



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **19419** (13) **U**
(51) МПК (2006)
A61K 39/20

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ РАБІЧНОГО АНТИГЕНУ ДЛЯ ГІПЕРІМУНІЗАЦІЇ ТВАРИН

1

2

(21) u200606862

(22) 19.06.2006

(24) 15.12.2006

(46) 15.12.2006, Бюл. № 12, 2006 р.

(72) Бабкін Михайло Валерійович, Стегній Борис Тимофійович, Ничик Сергій Анатолійович, Прохорова Олена Валентинівна, Явніков Назар Валентинович, Білокінь Віктор Степанович

(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР "ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ"

(57) Спосіб отримання рабічного антигену, що включає накопичення вірусу сказу в культурі клітин ВНК-21, концентрування вірусомісної рідини, який **відрізняється** тим, що накопичують штам "Щелково 51С" на перещеплюваній культурі клітин сірійського хом'ячка ВНК-21 Clone 13/04, концентрують трикратним заморожуванням-відтаванням.

Корисна модель відноситься до ветеринарної вірусології та біотехнології та може бути використана для виготовлення гіперімунної антирабічної сироватки.

Одним з найбільш розповсюджених способів діагностики сказу є реакція імунофлуоресценції, результати якої залежать від якості використовуваних антисироваток. Отримання активних та специфічних антисироваток неможливо без використання очищених та концентрованих препаратів вірусу. Методи накопичення, концентрування та очистки вірусу сказу, які існують, не позбавлені недоліків і не завжди дозволяють отримати імуноген вірусу якості, які потрібні.

Накопичення вірусу сказу проводиться на культурі клітин ВНК-21 Clone 13, який при ролярному культивуванні накопичується від 5,6 до 7,28lg МЛД 50/см³, в залежності від штаму вірусу [Arch. fur gesamte virusforschung. 1971. V.34. No.4. pp.351-359]. Вірус сказу штам "Щелково-51" при такому способі культивування, дає максимальний інфекційний титр 6,6lg МЛД 50/см³ [Між від. темат. науковий збірник "Ветеринарна медицина", вип. №84. - 2004. - С.528-530].

Існують способи отримання антигенів, в яких використовується концентрування вірусів за допомогою полі етиленгліколю [Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов. Научная конференция Щелково 2000-с - с.79-81]. Ці способи мають недоліки, які обумовлені значною втратою вірусу. Ультрацентрифугування, як препаративний метод, відрізняється високою вартістю та не придатне для концентрування зна-

чних об'ємів вірусних суспензій. Недолік методу ультрафільтрації є в тому, що при концентрації віріонів відбувається і концентрування контамінуючих біореагентів.

Для отримання рабічного антигену для гіперімунації тварин використовується накопичення вірусу сказу штам "Щелково 51С" на перещеплюваній культурі клітин сірійського хом'ячка ВНК-21 Clone 13/04 з очисткою та концентрацією для подальшого використання при гіперімунації тварин.

Прототипом способу, що запропонований, є спосіб одержання антигену з використанням очистки та концентрування вірусу сказу [Совершенствование метода очистки и концентрирования вируса бешенства" / А.П. Пономарев, Н.А. Назаров и др. // Материалы Международной н-пр. конференции, г.Покров – 2001 - с.49-51]. Принцип способу складається з накопичення вірусу сказу в культурі клітин ВНК-21, осадження вірусу поліетиленгліколем, концентрування вірусної маси ультрафільтруванням очистки та концентрування. Цей спосіб є трудомісткий, та не є придатним для виготовлення імуногену вірусу сказу у великих об'ємах.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб отримання рабічного антигену, що включає накопичення вірусу сказу в культурі клітин ВНК-21, концентрування вірусомісної рідини шляхом накопичення штаму "Щелково 51С" на перещеплюваній культурі клітин сірійського хом'ячка ВНК-21 Clone 13/04, концентрування трикратним заморожуванням - відтаванням, щоб забезпечити спосіб отримання рабічного антигену для гіперімунації тварин.

(13) **U**
(11) **19419**
(19) **UA**

Аналіз вітчизняної та закордонної літератури за матеріалами та результатами подібних досліджень дозволяє зробити висновок про відсутність ознак, що схожі із суттєвими відмінними ознаками способу, що заявляється.

Приклад 1

Отримання культурального вірусу сказу

Перещеплювану лінію культури клітин ВНК-21 Clone 13/04, яка є найбільш чутливою до вірусу сказу [Патент UA 60015U, 15.04.2005р. Бюл.№4, 2005], вирощували на живильних середовищах Ігла ДМЕМ, 199 в рівному співвідношенні з додаванням 10% сироватки крові великої рогатої худоби, яка очищена поліетиленгліколем. Посівна концентрація клітин складала $0,8 \times 10^6$ - $1,0 \times 10^6$ кл/см. Клітинну завесь розливали в 0,5 або 5,0л бутллі. Інкубували в ролерному приладі 24 години. З бутллів або флаконів, в яких моношар був сформований на 80-100 відсотків, зливали ростове середовище і вносили підтримуюче середовище: 199 - 50%, Ігла ДМЕМ - 50% без сироватки великої рогатої худоби. В підтримуюче середовище додавали культуральну суспензію вірусу сказу штам "Щелково 51С" з множинністю інфікування 0,65 МЛД 50/кл. Інкубували в ролерному приладі зі швидкістю обертання 1-2об/хв. при $(37,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ протягом 96 годин. Бутлі або флакони заморожували при мінус 20°C протягом 24 годин, після відтаювання рідини відбирали поверхневий прозорий шар рідини, визначали в ній вміст білку, який контролювали на спектрофотометрі при довжині хвилі 280нм, або якісною реакцією, наприклад, реактивом Неслера. Використовували фракції з кількістю білка 0,8-

1,0г/% і більше. Рідина, що не містить білок відкидалася.

Інфекційну активність зібраної клітинної культуральної біомаси, визначали зараженням білих мишей вагою 10-12г внутрішньомозково у дозі $0,03\text{см}^3$ за загально прийнятою методикою. Інфекційний титр вірусу сказу повинен бути 6,5lg МЛД 50/см³ і більше. Після титрування культуральну вірусну біомасу зливали в одну ємність і вносили інактивант - бета-пропіолактон до кінцевої концентрації 0,02-0,03%, інкубували при $4-6^\circ\text{C}$ протягом 2-4 годин.

Приклад 2

Отримання культурального антигену вірусу сказу

Після інактивації вірусну суспензію знову піддавали заморожуванню при мінус 20°C протягом 24 годин. При відтаюванні рідини із бутлю відбирали фракційно тільки рідину, яка містить білок, що контролюється спектрофотометрично при довжині хвилі 280нм або якісною реакцією, як вказано в прикладі 1. Таку операцію повторювали дворазово. При цьому концентрація білка повинна збільшуватись від 0,8-1,0г/% до 7,0-8,0г/% у кінці процесу. Сконцентровану рідину для осадження великих клітинних структур піддавали центрифугуванню при 300g протягом 40 хвилин при температурі плюс 4°C . Надосадову рідину використовували, як імуноген вірусу сказу.

Таким чином, використання способу дає можливість одержати висоякісний антиген вірусу сказу, технологія отримання якого адаптована до виробничих умов.