدقيقة في وسط يحتوي على مصل قبل مرحلة إنتاج الفيروسات في وسط خالي من المصل، ولكن نظرا لعيوب استخدام المصل أشار هؤلاء المؤلفون إلى أنه من المرغوب فيه وجود عملية خالية من المصل بالكامل، حيث في هذه العملية الخالية بالكامل من المصل المحسنة يكون المؤلفون قادرون على الحصول على عيار 6.3 × 10^8 $TCID_{50}$/ مل.

تشير Kreeftenberg et al (2006)، التي تتضمن إنتاج فيروس شلل الأطفال لإنتاج لقاح بنطاق صناعي، إلى حصيلات من أنواع برية و سلالات Sabin من فيروس شلل الأطفال في خلايا Vero تنمو على مواد حاملة دقيقة، حيث تكون الحصيلات مشابهة للسلالات المختلفة، ويكون لو العيارات حجمية بين 8.1 و 8.6. يصف أولئك المؤلفين أيضا أن تكون كمية الفيروس المطلوبة لإنتاج اللقاح النهائي أعلى بشكل كبير لـ IPV عنها OPV، حيث تؤدي إلى تكلفة إنتاج أعلى شكل كبير لكل جرعة لـ IPV عنه لـ OPV.

وقد تم وصف إنتاج فيروس شلل الأطفال خالي من المصل باستخدام خلايا Vero مستنبتة على مواد حاملة دقيقة بواسطة (Card et al, 2005)، و على الرغم من أن مستوى الإنتاجية يكون أقل منه في الزراعات الساكنة، تم وصف زراعات المادة الحاملة الدقيقة بسهولتها في التدرج.

على الرغم من أن كفاءة وقابلية التطبيق الصناعي لخلايا Vero المستنبتة على أساس مادة حاملة دقيقة، يظل إنتاج الكميات الكبيرة من فيروس شلل الأطفال مكلفا ومن ذلك تستمر الحاجة لأنظمة إنتاج بديلة لفيروسات شلل الأطفال التي تعاني بشكل أقل من هذا العيب.

تم وصف إنتاج فيروس شلل الأطفال باستخدام معلق خلايا Vero، الذي ينتج عيارات حجمية فيروس أقل (10^{10}لو CCID50/ مل بين 6.5 و 7.9) من تلك الملاحظة في الحامل الدقيق الروتيني لخلايا Vero (van Eikenhorst et al, 2009).

يتمثل هدف الاختراع في توفير عمليات مناسبة يمكن استخدامها للإنتاج واسع النطاق والاقتصادي لفيروسات شلل الأطفال للاستخدام في لقاحات. يمكن أن يساعد ذلك في تحقيق وصول للقاح فيروس شلل الأطفال بأسعار معقولة في الدول النامية على أساس مستديم.

وصف مختصر للاختراع

يعتمد الاختراع على توضيح تكاثر أكثر كفاءة لفيروس شلل الأطفال في خلايا PER.C6، حيث يتم الحصول على عيارات حجمية فيروس شلل الأطفال عالية بشكل غير مسبوق وفقا للطرق الموصوفة في هذه الوثيقة. لم يتوقع الحصول على تلك العيارات حجمية العالية، التي توفر ميزة إقتصادية ملحوظة عن إنتاج فيروس شلل الأطفال في خلايا Vero، بناء على تكاثر الفيروسات الأخرى في تلك الخلايا، ولا يمكن توقع ظروف العملية ذات الجدوى الصناعية، حيث يمكن أن تتغير الظروف والمميزات التي يمكن الحصول عليها على نطاق كبير لعدة أنواع مختلفة من الفيروسات التي لها خصائص مختلفة إلى حدٍ كبير.

وبالتالي، يوفر الاختراع عملية لإنتاج فيروس شلل الأطفال، تتضمن خطوات : أ) توفير مستنبت خلايا من معلق خالي من المصل، حيث تكون خلايا PER.C6 كما هي مودعة تحت ECACC رقم 96022940، ب) إصابة الخلايا المذكورة بفيروس شلل الأطفال، بكثافة خلية بين 2×10^6 خلية/ مل و 150×10^6 خلية/ مل، و ج) تجميع فيروس شلل الأطفال خلال مدة زمنية بين 12 و 48 ساعة بعد الإصابة.

في تجسيدات معينة، يتم إجراء الإصابة المذكورة بكثافة خلية بين حوالي 5×10^6 خلية/ مل و 20×10^6 خلية/ مل، على سبيل المثال بين حوالي 8×10^6 خلية/ مل و 15×10^6 خلية/ مل، على سبيل المثال، عند حوالي 10×10^6 خلية/ مل.

في تجسيدات معينة، يتم إجراء التجميع المذكور لفيروس شلل الأطفال خلال مدة زمنية بين حوالي 18 و 30 ساعة بعد الإصابة، على سبيل المثال عند حوالي 24 ساعة بعد الإصابة.

تمكن تلك الظروف للحصول على عيارات حجمية عالية جدا (حول 10^{10}/ مل، حيث تكون أكثر بشكل كبير من 10 مرات من العيارات حجمية التي تم الحصول عليها نمطيا باستخدام خلايا محمولة على مادة حاملة بحجم الميكرو Vero لسلالات شلل الأطفال من النوع البري) لفيروس شلل الأطفال في عملية قصيرة نسبيا، حيث بذلك يكون لها مميزات اقتصادية كافية عن العمليات المستخدمة حاليا لإنتاج فيروس شلل الأطفال لمستحضر اللقاح. تم توضيح ذلك

لكل الأنواع الثلاثة من فيروس شلل الأطفال : النوع 1 (سلالاة Brunenders)، النوع 2 (سلالة MEF و النوع 3 (سلالة Saukett).

في تجسيدات معينة من ذلك، يكون فيروس شلل الأطفال المذكور هو فيروس شلل الأطفال خبيث من النوع البري على سبيل المثال فيروس شلل الأطفال من النوع 1، فيروس شلل الأطفال من النوع 2 أو فيروس شلل الأطفال من النوع 3. في تجسيدات معينة، يكون فيروس شلل الأطفال المذكور هو فيروس شلل الأطفال من النوع 1 سلالة Mahoney أو Brunenders، فيروس شلل الأطفال من النوع 2 سلالة MEF (أو MEF-1)، أو فيروس شلل الأطفال من النوع 3 سلالة Saukett. في تجسيدات أخرى، يكون فيروس شلل الأطفال المذكور هو فيروس شلل الأطفال الموهن (يكون أقل سمية للأعصاب)، على سبيل المثال سلالة Sabin (حيث يمكن أن تكون أيضا من النوع 1، 2 أو 3).

يوفر الاختراع أيضا عملية لإنتاج لقاح شلل الأطفال، تتضمن عملية لإنتاج فيروس شلل الأطفال وفقا للاختراع، تتضمن أيضا تنقية، اختياريا تعطيل، و صياغة فيروس شلل الأطفال الذي تم تجميعه للحصول على لقاح شلل الأطفال. بالنسبة لـ IPV، يتم إجراء التعطيل بواسطة فورمالين أو وسائل أخرى. بالنسبة لـ OPV، لا تكون خطوة التعطيل مطلوبة.

تم في هذه الوثيقة أيضا الكشف عن توفير كتلة فيروس شلل الأطفال مفيدة لتحضير لقاح شلل الأطفال، كتلة فيروس شلل الأطفال المذكورة يمكن الحصول عليها بواسطة عملية لإنتاج فيروس شلل الأطفال وفقا للاختراع و تتضمن وسط زراعة و عيار فيروس شلل الأطفال على الأقل $10^{9.4}$ CCID50/ مل، على سبيل المثال بين حوالي $10^{9.5}$ و 10^{11} CCID50/ مل، على سبيل المثال بين حوالي $10^{9.8}$ و $10^{10.8}$ CCID50/ مل. في تجسيدات معينة، يكون للكتلة المذكورة حجم بين 1 و 1000 لتر. في تجسيدات أخرى، تحتوي الكتلة المذكورة على خلايا و/ أو حطام خلية، من الخلايا المستخدمة وفقا للعمليات الخاصة بالاختراع. في تجسيدات معينة، توجد الكتلة المذكورة في مفاعل حيوي. في تجسيدات أخرى، تمت إزالة الكتلة من المفاعل الحيوي و يوجد في حاوية مناسبة.

يتم الكشف أيضا عن فيروس شلل الأطفال و لقاح شلل الأطفال يمكن الحصول عليه وفقا للطرق الخاصة بالاختراع. يكون فيروس شلل الأطفال المذكور و/ أو اللقاح المذكور خالي من بروتينات القرود، على نحو مفضل خالي من بروتينات غير بشرية. سوف يكون أيضا خالي من بقايا خلية المضيف غير البشري الأخرى. على النقيض، سوف يحتوي فيروس شلل

الأطفال التي تم إنتاجها وفقا للطرق التقليدية على بقايا بروتين غير بشري و/ أو البقايا غير البشرية الأخرى، من خلايا المضيف المستخدمة و/ أو من المصل المستخدم أثناء زراعة الخلية. وبالتالي، يعاني فيروس شلل الأطفال الناتج وفقا للاختراع الحالي من تلويثات منخفضة من الملوثات غير البشري الناتجة من عملية الإنتاج عن فيروس شلل الأطفال ناتج باستخدام عمليات تقليدية.

يوفر الاختراع أيضا عملية للحصول على مستحضر فيروس شلل الأطفال في زراعة الخلايا بعيار على الأقل حوالي $10^{9.4}$، يفضل على الأقل $10^{9.8}$، يفضل أكثر على الأقل 10^{10}، على سبيل المثال بين $10^{10.5}$ و 10^{11} CCID50/ مل، تتضمن خطوات : أ) توفير مستنبت خلايا من معلق خالي من المصل، حيث تكون خلايا PER.C6، ب) إصابة الخلايا المذكورة بفيروس شلل الأطفال، بكثافة خلية بين 2×10^6 خلية/ مل و 150×10^6 خلية/ مل، و ج) تجميع فيروس شلل الأطفال خلال مدة زمنية بين 12 و 48 ساعة بعد الإصابة للحصول على مستحضر فيروس شلل الأطفال الذي له التركيز المذكور. تكون التجسيدات المفضلة هي نفسها كما هو موصوف أعلاه لعملية إنتاج فيروس شلل الأطفال وفقا للاختراع.

شرح مختصر للرسومات

الشكل 1. إنتاج فيروس شلل الأطفال في خلايا PER.C6 تابعة و Vero.

الشكل 2. إنتاج فيروس شلل الأطفال من النوع 1 في معلق خلايا PER.C6 في وسط مختلف خالي من المصل، عند MOIs مختلفة و عند كثافات خلية مختلفة عند الإصابة.

الشكل 3. تأثير درجة الحرارة و زمن التجميع على إنتاج فيروس شلل الأطفال من الأنواع 1، 2 و 3 في معلق خلايا PER.C6 في وسط خالي من المصل.

الشكل 4. تأثير كثافة خلية عند الإصابة، درجة الحرارة، و زمن التجميع على إنتاج فيروس شلل الأطفال من النوع 1 في معلق خلايا PER.C6 في وسط خالي من المصل.

الشكل 5. كفاءة إنتاج فيروس شلل الأطفال من الأنواع 1، 2 و 3 في معلق خلايا خالي من المصل PER.C6 بكثافات خلوية عالية.

الوصف التفصيلي للاختراع

الخلايا المستخدمة في العمليات الخاصة الاختراع عبارة عن خلايا PER.C6، حيث تكون عبارة عن خلايا حية، تكون معروفة أيضا ف يالفن بسلالات الخلايا المتواصلة، وبالتالي يكون لها قدرة لا نهائية على الحياة (انظر على سبيل المثال، Barrett et al, 2009). يمكن أن تشير خلايا PER.C6 لغرض التطبيق الحالي إلى خلايا كما هي مودعة تحت ECACC رقم 96022940 على 29 فبراير 1996. سوف يتضح للشخص الماهر أن تلك التعريفات سوف تتضمن خلايا من مسار سابق أو لاحق أو سليل من مسار سابق أو لاحق من تلك الخلايا المترسبة. تم وصف خلايا PER.C6 في براءة الاختراع الأمريكية رقم 5,994,128 و في (Fallaux et al, 1998). تكون تلك الخلايا مناسبة جدا بالنسبة لإنتاج فيروس الإنفلونزا لإنتاج لقاحات الإنفلونزا على الأساس الخلوي، حيث يمكن إصابتها و تكاثر الفيروس بكفاءة عالية، كما هو موصوف على سبيل المثال في (Pau et al, 2001) و WO 01/38362. تكون خلايا PER.C6 قادرة على النمو في معلق في غياب المصل، كما هو موصوف على سبيل المثال في (Yallop et al, 2005). تم في هذه الوثيقة توضيح أن تلك الخلايا تكون مناسبة جدا أيضا لإنتاج فيروس شلل الأطفال إلى مستويات عايلة في زراعات معلق خالي من المصل.

علاوة على ذلك، يمكن أن تكون الظروف المستخدمة بشكل اقتصادي وبتنظيم مميز.

لا يكون استخدام المواد الحاملة الدقيقة ضروريا للاختراع الحالي، على النقيض إلى العمليات المستخدمة على نطاق كبير باستخدام خلايا Vero. تساعد المواد الحاملة الدقيقة في التكاليف العالية لفيروس شلل الأطفال الناتجة باستخدام عمليات على أساس خلية Vero تقليدية.

يشير التعبير "خالي من المصل" وفقا للاختراع الحالي إلى أن الوسط المستخدم لنمو الخلية و الإصابة يفتقر لكل المصل في صورة مكون أساسي. لا يمكن أن تكون خالية تماما من منتجات مشتقة من المصل مثل على سبيل المثال ألبومين مصل بقري (BSA)، مع ذلك في تجسيدات مفضلة لا توجد تلك المكونات أيضا، أو تم إنتاجها بشكل مؤتلف في غياب أي مكونات مشتقة حيوانية. في تجسيدات مفضلة، يتم تنفيذ الطريقة بالكامل في غياب أي مكونات تم اشتقاقها مباشرة من الحيوانات، مثل المصل أو مكونات مصل،.. الخ. في تجسيد مفضل، يتم إجراء طريقة إنتاج لقاح في ظروف خالي من المكون الحيواني. يشير ذلك إلى أن الوسط المستخدم لنمو الخلية والإصابة يكون خالي من أي مكونات مشتقة حيوانية. علاوة على ذلك، تكون أي مواد إضافة، مستكملة بالوسط أثناء عملية إنتاج لقاح، خالية أيضا من مكونات مشتقة من الحيوانات. يؤدي غياب المكونات الحيوانية في عملية تحضير لقاح شلل الأطفال المذكور إلى إنتاج عملية يمكن التحكم بها بشكل أكثر و أمنة. لذلك السبب، تكون خلايا

PER.C6، التي تكون عبارة عن خلايا بشرية مميزة بالكامل و حيث يتم تطويرها بالتوافق مع GLP/GMP، ملائمة بشكل جيد جدا للاستخدام في تصنيع لقاح. يمكن استخدام أوساط زراعة مختلفة، واختيار وسط الزراعة الأمثل للخلايا وتكون الحالات المستخدمة جزء من المهام الروتينية للشخص الماهر في ذلك المجال. تكون أوساط الزراعة المناسبة لغرض الاختراع الحالي معروفة جيدا بالتالي للشخص الماهر و يمكن الحصول عليها بصورة عامة من مصادر تجارية بكميات كبيرة، أو تصنيع تقليدي وفقا للبروتوكولات العيارية. يمكن إجراء الزراعة على سبيل المثال في أطباق، زجاجات ملفوفة أو في مفاعلات حيوية، باستخدام أنظمة على دفعات، وبتغذية دفعية، و متواصلة و ما شبه ذلك. حتى يتم الحصول على تدرج كبير (مستمر) يفضل إنتاج فيروس من خلال زراعة الخلايا في الفن للحصول على خلايا قادرة على النمو في معلق، و يكون من المفضل الحصول على خلايا قادرة على الزراعة في غياب المصل المشتق من حيوان أو إنسان أو مكونات المصل المشتق من حيوان أو إنسان. تكون الظروف المناسبة لزراعة الخلايا معروفة (انظر على سبيل المثال، Tissue Culture, Academic Press, Kruse and Paterson, editors (1973), and R.I. Freshney, Culture of animal cells: A manual of basic technique, fourth edition (Wiley-Liss Inc., 2000, ISBN 0-471-34889-9). تشتمل أوساط الزراعة الخالية من المصل التي يمكن استخدامها وفقا للعمليات الخاصة بالاختراع وبدون تقييد على الأوساط العيارية التي يمكن شراءها من كتالوجات باعة الأوساط، بما في ذلك، CDM4PERMAb™ (Thermo Scientific HyClone، أرقام الكتالوجات SH30871، SH30872). علاوة على ذلك، يكون الوسط بالتجهيز العادي مثل Permexcis (Lonza) مناسبا. تكون أمثلة الأوساط الخالية من المصل الأخرى التي يمكن أن تكون مناسبة للاستخدام في عمليات الاختراع هي AEM (إنفيتروجين، cat. رقم 12582-011)، وسط EX-CELL™ VPRO (JRH Biosciences، رقم الكتالوج 14561) و CDM4Retino™ (هيكلون، أرقام كتالوج SH30520، SH30519).

في تجسيدات اختيارية وغير مقيدة محددة، يكون من الممكن استكمال الوسط الخالي من المصل في عمليات الاختراع باستخدام سوائل و/ أو نواتج تحلل المائي و/ أو مواد استكمال أخرى، لتحسين الإنتاجية أكثر.

يشير التعبير "حوالي" أو "تقريبا" للقيم العددية كما هي مستخدمة في الاختراع الحالي إلى القيمة ± 10 %.

يتم إجراء إصابة الخلايا بفيروس شلل الأطفال و/ أو تكاثر الفيروس في العمليات وفقا للاختراع الحالي على سبيل المثال بشكل مناسب عند درجة حرارة بين حوالي 33 درجة مئوية و 38 درجة مئوية. في تجسيدات مفضلة، يتم إجراء الإصابة و/ أو تكاثر الفيروس المذكورة عند درجة حرارة بين حوالي 34 درجة مئوية و 36 درجة مئوية، في تجسيدات معينة بين حوالي 34.5 درجة مئوية و 35.5 درجة مئوية، على سبيل المثال، عند حوالي 35 درجة مئوية.

يمكن أن تكون إصابة الخلايا بفيروس شلل الأطفال في العمليات وفقا للاختراع الحالي على سبيل المثال مناسبة للتنفيذ بإصابة متعددة (MOI) بين 0.001 و 10. في تجسيدات معينة، يتم إجراء الإصابة المذكورة عند MOI بين حوالي 1 و 3، على سبيل المثال عند MOI من حوالي 2. يمكن أن تؤدي الإصابة عند MOI عالية نسبيا (> 0.1، يفضل حوالي 1 أو أعلى) مرة أخرى إلى زيادة الكفاءة العالية، عملية بحصيلة عالية

وفقا للاختراع الحالي، يتم إصابة الخلايا بفيروس شلل الأطفال، على نحو مفضل عند كثافة خلية عالية. في السمات المحددة يتم إجراء الإصابة بفيروس شلل الأطفال عندما تكون للخلايا كثافة بين 1×10^6 خلية/ مل و 150×10^6 خلية/ مل، على نحو مفضل بين 2×10^6 خلية/ مل و 150×10^6 خلية/ مل. في تجسيدات محددة مفضلة، يتم إجراء الإصابة المذكورة بكثافة خلية بين حوالي 5×10^6 خلية/ مل و 20×10^6 خلية/ مل، على سبيل المثال بين حوالي 8×10^6 خلية/ مل و 15×10^6 خلية/ مل، على سبيل المثال عند حوالي 10×10^6 خلية/ مل. بقدر علمنا، تقدم العمليات الخاصة بالاختراع أعلى تركيزات خلوية عندها يتم تصنيع لقاحات فيروسية غير غدانية. تتمثل مميزات تلك العمليات وفقا للاختراع في أنه يمكن إنتاج عيارات حجمية فيروس شلل الأطفال عالية جدا، أي، على الأقل مقدار أكبر منه باستخدام عمليات Vero التقليدية من الفن السابق.

في العمليات وفقا للاختراع، يتم تجميع فيروس شلل الأطفال خلال مدة زمنية بين 12 و 48 ساعة بعد الإصابة. في تجسيدات معينة، يتم إجراء التجميع المذكورة لفيروس شلل الأطفال خلال مدة زمنية بين حوالي 18 و 30 ساعة بعد الإصابة، على سبيل المثال بين حوالي 20 و 28 ساعة، بين حوالي 22 و 26 ساعة بعد الإصابة، على سبيل المثال، عند حوالي 24 ساعة بعد الإصابة. وبالتالي، يمكن استخدام العمليات وفقا للاختراع للحصول على عيارات حجمية فيروس شلل الأطفال العالية بسرعة عالية جدا، مما يساعد أيضا في إجراء العمليات الخاصة

بالاختراع التي تكون جذابة بشكل اقتصادي شديد بالمقارنة بالعمليات الأكثر طولا التي تكون تقليدية في الفن.

يتم تشغيل معظم مزارع المعلقات علي نطاق واسع في صورة عمليات على دفعات أو بتغذية على دفعات لأنها تعتبر الأكثر بساطة في التشغيل والتدرج، وتكون تلك العمليات مناسبة من حيث المبدأ للعمليات الخاصة بالاختراع الحالي. ومع ذلك، فإن العمليات المتواصلة على أساس مبادئ التشبع في طريقها الي أن تكون أكثر شيوعا. وفي تجسيدات معينة من الاختراع الحالي يتم زراعة الخلايا المنتجة في نظام تشبع.

تم استخدام عمليات على دفعات، وبتغذية دفعية، وتشبعية، و إنتاج تشبعي باستخدام خلايا PER.C6، على سبيل المثال، لإنتاج جسم مضاد مأشوب. في الزراعات الدفعية، يتم الوصول إلى خلية حية بتركيز أعلى من 12×10^6 خلية/ مل بشكل روتيني. يعرض تركيز الخلية الحية إلى 40×10^6 خلية/ مل عدة مرات باستخدام تغذية على دفعات. في عمليات التشبع، يتم الوصول إلى ذروة تركيزات خلية أعلى من 150×10^6 خلية/ مل بشكل روتيني (Kral et al, 2009).

يكون للزراعة التشبعية للخلايا معناها التقليدي في الفن، أي، يشير ذلك إلى أنه أثناء الزراعة يتم حفظ الخلايا بواسطة جهاز فصل يوجد به تدفق خارج من السائل له كثافة خلية أقل منها قبل الفصل وحيث بها يوجد تدفق داخل من وسط زراعة الخلايا. تستجيب زراعة التشبع لتحدي نمو الخلايا عند كثافات عالية (على سبيل المثال، $10\text{-}50 \times 10^6$ خلية حية / مل). حتى يتم زيادة الكثافات، يتم استبدال الوسط باستمرار، أو بشكل متقطع باستخدام إمداد حديث حتى يتم تعويض النقص في التغذية ولإزالة المنتجات السامة. يسمح التشبع أيضا بالتحكم الأفضل في بيئة الزراعة (الرقم الهيدروجيني، dO_2، مستويات المغذيات،..الخ). يمكن تشبع وسط حديث خلال الزراعة عن طريق حفظ الخلايا باستخدام مجموعة مختلفة من أدوات الفصل (على سبيل المثال، مرشح بشكة دوارة دقيقة، ألياف مجوفة أو مرشحات بغشاء لوحة مستوية، أنابيب تسوية). في تجسيدات معينة، تكون أداة الفصل عبارة عن وحدة ترشيح تتضمن ألياف مجوفة، أي، أغشية أنبوبية. يكون القطر الداخلي للأنبوب عادة بين 0.3 و 6.0 مم، على سبيل المثال بين 0.5 و 2.0 مم. في تجسيدات معينة، يتم اختيار حجم الشبكة (حجم الثقب) في الغشاء بحيث يقترب حجم الثقوب في الشبكة من قطر الخلايا، مما يضمن احتفاظ عالي للخلايا بينما تمر حطام الخلية عبر المرشح. في تجسيدات أخرى، يكون حجم الشبكة أصغر بشكل ملحوظ من قطر الخلايا. على نحو مفضل، يكون حجم الشبكة بين 0.1-30

ميكرو متر، على سبيل المثال، بين 0.1 و 3 ميكرو متر، على سبيل المثال، حوالي 0.2 ميكرو متر. تكون وحدات المرشح التي تتضمن ألياف مجوفة متاحة تجاريا من على سبيل المثال General Electric (formerly Amersham).

يتم استخدام التشبع لحفظ المستويات المرغوب فيها من المواد الأيضية المحدد ولإزالة وبالتالي خفض الملوثات في وسط الزراعة. يمثل ذلك نموذجيا الحالة التي لا يتم بها تنفيذ التشبع في كل المرات أثناء الزراعة ويتم تنفيذه بصورة عامة فقط من آن إلى آخر أثناء الزراعة حسب الحاجة. على سبيل المثال، لا يبدأ التشبع نموذجيا إلا بعد بداية استنفاد مكونات الوسط المحددة مثل الجلوكوز وتتطلب استبدالها.

تكون أنظمة التشبع المختلفة معروفة في الفن وتكون مناسبة من حيث المبدأ للاستخدام في العمليات الخاصة بالاختراع الحالي. يشير التعبير "نظام تشبع" إلى توليفة من مفاعل حيوي متصل بأداة فصل. يمكن تضمين إما أداة الفصل في المفاعل الحيوي (على سبيل المثال، مرشح بشكة دوارة دقيقة) أو تبقى خارج المفاعل الحيوي (على سبيل المثال، ألياف مجوفة). في كلا الحالتين، كما هو موضح أعلاه، تمنع أداةا لفصل غسل كتلة الخلية من المفاعل وتمكن من إعادة تنشيط الوسط. في تجسيدات معينة، يتم تشغيل المفاعلات الحيوية باستخدام (توصيلها بـ) نظام تشبع تدفق تماسي بالتناوب (ATF) (على سبيل المثال، نظام ATF، Refine Technology, Co., East Hanover, NJ). يمكن تحقيق التدفق التماسي وفقا لطرق معروفة لشخص ماهر في الفن و كما هو موصوف في، على سبيل المثال، US 6,544,424. تم وصف نظام التشبع ATF، ويكون قابل لتعديل حجمه (Furey, 2002). تسمح أنظمة ATF بزراعة الخلايا لمدة زمنية أطول وللوصول إلى كثافات خلوية عالية بدون الحصول على مرشح مسدود. في الحقيقة، يمكن الحصول على كثافات خلوية عالية جدا تزيد عن 100×10^6 خلية حية / مل باستخدام نظام تشبع ATF، على سبيل المثال، باستخدام خلايا PER.C6 (انظر على سبيل المثال، Yallop et al, 2005 و WO 2005/095578). مع ذلك، في تلك التقارير الحديثة يتم استخدام خلايا PER.C6 في أنظمة التشبع للإنتاج المؤتلف للأجسام المضادة، أي، غرض مختلف بالكامل، وغير مصابة بفيروس شلل الأطفال.

في تجسيدات معينة، يكون التشبع على سبيل المثال باستخدام نظام ATF مميزا أثناء طور الزراعة السابق (أي، قبل الإصابة بفيروس شلل الأطفال)، حيث تسمح بإنتاج كثافات خلوية عالية جدا، و تكون الخلايا في ظروف جيدة للإصابة التالية بفيروس شلل الأطفال. حتى يتم الوصول إلى الكثافات الخلوية العالية المذكورة، يكون وسط الزراعة في تجسيدات معينة على

الأقل متشبع جزئيا أثناء جزء من الفترة أثناء نمو الخلية. في تجسيدات معينة، يتم بدء التشبع بمجرد الوصول إلى كثافة خلية بين حوالي 2×10^6 خلية حية / مل و 8×10^6 خلية حية / مل.

في العمليات الخاصة بالاختراع، يتم إصابة الخلايا بفيروس شلل الأطفال. نموذجيا، سوف يتعرض الفيروس إلى الخلايا منتجة الملائمة تحت ظروف مثالية، مما يعزز من سحب الفيروسات. يعرف الشخص الماهر في الفن كيفية الحصول على الظروف المثالية الإضافية، أي، بالنسبة للتكاثر، الرقم الهيدروجيني، الأكسجين المذاب (dO_2 أو DO). عادة، تكون الإثارة المثالية بين حوالي 50 و 300 لفة بالدقيقة، نموذجيا حوالي 100-200، على سبيل المثال، حوالي 150، نموذجيا DO هي 5-60 %، يكون الرقم الهيدروجيني المثالي بين 6.7 و 7.7. نموذجيا، يصيب فيروس شلل الأطفال الخلايا الخاصة بالاختراع بصورة عفوية، و يجعل الخلايا الملامسة لجسيمات فيروس شلل الأطفال كافية لإصابة الخلايا. بصورة عامة، يتم إضافة خام أنوية فيروس شلل الأطفال إلى الزراعة لبداية الإصابة، و بعد ذلك يتكاثر فيروس شلل الأطفال في الخلايا.

يكون من الممكن بشكل مفيد إصابة الخلايا المستنبة وفقا للاختراع بفيروس شلل الأطفال بكثافات خلوية عالية، أي، حوالي 10×10^6 خلية/ مل، و يمكن الحصول على عيارات حجمية عالية جدا (أكبر من 10^{10} CCID50/ مل) من فيروس شلل الأطفال.

في تجسيدات معينة، يتم حفظ قابلية الخلايا المستنبتة للحياة قبل الإصابة أعلى من 75 %، مما يشير إلى على الأقل 75 % من إجمالي كمية الخلايا في الزراعة تكون حية عند لحظة الإصابة. في تجسيدات معينة، تكون قابلية الخلايا المستنبتة للحياة عند الإصابة على الأقل 80 %، في تجسيدات أخرى على الأقل 85 %. يمكن قياس قابلية الحياة باستخدام طرق روتينية متاحة للشخص الماهر، على سبيل المثال، استبعاد التربان الأزرق، عد الخلايا Casy، و ما شابه ذلك.

في تجسيد محدد، تكون كثافة الخلايا عند الإصابة بين حوالي 10×10^6 و 50×10^6 خلية حية / مل، على سبيل المثال، بين حوالي 10×10^6 و 20×10^6 خلية حية / مل، على سبيل المثال، بين حوالي 10×10^6 و 15×10^6 خلية حية / مل. تسمح تلك الكثافات الخلوية بإنتاجية فيروسية عالية بتراكم محدود لحطام الخلية وخلية DNA المضيف، حيث تعطي ميزة لتلك التجسيدات في معالجة تالية لتجميع لفيروس شلل الأطفال. وبالتالي، يقدم

الاختراع الحالي عملية محسنة لإنتاج فيروس شلل الأطفال، تنتج عيارات حجمية عالية من فيروس شلل الأطفال، بينما في نفس الوقت توفير مادة مجمعة يمكن التحكم بها لأغراض المعالجة التلالية.

في تجسيدات أخرى، تكون كثافة الخلايا عند الإصابة بين حوالي 15×10^6 و 150×10^6 خلية/ مل، على سبيل المثال، بين حوالي 15×10^6 و 80×10^6 خلية/ مل، على سبيل المثال، بين حوالي 20×10^6 و 50×10^6 خلية/ مل. يمكن إنتاج إصابات عند تلك الكثافات الخلوية حتى عند تركيزات أعلى من الفيروسات.

في تجسيدات معينة من الاختراع، يتم تقديم طريقة لإنتاج كتلة فيروس شلل الأطفال بعيار على الأقل 10^{10} CCID50/ مل.

يتم التعبير عن العيار بـ CCID50، حيث يكون 50 % من جرعة إصابة زراعة الخلايا. في بعض الأحيان يشار له أيضا بـ $TCID_{50}$ (50 % من جرعة إصابة زراعة نسيج)، ولكن يتم تحديدها بواسطة زراعة خلية، يتم استخدام التعبير CCID50 في هذه الوثيقة.

يتم وضع الفيروس في تلامس مع الخلايا للسماح للفيروسات بإصابة الخلايا المذكورة وللتكاثر. على سبيل المثال، يتم إضافة الكثير من الأنوية الفيروسية إلى زراعة الخلايا وتركها لتمتص على الخلايا، على سبيل المثال لمدة حوالي 30 دقيقة عند تقليب معتدل (على سبيل المثال، حوالي 30 لفة بالدقيقة)، بعد ذلك يمكن إضافة كمية أخرى من وسط زراعة و تعديل الرقم الهيدروجيني عند الحاجة، يمكن تعديل سرعة التقليب وحفظ الزراعة. بعد خطوة الإصابة، يحدث تضخيم لعدد الجسيمات الفيروسية. وبالطبع، يتم إجراء تلك الخطوة أيضا على نحو مفضل في خلايا PER.C6 التي تم زراعتها في معلق في غياب المصل، و على نحو مفضل أكثر تحت ظروف تكون خالية تماما من المكونات المشتقة مباشرة من الحيوانات. يمكن إجراء هذه الخطوة بشكل مناسب في مفاعلات حيوية، على سبيل المثال، بتدرج بين 1 و 20000 لتر، على سبيل المثال، بين 10 و 2000 لتر، على سبيل المثال، بين 50 و 1000 لتر حيث يمكن تعديل التدرج حسب الطلب على اللقاح. في تجسيدات معينة، يكون المفاعل الحيوي عبارة عن مفاعل حيوي للاستخدام مرة واحدة (SUB).

بعد تكاثر فيروس شلل الأطفال في الخلايا، يتم تجميع الفيروس أو مكوناته من الخلايا المستنبتة. يمكن إجراء ذلك بواسطة طرق روتينية، حيث تكون معروفة للشخص الماهر. يمكن فصل الفيروس الناتج والمنطلق في وسط زراعة الخلايا من الكتلة الحيوية الخلوية

بواسطة طرق تقليدية، مثل الفصل بالطرد المركزي أو الترشيح الفائق، والتجميع في المادة الطافية. في تلك الحالة يكون الفصل بالطرد المركزي أو الترشيح عبارة عن خطوة تجميع. يمكن استخدام عمليات تقليدية لتجميع الفيروس، على سبيل المثال تلك الموصوفة في US 4,525,349. على نحو مختصر، يتم سحب معلق الوسط السائل المحتوي على الفيروس، وترشيحه و تركيزه بواسطة، على سبيل المثال الترشيح الفائق. على سبيل المثال، عند نهاية الزراعة، يتم إجراء التجميع عن طريق تجميع وسط الزراعة المحتوي على المعلق الفيروسي. يمكن ترشيح التجميع، على سبيل المثال، باستخدام مرشح 0.22 ميكرو متر، و اختياريا تخزينه عند 4 درجة مئوية.

يمكن الترشيح الفائق للتجميع المرشح اختياريا لتركيز معلق الفيروس، و بعد ذلك، يمكن تنقية فيروس شلل الأطفال، على سبيل المثال، باستخدام ترشيح بالجل و/ أو كروماتوجراف تبادل أيوني، على سبيل المثال بإتباع الإجراءات الموصوفة في US 4,525,349، أو في (Van Wezel et al, 1978). يمكن تخفيف معلق الفيروس المركز الناتج اختياريا، ولتحضير IPV سوف يكون فيروس شلل الأطفال بها معطلا، حيث يمكن استخدام الطرق التقليدية لذلك.

يتم استخدام طرق لتجميع و تنقية فيروس شلل الأطفال أو مكونات فيروسية، و إنتاج لقاحات منها في الفن لعدة عقود بالفعل، وبالتالي تكون معروفة جيدا و تم وصفها بالتفصيل، على سبيل المثال في (Van Wezel et al, 1978; Montagnon et al, 1984؛ WO 2007/007344؛ US 4,525,349)، all تم تضمين محتوياتها في هذه الوثيقة كمرجع.

تعتمد لقاحات شلل الأطفال على فيروس الكبد أو فيروس معطل. حيث تحتوي على مستضد D لفيروس شلل الأطفال، حيث يكون هو المستضد الحامي الضروري. يمكن قياس الحصيلات الفيروسية بواسطة تقنيات معايرة فيروسية قياسية، حيث يتم إجراء تحديد تركيز مستضد D أيضا بواسطة تقنيات روتينية مرعوفة جيدا للشخص الماهر، على سبيل المثال، تجربة ELISA مستضد D. يمكن تحديد الاستمناع على سبيل المثال بواسطة في اختبار في الكائن الحي في الحيوانات. يمكن تحديد القوة باستخدام ELISA مستضد D و بواسطة تجربة فيروس شلل الأطفال المعادل لزراعة الخلايا على أمصال من جرذان محصنة سابقا.

بصفة عامة، تم زراعة كل سلالات فيروس شلل الأطفال في عملية منفصلة، و إذا تم التحضير السريع للقاح ثلاثي النسخ يحتوي على الأنواع الثلاث من فيروس شلل الطفال، يتم خلط الفيروسات (معطلة، لـ IPV) و صياغتها لتحضير الجرعات المستقلة. في تجسيدات

معينة على سبيل المثال، يمكن أن يشتمل اللقاح النهائي لكل جرعة (على سبيل المثال، 0.5 مل) على سبيل المثال على 40وحدة مستضد D (DU) من فيروس شلل الأطفال من النوع 1، 8 DU من فيروس شلل الأطفال من النوع 2 و 32 DU من فيروس شلل الأطفال من النوع 3، محددة بواسطة مقارنة المستحضرات المرجعية.

يمكن تعطيل فيروس شلل الأطفال وفقا لطرق معروفة في الفن، على سبيل المثال باستخدام فورمالين أو باستخدام β- بروبيو لاكتون (BPL) (انظر على سبيل المثال، Jiang et al, 1986). في تجسيدات معينة، يتم إجراء التعطيل باستخدام فورمالين، على سبيل المثال بواسطة الطريقة التالية: يتم ترشيح المعلق الفيروسي المنقى فوق غشاء 0.22 ميكرو متر، وتسخينه إلى 37 درجة مئوية باستخدام مقلب مغناطيسي جاهز لمدة 24 ساعة، بعد ذلك يتم إضافة محلول الفورمول للوصول إلى تركيز 1 لكل 4000. في حين تم حفظ المعلق الفيروسيب عند 37 درجة مئوية، واستمر التقليب المغناطيسي لمدة أول أربعة أيام. في اليوم السادس، تم ترشيح المعلق الفيروسي فوق غشاء 0.22 ميكرون، واستكمل التعطيل تحت معلق عند 37 درجة مئوية حتى اليوم الثاني عشر. تمت مجانسة المعلق الفيروسي المعطل ويمكن تخزينه، على سبيل المثال، عند 4 درجة مئوية. بعد هذه الخطوة، يمكن تحضير الدفعات المركزة و/ أو النهائية للإعطاء على سبيل المثال عن طريق خلط المستحضرات المرغوب فيها.

في تجسيدات معينة، يتم صياغة فيروس شلل الأطفال المنقى أو المكون الفيروسي في تركيبة صيدلانية. يمكن إجراء ذلك وفقا لمجموعة من الطرق و باستخدام مجموعة من المحاليل المنظمة كلها وفقا لنظام طرق معروفة جيدا لشخص ماهر في الفن. بصفة عامة، يستتبع ذلك إدخال جسيمات فيروس شلل الأطفال في تركيبة مقبولة صيدلانيا، تتضمن فيروس شلل الأطفال وعلى الأقل سواغ مقبول صيدلانيا. يمكن تحضير تلك التركيبة تحت ظروف معروفة للشخص الماهر، وفي تجسيدات معينة تكون مناسبة للإعطاء للبشر. في تجسيدات معينة، يمكن أن تشتمل التركيبة على وسط زراعة منظم، حيث يمكن اختياريا أن يكون Medium M-199، حيث يمكن استخدامه في صورة منظمة للصياغة للقاحات شلل الأطفال المعطل التقليدية المسجلة. علاوة على ذلك، يمكن استخدام محلول فوسفات منظم، ويمكن أن تشتمل صياغات الجرعة النهائية على سبيل المثال على 0.5 % من 2- فينوكسي إيثانول و بحد أقصى 0.02 % من فورمالدهيد لكل جرعة في صورة مواد حافظة مضادة للباكتريا.

تكون المواد الحاملة أو السواغات المقبولة صيدلانيا والمواد المخففة معروفة جيدا في الفن وتستخدم كثيرا على نطاق واسع من المنتجات العلاجية. على نحو مفضل، يمكن استخدام مواد حاملة لتعمل جيدا في لقاحات. في تجسيدات معينة، تشتمل اللقاحات أيضا على مادة مساعدة، على سبيل المثال، الشب. تكون المواد المساعدة معروفة في الفن للزيادة الإضافية للاستجابة المناعية لمحددات مستضد مستخدمة.

بالنسبة للإعطاء للبشر، يمكن أن يستخدم الاختراع تركيبات صيدلانية تتضمن فيروس شلل الأطفال و مادة حاملة مقبولة صيدلانيا أو سواغ. في السياق الحالي، يشير التعبير "مقبول صيدلانيا" إلى أن المادة الحاملة أو السواغ، عند الجرعات و التركيزات المستخدمة، سوف لن تؤدي إلى أي تأثيرات غير مرغوب فيها أو ضارة في الحالات المرضية التي يتم إعطاءها. تكون تلك المواد الحاملة والسواغات المقبولة صيدلانيا معروفة جيدا في الفن (انظر Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, A. R. Gennaro, Ed., Mack Publishing Company [1990]؛ Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins, S. Frokjaer and L. Hovgaard, Eds., Taylor & Francis [2000]؛ و Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd edition, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press [2000]). يتم صياغة فيروس شلل الأطفال المعطل المنقى أو أجزاء استمناعية منه على نحو مفضل و إعطاؤه في صورة محلول معقم. يتم تحضير المحاليل المعقمة بواسطة الترشيح المعقم أو بواسطة طرق معروفة أخرى بحد ذاتها في الفن. يتم بعد ذلك تجفيف المحاليل بالتجميد أو ملئها في حاويات جرعات صيدلانية. يكون الرقم الهيدروجيني للمحلول بشكل عام في النطاق من رقم هيدروجيني 3.0 إلى 9.5، على سبيل المثال رقم هيدروجيني 5.0 إلى 7.5. يكون فيروس شلل الأطفال أو أجزاء استمانعية منه نموذجيا في محلول يحتوي على منظم مقبول صيدلانيا مناسب، ويمكن أن يحتوي المحلول من فيروس شلل الأطفال أيضا على ملح. اختياريا يمكن أن يوجد عامل تثبيت اختياري، مثل ألبومين. في تجسيدات معينة، يتم إضافة مادة مطهرة. في تجسيدات معينة، يمكن صياغة اللقاح في مستحضر قابل للحقن. تكون تلك الصياغات المحتوية على كميات فعالة من فيروس شلل الأطفال أو أجزاء استمناعية منه، إما في صورة محاليل سائلة معقمة، أو معلقات سائلة أو صور مجففة بالتجميد اختيارية وتحتوي على مواد مثبتة أو سواغات.

يمكن أن يكون لقاح شلل الأطفال أحادي التكافؤ، يحتوي على أحد أنواع فيروس شلل الأطفال (النوع 1، 2 أو 3)، أو ثنائي التكافؤ (يتضمن نوعين من فيروس شلل الأطفال، على سبيل

المثال، الأنواع 1 و 2، 1 و 3 أو 2 و 3)، أو ثلاثي التكافؤ (يتضمن ثلاث أنواع من فيروس شلل الأطفال، أي، الأنواع 1، 2 و 3).

يكون من الممكن إنتاج IPV من فيروسات شلل الأطفال من النوع البري. على نحو بديل، يمكن إنتاج IPV من فيروس شلل الأطفال حي غير سام، على سبيل المثال، من سلالات Sabin، حيث سوف تقلل من خطر إعادة تقدم فيروس شلل الأطفال من النوع البري من تصنيع IPV (انظر على سبيل المثال، WO 2007/007344، و Doi et al, 2001). يكون الاختراع الحالي مناسبا لإنتاج فيروس شلل الأطفال من النوع البري (الأنواع 1، 2 و 3، على سبيل المثال، سلالة Mahoney من النوع 1، سلالة MEF من النوع 2، أو سلالة Saukett من النوع 3) بالإضافة إلى الأنواع غير السامة من فيروس شلل الأطفال (على سبيل المثال، سلالات Sabin). وبالتالي يمكن استخدام الاختراع لإنتاج فيروس شلل الأطفال لـ IPV، بالإضافة إلى OPV. يمكن أن تعمل العمليات وفقا للاختراع المطبقة لإنتاج IPV لخفض التكاليف إلى المدى الذي يمكن أن يجعل IPV متاح للدول الأقل و أدنى تقدم. بصفة عامة، على الرغم من أن OPV يكون أرخص من IPV عند تحضيره وفقا للطرق التقليدية، يمكن أن تستمر العمليات عالية الكفاءة وفقا للاختراع في خفض تكاليف المادة الكتلية لـ OPV وبالتالي تقلل تكاليفه أيضا.

يمكن إعطاء لقاح شلل الأطفال على سبيل المثال في العضل، تحت الجلد، أو عبر الفم، وفقا لطرق معروفة في الفن.

يمكن استخدام لقاح شلل الأطفال الذي يمكن الحصول عليه وفقا للاختراع في صورة لقاح أحادي السلالة، ولكن في تجسيدات أخرى يمكن أن تكون مجمعة مع لقاحات أخرى في الطريقة العادية، على سبيل المثال، في صورة لقاح مركب ضد السعال الديكي والدفتيريا والكزاز وشلل الأطفال ويمكن أن يشتمل اختياريا أيضا على مكونات لقاح، على سبيل المثال، ضد الالتهاب الكبدي ب و/ أو النزلة المستديمة،.. الخ، وبالتالي، يكون فيروس شلل الأطفال مناسب للاستخدام في نظام ممتد على التطعيم (EPI)، و يمكن تجميعه مع اللقاحات في ذلك البرنامج. بصورة مشابهة لقاحات شلل الأطفال التقليدية، يمكن إعطاء اللقاح وفقا للاختراع في صورة جرعة واحدة، أو على نحو مفضل في أنظمة أنظمة تعزيز رئيسية حيث يتم إعطاء عدة جراعات من اللقاح مع فترات زمنية ملائمة، على سبيل المثال، حقنتين بفترة زمنية من 1- 2 شهر، يليها جرعة معززة بعد 6- 12 شهر؛ أو على سبيل المثال جرعة أولية عبر الفم، يليها جرعة ثانية بعد حوالي 8 أسابيع و جرعة ثالثة 8-12 أشهر بعد الجرعة الثانية؛ أو على

سبيل المثال للرضع جرعة أولى عبر الفم بعمر 6-12 أسابيع، يليها جرعة ثانية حوالي 8 أسابيع بعد الجرعة الأولى والجرعة الثالثة بعمر حوالي 6-18 أشهر؛ أو على سبيل المثال فقط جرعة واحدة للأشخاص الذي تناولوا لقاح سابقا عند خطر عالي؛.. الخ. يمكن تحديد نظام الجرعة المثالث وفقا للممارسة الطبية القياسية وسوف يتبع بشكل عام نفس المخططات كما هي متاحة للقاحات شلل الأطفال.

تم شرح الاختراع مرة أخرى في الأمثلة التالية. لا تقيد الأمثلة الاختراع بأي حال. ولكن تعمل فقط على توضيح الاختراع.

أمثلة

المثال 1: كفاءة إنتاج فيروس شلل الأطفال على خلايا PER.C6 تابعة

حتى يتم اختبار تكاثر فيروس شلل الأطفال على خلايا PER.C6 تابعة ولتوليد خزائن فيروسية، تم الحصول على فيروس شلل الأطفال من النوع 1 (Brunenders)، النوع 2 (MEF-1) و النوع 3 (Sauckett)، من SBL (Sweden). كانت عيارات حجمية تلك الخزانات، تم إنتاج كل منها على خلايا Vero، حوالي 10^6 CCID50/ مل. تم إنماء خلايا PER.C6 (Fallaux et al, 1998) في وسط زراعة (DMEM مع 10 % FBS و 10 ملي مولار $MgCl_2$). تم نشر ثلاث دوارق من T175 باستخدام 30 × 10^6 خلايا PER.C6 / الدورق في 25 مل وسط زراعة لكل نوع من فيروس شلل الأطفال و تلقيحها اليوم التالي باستخدام إصابات متعددة (MOI) من 0.1 (0.1 CCID50/ خلية) عند 37 درجة مئوية و 10 % CO_2 في جهاز احتضان رطوبي. في أخر ثلاثة أيام، تم تجميع الخلايا والوسط وتم تحضير حلالات خام بواسطة دورتين تجميد/ إذابة. بعد الفصل بالطرد بالمركيز لإزالة حطام الخلايا، تم تقسيم المواد الطافية في قسائم متساوية وتخزينها عند -80 درجة مئوية. وعلى التوازي، تم نشر دورق T175 باستخدام 6.25 × 10^6 خلايا Vero في 25 مل وسط زراعة خلايا Vero (وسط Optipro SFM مستكمل بـ 4 ملي مولار من L- جلوتامين) لكل سلالة من فيروس شلل الأطفال و إصابتها بنفس MOI. تم أيضا تجميع مستنبتات Vero بعد 3 أيام، وتجميدها/ إذابتها مرتين و تقسيمها للتخزين.

تمت معايرة إنتاج فيروس شلل الأطفال بعد ذلك باستخدام تجربة CCID50 باستخدام خلايا خلايا Vero. حيث بها، تم نشر 1.25 × 10^4 من خلايا Vero في كل عين من لوحة ذات 96 عين في وسط 100 ميكرو لتر و الاحتضان عند 37 درجة مئوية و 5 % CO_2. في اليوم

التالي، تم تحضير سلسلة من 15 تخفيف خمسة أضعاف من عينات فيروس شلل الأطفال في وسط زراعة خلايا Vero وتمت إضافة 100 ميكرو لتر من التخفيفها رقم 5 إلى 15 إلى العمود 1 إلى 11 في اللوحة ذات 96 عين في ثمانية أضعاف. يعمل العمود 12 في صورة عمود مقارن غير مصاب. في أخر سبعة أيام تم تحليل العيون لتحديد حدوث التأثير الممرض للخلايا (CPE) و احتساب العيارات حجمية باستخدام طريقة Spearman-Kärber:

الحد النهائي للعيار (لو$_{10}$) = X_o- d/2+d/n*ΣX_i

حيث X_o هي قيمة لو$_{10}$ من أعلى تخفيف حيث عنده تكون كل التلقيحات لا تزال موجبة، d هي قيمة لو$_{10}$ من معامل التخفيف المستخدم، n هي عدد التكرارات عند كل تخفيف و ΣX_i هي إجمالي كل العيون التي تحتوي على تخفيف موجب X_o.

تم عرض نتائج تجربة المعايرة في الشكل 1 وتوضح عدم وجود خلايا PER.C6 تابعة حيث تكون العيارات حجمية >5 مرات أكبر من على خلايا Vero لفيروس شلل الأطفال من النوع 1 و >10 مرات أعلى في حالة النوع 2 و 3. من المتوقع أن تكون الاختلافات في إنتاج جسيمات فيروسية لكل خلية من المتوقع أصغر حيث يتم نشر خلايا PER.C6. بالنسبة لكل PER.C6 و Vero تم تقدير اقتران الخلية أحادية الطبقة لتكون ~80 %.

من هذه الاختبارات تم استنتاج أن إنتاج فيروس شلل الأطفال على طبقات أحادية تابعة لخلايا PER.C6 على الأقل بمقدار الجودة على خلايا Vero.

المثال 2 كفاءة إنتاج فيروس شلل الأطفال في خلايا PER.C6 في معلق

لفحص تكاثر فيروس شلل الأطفال على خلايا PER.C6 في معلق، تم إجراء تجارب على نطاق صغير لاختبار أوساط الزراعة المختلفة، إصابات متعددة (MOI) و زمن التجميع (TOH). حيث بها، تم زراعة خلايا PER.C6 في ثلاث أوساط مختلفة: AEM (إنفيتروجين)، BMIVg (متاح تجاريا باسم Permexcis™، من Lonza) و CDM4PERMAb (هيكلون). في يوم الإصابة، تم عد الخلايا المستنبة في نوع واحد من الأوساط و إعادة نشرها في نفس نوع الوسط بكثافات خلوية مختلفة (1.5، 2.5، 3.5 أو 5 مليون خلية/ مل) و إصابتها بـ MOIs مختلفة (0.01، 0.05 أو 0.1 CCID50/ خلية) عند 37 درجة مئوية في جهاز احتضان رطوبي على منصة اهتزاز. تحتوي المنصة (IKA KS 260) على 10 مم من قطر مداري وتم استخدامها عند 100 لفة بالدقيقة بالنسبة لدوارق هزازة سعة 125 أو 250 مل ممتلئة بوسط 15-20 مل. لوسط AEM، تم نشر الخلايا عند 1.5 أو 2.5 مليون خلية/ مل حيث

AEM لا تحمل كثافات خلوية أعلى. بهذه الطريقة تم تحضير عدة زراعات التي تم تجميعها 2، 3 أو 4 أيام بعد الإصابة. تم تجميد/ إذابة كل العينات مرتين والحفظ عند -20 درجة مئوية أو أقل حتى التحليل الإضافي.

الشكل 2 يصور نتائج معايرة تلك العينات بالنسبة لعينات يوم 2 و يوم 4 (لم يتم عرض بيانات يوم 3). تكون خلايا PER.C6 التي تنمو ومصابة في كل الأوساط الثلاثة قادرة على إنتاج عيارات حجمية عالية من فيروس شلل الأطفال من النوع 1، على الرغم من أن وسط BMIVg يعني عيارات حجمية أقل بعض الشيء بالمقارنة بوسط PERMAb و AEM. علاوة على ذلك، لا يؤدي الاحتضان الأطول إلى عيارات حجمية أعلى. وعلى النقيض، يعطي تجميع اليوم 2 في معظم الحالات عيارات حجمية أعلى بالمقارنة بتجميعات يوم 3 و 4. لا يمكن رؤية تأثير ثابت لاختلاف MOIs في هذه التجربة. على نحو هام، لا يؤدي استخدام كثافات خلوية أعلى عند الإصابة إلى عيارات حجمية حجمية أعلى مما يوضح أن عملية زراعة معلق باستخدام كثافات خلية عالية تكون مفيدة لحصيلة إصابة فيروس شلل الأطفال.

في تجربة تالية ، تمت مقارنة زمن التجميع ودرجة الحرارة أثناء الإصابة بكل سلالات فيروس شلل الأطفال الثلاث. حيث بها، تم نشر الخلايا في وسط AEM عند 2.5×10^6 خلية/ مل بأحجام 15 مل في دوارق هزازة و إصابتها بـ MOI بتركيز 0.1 عند 37 درجة مئوية و عند 35 درجة مئوية من كل سلالة فيروس شلل الأطفال. تم تجميع الخلايا والوسط 2، 3 و 4 أيام بعد الإصابة ومعالجتها كما هو موصوف أعلاه. تم إجراء تحليل إنتاج الفيروس تحت الظروف المختلفة بواسطة تحديد قيم CCID50 كما هو موصوف أعلاه و تعرض زيادة في الحصيلة عند 35 درجة مئوية بالمقارنة بـ 37 درجة مئوية لكل الأنواع الثلاثة من فيروس شلل الأطفال (الشكل 3). بالإضافة لذلك يمكن تأكيد ذلك و تطبيقه على فيروس شلل الأطفال من النوع 2 و 3 حيث في معظم الحالات يتم قياس أعلى العيارات حجمية عند أخذ التجميعات عند يوم 2.

المثال 3: زيادة حصيلة فيروس شلل الأطفال على معلق خلايا PER.C6 عند كثافة خلوية أعلى

لدراسة ما إذا كانت زيادة أخرى في كثافة الخلية تؤدي إلى زيادة في عيار الفيروس، تمت مقارنت إنتاجات باستخدام 2.5×10^6 خلية/ مل مع 10×10^6 خلية/ مل. حيث بها، تم نشر خلايا PER.C6 في وسط PERMAb بحجم 15 مل في دوارق هزازة عند كثافات الخلية

المشار إليها و إصابتها بـ 2 CCID50/ خلية من فيروس شلل الأطفال من النوع 1 في ثلاث نسخ. بعد 24 و 48 ساعة تم تجميع الخلايا و الوسط و تم تحضير حلالات نظيفة بالتجميد/ الإذابة وفصلها بالطرد المركزي كما هو موصوف أعلاه. بالإضافة إلى درجات الحرارة المختبرة سابقا 35 و 37 درجة مئوية، تم تنفيذ التجربة أيضا عند 33 درجة مئوية.

أكد تحليل العيارات حجمية بواسطة تجربة CCID50 (الشكل 4) أنه تم تحسين الحصيلة عند إصابة الخلايا عند كثافة 10×10^6 خلية/ مل بالمقارنة بـ 2.5×10^6 خلية/ مل. تم الحصول أفضل عيارات حجمية عند 35 درجة مئوية بغض النظر عن كثافة خلية أو يوم تجميع. علاوة على ذلك، و يشير إلى كفاءة تكاثر فيروس شلل الأطفال على خلايا PER.C6، يوضح ذلك أنه يمكن أخذ التجميعات بعد 24 ساعة حيث تكون الحصيلة في عينات 24 ساعة أو 48 ساعة يمكن مماثلة تماما.

في التجربة التالية تم اختبار تلك الظروف أيضا لتحديد الأنواع الأخرى من فيروس شلل الأطفال. تم نشر خلايا PER.C6 في وسط PERMAb عند 10×10^6 خلية/ مل والإصابة بـ 2 CCID50/ خلية عند 35 درجة مئوية في دوارق هزازة في ثلاث نسخ مع الخزائن المختلفة من فيروس شلل الأطفال. تم تجميعها بعد 24 و 48 ساعة و معالجة الخلايا والوسط لتنظيف الحلالات كما هو موصوف أعلاه. أوضحت المعايرة بواسطة تجربة CCID50 أن استخدام كثافات خلايا عالية يؤدي أيضا إلى حصيلات عالية من الفيروس بالنسبة للنوع 2 و 3 (الشكل 5).

يوضح ذلك بوضوح أن الزراعات عالية الكثافة لخلايا PER.C6 في معلق يوفر برنامج ممتاز لإنتاج فيروس شلل الأطفال من النوع الشارد. بما أن كثافة الخلايا الخاصة بخلايا PER.C6 و يمكن زيادة حجم/ أحجام الزراعة باستخدام أنظمة متفاعل حيوي، انتفاخا تموجية أو أنواع أخرى من الأنظمة التي يمكن زيادة تدرجها للزراعة، يمكن تحسين إنتاج فيروس شلل الأطفال بصورة كبيرة بالمقارنة بالنظام الحامل الدقيق الحالي باستخدام زراعات خلية Vero.

تم تجميع فيروس شلل الأطفال الناتج و تنقيته وفقا لطرق معروفة في الفن وتستخدم لنشر فيروس شلل الأطفال على خلايا Vero، معطلة بواسطة فورمالين وفقا لطرق معروفة، و بعد ذلك تم اختبار الاستمناع باستخدام تجربة استمناع جرذ عيارية، وفقا لطرق معروفة جيدا في الفن (على سبيل المثال، Bevilacqua et al, 1996). يكون من المتوقع أن يكون لفيروس شلل

الأطفال الناتج استمناع مقارن بفيروس شلل الأطفال الناتج باستخدام عمليات تقليدية باستخدام خلايا Vero.

المثال 4: إنتاج فيروس شلل الأطفال في خلايا PER.C6 في مفاعل حيوي

تمت إذابة الخلايا من بنك الخلايا العاملة PER.C6، و نشرها في وسط زراعة خالي من المصل في جهاز احتضان رطوبي عند 37 درجة مئوية و 10 % CO_2. تم إجراء زراعة فرعي كل 3 إلى 4 أيام حتى الوصول إلى كثافة خلايا كافية لتلقيح مفاعل حيوي سعة 2 لتر بكثافة خلية $0.4\text{-}0.2 \times 10^6$ خلية/ مل. تم نشر الخلايا في المفاعل الحيوي سعة 2 لتر عند 37 درجة مئوية، DO من 40 %، و رقم هيدروجيني 7.3. عند الوصول إلى كثافة خلايا تقريبا 2×10^6 خلية/ مل (يوم 4 بعد التلقيح) تمت بداية نظام ATF، للسماح بزراعة الخلايا لمدة زمنية أطول والوصول إلى كثافات خلايا أعلى. بعد حوالي 11 إلى 12 يوم وصلت كثافة الخلايا في المفاعل الحيوي سعة 2 لتر إلى أكثر من 50×10^6 خلية/ مل. في هذه اللحظة تم نقل معلق الخلايا إلى مفاعل حيوي سعة 10 لتر. تم تخفيف معلق الخلايا من المفاعل الحيوي سعة 2 لتر 1 : 5 باستخدام وسط زراعة خالي من المصل. كانت كثافة الخلايا في المفاعل الحيوي سعة 10 لتر بين 10 و 15×10^6 خلية/ مل. بعد ذلك تمت إصابة المفاعل الحيوي سعة 10 لتر بمخزون بذور فيروس شلل الأطفال عند 2 MOI /CCID50 خلية. تم إجراء إنتاج فيروس شلل الأطفال عند 35 درجة مئوية، رقم هيدروجيني 7.3 و DO 40 %. تم أخذ عينات من المفاعل الحيوي سعة 10 لتر عند نقاط زمنية لعد الخلايا و إنتاج فيروس شلل الأطفال، و إجراء تجميع فيروس شلل الأطفال بصورة ملائمة بين 12 و 48 ساعة بعد الإصابة.

المراجع

Barrett PN, Mundt W, Kistner O, Howard MK. 2009. Vero cell platform in vaccine production: moving towards cell culture-based viral vaccines. Expert Rev. Vaccines 8: 607-618.

Bevilacqua JM, Young L, Chiu SW, Sparkes JD, Kreeftenberg JG. 1996. Rat immunogenicity assay of inactivated poliovirus. Dev. Biol. Stand. 86: 121-127.

Campbell SA, Lin J, Dobrikova EY, Gromeier M. 2005. Genetic determinants of cell type-specific poliovirus propagation in HEK 293 cells. J. Virol. 79: 6281-6290.

Card CJ, Smith T, Hunsaker B, Barnett B. 2005. Serum-free production of poliovirus: A comparative study using microcarriers, roller bottles and stationary cell culture. In: F. Gòdia and M. Fussenegger (Eds.), Animal Cell Technology meets Genomics, 761-765.

Doi Y, Abe S, Yamamoto H, Horie H, et al. 2001. Progress with inactivated poliovirus vaccines derived from the Sabin strains. In: Brown F (ed): Progress in Polio Eradication: Vaccine Strategies for the End Game. Dev. Biol. 105: 163-169.

Van Eikenhorst G, Bakker WAM, Thomassen YE, van der Pol LA. 2009. Platform technology for viral vaccine production: comparison between attached and suspension Vero cells. Poster and Abstract P70. In: 21st Meeting of the European Society for Animal Cell Technology, Programme and Book of Abstracts.

Fallaux FJ, Bout A, van der Velde I, van den Wollenberg DJ, Hehir KM, Keegan J, et al. New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses. Hum Gene Ther 1998 Sep 1;9(13):1909-17.

Furey J. Scale-up of a cell culture perfusion process – A low-shear filtration system that inhibits filter-membrane fouling. Genetic Engineering News. Vol. 22, No. 7, April 2002.

Jiang S, Pye D, Cox JC. 1986. Inactivation of poliovirus with β-propiolactone. J. Biol. Stand. 14: 103-109.

John J. 2009. Role of injectable and oral polio vaccines in polio eradication. Expert Rev. Vaccines 8: 5-8.

Kew OM, Sutter RW, de Gourville EM, Dowdle WR, Pallansch MA. 2005. Vaccine-derived polioviruses and the endgame strategy for global polio eradication. Annu. Rev. Microbiol. 59: 587-635.

Kral KM, Golden K, Zijlstra G, Swaving J, Nieboer M, Chon JH. 2009. Advances in high yielding platform production processes using the PER.C6® human cell line. Abstract P142. In: 21st Meeting of the European Society for Animal Cell Technology, Programme and Book of Abstracts.

Merten O.-W., Wu R, Couvé E, Crainic R. 1997. Evaluation of the serum-free medium MDSS2 for the production of poliovirus on Vero cells in bioreactors. Cytotechnology 25: 35-44.

Montagnon B, Vincent-Falquet JC, Fanget B. 1982. Thousand litre scale microcarrier culture of Vero cells for killed poliovirus vaccine. Promising results. Develop. Biol. Standard. 55: 37-42.

Montagnon BJ, Fanget B, Vincent-Falquet JC. 1984. Industrial-scale production of inactivated poliovirus vaccine prepared by culture of Vero cells on microcarrier. Rev. Infect. Dis. 6 (suppl. 2): S341-S344.

Pau MG, Ophorst C, Koldijk MH, Schouten G, Mehtali M, Uytdehaag F. The human cell line PER.C6 provides a new manufacturing system for the production of influenza vaccines. Vaccine 2001 Mar 21;19(17-19):2716-21.

Van Wezel AL, van Steenis G, Hannik CA, Cohen H. 1978. New approach to the production of concentrated and purified inactivated polio and rabies tissue culture vaccines. Develop. biol. Standard. 41: 159-168.

Wright PF, Modlin JF. 2008. The demise and rebirth of Polio – A modern Phoenix? J. Infect. Dis. 197: 335-336.

Yakovenko ML, Korotkova EA, Ivanova OE, Eremeeva TP et al. 2009. Evolution of the Sabin vaccine into pathogenic derivatives without

appreciable changes in antigenic properties: need for improvement of current poliovirus surveillance. J. Virol. 83: 3402-3406.

Yallop C, Crowley J, Cote J, Hegmans-Brouwer K, Lagerwerf F, Gagne R, Martin JC, Oosterhuis N, Opstelten DJ, Bout A. Per.C6 cells for the manufacture of biopharmaceutical proteins. Modern Biopharmaceuticals – Design, Development and Optimization. Vol. 3, 2005.

العناصر الجديدة المطلوب حمايتها

1- عملية لإنتاج فيروس شلل الأطفال، تتضمن خطوات :

أ) توفير مزرعة خلايا من معلق خالي من المصل، حيث تكون خلايا PER.C6 كما هي مودعة تحت عنوان ECACC رقم 96022940،

ب) إصابة الخلايا المذكورة بفيروس شلل الأطفال، بكثافة خلية بين 2×10^6 خلية/ مل و 150×10^6 خلية/ مل، و

ج)تجميع فيروس شلل الأطفال خلال مدة زمنية بين 12 و 48 ساعة بعد الإصابة.

2- عملية وفقا لعنصر الحماية 1، حيث يتم إجراء الإصابة و/ أو تكاثر الفيروس المذكورة عند درجة حرارة بين 34 درجة مئوية و 36 درجة مئوية.

3- عملية وفقا لأي من عناصر الحماية السابقة، حيث يتم إجراء الإصابة المذكورة بكثافة خلية بين 5×10^6 خلية/ مل و 20×10^6 خلية/ مل.

4- عملية وفقا لأي من عناصر الحماية السابقة، حيث يتم إجراء الإصابة المذكورة بكثافة خلية حوالي 10×10^6 خلية/ مل.

5- عملية وفقا لأي من عناصر الحماية السابقة، حيث يتم إجراء الإصابة المذكورة بإصابة متعددة (MOI) بين 1 و 3، على سبيل المثال حوالي 2.

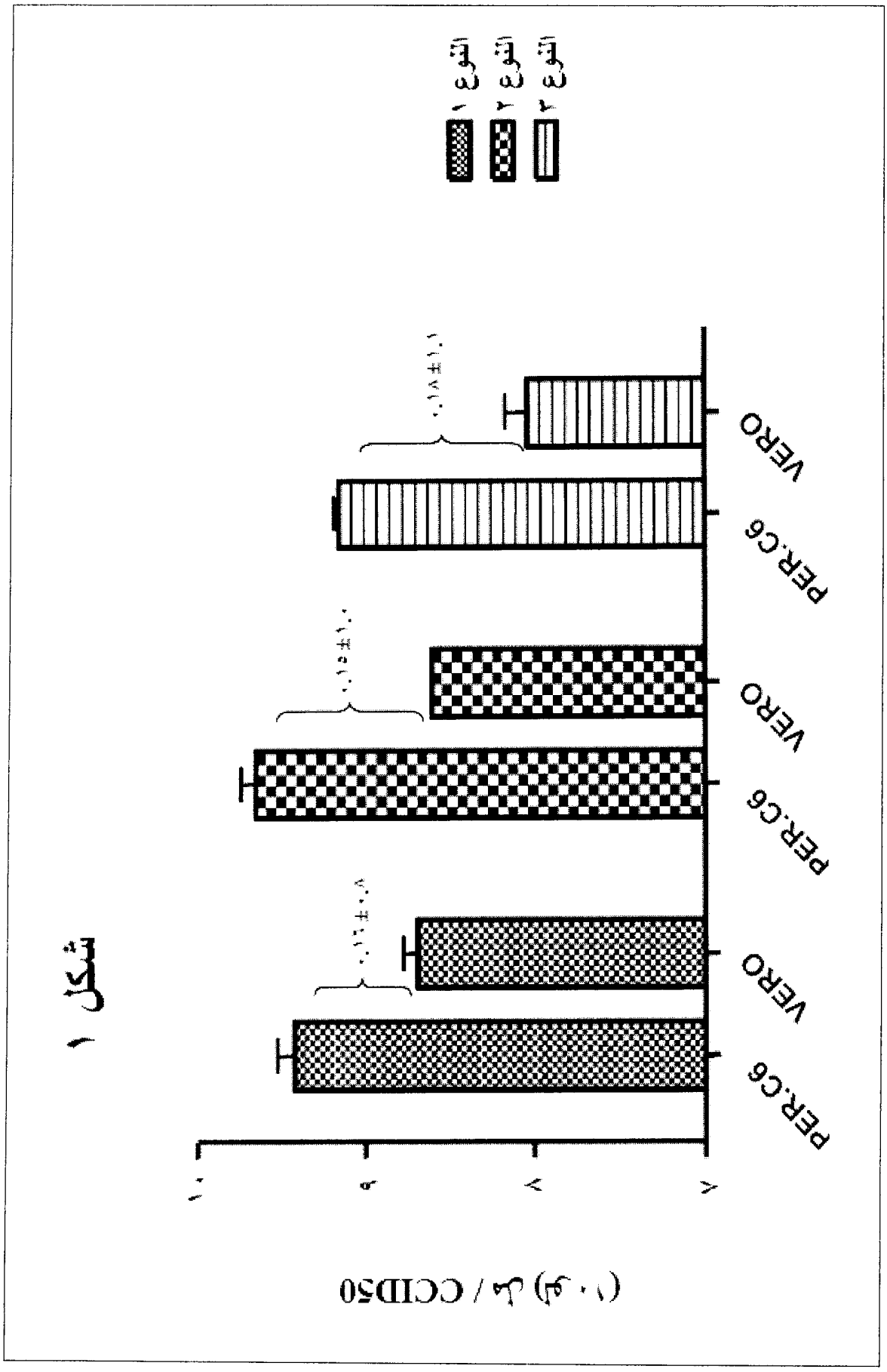
6- عملية وفقا لأي من عناصر الحماية السابقة، حيث يتم إجراء تجميع فيروس شلل الأطفال المذكور خلال مدة زمنية بين 18 و 30 ساعة بعد الإصابة، على سبيل المثال حوالي 24 ساعة بعد الإصابة.

7- عملية وفقا لأي من عناصر الحماية السابقة، حيث يكون فيروس شلل الأطفال المذكور هو فيروس شلل الأطفال من النوع 1، فيروس شلل الأطفال من النوع 2 أو فيروس شلل الأطفال من النوع 3.

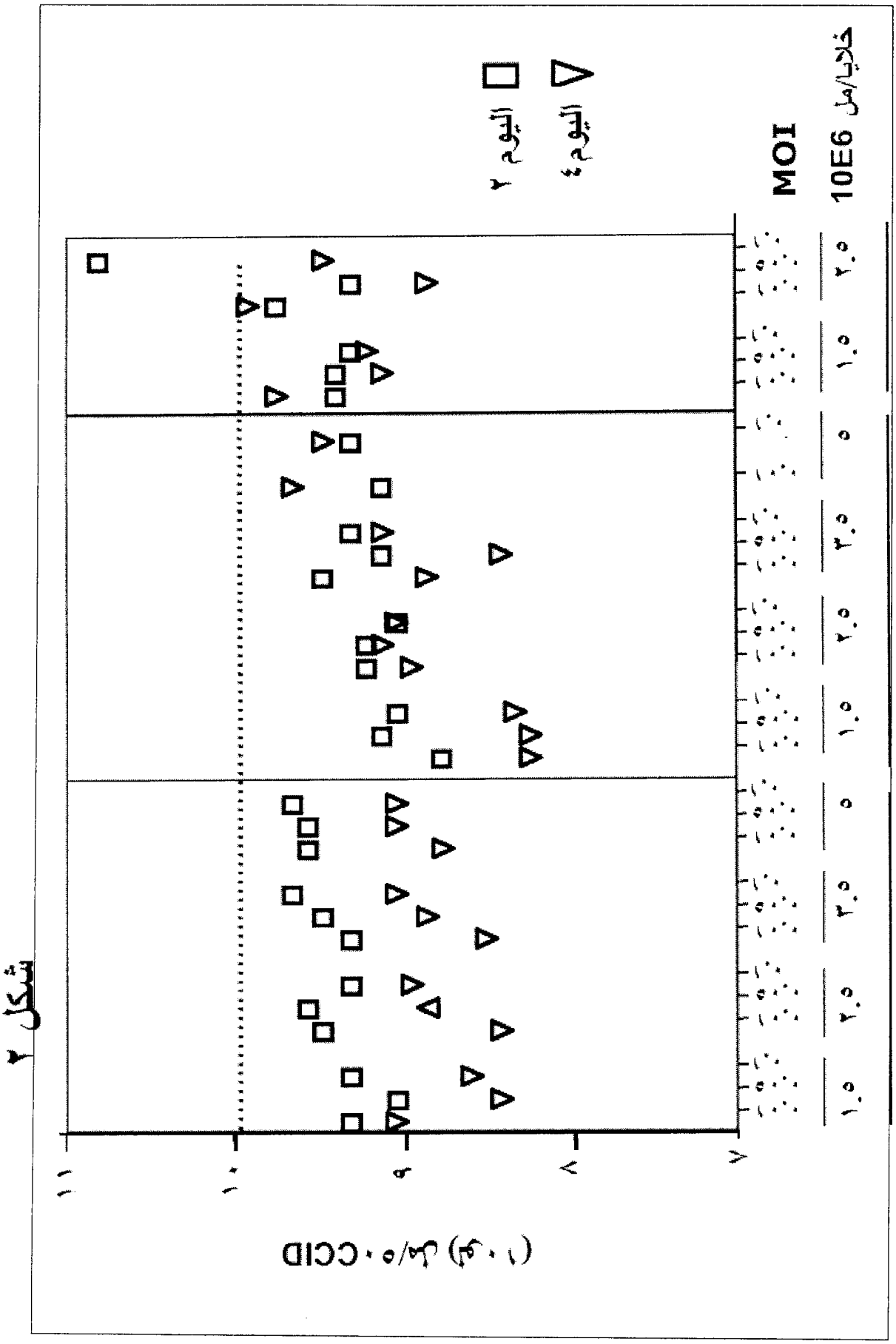
8- عملية وفقا لعنصر الحماية 7، حيث يكون فيروس شلل الأطفال المذكور هو فيروس شلل الأطفال من النوع 1 سلالة Mahoney، فيروس شلل الأطفال من النوع 2 سلالة MEF، أو فيروس شلل الأطفال من النوع 3 سلالة Saukett.

9- عملية وفقا لعنصر الحماية 7، حيث يكون فيروس شلل الأطفال المذكور هو فيروس شلل الأطفال الموهن، مثل سلالة Sabin.

10- عملية لإنتاج لقاح شلل الأطفال، تتضمن عملية وفقا لأي من عناصر الحماية السابقة، تتضمن أيضا تنقية، اختياريا تعطيل، و صياغة فيروس شلل الأطفال الذي تم تجميعه للحصول على لقاح شلل الأطفال.

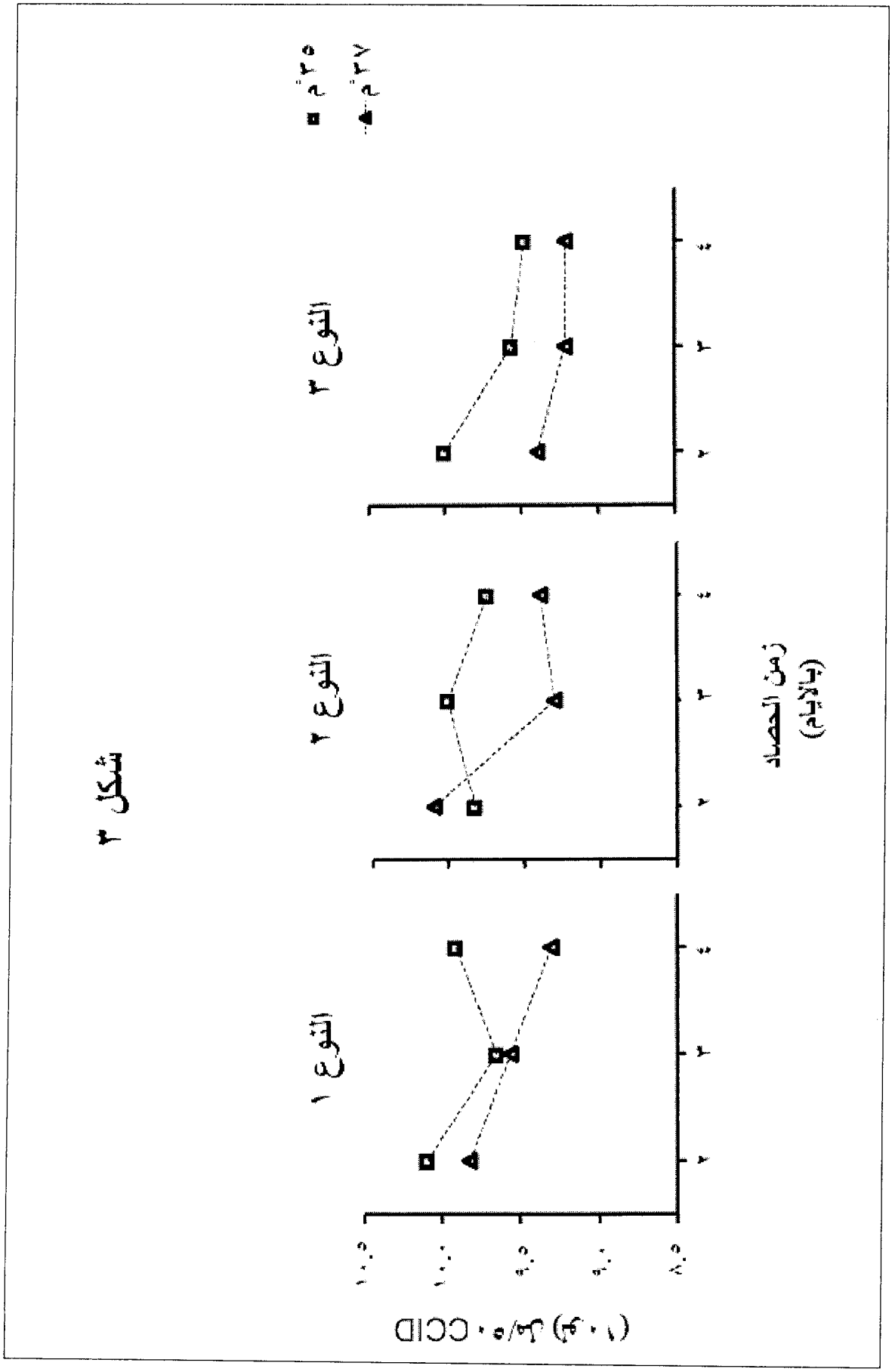


شكل ١

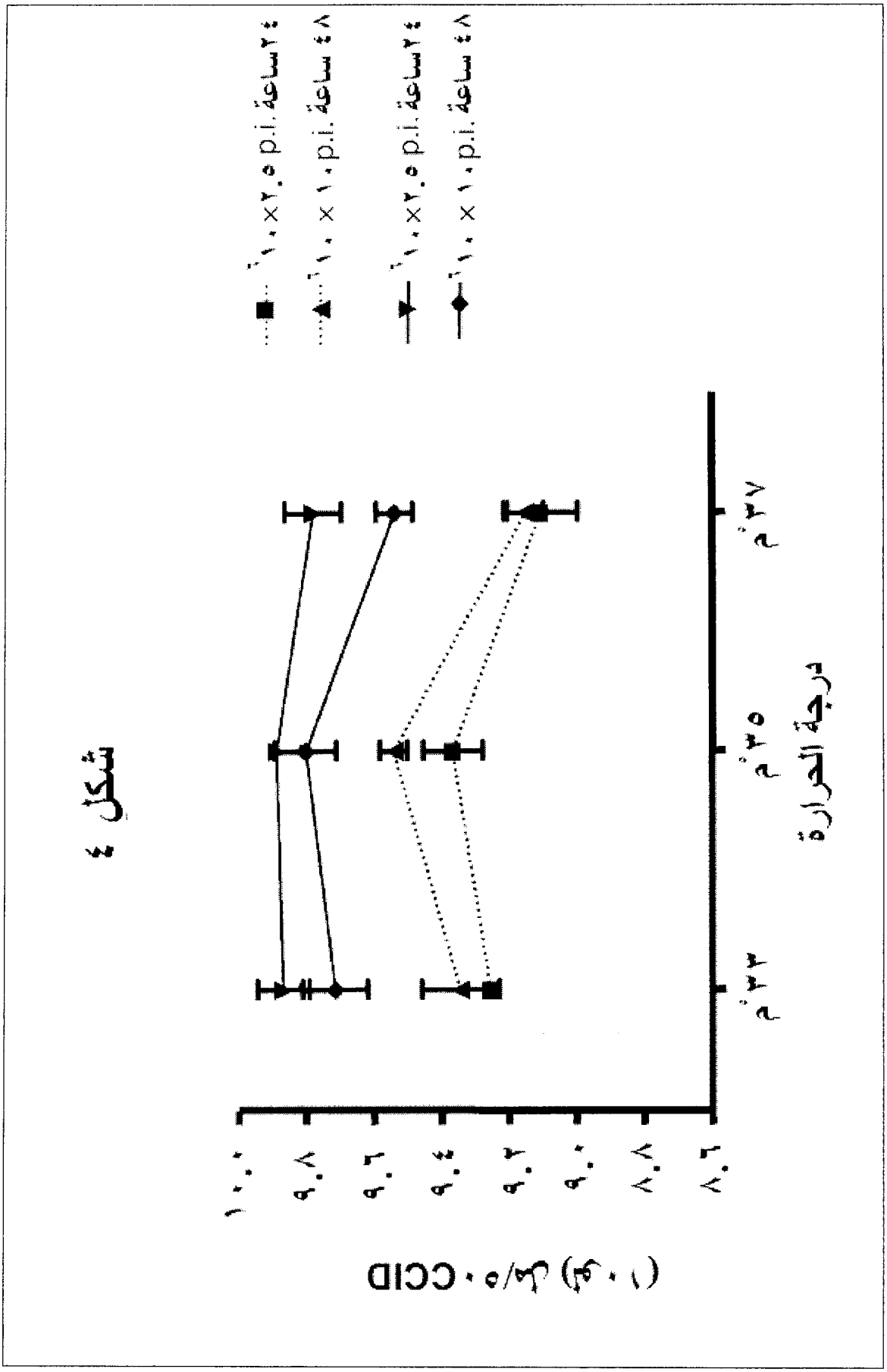


اليوم ٢
اليوم ٤
MOI
10E6 خلايا/مل
متوسط
AEM
BMIVg
PERMab
١١
١٠
٩
٨
٧

شكل ٢

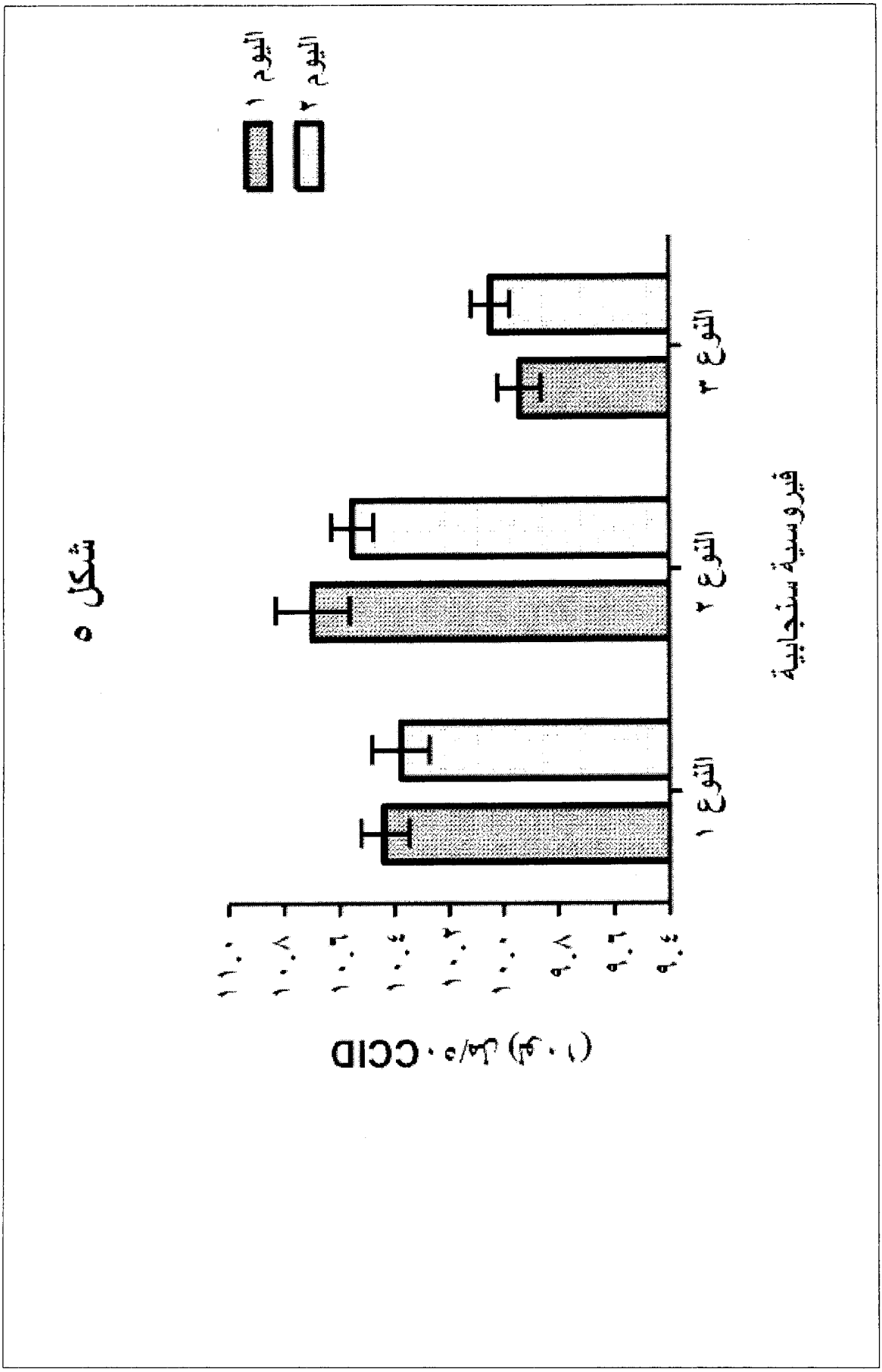


شكل ٣



شكل ٤

٢٤ ساعة p.i. ٢,٥×١٠^٦
٤٨ ساعة p.i. ١٠ × ١٠^٦
٢٤ ساعة p.i. ٢,٥×١٠^٦
٤٨ ساعة p.i. ١٠ × ١٠^٦
١٠,٠
٩,٨
٩,٦
٩,٤
٩,٢
٩,٠
٨,٨
٨,٦
CCID٥٠/مل (لو١٠)
٣٣°م
٣٥°م
٣٧°م
درجة الحرارة



اليوم ١
اليوم ٢
النوع ١
النوع ٢
النوع ٣
١١.٠
١٠.٨
١٠.٦
١٠.٤
١٠.٢
١٠.٠
٩.٨
٩.٦
٩.٤

شكل ٥