



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 89102021.7

[51] Int.Cl⁴

C12P 21/00

[43] 公开日 1989 年 11 月 1 日

[22] 申请日 89.3.3

[30] 优先权

[32] 88.3.4 [33] HU [31] 1049/88

[71] 申请人 EGIS 哥斯查亚

地址 匈牙利克伦斯坦

[72] 发明人 樊恩·彼特夫 莱斯奥·巴尔
佐尔特·帕尔

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
代理部

代理人 唐 跃

C12N 15/00

说明书页数: 4 附图页数:

[54] 发明名称 一种增加细胞激动素产率的方法

[57] 摘要

本发明涉及一种以增加的量制备细胞激动素的方法,其中于不同的温度和/或 pH 值条件下完成诱导和生产过程。

1. 一种以较高产率制备细胞激动素的方法，其包括在不同的温度和/或 p^H 值条件下完成诱导和生产过程。

2. 根据权利要求1的方法，其包括在诱导期间比在生产期间使用了较低的 p^H 和/或保温温度。

3. 根据权利要求1或2的方法，其包括在生产过程中将保温的 p^H 值调到7和/或将保温温度调到 $15 \sim 40^\circ\text{C}$ ，较好 $20 \sim 35^\circ\text{C}$ ，最好 $25 \sim 32^\circ\text{C}$ 。

4. 根据权利要求1至3中任一项的方法，其包括在细胞激动素合成开始后改变保温的 p^H 值和/或温度。

5. 根据权利要求1至4中任一项的方法，其包括在细胞激动素合成的指数期内改变保温的 p^H 值和/或温度。

一种增加细胞激动素产率的方法

本发明涉及以提高了的产率制备细胞激动素的方法，其中诱导和生产是在不同的温度和PH值条件下完成的。

细胞激动素在活生物组织和细胞功能之间的相互联系及调节方面起着重要的作用。“细胞激动素”(“Cytokine”)包括由活细胞产生并分泌到其周围环境中的所有具生物学活性的分子或分子集团。例如，其中包括白细胞介素、干扰素(IFNs)、脂皮质素(lipocortin)、肿瘤坏死因子等。

在适当诱导因子参与下，活细胞还能在试管内产生细胞激动素。上述诱导因子可以是病毒、植物血凝素、促细胞分裂剂、佛波醇酯、离子载体，合成的核糖核酸等。可见，可通过适当方法工业化生产天然的生物活性物质。

也可以通过所谓天然方法，即使用基因操作来制备细胞激动素，其中将人和动物细胞置于营养溶液中使之在诱导剂的作用下产生细胞激动素，然后再从培养基中回收细胞激动素。有关制备方法已在文献中有所记载：如使用糖皮质激素诱导剂制备脂皮质素〔参见B.

Rothhut 等，FEBS Lett. 219, 169 (1987)〕；使用PMA诱导剂制备B细胞刺激因子(IL-4)〔参见J. HuLi等，J. EXP. Med. , 165, 157 (1987)〕；使用伴刀豆球蛋白A诱导剂制备白细胞介素2〔参见K. Kato 等，Biochem. Biophys. Res. Commun. 127, 182 (1985)〕；以及使用仙台病毒诱导剂制备α干扰素〔参见K. Cantell 等，Methods Enzymol. 72, 29 (1981)〕等方法。

上述方法的共同特点是，细胞激动素的诱导和产生过程是在同一条件下进行的。

发明是基于这样一个认识：即在最合适的诱导条件下，也会较早地出现生产抑制因素，而这一因素可借助适当调整环境条件得以避免。

使用本发明的方法，能够在体外条件下显著地增加各种细胞产生之细胞激动素的产率。

通常可通过用一种或几种诱导剂处理相应的细胞，然后再保温一定时间来制备细胞激动素。可用已知方法来回收分泌到营养液中的细胞激动剂。

本发明的目的是通过减小细胞激动素合成抑制因子的作用，从而提高细胞激动素的产量。

根据本发明的方法，可按适当的时间间隔改变保温条件，以阻止抑制因子的影响，从而大大提高细胞激动素的产量。

我们发现，在细胞激动素合成的指数期之后，延缓细胞激动素合成的生化过程会更为加强。从指数期开始，细胞激动素产生对保温条件改变的敏感性较小，而且比上述减慢合成过程所受到抑制作用亦较小。因此，可以通过适当改变保温条件及选择合适的时间来延长生产间期。

下列实施例将更为详细地阐明本发明。

在没有提及调节 p^H 值的地方， p^H 值为生理值，即 7.2~7.4。

实施例 1

通过改变保温的 p^H 值增加人白细胞 α 干扰素的产率。

用 0.83% 氯化铵溶液经几次溶血去除污染的红细胞，得到纯

化的血沉棕黄层 (Buffy coat, 从新鲜人血中分离的富含白细胞组份), 然后将所得的白细胞以 1×10^7 个细胞/ml 的浓度悬浮于含无机盐、葡萄糖及 1 mg/ml 无 γ 球蛋白人血清的适当营养液中。向上述悬浮液内加入 200 IU/ml 人白细胞 α 干扰素, 将混合溶液于 37°C 下保温 2 小时。然后再向细胞悬浮液内加入 100 HA 单位/ml 的仙台病毒, 并将混合溶液于 37°C 下保温 2 小时。

2 小时后, 向含有细胞悬浮液的小瓶内加入一定量的 Tris-HCl 缓冲液, 将其 pH 值调到 7, 然后保温 20 小时。经离心从营养溶液内分离出白细胞。如此制得的干扰素粗品的抗病毒效价为 $200,000 \text{ IU/ml}$, 即是说比没加缓冲液调 pH 值所制得的干扰素抗病毒效价高两倍。

实施例 2

改变保温温度和 pH 值以增加人白细胞 γ 干扰素和白细胞介素 2 的产率。

可在同一细胞培养物中同时制备 γ 干扰素和白细胞介素 2。

由新鲜血沉棕黄层制得的白细胞或在先前制备干扰素时用过的白细胞, 均可用于该生产过程。可按实施例 1 中所述的方法制备的细胞悬液。

将白细胞以 $1 \times 10^7 \sim 2 \times 10^7$ 细胞/ml 的浓液悬浮于含有 1 mg/ml 无 γ 球蛋白人血清的已知营养溶液中。可于 37°C 下加入 $10 \sim 20 \mu\text{g/ml}$ 伴刀豆球蛋白 A、或 $1 \sim 10 \mu\text{g/ml}$ 植物血凝素、或 $20 \sim 100 \mu\text{g/ml}$ meserine, 或 $0.5 \sim 2 \mu\text{g}$ A 23187 离子载体、或 $5 \sim 30 \text{ ng/ml}$ 佛波醇肉豆蔻酸乙酸酯进行诱导。加入诱导剂 3 小时后, 将含有白细胞的小瓶置于 30°C 恒

温箱中，将 p^H 调到 7 后保温该混合溶液。保温后，离心以从含 γ 干扰素和白细胞介素 2 (IL-2) 的营养液中分离出细胞。

γ 干扰素的抗病毒效价为 15,000 IU/ml，白细胞介素 2 的抗病毒效价为 1,300 IU/ml。这些效价比在恒定温度 37℃ 下未用缓冲液调 p^H 制得的产物的效价高 2~2.5 倍。

实施例 3

改变保温温度以增加脂皮质素的产率

用 0.83% 氯化铵溶液经几次溶血去除污染的红细胞，由新鲜人血中制得纯化的血沉棕黄层。然后将所得的纯白细胞以 1×10^7 个细胞/ml 的浓度悬浮于不含血清的营养溶液中，用 $1 \mu M$ 地塞米松处理并于 37℃ 下保温 2 小时。再将保温温度调到 30~32℃ 继续保温 15 至 20 小时。接着以离心法从营养液中除去白细胞。所得上清液即为脂皮质素的粗制品，其对角叉菜胶诱发的炎症有很强的抗炎作用。在非恒定温度下制得的脂皮质素粗品比在恒定温度下制得的脂皮质素的抗炎作用高 2~2.5 倍。抗炎作用的大小是按 Winter 等人 (*Pract. Soc. Exp. Biol. Med.*, 111, 644 (1962)) 所述的方法通过小鼠体内的角叉菜胶试验测定的。