



FEDERÁLNÍ ÚŘAD  
PRO VYNÁLEZY

# POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

264 100

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.<sup>4</sup>

C 07 K 15/06,  
C 07 K 1/14

(21) PV 1616-88.I  
(22) Přihlášeno 11 03 88

(40) Zveřejněno 16 09 88  
(45) Vydáno 15 01 90

(75)  
Autor vynálezu

PROCHÁZKA VLADIMÍR RNDr. CSc., VÁCHA PŘEMYSL ing. CSc.,  
SCHWARZ VLADIMÍR RNDr. CSc., JENLIČKA STANISLAV,  
TROFIMOVA LUDMILA RNDr., HÝLOVÁ JARMILA, PRAHA,  
RAHN JAN RNDr. PhDr., DLOUHÁ JIŘINA, ÚSTÍ NAD LABEM,  
BÁRTL VÁCLAV ing. CSc., BUCHVALDEK TOMÁŠ ing.,  
DURDIL PETR ing. CSc., PRAHA

Způsob výroby imunomodulačních peptidů thymosinu frakce 5

(54)

(57) Řešení se týká výroby imunomodulačních peptidů thymosinu frakce 5 zjednodušeným postupem, který spočívá v tom, že se extrakt z telecích brzlíků po tepelné denaturaci balastních bílkovin a jejich současném odstranění s brzlíkovou tkání delipiduje extrakcí do octanu ethylnatého nebo nižšího alkanolu. Z vyčištěné vodné fáze se vysolí balastní bílkoviny spolu se zbytky rozpouštědla a oddělí se jako vrchní kapalná fáze. Balast vysošením se získá surový thymosin, který se čistí ultrafiltrací a z ultrafiltrátu se po zahuštění a okyselení opětovně vysráží částečně odsolený thymosin frakce 5. Ten se převede promytím acetonem na stabilizovaný suchý meziprodukt, zpracovatelný dále podle potřeby po odsolení gelovou filtrací, chromatografií na měnící kationtů a lyofilizací na finální produkt. Peptidy thymosinu frakce 5 se používají k léčbě poruch imunitního systému.

Vynález se týká způsobu výroby imunomodulačních peptidů thymosinu frakce 5 z telecích brzlíků.

Thymosin frakce 5 je komplex peptidických hormonů, vylučovaných brzlíkem ( thymem ), které umožňují dozrávání a diferenciaci T lymfocytů v imunokompetentní buňky a podílejí se na správné funkci imunitního systému.

Z celé řady imunomodulačních peptidů brzlíku je thymosin frakce 5 v současné době nejlépe prostudován a ve světě též klinicky používán. Je připravován extrakcí zmražených telecích brzlíků a jeho složení je dáno jednak způsobem extrakce, jednak následnými izolačními a čistícími stupni.

Původní způsob přípravy ( A.L. Goldstein se sp., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 1800, 1972 ) byl dále zpracován ( J.A. Hooper se sp., Ann. N.Y. Acad. Sci. 249, 125, 1975 ). Podle tohoto postupu se homogenizát telecího brzlíku ve 3 dílech 0,15 M roztoku chloridu sodného odstředí, supernatant se zahřeje na teplotu 80 °C po dobu 15 minut a sražený denaturát balastních bílkovin se odfiltruje. Filtrát se sráží vkapáním do čtyřnásobného objemu acetonu zchlazeného na teplotu -10 °C, odfiltrovaná sraženina promytá acetonem se vysuší na prášek a tento se rozpustí v 10 dílech 0,1 M fosfátového pufru o hodnotě pH 7,0. Nerozpuštěný zbytek se odstředí a ze supernatantu se nejprve vysolí další balastní bílkoviny síranem amonným přidáním do dosažení 25 % nasycení. Po odstředění vysolených bílkovin se upraví pH supernatantu na hodnotu 4,0 a surový thymosin se vysolí dalším přídavkem síranu amonného do dosažení 50 % nasycení. Odstředěný sediment aktivních peptidů se rozpustí v 0,01 M tris(hydroxymethyl)-aminomethanovém pufru ( dále TRIS-pufu ) při hodnotě pH 8,0 na koncentraci 10 mg peptidu / ml

a po vyčeření se roztok ultrafiltruje přes membránu s vylučovacím limitem 10.000. Ultrafiltrát obsahující thymosiny frakce 5 se odsolí na dextranovém gelu a požadovaná frakce, eluovaná v oblasti  $V_0$ , se lyofilizuje. Ve snaze převést izolaci thymosinu frakce 5 do výrobního měřítka byl popsán postup dále modifikován. Podle patentového spisu USA č. 4128637 se bílkoviny v extraktu denaturují vháněním páry, další patentový spis USA č. 4082737 popisuje odstranění endotoxinů a pyrogenů ultrafiltrací.

Dosud popsané postupy mají dvě společné nevýhody. Z koloidního brzlíkového homogenizátu je nutno oddělovat extrakt odstředěním při vysokých hodnotách tíhového zrychlení, dále postupy vyžadují značné objemy zchlazeného acetonu pro srážení a delipidaci surového thymosinu. Tyto technologické operace velmi zneškodňují průmyslové využití postupů. Uvedené nevýhody jsou odstraněny postupem uvedeným v čs. AO č. 250631, podle něžž se zbytky brzlíkové tkáně a balastní bílkoviny odstraní současně filtrací za horka po zahřátí homogenizátu, ze zchlazeného filtrátu se oddělí vrstva lipidů a z roztoku se vysolí síranem amonným přímo peptidy thymosinu. Dále se odstraní neúčinný polypeptid  $\beta_1$  o hodnotě isoelektrického bodu pI 6,7 chromatografií na sloupci slabě kyselého měniče kationtů v těkavém pufru o hodnotě pH 5,0 až 7,0. Přesto však současný postup přináší ještě obtíže, jako zákaly roztoků po oddělení lipidů, poměrně vysokou spotřebu síranu amonného, nutnost dvojího odstředění při vysolování a obtížné skladování meziproductů v případě přerušení výroby.

Uvedené nevýhody odstraňuje způsob výroby imunomodulačních peptidů thymosinu frakce 5, získané z homogenizátu telecích brzlíků po tepelné denaturaci, podle výsledku, jehož podstatou spočívá v tom, že se z teplého filtrátu vyextrahují lipidy octanem ethylnatým nebo alkanolem o počtu uhlíkových atomů 3 až 5. Po ochlazení se v oddělené vodné fázi vysolí síranem amonným balastní bílkoviny a organické rozpouštědlo, které jsou v horní fázi. Čirá spodní fáze se následně vysolí opět síranem amonným a získaný surový thymosin se oddělí a ultra-

filtruje. Zahuštěním a okyselením ultrafiltrátu na hodnotu pH 3,8 až 4,2 se zpět vysolí předčištěný částečně odsolený thymosin, který se převede acetonem na stabilní práškový meziproduct. Ten se gelovou filtrací a chromatografií na měničích kationtů zpracuje přímo na konečný komplex imunomodulačních peptidů thymosinu frakce 5. Způsob podle vynálezu se výhodně provádí tak, že se lipidy vyextrahují 2-propanolem nebo 1-butanolem a okyselení ultrafiltrátu se provede kyselinou octovou na hodnotu pH 4,0. Autory vynálezu bylo takto zjištěno, že je možno při využívání a zachování podstaty čs. A0 č. 250631 zjednodušit a zvýhodnit výrobu thymosinu frakce 5, jak vystihuje Schema I.

Způsob podle vynálezu se provádí tak, že se zhomogenizovaná gelovitá suspenze brzlíkové tkáně v 0,15 M roztoku chloridu sodného zahřeje na teplotu 80 °C, denaturát balastních bílkovin spolu se sraženou brzlíkovou drtí se za horka odfiltruje a k extraktu se ještě při teplotě kolem 50 °C přidá za míchání octan ethylnatý nebo nižší alkanol, s výhodou 2-propanol nebo 1-butanol. Po zchladnutí se oddělí odtučněná vodná fáze, ze které se vysolí další balastní bílkoviny a rozpouštěné organické rozpouštědlo přidavkem síranu amonného do 25 % nasycení roztoku. Vytvoří se vrchní kapalná fáze, obsahující též sraženinu bílkovin s částí nežádoucích peptidů a zbytky lipidů. Spodní čirá fáze obsahující thymosin se dá velmi snadno oddělit na rozdíl od dosavadního postupu, kdy bylo nutno vysolené balasty odstředit na průtokovém separátoru. Z vodné dokonale delipidované fáze se dále vysolí surový thymosin při hodnotě pH 4,0 přidavkem síranu amonného do dosažení 40 až 45 % nasycení roztoku. Sraženina tentokrát sedimentuje a oddělí se odstředěním na průtokovém separátoru. Surový thymosin se po rozpouštění v pufru o hodnotě pH 8,0 zbaví vysokomolekulárních příměsí ultrafiltrací přes membránu s vylučovacím limitem 10.000 a ultrafiltrát, obsahující ještě značné množství soli, se s výhodou přečistí a zároveň převede na stabilní meziproduct tak, že se zahuští a okyselí na hodnotu pH 4,0. Tím se opětovně vysolí thymosin, který lze snadno odfiltrovat a promýt zchlazeným acetonem. Promytí má další čistící účinek,

neboť do acetonu přejdou barevné příměsi. Získaný práškovitý meziprodukt obsahuje asi 4x méně soli než odstředěná sraženina. Po odsolení gelovou filtrací se efluent z kolony molekulového síta zbaví neúčinného polypeptidu  $\beta_1$  podle postupu uvedeného v čs. AO č. 250631 průtokem přes sloupec slabě kyselého měniče kationtů v prostředí tekavého pufru o hodnotě pH 5,0 až 7,0, např. octanu amonného. Aktivní peptidy thymosinu frakce 5 procházejí kolonou a mohou být přímo lyofilizovány, zachycený polypeptid  $\beta_1$  se vymyje z iontoměniče zvýšením hodnoty pH elučního roztoku a tím se zároveň iontoměnič regeneruje.

Postup podle vynálezu má tyto hlavní výhody: delipidace octanem ethylnatým nebo alkanolem přidaným ke zfiltrovanému extraktu hned po tepelné denaturaci je velmi rychlá a účinná. Použití uvedených organických rozpouštědel má za následek změnu měrné hmotnosti sraženiny balastních bílkovin oproti stávajícím postupům a umožňuje jejich oddělení s vrchní kapalnou fází, čímž se eliminuje z technologického procesu jedno odstředění na průtokovém separátoru. Surový thymosin se vysoluje z dokonale čirého roztoku a to usnadňuje rozpouštění odstředěné sraženiny i předběžné čocření před ultrafiltrací. Organické rozpouštědlo má příznivý vliv na vysolování balastních látek a thymosinu. Projevuje se to zmenšením potřebného množství síranu amonného a dále tím, že finální produkt obsahuje méně neúčinných peptidů. Přesrážení thymosinu frakce 5 ze zahuštěného ultrafiltrátu a jeho převedení na acetonový prášek umožňuje shromažďovat stabilní meziprodukt z jednotlivých várek s ohledem na potřeby při následné gelové filtraci a lyofilizaci. Převedení na acetonový prášek má další rafinační účinek při minimální spotřebě acetonu oproti předchozím postupům. Při částečném odsolení ultrafiltrátu se několikanásobně sníží poměr soli k thymosinu a tím se snižují nároky na zařízení pro gelovou filtraci. Způsob podle vynálezu zrychluje podstatně výrobní proces, snižuje nároky na zařízení i na spotřebu energií. Snižuje též spotřebu surovin, jako síranu amonného a dextranového gelu. Z toho vyplývají i ekonomické úspory.

V dalším je vynález blíže objasněn jednak příklady provedení, aniž by se jimi omezoval, jednak Schematem I.

#### Příklad 1

Naváška 50 kg zmražených telecích brzlíků se rozmеле a zhomogenizuje ve 125 litrech 0,15 M roztoku chloridu sodného při teplotě 15 až 20 °C. Suspenze se míchá v kotli opatřené topným pláštěm při této teplotě po dobu 1 hodiny. Poté se za míchání zahřeje na teplotu 80 °C během 30 minut. Při této teplotě se míchá 10 minut a neprodleně se za tepla zfiltruje při redukovaném tlaku přes plachetku. Sraženina se promyje 20 litry vody. Teplý filtrát se přečerpá do zásobníku opatřeného výkonným míchadlem a ihned za tepla se za míchání přidá 1/4 objemu, t.j. kolem 30 litrů octanu ethylnatého. Po ustavení extrakční rovnováhy se kapalná fáze přečerpají do skleněného zásobníku opatřeného spodní výpustí. Po zchlazení na teplotu do 20 °C se oddělí vodná delipidovaná fáze, k níž se za míchání přidá takové množství pevného síranu amonného, aby bylo dosaženo 25 % nasycení ( 250 g / liter ) a směs se míchá po dobu 30 minut. Vzniklá suspenze se přečerpá opět do skleněného zásobníku, kde se oddělí jako vrchní fáze vrstva vysoleného rozpouštědla spolu s balastními bílkovinami. Oddělená čirá vodná fáze se okyslí ledovou kyselinou octovou na hodnotu pH 4,0 a dalším přídatkem síranu amonného do 40 až 45 % nasycení ( 185 g / liter ) se za stejných podmínek jako při prvním vysolování vyloučí surový thymosin. Sraženina tentokrát sedimentuje a odstředí se při 5.000 až 10.000 g na průtokovém separátoru.

Odstředěná sraženina surového thymosinu o hmotnosti kolem 800 g a sušině kolem 49 % se rozpustí ve 2.500 ml 0,01 M TRIS-pufu o hodnotě pH 8,0, přičemž se pH udržuje při uvedené hodnotě přídatky 25% vodného amoniaku. Vzniklý kalný roztok se zhruba zfiltruje přes sintr, poté se vyčerpá na asbestocelulozovém filtru a ultrafiltruje přes membránu s vylučovacím limitem 10.000. Ultrafiltrát se zahustí ve vakuu při vnější teplotě do 50 °C na obsah kolem 10 % sušiny a odsolí se chro-

matografií na dextranovém gelu. Imunomodulační peptidy thymosinu frakce 5, eluované v oblasti  $V_0$ , se buď přímo lyofilizují, nebo se zbaví polypeptidu  $\beta_1$  předběžnou filtrací eluátu přes sloupec slabě kyselého měniče kationtů. Výtěžek je 5,0 až 7,5 g thymosinu frakce 5.

#### Příklad 2

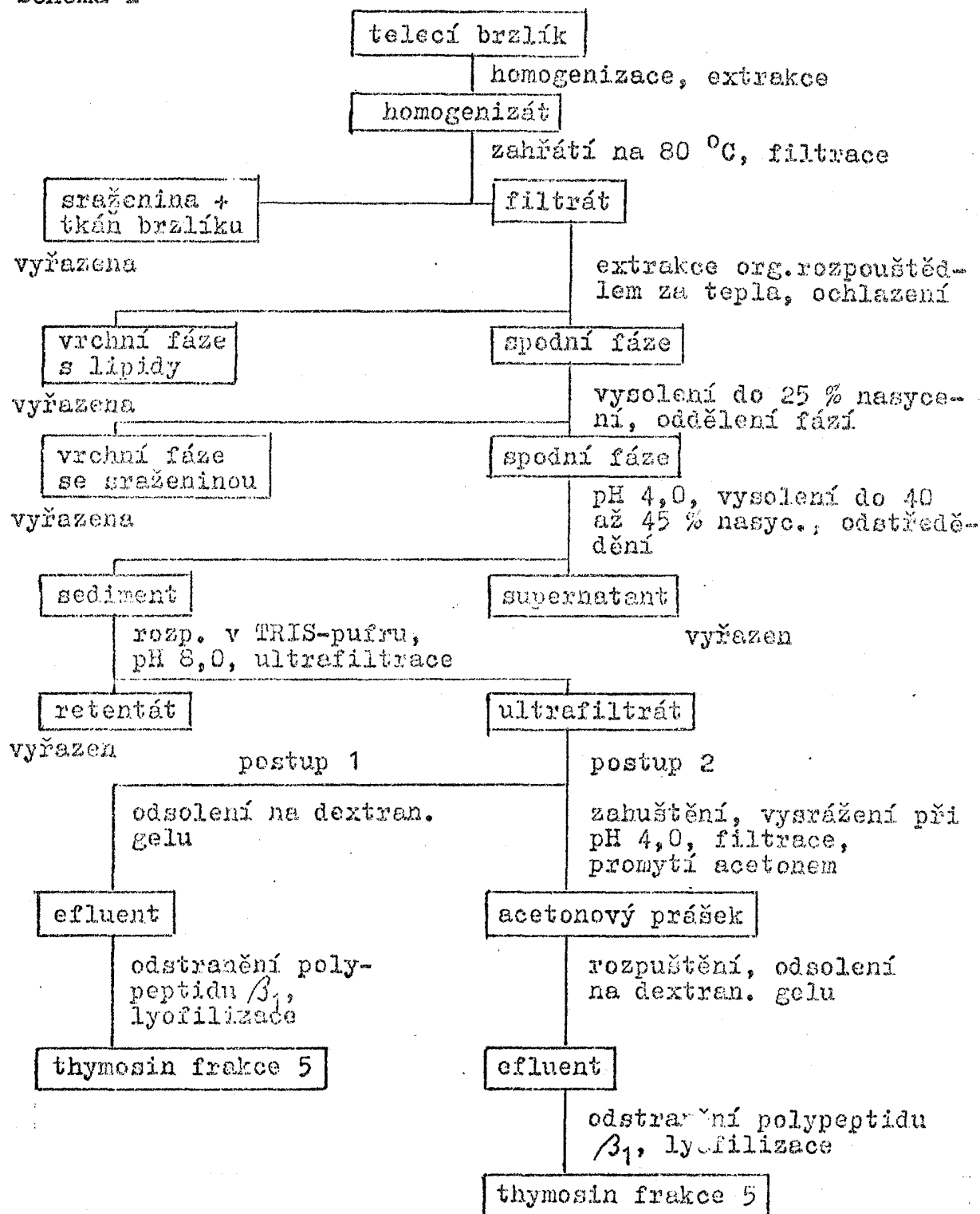
Ultrafiltrát thymosinu frakce 5 připravený postupem podle příkladu 1 se zahustí na 1/15 objemu, čímž se docílí koncentrace síranu amonného potřebné k opětovnému vysolení peptidů thymosinu. Ty se vyloučí úpravou pH na hodnotu 4,0, odsají na síntu a promyjí acetonem zchlazeným na teplotu  $-10^{\circ}\text{C}$ . Získaný stabilizovaný a částečně odsolený prášek obsahuje kolem 35 % účinných peptidů. Po rozpuštění v tekavém pufru, např. v roztoku octanu amonného při hodnotě pH 8,0 se odsoluje a dále zpracovává postupem popsaným v příkladu 1.

#### Příklad 3

Delipidaci extraktu lze provést za stejných podmínek jako v příkladu 1 s tím, že se použije namísto octanu ethylnatého nižší alkohol, s výhodou 2-propanol nebo 1-butanol.

Čistota získaných imunomodulačních peptidů thymosinu frakce 5 byla ověřena analytickou metodou isoelektrické fokusa-  
ce v rozmezí hodnot pH 3,5 až 9,5 a ultrafialovou spektroskopií při 200 až 300 nm.

Schema I



Výtěžek thymosinu frakce 5: kolem 0,01 % hmotnosti brzlíku.

P Ř E D M Ě T    V Y N Á L E Z U    264 100

1. Způsob výroby imunomodulačních peptidů thymosinu frakce 5, získávané z homogenizátu telecích brzlíků po tepelné denaturaci, vyznačující se tím, že se z teplého filtrátu vyextrahují lipidy octanem ethylnatým nebo alkoholem o počtu uhlíkových atomů 3 až 5, po ochlazení se v oddělené vodné fázi vysolí síranem amonným balastní bílkoviny a organické rozpouštědlo, které jsou ve vrchní fázi a čirá spodní fáze se následně vysolí opět síranem amonným, získaný surový thymosin se oddělí a ultrafiltruje, zahuštěním a okyselením ultrafiltrátu na hodnotu pH 3,8 až 4,2 se opět vysolí předčištěný a částečně odsolený thymosin, který se převede acetonem na stabilní práškovitý meziprodukt a ten se gelovou filtrací a chromatografií na měniči kationtů zpracuje přímo na komplex imunomodulačních peptidů thymosinu frakce 5.
2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se lipidy vyextrahují 2-propanolem nebo 1-butánolem.
3. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se okyselení ultrafiltrátu provede kyselinou octovou na hodnotu pH 4,0.