

Изобретение относится к биотехнологии и может использоваться в производстве ветеринарных и медицинских биопрепаратов, в частности, интерферонов.

Известны способы получения интерферонов с использованием переживающих лимфоидных клеток - продуцентов на крови, селезенки, костного мозга, миндалин. В качестве индуктора при этом используют вирус болезни Ньюкаста (ВБН). Для получения ВБН используют развивающиеся куриные эмбрионы, в аллантоисной жидкости которых накапливается вирус. Внесение больших количеств аллантоисной жидкости в культуру клеток приводит к загрязнению целевого продукта чужеродным белком, а необходимость дополнительной обработки для инактивации вируса-индуктора снижает активность целевого продукта.

Задача настоящего изобретения состоит в разработке способа получения основы препаратов интерферонов с высоким выходом целевого продукта и высокой степенью очистки целевого продукта от необладающих интерферонной активностью белков наряду с максимальным извлечением целевого продукта.

Поставленная задача решается тем, что, согласно изобретению, в качестве индуктора интерферона в культивируемых клетках млекопитающих используют ротавирус или Продукт его обработки, а выделение целевого продукта - основы препаратов интерферонов - осуществляют, концентрируя культуральную среду, индуцированных клеток на полых волокнах с последующей обработкой концентрата роданидом калия или полиэтиленоксидом, завершая процедуру хроматографической очистки целевого продукта.

Изобретение осуществляется следующим образом.

Пример 1. Суспензионное культивирование, например, клеток селезенки свиньи, осуществляют общепринятыми способами (Биотехнология клеток животных, М., 1989, Агропромиздат, т. 1,2) в реакторе из нержавеющей стали объемом 5-20 л при температуре +38°C в течение 24-48 ч, предварительно проведя прайминг и индукцию. В качестве индуктора используют ротавирус, полученный из фекалий поросят-пигтобиотов, зараженных свободным от иных вирусов и микроорганизмов ротавирусом свиней. Полученный ротавирус очищают и концентрируют таким образом, чтобы суспензия содержала не менее $5 \cdot 10^{13}$ физических частиц ротавируса в 1 см^3 . В суспензию вносят 33%-ную перекись водорода до концентрации 2,5-3% и выдерживают 6-10 часов при +4°C и постоянном перемешивании. Определяют концентрацию вируса с помощью электронного микроскопа и используют на этапе индукции, внося в культуру клеток 10000-100000 вирионов на 1 жизнеспособную клетку. По окончании биосинтеза культуральную среду отделяют от клеток и подвергают ультрафильтрации на полых волокнах, причем концентрирование осуществляют в 10-15 раз, а концентрат собирают и стерилизуют фильтрованием. Определяют титр интерферона стандартным методом по подавлению цитопатического эффекта в системе "культура гомологических клеток- вирус везикулярного стоматита".

Пример 2. Концентрат, полученный как в примере 1, обрабатывают калием роданистым, внося сухую соль до 0,5-0,6 М при pH 3,0-3,5 и T° 15-20°C. После перемешивания в течение 15-20 мин осадок отделяют, соединяют с 95%-ным этанолом, устанавливают pH 4,0-4,2 и при постоянном перемешивании выдерживают 6-12 час, центрифугируют при 800-1000, супернатант подщелачивают до 7,2-7,4 ед. pH, добавляют 18-20% объемных хлороформа и выдерживают при -15-20°C 6-12 час. Осадок отделяют центрифугированием при 800-1000 и растворяют в 0,15 М натрия цитрате, получая целевой продукт. Определяют титр интерферона как в примере 1.

Пример 3. Концентрат, полученный как в примере 1, обрабатывают полиэтиленоксидом с молекулярной массой 4000-6000 при pH 7,6-8,0, внося сухой реактив до концентрации 15-20% массовых, смесь инкубируют при +4°C 4-14 час, осадок отделяют центрифугированием при 800-1000, растворяют в 0,15 М натрия цитрате и определяют титр интерферона.

Пример 4. Целевой продукт, полученный как в примерах 2 и 3, подвергают гель-фильтрации на сефадексах С-10, С-15 или С-25, собирая первый пик. Элюирующим раствором служит 0,02 М фосфатный, буфер pH 7,2. Определяют титр интерферона как в примере 1.

Пример 5. Очищенный и концентрированный ротавирус, полученный как в примере 1, суспендируют в 0,02 М фосфатном буфере pH 7,2, соединяют с водонасыщенным фенолом при постоянном перемешивании в отношении 1:1 и немедленно добавляют 1 объем этанола. Смесь выдерживают 1-1,5 часа при 0°C, осадок отделяют центрифугированием при 1 500, растворяют в 0,02 М фосфатном буфере pH 7,2 и осаждают 2,5-3 объемами дважды перегнанного этанола, повторяя осаждение трижды. Полученный осадок используют, внося в культуру клеток 1-10 мкг/см^3 продукта обработки ротавируса на этапе индукции непосредственно после получения или консервируют 70%-ным этанолом и хранят при -10°C. Дальнейшее культивирование клеток как в примере 1, прочие операции как в примерах 2, 3, 4. Определяют титр интерферона как в примере 1.

Таблица 1

Титры интерферона в суспензионной культуре спленоцитов свиньи в зависимости от концентрации индуктора

Индуктор	Вирус болезни Ньюкаста (ВБН), вирионов/клетку		Ротавирус, обработанный перекисью водорода, вирионов/клетку			Продукт обработки ротавируса фенолом и этанолом, мкг/см ³ суспензии клеток			
Концентрация	$1 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^5$	0,1	1,0	10,0	30,0
Титры	512	1024	8192	16384	32768	1024	16384	32768	32768

Таблица 2

Удельная противовирусная активность целевого продукта (МЕ/мг белка)

Целевой продукт	Индуктор	
	Ротавирус, обработанный перекисью водорода	Продукт обработки ротавируса фенолом и этанолом
Концентрат культуральной среды индуцированных клеток	$1,3 \cdot 10^3 - 4,5 \cdot 10^3$	$1,3 \cdot 10^3 - 4,5 \cdot 10^3$
Концентрат после обработки калия роданидом	$0,6 \cdot 10^7 - 1,4 \cdot 10^7$	$1,0 \cdot 10^7 - 1,4 \cdot 10^7$
Концентрат после обработки ПЭО	$0,25 \cdot 10^7 - 1,0 \cdot 10^7$	$0,6 \cdot 10^7 - 1,4 \cdot 10^7$