



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

215108
(11) (82)

(51) Int. Cl.³
A 61 K 45 02

(22) Přihlášeno 11 07 78
(21) (PV 4645-78)

(32) (31) (33) Právo přednosti od 15 07 77
(23871/77) Velká Británie

(40) Zveřejněno 30 10 81

(45) Vydáno 15 10 84

(72)

Autor vynálezu

JOHNSTON DENIS MICHAEL, BECKENHAM (Velká Británie)

(73)

Majitel patentu

THE WELLCOME FOUNDATION LIMITED, LONDÝN (Velká Británie)

(54) Způsob výroby interferonu

1

Vynález se týká způsobu výroby interferonu jako látky s nespécifickým protiviropným účinkem.

Interferon je protiviropná látka bílkovinné povahy, která je produkováána buňkami jako odpověď na stimulaci virem nebo jiným indukčním prostředkem. Interferony mohou být produkovány velkým množstvím buněk, například bílými krvinkami, fibroblasty, lyfoblastoidními buňkami, buňkami epitheliálního typu, například buňkami ledvin nebo HeLa buňkami, buňkami myelomu a podobně. Volba buněk, které produkují interferon, závisí na požadovaném produktu, protože různé interferony mají vlastnosti, které závisí na tkáni, z níž jsou odvozeny. V případě, že interferon má být použit u člověka, jsou nejvýhodnějším zdrojem lidské buňky. Po svém vzniku se interferon z buňky vylučuje a může dojít k jeho působení na další buňky, čímž se brání replikaci viru nebo vzniku škodlivých účinků. Tyto protiviropné účinky nejsou specifické vzhledem k určitým virům, přestože některé viry jsou na působení interferonu citlivější.

Interferon byl rovněž užit jako chemoterapeutikum při léčbě určitých typů karcinomů, kde bylo dosaženo příznivých účinků. [Strander, H., Cantell K., a další, Fo-

2

gargty Intern. Center Proc., U. S. Govt. Printing Office, Washington D. C., 28: str. 377 až 381, 1977 předneseno na The Conference at the National Institute of Health, Bethesda, 9. až 11. prosince 1974].

Větší množství lidského interferonu je možno získat ze tří hlavních zdrojů, a to z lidských bílých krvinek, lidských fibroblastů a lymfoblastoidních buněk. Až dosud bylo velmi obtížné získat větší množství lidského interferonu s takovou čistotou, aby byl použitelný pro klinické účely. Výroba interferonu z bílých krvinek je například omezena dostupností lidské krve. Výroba interferonu z fibroblastů je brzděna skutečností, že tyto buňky rostou pouze v souvislosti s určitým povrchem. Lymfoblastoidní buňky mají tu výhodu, že je možno pěstovat je v suspenzi a je možno u nich vyvolat tvorbu interferonu působením viru.

Jedním z možných způsobů výroby lidského interferonu z lymfoblastoidních buněk je způsob, při němž se na suspenzi buněk působí malým množstvím interferonu homologního druhu a tím se u těchto buněk vyvolá produkce interferonu. Pak se přidá ještě vhodný virus [Strander H., a další, J. Clin. Micro., 1, str. 116 až 117 (1975)].

Bylo zjištěno, že se produkce interferonu z lidských lymfoblastoidních buněk svr-

chu uvedeným způsobem podle podmínek podstatně mění, je například možno získat až 60 až 80 megajednotek interferonu v 1 litru, což odpovídá výtěžku 30 až 40 megajednotek na 10^9 buněk. 1 megajednotka je rovna 10^6 jednotek interferonu podle podmínek uvedených v Medical Research Council research standard preparation of interferon, 69/19, N-Finter, Interferons, 1973, str. 485 až 486, published by North Holland. V jiných příkladech bylo možno dosáhnout pouze 1 megajednotky v 1 litru, to znamená 0,5 až 0,7 megajednotek na 10^9 buněk nebo ještě méně z podobných buněk, které byly ošetřeny naprosto stejným způsobem. Příčiny těchto rozdílů výtěžku interferonu nejsou známy.

Nyní bylo zjištěno, že v případě, že se na buňky produkující interferon působí karboxylovou kyselinou nebo její soli a pak se provádí indukce výroby interferonu, je možno reprodukovatelně získat poměrně vysoké výtěžky interferonu.

Předmětem vynálezu je tedy způsob výroby interferonu spočívající v pěstování epitheliálních nebo lymfoblastoidních buněk, v nichž je možno tvorbu interferonu vyvolat na vhodném prostředí pro zvolené buňky při přidání indukčního činidla, například viru, s následnou izolací interferonu produkovaného buňkami, vyznačující se tím, že se před indukcí buňky inkubují v prostředí, které obsahuje účinné netoxické množství nasycené karboxylové kyseliny o 2 až 6 atomech uhlíku s přímým řetězcem nebo její soli, například sodné, draselné nebo amonné, při teplotě 33 až 38 °C po dobu 12 až 72 hodin.

Buňky zvolené pro výrobu interferonu jsou například v případě, že interferon má být podáván lidem, lidské buňky. Zvolenými buňkami mohou být epitheliální buňky nebo lymfoblastoidní buňky, například buňky Namalva nebo jiné lymfoblastoidní buněčné linie. Linie lymfoblastoidních buněk, které je možno sériově množit ve tkáňové kultuře, je možno odvodit od tkáňových kultur lidských bílých krvinek z periferní krve známými způsoby. [Hope, J. H., Horne M. K., Scott W., Int. J. Cancer, **3**, str. 857 až 866 (1978), Hope J. H., Horne M. K., Scott W., Int. J. Cancer, **4**, str. 255 až 260 (1969), Chang R. S., Golden H. D., Nature, **234**, str. 359 až 360 (1971)]. Leukocyty mohou být získány ze zdravých nebo nemocných lidí a je možno je jednoduchým způsobem odvodit v případě, že tyto buňky se infikují virem Epstein-Barr (EBV), nebo je možno odvodit je i z kultur bílých krvinek, které tímto virem infikovány nebyly, například buňky z pupečnickové krve, k nimž byly přidány buňky EBV nebo buňky in-

fekční mononukleózy nebo Burkittova lymfom.

Lymfoblastoidní buněčné linie je možno snadno odvodit od buněk nemocných s burkitovým lymfomem, protože tyto buňky již jsou infikovány EBV. Zvlášť linií Namalva bylo možno odvodit způsobem podle publikace [Nyoroi O., Klein G., Adams A., Dombon L., Int. J. Cancer **12**, str. 396 až 408 (1973)]. Tato linie byla získána z afrického děvčátka téhož jména. Buňky této linie jsou schopny při vhodné stimulaci produkovat velká množství interferonu. [Strander H., Morgensen K. E., Cantell K., J. Clin. Micro., **1**, str. 116 až 117, (1975)]. Subkultura těchto buněk byla získána od Dr. Iona Gressera (Villejuif, Francie) v lednu 1975. V této době byla buněčná linie adaptována tak, aby mohla růst na živném prostředí RMPI 1640 s 10 % telecí fetální krve. V laboratoři byly buňky přizpůsobeny tak, že rostou na tomtéž prostředí, doplněném 5 až 7 % krevního séra z telat starých 6 až 8 měsíců a bylo možno kulturu udržet tak, že byla 2 až 3× týdně přeočkována v průběhu 18 měsíců. V průběhu tohoto přeočkování byly získány subkultury. Tyto buňky jsou nyní nazývány Namalva (WRL) a byly uloženy do velkého počtu ampulí, které jsou skladovány v kapalném dusíku. Buňky jsou prostě infekce mykoplasmaty a jejich vzorky byly uloženy v American Type Culture Collection pod číslem CRL 1432.

Živné prostředí RMPI 1640 má následující složení:

Složka	Koncentrace mg/l
Aminokyseliny	
l-arginin	200
l-asparagin	50
l-asparagová kyselina	20
l-cystin	50
l-glutamová kyselina	20
l-glutamin	300
redukovaný glutathion	1
glycin	10
l-histidin	15
l-hydroxyprolin	20
l-isoleucin	50
l-leucin	50
l-lysinhydrochlorid	40
l-methionin	15
l-fenylalanin	15
l-prolin	20
l-serin	30
l-threonin	20
l-tryptofan	5
l-tyrosin	20
l-valin	20

Vitamíny

p-aminobenzoová kyselina	1
biotin	0,2
panthothénát vápenatý	0,25
cholinchlorid	3
kyanokobalamin	0,005
kyselina listová	1
l-inositol	35
nikotinamid	1
pyridoxinhydrochlorid	1
riboflavin	0,2
thiaminhydrochlorid	1

Soli

dusičnan vápenatý (tetrahydrát)	100
hydrogenfosforečnan sodný (heptahydrát)	1512
síran hořečnatý (heptahydrát)	100
chlorid draselný	400
hydrogenuhlíčan sodný	2000
chlorid sodný	6000

Různé

glukóza	2000
fenosulfoftalein	5

pH se upraví na 7,2 přidáváním 10% vodného roztoku uhličitanu sodného

Buňky Namalva/WRL byly užity v následujících příkladech, vynález je však proveditelný i s dalšími subliniemi buněk Namalva a dalších lymfoblastoidních buněk.

Karboxylová kyselina užitá jako přísada do prostředí s výhodou obsahuje 2 až 8 atomů uhlíku, zvláště 3 až 6 atomů uhlíku, nejvýhodnější kyselinou je kyselina máselná. Užije-li se kyselina jako taková, pak se obvykle vytváří v živném prostředí sůl této kyseliny, protože prostředí obsahuje různé anorganické a organické soli. Je také možno přidat do prostředí sůl karboxylové kyseliny, v tomto případě jde obvykle o sůl sodnou, draselnou nebo amonnou.

Aby bylo možno získat interferon, je nutno zvolené buňky nejprve pěstovat za podmínek, které jsou vhodné pro zvolený buněčný typ, jak je možno zjistit v literatuře. Například lidské lymfoblastoidní buňky, například buňky Namalva, dobře rostou v suspenzi v živném prostředí, jako je například prostředí RMPI 1640 [Moore G. E., a další, 1967, J. Amer. Med. Assoc. **199**, 519 až 524], přičemž prostředí je doplněno sérem, například telecím nebo koňským, obvykle v množství 5 až 10 objemových %.

Pro výrobu interferonu z lymfoblastoidních buněk, například z buněk Namalva, se tyto buňky pěstují v suspenzi tak dlouho, až se dosáhne žádané koncentrace, například 0,5 až 10×10^6 buněk/ml, pak je mož-

no buňky užít pro výrobu interferonu. K tomuto účelu se koncentrace buněk upraví na hodnotu 0,25 až 6×10^6 buněk/ml, s výhodou 0,2 až 3×10^6 buněk/ml, zvláště 1×10^6 buněk/ml ve vhodném živném prostředí, například v některém z následujících prostředí:

a) je možno užít svrchu uvedeného čerstvého živného prostředí;

b) je možno užít živného prostředí, v němž byly buňky pěstovány, a přidat čerstvé živné prostředí; nebo

c) je možno užít živné prostředí, v němž byly buňky pěstovány, a toto prostředí doplnit čerstvými živnými látkami.

V tomto stupni se také přidává karboxylová kyselina nebo její sůl do konečné koncentrace 0,1 až 10 mmolů, s výhodou 0,2 až 5 mmolů, zvláště 0,5 až 2,0 mmoly. Koncentrace kyseliny je omezena její toxicitou pro buňky, kyselina však má být přítomna v takovém množství, aby účinně podporovala výrobu interferonu, takže je nutno dosáhnout optimální hranice mezi zlepšeným výtěžkem interferonu a buněčnou toxicitou. Tuto hodnotu je nutno stanovit pro každou použitou kyselinu zvlášť. V případě, že se užije jiná kyselina než kyselina máselná, je tedy obvykle nutno užít jiné molární množství. Po přidání kyseliny se pak buňky inkubují při teplotě 33 až 38 °C, s výhodou 35 až 37 °C po dobu 12 až 72 hodin v závislosti na koncentraci užitě karboxylové kyseliny, například buňky linie Namalva lidských lymfoblastoidních buněk je nutno inkubovat 48 hodin při konečné koncentraci kyseliny máselné 1 mmol a při pH 6,2 až 7,4, s výhodou 6,6 až 7,2.

Po inkubaci se buňky oddělí od prostředí s obsahem karboxylové kyseliny způsobem, který buňky nepoškozuje, například odstředěním nebo filtrací. Buňky je možno znovu uvést v suspenzi ve vhodném prostředí a znovu indukovat tvorbu interferonu známým způsobem [Tovey M. G., a další, Proc. of Soc. for Exp. Biol. a Med., **146**, 809 až 815 (1974)]. Je například možno buňky znovu uvést v suspenzi v prostředí RMPI 1640 bez obsahu séra nebo s obsahem až 5 objemových % séra na konečnou koncentraci buněk 0,25 až 8×10^6 buněk/ml, s výhodou 0,5 až 4×10^6 buněk/ml. Pak se přidá vhodný indukční prostředek, například virus jako Sendai, k buněčné suspenzi do konečné koncentrace 5 až 200 HAU/ml, s výhodou 20 až 50 HAU/ml. Buněčná suspenze se důkladně promísí a pak se inkubuje 12 až 48 hodin při teplotě 34 až 37 stupňů Celsia. V případě, že se užije teploty 35 °C, je nutno inkubovat buněčnou suspenzi přes noc, v této době se interferon z buněk uvolní a přejde do prostředí. Pak se buňky odstraní, například odstředěním, čímž se získá supernatant s obsahem surového interferonu.

Výhodou inkubace buněk za přítomnosti karboxylové kyseliny s přímým řetězcem

nebo její soli před indukcí tvorby interferonu jsou poměrně vysoké výtěžky interferonu, a to 5 až 10 megajednotek v 1 litru nebo více, přičemž tyto výtěžky jsou reprodukovatelnější, než bez inkubace buněk s kyselinou. Mimoto se buňky adaptují na růst v prostředí, které obsahuje menší množství séra, například 1 až 2 objemová %, a v tomto prostředí pak produkují stejné množství interferonu jako buňky v živném prostředí s trojnásobným nebo čtyřnásobným množstvím séra. Tento výsledek je velmi důležitý, protože cena séra tvoří větší část nákladů na výrobu interferonu.

Další výhodou inkubace buněk za přítomnosti karboxylové kyseliny je, že je možno opustit stimulaci buněk před výrobou interferonu malým množstvím homologního interferonu, čímž je opět možno ušetřit část nákladů.

Vynález bude osvětlen následujícími příklady. V příkladech jsou užity zkratky HAU/ml (hemaglutinační jednotky/ml) a pfn/cell (jednotky tvorby plaků/buňka).

Příklad 1

Lidské lymfoblastoidní buňky linie Namalva WRL byly pěstovány v suspenzi za stálého míchání v nádobě o obsahu 100 l v živném prostředí RMPI 1640 se 7 % telecího séra, s přidavkem neomycinu a polymycinu a hydrogenuhličitanu pro řízení pH. Jakmile bylo dosaženo buněčné koncentrace 2×10^6 buněk/ml, bylo z nádoby odebráno 10 l prostředí a prostředí bylo zředěno stejným množstvím čerstvého živného prostředí, současně byla přidána kyselina máselná do konečné koncentrace 1 mmol a buňky byly inkubovány při teplotě 37 °C po dobu 48 hodin. V průběhu této doby byly buňky míchány ve skleněných nádobách, přičemž poměr mezi objemem buněčné suspenze a vzduchem v nádobě byl přibližně 2 : 5.

Po inkubaci byly buňky odstředěny při 2500 otáčkách za minutu po dobu 5 minut při teplotě 20 °C v odstředivce MSE Colspin.

Pak byly buňky znovu uvedeny v suspenzi v prostředí RMPI 1640 s obsahem 2 % telecího séra a byla znovu stanovena koncentrace buněk. Buňky pak byly zředěny na koncentraci $2,75 \times 10^6$ buněk v 1 ml a pak byl přidán předem vytvořený lymfoblastoidní interferon do konečné koncentrace přibližně 100 referenčních jednotek interferonu v 1 ml. Pak byl přidán virus Sendai do konečné koncentrace 75 hemaglutinačních jednotek v 1 ml, k indukcí tvorby interferonu. Po důkladném promíchání byla buněčná suspenze uložena do Thompsonových lahví v množství 300 ml do jedné láhve. Láhve byly pak inkubovány přes noc při teplotě 35 °C. Další den byla buněčná suspenze odstředěna při 3000 otáčkách za minutu po dobu 10 minut při teplotě 4 °C

ve svrchu uvedené odstředivce. Supernatant s obsahem surového interferonu byl okyselen na 24 hodin na pH 2 a pak byl neutralizován na pH 4 pro následné skladování.

Další podíl buněčné suspenze z nádoby o obsahu 100 l byl zpracováván týž způsobem, s tím rozdílem, že nebyla přidána kyselina máselná.

Vzorky kontrolních buněk a buněk po působení kyseliny máselné byly zkoumány souběžně na obsah interferonu. Byly získány následující výsledky:

Kontrolní buňky:

3,75 log referenčních jednotek interferonu/ml, což je ekvivalentní 6 megajednotka/l

Buňky po působení kyseliny máselné:

4,80 log referenčních jednotek interferonu/ml, což je ekvivalentní 63 megajednotka/l

Příklad 2

Buňky Namalva/WRL se pěstují do koncentrace $2,5 \times 10^6$ buněk/ml v živném prostředí z příkladu 1 a pak se oddělí odstředěním při 800 g po dobu 10 minut. Buňky se uvedou znovu v suspenzi v čerstvém živném prostředí. Pak se buněčná suspenze zředí na konečnou koncentraci $1,3 \times 10^6$ buněk/ml a vzorky o obsahu 50 ml se uloží do nádob z plastické hmoty pro pěstování tkáňových kultur o obsahu 75 cm². K jednotlivým nádobám se přidá různé množství roztoku sodné soli kyseliny máselné v chloridu sodném s obsahem fosfátového pufru při koncentraci soli kyseliny máselné 100 mmolů, a to tak, že konečná koncentrace této soli v jednotlivých nádobách je 0, 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2 a 5 mmolů.

Nádoby se pak inkubují při teplotě 36 °C po dobu 48 hodin a buňky v každé nádobě se pak odstředí při 800 g 5 minut. Každý podíl buněk se znovu uvede v suspenzi do konečné koncentrace $4,3 \times 10^6$ buněk/ml v prostředí RMPI 1640 s obsahem 2 % telecího séra (udržovací prostředí). Vzorky 10 ml každé buněčné suspenze se uloží do dvou nádob z plastické hmoty o obsahu 25 cm² a provede se indukce tvorby interferonu přidáním viru Sendai do konečné koncentrace 40 HAU/ml.

Nádoby se pak vrátí na 20 hodin do prostředí s teplotou 36 °C. Interferon, produkováný každou z těchto kultur, se izoluje odstředěním z buněk 5 minut při 1000 g. Supernatant s obsahem interferonu se upraví na pH 2,0 přidáním koncentrované kyseliny chlorovodíkové a skladuje se přes noc při teplotě 4 °C. Následující den se pH upraví na 7,0 a každý z uvedených vzorků se zkoumá na obsah interferonu. Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce.

Koncentrace sodné soli kyseliny máslé v mmolech	Titru interferonu ($\log_{10}$ referenčních jednotek inter- feronu/ml)	Výtěžek interferonu mega- jednotky/l
0	4,09	12
0,1	4,05	11
0,2	4,26	18
0,5	4,62	42
1,0	4,92	83
2,0	4,96	91
5,0	4,70	50

Příklad 3

Opakuje se způsob výroby interferonu podle příkladu 2, s tím rozdílem, že se místo

másléanu sodného užije octan sodný a užije se koncentrací 0, 0,2, 1,0, 5,0 mmolů. Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce:

Koncentrace octanu sodného v mmolech	Titru interferonu ($\log_{10}$ refe- renčních jednotek inter- feronu/ml)	Výtěžek interferonu mega- jednotky/l
0	3,55	3,5
0,2	3,52	3,3
1,0	3,59	3,9
5,0	3,98	9,6

Příklad 4

Byl opakován způsob výroby interferonu podle příkladu 2, s tím rozdílem, že

místo sodné soli kyseliny máslé byl užit propionát sodný v koncentraci 0, 0,5, 1,0, 2,0, 5,0 a 10,0 mmolů. Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce:

Koncentrace propionátu sodného v mmolech	Titru interferonu ($\log_{10}$ refe- renčních jednotek inter- feronu/ml)	Výtěžek interferonu mega- jednotky/l
0	3,69	5
0,5	3,71	5
1,0	4,20	16
2,0	4,49	31
5,0	4,05	11
10,0	4,15	14

Příklad 5

Opakuje se způsob výroby interferonu podle příkladu 2 s tím rozdílem, že místo sod-

né soli kyseliny máslé se užije pentanoát sodný v koncentraci 0, 0,2, 0,5, 1,0, 2,0 a 5,0 mmolů. Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce:

Koncentrace pentanoátu sodného v mmolech	Titru interferonu ($\log_{10}$ refe- renčních jednotek inter- feronu/ml)	Výtěžek interferonu mega- jednotky/l
0	3,81	6
0,2	3,94	9
0,5	4,26	18
1,0	4,59	39
2,0	4,85	71
5,0	4,37	23

Příklad 6

Opakuje se způsob výroby interferonu podle příkladu 2, s tím rozdílem, že se sod-

ná sůl kyseliny máslé nahradí hexanoátem sodným v koncentraci 0, 0,2, 0,5, 1,0 a 2,0 mmolů. Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce:

Koncentrace hexanoátu sodného v molech	Titř interferonu ($\log_{10}$ referenčních jednotek interferonu/ml)	Výtěžek interferonu mega-jednotky/l
0	3,20	2
0,2	3,69	5
0,5	3,63	4
1,0	3,80	6
2,0	3,99	10

Příklad 7

Doba trvání účinku na tvorbu interferonu po působení sodné soli kyseliny máselné na buňky Namalva/WRL.

50 ml suspenze buněk Namalva/WRL s koncentrací $1,0 \times 10^6$ buněk/ml v čerstvém prostředí RPMI 1640 s obsahem 7 objemových % telecího séra se uloží do 5 nádob z plastické hmoty s povrchem pro růst buněk 75 cm². Pak se přidá ke 4 z těchto nádob sodná sůl kyseliny máselné v chloridu sodném s obsahem fosfátového pufru do konečné koncentrace 1 mmol. Nádobu se pak inkubují při teplotě 36 °C po dobu 48 hodin. Buňky v nádobě bez máselnanu sodného a v jedné z nádob s obsahem 1 mmolu máselnanu sodného se pad odstředí 5 minut při 1000 g, znovu se uvedou v suspenzi v prostředí RPMI 1640 s obsahem 2

objemových % telecího séra a upraví se na množství $3,0 \times 10^6$ buněk/ml. K těmto buňkám se pak přidá virus Sendai do konečné koncentrace 20 HAU/ml.

Buňky ve zbývajících nádobách se slíjí, odstředí 5 minut při 1000 g a pak se znovu uvedou v suspenzi do konečné koncentrace $1,0 \times 10^6$ buněk/ml v čerstvém živném prostředí RPMI 1640, které vůbec neobsahuje máselnan sodný. Tyto buňky se pak rozdělí po 50 ml do tří nových nádob z plastické hmoty o plošném obsahu pro růst buněčné kultury 75 cm² a inkubují při teplotě 36 °C. Další dny se buňky z jedné z těchto nádob odstředí 5 minut při 1000 g, znovu uvedou v suspenzi v prostředí RPMI 1640 s obsahem 2 objemová % telecího séra na koncentraci $3,0 \times 10^6$ buněk/ml a znovu se přidá virus Sendai. Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce:

	Koncentrace máselnanu (mmoly)	Inkubace za přítomnosti máselnanu (dny)	Následná inkubace bez máselnanu (dny)	Titř interferonu $\log_{10}$ jednotek/ml	Výtěžek interferonu mega-jednotky/l
1.	0	0	0	4,05	11
2.	1	2	0	4,57	37
3.	1	2	1	4,30	20
4.	1	2	2	3,95	9
5.	1	2	3	3,92	8

Příklad 8

Produkce interferonu tkáňovou kulturou opičích ledvinových buněk linie V₃ po působení sodné soli kyseliny máselné.

Nádobu z plastické hmoty pro pěstování tkáňových kultur s plochou 25 cm² se naočkuje buněčnou linií V₃ [Christofinis G. J., J. Med. Micro, 3 (2), 251 až 258, 1970] při koncentraci $1,5 \times 10^5$ buněk/ml v 10 ml Eaglesova prostředí s obsahem 4 objemových % fetálního telecího séra. Nádobu se uloží na 24 hodin při teplotě 36 °C, aby se buňky přizpůsobily nádobě. Pak se z každé nádoby odstraní živné prostředí a přidá se 10 ml čerstvého živného prostředí. K jedné z nádob se přidá máselnan sodný v chloridu sodném s obsahem fosfátového pufru

do konečné koncentrace 2 mmoly. Obě nádoby se pak inkubují 48 hodin při teplotě 36 °C. Živné prostředí se odstraní a každá z kultur se naočkuje 0,5 ml viru Sendai při 2000 HAU/ml. Nádobu se ještě 1 hodinu udržují při teplotě 36 °C, aby virus mohl proniknout do buněk. Pak se materiál z buněk odstraní, buňky se promyjí roztokem chloridu sodného s obsahem fosfátového pufru a pak se k nim znovu přidá 10 ml svrchu uvedeného prostředí s obsahem 2 objemových % fetálního telecího séra. Nádobu se inkubují 24 hodin při teplotě 36 °C a pak se supernatant s obsahem interferonu odstředí a prostředí s obsahem interferonu se dále zpracovává obvyklým způsobem při pH 2 a zkoumá na obsah interferonu. Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce:

	Titru interferonu ($\log_{10}$ jednotek/ml)	Výtěžek interferonu, megajednotky/l
1. V3 bez přidání máselnanu sodného	0,66	0,005
2. V3 s přidáním máselnanu sodného	1,32	0,021

Příklad 9

Zlepšení titru interferonu přidavkem máselnanu sodného při použití buněk Namalva/WRL po indukci různými prostředky.

Buňky Namalva/WRL se odstředí a uvedou v suspenzi do čerstvého prostředí RMPI 1640 s obsahem 7 objemových % telecího séra do koncentrace $1,38 \times 10^6$ buněk/ml. Vždy 500 ml suspenze se uloží do dvou skleněných nádob o obsahu 1 litr a k jed-

né z těchto nádob se přidá máselnan sodný v chloridu sodném s obsahem fosfátového pufru do koncentrace 1 mmol. Kultura se míchá 48 hodin při teplotě 46 °C, pak se odstředí a buňky se uvedou v suspenzi v prostředí RMPI 1640 s obsahem 2 objemových % telecího séra do koncentrace $5,0 \times 10^6$ buněk/ml. Vždy 10 ml této suspenze se užije k indukci různými indukčními prostředky. Supernatanty se zpracovávají běžným způsobem při pH 2. Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce:

	Množství	Buňky, předem ošetřené máselnanem	Titru interferonu $\log_{10}$ jednotek/ml	Výtěžek interferonu megajednotky/l
1. Sendai virus	40 HAU/ml	—	3,71	5
2. Sendai virus	40 HAU/ml	+	4,56	36
3. Newcastle Disease virus	20 HAU/ml	—	2,45	0,3
4. Newcastle Disease virus	20 HAU/ml	+	3,19	2
5. Semliki Forest virus	10 pfu/cell	—	0,72	0,005
6. Semliki Forest virus	10 pfu/cell	+	1,22	0,02
7. kyselina polyribosinová — komplex kyseliny polyribocytidylové DEAE-dextran	100 μ g	—	0,92	0,008
8. polyribosinová kyselina — komplex kyseliny polyribocytidylové DEAE-dextran	100 μ g	+	1,66	0,05

Kyselina polyribosinová jako komplex polyribocytidylových kyselin byla získána z P—L Biochemicals Inc. Lot č. 477 121.

Příklad 10

Zlepšení titru interferonu z buněk Namalva/WRL, adaptovaných pro růst na prostředí se sníženým množstvím séra.

Buňky Namalva/WRL, které běžně rostou v prostředí RMPI 1640 s obsahem 7 objemových % telecího séra byly adaptovány pro růst prostředí, které obsahovalo pouze 2 % telecího séra. Tyto kultury obvykle dosahují koncentrace buněk 1,5 až $2,0 \times 10^6$ /ml.

Byl odebrán vzorek ze dvou kultur s obsahem buněk 1,67 a $2,05 \times 10^6$ /ml a vzorky byly zředěny 1 polovinou čerstvého prostředí. Pak byla přidána kyselina máselná do koncentrace 1 mmol a kultury byly míchány 48 hodin při teplotě 37 °C.

Po působení kyseliny máselné byla provedena indukce tvorby interferonu. Kontrolní indukce byla prováděna na týchž buňkách bez inkubace s kyselinou máselnou, tyto buňky byly pěstovány další 2 dny v běžném živném prostředí. Buňky po působení kyseliny máselné i kontrolní buňky byly odstředěny a znovu uvedeny v suspenzi v čerstvém prostředí při koncentraci $2,75 \times 10^6$ buněk/ml. Byl přidán virus Sendai, a to 50 HAU/ml, a kultura byla inkubována přes noc při teplotě 35 °C.

Kultury obsahovaly tyto titry interferonu:

Kontroly bez kyseliny máselné:

$\log_{10}$ 3,45 až 3,46/ml, tj. 3 megajednotky/l

Buňky po působení kyseliny máselné:

$\log_{10}$ 4,69 a 4,82/ml, tj. průměrně 58 megajednotek/l.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob výroby interferonu, spočívající v pěstování epitheliálních nebo lymfoblastoidních buněk, v nichž je možno tvorbu interferonu vyvolat na vhodném prostředí pro zvolené buňky při přidání indukčního činidla, například viru, s následnou izolací interferonu produkovaného buňkami, vyznačující se tím, že se před indukcí buňky inkubují v prostředí, které obsahuje účinné netoxické množství nasycené karboxylové kyseliny o 2 až 6 atomech uhlíku s přímým řetězcem nebo její soli, například sodné, draselné nebo amonné, při teplotě 33 až 38 °C po dobu 12 až 72 hodin.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se užije lymfoblastoidních buněk.

3. Způsob podle bodu 2, vyznačující se tím, že se užije lymfoblastoidních buněk linie Namalva.

4. Způsob podle bodů 1 až 3, vyznačující se tím, že se užije kyseliny máselné.

5. Způsob podle bodů 1 až 3, vyznačující se tím, že se kyselina nebo její sůl přidává k živnému prostředí do koncentrace 0,1 až 10 mmolů.

6. Způsob podle bodu 4, vyznačující se tím, že konečná koncentrace kyseliny nebo její soli je 0,2 až 5 mmolů.