

НЕ ПОДЛЕЖИТ СПУБЛИКАЦИИ  
В ОТКРЫТОЙ ПЕЧАТИ



СОЮЗ СОВЕТСКИХ  
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ  
РЕСПУБЛИК

(19) SU (11) 1172116 A

(51) A 61 K 45/02// A 61 K 35/50

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР  
ПО ДЕЛАМ ИЗОБРЕТЕНИЙ И ОТКРЫТИЙ

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

(21) 3541122 /28-13

(22) 18.01.83

(71) Институт микробиологии и вирусологии им.Д.К.Заболотного

(72) Н.Я.Сильск, С.Р.Резник, Л.Д.Кривоохатская и А.И.Завирюха

(53) 615.361(088.8)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ИНТЕРФЕРОНА

(19) SU (11) 1172116 A

Изобретение относится к медицинской и ветеринарной вирусологии, а именно к способам получения интерферона для профилактики и терапии вирусных заболеваний человека и животных.

Цель изобретения - увеличение выхода интерферона.

Способ поясняется следующими примерами.

Пример 1.

Небные миндалины свиней отбирают после убоя животных и помещают в среду/199, содержащую 2% сыворотки крови крупного рогатого скота и антибиотики (пенициллин 100 ед/мл, стрептомицин 50 ед/мл). Материал должен быть подвергнут дальнейшей обработке не позднее 24 ч. с момента убоя животных. Миндалины очищают от соединительной ткани, измельчают до гомогенного состояния, а затем разводят (соотношение объемов 1:4) средой/199, содержащей сыворотку и антибиотики, и фильтруют для удаления крупных частиц через два слоя стерильной марли. Подсчитывают в камере Горяева количество живых клеток, которые подкрашивают трипановым синим. Мертвые клетки окрашиваются в синий цвет. Многократные наблюдения свидетельствуют, что из одной миндалины массой 20 г (миндалины бывают от 5 до 25 г) получают  $5 \cdot 10^8$  лимфоцитов (в то же время из 1 л крови получают  $3-4 \cdot 10^7$  лейкоцитов). Из 100 г гомогената небных миндалин получают  $1-3 \cdot 10^9$  лимфоцитов. В зависимости от результата подсчета полученную взвесь растворяют средой/199 с 5% сыворотки и антибиотиками до концентрации  $5 \cdot 10^6$  кл/мл. В приготовленную суспензию вносят индуктор интерферона - вакцинный вирус Ньюкасла штамм Н из

из расчета 10 ТЦД<sub>50</sub>/клетку и ставят для инкубации при 37°C в течение 20ч. По окончании инкубации суспензию центрифугируют при 1000 об/мин. в течение 15 мин, надосадочную жидкость сливают, а осадок утилизируют. С помощью 0,1N HCl доводят pH надосадочной жидкости до 2,2 и выдерживают в холодильной камере в течение 4 сут. (для инактивации оставшегося в суспензии вируса-индуктора). Затем pH суспензии доводят 20%-ным раствором *NaOH* до 7,2. Антивирусную активность полученного интерферона определяют в культуре первичных клеток эмбриона свиней, которые заражают вирусом везикулярного стоматита штамм Индиана в дозе 100 ТЦД<sub>50</sub>. Из лимфоцитов миндалин можно получить гораздо большее количество интерферона, чем из лейкоцитов. В организме свиней кровь составляет 6-8% от массы животного, т.е., собрав всю кровь животного (массой 100 кг), можно получить из нее 1-3 · 10<sup>8</sup> лимфоцитов, в то же время только из одной пары миндалин (массой по 20 г) выход лимфоцитов в 3-4 раза больше. Из 1 л крови свиней можно получить 80-100 мл интерферона, а из 100 г гомогената небных миндалин - до 500 мл интерферона.

#### Пример 2.

Отбор окологлоточных лимфоузлов производят во время раздвигания тули животного и все последующие операции выполняют аналогично, как и в случае с небными миндалинами. Пул окологлоточных лимфоузлов (8 узлов, общей массой 100 г) очищают от соединительной ткани, измельчают до гомогенного состояния, разводят в соотношении 1:4 средой 199, содержащей сыворотку крупного рогатого скота и антибиотики, и фильтруют через два слоя стерильной

марли для удаления крупных частиц. Полученные лимфоциты обрабатывают 0,83% <sup>ннм</sup>  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (хлористым аммонием) в соотношении 1:5, встряхивают и центрифугируют при 1000 об/мин · 15 мин. Надосадочную жидкость сливают, а осадок ресуспендируют в среде  $\text{M199}$  с сывороткой и антибиотиками. В камере Горяева считают количество живых клеток.

Из окологлоточных лимфоузлов одного животного получают  $8-10 \cdot 10^8$  лимфоцитов. В зависимости от результата подсчета полученную суспензию разводят средой  $\text{M199}$  с 5% сыворотки крупного рогатого скота и антибиотиками до концентрации  $5 \cdot 10^6$  кл/мл. В приготовленную суспензию вносят индуктор интерферона - вирус болезни Ньюкасла штамм Н из расчета 10 ТЦД<sub>50</sub>/клетку и инкубируют в термостате при температуре 37°C в течение 20 ч. Затем проводят те же операции, как и в примере 1 с лимфоцитами небных миндалин.

Селезенки свиней отбирают так же, как миндалины и лимфоузлы, во время разделки туши (масса селезенки у животноных колеблется от 0,1 до 0,3% от массы тела, в среднем  $\sim 0,2\%$ ). Селезенку очищают от соединительной ткани и измельчают до гомогенного состояния. Гомогенизированную ткань тщательно суспендируют в среде  $\text{M199}$  с антибиотиками и сывороткой (соотношение объемов 1:3) и фильтруют для удаления крупных частиц через два слоя стерильной марли. К фильтрату добавляют 0,83%-ный раствор хлористого аммония ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) в соотношении 1:5, перемешивают и центрифугируют при 1000 об/мин в течение 15 мин. Надосадочную жидкость сливают, а осадок ресуспендируют в среде  $\text{M199}$  с 5% сыворотки и антибиотиками. Из селезенки свиней массой 200 г получают до  $5 \cdot 10^9$  лимфоцитов. Индукцию интерферона в

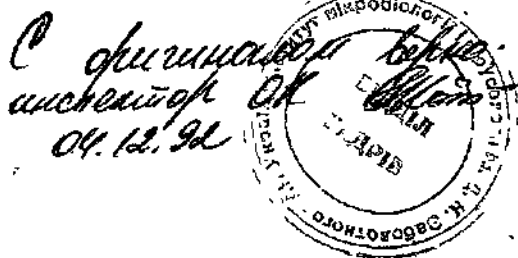
лимфоцитах селезенки осуществляют в тех же условиях, что и в предыдущих примерах.

### Формула изобретения

Способ получения интерферона из сырья животного происхождения, включающий инкубирование продуцента интерферона в питательной среде № 199 в присутствии вируса-индуктора с последующим выделением целевого продукта и инаktivацией вируса-индуктора, отличающийся тем, что, с целью увеличения выхода интерферона, в качестве сырья используют лимфоидные органы животных, которые гомогенизируют и проводят инкубирование в питательной среде, дополнительно содержащей 2-5% сыворотки крови крупного рогатого скота при температуре 39-40°C.

(56) Ершов Ф.И., Новохатский А.С., "Интерферон и его индукторы", М., 1980, с. 97, 99.

Авторское свидетельство СССР № 839547, кл. А 61 К 45/02, 1977



Подписано к печати

13.05.85

Редактор

*В. Котова*

Зак. № 620

Тираж

*4*

экз.

