

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

ПЕНЧУК ЮРІЙ МИКОЛАЙОВИЧ

УДК 578.245:577.1113.7:57.086.833

**РОЗРОБКА ТЕХНОЛОГІЇ ІНТЕРФЕРОНІВ І ТИПУ З ВИКОРИСТАННЯМ КОНСТРУКЦІЙНО
ОФОРМЛЕНОЇ ІНДУКТОРНОЇ СИСТЕМИ БАГАТОРАЗОВОЇ ДІЇ**

03.00.20 - біотехнологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата технічних наук

КИЇВ – 2007

Дисертацією є рукопис

Роботу виконано на кафедрі біотехнології мікробного синтезу Національного університету харчових технологій Міністерства освіти і науки України

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор
кафедри біотехнології мікробного синтезу
Карпов Олександр Вікторович,
Національний університет харчових технологій
Міністерства освіти і науки України

Офіційні опоненти: доктор технічних наук,
завідувач відділом біотехнології
Кігель Наталя Федорівна,
Технологічний інститут молока та м'яса
Української академії аграрних наук

доктор біологічних наук професор,
завідувач відділу структури і функції білка
Волков Георгій Леонідович
Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН
України

Провідна установа: Національний університет “Львівська політехніка”
Міністерства освіти і науки України (м. Львів)

Захист дисертації відбудеться “03” липня 2007 р., о 14 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д26.058.03 Національного університету харчових технологій за адресою:
01033, м. Київ-33, вул. Володимирська, 68, корпус А, аудиторія 311.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Національного університету харчових технологій за адресою: 01033, м. Київ-33, вул. Володимирська, 68.

Автореферат розісланий 1 червня 2007 р.

Вчений секретар спеціалізованої
Вченої ради, к.т.н., доцент

Поводзинський В.М.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Технології отримання препаратів інтерферону (ІФН) І типу природного походження, прийняті на вітчизняних фармацевтичних підприємствах, передбачають використання в якості індукторів деяких вірусів, умовно патогенних для людини – вірусу Сендай, вірусу хвороби Ньюкасла тощо. Використання вірусів робить процес отримання ІФН досить небезпечним як для працівників, так і для довкілля в цілому. Тому в даному випадку виникає необхідність знезараження вірусу та додаткова очистка кінцевого препарату, що призводить до значних втрат активності ІФН і збільшення його собівартості. Очевидна і неможливість повторного використання індуктору. Внаслідок перелічених факторів існує нагальна необхідність розробки принципово нової технології отримання препаратів ІФН І типу, що дозволила б суттєво знизити вартість кінцевого продукту, спростити процес його отримання, а також забезпечити багаторазове використання індуктору, позбавити при цьому ризику вірусного зараження виробничий персонал, а також запобігти вірусної контамінації отриманого препарату.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконувалась згідно наукової тематики кафедри біотехнології мікробного синтезу Національного університету харчових технологій, а також у межах проекту Міністерства науки і освіти України: "Встановлення молекулярних механізмів індукції інтерферонів І типу (α/β -інтерферонів) в умовах *in vitro*" 2002–2003 рр., № держреєстрації 0102U000557.

Мета і завдання дослідження. Метою роботи є розробка нової технології отримання препаратів ІФН І типу з використанням комплексної індукторної системи дріжджова РНК-гідрохлорид тилорону, іммобілізованої на нерозчинному носії. Для досягнення заданої мети були поставлені такі завдання:

1. Сконструювати штучні конструкції для здійснення процесу індукції ІФН І типу (α/β -ІФН) в умовах *in vitro* на основі молекулярних комплексів дріжджової РНК, яка ковалентно приєднана до нерозчинних гранулярних матриць, з гідрохлоридом тилорону;
2. Дослідно визначити кількісні та часові параметри синтезу ІФН клітинами-продуцентами під дією контактів з гранулами іммобілізованого молекулярного комплексу (ІММК) в середовищі культивування;
3. Розробити та конструювати установку для одержання ІФН в умовах *in vitro* з використанням моношарових та суспензійних клітинних культур, індукованого за допомогою ІММК;
4. Експериментально оцінити ефективність інтерферогенезу в культурах обох типів під дією ІММК за різних технологічних умов, оптимізація параметрів біосинтезу ІФН в дослідній установці, як прототипі промислової апаратури, з застосуванням ІММК як інтерферогену.

Об'єкт дослідження. В роботі використовувалися об'єкти двох типів: абіотичні – індуктори ІФН І типу та системи культивування, як складові процесу

інтерфероногенезу; а також біотичні – клітини-продуценти ІФН І типу: опорнозалежні – перевивні текстикули поросят (ПТП), фібробластні клітинні лінії (L-41, L-929) та суспензійні – лейкоцити, виділені з периферичної крові людини.

Предмет дослідження. Аналіз інтерфероногенних та технологічних властивостей ІММК та його компонентів в умовах використання в технологічній установці для отримання ІФН І типу за допомогою моношарових та суспензійних клітинних культур клітин.

Методи дослідження. Експериментальні результати роботи отримані за допомогою традиційних та сучасних фізико-хімічних, імунологічних, вірусологічних, біохімічних, технологічних та статистичних методів.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше науково обґрунтована та експериментально доведена здатність створених комплексних іммобілізованих на гранулах нерозчинних носіїв індукторів ІФН на основі молекулярних комплексів дріжджова РНК-гідрохлорид тилорону до інтерфероногенезу в умовах *in vitro*. На основі дослідження інтерфероногенних властивостей ІММК в моношарових та суспензійних культурах еукаріотичних клітин встановлено, що найвищого рівня продукція ІФН лейкоцитами крові людини досягає на 10 год, ПТП – через 4 год, L-41 – через 3 год, а L-929 – через 5 год. Доведено факт збереження індукторних властивостей ІММК при багаторазовому використанні з наступною регенерацією впродовж шести промислових циклів. Визначено оптимальні біотехнологічні параметри і режими культивування клітин-продуцентів та подальшої продукції ІФН І типу в напівпромислових умовах з використанням гранул ІММК як індуктора: оберти валу на рівні 5 об/год, температура культивування 37°C, вміст сироватки великої рогатої худоби на рівні 20%.

Практичне значення одержаних результатів. Розроблено технологію одержання препаратів ІФН І типу з використанням індукторної системи, що включає в себе ковалентно закріплений на поверхні нерозчинного носія молекулярний комплекс дріжджова РНК-гідрохлорид тилорону, яка може бути реалізована на підприємствах, спрямованих на випуск лейкоцитарного ІФН.

Показано можливість використання розробленої індукторної системи впродовж шести промислових циклів та можливість отримувати титри ІФН І типу на рівні промислових, які мають місце при застосуванні стандартних індукторів.

Створена керована комп'ютером установка для препаративного отримання ІФН з використанням ІММК, як інтерфероногенів, яка може слугувати прототипом промислової апаратури для виробництва препаратів ІФН.

Проведено дослідно-промислові випробування розробленої технології на підприємстві ВАТ „Біолік” (м. Харків).

Основні положення дисертаційної роботи включені в програму лекцій і практичних занять спецкурсів кафедри біотехнології мікробного синтезу НУХТ, відображені у відповідних методичних рекомендаціях.

Особистий внесок здобувача. Особистий внесок здобувача полягає у

визначенні актуальності та ступеню вивчення проблеми, виконанні методик експериментальних досліджень. Особисто дисертантом проведений статистичний аналіз результатів досліджень, написані всі розділи дисертації, зроблені висновки.

Визначення інтерфероногенної здатності створених індукторних систем проводили у відділі проблем інтерферону та імуномодуляторів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, спільно з к.б.н. Н.М. Жолобак та аспірантом кафедри біотехнології мікробного синтезу, Національного університету харчових технологій Манджосом О.П. Розробка технології та конструювання установки для інтерфероногенезу проводили спільно з доцентом кафедри біотехнології мікробного синтезу, Національного університету харчових технологій Поводзинським В.М. Імобілізацію полірибонуклеотидів проведено у відділі структури і функції білка Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України спільно з провідним науковим співробітником. д.б.н. С.В. Верьовкою, який є співавтором робіт. Величини ζ -потенціалів індукторних систем та клітин продуцентів визначали спільно з співробітниками Інституту біоколоїдної хімії ім. Ф.Д. Овчаренка НАН України к.х.н. Марочко Л.Г. та к.х.н. Бойко Ю.П. Здобувач брав безпосередню участь у розробці у написанні наукових статей та патентів.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертаційної роботи були представлені на Міжнародній конференції “Стратегія і тактика боротьби з інфекційними захворюваннями” (Харків 2001), Міжнародній науково-практичній конференції „Нові технології отримання і застосування біологічно активних речовин” (Алушта, 2002), III Міжнародній науково-практичній конференції „Наука і соціальні проблеми суспільства: медицина, фармація, біотехнологія” (Харків, 2003), 7-й Пушинській школі-конференції молодих вчених „Біологія – наука ХХІ століття” (Пушино, 2003), IV Міжнародній конференції „Біоресурси і віруси” (Київ, 2004), II Всеукраїнській науково-практичній конференції „Біотехнологія. Освіта. Наука.” (Львів, 2004), X з’їзді Товариства мікробіологів України (Одеса, 2004), IX міжнародній науково-технічній конференції “Нові технології та технічні рішення в харчовій та переробній промисловості: сьогодення і перспективи”, (Київ, 2005), III Всеукраїнській науково-практичній конференції „Біотехнологія. Освіта. Наука. Практика” (Харків, 2006).

Матеріали дисертації були включені до роботи «Розробка нової технології інтерферону», за яку присуджено премію Президента України для молодих вчених 2006 року (Указ №1083/2006 від 16.12.2006 р.).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 19 наукових робіт, із них 3 статті у фахових виданнях, тези 10 наукових конференцій та отримано 5 деклараційних патентів України.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота викладена на 115 сторінках машинописного тексту, ілюстрована 23 рисунками і 11 таблицями, складається зі вступу, огляду літератури, розділів: матеріали та методи досліджень, результати досліджень, аналізу і узагальнення отриманих даних, висновку і списку літературних джерел. У списку міститься 220 літературних

джерел, із них 69 вітчизняних та 151 іноземних.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У **Вступі** зазначено актуальність вибраного напряму досліджень, зв'язок із науковими програмами, сформульовано мету і завдання досліджень, визначено наукову новизну та практичну цінність результатів дисертаційної роботи, наведено відомості стосовно особистого внеску автора, апробації результатів дисертації, обсягу роботи.

У першому розділі **“Огляд літератури”** наведена загальна характеристика інтерферонів, здійснений детальний аналіз структурно-функціональних властивостей відомих індукторів інтерферонів І типу за критеріями функціональної активності та технологічності, а також викладені відомості щодо клітин-продуцентів ІФН, їх культивування в промислових умовах. Окремо розглянуті питання апаратурного оформлення біосинтезу біологічно-активних сполук культурами клітин *in vitro* та принципи дії обладнання, що при цьому використовується.

В другому розділі **“Матеріали та методи досліджень”** наведено характеристику об'єктів, опис апаратури та методів, якими користувалися при виконанні дисертаційної роботи.

В роботі досліджувалися об'єкти двох типів: біотичні – клітини-продуценти ІФН І типу, та абіотичні – системи культивування і складові процесу інтерфероногенезу. В якості індукторів ІФН І типу використовувались інтерфероногенні молекулярні комплекси, у яких поліуклеотидна складова ковалентно з'єднувалася з гранулярним нерозчинним носієм (ІММК). Компонентами ІММК слугували дріжджова РНК (НПО “Біохімреактив“, Олайна, Латвія) та гідрохлорид тилорону (“Sigma”, США). Індукторами порівняння в досліджах слугували вільні молекулярні комплекси дріжджова РНК-тилорон (МК), вільний гідрохлорид тилорону, а також як вільні, так і іммобілізовані на тих же гранулярних носіях ридостин (дволанцюгова РНК (длРНК) дріжджів *S. cerevisiae*, НПО “Вектор”, Росія) та *poly(I)-poly(C)* (“Calbiochem”, США). Як нерозчинні гранулярні носії для ковалентного зв'язування поліуклеотидних компонентів індукторів ІФН використовувалися Сефадекс (Sephadex G-50 Medium 50-150 μm “Pharmacia”, Швеція), Сефароза (Sephарозе 4В, 60-140 μm , “Pharmacia”) та Сферон (Spheron 300 (LC) 63-100 μm “Lachema”, Чехія).

В основі дії створеної авторами дослідної установки для культивування клітин-продуцентів ІФН з використанням ІММК у якості інтерфероногену покладений принцип роллерного перемішування горизонтально закріплених ємностей для культивування. Установка конструювалася як універсальна, в розумінні можливості культивувати як моношарові, так і суспензійні культури (рис.1).



Рис. 1. Схема дослідної роллерної установки для культивування клітин та біосинтезу ІФН

Установка зібрана на базі редукційного електродвигуна з максимальною швидкістю обертання валу 60 об/год. Як датчик температури використовувався термометр опору ТСП-5071 (Росія), а як датчик обертів – магнітний датчик VDO 804/6/10 (Чехія). Точність підтримання температури підтримували в межах $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$, а швидкість обертів валу – $\pm 0,1$ об/год від заданої швидкості. Установка оснащена електронним блоком керування на базі двох мікроконтролерів. Зв'язок блоку керування з комп'ютером здійснювали через COM-порт за допомогою інтерфейсного блоку, зібраного на базі мікросхеми MAX 233. Контроль за технологічним процесом та введення дослідних параметрів культивування здійснювалося комп'ютером за допомогою програми BioTech v.1, розробленої спеціально для виконання даної роботи.

Визначення біологічних властивостей індукторів ІФН, в умовах *in vitro*, проводили з використанням перещеплюваної лінії клітин тестикул поросят (ПТП) (НДІ ветеринарії УААН), та фібробластів мишей L-41 і L-929 (Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології НАН України ім. Р.Є. Кавецького) (моделі моношарової культури). Первинні культури лейкоцитів (мононуклеарів) людини I(0) групи використовували як моделі суспензійної культури.

Життєздатність клітин визначали методом виключення барвника живими клітинами при фарбуванні 0,1% розчином трипанового синього (Doyle , Griffiths, 1998).

Для визначення кількості індукованого ІФН використовували вірус везикулярного стоматиту (ВВС) штам Індіана, отриманий з музею НДІ епідеміології і мікробіології ім. Н.Ф. Гамалеї, Росія. Титрування ІФН у зразках проводили згідно стандартної методики (Соловьев, Бектемиров, 1981).

Активність препаратів ІФН розраховували у логарифмічному значенні – $\log_2$ (кількість дворазових розведень досліджуваного зразка), або стандартних міжнародних одиницях – МО/мл.

Усі досліді проводили у трьох та більше повторностях. Статистичну обробку результатів експериментів здійснювали за спеціальними комп'ютерними програмами для персональних ЕОМ. Графічну обробку результатів проводили за допомогою програм Microsoft Excel XP та Harvard Chart XL for Windows XP.

У третьому розділі “**Результати та їх обговорення**” наведені результати власних досліджень відносно створення ІММК з використанням різних за фізико-хімічними характеристиками гранулярних компонентів та полірибонуклеотидів з різною вторинною структурою, вивчення їх фізичних та інтерферогенних властивостей, впливу на життєдіяльність клітин-продуцентів, а також технологічних параметрів розробленої установки для культивування клітин в умовах дії на них часток ІММК.

Відомості щодо вмісту нуклеїнового компоненту, ковалентно приєднаного до гранул різних носіїв, у складі створених нами препаратів ІММК, наведені в табл. 1.

Таблиця 1

Вміст полірибонуклеотидів у препаратах ІММК*

Носій	Розмір часток (мкм)	Ридостин мкг/г	<i>poly(I)-poly(C)</i> мкг/г	Дріжджова РНК, мкг/г
Сефадекс G-50	50-150	22,2±1,6	21,7±3,9	24,6±1,2
Сефароза 4В	60-140	27,1±3,1	26,8±3,6	29,3±2,3
Сферон 300	63-100	30,0±3,5	28,7±3,1	31,8±2,6

* - вміст рибополінуклеотидів визначали при першому циклі використання ІММК; дані 4 дослідів

Вміст іммобілізованих рибополінуклеотидів у препаратах ІММК виявився принаймні на 2-3 порядки меншим за традиційної іммобілізації білків, здатних до інкорпорації в сітчасту структуру гранули. Кількість приєднаних полінуклеотидів у всіх випадках була більшою на гранулах Сферону 300. Хімізм процесу активації всіх трьох нерозчинних носіїв виявився практично ідентичним. При цьому відмічається, що завдяки більш вільній орієнтації полінуклеотиду, ковалентно закріпленого на носіях типу сферонів, у порівнянні з іншими, приєднання здійснюється більш повно і не впливає на реакції, яким цей полінуклеотид піддають далі.

Характерна для іммобілізованих полінуклеотидів молекулярна маса (порядку 150-300 баз для дріжджової РНК, 200-800 баз для ридостину та 300-700 баз для *poly(I)-poly(C)*) практично виключала інкорпорацію лігандів всередину гранули, обмежуючи ковалентну кон'югацію зовнішньою поверхнею останньої. Стосовно до мети дослідження – створення контактного індуктора ІФН, подібне обмеження аж ніяк не є вадой, оскільки саме іммобілізовані на поверхні гранули

молекули мають вступати в контакт з клітинами-продуцентами. Слід також відмітити, що дріжджова РНК приєднувалася до носіїв більш ефективно, ніж інші полінуклеотиди, що, можливо, є відображенням структурних відмінностей вказаних полімерів.

Визначення ζ -потенціалів, що визначають заряди поверхні індукторних систем та клітин-продуцентів, характеризує ступінь контакту між ними, потрібний для початку процесу індукції, а в подальшому біосинтезу ІФН, тому проводили дослідження зарядових характеристик контактуючих часток у середовищі культивування. Отримані дані наведені нижче.

Об'єкт	ζ -потенціал, мV
Сферон 300	-1,68
Сферон 300 – РНК	-3,9
Сферон 300 – ридостин	-4,6
Сферон 300 – <i>poly(I)-poly(C)</i>	-5,2
Мононуклеари	-13,5

З наведених даних видно, що найбільша різниця ζ -потенціалів, і таким чином найвірогідніший контакт поверхонь часток у розчині, спостерігався у випадку пари мононуклеари/Сферон 300. По мірі зменшення величини ζ -потенціалів найсуттєвіша різниця між ними спостерігається у випадку системи Сферону 300 з іммобілізованою на його поверхні РНК – (-9,6 мВ), а найменша – у випадку системи Сферон 300 – *poly(I)-poly(C)* – (-8,1 мВ).

Головним питанням даного дослідження було питання щодо можливості длРНК, іммобілізованої на нерозчинних гранулярних носіях, індукувати синтез ІФН в клітинах (рис.2).

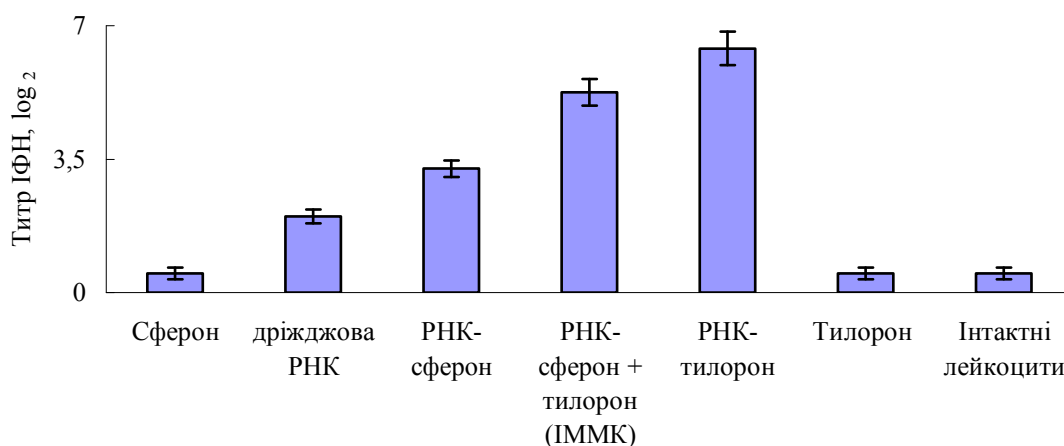


Рис. 2. Інтерферогенна дія ІММК на основі Сферону 300 та його окремих компонентів, на лейкоцитах.

В той час, як контакт лейкоцитів з Сфероном 300 і тилороном, які брали самі по собі, практично не приводила до появи ІФН, ІММК, на відміну від вказаних його компонентів, викликав індукцію синтезу ІФН. Достатньо велику індукторну дію викликав іммобілізований препарат олРНК у порівнянні з його неіммобілізованою формою, що можна пояснити утворенням достатньо великої кількості дволанцюгових структур у складі дріжджової олРНК у процесі її іммобілізації на Сферон. У випадку ж подальшого комплексоутворення нуклеїнового компонента такої іммобілізованої конструкції з тилороном (препарат ІММК) індукторний ефект ще більш підвищувався. Це свідчило щодо утворення в структурі іммобілізованої олРНК додаткових дволанцюгових фрагментів, здатних забезпечувати інтерферогенну дію.

У випадку моношарових культур найбільш ефективними індукторами теж виявилися ІММК на основі комплексу дріжджова РНК-тилорон, причому найефективнішим носієм був Сферон 300 (табл. 2). При іммобілізації з цим носієм інтерферогенна ефективність різних полінуклеотидних компонентів ІММК розподілялася у ряду: дріжджова РНК-тилорон > *poly(I)-poly(C)* > ридостин ($p < 0,05$), що в цілому співпадає з літературними даними.

Таблиця 2

Інтерферогенна дія різних ІММК в умовах культивування моношарових культур клітин*

Тип ІММК	Кількість індукованого ІФН, МО/10 ⁶ клітин		
	ПТП	L-41	L-929
Сефадекс G-50 + дріжджова РНК-тилорон	195±9	143±8	100±3
Сефадекс G-50 + ридостин	195±9	50±2	5±0,2
Сефадекс G-50 + <i>poly(I)-poly(C)</i>	300±8	200±7	125±5
Сефароза 4В + дріжджова РНК-тилорон	195±9	100±5	97±4
Сефароза 4В + ридостин	26±1	17±0,5	20±0,5
Сефароза 4В + <i>poly(I)-poly(C)</i>	250±12	136±6	130±6
Сферон 300 + дріжджова РНК-тилорон	550±27	317±15	390±13
Сферон 300 + ридостин	275±14	234±11	170±7
Сферон 300 + <i>poly(I)-poly(C)</i>	456±10	290±8	230±10

*титри індукованого ІФН визначали на першому циклі використання ІММК; дані 4 дослідів

Ефективність інтерферогенезу, що здійснювалася іммобілізованими полінуклеотидними індукторами у всіх трьох моношарових клітинних культурах, виявилася практично рівною ефективності тих же індукторів у розчинній формі (табл.3).

Таблиця 3

**Рівні інтерферогенезу в моношарових та суспензійній культурах клітин
під дією розчинних та іммобілізованих індукторів полінуклеотидної
природи***

Індуктори	Титри індукованого ІФН, (log ₂)			
	L929	L41	ПТП	Лейкоцити
Ридостин	3,8±0,19	3,3±0,16	4,8±0,24	3,7±0,18
<i>poly(I)-poly(C)</i>	3,7±0,19	4,6±0,23	3,5±0,17	5,7±0,28
Дріжджова РНК-тилорон	4,0±0,20	3,6±0,18	3,6±0,18	6,4±0,32
Ридостин іммоб.	4,8±0,24	3,5±0,17	4,9±0,25	3,4±0,17
<i>poly(I)-poly(C)</i> іммоб.	2,8±0,14	3,2±0,16	3,8±0,19	5,9±0,29
Дріжджова РНК-тилорон іммоб.	2,23±0,11	2,7±0,13	3,5±0,17	5,25±0,26
Контроль	0,16±0,02	0,15±0,03	0,17±0,02	0,17±0,02

* зазначення ті ж, що і у табл. 3.

Найбільшу ефективність як в іммобілізованій, так і у розчинній формах, виявили *poly(I)-poly(C)* та молекулярний комплекс дріжджова РНК-тилорон. При цьому концентрація індукторів (у випадку ІММК – концентрація полінуклеотидного компоненту) відповідала рекомендованій (Ершов, Новохатский, 1980).

Найвищого рівня продукція ІФН у випадку культури ПТП досягає приблизно через 4 години від початку дії ІММК, L-41 – через 3 години, а L929 – через 5 годин. У випадку суспензійної культури (лейкоцити крові людини) цей показник набуває найбільшого значення на 10 годину від початку дії цього індуктора.

З метою встановлення, до якого типу належить ІФН, який індукується в клітинах під дією ІММК, зразки культуральної рідини після визначення в них титру ІФН, піддавали дії фізичних факторів (інкубації при 60°C упродовж 30 хв, а також підкисленню до рН 2,0 упродовж 24 год). При цьому титри ІФН під дією фізичних факторів достовірно не змінювалися ($P > 0,05$). Це прямо свідчить про те, що ІФН, який індукується в цьому випадку, внаслідок його кислото- та термостабільності, можна віднести до ІФН I типу (α/β - ІФН).

Результати дослідження можливості багаторазового використання ІММК з наступною регенерацією наведені на рис. 3. Як видно, зі збільшенням кількості циклів регенерації досить суттєво (~40%) знижується кількість РНК, зв'язаної зі Сфероном 300. Найбільш вірогідно це пояснюється дією різноманітних нуклеаз,

присутніх у середовищі з клітинами. Зі зниженням цього параметра зменшується і здатність ІММК індукувати ІФН. Слід додати, що багаторазове використання і наступна очистка ІММК від клітин і клітинних фрагментів приводила до деякої втрати загального об'єму цих іммобілізованих конструкцій (~10–20%), що також знижувало загальний інтерферогенний ефект ІММК.

Однак сама можливість багаторазового використання ІММК як індукторів у технології широкомасштабного виробництва препаратів ІФН І типу вважається безсумнівною перевагою у порівнянні з їх розчинними прототипами.

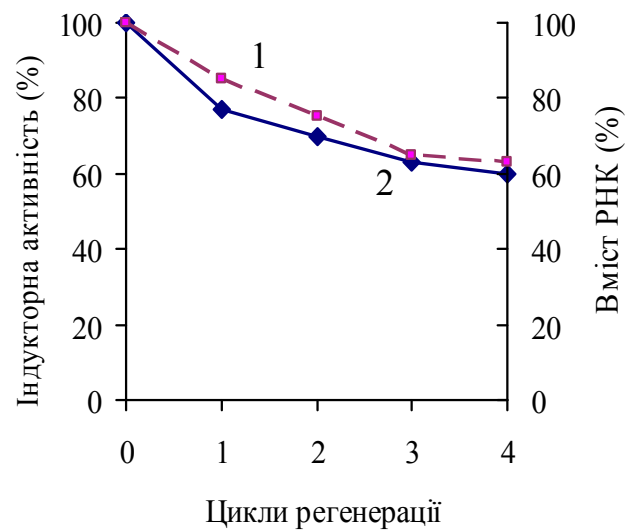


Рис.3. Зміна параметрів ІММК залежно від кількості циклів регенерації.
1 – індукторна активність ІММК;
2 – вміст РНК.

Головним питанням даної роботи була оцінка ефективності культивування клітин і біосинтезу ІФН в дослідній установці у порівнянні зі стаціонарними умовами культивування.

Як видно з наведених даних (рис. 4), культивування в дослідній установці суттєво сприяє збереженню життєздатності клітин-продуцентів, по відношенню до стаціонарних умов.

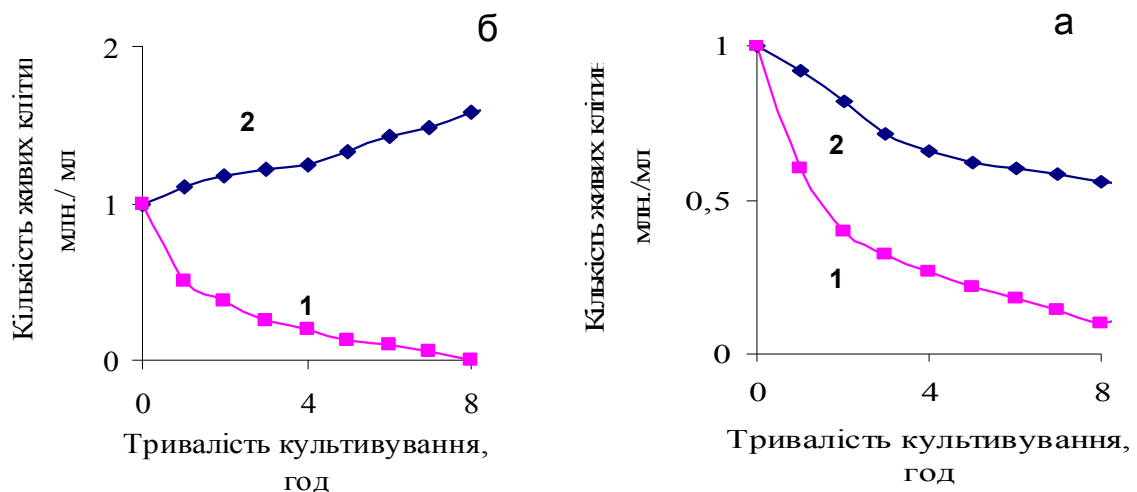


Рис. 4. Вплив умов культивування клітин-продуцентів ІФН з ІММК на життєздатність клітин: а – суспензійна культура, б – моношарова культура.
1 – стаціонарні умови, 2 – культивування в дослідній установці.

Так, у випадку суспензійної культури моноклеарних клітин крові людини (рис. 4а) на 8 год культивування в стаціонарних умовах кількість клітин зменшилася – майже у 4 рази, порівняно з культивуванням в дослідній установці. У випадку моношарової культури (рис. 4б) кількість клітин збільшувалася при культивуванні в установці приблизно в 1,7 рази, а в стаціонарних умовах на 8 годину культивування спостерігалася повна загибель клітин.

Дані щодо кількості ІФН, синтезованого вказаними клітинами-продуцентами в дослідних умовах, підтверджують попередній висновок (рис.5). У випадку обох досліджуваних типів культур клітин культивування в установці приводило до накопичення ІФН у значно більш високих титрах, ніж за стаціонарних умов.

Для оптимізації біосинтезу ІФН при використанні ІММК у якості індуктору надзвичайно важливим є попередній дослідний підбір оптимального для інтерферогенезу співвідношення кількості клітин-продуцентів до часток ІММК.

Результати такого підбору для конкретних ємностей для культивування з зазначеними об'ємними параметрами, які ми використовували (об'єм – 15 мл, внутрішня поверхня – 28 см², коефіцієнт заповнення – 0,7), наведені на рис. 6.

Як видно, присутність часток ІММК в середовищі культивування у кількостях, перевищуючих кількість культивованих клітин (10/1), негативно впливає як на їх життєздатність (рис. 6а), так і спроможність до інтерферогенезу (рис. 6б). Це, можливо, пояснюється надлишком контактів між клітинами та частками ІММК з відповідними незворотними порушеннями структури клітинних мембран. При цьому слід відмітити, що частки Сферону 300, на основі якого був створений ІММК, у набухлому стані мають об'єм 10⁻¹¹ см³, що практично на порядок перевищує об'єм середньої еукаріотичної клітини, і тому потенційно спроможні не тільки завдавати механічні пошкодження клітинам, але і пасивно перешкоджати трансмембранному проходженню іонів та субстратів до клітини.

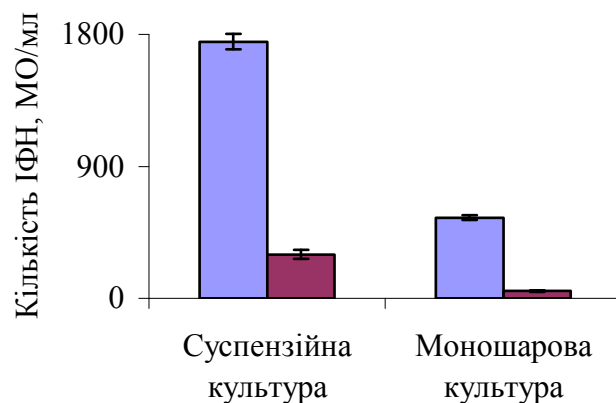


Рис.5. Вплив умов культивування клітин-продуцентів ІФН з ІММК на кількість синтезованого ІФН.

■- культивування в дослідній установці;
■- стаціонарні умови культивування.

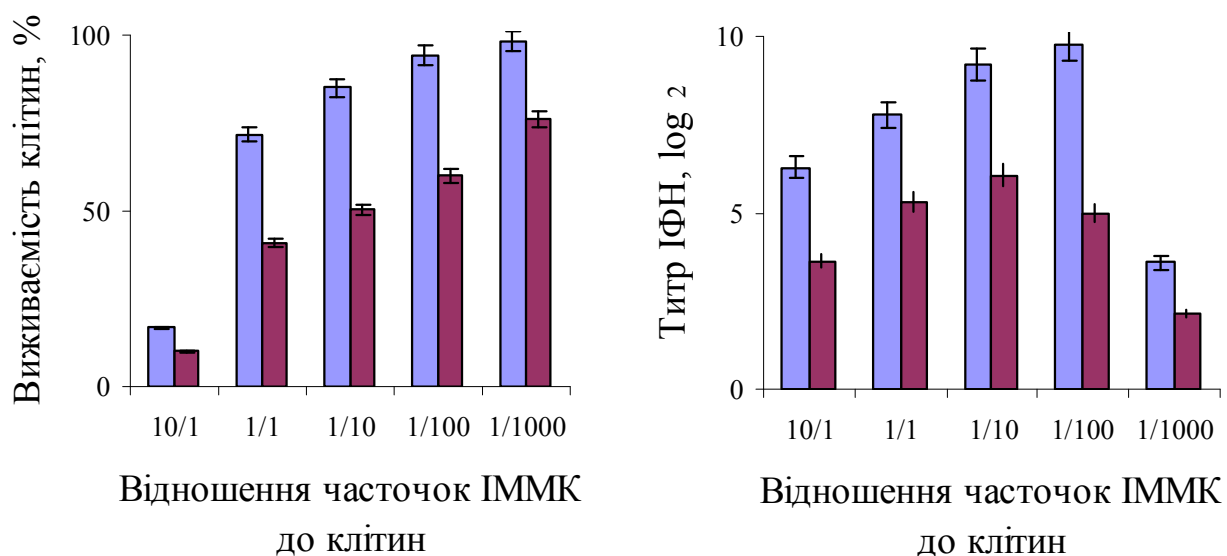


Рис. 6. Залежність життєздатності клітин (а) та виходу синтезованого ІФН (б) від співвідношення часток ІММК до клітин у ємностях для культивування: ■ – суспензійна культура, ■ – моношарова культура (ПТП).

Поряд з вирішальними факторами забезпечення життєдіяльності клітин ссавців, до яких звичайно відносять оптимальний температурний режим та рівень рН середовища, велике значення при культивуванні *in vitro* мають умови, пов'язані з рухом середовища. В роботі визначені оптимальні для культивування клітин швидкості перемішування культурального середовища для кожної з культур у певні фізіологічно важливі періоди культивування (у межах 7 об/год та 5 об/год, відповідно). Дослідно встановлені також оптимальні величини співвідношення кількості часток ІММК та клітин-продуцентів в середовищі культивування 1/100, початкової концентрації клітин в ємностях біореактора на рівні 10^6 - 10^7 кл/мл середовища, а також оптимального вмісту сироватки великої рогатої худоби у живильному середовищі при культивуванні клітин моношарових та суспензійної культур 15-25 %.

Розроблено апаратурну схему отримання ІФН І типу з суспензійної (лейкоцитів) та моношарових культур клітин з використанням ІММК у якості індуктора (рис.7). У випадку суспензійної культури лейкоцитарна маса з донорської крові потрапляє до холодильника Х-1, де зберігається до моменту введення в виробничий цикл. Після подачі до реактору Р-1, туди ж подається розчин версену, що руйнує домішок еритроцитів. Отримана суспензія розділяється на центрифугі Ц-3, з якої очищена лейкомаса подається в термостатовану шафу Т-4, в якій розташована установка для культивування 3-5. Туди ж додається суспензія ІММК та живильне середовище 199. Індукція ІФН проходить протягом 12 год при температурі 36,5 °С та швидкості обертів валу 7 об/год.

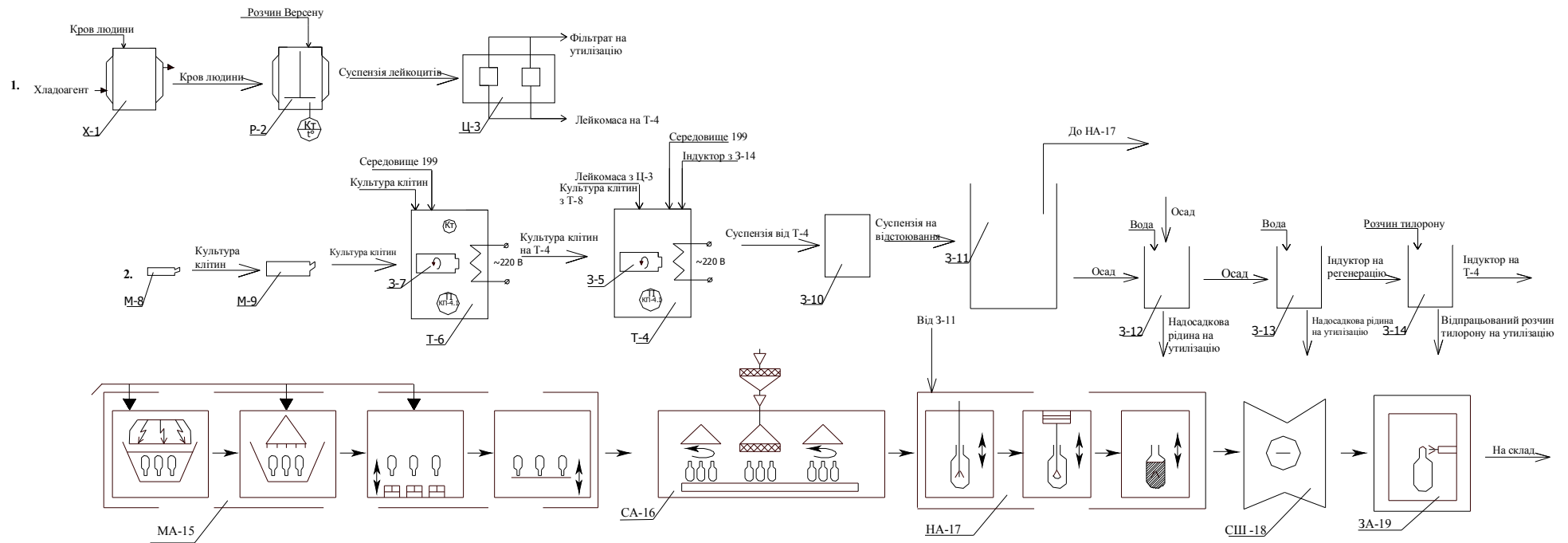


Рис. 7. Апаратурна схема отримання інтерферону І типу з лейкоцитів (1) та культур клітин (2) з використанням іммобілізованої індукторної системи багаторазової дії.

Обладнання: Х-1 – холодильник; Р-2 – реактор; Ц-3 – центрифуга; Т-4, Т-8 – термостатовані шафи; 3-5, 3-7 – ємності для культивування; М-8, М-9 – матраци для вирощування культур клітин; 3-10, 3-11, 3-12, 3-13, 3-14 – збірники; МА-15 – мийка ампул; СА-16 – сушіння ампул; НА-17 – наповнення ампул; СШ-18 – сублімаційна сушарка; ЗА-19 – запаювання ампул.

У разі використання в якості продуцентів ІФН моношарових клітинних ліній здійснюється їх попереднє підрощення на матрацах М-8 та М-9, після чого культура разом з живильним середовищем 199 подається для другого підрощення в установці для культивування 3-7, розташованій у термостатованій шафі Т-8. Після підрощення, яке триває 24 год. здійснюється заміна поживного середовища на свіже та внесення суспензії ІММК з 3-15. Процес індукції відбувається впродовж 12 годин при температурі 36,5 °С та швидкості обертів валу 5 об/год.

Після індукції клітинна суспензія з ІММК у живильному середовищі передається в збірник 3-10, а потім на відстоювання 3-11, де відбувається відділення розчину ІФН від часток ІММК. Отриманий розчин ІФН передається на стадію НА-17, де відбувається наповнення ампул та сушіння в сублімаційній сушарці СШ-18. Частки відпрацьованого ІММК передаються в збірники 3-12 та 3-13, де здійснюється дворазове відмивання від залишків клітинного матеріалу водою. Потім завис відмитого ІММК передається на регенераційну обробку розчином тилорону в 3-14, після чого ІММК знову використовується в промисловому циклі як індуктор.

ВИСНОВКИ

1. Розроблено технологію одержання препаратів інтерферону І типу з використанням іммобілізованого молекулярного комплексу (ІММК) у якості індуктору, яка дає змогу використовувати ІММК впродовж шести циклів інтерферогенезу.
2. Сконструйовано штучні конструкції для здійснення процесу індукції ІФН І типу (α/β -ІФН) в умовах *in vitro* на основі молекулярних комплексів дріжджової РНК, яка ковалентно приєднана до нерозчинних гранулярних матриць, з гідрохлоридом тилорону. Показана інтерферогенна здатність таких конструкцій, вивчена динаміка синтезу індукованого ними ІФН і доведена його належність до ІФН І типу (α/β -ІФН).
3. Досліджено значення величин ζ -потенціалів індукторних систем на основі Сферону 300 та лейкоцитів: (-3,9 mV) – Сферон 300-РНК; (-4,6 mV) – Сферон 300-ридостин; (-5,2 mV) – Сферон 300-*poli(I)-poli(C)*; лейкоцити (-13,5 mV)
4. Встановлено, що вміст іммобілізованих рибополінуклеотидів в отриманих індукторних системах становить (мкг/г): на основі Сферону 300 (РНК – $31,8 \pm 2,6$, ридостин – 30 ± 2 , *poli(I)-poli(C)* – $28,7 \pm 3$); на основі Сефадексу G-50 (РНК – $24,6 \pm 1,2$, ридостин – $22,2 \pm 1,6$, *poli(I)-poli(C)* – $21,7 \pm 3,9$); на основі Сефарози 4В (РНК – $29,3 \pm 2$, ридостин – $27,1 \pm 3$, *poli(I)-poli(C)* – $26,8 \pm 3,9$).
5. Визначено кількісні та часові параметри синтезу ІФН клітинами-продуцентами суспензійної та моношарових культур під дією контактів з гранулами ІММК в середовищі культивування. Встановлено, що найвищого рівня продукція ІФН лейкоцитами крові людини досягає на 10 год, ПТП – через 4 год, L-41 – через 3 год, а L-929 – через 5 год.
6. Розроблено і сконструйовано дослідну установку, яка може слугувати прототипом промислової апаратури при одержанні ІФН в умовах *in vitro* індукованого за допомогою ІММК з застосуванням моношарових та суспензійних клітинних культур.
7. Експериментально оцінено ефективність та проведено підбір технологічних параметрів інтерферогенезу в культурах обох типів під дією ІММК. Встановлено, що оптимальними параметрами інтерферогенезу є швидкість обертів валу 5 об/год, вміст сироватки великої рогатої худоби 17 %, співвідношення клітин-продуцентів до часточок індуктору 100 до 1.
8. Розроблено апаратурно-технологічну схему отримання інтерферону І типу для обох типів досліджених культур з використанням іммобілізованої індукторної системи багаторазової дії.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Карпов О.В., Жолобак Н.М., Манджос О.П., Пенчук Ю.М., Співак М.Я. Вивчення зв'язку структура-активність в ряду лігандів інтерфероніндукуючих молекулярних комплексів з одноланцюговою РНК. // Вісник Київського нац. університету ім. Тараса Шевченка. Біологія - 2001 - Вип. 35 - С.25-28.

(Здобувачем було самостійно проведено створення молекулярних комплексів та перевірка їх індукторної здатності).

2. Карпов О.В., Верьовка С.В., Манджос О.П., Пенчук Ю.М., Поводзинський В.М., Жолобак Н.М., Співак М.Я., Кисельова О.К. Індукція інтерферонів І типу в умовах *in vitro* за допомогою іммобілізованого комплексного інтерфероногену. // Доп. НАН України - 2003 - №9 - С.178-181. (Здобувачем було самостійно визначений час, за який відбувається максимальне накопичення інтерферону в культурі клітин, та здійснено підбір оптимальних параметрів біосинтезу).

3. Пенчук Ю.М., Поводзинський В.М., Карпов О.В. Конструювання та випробування іммобілізованого комплексного індуктору $\alpha\beta$ -інтерферонів. // Укр. журн. мед. техн. технол. – 2005 – №3-4 – С.80-84. (Здобувачем було самостійно проведено перевірку здатності створеного комплексу індукувати біосинтез інтерферону упродовж кількох промислових циклів без суттєвої втрати активності).

4. Карпов А.В., Пенчук Ю.Н., Верева С.В. Применение иммобилизованных индукторов в технологии получения природных интерферонов I типа в культурах клеток. Использование гранулярных носителей. // Биотехнология – 2006 - №1 – С.30-35. (Здобувачем було самостійно сконструйовано установку для біосинтезу інтерферону та розроблено технологію інтерферонів з використанням іммобілізованих комплексних індукторів).

5. Деклараційний патент UA 70637A, A61K38/21. Індуктор інтерферону першого типу в культурах клітин. / О.В. Карпов, В.М. Поводзинський, Ю.М. Пенчук, Н.М. Жолобак, С.В. Верьовка. - Опубл. 15.10.2004. Бюл. № 10. (Здобувачем було самостійно створено гранулярний молекулярний комплекс для індукції інтерферону).

6. Деклараційний патент UA 70638A, A61K38/21. Спосіб одержання інтерферону першого типу. / О.В. Карпов, В.М. Поводзинський, Ю.М. Пенчук, Н.М. Жолобак, С.В. Верьовка. - Опубл. 15.10.2004. Бюл. № 10. (Здобувачем було проведено підбір технологічних параметрів біосинтезу інтерферону).

7. Деклараційний патент UA 71280A, A61K38/21. Спосіб одержання інтерферону першого типу. / О.В. Карпов, В.М. Поводзинський, Ю.М. Пенчук, Н.М. Жолобак, С.В. Верьовка. - Опубл. 15.11.2004. Бюл. № 11. (Здобувачем було проведено перевірку технології одержання інтерферону в умовах *in vitro* з комплексним індуктором).

8. Деклараційний патент UA 71281A, A61K38/21. Індуктор інтерферону першого типу в культурах клітин. / О.В. Карпов, В.М. Поводзинський, Ю.М. Пенчук, Н.М. Жолобак, С.В. Верьовка. - Опубл. 15.11.2004. Бюл. № 11. (Здобувачем було самостійно створено плівковий молекулярний комплекс для індукції інтерферону).

9. Деклараційний патент UA 71282A, C12M1/04. Апарат для вирощування клітин. / О.В. Карпов, В.М. Поводзинський, Ю.М. Пенчук, Н.М. Жолобак, С.В.

Верьовка. - Оpubл. 15.11.2004. Бюл. № 11. (Здобувачем було сконструйовано та перевірено установку для культивування клітин).

10. Карпов А.В., Жолобак Н.М., Манджос А.П., Пенчук Ю.М., Спивак Н.Я. Изучение связи “структура-активность” в ряду лигандов интерферониндуцирующих молекулярных комплексов с одонитевой РНК. // Тезисы Международной конференции “Стратегия и тактика борьбы с инфекционными заболеваниями”, Харьков, 23-24 октября 2001 - Анали Мечниковського інституту - №1 - С. 68.

11. Манджос А.П., Пенчук Ю.Н., Карпов А.В. Интерферон-индуцирующее действие иммобилизованной дрожжевой РНК в комплексе с тилороном. // Тезисы Международной научно-практической конференции “Новые технологии получения и применения биологически активных веществ”, Алушта, 20-25 мая 2002 - С.117.

12. Пенчук Ю.Н., Поводзинский В.Н., Карпов А.В. Биоинженерные аспекты технологии интерферонов первого типа полученных при использовании иммобилизованного индуктора. // Тезисы 7-ой Пущинской школы-конференции молодых ученых “Биология – наука XXI века”, 14-18 апреля 2003, г. Пущино, С.122.

13. Поводзинський В.М., Пенчук Ю.М., Верьовка С.В., Карпов О.В. Застосування індукторних конструкцій на основі іммобілізованого молекулярного комплексу для одержання інтерферонів I типу. // Тези III Міжнародної науково-практичної конференції “Наука і соціальні проблеми суспільства: медицина, фармація, біотехнологія”, 21-23 травня 2003 р., м. Харків, Частина II, С.278.

14. Пенчук Ю.М., Поводзинський В.М., Карпов О.В. Установка для препаративного одержання інтерферонів першого типу за допомогою індукторної системи багаторазової дії. // Тези доповідей X з'їзду Товариства мікробіологів України, Одеса, 15-17 вересня 2004 – С.68.

15. Пенчук Ю.М., Поводзинський В.М., Карпов О.В. Установка для препаративного одержання інтерферонів I типу за допомогою індукторних систем багаторазової дії. // Тези IV Міжнародної конференції “Біоресурси і віруси” – 27-30 вересня 2004, Київ, Україна - С.66.

16. Пенчук Ю.М., Карпов О.В. Конструктивне оформлення технології одержання $\alpha\beta$ -інтерферонів з використанням індукторних систем багаторазової дії. // II Всеукраїнська науково-практична конференція “Біотехнологія. Освіта. Наука” присвячена 160-річчю університету “Львівська політехніка”. Збірник тез. Львів, 6-8 жовтня 2004 р. – С.81.

17. Пенчук Ю.М., Манджос О.П., Поводзинський В.М., Карпов О.В. Розробка конструкції біореактора для одержання інтерферонів I типу шляхом культивування клітин вищих організмів. // Наукові праці національного університету харчових технологій – 2004 - №15 (додаток) – С.29-30.

18. Пенчук Ю.М., Карпов О.В., Поводзинський В.М. Розробка технології інтерферонів I типу. / Матеріали IX міжнародної науково-технічної конференції “Нові технології та технічні рішення в харчовій та переробній

промисловості: сьогодення і перспективи”, Частина I, 17-19 жовтня 2005 р., Київ, НУХТ, 2005, С.48-49.

19. Пенчук Ю.М., Поводзинський В.М., Карпов О.В. Технологічні умови одержання інтерферону з використанням індукторного іммобілізованого молекулярного комплексу. / Сборник тезисов III Всеукраинской научно-практической конференции с международным участием «Биотехнология, образование, наука, практика», 18-20 октября 2006 г, Харьков, С. 134.

АНОТАЦІЯ

Пенчук Ю.М. Технологія отримання препаратів інтерферонів I типу з використанням індукторної системи багаторазової дії. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата технічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія, технічні науки. – Національний університет харчових технологій Міністерства освіти і науки України, Київ, 2006.

Дисертація присвячена розробці технології отримання препаратів інтерферонів I типу з використанням у якості інтерфероногену штучно створених індукторних конструкцій на основі молекулярних комплексів дріжджової РНК, яка ковалентно приєднана до нерозчинних гранулярних матриць, з гідрохлоридом тилорону (ІММК). В дослідях встановлені особливості синтезу ІММК та їх фізико-хімічні характеристики. Показано, що вміст іммобілізованих рибополінуклеотидів в отриманих препаратах ІММК знаходився в межах 30 мкг/г, а значення величин ζ -потенціалів індукторних систем коливалося від -3,9 mV до -5,2 mV. Дослідно доведена принципова можливість отримання препаратів інтерферонів I типу з використанням ІММК у якості індуктору. Експериментально визначені кількісні та часові параметри синтезу інтерферонів клітинами-продуцентами суспензійної та моношарових культур під дією контактів з гранулами ІММК в середовищі культивування. Експериментально доведена можливість багаторазового використання ІММК у якості індуктору інтерферонів. Розроблений спосіб регенерації часток ІММК для подальшого використання. Розроблена і сконструйована дослідна установка для отримання інтерферонів в умовах *in vitro* з застосуванням моношарових та суспензійних клітинних культур, індукованих за допомогою ІММК. Проведена оцінка ефективності інтерфероногенезу в культурах обох типів під дією ІММК за різних технологічних умов. Здійснена оптимізація параметрів біосинтезу інтерферонів в дослідній установці, як прототипі промислової апаратури, з застосуванням ІММК у якості інтерфероногену. Розроблена апаратурно-технологічна схема отримання інтерферону I типу для обох типів досліджених культур з використанням іммобілізованої індукторної системи багаторазової дії.

Ключові слова: інтерферон, індуктор, дріжджова РНК, тилорон, сферон.

АННОТАЦИЯ

Пенчук Ю.Н. Технология получения препаратов интерферонов I типа с использованием индукторной системы многократного действия. – Рукопись.

Диссертация на соискание научной степени кандидата технических наук по специальности 03.00.20 – биотехнология, технические науки. – Национальный университет пищевых технологий Министерства образования и науки Украины, Киев, 2007.

Диссертация посвящена разработке технологии получения препаратов интерферонов I типа с использованием, в качестве интерферогена, искусственно созданных индукторных конструкций на основе молекулярных комплексов дрожжевой РНК, ковалентно присоединенной к нерастворимым гранулярным матрицам, с гидрохлоридом тилорона (ИММК). В опытах доказано преимущество использования Сферона, как нерастворимой гранулярной матрицы, а также установлены особенности синтеза ИММК и их физико-химические характеристики. Показано, что содержание иммобилизованных рибополинуклеотидов в полученных препаратах ИММК находилось в пределах 30 мкг/г, а значение величин ζ -потенциалов индукторных систем колебалось от -3,9 mV до -5,2 mV. Опытным путем доказана принципиальная возможность получения препаратов интерферонов I типа в монослойных и суспензионных клеточных культурах с использованием ИММК в качестве индуктора. Экспериментально определены количественные и временные параметры синтеза интерферонов клетками-продуцентами под действием контактов с гранулами ИММК в среде культивирования. Экспериментально доказана возможность многократного использования ИММК в качестве индуктора интерферонов. Доказана возможность многократного использования частиц ИММК при получении препаратов интерферонов. Разработан способ регенерации частиц ИММК для дальнейшего использования. Разработана и сконструирована опытная установка роллерного типа, оснащенная электронным блоком управления, связанным с компьютером, предназначенная для получения интерферонов в условиях *in vitro* с использованием монослойных и суспензионных клеточных культур, индуцируемых с помощью ИММК. Проведена оценка эффективности интерферогенеза в культурах обоих типов под действием ИММК при различных технологических условиях. Осуществлена оптимизация параметров биосинтеза интерферонов в опытной установке, как прототипе промышленной аппаратуры, с использованием ИММК в качестве интерферогена. При этом экспериментально найдены оптимальное соотношение рабочего объема клеточной суспензии в емкости для культивирования к общему объему емкости, а также оптимальные соотношения количества клеток-продуцентов и частиц ИММК в среде культивирования и оптимальные для культивирования клеток скорости перемешивания культуральной среды для каждой из культур. Определены также оптимальные значения начальных концентраций клеток-продуцентов и содержания сыворотки крупного рогатого скота. Разработана аппаратурно-технологическая схема промышленного получения интерферона I

типа для обоих типов исследованных культур с использованием иммобилизованной индукторной системы многократного действия.

Ключевые слова: интерферон, индуктор, дрожжевая РНК, тилорон, сферон.

SUMMARY

Penchuk Yuri. Technology of production of interferon I type preparations using inductor system reusable action. – Manuscript.

Dissertation on receipt of candidate's of technical sciences degree by specialization 03.00.20 – Biotechnology, Technical science – National University of Food Technology Of Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2006.

Dissertation is related to designing of technology of the interferon I type preparations' production using synthetic inductor constructions as interferogene factor. Inductor systems are molecular complexes of yeasts RNA which is covalent associated to insoluble granular matrix, and tyloron hydrochloride (IMMC).

It was established character of IMMC synthesis and its physical-chemical characteristics. It was shown that concentration of immobilized ribopolynucleotides in IMMC'preparations was 30 mg/ml, and value of ζ -potentials of inductor systems was

-3,9 mV to -5,2 mV. Principal opportunity of production of interferon I type preparations using IMMC as inductor was shown experimentally. Value and time parameters of interferon synthesis by producer in suspension and monolayer culture contacting to IMMC granules were established.

Reusable action of IMMC as inductor of interferon synthesis was shown, also method of regeneration of IMMC particles was worked out. It was designed and made equipment for interferon production *in vitro* using monolayer and suspension cell cultures induced by IMMC.

Evaluation of interferon genesis' efficiency by both types of producers' cultures using IMMC in different technological conditions was established. Optimization of interferon biosynthesis parameters on laboratory equipment as prototype of industrial apparatus was finished. Apparatus-technological scheme of interferon I type production using immobilized reusable inductor system was designed.

Key words: interferon, inductor, yeasts RNA, tyloron, spheron.