



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

226097

(11)

(B1)

(61)

(23) Výstavní priorita

(22) Přihlášeno 04 05 82

(21) PV 3189-82

(40) Zveřejněno 29 07 83

(45) Vydáno 01 06 86

(51) Int. Cl.³
C 12 N 5/00

(75)

Autor vynálezu

MICHL JIŘÍ RNDr. CSc., PRAHA,
NOVOTNÝ JOSEF, KOSTELEČ NAD ČERNÝMI LESY

(54) Živné prostředí pro buněčné a tkáňové kultury obsahující růstové proteiny krevního séra

Vynález se týká živného prostředí pro buněčné a tkáňové kultury obsahujícího růstové proteiny krevního séra.

Součástí většiny živných prostředí pro živočišné buněčné a tkáňové kultury je krevní sérum. Bezserová prostředí lze zatím užívat jen omezeně pro pěstování stabilních linií; složky těchto prostředí, např. fibronectin, transferin a epidermální růstový faktor jsou zároveň velmi drahé. Sérum obsahuje ovšem řadu složek, zejména ze skupiny lipoproteinů, které inhibují růst buněk nebo buňky morfologicky či fyziologicky poškozuji. Většinou lze užít k pěstování fyziologicky nepoškozených buněk mimo organismus pouze živné prostředí s fetálním sérem, které obsahuje jen stopy inhibujících komponent. Celosvětově i u nás je ale nedostupnějšího z fetálních sér – telecího séra plodu – chronický nedostatek i přes to, že je velmi drahé.

Růstové proteiny telecího séra se podobají obsahem vysokomolekulárních růstových faktorů fetálnímu séru; předpokladem ovšem je, aby bylo při jejich výrobě užito jako výchozí suroviny sérum sajících telat ve stáří do 6 týdnů, které má minimální obsah inhibujících složek. Dnes taková zvířata nejsou a nebudou k dispozici. Sérum starších zvířat obsahuje již značná množství inhibitorů, které dosud používanou technologií odstranit nelze. Kolísání obsahu a kvality inhibitorů v séru

užívaném k přípravě růstových proteinů se pak projevuje získáváním nestandardního produktu, který nemůže být často ani komerčně distribuován. Živné prostředí, které je z růstových proteinů vyráběno a komerčně distribuováno, obsahuje zároveň hydrolyzáty mléčného albuminu, který je mimořádně nestandardní složkou, protože každá šarže má jiné složení.

Podstata živného prostředí pro buněčné a tkáňové kultury s růstovými proteiny krevního séra spočívá v tom, že obsahuje pouze ty vysokomolekulární složky, které jsou nezbytnými růstovými faktory buněk a tkání pěstovaných mimo organismus. Jde tedy o živné prostředí pro buněčné a tkáňové kultury obsahující růstové proteiny krevního séra a ostatní běžné nízkomolekulární složky chemicky definovaného živného prostředí, vyznačující se tím, že obsahuje 0,4 až 10,0 hmot. % sérových proteinů zbavených lipoproteinů a pozůstávajících z 38,0 až 52,0 hmot. % albuminu, 12,0 až 22,0 hmot. % alfa globulinů, 11,0 až 23,0 hmot. % beta globulinů a 15,0 až 25,0 hmot. % gama globulinů. Nově vypracovaný technologický předpis přípravy růstových proteinů totiž zaručuje přípravu produktu, z něhož jsou odstraněny všechny vysokomolekulární komponenty séra inhibující růst buněk a tkání. Metoda je tak účinná, že umožňuje využití nejen telecího, ale i hovězího

séra. V tom spočívají hlavní výhody přípravy růstových proteinů krevního séra podle tohoto vynálezu: a) telecího séra je nedostatek, i když jde o séra zvířat poměrně starých a dočasných; hovězího séra bude dostatek; b) kvantitativní výtěžek produktu je v průměru asi o 1/4 vyšší při užití hovězího séra ve srovnání se sérem telecím, což se nutně musí projevit ve snížení výrobních nákladů nového výrobku; c) růstové proteiny hovězího séra není nutné kombinovat s hydrolyzátem mléčného albuminu, jsou stejně účinné i v plně definovaném mediu, jako je např. minimální esenciální medium Eagle (MEM).

Příklad provedení (jako příklad uvedeno sérum hovězí):

Krev ze zdravých zvířat, ne starších 2 roky, se odebere pokud možno asepticky a uchovává se v chladnici až do přípravy séra. Sérum se oddělí v průtokové odstředivce a na 10 000 ml séra se přidá 3 000 g síranu amonného p. a. Po rozpuštění síranu amonného se směs nechá 20 hod. stát v chladnici. Vzniklá sraženina se oddělí filtrací přes promyté, dvojité, papírové filtry; filtruje se v chladnici. Sraženina se dialysuje nejprve proti proudící vodovodní vodě, později proti demineralizované vodě při 4 °C. Po dialyse musí být v roztoku proteinů zkouška na obsah síranů negativní při zkoušení chloridem barnatým. Roztok vychlazený na 4 °C se centrifuguje při 2 000 ot./min. 90 minut. Výsledný čirý roztok je součástí A produktu. Sediment se vyhazuje. Roztok zbývající po původní filtraci přes papírové filtry se sráží síranem amonným dále (na 10 000 ml 3 000 g), nechá se stát v chladnici 20 hod. a filtruje se již uvedeným způsobem. Sraženina se dialysuje stejně jako část A produktu, zkouší se na síranové ionty a je-li zkouška negativní a roztok zcela čirý, získává se část B produktu. Obě části se smíchají a výsledný roztok se lyofilisuje. Tím se získá produkt, který neztrácí biologickou aktivitu nejméně 2 roky při skladování při 4 °C. Používá se v koncentraci 0,4–10,0 % (hmotnost na objem) ve vhodném chemicky definovaném živném prostředí, obsahujícím pouze nízkomolekulární složky a voleném podle typu pěstovaných buněk či tkání. Výhodné je také použití vysokokapacitního ústrojného roztoku, např. N-2-hydroxyetyl-piperazin-N'-2-etansulfonát sodný (HEPES-Na) jako součásti média, neboť je tím zajištěno dlouhodobé udržování optimální a konstantní hodnoty pH živného roztoku. Základní médium s širokým rozsahem použití je založeno na definovaném roztoku MEM doplněném růstovými proteiny krevního séra a HEPESem, jak je uvedeno v následujících příkladech:

Příklad složení média 1. Užívá se pro heteroploidní linie a pro čerstvě explantované dělivé buňky.

Ingredience	mg
Růstové proteiny krevního séra	4 000,00
HEPES-Na	5 200,00

1-arginin. HCl	126,98
1-cystin	24,00
1-glutamin	292,00
1-histidin. HCl. aq.	41,98
1-isoleucin	52,00
1-leucin	52,00
1-lysin. HCl	72,48
1-metionin	15,00
1-fenylalanin	32,00
1-threonin	48,00
1-tryptofan	10,00
1-tyrosin	36,00
1-valin	46,00
cholinchlorid destilovaná + demineralizovaná voda do	1 000,0 ml
Kys. listová	1,00
i-inositol	2,00
nikotinamid	1,00
Ca-pantothenát	1,00
pyridoxal. HCl	1,00
riboflavin	1,00
thiamin. HCl	1,00
chlorid sodný	8 000,00
chlorid draselný	400,00
chlorid vápenatý	140,00
síran hořečnatý	98,00
fosforečnan sodný sek.	48,00
fosforečnan draselný prim.	60,00
glukosa	1 000,00
kyselý uhličitán sodný	750,00
fenolová červeň	10,00

Příklad složení média 2. Pro čerstvě explantované diferencované buňky, náročné lidské diploidní linie, např. RS4, pro buňky lidských plodových vod a pro další buňky náročné na výživu je nutné zvýšit koncentraci růstových proteinů krevního séra na 10 000,0 mg na 1 litr a ve vyjimečných případech až na 100,0 g na 1 litr. Médium je nutné současně doplnit o následující ingredience:

	mg
1-serin	10,50
1-prolin	11,30
1-asparagin	66,00
beta-alanin	8,90
kys. glukuronová	10,00
uridin	5,00
thymidin	2,50
Na-pyruvát	55,00
biotin	1,00
adeninsulfát	10,00
kys. p-aminobenzoová	1,00
taurin	1,00
cholinchlorid	9,00
beta-glycerofosfát	1,00
0-fosfoetanolamin	2,00
alfa-tokoferolfosfát-Na ₂	1,00

Vhodnost uvedeného živného prostředí byla ověřována na 5 nezávislých pracovištích za použití těchto typů kultur: a) stabilní buněčné linie: HeLa, BHK, MDA, neuroblastom Cl300; b) lidské diploidní linie: LEP 19 a RS4; c) čerstvě explantova-

né buňky: kuřecí fibroblasty, chondroblasty, gliové buňky, neurony, buňky lidských plodových vod a buňky opičích ledvin. Pro každou z uvedených skupin je dále zaznamenán příklad kvantitativního vyhodnocení růstu buněk v médiu s růstovými proteiny a v médiu se sérem:

Hodnocení růstu lidských heteroploidních buněk HeLa (a)

Počet buněk v kultuře po 7 dnech růstu

	médium s růstovými proteiny	médium s 10 % telecího séra
1. pasáž	$4,1 \times 10^7$	$4,5 \times 10^7$
2. pasáž	$4,2 \times 10^7$	$4,3 \times 10^7$
3. pasáž	$4,4 \times 10^7$	$4,6 \times 10^7$

Hodnocení růstu lidských diploidních buněk (b)

Počet buněk v kultuře po 7 dnech růstu

	médium s růstovými proteiny	médium s 10 % fetálního telecího séra
--	-----------------------------------	---

1. pasáž	$1,7 \times 10^7$	$1,9 \times 10^7$
2. pasáž	$1,9 \times 10^7$	$1,9 \times 10^7$
3. pasáž	$1,8 \times 10^7$	$1,8 \times 10^7$

Hodnocení růstu čerstvě explantovaných kuřecích fibroblastů (c)

Počet buněk v kultuře po 7 dnech růstu

	médium s růstovými proteiny	médium s 10 % telecího séra
1. pasáž	$2,6 \times 10^7$	$2,3 \times 10^7$
2. pasáž	$1,6 \times 10^7$	$1,5 \times 10^7$

Jak vyplývá z uvedených příkladů, jsou výsledky kultivace buněk v živném prostředí s růstovými proteiny krevního séra vyrobeném podle tohoto vynálezu prakticky shodné s výsledky kultivace buněk nejen v prostředí s telecím sérem, ale i s fetálním telecím sérem u náročnějších buněčných typů. Výrobní náklady prostředí s růstovými proteiny jsou však podstatně nižší než výrobní náklady živného prostředí s fetálním sérem. Zároveň lze růstové proteiny vyrobit v dlouhodobě skladovatelné formě a prakticky neomezeném množství.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Živné prostředí pro buněčné a tkáňové kultury, obsahující růstové proteiny krevního séra a ostatní běžné nízkomolekulární složky chemicky definovaného živného prostředí, vyznačující se tím, že obsahuje 0,4 až 10,0 hmot. % sérových proteinů

zbavených lipoproteinů, pozůstávajících z 38,0 až 52,0 hmot. % albuminu, 12,0 až 22,0 hmot. % alfa globulinů, 11,0 až 23,0 hmot. % beta globulinů a 15,0 až 25,0 hmot. % gamma globulinů.