



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY  
A OBJEVY

# POPIS VYNÁLEZU 260968

## K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

(61)

(23) Výstavní priorita  
(22) Přihlášeno 27 04 84  
(21) PV 3139-84  
(89) 1027867, 20 08 81, SU

(11) B<sub>1</sub>

(51) Int. Cl.<sup>A</sup>  
A 61 K 45/02

(40) Zveřejněno 18 12 86  
(45) Vydáno 30.05.89

(75)  
Autor vynálezu

KOROBICYN LEONID PAVLOVIČ,  
PIVOVAROV ANATOLIJ MICHAJLOVIČ,  
GONČAROVA SVĚTLANA VIKTOROVNA,  
KULIKOVA IRINA NIKOLAJEVNA,  
TJAGOTIN JURIJ VASILJEVIČ, LENINGRAD (SU)

(54)

Způsob výroby lidského leukocytárního interferonu

Řešení se týká oblasti průmyslové biologie. Způsob výroby lidského leukocytárního interferonu spočívá v odstředění krve dárce, oddělení leukocytů, hemolýze zbývajících erytrocytů s chloridem amonným resuspendování usazených leukocytů v živném prostředí podle Bagla a oddělení cílového produktu. Přínosem je, že odstředění použité krve se uskutečňuje při 1500 až 5000 g po dobu 35 až 45 minut, odebrání 30 až 75 % objemu vrchní části leukocyty obsahující erytrocytové hmoty, hemolýza se provede roztokem 0,80 až 0,84 chloridu amonného při poměru 1 : /3 až 50/.

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

Заявлено: 20.08.81

Заявка № 3337658/28-13

МКИ<sup>3</sup> А 61 К 45/02

Авторы: Л.П.Коробицын, А.М.Пивоваров, С.В.Гончарова, И.Н.Куликова  
и Ю.В.Тяготин

Заявитель: Всесоюзный научно-исследовательский институт особо чистых био-  
препаратов

Название изобретения: СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ЛЕЙКОЦИТАРНОГО ИНТЕР-  
ФЕРОНА

Изобретение относится к области промышленной биологии, а именно к спосо-  
бам получения интерферона из лейкоцитов крови человека.

Известен способ получения лейкоцитарного интерферона путем выделения лей-  
коцитов, индукции интерферонообразования, биосинтеза интерферона, выделения  
интерферона (1).

Однако выход клеток составляет 10-15% от популяции лейкоцитов, содержа-  
щихся в цельной крови.

Известен также способ получения человеческого лейкоцитарного интерферона  
путем центрифугирования донорской крови, отделения лейкоцитов, гемолиза ос-  
таточных эритроцитов хлористым аммонием, ресуспендирования осадка лейкоци-  
тов в питательной среде Игла, выделения целевого продукта (2).

Однако выход интерферона незначителен и составляет  $4 \cdot 10^6$  МЕ/л с единицы  
объема перерабатываемой крови.

Целью изобретения является повышение выхода целевого продукта.

Указанная цель достигается тем, что при осуществлении способа получения  
человеческого лейкоцитарного интерферона путем центрифугирования донорской  
крови, отделения лейкоцитов, гемолиза остаточных эритроцитов хлористым ам-  
монием, ресуспендирования осадка лейкоцитов в питательной среде Игла, выде-  
ления целевого продукта отличительной особенностью является то, что центри-  
фугирование цельной крови осуществляют при 1500-5000g в течение 35-45 минут,

отбирают 30-75% объема верхней части лейкоцитсодержащей эритроцитной массы, гемолиз осуществляют 0,80-0,84% раствором хлорида аммония при соотношении 1: (3-50).

Способ поясняется следующими примерами.

Пример 1

Кровь доноров собирают в пластиковые пакеты, содержащие цитратный стабилизатор. Сразу после сбора кровь центрифугируют при  $4^{\circ}\text{C}$  в течение 20 минут при 2000g, чтобы отделить плазму от эритроцитов. После удаления плазмы собирают 10-15 мл Buffy coat, переносят его в пробирки, содержащие 1 мл раствора этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) и ресуспендируют. Смесь выдерживают 10 минут при  $+4^{\circ}\text{C}$  и центрифугируют при 160g в течение 10 мин. Осадок лейкоцитов ресуспендируют в 10 мл питательной среды Игла MEM, содержащей 10% человеческой сыворотки. К полученной суспензии клеток добавляют 1/10 объема ЭДТА и суспензию смешивают с 8 объемами 0,83%  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Через несколько минут смесь центрифугируют при 160g в течение 10 минут. Полученный осадок лейкоцитов ресуспендируют в свежей питательной среде Игла MEM до конечной концентрации  $10^7$  кл/мл. Конечный выход лейкоцитов составляет  $0,9 \times 10^9$  клеток с 1 литра крови или 15% от того количества лейкоцитов, которое содержится в донорской крови.

Лейкоциты, ресуспендированные в питательной среде Игла, обрабатывают 200 МЕ/мл лейкоцитарного человеческого интерферона при  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 2 часов. Затем к суспензии лейкоцитов добавляют индуктор-вирус болезни Ньюкастла или вирус Сендай в дозе 20-25 цитотоксических доз на 1 клетку и инкубируют еще в течение 1 часа при  $37^{\circ}\text{C}$ . По истечении этого времени неадсорбированный на клетках вирус отделяют центрифугированием при 600g в течение 15 минут. Полученный осадок клеток ресуспендируют в питательной среде Игла MEM в конечной концентрации  $5-10 \times 10^6$  кл/мл. Питательная среда содержит 5% человеческой плазмы. Суспензию клеток инкубируют при  $37^{\circ}\text{C}$  при перемешивании в течение 16-20 часов.

По завершении указанного срока культуральную жидкость отделяют от клеток-продуцентов центрифугированием при 1500g в течение 30 минут. Осадок клеток отбрасывают, а культуральную жидкость выдерживают в течение 3-4 суток при  $+4^{\circ}\text{C}$  и pH раствора, доведенного до 2,5 и  $\text{HCl}$  с целью инактивации вируса-индуктора, а затем в ней проводят определение титра интерферона.

Абсолютный выход интерферона с 1 литра крови достигает  $4 \times 10^6$  МЕ.

Пример 2

Кровь собирают в пластиковые пакеты типа "Гемакон", содержащие цитратный стабилизатор. Сразу после сбора кровь центрифугируют при  $2000 \pm 100\text{g}$  в течение 40-5 минут при  $+4^{\circ}\text{C}$  с целью отделения плазмы от эритроцитов. После удаления плазмы собирают верхние 2/3 объема эритроцитарной массы и ресуспендируют в 3 объемах 0,83%  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Смесь центрифугируют при 500g в течение 40 минут. Полученный осадок клеток ресуспендируют в 10 объемах 0,83%  $\text{NH}_4\text{Cl}$  и центрифугируют при 150g в течение 20 минут. Полученный осадок лейкоцитов ресуспендируют в питательной среде Игла MEM, содержащей 4% человеческой сыворотки в конечной концентрации  $10^7$  кл/мл. Выход лейкоцитов составляет  $5,0 \times 10^9$  клеток с 1 литра крови или 80% от их содержания в цельной крови. Индукцию и биосинтез интерферона проводят так же как в примере 1.

Абсолютный выход интерферона с 1 литра крови составляет  $10^7$  МЕ.

Пример 3

Кровь от доноров собирают в пластиковые пакеты типа "Гемакон", содержащие цитратный стабилизатор. Сразу после сбора кровь центрифугируют при  $2000-100\text{g}$  в течение 40-5 минут при  $+4^{\circ}\text{C}$  с целью отделения плазмы от эритроцитов.

После удаления плазмы собирают верхние 2/3 объема эритроцитарной массы и ресуспендируют в 25 объемах 0,83%  $\text{NH}_4\text{Cl}$  и центрифугируют при 250g в течение 20 минут. Полученный осадок клеток ресуспендируют в 3 объемах 0,80%  $\text{NH}_4\text{Cl}$  и центрифугируют при 150g в течение 20 минут. Полученный осадок лейкоцитов ресуспендируют в питательной среде Игла MEM, содержащей 4% человеческой сыворотки в конечной концентрации  $10^7$  кл/мл. Выход лейкоцитов составляет  $5 \times 10^9$  клеток с 1 литра крови или 80% от их общего содержания в цельной крови. Индукцию и биосинтез интерферона проводят так же как в примере 1.

Абсолютный выход интерферона с 1 литра крови составляет  $12 \times 10^6$  МЕ.

Пример 4.

Кровь от доноров собирают в пластиковые пакеты типа "Гемакон", содержащие цитратный стабилизатор. Сразу после сбора кровь центрифугируют при 2000  $\pm$  100g в течение 40  $\pm$  5 минут при +4°C с целью отделения плазмы от эритроцитов. После удаления плазмы собирают верхние 2/3 объема эритроцитарной массы и ресуспендируют в 50 объемах  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Смесь выдерживают 10 минут при +4°C и центрифугируют при 150g в течение 20 минут. Полученный осадок клеток ресуспендируют в питательной среде Игла MEM, содержащей 4% человеческой сыворотки, в конечной концентрации  $10^7$  кл/мл. Выход лейкоцитов составляет  $4 \times 10^9$  клеток с 1 литра крови или 70% от их содержания в цельной крови. Индукцию и биосинтез интерферона проводят так же как в примере 1.

Абсолютный выход интерферона с 1 литра крови составляет  $8 \times 10^6$  МЕ.

Пример 5

Кровь от доноров собирают в пластиковые пакеты типа "Гемакон", содержащие цитратный стабилизатор. Сразу после отбора кровь центрифугируют при 1500g в течение 90 мин. при 4°C с целью отделения плазмы от эритроцитов. После удаления плазмы собирают верхние 75% объема эритроцитарной массы и ресуспендируют ее в 3 объемах 0,84%  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , выдерживают смесь при +4°C 20 минут и центрифугируют при 250g в течение 20 минут. Полученный осадок лейкоцитов ресуспендируют в 20 объемах 0,84%  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , центрифугируют при 150g в течение 20 минут. Осадок лейкоцитов ресуспендируют в питательной среде до конечной концентрации  $10^7$  кл/мл. Выход лейкоцитов составляет  $3 \times 10^9$  клеток с 1 литра крови или 50% от общего содержания в цельной крови. Индукцию и биосинтез интерферона проводят так же как в примере 1.

Абсолютный выход интерферона с 1 литра крови составляет  $6 \times 10^6$  МЕ.

Пример 6

Кровь от доноров собирают в пластиковые пакеты типа "Гемакон", содержащие цитратный стабилизатор. Сразу после сбора кровь центрифугируют при 5000g в течение 10 минут при 4°C с целью отделения плазмы от эритроцитарной массы. После удаления плазмы собирают верхние 30% объема эритроцитарной массы и ресуспендируют в 3 объемах 0,80%  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , центрифугируют при 250g в течение 20 минут и осадок лейкоцитов ресуспендируют повторно в 10 объемах 0,83%  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Лейкоциты осаждают центрифугированием при 150g в течение 20 минут и ресуспендируют в питательной среде. Выход лейкоцитов с 1 литра крови составляет  $5 \times 10^9$  клеток или 80% от их общего содержания в цельной крови. Индукцию и биосинтез интерферона проводят так же как в примере 1.

Абсолютный выход интерферона с 1 литра крови составляет  $3 \times 10^6$  МЕ.

Предложенный способ позволяет повысить выход целевого продукта до  $10-12 \times 10^6$  МЕ/л крови по сравнению с известным способом  $4 \times 10^6$  МЕ/л крови.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ получения человеческого лейкоцитарного интерферона путем центрифугирования донорской крови, отделения лейкоцитов, гемолиза остаточных

эритроцитов хлористым аммонием, ресуспендирования осадка лейкоцитов в питательной среде Игла, выделения целевого продукта, отличающийся тем, что, с целью повышения выхода целевого продукта, центрифугирование цельной крови осуществляют при 1500-5000g в течение 35-45 минут, отбирают 30-75% объема верхней части лейкоцитсодержащей эритроцитной массы, гемолиз осуществляют 0,80-0,84% раствором хлорида аммония при соотношении 1:(3-50).

Источники информации, принятые во внимание при экспертизе:

1. Аналог-Соловьев В.Д., Бектемиров Г.А. "Интерферон в теории и практике медицины", М., 1970.
2. Прототип In: Human Interferon Kauppinen H.-U., Myllyly" G., - 6, 1978, p. 1-13.

#### Р Е Ф Е Р А Т

#### СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ЛЕЙКОЦИТАРНОГО ИНТЕРФЕРОНА

Настоящее изобретение относится к области промышленной биологии.

Способ получения человеческого лейкоцитарного интерферона состоит в центрифугировании донорской крови, отделении лейкоцитов, гемолизе остаточных эритроцитов хлористым аммонием, ресуспендировании осадка лейкоцитов в питательной среде Игла, выделении целевого продукта. Новым является то, что центрифугирование цельной крови осуществляют при 1500-5000g в течение 35-45 минут; отбирают 30-75% объема верхней части лейкоцитсодержащей эритроцитной массы, гемолиз осуществляют 0,80-0,84% раствором хлорида аммония при соотношении 1:(3-50).

Признано изобретением по результатам экспертизы, осуществленной Государственным Комитетом СССР по делам изобретений и открытий.

## PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob výroby lidského leukocytárního interferonu odstředěním dárcovské krve, oddělením leukocytů hemolýzou zbývajících erytrocytů chloridem amonným, resuspendování usazených leukocytů v živné půdě podle Eagla oddělením cílového produktu, vyznačující se tím, že za účelem zvýšení výtěžku produktu se provede odstředění použité krve při 1500 až 5000 g po dobu 35 až 45 minut odebrání 30 až 75 % objemu vrchní části leukocyty obsahující hmoty erytrocytů, provede se hemolýza 0,80 až 0,84 % roztokem chloridu amonného při poměru 1 : /3 až 50/.