

Eljárás heparin előállítására, hízósejttenyészetekből kiindulva**Kivonat**

5

A találmány tárgyát egy hízósejttenyészetekből kiinduló heparinelőállítási eljárás képezi. A találmány szerinti eljárás alkalmazásakor a kiindulási anyag előnyösen sertés eredetű hízósejtek tenyésztete.

Jelkérés: Élvé φ
Berett

Eljárás heparin előállítására, hízósejttenyészetekből kiindulva

A találmány tárgyát egy hízósejttenyészetekből kiinduló heparinelőállítási eljárás képezi. A találmány szerinti eljárás alkalmazásakor a kiindulási anyag előnyösen sertés eredetű hízósejtek tenyésztete.

A heparin a glikozaminoglikán (GAG) családba tartozó vegyület, a család tagjait egy aminocukorból (D-glükózaminból vagy galaktózaminból) és egy uronsavból (D-glükuronsavból vagy iduronsavból) álló diszacharid ismétlődését tartalmazó lineáris poliszacharidok alkotják.

A heparán szulfáttal együtt a glükózaminoglikán alcsaládba tartozó heparin esetében az aminocukor D-glükózamin. A molekula esetében az uronsav vagy glükuronsav (Glc) vagy iduronsav (Ido). A glükózamin N-acetilált, N-szulfatált vagy O-szulfatált lehet.

A „heparin” megnevezés hagyományosan olyan nagymértékben szulfatált poliszacharidokra vonatkozik, amelyekben a glükózamin reziduumok több mint 80%-a N-szulfatált, és az O-szulfátok száma nagyobb, mint az N-szulfátoké. A heparin esetében a szulfát/diszacharid arány általában nagyobb mint 2. A heparin szerkezete ugyanakkor rendkívül heterogén és nagymértékben eltérő szulfát/diszacharid aránnyal jellemzett láncokat is tartalmazhat.

A többi GAG-hoz hasonlóan a heparin proteoglikánként szintetizálódik. A szintézis előnyösen hízósejtek egy alcsoportjában, az ún. savóshártya- vagy kötőszöveti eredetű hízósejtekben (CTMC-kben) megy végbe. Ezek a hízósejtek nagy számban fordulnak elő a bőrben és a légzőszervek szubmukózájában. Élettartamuk nagyon hosszú, általában legalább hat hónap. A heparin mellett heparán-szulfátot és kimutatható mennyiségű (állatfajtól függően megközelítőleg 10 pg/sejt) hisztamint is tartalmaznak.

A heparinszintézis első lépése a szabályosan váltakozó szerin és glicin aminosavakat tartalmazó szerglicin proteinmag kialakítása. A heparinlánc meghosszabbítása tetraszacharidból indul ki, és ozamin és uronsav egymást követő hozzáadásával megy végbe.

A fentiek szerint kialakított proteoglikán több egymást követő átalakítási lépésen megy át, ilyenek az N-deacetilezés, N-szulfatálás, D-glükuronsav epimerizálás és O-szulfatálás.

Az említett teljes érési folyamat azonban csak a proteoglikán egy részén megy végbe, ez az oka a heparin heterogenitásáért felelős jelentős szerkezeti változékonyságnak.

A poliszacharid láncokat ezután egy endoglükuronidáz hasítja le a szerglicin magról. Az említett láncok molekulatömege ekkor 5000 és 30000 Da között változik. A láncok alkali-

kus proteázokkal komplexet képezve tárolódnak a hízósejtek granulumaiban. A heparin csak a hízósejtek degranulálódása során válik szabaddá.

A heparin elsősorban a véralvadási mechanizmusban tölt be fontos biológiai szerepet, ezzel összefüggésben elsősorban véralvadás- és trombusképződés-ellenes hatóanyagként széles körben alkalmazzák a gyógyászatban.

Jelenleg a felhasznált heparin döntő hányadát sertés bélnyálkahártyából nyerik ki proteolízis, majd anioncserélő gyantán végzett tisztítás alkalmazásával [a heparin-előállítás különféle módszereinek összefoglaló ismertetése megtalálható pl. a következő publikációban: Duclos: „L'Héparine: fabrication, structure, propriétés, analyse”, kiad.: Masson, Párizs (1984)].

A molekula természetes heterogenitása mellett a forrásául szolgáló állatcsoportok különbözősége is hozzájárul az előállított heparin biológiai aktivitásának jelentősen eltérő mértékéhez. Mindemellett az elegendő mennyiségű nyersanyaggal való folyamatos ellátás is nehézségekbe ütközik.

Korábban már felvetették emlősökből származó sejtek GAG vagy proteoglikán-előállításra történő alkalmazását.

A WO 99/26983 számú nemzetközi közzétételi iratban heparin típusú vegyületek, pl. proteoglikánok (HEP-PG) vagy glikozaminoglikánok (HEP-GAG) patkány hízósejtekből történő előállítását ismertették. Az említett vegyületek azonban nem tekinthetők heparinnak, az izolált sejtek nem stabil sejtvonalak, emellett a szabadalmat benyújtó az izolált sejtek fibroblasztokkal történő együttes tenyésztését javasolta.

Wang és Kovanen közleménye is patkány savóshártya eredetű hízósejtek izolálására és proteoglikánok belőlük történő előállítására szolgáló eljárást ismertetett [Wang és Kovanen: Circulation Research 84, 74 (1999)]. Mint a WO 99/26983 számú nemzetközi közzétételi irat esetében, a proteoglikánok előállítására alkalmazott sejtek itt sem stabil sejtvonalba tartoztak, hanem csupán izolált majd proteoglikánok termelése érdekében stimulált sejtek voltak.

A kutatási jelentésben említett WO 90/14418 számú nemzetközi közzétételi iratban egér mastocytomákból (hízósejtes daganatokból) előállított sejtvonalakat ismertettek, valamint azok heparin előállítására történt alkalmazását mutatták be. Az említett sejtek daganatos eredetűek, ami egészségügyi szempontból aggályos lehet. Montgomery és mtsai. egy közleménye is egér mastocytomák izolálásával foglalkozott [Montgomery és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89, 11327 (1992)].

Találmányunk könnyen elérhető homogén, stabil tulajdonságokkal rendelkező nyersanyag alkalmazásával megoldást kínál a nyersanyagellátással kapcsolatban a fentiekben felső-

rolt minőségi és mennyiségi problémákra és állandó minőségű heparin előállítását teszi lehetővé.

Kimutattuk, hogy hízósejttenyészetekből a sertés bélnyálkahártyából kivonttal összehasonlítható tulajdonságokkal rendelkező, jelentős mennyiségű heparin állítható elő. A sejttenyészetek nyersanyagként történő alkalmazásával megvalósítható a heparinszintézis feltételeinek szabályozása és reprodukálható jellemzőkkel rendelkező termék előállítására nyílik lehetőség.

A találmány tárgyát heparin előállítására szolgáló eljárás képezi, amelynek során sertés eredetű hízósejtek tenyésztésére, majd a tenyészetekből heparin kivonására kerül sor.

Az említett hízósejttenyészetek előnyösen sertés eredetű hízósejt-vonalak.

10 A „tenyészet” kifejezés általánosságban *in vitro* tenyésztett sejtet vagy sejtcsoportot jelöl. Az állatból nyert sejtől vagy szövetmintából kialakított tenyészetet „elsődleges (primer) tenyészetnek” nevezzük. A „vonalt” kifejezést legalább egy passzázs, általában pedig számos egymást követő sikeres passzálás eredményeként kapott tenyészetre alkalmazzuk [Schaeffer: *In Vitro Cellular and Developmental Biology* 26, 91 (1990)].

15 Az említett hízósejtek előnyösen sertés eredetű hízósejttenyészetekből, közelebből az FR 0113608 számú franciaországi szabadalmi iratban, valamint a „Cultures de mastocytes de porc et leurs utilisations” (sertés eredetű hízósejttenyészetek és azok alkalmazása) című, a jelen szabadalommal egy időben az INRA és az ENVA nevében benyújtott nemzetközi bejelentésben leírtak szerint előállított hízósejttenyészetekből származnak. Az említettek közül a találmány szerinti megoldás szempontjából előnyös tenyészetek a következők:

20 az INRA (147 rue de l'Université, 75007 Párizs, Franciaország) által a CNCM-nél [Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (Nemzeti Mikroorganizmus-tenyészet Gyűjtemény), Pasteur Institute, 26 rue du Docteur Roux, 75724, Párizs, CEDEX 15, Franciaország] 2001. október 17-én I-2735 számon letétbe helyezett, magzati sertésmájából származó hízósejt-vonal;

az INRA által a CNCM-nél 2001. október 17-én I-2736 számon letétbe helyezett, magzati sertésmájából származó, az SV40 vírus T-antigénnel transzfektált hízósejt-vonal;

30 az INRA által a CNCM-nél 2001. október 17-én I-2734 számon letétbe helyezett, magzati sertés csontvelőből származó, az SV40 vírus T-antigénnel transzfektált hízósejt-vonal.

Az említett hízósejtek előnyösen „savós” hízósejtek.

Az említett hízósejtek tenyésztésére előnyösen egy vagy több növekedési faktorial, pl. 1 ng/mL és 1 µg/mL közötti koncentrációjú SCF-fel (Stem Cell Factor, őssejt faktorial), vagy adott esetben 0,1 ng/mL és 100 ng/mL közötti koncentrációjú IL3-mal (interleukin 3-mal),

és/vagy 1 nM és 1 μ M közötti koncentrációjú PGE2-vel (prostaglandin E2-vel) kiegészített definiált tenyésztőközegben kerül sor.

A tápközeg 0,5% és 20% (térfogatszázalék) közötti mennyiségű szarvasmarha szérummal is kiegészíthető.

5 A protein-koncentráció csökkentése és az állati eredetű vegyületek alkalmazásával kapcsolatos veszélyek mérséklése érdekében a tápközeg szarvasmarha szérum helyett szérumentes tápközeggel, pl. AIMV-vel (Invitrogen) is kiegészíthető [Kambe és mtsai.: J. Immunol. Methods 240, 101 (2000)].

10 A sejtek fenotípusának transzformer és/vagy „halhatatlanná tevő” ágensekkel végzett szabályozott átalakítása segítségével szérum és/vagy növekedési faktorok hozzáadásától függetlenül osztódó sejtek előállítására is lehetőség van [Tsuimura: Pathology International 46, 933 (1996); Piao és Bernstein: Blood 87, 3117 (1996)].

15 A hízósejtek tenyésztésére eukarióta sejtek tömeges tenyésztésére kidolgozott eljárások vehetők igénybe [ld. pl. Griffiths és mtsai.: Animal Cell Biology, 3. kötet, pp. 179-220., szerk.: Spier és Griffiths, kiad.: Academic Press, London (1986)]. A tenyésztéshez több köbméteres befogadóképességű bioreaktorok is alkalmazhatók [ld. pl. Philips és mtsai.: Large Scale Mammalian Cell Culture, szerk.: Feder és Tolbert, kiad.: Academic Press, Orlando USA (1985); Mizrahi: Process Biochem. augusztus, 9, (1983)].

20 A tenyésztés szuszpenzióban, vagy van Menzel módszere szerint mikrohordozó alkalmazásával is elvégezhető [van Menzel: Nature 216, 64 (1967)].

A fenti célra az ipari méretű sejtelőállításra való rendkívül könnyű alkalmazhatóságuk miatt eukarióta sejtek tenyésztésére használt tételes tenyésztőrendszerek („batch culturing systems”) is igénybe vehetők [Vogel és Todaro: Fermentation and Biochemical Engineering Handbook, 2. kiadás, kiad.: Noyes Publication, Westwood, New Jersey, USA (1997)]. Ezekkel a rendszerekkel általában 10⁶ és 5x10⁶/mL közötti sejtkoncentráció érhető el.

25 A tételes tenyészetek termelékenységére előnyösen fokozható a sejtek egy részének (70-90%-ának) a GAG kivonás és a heparin izolálás céljából a bioreaktorból történő eltávolításával és a maradék sejtmenyiség új tenyészet beindítására történő igénybe vételével. Ebben az „ismételt” tételes tenyésztési rendszerben az optimális sejtnövekedést, valamint a GAG és a heparin nagyobb mértékű sejtbeli felhalmozódását eredményező tenyésztési körülmények megkülönböztetésére is lehetőség nyílik.

A fenti cél elérésére sejtviisszatartással vagy anélkül üzemelő, folyamatos perfúzióval táplált tenyésztési rendszerek is igénybe vehetők [Velez és mtsai.: J. Immunol. Methods 102, 275 (1987); Chaubard és mtsai.: Gen. Eng. News 20, 18 (2000)]. A találmány szerinti megol-

dásban különösen a reaktorban történő sejtvisszatartással üzemelő, a tételes tenyésztési rendszereknél jobb sejtnövekedést és nagyobb sejtmennyiséget eredményező rendszerek alkalmazhatók előnyösen. A sejtvisszatartás pörgő-szűrős („spin-filter”), üreges szál vagy szilárd mátrix alapú retenciós rendszerrel valósítható meg [Wang és mtsai.: Cytotechnology 9, 41 (1992);
 5 Velez és mtsai.: J. Immunol. Methods. 102, 275 (1987)]. A módszerrel általában 10^7 és 5×10^7 /mL közötti sejtkoncentráció érhető el. A bioreaktorban történő tenyésztés az online érzékelőknek köszönhetően a sejtnövekedés fiziko-kémiai paramétereinek [pH, pO₂, red/ox, növekedési szubsztrátok, pl. vitaminok, aminosavak, szénalapú szubsztrátok (pl. glükóz, fruktóz, galaktóz), metabolitok, pl. tejsav, vizes ammónia stb.] jobb ellenőrzését teszi lehetővé,
 10 valamint javítja a GAG és a heparin sejtbeli felhalmozódásának mértékét.

A sejtek kinyerésére és a tenyésztőközegtől történő megtisztítására az említett körülmények között általában centrifugálás vagy szűrés vehető igénybe a tenyésztés 3. és 30. napja, általában pedig a tenyésztés 3. és 10. napja között.

A centrifugálásra számos különféle centrifugarendszer alkalmazható, ilyenek pl. a Vogel és Todaro által említettek [Vogel és Todaro: Fermentation and Biochemical Engineering Handbook, 2. kiadás, kiad.: Noyes Publication, Westwood, New Jersey, USA (1997)].
 15

A szétválasztás alternatív módon, vagy centrifugálással kombináltan a sejtek átlagos átmérőjénél (5-20 μ m) kisebb pórusátmérőjű, az oldat/szuszpenzió egyéb elemeit azonban szabadon átengedő membránokat alkalmazó tangenciális mikroszűréssel is megvalósítható. A
 20 membránok eltömődésének megakadályozása és a sejtek épségének megőrzése érdekében a tangenciális áramlás és a membránt érő nyomás mértékének megállapításakor alapvető szempont a csekély mértékű nyíróerő (5000/másodperc alatti Reynolds szám) kialakítása.

A fenti beavatkozásra különféle membránok vehetők igénybe, ilyenek pl. a spirális membránok (Amicon, Millipore), valamint a síkmembránok vagy az üreges szálak (Amicon,
 25 Millipore, Sartorius, Pall, GF).

Olyan membránok is alkalmazhatók, amelyek porozitása, töltése vagy megkötő képessége („grafting”) lehetővé teszi a sejteknek a tenyésztőközegben potenciálisan jelen lévő szennyező anyagoktól, pl. sejtproteinektől, DNS-től, vírusoktól vagy más makromolekuláktól történő szeparálását és elsődleges tisztítását.

A találmány szerinti megoldásban olyan termelési és sejtkenyérési eljárások alkalmazhatók, amelyek lehetővé teszik a GAG-ok és a heparin intracelluláris megőrzését, azonban a GAG-ok és a heparin a sejtek lízise vagy degranulálódása után a tenyésztőközegtől is kinyerhetők.
 30

A degranulálódást specifikus ligandumoknak a hízósejtek felszínén jelen lévő recepto-
 rokhoz történő kötődése idézheti elő, ilyen hatású pl. az allergén típusú ágenseknek (pl. IgE
 Fc fragmens vagy annak analógjai) a hízósejtek IgE receptoraihoz történő kötődése. Ha szét-
 választási lépés idejére a hízósejtek egy részének vagy mindegyikének degranulálódása vagy
 5 lízise következtében a heparin kikerült az intracelluláris térből, kisebb pórusátmérőjű memb-
 ránok is alkalmazhatók. Ebben az esetben a sejtszétválasztás egy vagy több membránon ke-
 resztül történő ultraszűréssel köthető össze. Az alkalmazott membránok porozitása és szerke-
 zete lehetővé teszi a heparin koncentrációját és a tápközegben lévő egyéb molekuláktól azok
 méretén, molekulatömegén, és adott esetben elektromos töltésén vagy biológiai tulajdonsága-
 10 in alapuló elkülönítését.

A találmány szerinti megoldásban a membránok áteresztőképességének határértéke
 előnyösen 1000 és 5000 Da közötti. Az eljárás során a mikroszűréshez alkalmazott membrá-
 nokhoz hasonló membránrendszerek vehetők igénybe, ilyenek pl. a spirális membránok, a sík-
 membránok vagy az üreges szálak. Előnyösen alkalmazhatók olyan membránok, amelyek töl-
 15 tési tulajdonságaik vagy heparinnal szembeni affinitást mutató ligandumokat (pl. ellenanyagó-
 kat, ATIII-at, lektint, peptideket, nukleotidokat stb.) megkötő képességük alapján lehetővé te-
 szik a heparin szeparálását és kitisztítását.

Hízósejt degranulálódást egyéb ágensek is előidézhethetnek. Ezek lehetnek pl. citotoxi-
 kus ágensek, enzimek, poliszacharidok, lektinek, anafilatoxinok, bázikus vegyületek (48/80
 20 jelű vegyület, P-anyag stb.), kalcium (A23187 ionofor, ionomicin stb.) [D. Lagunoff és T. W.
 Martin: „Agents that release histamine from mast cells”, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 23,
 331 (1983)]. Egy adott degranuláló ágens ugyanazokon a tenyésztett sejteken ismételt is al-
 kalmazható. Ez a termelési eljárás a felülűszóból történő kinyerés egyszerűsítése és a sejtek
 tenyésztésben tartása miatt fokozott termelékenységet biztosít.

Az A23187 jelű ionofor esetében például a hízósejtek degranulálódása milliliterenként
 25 2×10^6 hízósejt 1-100 $\mu\text{g/mL}$ A23187-vel 1 perc és 4 óra közötti ideig történő inkubálásával
 idézhető elő.

A hízósejtek lízise előidézhető pl. hipotóniás vagy hipertóniás oldatokkal végzett oz-
 motikus sokkal, hősokkal (fagyasztással/kiolvasztással), mechanikus sokkal (pl. szonikálással
 30 vagy nyomásváltoztatással, kémiai anyagokkal (ilyenek pl. a NaOH, a THESITTM, az
 NP40TM, a TWEEN 20TM, a BRIJ-58TM, a TRITON XTM-100 stb.), enzimatis lízissel (pl.
 papainnal, tripszinnel stb.), vagy két vagy több előbb említett eljárás kombinálásával.

A heparin sejtlizátumból történő kivonására és kitisztítására, a poliszacharid láncok
 szerglicin magtól történő elválasztására, valamint a heparinnak a kivonási közegben lévő

egyéb GAG-októl történő elkülönítésére a heparin állati szövetekből történő kivonására és kitisztítására általában alkalmazott és pl. Duclos fentebb említett munkájában is ismertetett eljárásokhoz hasonló módszerek vehetők igénybe.

A heparin nukleinsavaktól és sejtproteinektől történő elkülönítése és oldhatóvá tétele, vagyis a szerglicin magon belüli kötések megszüntetése nem kizárólagos módon a következő lépésekben valósítható meg:

a sejtízátum egy vagy több enzimes (pl. pronázos, tripszines, papainos stb.) emésztési lépésnek vethető alá;

a heparin-protein kötések alkális közegben, szulfátok vagy kloridok jelenlétében hidrolizálhatók;

a sejtől származó nukleinsavak és proteinek roncsolása érdekében savas közegben (pl. hideg triklórecetsavban) végzett kezelés is végezhető, amit a GAG-protein kapcsolatokat disszociáló ionos oldat hozzáadása egészíthet ki;

az enzimikus hidrolízist követően guanidines kivonás is végezhető; az oldhatóvá tett heparin kitisztítására pl. kálium-acetáttal, kvaterner amóniumvegyülettel, vagy acetonnal stb. végzett precipitálást is igénybe lehet venni.

Az említett tisztítási lépések előnyösen egy vagy több kromatográfiás lépéssel, közelebről anioncserés kromatográfiás vagy affinitás-kromatográfiás lépésekkel egészíthetők ki vagy helyettesíthetők.

A találmány tárgyát képezik továbbá a hízósejt tenyészetekből találmány szerinti eljárás segítségével előállított heparin-készítmények is.

A korábban ismert eljárásokkal állati szövetekből előállított heparin-készítményekkel összevethető biológiai tulajdonságokkal rendelkező találmány szerinti heparin-készítmények a heparin bármely szokásos alkalmazása során igénybe vehetők.

A jobb érthetőség kedvéért a találmány szerinti megoldást a következőkben a heparin hízósejtenyészetekből történő előállítását és a kinyert heparin jellemzését bemutató példákon keresztül ismertetjük.

1. példa

Heparin kivonás hízósejtenyészetekből

Hízósejtek tenyésztése

A vizsgálatban sertés magzati májból származó hízósejt-vonalat és SV40 vírus T-antigénnel transzfektált, sertés magzati májból származó hízósejt-vonalat (CNCM I-2735 és CNCM I-2736) alkalmaztunk.

A sejteket 10^5 - 5×10^5 sejt/mL közötti koncentrációban sertés IL3-mal (2 ng/mL) és sertés SCF-fel (80 ng/mL) kiegészített komplett MEM α tápközegbe juttattuk.

A tenyészeteket tenyésztőedényben vagy 1 literes forgó palackban szuszpenzióban állítottuk elő. A sejtnövekedést 4-12 napon keresztül naponta ellenőriztük. A heparintermelést ezzel párhuzamosan, a tenyészet által termelt glikozaminoglikánok elemzésével követtük nyomon. A vizsgálat eredményeit az 1-5. ábrák mutatják be.

Az 1-3. ábrák tenyésztőedényben, statikus tenyészetben (1. ábra, kezdeti sejtmennyiség \blacklozenge : 1×10^5 sejt; \blacksquare : 2×10^5 sejt), valamint palackbeli szuszpenzióban (2. ábra) tenyésztett májeredetű hízósejtek, továbbá palackbeli szuszpenzióban tenyésztett transzfektált májeredetű hízósejtek (3. ábra) növekedését szemléltetik.

Ezekben a kísérletekben a palackbeli szuszpenziós tenyészetek maximális sejtsűrűsége kb. 8×10^5 sejt/mL (nem transzfektált sejtek esetében) és kb. $1,5 \times 10^6$ sejt/mL (transzfektált sejtek esetében) között változott. Az exponenciális növekedési fázis alatt számított megkettőződési idő 24 és 48 óra között változott.

15 Glikozaminoglikán tisztítás

A beavatkozás során a proteoglikánok hasítása és az ionos GAG/protein kölcsönhatások kialakulásának megakadályozása érdekében a sejteket lúgos közegben só jelenlétében hidrolizáljuk.

Az említett eljárás a következő lépéseket foglalja magában.

20 1. Nátrium-hidroxidos kezelés fiziológiás sóoldatban. A lépés célja a sejtek roncsolása, valamint a heparin és az azt hordozó protein közti kötések megszüntetése.

Ebben a lépésben 10^6 sejthez $100 \mu\text{L}$ 1 M NaOH-ot és $800 \mu\text{L}$ 0,5 M NaCl-ot adtunk. Az így kapott keveréket vízfürdőben 80°C -on 30 percig melegítettük, majd 5 percig ultrahanggal kezeltük (szonikáltuk), ezt követően pedig 1 N HCl-dal neutralizáltuk.

25 2. Kivonás. A hidrolizált mintát anioncserélő gyantát tartalmazó oszlopra töltöttük (SAX, Varian), amely visszatartja a heparint. Az oszlopot a proteinek és az egyéb GAG-ok, mindenekelőtt a dermatán eltávolítása érdekében 0,5 M NaCl-ot tartalmazó Tris/HCl pufferben (pH = 7,4) három alkalommal mostuk. A heparint ezután 3 M NaCl-ot tartalmazó 1 mL Tris/HCl pufferrel (pH = 7,4) eluáltuk.

30 3. Sótalanítás/liofilizálás. A nátrium-klorid alábbiakban ismertetendő egyes analitikai módszerek elvégzéséhez szükséges eltávolítását „SEPHADEX G10” gélen végzett szterikus kizárásos kromatográfiával és vezetőképesség-méréssel végeztük. A begyűjtött heparin frakciókat a minta koncentrációja érdekében liofilizáltuk.

Poliakrilamid-gélelektroforézis

Ez az eljárás alkalmas a GAG-ok méretük és töltésük alapján történő szétválasztására, valamint a heparin jelenlétének vagy hiányának gyors megállapítására.

A fentieknek megfelelően előállított tisztított készítmény 20 µL-ét 30 – 1 kDa közötti nagyságú molekulák szétválasztására alkalmas (10-20% grádiens) Trisz/tricin poliakrilamid-gélre töltöttük. Ugyanezen a gélen 25 ng dermatánt, 25 ng SPIM standard sertés eredetű heparint (sertés bélnyálkahártyából nyert heparin 4. nemzetközi standardját), valamint sertés bélnyálkahártyából kivont, nátrium-hidroxid kezeléssel, valamint a fentieknek megfelelő körülmények között anioncserélő gyanta alkalmazásával kitisztított heparint is futtattunk.

A glikozaminoglikánok kimutatására alkalmas az alciánkék-oldat, majd ezüst-nitrát alkalmazásával végzett kettős festés (az ezüst-nitrát önmagában csak a proteineket festi meg) [Al-Hakim és Linhardt: Applied and Theoretical Electrophoresis 1, 305 (1991)]. A géleket a festést követően a különböző GAG-ok kimutatása érdekében szkennelvel (Bio-Rad) olvastuk le. A heparin kimutatási határértéke 10 ng/csík.

A kísérlet eredményeit az alábbi 1. táblázatban foglaltuk össze, ahol a sejtek által termelt heparin mennyiségét µg/106 sejt értékben adtuk meg.

1. táblázat

Kinyerés napja	3	4	5	6	7	10	11	14
Májsejt, edény	2,6	3,5	4,4	6,5	3,7	4,2	-	8,1
Transzfektált májsejt, edény	2,6	6,9	9,0	11,7	10,8	8,5	5,4	7,1
Májsejt, palack	1,2	-	-	-	-	-	-	-
Transzfektált májsejt, palack	-	2,1	-	-	-	-	-	-

A fenti eredményeket mutatja be a 4. ábra is (görbe: sejtpopuláció; oszlopok: heparintermelés).

A 4. ábra a tenyésztőedényekben statikus tenyészetben növekvő, májeredetű hízósejtek heparintermelését szemlélteti.

A heparin-koncentráció általában 2-14 µg/106 sejt statikus tenyészetben vagy szuszpenzióban.

25 2. példa

Hízósejtenyészetekből származó heparinkészítmény jellemzése

HPLC-vel megállapított diszacharid-profil

A diszacharid-összetétel alapján a heparin elkülöníthető az egyéb glikozaminoglikánoktól.

A tenyésztett hízósejtek által termelt glikozaminoglikánok diszacharid-profilját Linhardt és mtsai. eljárása szerint állapítottuk meg [Linhardt és mtsai.: Biomethods 9, 183 (1997)].

Az 1. példában leírtak szerint előállított GAG-készítményt *Flavobacterium heparinum* heparinázok keveréke (Heparináz I., II. és III.; Grampian Enzymes) alkalmazásával depolimerizáltuk. A reakció körülményeit Linhardt és mtsai. fentebb idézett közleménye tartalmazza.

Kontrollként azonos körülmények között SPIM standard heparint is depolimerizáltunk.

Az említett körülmények között a depolimerizálás teljes mértékben végbemegy és diszacharidokat eredményez.

Az N-szulfatált vagy N-acetilált nyolc fő diszacharidot az 5. ábra mutatja be.

UV detektálás

Az említett diszacharidokat a Linhardt és mtsai. fentebb idézett közleményében leírtak szerint anioncserélő oszlop alkalmazásával szeparáltuk és azonosítottuk.

A kísérlet eredményei a 6. ábra mutatja be. Az ábrán a magzati máj eredetű hízósejtek palackos tenyésztete által termelt heparinkészítmény diszacharid-profilját (■) és a standard heparin diszacharid-profilját (□) tüntettük fel.

Az eredmények alapján a SPIM sertés eredetű referencia heparinban jelen lévő diszacharidok eltérő arányban bár, de jelen vannak a hízósejt-eredetű heparinban is. Az IS/IIS arány 3,7.

Fluoreszcenciás detektálás

Egy hasonló, fluorimetriás eljárással lehetőség van csupán a heparinra jellemző IS és IIS diszacharidok mennyiségi meghatározására, valamint arányuk megállapítására.

Az enzimatis depolimerizálást és a HPLC alapú szétválasztást a fentiekben leírtaknak megfelelően végeztük.

Az oszlopon történt szeparálás után guanidinnel történő fluoreszcens komplex képzés érdekében derivatizálást végeztünk.

Az ebben az eljárásban legerősebb válaszreakciót mutató IS triszulfatált diszacharid kimutatását és mennyiségi meghatározását ismert koncentrációjú standard heparinoldattal történő összehasonlítással végeztük.

Az említett eljárás kimutatási határértéke sejtenyészet eredetű minták esetében 5 ng/mL heparin.

A 2. táblázat a sejtenyészetek IS/IIS arányát mutatja be az idő függvényében.

2. táblázat

Kinyerés napja	3	4	5	6	7	10	11	14
Májsejt, edény	1,9	1,6	1,6	1,4	1,4	1,3	-	1,4
Transzfektált májsejt, edény	4,1	5	4,6	6,6	3,7	4,9	5,6	5,7
Májsejt, palack	2,3	-	-	-	-	-	-	-
Transzfektált májsejt, palack	-	2,9	-	-	-	-	-	-

3. példa

5 A heparin biológiai jellemzése anti-Xa és anti-IIa aktivitásának megállapítása alapján

Biológiai aktivitás

Az Xa és a IIa faktorok inaktiválása a heparin jellemző tulajdonsága, ami lehetővé teszi a heparán-szulfáttól és a dermatántól történő elkülönítését.

10 A vizsgálatban az European Pharmacopoeia 3. kiadásában (1997), az alacsony molekulatömegű heparinokról szóló monográfiában leírt eljárást alkalmaztuk.

A reakció három lépésben megy végbe.

1. ATIII + heparin \rightarrow [ATIII-heparin]

2. [ATIII-heparin] + faktor (feleslegben) \rightarrow [ATIII-heparin-faktor] + faktor (maradék)

3. faktor (maradék) + kromofor szubsztrát \rightarrow pNA

15 A felszabaduló para-nitroanilin (pNA) mennyiségét 405 nm-en mértük. A vegyület mennyisége fordítottan arányos a mintabeli heparin mennyiségével.

Az anti-Xa vagy anti-IIa aktivitást a SPIM standard segítségével megállapított kalibráló egyenes alkalmazásával határoztuk meg.

Az eljárás érzékenysége 0,006 NE/mL.

20 A vizsgálatban kapott eredményeket a 3. táblázatban foglaltuk össze.

3. táblázat

Kinyerés napja	3	4	5	6	7	10	11	14
Májsejt, edény								
anti-Xa	2,1	1,8	5,7	4,0	2,4	2,2	-	0,0
anti IIa	-	-	-	-	-	-	-	-
anti-Xa/anti-IIa arány	-	-	-	-	-	-	-	-
Transzfektált májsejt, edény								
anti-Xa								
anti IIa	44	11,5	11,7	12,3	11,4	13,0	11,6	12,9
anti-Xa/anti-IIa arány	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-
Májsejt, palack								
anti-Xa	0,7	-	-	-	-	-	-	-
anti IIa	1,4	-	-	-	-	-	-	-
anti-Xa/anti-IIa arány	0,6	-	-	-	-	-	-	-
Transzfektált májsejt, palack								
anti-Xa								
anti IIa	-	3,1	-	-	-	-	-	-
anti-Xa/anti-IIa arány	-	14	-	-	-	-	-	-
	-	0,2	-	-	-	-	-	-

A tenyésztett hízósejtekből nyert heparin anti-Xa és anti-IIa aktivitását összehasonlítottuk a sertés bélnyálkahártyából kivont heparin, valamint a standard heparin anti-Xa és anti-IIa aktivitásával. Az összehasonlítás eredményét a 4. táblázat tartalmazza.

5 4. táblázat

	Anti-Xa (NE/mg)	Anti-IIa (NE/mg)	Xa/IIa (NE/mg)
Hízósejt eredetű heparin	18 – 3,1	14 – 3	0,2 – 1
Nyálkahártya eredetű heparin	80	81	1
Standard heparin	180	180	1

Az ATIII-kötődés jellemzése

A heparin és az ATIII közötti kötődést elektroforézises migráció-eltolódás alkalmazásával mutattuk ki [Lee és Lander: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 2768 (1991)].

Az elektroforézist 0,8%-os agarózgélen, ecetsav/lítium-hidroxid oldatban (pH = 3) végeztük.

A vizsgált minták 100 μL -éhez 100 μL , csökkenő koncentrációban 584-183 $\mu\text{g/mL}$ mennyiségű ATIII-at (emberi eredetű, Biogenic) adtunk.

5 A géleken 100 μL mennyiségű mintákat futtattunk, a futtatást 100 V feszültség mellett 30 percig végeztük.

A géleket 0,1%-os hexadecil-trimetil-ammónium-bromid oldattal rögzítettük (Cetavlon-Sigma).

A gélek festését 0,08%-os vizes „Azure A” oldattal végeztük.

10 A gélek leolvasására és értékelésére „Quantity One” szoftvert (Bio-Rad) alkalmaztunk.

Az eredményeket az ATIII-hoz kötődött heparin százalékos arányában fejeztük ki.

A transzfektált májsejtek palackbeli tenyésztése esetében kapott eredményeket a 7. ábra szemlélteti.

15 A standard heparin (SPIM) esetében 31%-os ATIII kötődést mutattunk ki (az elméleti érték 33%), míg a hízósejtenyészetből nyert heparin (keverék) esetében 27%-os kötődést tapasztaltunk.

4. példa

20 Hízósejtek tenyésztése ismételt tételes bioreaktorban

A kísérlethez sertés magzati májból származó, nem transzfektált hízósejteket alkalmaztunk. A sejteket sertés eredetű IL3-mal (2 ng/mL) és SCF-ral (80 ng/mL) kiegészített komplett DMEM/F12 tápközegben, 2,0-4,0x10⁵ sejt/mL kezdeti sejtszám mellett tenyésztettük.

25 Az alkalmazott bioreaktor 2 liter tenyésztőközeg befogadására volt képes, a tenyészet oxigéntenzíóját 20-40%-os szaturáció között tartottuk, a pH értéke 7,0-7,4 között volt, a hőmérsékletet a bioreaktor köpenyében meleg víz keringtetésével 37°C \pm 0,5°C-on állandósítottuk. A tenyészetet hajócsavar segítségével 80-150 fordulat/perc sebességgel kevertük.

30 Négy napos tenyésztést követően a sejtsűrűség 1,3x10⁶ sejt/mL, ami 24-48 óra közötti megkettőződési időtartamnak felel meg. A kinyerés napján a heparinkivonás céljából a tenyészet 80%-át eltávolítottuk, a maradékot az ismételt tételes tenyésztés esetében előírt módon friss tápközeggel 2,0-3,0x10⁵ sejt/mL koncentrációjúra hígítottuk. A hígítást követően 3 nap-

pal a megállapított sejtsűrűség $9,0 \times 10^5$ sejt/mL, ami az első tenyésztéssel összemérhető, 24-48 óra közötti megkettőződési időtartamot jelent (8. ábra).

A heparin kitisztítását az 1. példában bemutatott eljárás szerint végeztük.

5 A kitisztított heparint ezután a 2. példában leírt módon, kontrollként SPIM heparint alkalmazva HPLC eljárással elemeztük.

Az 5. táblázatban és a 9. ábrán magzati sertésmájából származó hízósejtek szuszpenziós tenyésztésével előállított heparin szerglicin (Gly-Ser) proteinmagjának arányát és diszacharid profilját (■) mutatjuk be SPIM standard heparin profiljával összehasonlítva (□).

10 A 6. táblázatban magzati sertésmájából származó hízósejtek szuszpenziós tenyésztésével előállított heparin diszacharidjainak N-acetilézéssel, N-szulfatálással és O-szulfatálással profilját mutatjuk be SPIM standard heparin diszacharidjainak profiljával összehasonlítva.

5. táblázat

	% Standard	% Tenyészet
Gly-Ser	3,5	3,2
IVa	4	5,4
IVs	3,1	7,6
IIa	3,1	4,4
IIIa	1,5	0,7
IIs	8,4	11,9
IIIs	7,2	17,1
Ia	1,3	0,2
Is	62	48,8

6. táblázat

Diszacharidok	% Standard	% Tenyészet
Acetilált	11,8	10,7
2-O-szulfatált	23	8
6-O-szulfatált	42	42
N-szulfatált	83	85
2-O-szulfatált	84	77
6-O-szulfatált	89	71
Szulfátok/karboxilátok	2,4	2,1

Hasonló eredményeket kaptunk SV40 vírus T-antigénnel transzfektált hízósejt-vonal

15 alkalmazása esetén is.

5. példa

Heparin előállítás hízósejttenyészet felülúszójában degranuláló ágens alkalmazásával

Ezt a kísérletet nem-transzfektált magzati sertésmáj-eredetű hízósejt-vonal alkalmazásával hajtottuk végre.

5 Az első tenyésztéstől számított 762. napon a hízósejt-koncentrációt 2×10^6 sejt/mL-re állítottuk be, majd a tenyészetet egy órán át hízósejt-degranulálódást előidéző A23187 jelű ionofor $4 \mu\text{g/mL}$ -ét tartalmazó MEM tápközegben inkubáltuk.

10 A sejtek által kiválasztott és az összes GAG mennyiségét PAGE-val állapítottuk meg. A 10. ábrán látható, hogy az A23187 ionoforral végzett kezelést követően a GAG-ok 70-75%-a a felülúszóban foglalt helyet, míg a kezeletlen sejtek esetében ez az arány megközelítőleg 10% volt ($0 \mu\text{g/mL}$ A23187).

A 762. tenyésztési napon a GAG-ok kinyerésére felhasznált hízósejteket ismételt tápközegbe helyeztük. A sejtek életképességében vagy növekedési erélyében nem lehetett változást megfigyelni.

15 Huszonegy nappal később ugyanezeket a hízósejteket újra degranuláltattuk, a kibocsátott GAG-ok mennyiségét a fentiek szerint határoztuk meg. Kontrollként ebben a vizsgálatban megegyező korú, de a 762. napon nem degranuláltatott hízósejttenyészetet alkalmaztunk.

20 A vizsgálat eredményei a 10. ábrán láthatók. A kibocsátott GAG-ok százalékos aránya az első degranulálódáskor megfigyeltnek felelt meg és összevethető volt az azonos korú kontroll sejtek alkalmazásakor kapott értékkel.

Hasonló eredményeket kaptunk SV40 vírus T-antigénnel transzfektált hízósejt-vonal alkalmazása esetén is.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás heparin előállítására, azzal jellemezve, hogy sertés eredetű hízósejteket tenyészünk és a tenyészetből heparint nyerünk ki.

5 2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a hízósejt-tenyésztésre sertés eredetű hízósejt-vonalat alkalmazunk.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy hízósejteként magzati sertés csontvelőből vagy magzati sertésmájából származó hízósejteket alkalmazunk.

10 4. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy hízósejteként „savós” hízósejteket alkalmazunk.

5. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy hízósejt-forrásként a következő hízósejt-vonalak bármelyikét alkalmazzuk:

- a CNCM-nél (Nemzeti Mikroorganizmus-tenyészet Gyűjtemény) 2001. október 17-én I-2735 számon letétbe helyezett hízósejt-vonal;

15 - a CNCM-nél 2001. október 17-én I-2736 számon letétbe helyezett hízósejt-vonal;
vagy

- a CNCM-nél 2001. október 17-én I-2734 számon letétbe helyezett hízósejt-vonal.

6. Heparinkészítmény, amely az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti eljárás alkalmazásával előállítható.


20

A meghatalmazott:

DANUBIA

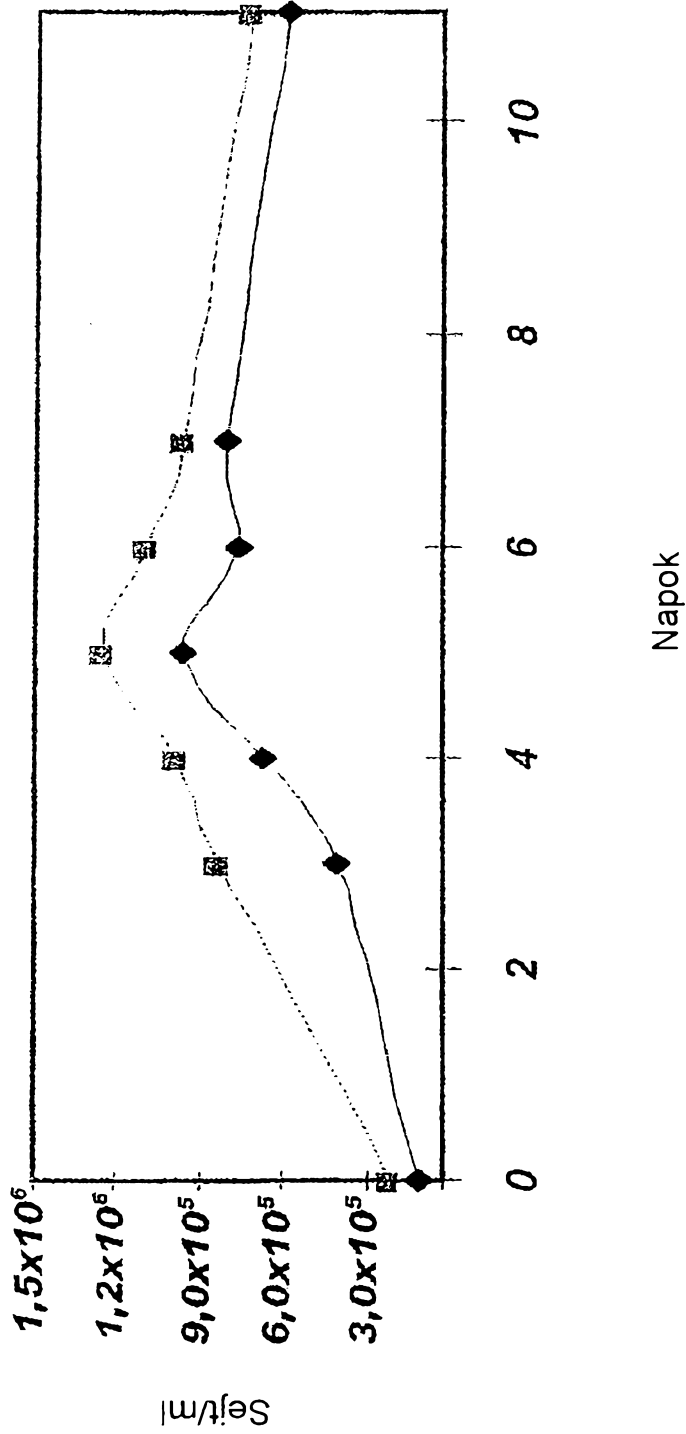
Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

25

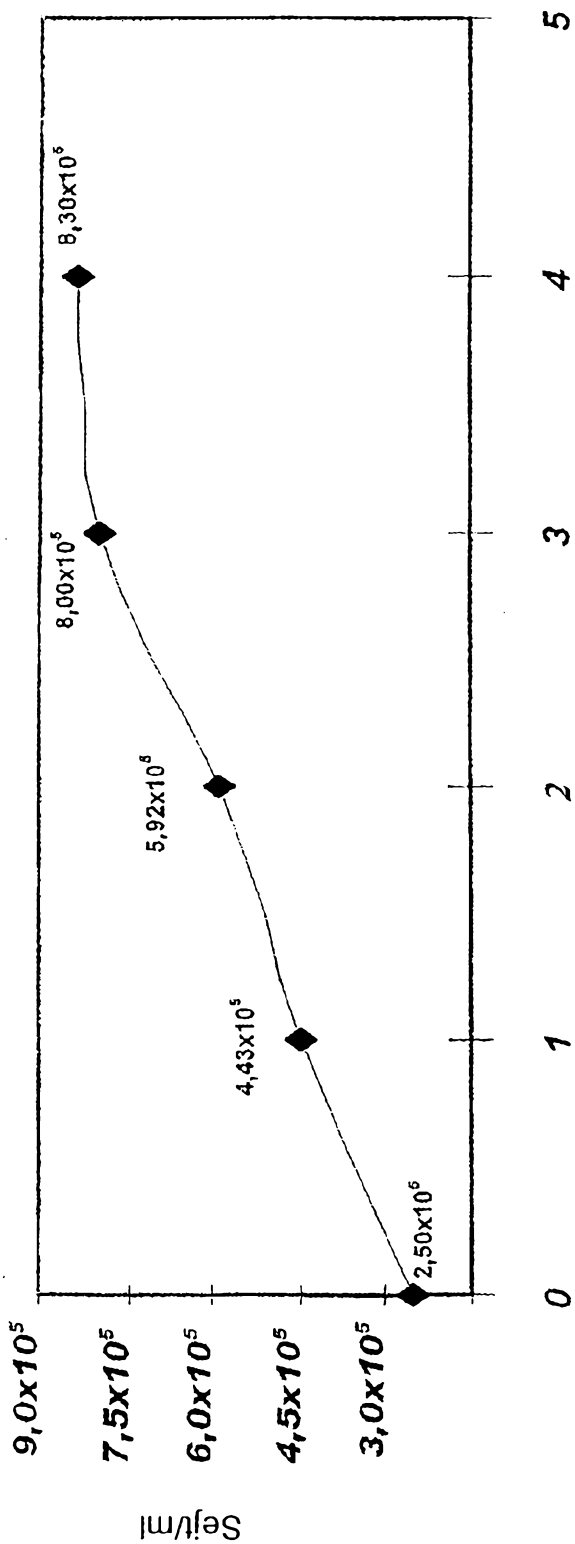

dr. Pethő Árpád
szabadalmi ügyvivő

16 oldal
10 a lra old.

26 oldal
Pethő

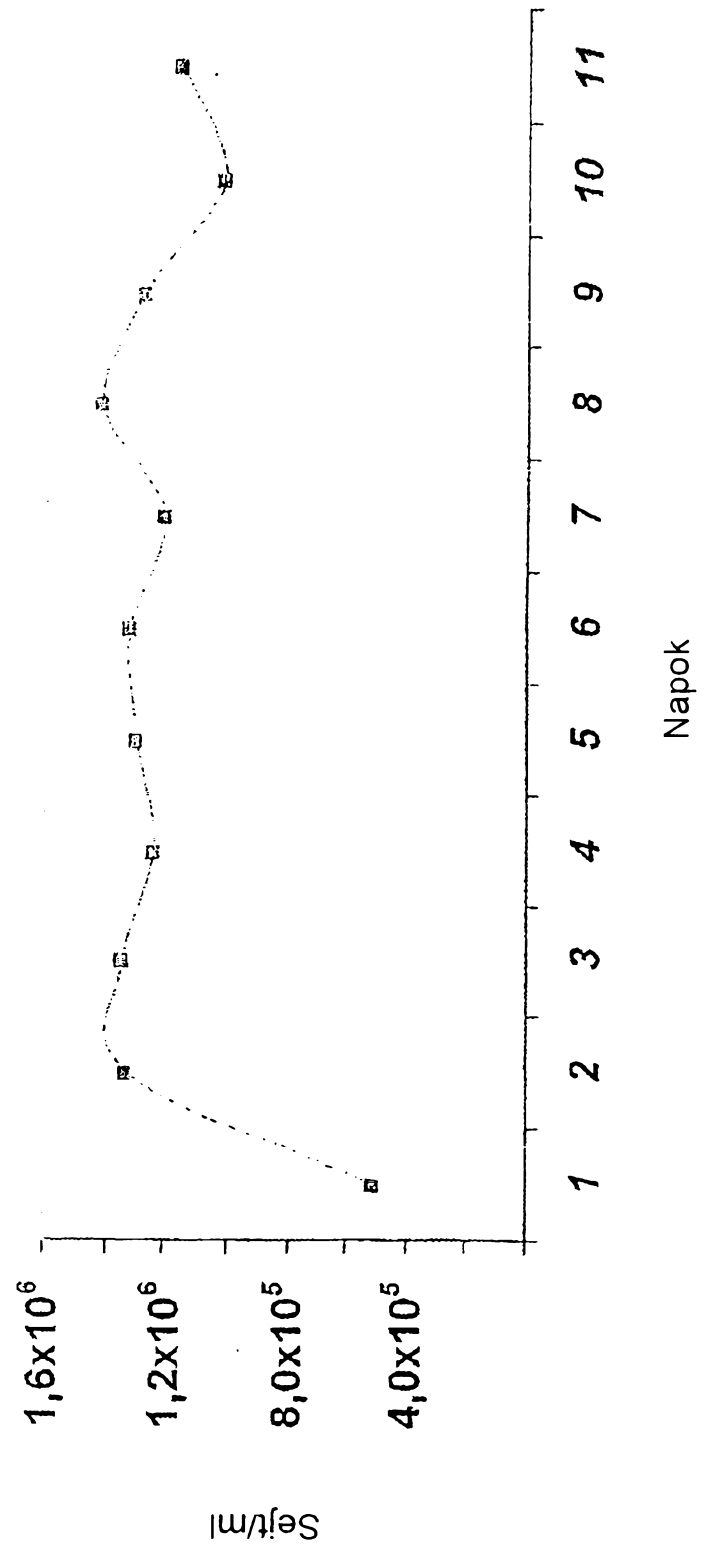


1. ábra

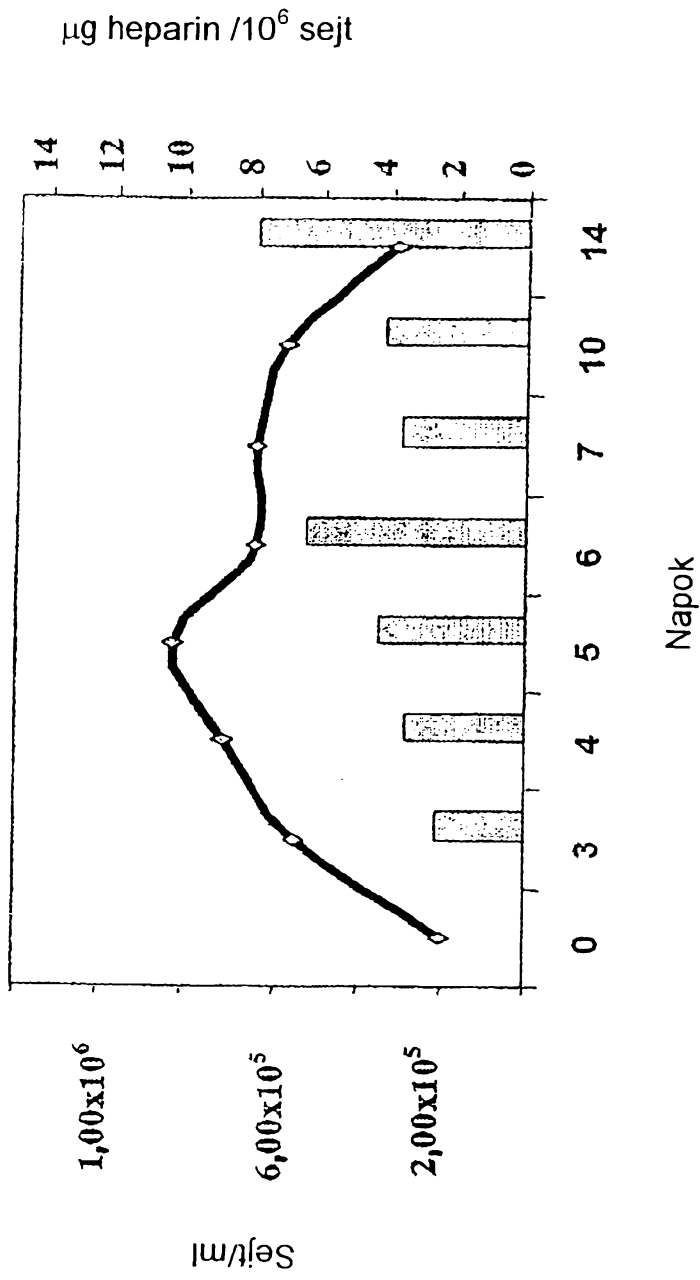


Napok

2. ábra

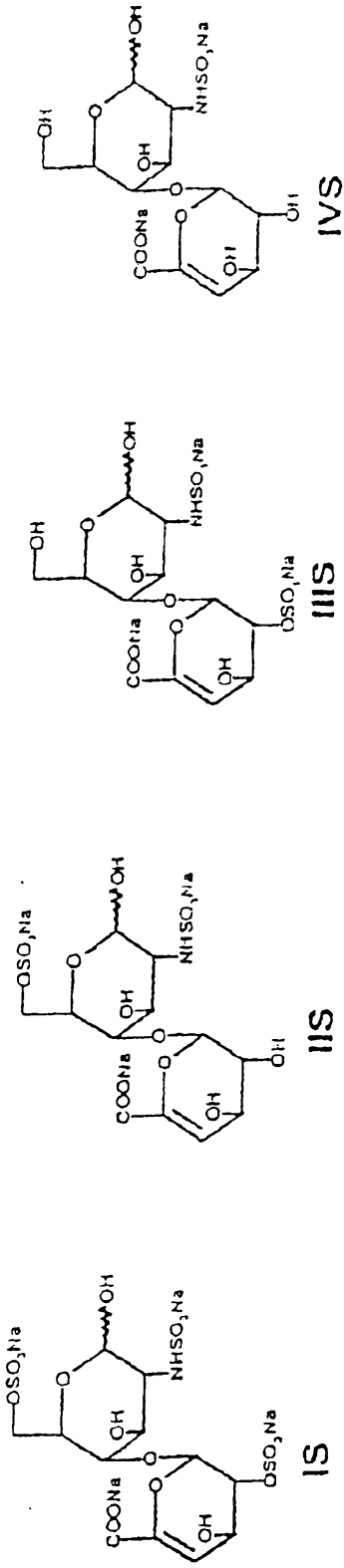


3. ábra

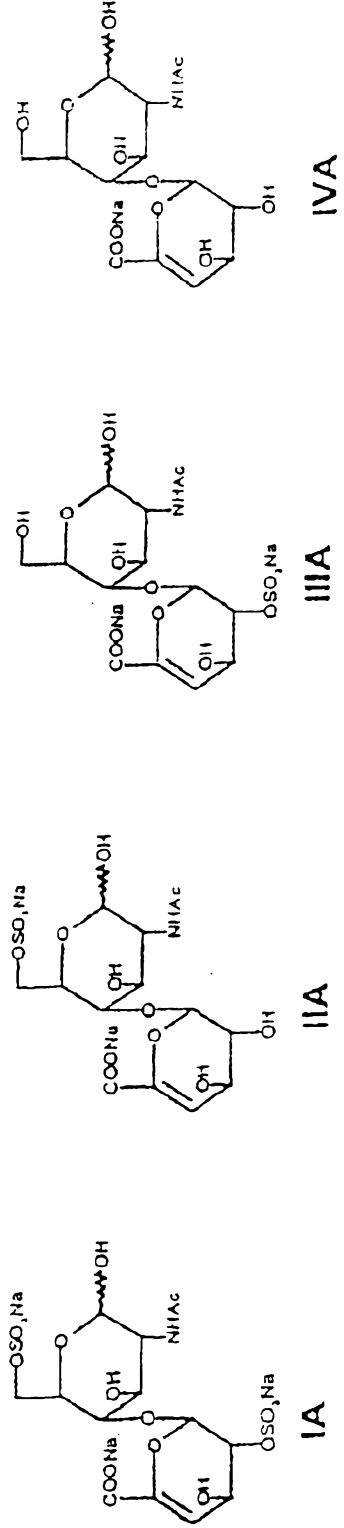


4. ábra

N-szulfatált diszacharidok

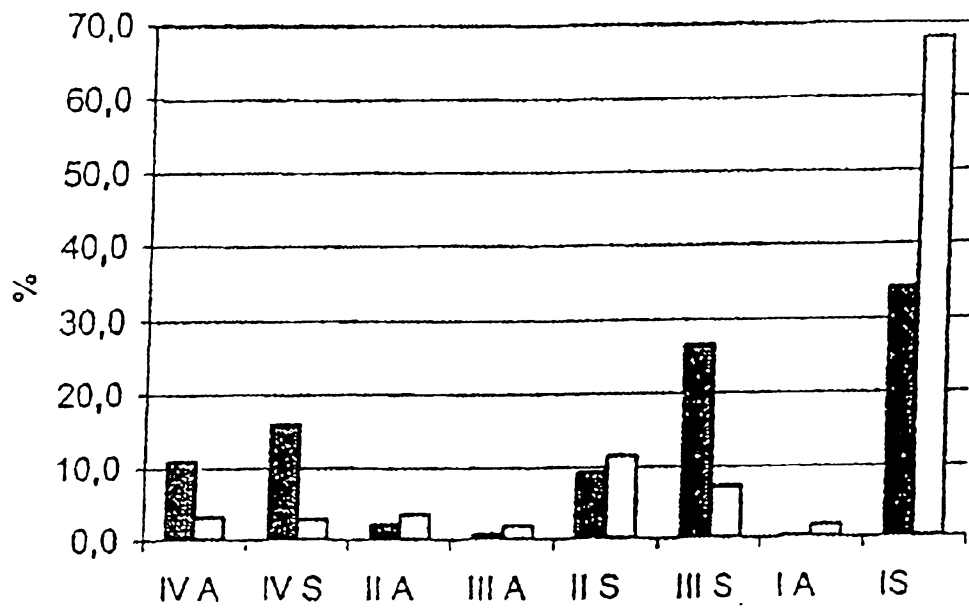


N-acetilált diszacharidok



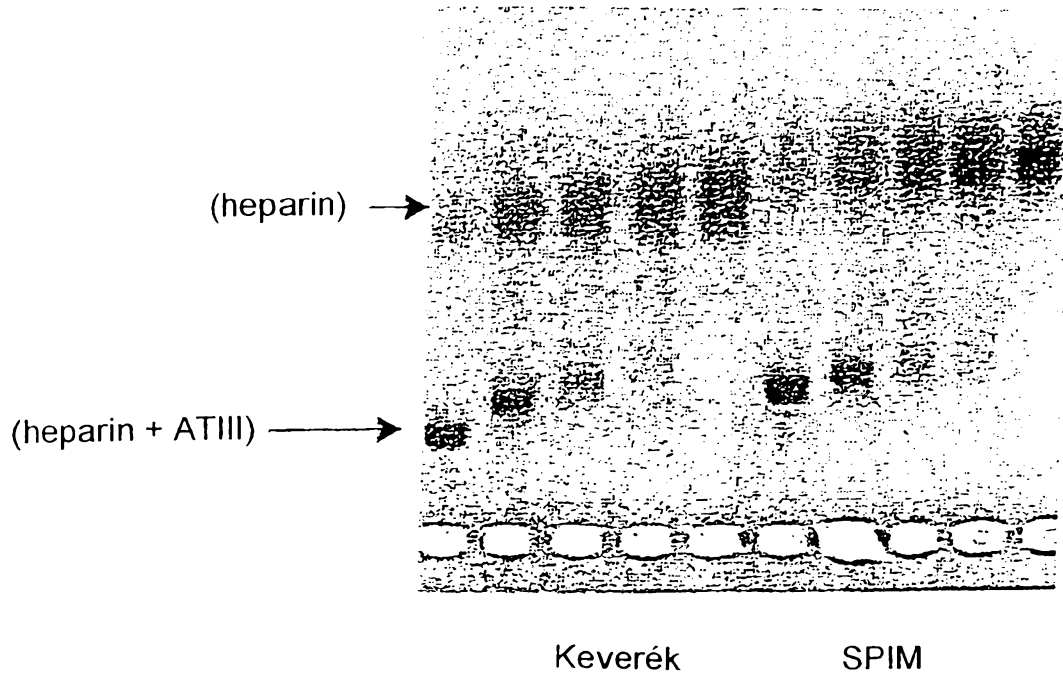
5. ábra

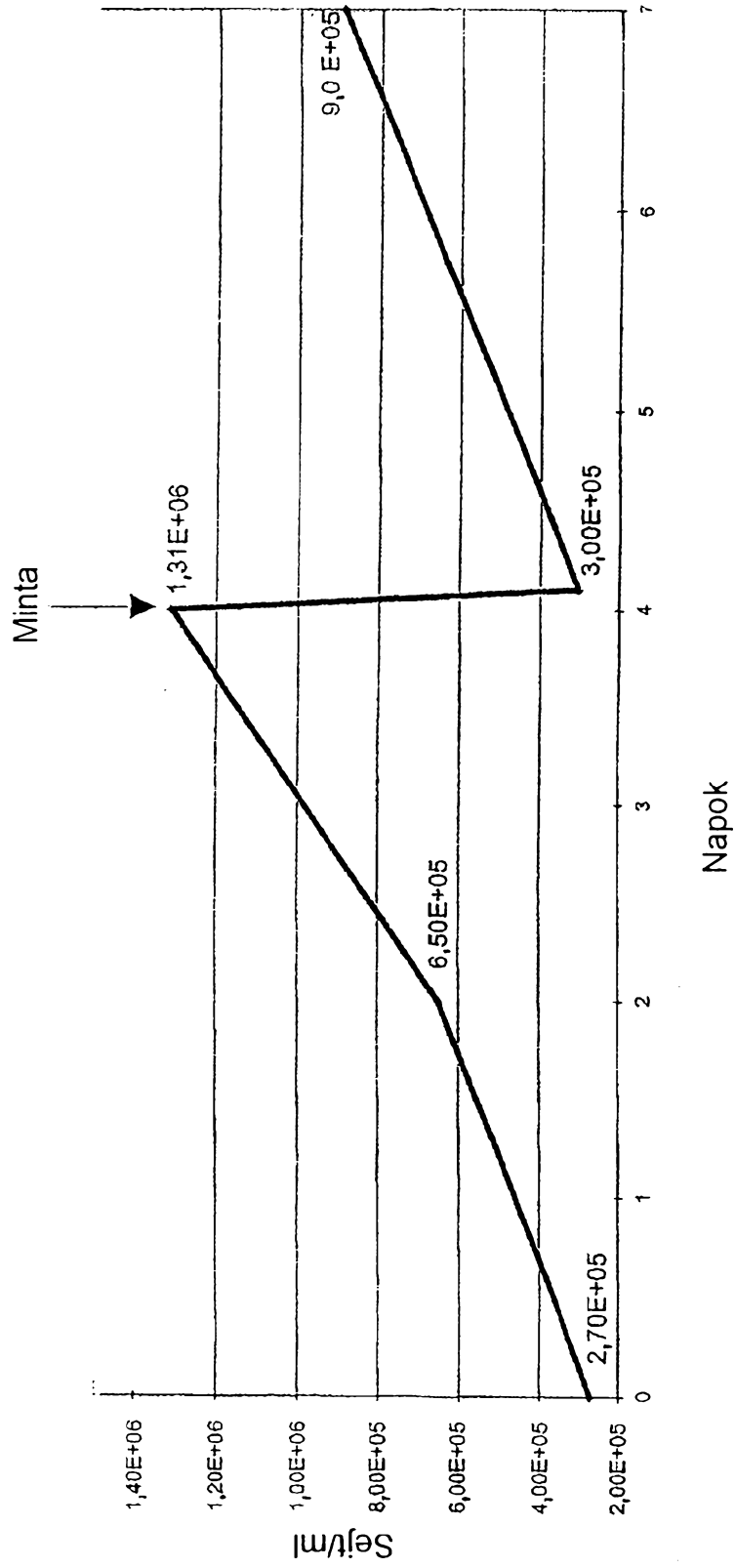
6/10



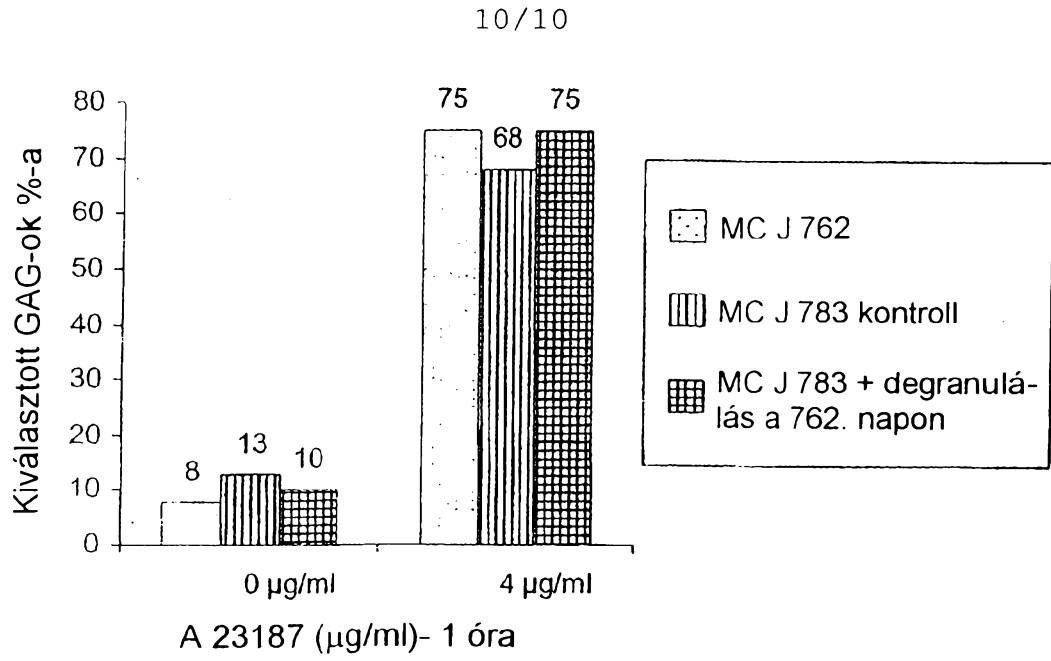
6. ábra

7/10





8. ábra



10. ábra