

Изобретение относится к области биотехнологии и может быть использовано в медицине и ветеринарии для профилактики и лечения ряда заболеваний.

Изучение иммуномодулирующего действия препаратов интерферона продемонстрировало выраженный протективный эффект в отношении ряда бактериальных инфекций. Несмотря на то, что в этих исследованиях были использованы малые дозы интерферона, который, как известно, быстро выводится из организма, протективный эффект сохранялся в течение многих суток. Эти данные позволили обосновать индукторный механизм действия интерферона в формировании резистентности организма [1]. Этот механизм опосредован выработкой лимфоцитами эндогенных факторов, получение которых представляется весьма актуальной задачей.

Известны иммунологически активные вещества, полученные из экстрактов лейкоцитов, которые способны "переносить" специфическую иммунную реакцию на определенный антиген - так называемый фактор переноса [2] или индуцировать неспецифическую реактивность - спленин [3] или ограничивать иммунный ответ - антигениндуцированный супрессорный фактор [4].

Фактор переноса представляет диализуемый бесклеточный лейкоцитарный экстракт, приготовленный путем замораживания и оттаивания мононуклеарных клеток, способный специфически переносить гиперчувствительность замедленного типа, к определенным антигенам, от иммунного организма к неиммунному.

Обычный метод приготовления фактора переноса для клинического применения состоит в разрушении клеток в присутствии ДНК-азы с последующим экстенсивным диализом против больших объемов дистиллированной воды. Клеточным источником фактора переноса является донорская кровь, что не всегда позволяет накопить достаточное количество препарата.

Спленин - биологически активный препарат, полученный из селезенки крупного, рогатого скота после аутолиза при помощи экстракции диэтилэтаном. Белок в спленине не обнаружен. Активное начало спленина остается неизвестным.

Антигениндуцированный супрессорный фактор селезенки - обнаруживается в надосадочной жидкости гомогената клеток селезенки при активации клеток-супрессоров, ограничивающих иммунный ответ.

Для получения супрессорного фактора мышей иммунизируют антигеном. Через 14 суток после иммунизации селезенку этих животных гомогенизируют, пятикратно замораживают и оттаивают. Надосадок отделяют центрифугированием при 10000g в течение 30 минут. Супернатант разливают в ампулы и замораживают. Свойства супрессорного фактора во многом недостаточно изучены. Известно, что супрессорный фактор селезенки мышей, неспецифически подавляет тимусзависимый иммунный ответ.

Наиболее близким прототипом по способу получения является способ получения экстракта из регенерирующей ткани селезенки, ингибирующего синтез ДНК в лейкозных клетках [5], заключающийся в предварительном введении телятам циклофосфана в дозе 30мг/кг за 10 дней извлечения селезенки с последующим получением из нее ацетонового порошка. Водорастворимые вещества из ацетонового порошка экстрагируют 15-кратным объемом воды при постоянном перемешивании. Экстракт после центрифугирования в течение 2 часов при 45000g подвергают диализу, затем повторно центрифугируют при 30000g в течение 45 минут. Надосадочную жидкость стерилизуют и лиофилизируют.

Задачей изобретения является разработка способа получения из лимфоцитов, выделенных из различных клеточных источников, эндогенного иммуномодулирующего вещества с направленным механизмом действия, получаемого на основе индукторного механизма при предварительном введении гомологичного интерферона, что приводит к выработке лимфоцитами специфического фактора(ов), активирующего эффекторы системы естественной резистентности.

Заявляемый способ и полученное вещество, по иммуномодулирующему действию отличается от вещества-прототипа и от вещества, получаемого описанным способом из селезенки и лимфатических узлов без предварительного введения интерферона (контрольное вещество), что иллюстрируют данные таблицы.

Способ получения иммуномодулирующего вещества осуществляется путем введения подкожно мышам линии СВА массой 16 - 18г 1000Ед естественного гомологичного альфа-интерферона. Через 3 суток животных забивают при помощи шейной дислокации под эфирным наркозом, извлекают селезенку, гомогенизируют в стеклянном гомогенизаторе в физиологическом растворе. Гомогенат фильтруют через капроновую сетку. Эритроциты в клеточной суспензии лизируют добавлением трех объемов 0,83% раствора  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Спленициты (лимфоциты) трижды отмывают физиологическим раствором, центрифугируя в течение 10 минут при 400g, вновь ресуспендируют в физиологическом растворе и подсчитывают в гемоцитометре. Затем клеточную суспензию подвергают пятикратному замораживанию (при  $-20^\circ\text{C}$ ) и оттаиванию для разрушения лимфоцитов и получения экстракта клеток, который центрифугируют при 20000g в течение 30 минут. Супернатант, содержащий иммуномодулирующее вещество, разводят так, чтобы число ядросодержащих клеток в его 1мл составляло  $1 \times 10^8$ . Полученный таким образом экстракт клеток подвергают ультрафильтрации в системе тангенциального потока "Minitam" через 4 пакета мембран с номинальной отсекающей молекулярной массой 30кД. Полученное вещество исследовали на различных биологических моделях, расфасовывали в ампулы и лиофилизовали.

Подобным образом получали иммуномодулирующее вещество из селезенки свиней, предварительно получавших гомологичный интерферон. Полученное вещество обладало свойствами, отраженными в таблице.

Таким образом, введение гомологичного интерферона приводит к выработке лимфоцитами эндогенных факторов, стимулирующих функциональную активность эффекторов системы естественной резистентности. На этом феномене основан способ получения иммуномодулирующего вещества.

Сравнительная характеристика иммуномодулирующих свойств веществ, полученных различным способом

Биологическая модель	Эффект		
	Заявляемое вещество	Вещество-прототип	Контрольное вещество
1. Гиперчувствительность замедленного типа	Не влияет	Снижает	Не влияет
2. Антительный иммунный ответ	Не влияет	Снижает	Не влияет
3. Функциональная активность моноклеарных фагоцитов	Существенно повышает	Не влияет	Не влияет
4. Протективное действие (на модели экспериментальной сальмонеллезной инфекции)	Выраженное	Отсутствует	Отсутствует
5. Влияние на цитотоксический потенциал лимфоцитов и макрофагов	Существенно повышает	Не влияет	Не влияет
6. Влияние <i>in vitro</i> на пролиферацию опухолевых клеток человека (A549, U937)	Угнетает	Не влияет	Не влияет