



ÚRAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

203207
(11) (B1)

(22) Prihlásené 26 01 78
(21) (PV 521-78)

(40) Zverejnené 29 02 80

(45) Vydané 15 09 83

(51) Int. Cl.³
C 12 N 5/00

(75)

Autor vynálezu

VEBER PAVEL RNDr. CSc., BALUCH JOZEF RNDr.,
HÁNA LADISLAV ing. CSc. a LEŠKO JÁN ing. CSc., BRATISLAVA

(54) **Prípravky pre uvoľňovanie buniek z tkanív alebo z povrchu
kultivačných nádob vo forme prášku granulátu alebo výliskov
a spôsob ich výroby**

1

Vynález sa týka spôsobu výroby prípravkov pre uvoľňovanie buniek z tkanív alebo z povrchu kultivačných nádob vo forme prášku, granulátu alebo výliskov (najčastejšie tabliet alebo briekiet), pripravovaných z práškovaných homogenizovaných alebo granulovaných zmesí proteolytických enzýmov, chelátotvorných látok a pomocných látok pozostávajúcich predovšetkým z anorganických solí.

Pre prípravu bunkových suspenzií zo živočíšnych tkanív sa používajú rôzne proteolytické enzýmy, ako napr. trypsín, pankreatín, pronáza, elastáza, chymotrypsín a iné. Obdobne uvoľňovanie buniek z povrchu kultivačných nádob sa vykonáva uvedenými enzýmami. Okrem roztokov vyššie spomenutých enzýmov sa používajú pre uvoľňovanie tkanív a uvoľňovanie buniek z kultivačných nádob roztoky chelátotvorných látok ako napríklad kyselina etyléndiamínotetraoctová, kyselina citrónová a iné. Enzýmy alebo chelátotvorné látky sa zvyčajne rozpúšťajú v izotonickom roztoku chloridu sodného, ktorý sa vhodne pufruje na určité pH, kde je maximálna účinnosť enzýmu. Doposiaľ sa tieto prípravky vyrábajú pre použitie pri kultivácii buniek a tkanív in vitro vo forme sterilných roztokov alebo lyofilizátov k priamemu použitiu (katalog firmy Difco, USA r.

2

1976, Gibco, USA r. 1976, Flow, Anglia r. 1977).

Vo vodných roztokoch je trypsín, ako aj iné proteolytické enzýmy nestabilný a podlieha proteolytickému autorozkladu. V priebehu skladovania sa enzymatická aktivita znižuje a výrobky sa stávajú neštandardnými. Pri skladovaní 0,25% roztoku trypsínu v pufrovanom fyziologickom roztoku pri pH, pri +4 °C je trypsín použiteľný maximálne 2–3 týždne a pri skladovaní pri –20 °C je trypsín stabilný 6 mesiacov (Von A. Mayr, P. A. Bachmann, B. Bibrack, G. Wittmann: Virologische arbeitsmethoden. VEB Gustav Fischer, Verlag Jena 1974).

Vynález odstraňuje nevýhody tým, že na zvýšenie stability prípravkov pre uvoľňovanie buniek z tkanív a povrchov kultivačných nádob sa enzýmy, chelátotvorné látky a pomocné látky pozostávajúce predovšetkým z anorganických solí homogenizujú, upravujú do formy granulátu alebo sa formujú na vhodných lisovacích strojoch (za podmienok uvedených nižšie) do formy výliskov, guľovitých, válcovitých, šošovkovitých, alebo iného vhodného tvaru.

Podstatou vynálezu sú teda prípravky pre uvoľňovanie buniek z tkanív alebo povrchu kultivačných nádob vo forme prášku, granulátu alebo vo forme výliskov najmä tab-

liet a brikiat, ktoré obsahujú 1—40 % hmotných % proteolytických enzýmov najmä trypsínu, chymotrypsínu, pankreatínu, pronázy, elastázy, kolagenázy a iné alebo chelátotvorné látky najmä dvojsodné soli kyseliny etyléndiamínotetraoctové jednotlivo, alebo v zmesiach. Ďalej prípravky obsahujú 60—99 hmotných % pomocných látok ako sú:

chlorid sodný,
chlorid draselný,
glukóza,
kyslý fosforečnan sodný,
kyslý fosforečnan draselný,
stredný fosforečnan sodný,
stredný fosforečnan draselný,
kyslý uhličitan sodný,
tris-hydroxymethylaminomethan,
chlorid vápenatý,
chlorid horečnatý,
polyethylénglykol,
polyvinylpyrolidón,
methylcelulóza,
fenolová červeň,
N-2-hydroxyethylpiperazín-N'-2-etan-sulfonová kyselina,
N-tris-hydroxymethylmethylglycin,
2-(N-morfolino)-etan sulfónová kyselina,
piperazín-N,N'-bis(2-ethan-sulfonová kyselina),
N,N-bis-1(2-hydroxyethyl)glycin,
N-{tris-(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethan sulfonová kyselina,
2-bis-(hydroxyethyl)-imino-2-hydroxymethyl-1-3-propándiol,
hydroxyethyl piperazín-N'-3-propán sulfonová kyselina a ďalšie.

Enzýmy, chelátotvorné látky a pomocné látky pozostávajúce predvážne z anorganických solí sa homogenizujú s výhodou vo fluidizačnom zariadení alebo v planetárnej miešačke. Do fluidnej vrstvy zloženej z pomocných látok sa pridáva vodný alebo alkoholový roztok jednej alebo viacerých pomocných látok a celkový obsah enzýmov chelátotvornej látky alebo ich zmes. Zmes sa suší plynom s výhodou vzduchom do 100 °C alebo sa najprv granuluje a potom suší. V ďalšom prípade sa pomocné látky zmiešajú v planetárnej miešačke a zvlhčia sa roztokom etanolu, propanolu, acetónu alebo ich zmesou, v ktorej sú rozpustené látky upravujúce onkotický tlak najmä polyethylénglykol, polyvinylpyrolidón ako aj látky indikujúce pH ako je fenolová červeň. Zvlhčená zmes sa suší plynom s výhodou vzduchom do 100 °C. Po vysušení sa ku granulátu pridá enzým, či chelátotvorná látka alebo ich zmes a po homogenizácii sa granulát lisuje na výlisky s výhodou na tablety alebo briky pri tlaku od 40 do 200 MPa.

Práškovany výsledný homogenizát alebo granulát, či tablety sa rozvážia alebo rozplnia do vhodných flaštičiek, sterilizujú sa gama žiarením o dávke 2,5 Mrad. Práškovany homogenizát alebo granulát, či tablety pripravkov pre uvoľňovanie buniek je možno

taktiež po rozpustení v danom objeme redestilovanej vody sterilizovať filtráciou cez filter Milipor.

Účelom vynálezu je príprava kvalitných suchých pripravkov pre uvoľňovanie buniek z tkanív a kultivačných nádob vo forme výlisikov (tablet, brikiat alebo výlisikov iného vhodného tvaru), alebo homogenizovaných práškov a granulátov, ktoré majú oproti doposiaľ užívaných spôsobom prípravy (prípravky tekuté, lyofilizované) výhody v dokonalejšej homogenizácii zložiek, dlhodobejšej stability, dobrej rozpustnosti, v pevnom štandardnom tvare a váhe v prípade výlisikov a zjednodušenej manipulácii pri príprave a doprave. Získané prípravky si uchovávajú všetky vlastnosti pre uvoľňovanie buniek zo živočíšnych tkanív alebo povrchov kultivačných nádob.

Výhodou úpravy výrobkov je štandardnosť pri používaní, ktorá vyplýva zo zvýšenej stability suchých enzymatických pripravkov vo forme homogenizovaných práškov, granulátov alebo výlisikov (tablet, brikiat). Tablety je možno vhodne váhovo upraviť tak, aby ich bolo možné rozpušťať v definovanom objeme vody. Ekonomickou výhodou pripravkov pre uvoľňovanie buniek z tkanív alebo kultivačných nádob vo forme granulátu alebo tablet je dlhodobá skladovateľnosť a zmenšenie nárokov na chladiaci priestor, ako aj zníženie nákladov na prepravu a obalové materiály.

Možnosť výroby veľkých šarží výrobkov pripravovaných navrhovaným spôsobom umožňuje zlepšiť štandardnosť enzymatických pripravkov. Formovanie suchých výlisikov pre tkanivové kultúry je možné prevádzať buď na bežných tabletovačkách (briketovačkách) excentrických alebo rotačných, či iného druhu, za normálnych atmosférických podmienok pri vhodnom lisovacom tlaku, alebo opatrených špeciálnym povlakom (razidiel) teflón, silikón alebo z inej vhodnej hmoty) po úprave vlhkosti východzej suroviny a pri relatívnej vlhkosti vzduchu prostredia 10—50 %, podľa druhu lisovanej zmesi pripravkov pre uvoľňovanie buniek z tkanív alebo kultivačných nádob.

Príklad 1

Vo fluidnom zariadení sa zmieša 400 g chloridu sodného p. a., 10 g chloridu draselného p. a., 144,5 g stredného fosforečnanu sodného p. a. a 5 g chloridu horečnatého s 6 H₂O p. a. Do fluidnej vrstvy sa postupne nastrekuje roztok o zložení trypsín 12,5 g, chymotrypsín 12,5 g, kyslý fosforečnan draselný p. a., 10 g, 8 g polyethylénglykol m. v. 6000 v 50 ml redestilovanej vody. Vzniknutý granulát sa suší pri teplote do 100 °C. Vysušený granulát je možné rozplniť po 0,6 g do flaštičiek a ožiari sa gama lúčmi celkovou dávkou 2,5 Mrad. Po ožiarení sa sterilný granulát rozpustí v 50 ml sterilnej redestilovanej vody a použije sa na uvoľnenie buniek z

kultivačných nádob, alebo z vysušeného granulátu je možné lisovať tablety o váhe 0,6 g pri tlaku 98 MPa. Tablety je možné sterilizovať gama žiarením o celkovej dávke 2,5 Mrad. Jedna sterilná tableta o váhe 0,6 g sa pred použitím rozpustí v 50 ml sterilnej redestilovanej vody.

Príklad 2

Vo fluidnom zariadení sa zmieša 340 g chloridu sodného p. a., 20 g chloridu draselného p. a., 54,75 g glukózy, 110 g kyslého uhličitanu sodného p. a. a prevlhčí sa roztokom o zložení: 40 g 96% etanolu, 0,25 g fenolovej červene a 10 g polycetylenglykolu o m. v. 6000. Vzniknutý granulát sa suší pri teplote do 150 °C. Suchý granulát sa zmieša s 12,5 g trypsínu a 12,5 g chymotrypsínu o veľkosti častíc 0,125 mm. Z vysušenej zmesi sa lisujú tablety o váhe 0,56 g pri tlaku 40 MPa. Tablety sa sterilizujú gama žiarením celkovou dávkou 2,5 Mrad. Jedna sterilná tableta sa pred použitím rozpustí v 50 ml sterilnej redestilovanej vody.

Príklad 3

V planetárnej miešačke sa zmieša 125 g tris-hydroxymethylaminomethanu HCl, s 25 gramy tris-hydroxymethylaminomethanom a 377,5 g chloridu sodného p. a. a prevlhčí sa zmesou o zložení 50 g 96% etanolu, 0,25 g fenolovej červene a 7,25 g polyvinylpyrrolidónu. Vzniknutý granulát sa suší pri teplote do 130 °C. Po vysušení sa ku granulátu pridá 12,5 g trypsínu o veľkosti častíc 0,100 mm. Po homogenizácii sa lisujú tablety o váhe 0,55 g a priemere 12 mm pri tlaku 60 MPa. Jedna tableta sa pred použitím rozpustí v 50 ml redestilovanej vody a roztok sa pred použitím sterilizuje ultrafiltráciou cez

filter Milipor 0,22 μ m. Pochopiteľne je možné použiť na sterilizáciu aj gama žiarenie ako v predchádzajúcom príklade.

Príklad 4

Vo fluidnom zariadení sa zmieša 400 g chloridu sodného p. a., 10 g chloridu draselného p. a., 144,5 g stredného fosforečnanu sodného s 12 H₂O p. a. a 5 g chloridu horečnatého s 6 H₂O p. a. V 50 ml redestilovanej vody sa rozpustí 12,5 g trypsínu pre tkáňové kultúry, 10 g kyslého fosforečnanu draselného p. a. a 8 g polyethylenglykolu o m. v. 6000. Roztok sa zfiltruje cez sklenený slinutý filter S 3. Potom sa postupne tento roztok nasťrekuje do fluidnej vrstvy. Vzniknutý granulát sa suší do 100 °C. Vysušený granulát sa lisuje na brikety o váhe 2,4 g pri tlaku 200 MPa. Tablety sa ožiaria gama lúčmi o celkovej dávke 2,5 Mrad. Jedna sterilná tableta sa pred použitím rozpustí v 200 ml sterilnej redestilovanej vody.

Príklad 5

Vo fluidnom zariadení sa zmieša 340 g chloridu sodného p. a., 20 g chloridu draselného p. a., 54,75 g glukózy, 100 g kyslého uhličitanu sodného p. a. a 10,0 g dvojsodnej soli kyseliny etyléndiamínótetraoctovej p. a. a prevlhčí sa roztokom o zložení 0,25 g fenolová červeň, 10 g kyslého uhličitanu sodného v 30 ml redestilovanej vody. Vzniknutý granulát sa suší pri teplote do 130 °C. Vysušený granulát sa premieša s 10 g trypsínu a 10 g chymotrypsínu o veľkosti častíc 0,125 mm. Suchá práškovaná homogenizovaná zmes sa rozplní po 0,56 g do flaštičiek a sterilizuje sa celkovou dávkou gama žiarenia 2,5 Mrad.

PREDMET VYNÁLEZU

1. Prípravky pre uvoľňovanie buniek z tkanív alebo povrchu kultivačných nádob vo forme prášku, granulátu alebo vo forme výliskov najmä tabliet a brikiet vyznačujúci sa tým, že obsahujú 1 až 40 hmotných % proteolytických enzýmov najmä trypsínu, chymotrypsínu, pankreatínu, pronázy, elastázy, kolagenázy alebo chelátotvornej látky najmä dvojsodnej soli kyseliny etyléndiamínótetraoctovej jednotlivo alebo v zmesiach a 60 až 99 hmotných % pomocných látok, ktoré pozostávajú z látok upravujúcich iontovú silu na izotonický roztok najmä chlorid sodný, chlorid draselný, glukóza v množstve 0,5 až 99 hmotných % a z pufrujúcich látok najmä kyslý fosforečnan sodný, stredný fosforečnan sodný, kyslý fosforečnan draselný, stredný fosforečnan draselný, kyslý uhličitan sodný,

tris-hydroxymethyl-aminomethan . HCl, tris-hydroxymethylaminomethan, N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-etán-sulfonová kyselina, N-tris-hydroxymethylglycin, 2-(N-morfolino)ethan sulfonová kyselina, piperazin-N-N'-(bis)-2-etán sulfonová kyselina, N,N'-bis-1-(2-hydroxyethyl) glycin, N-tris(hydroxymethyl) methyl 2-aminomethan sulfonová kyselina, 2-bis-(hydroxyethyl)-imino-2-hydroxymethyl-1,3-propándiol, hydroxyethyl piperazin-N'-3-propán sulfonová kyselina v množstve 1 až 99,5 hmotných percent.

2. Prípravky podľa bodu 1 vo forme prášku granulátu alebo vo forme výliskov, vyznačujúce sa tým, že obsahujú ako pomocné látky navyše látky, upravujúce onkotický tlak najmä polyethylenglykol, polyvinylpy-

rolidon, methylcelulózu, hydroxyethylcelulózu a iné rozpustné deriváty celulózy vo vode v množstve od 0,01 do 2 hmotných percent.

3. Prípravky podľa bodu 1 a 2 vo forme prášku, granulátu alebo vo forme výliskov, vyznačujúce sa tým, že obsahujú ako pomocné látky navyše látky indikujúce pH najmä fenolovú červeň v množstve od 0,02 do 0,1 hmotných percent.

4. Prípravky podľa bodu 1 až 3 vo forme prášku, granulátu alebo vo forme výliskov, vyznačujúce sa tým, že obsahujú ako pomocné látky navyše látky aktivujúce enzymatickú aktivitu proteolytických enzýmov najmä chlorid vápenatý, chlorid horečnatý od 1 do 5 hmotných percent.

5. Spôsob prípravy prípravkov pre uvoľňovanie buniek z tkanív alebo povrchu kultivačných nádob podľa bodu 1 až 4 vyznačujúci sa tým, že 60 až 99 hmotných percent pomocných látok, vzťahnutých na hmotnosť výsledného produktu, sa homogenizuje s výhodou vo fluidnom zariadení do homogenizátu a s výhodou do fluidnej vrstvy sa pridáva vodný alebo alkoholový roztok obsahujúci aspoň jednu pomocnú látku ako aj látku indikujúcu pH a 1 až 40 hmotných percent proteolytických enzýmov alebo chelátotvornej látky, vzťahnuté na hmotnosť výsledného produktu, o pH 3 až 6, pričom sa získaná zmes suší plynom, s výhodou vzduchom, o teplote do 100 °C, najprv sa granuluje a potom suší.

6. Spôsob prípravy prípravkov pre uvoľňovanie buniek z tkanív alebo z povrchu kultivačných nádob podľa bodu 1 až 4 vyznačujúci sa tým, že 60 až 99 hmotných percent pomocných látok sa homogenizuje, granuluje a suší a potom sa k suchému granulátu pridá 1 až 40 hmotných percent, vzťahnutých na hmotnosť výsledného produktu, proteolytických enzýmov a alebo chelátotvorných látok alebo ich zmesi.

7. Spôsob prípravy prípravkov pre uvoľňovanie buniek z tkanív alebo povrchu kultivačných nádob podľa bodu 1 až 4 vyznačujúci sa tým, že sa homogenizuje 1 až 40 hmotných percent proteolytických enzýmov alebo chelátotvorných látok a 60 až 99 hmotných percent pomocných látok, vzniknutá zmes sa zvlhčí s výhodou acetónom, etanolom, izopropanolom, vodou alebo ich zmesou a následne sa granuluje a suší plynom s výhodou vzduchom pri teplote do 100 °C.

8. Spôsob prípravy prípravkov podľa bodu 5 až 7 vyznačujúci sa tým, že sa práškovaný produkt alebo granulát lisuje na výlisky s výhodou na tablety alebo brikety pri tlaku od 40 MPa do 200 MPa.

9. Spôsob prípravy prípravkov podľa bodu 5 až 8 vyznačujúci sa tým, že sa práškovaný produkt, granulát alebo výlisky sterilizujú gama žiarením s výhodou celkovou dávkou 2,5 Mrad.