

Предлагаемое изобретение относится к биологии и может быть использовано в ветеринарной и медицинской вирусологии при производстве биологически активных веществ: вирусных антигенов, вакцин, интерферонов и т.п.

Известен способ культивирования перевиваемых клеток с персистентной формой вирусной инфекции, например, полиомиелита, оспы птиц, вируса болезни Ньюкасла и др., что обуславливается наличием в культурах вируснейтрализующих антител, или ингибиторов вируса, белков сыворотки крови, факторов, поддерживающих на оптимальном уровне клеточный метаболизм, а также при недостаточном питании клеток [Банг, Леви, Гей, 1951; Генлеидр., 1952; Аккерман и Куртц, 1955].

Описан способ культивирования перевиваемых культур клеток Нер 2, продуцирующих вирус клещевого энцефалита. Клетки выращивали на среде 199 с 10% бычьей сыворотки, в которой отсутствовали антитела к вирусу. Пассажи проводили в среднем 1 раз в 8-12 дней. Перед очередным пассажем старую питательную среду удаляли, клетки снимали 0,02% раствором версена и добавляли новую питательную среду в объеме, равном количеству среды, удаленной из фляги. Кратность прироста клеток колебалась от 1,2 до 8 на протяжении 27 пассажей. Титр вируса в клетках - от неразведенного до  $10^{3,2}$ .

Удаление из питательной среды сыворотки крови вело к исчезновению вируса (Анджапаридзе О.Г. и Богомолова Н.Н., 1961).

Прототип. Перевиваемую культуру клеток почки эмбриона овцы FLK культивировали на среде Игла с 20% сыворотки крови плода коровы.

Из-за отсутствия этих компонентов в лаборатории лейкозов ВИЭВ культуру адаптировали к смеси питательной среды Игла с 0,5%-ным гидролизатом лактальбумина в соотношении 1 : 1 и сывороткой крови крупного рогатого скота (5-7 %). При высеве клеток в концентрации 200 000 клеток в 1 мл монослой формируется к 48 - 72 часам, для накопления антигена культура перевивается через 6-7 дней (Головченко А.П. и др., 1979; Залевский Д.И., 1979). Однако указанная тест - система продуцирует онкорнавирус в низких концентрациях, что требует повышенного расхода питательных сред и реактивов (Залевский, Д.И., 1979).

К недостаткам известного способа относятся следующие:

1. При персистентной вирусной инфекции клетка нуждается в оптимальном обеспечении белковыми веществами, необходимыми для жизнедеятельности клетки и репродукции вирусных нуклеопротеидов.

В известном способе культивирования клетки FLK выращивают на сочетании сред Игла и 0,5%-ном гидролизате лактальбумина (ГЛА), однако среда Игла является минимальной питательной средой и количество аминокислот в ней - лимитирующий фактор (Витакер А., 1976, Сергеев В.А., Собко Ю.А., 1990).

Химический анализ 0,5%-ного гидролизата лактальбумина (Витакер А., 1976, Сперанская И.Д. и др., 1981), свидетельствуют о большой нестандартности ГЛА, препараты различаются в значительной степени как по количеству, так и по весовому составу аминокислот.

На некоторых партиях ГЛА клетки теряют способность прикрепляться к стеклу.

Таким образом, в известном способе сочетание среды Игла и ГЛА не является оптимальным по белковому потенциалу и другим свойствам.

2. В известном способе для пересева клеток используют общепринятый метод снятия клеток со стекла версеном, который, как правило, приводит к химической травме клеток, лишаящей их способности размножаться вне клеточной ассоциации, снижающей ростовые свойства культуры (Анджапаридзе О.Г. и др., 1962).

Цель изобретения - создать оптимальные условия для культивирования клеток FLK, репродукции вирусного антигена, повысить его специфичность, удешевить продукцию.

Указанная цель достигается тем, что для культивирования клеток FLK используют питательную среду 199, содержащую более 60 компонентов, и среду Игла в сочетании 1:1. В качестве белкового компонента в питательную среду вводят белково-коллоидный плазмозамещающий раствор геоссен, содержащий в своем составе 4-5 % общего белка.

Для снятия клеток со стекла используют щадящий метод встряхивания и диспергирования их в питательной среде.

Пример. В полуторалитровую плоскую флягу с 250 мл питательной среды высевают суспензию клеток вируспродуцирующей линии клеток FLK в конечной концентрации 200 000 клеток в 1 мл, что соответствует коэффициенту посева 1 : 3. Состав питательной среды: среда 199 - 47,5 %; среда Игла с глутамином - 47,5 %; геоссен - 5 %; сыворотка крови крупного рогатого скота - 5 %, антибиотики - пенициллин, стрептомицин в общепринятых концентрациях. Культивирование проводят при 37 - 38°C. Клетки выполняют монослой на 4 - 5 день, но для оптимального накопления вирусного антигена снятие клеток производят на 12 - 14 день: сливают старую питательную среду, содержащую вирусный антиген; во флягу с клетками вносят свежую питательную среду (без сыворотки) в объеме соответственно коэффициенту посева. Флягу встряхивают и клеточную суспензию диспергируют в питательной среде, затем в среду вносят 5% сыворотки крови и засевают в новые фляги с коэффициентом посева 1:2-1:4.

При определении эффективности биосинтеза лейкозного антигена установлено, что для получения 1000 доз преципитирующего антигена используется примерно 770 мл питательной среды при существующей норме 1000- 1300 мл.

Предложенный метод позволяет при равных затратах увеличить выход антигена на 30-40 %.

Литература:

1. Анджапаридзе О.Г., Богомолова Н.Н. Взаимодействие вируса клещевого энцефалита с восприимчивыми клетками. Сообщение II. Латентная инфекция клеток. Вопросы вирусологии, 1961, 3, 343.

2. Анджапаридзе О.Г., Гаврилов В.И., Семенов Б.Ф., Степанова Л.Г. Культура ткани в вирусологических исследованиях. М., 1962. с. 86.

3. Витакер А. Среды для культивирования клеток млекопитающих. В кн. Новые методы культуры животных тканей. М., 1981, с. 134-136.

4. Головченко А.П., Дун Е.А., Ефремов Г.П. Изучение культуры клеток почки эмбриона овцы,

- репродуцирующей онкорнавирус крупного рогатого скота. Бюллетень ВИЭВ, выпуск 36. М., 1979, с. 22 - 23.
5. Залевский Д.И. Получение вируспродуцирующих клеток и антигена онкорнавируса крупного рогатого скота. Бюллетень ВИЭВ, выпуск 36, М., 1979, с. 25 - 27.
6. Сергеев В.А., Собко Ю.А. Культуры клеток в ветеринарии и биотехнологии. - К., "Урожай", 1990, с. 38 - 39.
7. Сперанская И.Д., Миронова Л.Л., Данилова Э.Б., Голубева Е.Н., Грачев В.П. Влияние состава гидролизата лактальбумина на качество питательных сред. Научные основы технологии промышленного производства биологических препаратов /Тезисы докладов второй всесоюзной конференции) (Москва, 19 -21 ноября 1981.),-М., 1981, с. 134-136.
8. Ackermann W., Kurtz H. Observations concerning a persisting Infection of Heia cells with poliomyelitis virus. J. exp. med., 1955, 102, 5, 555.
9. Bang F.B., Levy E., Jey J.O. Some observations on host - cell - virus relation -ships in fowl pox: growth In tissue culture; inclusion produced by virus on chick chorioallantois membrane. J. Immunol., 1951.66,329.
10. Heggles A.D., Morgan H.P. Latent viral Infection of cells in tissue culture III. Role of certain aminoacids. Proc. Soc. exp. Biol. Med.. 1956, 92, 506.