



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENÍU

230 114

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavná priorita

(22) Prihlášené 24 11 82

(21) PV 8397-82

(51) Int. Cl.³
A 61 K 45/02

(40) Zverejnené 25 11 83

(45) Vydané 01 05 86

(75)
Autor vynálezu

FUCHSBERGER NORBERT RNDr.CSc.,
BORECKÝ LADISLAV MUDr.DrSc. člen korešpondent ČSAV a SAV
BRATISLAVA

(54)

Spôsob prípravy ľudského leukocytárneho
interferónu

vynález sa týka spôsobu prípravy ľudského leukocytového interferónu.

Doterajší stav techniky: Cantell a Hirvonen pripravili interferón purifikovaný selektívnym zrážaním [L. Cantell, S. Hirvonen: J. Gen. Virol. 39, 541, (1978)], ktorý obsahuje nežiaduce prímеси, ktoré sa pri zrážaní dostanú zo zdroja do finálneho preparátu. Tento môže mať potom nežiaduce účinky, napr. vyvolávanie vysokých horúčok. M. Rubinstein a kol. využitím zložitých separačných metód pripravili interferón vo veľmi malých množstvách s použitím špeciálnych zariadení [M. Rubinstein, S. Rubinstein, P. C. Familietti, M. S. Gross, R. S. Miller, A. A. Waldman, S. Pestka: Science 202, 1289, (1978)]. Širšiemu využitiu interferónu bráni nedostatok vhodných postupov na získanie požadovaného množstva kvalitného preparátu interferónu.

Uvedené nevýhody v podstatnej miere odstraňuje vynález, ktorého podstata spočíva v tom, že leukocytárny koncentrát získaný z transfúznej stanice sa podrobí dvojnásobnej erytrolýze chloridom amónnym, leukocyty sa premyjú vo fosfátmi tlmenom fyziologickom roztoku a suspendujú sa v kultivačnom médiu, potom sa infikujú s vírusom Newcastle'skej choroby a inkubujú sa 8 až 24 h pri 37 °C, čím sa získa surový ľudský leukocytový interferón, z ktorého sa tuhé nečistoty odcentrifugujú, okyseli sa kyselinou chlorovodíkovou na pH 2 na dobu 48 až 72 h, potom sa koncentruje dvojnásobným zrážaním s rodanidom draselným, zvyšky rodanidu sa oddialyzujú a napokon sa purifikuje gélovou filtráciou cez modifikovaný sieťovaný dextran, pričom frakcia v rozpätí hodnôt elučných konstant K_{av} 0,119 až 0,65 sa znovu zráža s rodanidom draselným, dialyzuje sa a po testovaní aktivity sa zlyofilizuje.

výhodou navrhovaného spôsobu prípravy leukocytového interferónu oproti doterajším postupom je to, že vhodným skĺbením precipitačnej a separačnej techniky sa dá pripraviť štandardný preparát vysokej kvality, ktorý je areaktívny a apyretický, pričom má vysokú špecifickú aktivitu, väčšiu ako milión jednotiek na miligram bielkoviny neobsahuje znečisteniny o relatívnej molekulovej hmotnosti väčšej ako 45 000 daltonov, pričom celý postup nie je natoľko zložitý, že by sa nedal robiť vo veľkých množstvách, takže je ekonomicky nenáročný. výhodou je tiež, že tento liek využíva prirodzený ochranný mechanizmus tým, že ovplyvní bunky v organizme tak, že sú na vírusy necitlivé. Ďalšou výhodou je, že semipurifikovaný preparát sa dá skladovať pri teplote -40°C po dobu 1 roka, takže sa dá nahromadiť a ďalšiu purifikáciu robiť naraz s väčším množstvom.

Príklad 1

Spracovanie 10 leukocytových koncentrátov:

Leukocytové koncentráty sa zmiešajú, získa sa 300 ml zmesi, ktorá sa vmieša do 3000 ml 0,83 % roztoku chloridu amónneho, vychladeného na 4°C . po dobu 10 min. sa zmes centrifuguje 20 min. pri 1000 ot. min⁻¹. Tekutina nad úsadkom sa odsaje a bunky sa resuspendujú v 1000 ml 0,83 % roztoku chloridu amónneho. po 10 min. sa bunky sцентрифугujú 20 min. pri 1000 ot. min⁻¹. Tekutina nad úsadkom sa odsaje a bunky sa resuspendujú v 1000 ml fosfátmi tlmenom fyziologickom roztoku na pH 7,2. suspenzia sa sцентрифугuje 20 min. pri 1000 ot. min⁻¹, tekutina nad úsadkom sa odsaje a bunky sa suspendujú v 100 ml kultivačného média, ktoré má zloženie /g.l⁻¹/:

L-arginín hydrochlorid 0,021 00, L-cystín 0,012 00, L-tyrozín 0,018 00, L-histidín 0,008 00, L-izoleucín 0,026 00, L-leucín 0,026 00, L-lyzín 0,029 00, L-metionín 0,007 50, L-fenylalanín 0,016 50, L-treonín 0,024 00, L-tryptofán 0,004 00, L-valín 0,023 50, L-glutamín 0,292 00, chlorid vápenatý 0,200 00, fenolová červená 0,010 00, +/- Biotín 0,001 00, kyselina listová 0,001 00, cholínchlorid 0,001 00, nikotínamid 0,001 00, D-pantotenát vápenatý 0,001 00, pyridoxal hydrochlorid 0,001 00, i-inozitol 0,001 80, riboflavín 0,000 10, glukóza 1,000 00, chlorid sodný na tkanivové kultúry 6,800 00, chlorid draselný

na tkanivové kultúry 0,400 00, kyslý fosforečnan sodný kryštalický s 2 vodami 0,125 00, síran horečnatý kryštalický so 7 vodami 0,200 00, penicilín C-draselná soľ 40 jednotiek, síran streptomycínu 40 mikrogramov a 4 objemové percentá agamma-séra, to je ľudské sérum zbavené globulínov precipitáciou síranom amónnym.

Bunky sa spočítajú, zistí sa, že sa získalo 4 500 miliónov leukocytov. K suspenzii sa pridá ešte 350 ml média, čím sa získa koncentrácia 10^7 leukocytov v 1 ml. Suspenzia sa umiestni do dvojlitrovej kultivačnej fľaše a infikuje sa so 40 000 hemaglutinačných jednotiek vírusu Newcastleovej choroby. Fľaša sa dá do termostatu do otáčavého bubna s horizontálnou rovinou otáčania a kultivuje sa 8 h pri 37°C . Potom sa suspenzia schladí na 4°C , scentrifuguje sa 20 min pri 2000 ot. min^{-1} . Tekutina nad úsadkom predstavuje surový interferón. V tomto sa na 48 h upraví pH 2 pomocou kyseliny chlorovodíkovej, zneutralizuje sa hydroxidom draselným. K 460 ml surového interferónu sa pridá 46 ml 5 mol na liter rodanidu draselného, pH sa upraví kyselinou chlorovodíkovou na 3,5. Po 60 min sa zmes scentrifuguje 20 min pri 2000 ot. min^{-1} . Tekutina nad úsadkom sa odsaje, úsadok sa rozmieša v 46 ml fyziologického roztoku, pomocou hydroxidu sodného sa zneutralizuje, čím sa i precipitát rozpustí, zvyšky rodanidu sa odstránia dialýzou. Tento koncentrát sa môže skladovať pri teplote -40°C celý rok bez straty aktivity. V priebehu purifikácie sa materiál koncentruje a ďalšie kroky sa robia naraz s väčším množstvom. K 320 ml semipurifikovaného preparátu sa pridá 32 ml 5 mol na liter roztoku rodanidu draselného pri pH 3,5. Zmes sa scentrifuguje 20 min pri 2000 ot. min^{-1} , tekutina nad úsadkom sa odsaje a úsadok sa rozmieša v 32 ml fyziologického roztoku a potom sa zneutralizuje. Koncentrát sa potom aplikuje na kolónu naplnenú sieťovým dextranom /sephadex G-75/ s výškou stĺpca 32 cm a priemerom 10 cm. Elúcia sa robí fosfátmi tlmeným fyziologickým roztokom s prídavkom 0,02 % azidu sodného, hydrostatickým tlakom výšky 38 cm. Pre túto kolónu sú hodnoty K_{av} 0,119 až 0,65 zodpovedné elučnému objemu 1180 až 1800 ml. To znamená, že sa získa 620 ml purifikátu. K tomuto sa pridá 62 ml 5 mol

na liter rodanidu draselného, okyseli sa na pH 3,5 a scentrifuguje sa po dobu 20 min pri 2000 otáčkach za min Tekutina nad úsadbom sa odsaje, úsadbok sa rozmieša v 60 ml fyziologického roztoku, prefiltruje sa cez bakteriologický filter, po odstránení zvyškov rodanidu dialýzou sa zlyofilizuje.

Príklad 2

postupuje sa ako v príklade 1 s tým rozdielom, že získané leukocyty sa kultivujú 24 h.

Príklad 3

Postupuje sa ako v príklade 1 s tým rozdielom, že v surovom interferóne sa upraví pH 2 na 72 h.

Príklad 4

Postupuje sa ako v príklade 2 s tým rozdielom, že v surovom interferóne sa upraví pH 2 na 72 h.

Ľudský interferón môže nájsť široké uplatnenie v medicíne ako liek pri širokej škále vírusových i nádorových ochorení.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

230 114

spôsob prípravy leukocytárneho interferónu vyznačujúci sa tým, že leukocytárne koncentráty sa podrobia dvojnásobnej erytrolýze chloridom amónnym, získané leukocyty sa premyjú fyziologickým roztokom a suspendujú v kultivačnom médiu, potom sa infikujú vírusom Newcastelskej choroby a inkubujú 8 až 24 h pri 37 °C, čím sa získa surový interferón, z ktorého sa tuhé nečistoty odcentrifugujú, na dobu 48 až 72 h sa okyslí kyselinou chlorovodíkovou na pH2, potom sa koncentruje dvojnásobným zrážaním rodanidom draselným a napokon sa purifikuje gélovou filtráciou cez modifikovaný sieťovaný dextran, pričom frakcia elučných konštánt K_{av} 0,119 až 0,65 sa znovu skoncentruje rodanidom draselným, zvyšky rodanidu sa oddialyzujú a preparát sa zlyofilizuje.