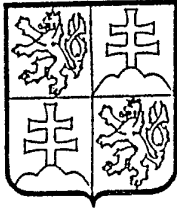


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

PATENTOVÝ SPIS 277068

(21) Číslo přihlášky : 7294-89
(22) Přihlášeno : 21.12.89
(30) Prioritní data :

(40) Zveřejněno : 17.06.92
(47) Uděleno : 30.09.92
(24) Oznámeno udělení ve Věstníku : 18.11.92

(13) Druh dokumentu : B6
(51) Int. Cl.⁵ :

B 01 D 37/00
B 01 J 47/02

(73) Majitel patentu : Lomský Radovan MUDr., Praha, CS;
Příbyšová Jaroslava RNDr., Hradec Králové, CS

(72) Původce vynálezu : Lomský Radovan MUDr., Praha, CS;
Příbyšová Jaroslava RNDr., Hradec Králové, CS

(54) Název vynálezu : Způsob izolace lidského hypofysárního prolaktinu

(57) Anotace :

Řešení se týká způsobu izolace vysoce purifikovaného lidského hypofysárního prolaktinu o vysoké specifické aktivitě gelovou filtrací a chromatografií na iontoměničích. Podstata řešení spočívá v tom, že hypofysární extrakt čistí gelovou filtrační chromatografií na polymerisovaném dextransu s frakcionačním rozmezím 4 000 - 150 000 daltonů, po níž následuje anexová chromatografie na celulóse se substituovanými diethylaminoethylovými iontovými skupinami za použití eluce s konvexním gradientem koncentrace NaCl, katexová chromatografie na zesíťované agarose se substituovanými karboxymethylovými iontovými skupinami za použití eluce s lineárním gradientem koncentrace NaCl a konečné gelová filtrace na polymerisovaném dextransu s frakcionačním rozmezím 4 000 až 150 000 daltonů a velikostí částic 10 až 40 μm.

Vynález se týká způsobu izolace vysoce purifikovaného lidského hypofysárního prolaktinu (hPRL) z hypofys o specifické aktivitě vyšší než u dosud známých metod izolace.

Dosud se hPRL isoloval z extraktů lidských hypofys buď kombinací gelové filtrace na polymerisovaném dextranu s frakcionačním rozmezím 4 000 až 150 000 daltonů a ionexových chromatografií postupně na celulose se substituovanými diethylaminoethylovými a potom karboxymethylovými iontovými skupinami za použití stupňovité eluce s diskontinuálně stoupajícími koncentracemi chloridu sodného (P. Hwang et al.. J. Clin. Endocrinol. Metab. 36: 1 110 až 1 118, 1973), nebo postupnými chromatografiemi, jež zahrnovaly gelovou filtraci na zesíťované agarose, chromatografii s hydrofobní interakcí na agarose se substituovanými fenylovými skupinami, gelovou filtraci na polymerisovaném dextranu s frakcionačním rozmezím 4 000-150 000 daltonů a ionexovou chromatografii na agarose se substituovanými diethylaminoethylovými skupinami (P. Roos et al.. Biochim. Biophys. Acta 588: 368 až 379, 1979), nebo kombinací chromatografie s hydrofobní interakcí na zesíťované agarose se substituovanými fenylovými skupinami s následnou anexovou chromatografií na celulose se substituovanými diethylaminoethylovými iontovými skupinami za přítomnosti acetonitrilu (S. C. Hodgkinson a P. J. Lowry: Biochem. J. 199: 619 až 627, 1981). Preparáty, získané těmito technikami, jsou komerčně dostupné a jejich specifická aktivita v systému radioimunoanalýzy (RIA) se pohybuje při vztažení na mezinárodní standard Světové zdravotnické organizace (WHO) IRP No. 75/504 na úrovni přibližně 30 mezinárodních jednotek na 1 mg izolované substance hPRL.

Úkolem vynálezu bylo optimalisovat sled jednotlivých typů chromatografií a optimalisovat eluční podmínky při těchto chromatografiích tak, aby byl získán hPRL s nejvyšší možnou specifickou aktivitou, tj. specifickou aktivitou vyšší než u dosud známých metod izolace. Vysoká specifická aktivita hPRL, jež je podmíněna zejména odstraněním jiných kontaminujících proteinů a čistotou konečného preparátu hPRL, je totiž nezbytnou podmínkou pro přípravu vysoce specifických antisér pro diagnostickou radioimunoanalýzu (RIA) a pro použití hPRL při značkování radioaktivním jodem ^{125}I v systému RIA.

Podstata vynálezu spočívá v tom, že se při ionexových chromatografiích používá k eluci navázaného hPRL kontinuálních gradientů koncentrace elučního pufru místo dosud používaných diskontinuálních gradientů, takže se dosáhne podstatně lepšího oddělení materiálu s obsahem hPRL od nečistot, a že se na závěr purifikace připojí gelová filtrace na polymerovaném dextranu s velikostí částic 10 až 40 μm a s frakcionačním rozmezím 4 000 až 150 000 daltonů. Výhoda tohoto postupu spočívá v tom, že má izolovaný hPRL nejvyšší dosud známou specifickou aktivitu, tj. nejvyšší obsah mezinárodních jednotek na jednotku hmotnosti.

Při izolacích byly jednotlivé purifikační kroky prováděny na různých typech chromatografického zařízení.

Konkrétní provedení vynálezu začíná homogenisací 600 zmrazených lidských hypofys v 600 ml 50 mM Tris-HCl, pH 8,7. Homogenát se extrahuje v tomto pufru za stálého míchání po dobu 2 hodin. Po

centrifugaci a slití supernatantu se získaný sediment homogenisuje a extrahuje za stejných podmínek ještě dvakrát. Spojené supernatanty se upraví na pH 6,3 pomocí 50% kyseliny octové a suspenze se ponechá při 4 °C po dobu 16 hodin. Po centrifugaci se supernatant s vysokým obsahem lidského růstového hormonu (hGH) uschová jako zdroj pro izolaci terapeuticky použitelného hGH. Sediment s vysokým obsahem hPRL se rozsuspenderuje v 500 ml vody a pH suspenze se upraví na 10,5 pomocí 1M NaOH. Směs se míchá 16 hodin při 4 °C. Po centrifugaci se pH supernatantu upraví na 8,5 pomocí 5M HCl a přidá se postupně absolutní ethanol do konečné koncentrace 25%. Vzniklý precipitát se odstraní centrifugací a vyhodí. K supernatantu se přidá postupně další absolutní ethanol do konečné koncentrace 85%. Směs se ponechá přes noc při 4 °C. Druhý den se suspenze centrifuguje, supernatant se vyhodí a sediment se rozpustí ve 200 ml 100 mM NaOH a pH roztoku se upraví pomocí 1M HCl na pH 10,0. Nepatrný nerozpuštěný zbytek se oddělí centrifugací a supernatant se nanese na sloupec polymerisovaného dextranu s frakcionačním rozmezím 4 000 až 150 000 daltonů, ekvilibrovaného v pufru 10 mM Tris-HCl, pH 8,5. Frakce s obsahem hPRL jsou slity a aplikovány na sloupec celulosy se substituovanými diethylaminoethylovými iontovými skupinami, ekvilibrované stejným pufrům jako předtím polymerisovaný dextran. Po promytí lože gelu asi 500 ml startovního pufru následuje eluce za použití konvexního gradientu koncentrace NaCl tak, že mísicí nádobka obsahuje 1 000 ml pufru 10 mM Tris-HCl, pH 8,5, a reservoár obsahuje 1 000 ml stejného pufru s obsahem 120 mM NaCl. Frakce s obsahem hPRL se spojí a naředí vodou tak, aby byla absorbance roztoku v kyvetách o šířce 1 cm při 280 nm menší než 0,5. pH se potom upraví zředěnou kyselinou octovou na 5,6. Vzorek se aplikuje na sloupec zesíťované agarosy se substituovanými karboxymethylovými iontovými skupinami, ekvilibrované v 10 mM pufru octanu amonného, pH 5,6. Po promytí dvěma objemy startovního pufru následuje eluce za použití lineárního gradientu koncentrace NaCl tak, že mísicí nádobka obsahuje 360 ml 10 mM pufru octanu amonného a reservoár obsahuje 360 ml stejného pufru s obsahem 500 mM NaCl. Oba pufrů mají pH 5,6. Efluent z chromatografie je ihned upraven 1M Trisem na pH 8 až 9, frakce s obsahem hPRL se koncentrují ultrafiltrací za použití membrány s retenčním limitem 10 000 daltonů a vzorek se aplikuje na sloupec polymerisovaného dextranu o velikosti částic 10 až 40 μm s frakcionačním rozmezím 4 000 až 150 000 daltonů, ekvilibrovaného ve 100 mM kyselém uhličitanu amonném. Střed vrcholu s obsahem hPRL se lyofilisuje. V průběhu všech chromatografií jsou frakce s obsahem hPRL identifikovány RIA systémem pro stanovení hPRL. hPRL izolovaný výše popsanou metodologií je zcela homogenní při analytických elektroforesách v polyakrylamidu v kyselém i v alkalickém prostředí a také při elektroforese v polyakrylamidu za přítomnosti sodiumdodecylsulfátu (SDS). Takto izolovaný hPRL má specifickou aktivitu 36 až 43 mezinárodních jednotek v 1 mg izolované substance, tj. nejvyšší dosud dosaženou specifickou aktivitu.

Substance hPRL byla použita pro přípravu králičích antisér proti hPRL, pro značkování hPRL radiojodem 125-I a pro konstrukci kalibrační křivky v systému RIA, určeném pro diagnostické stanovení hladin hPRL v krevním séru žen s nejrůznějšími typy gynekologicko-endokrinologických onemocnění.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

Způsob izolace lidského hypofysárního prolaktinu o vysoké specifické aktivitě metodami gelové filtrace a chromatografií na iontoměničích, vyznačující se tím, že se hypofysární extrakt čistí gelovou filtrací na polymerisovaném dextransu s frakcionačním rozmezím 4 000 až 150 000 daltonů, načež následuje anexová chromatografie na celulóse se substituovanými diethylaminoethylovými iontovými skupinami za použití eluce s konvexním gradientem koncentrace NaCl, po níž se provede katexová chromatografie na agarose se substituovanými karboxymethylovými iontovými skupinami za použití eluce s lineárním gradientem koncentrace NaCl s následnou gelovou filtrací na polymerisovaném dextransu o velikosti částic 10 až 40 μm s frakcionačním rozmezím 4 000 až 150 000 daltonů, po níž se provede lyofilisace.

Konec dokumentu
