

Винахід відноситься до галузі мікробіології, вірусології та імунології і може використовуватись в медицині, ветеринарії, експериментальній біології при отриманні препаратів природних імуномодуляторів γ -інтерферонів.

Найбільш близьким до рішення, що заявляється, є спосіб виготовлення γ -інтерферонів, який складається з отримання продуцентів інтерферону - імуноцитів, їх культивування в присутності як індукторів γ -інтерферону лектинів, отриманих з трави "золотий дощ".

Щільність суспензії клітин продуцентів складає $2,7 \times 10$ мл, а концентрація лектинів 20 - 25 мг/мл, при цих умовах отримано препарати з середнім антивірусним титром 1 : 1024 - 1535 Од/мл, що є недостатнім для виробництва серійних препаратів γ -інтерферонів [1].

Недоліком вказаного способу є те, що рослинні лектини, до яких відносяться лектини, одержані із трави "золотий дощ", вкрай дорогі при виробництві; крім того, вони досить токсичні. Тому їх практичне використання обмежене як дороговизною отримання, так і тим, що при їх застосуванні постає питання про видалення їх як токсичних речовин з кінцевого продукту - отриманого γ -інтерферону.

Задачею даного винаходу є вдосконалення способу виготовлення γ -інтерферонів шляхом знайдених авторами операцій, їх режимів і застосування лектинів *Bacillus Subtilis* 668 IMB, внаслідок чого досягається збільшення виходу продукту та зменшуються затрати, пов'язані з використанням способу.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі виготовлення γ -інтерферонів, який включає в себе отримання продуцентів інтерферону γ -імуноцитів тварин та їх культивування в присутності індуктора інтерферогенезу, і послідовним відділенням інтерферонскладової рідини, згідно винаходу, культивування проводять при щільності імуноцитів 5×10^5 - 5×10^6 клітин в мл, а як індуктор інтерферогенезу беруть лектин *Bacillus Subtilis* 668 IMB при його концентрації 10 - 20 мг на 1 мл суспензії клітин, причому процес інтерферогенезу здійснюють при коливаннях клітинної суспензії з частотою 1,0 - 1,5 Гц та поверхневій аерації повітрям 0,20 л/л · хв.

Вказані лектини мають високу інтерферогенну активність, що дозволяє отримувати γ -інтерферони з високою антивірусною активністю 1 : 1024 - 2048 Од/мл, а їх отримання, порівняно з лектинами рослинного походження, не дороге, при цьому самі лектини не токсичні.

Крім індуктора, при отриманні γ -інтерферонів великий вплив на якість отримуваних препаратів - мають умови інтерферогенезу, тобто умови, в яких знаходяться клітини - продуценти під час синтезу інтерферону. Оптимальні інтерферонсинтезуючі умови досягаються при використанні суспензійних умов культивування в біореакторах з перемішуванням. Але у зв'язку з тим, що клітини-продуценти інтерферону не мають клітинних стінок, вони характеризуються чутливістю до фізичного впливу під час перемішування, який може призвести до травмування і загибелі клітин. Ось чому біореактори для культивування клітин тварин не повинні травмувати клітини під час перемішування.

Найбільш низький травмуючий ефект мають біореактори з застосуванням пульсаційного перемішування.

Проводили дослідження впливу різних щільностей клітин продуцентів, а також концентрацій індуктора інтерферогенезу бактерійного лектину *Bacillus subtilis* 668 IMB, на інтерферонсинтезуючу активність клітин - продуцентів в пульсаційному біореакторі, в порівнянні з традиційним способом, де використовували лектин трави "золотий дощ": Біосинтез γ -інтерферону проводили у пульсаційному біореакторі при частоті коливань перемішуваної суспензії клітин 1,0 - 1,5 Гц і поверхневій аерації повітрям - 0,20 л/л · хв.

Найбільш близьким до рішення, що заявляється, є пристрій для виготовлення γ -інтерферонів, який містить в собі біореактор, що являє собою скляний посуд з випуклим дном, в рівні робочого об'єму якого коаксіально розміщений циліндр, герметично з'єднаний з пневмогенератором [2].

Перемішування здійснюється шляхом зворотно-поступового руху клітинної суспензії під дією повітря, яке подається з пневмогенератора в циліндр. При подачі повітря з пневмогенератора в циліндр, який виконує функції пульсаційного перемішувального пристрою, клітинна суспензія витискується з об'єму циліндра і переміщується в об'єм біореактора, при відключенні пневматичного імпульсу рівень як в біореакторі, так і в циліндрі вирівнюється, здійснюючи тим самим коливання рівня клітинної суспензії і її перемішування. Форма днища біореактора призначена для формування струму клітинної суспензії. Крім того, вказаний пристрій має штуцери завантаження та вивантаження клітинної суспензії.

До недоліків описаної конструкції пристрою можна віднести наступні ознаки: гідродинамічні умови в біореакторі відрізняються нерівномірністю розподілу фаз, так як потоки клітинної суспензії, які виходять з циліндру, слабкі для охоплення всього об'єму клітинної суспензії, що призводить до утворення застійних зон.

Використання газової фази для створення коливань клітинної суспензії при тривалому культивуванні неминуче призводить до зміни рН середовища. Це пов'язане з тим, що в поживних середовищах, які використовуються для культивування клітин тварин, компонентом, що підтримує рН, є бікарбонатний буфер. Повітря, яке надходить з пневмогенератора, порушує рівновагу буферної системи за рахунок видалення CO_2 і відбувається зміна рН в сторону залуження.

Принцип перемішування не дозволяє масштабувати пристрій до промислових об'єктів, що обмежує його використання виключно в лабораторних дослідженнях.

Задачею винаходу є вдосконалення пристрою для виготовлення γ -інтерферонів, в якому конструктивні особливості забезпечують збільшення синтезуючого потенціалу клітин - продуцентів та збільшення виходу γ -інтерферону.

Поставлена задача досягається тим, що пристрій для виготовлення γ -інтерферонів, який містить в собі біореактор, перемішувач, вузол, штуцери завантаження та розвантаження згідно винаходу, біореактор має кульовидну форму, в нижній частині якого розміщений 2-камерний пульсаційний перемішувач, вузол

мембранного типу, при цьому одна з камер з'єднана з біореактором на рівні нижньої частини робочого об'єму, а інша, в сторону якої повернута сферична окружність мембрани, - з пневмогенератором, крім того, додатково містить фільтри стерилізації аеруючого та відпрацьованого повітря.

Пристрій, що заявляється, приведено на кресленні (фіг.). Пристрій являє собою ємність кульовидної форми 1, обладнану пульсаційним перемішувальним пристроєм мембранного типу 2, який розділений еластичною випуклою мембраною 3, що поділяє його на камеру заповнення клітинною суспензією 4, та камеру підводу стиснутого повітря 5. Мембрана встановлена випуклістю в напрямку камери підводу стиснутого повітря. Біореактор обладнаний фільтрами стерилізації аеруючого 6 та відпрацьованого повітря 7, штуцерами завантаження 8 та вивантаження клітинної суспензії 9.

Пристрій працює таким чином: після внесення в біореактор клітинної суспензії до робочого вмісту, який становить 70% геометричного, в камеру підводу стиснутого повітря подаються пневматичні імпульси, в результаті яких відбувається деформація мембрани, і як наслідок цього змінюється об'єм клітинної суспензії в суміжній камері, при цьому клітинна суспензія виштовхується з камери в біореактор, створює цим самим занурений потік, який направлений до поверхні суспензії та підвищує рівень клітинної суспензії в біореакторі. В інтервалах між імпульсами, завдяки випуклій формі мембрани, що позбавлена залишкової деформації, відбувається заповнення камери перемішуючого пристрою суспензією клітин, яка надходить з біореактора. Після надходження наступного пневматичного імпульсу відбувається повторне виштовхування суспензії в біореактор. Таким чином при роботі біореактора досягається суспензійні умови, при яких клітини - продуценти знаходяться в монодисперсному стані завдяки коливанням клітинної суспензії та її циркуляції й напрямку від нижньої частини біореактора до поверхні розподілу фаз газ - рідина з седиментаційною зоною в латеральній частині, що створює замкнутий контур перемішування.

Циклічність заповнення камери клітинною суспензією та її виштовхування, цим самим інтенсивність перемішуючих коливань в біореакторі регулюється частотою пневматичних імпульсів, що подаються до пульсаційного пристрою.

Результати проведених досліджень по застосуванню пульсаційного біореактора при отриманні γ -інтерферонів з допомогою лектину *Bacillus subtilis* 668 IMB та лектинів з трави "золотистий дощ" наведені в таблиці.

З наведених матеріалів видно, що:

1) при культивуванні клітин - імуніцитів свиней за допомогою запропонованого біореактора має місце найбільш високий вихід γ -інтерферону при використанні лектинів *Bacillus subtilis* 668 IMB в діапазоні щільності клітин-продуцентів $5,0 \cdot 10^6$ - $2,5 \cdot 10^7$ клітин в 1мл;

2) при "реакторному типі" біосинтезі гамма-інтерферону досягається істотна економія лектину *Bacillus subtilis* 668 IMB - його треба використовувати лише 10 - 20мкг на 1мл клітинної суспензії (а не 40 - при "традиційному" методі),

оскільки 5мкг індуктора на 1мл клітинної суспензії клітин - продуцентів давали лише половинні титри, отримані для дози лектинів - 10 - 20мкг/мл, подальше збільшення дози лектину не призводила до істотного збільшення виходу кінцевого продукту.

Примітка: Оскільки при виготовленні природного γ -анімаферону ВРХ та мишей були отримані тотожні результати, дані цих дослідів не наводимо.

Таким чином, виготовлення γ -інтерферонів тварин (свиней, ВРХ та мишей) за допомогою запропонованого пристрою дає оптимальний вихід кінцевого продукту - γ -інтерферону при порівняно широкому діапазоні щільності клітин - продуцентів та порівняно менших концентраціях лектинів як індукторів інтерферогенезу. Це дає можливість значно збільшити кількість отриманого γ -інтерферону, економити вихідну сировину при отриманні клітин - продуцентів та зменшити витрати індуктора - бактерійного лектину.

Запропонований спосіб отримання γ -інтерферону та пристрій для його здійснення може бути адаптований до отримання γ -інтерферонів людини, свійських тварин - коней, птахів, собак, кішок, а також хутрових звірів - норок, ондатр тощо.

Ефективність біосинтезу γ -Інтерферону свиней і
Індукторів – лектинів *Bacillus subtilis* 66

Доза лектинів, мкг/мл	Щільність клітинів, кл	
<i>Bacillus subtilis</i> 668		
5	$1,0 \cdot 10^6$	
	$5,0 \cdot 10^6$	
	$1,0 \cdot 10^7$	
	$2,5 \cdot 10^7$	
	$5,0 \cdot 10^7$	
10	$1,0 \cdot 10^6$	
	$5,0 \cdot 10^6$	
	$1,0 \cdot 10^7$	
	$2,5 \cdot 10^7$	
	$5,0 \cdot 10^7$	
20	$1,0 \cdot 10^6$	
	$5,0 \cdot 10^6$	
	$1,0 \cdot 10^7$	
	$2,5 \cdot 10^7$	
	$5,0 \cdot 10^7$	
40	$1,0 \cdot 10^6$	044,0
	$5,0 \cdot 10^6$	1484,8
	$1,0 \cdot 10^7$	1945,6
	$2,5 \cdot 10^7$	2150,4
	$5,0 \cdot 10^7$	2150,0
Трави "золотистий дощ" (контроль)		
20	$1,0 \cdot 10^6$	360,0
	$5,0 \cdot 10^6$	420,0
	$1,0 \cdot 10^7$	1024,0
	$2,5 \cdot 10^7$	1466,0
	$5,0 \cdot 10^7$	766,0

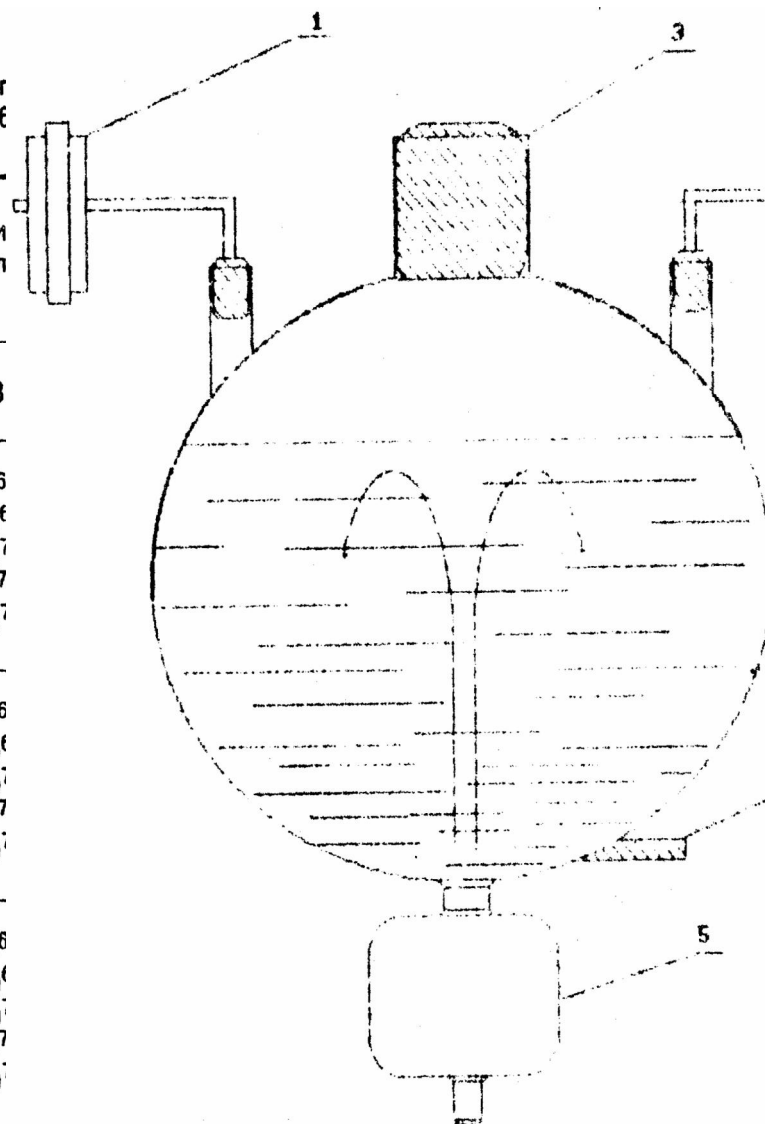


Fig.