



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **41066** (13) **U**
(51) МПК
C12N 7/06 (2009.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИДАЛЕННЯ ВІРУСІВ ІЗ БІОЛОГІЧНОЇ РІДИНИ З ВИКОРИСТАННЯМ МІКРОЧАСТОК

1

2

(21) u200814096

(22) 08.12.2008

(24) 27.04.2009

(46) 27.04.2009, Бюл.№ 8, 2009 р.

(72) ВЕРГУН ЛЮБОВ ЮРІЇВНА, UA, ТРОХИМЕНКО ОЛЕНА ПЕТРІВНА, UA

(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ГЕМАТОЛОГІЇ ТА ТРАНСФУЗІОЛОГІЇ АМН УКРАЇНИ", UA

(57) Спосіб видалення вірусів із біологічної рідини з використанням мікрочасток шляхом адсорбції і подальшого видалення адсорбенту, який **відріз-**

няється тим, що як адсорбенти використовують Fe_3O_4 , TiO_2 , SiO_2 , Al_2O_3 та їх композити із різним вмістом оксидів металів у кремнеземі $\text{TiO}_2 / \text{SiO}_2$ (25,1%), $\text{TiO}_2 / \text{SiO}_2$ (11,27%), $\text{Al}_2\text{O}_3 / \text{SiO}_2$ (3,07%), $\text{Al}_2\text{O}_3 / \text{SiO}_2$ (1,94%), Ag / SiO_2 , γ - АПТЭС / Fe_3O_4 , при цьому на 100мг кожного із них додаючи 1см^3 вірусовмісної рідини, яка містить вірус везикулярного стоматиту, та витримують 1 годину при кімнатній температурі і осаджують зовнішнім магнітом або центрифугуванням.

Корисна модель відноситься до медицини, зоо-крема, до способу видалення вірусних часток із біологічних рідин і може бути використана в науково-дослідних установах, підприємствах біологічної промисловості.

Відомий спосіб інактивації оболонкових вірусів. Спосіб передбачає використання неіонних детергентів і октилглюкозиду. Недоліком способу є те, що не передбачається видалення продуктів розпаду з біологічної рідини [1].

Відомий спосіб інактивації вірусів різних таксономічних груп сіркокислою міддю. Процес денатурації нуклеїнової кислоти регулюється іонами металу, які руйнують геном до низькомолекулярних фрагментів (50-100 нуклеотидів). Недолік способу - інактивованій матеріал залишається в біологічній рідині [2].

Найближчим аналогом є спосіб видалення РНК-вірусів типу С з використанням неорганічної речовини гідроксиапатиту. Вірусовмісну рідину додають (1:1) до суспензії гідроксиапатиту, залишають при перемішуванні на ніч у холодній кімнаті, далі суспензію центрифугують рідку фазу удаляють, глину переносять у колонку і виконують процедуру елюції. Недоліком способу є те, що процедура являє собою складний, довготривалий процес, для виконання якого потрібно хроматографічне обладнання та створення температурних умов [3].

Завданням корисної моделі є підбір високодispersних оксидів та їх композитів, що здатні видаляти вірусні частки з біологічної рідини.

Поставлена задача досягається використанням адсорбентів Fe_3O_4 , TiO_2 , SiO_2 , Al_2O_3 та їх композитів із різним вмістом оксидів металів у кремнеземі $\text{TiO}_2/\text{SiO}_2$ (25,1%), $\text{TiO}_2/\text{SiO}_2$ (11,27%), $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ (3,07%), $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ (1,94%), Ag/SiO_2 , γ - АПТЭС / Fe_3O_4 з питомою поверхнею від $30\text{м}^2/\text{г}$ до $300\text{м}^2/\text{г}$. Магніточутливі частки осаджують за допомогою зовнішнього магніту.

У якості біологічної рідини використовують культуральну рідину, яку отримують шляхом зараження клітин перещеплюваної лінії Нер-2с вірусом везикулярного стоматиту (ВВС) та послі дуючого культивування їх при $+37^\circ\text{C}$ до настання цитопатичного ефекту у монослої клітин на 60-70%. Вірусовмісне культуральне середовище збирають, освітлюють шляхом низькошвидкісного центрифугування.

Приклад конкретного виконання. Зразки адсорбентів TiO_2 , SiO_2 , Al_2O_3 , $\text{TiO}_2/\text{SiO}_2$ (25,1%), $\text{TiO}_2/\text{SiO}_2$ (11,27%), $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ (3,07%), $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ (1,94%), Ag/SiO_2 стерилізують (сухим жаром, автоклаву вашіям, обробкою спиртом) або озonom - Fe_3O_4 , γ - АПТЭС / Fe_3O_4 і додають у вірусовмісну культуральну рідину з активністю від $4,7 \lg \text{ТЦД}_{50/\text{см}^3}$ до $5,7 \lg \text{ТЦД}_{50/\text{см}^3}$ (табл.1), при цьому на кожні 100мг адсорбенту додають 1см^3 рідини. Витримують 1год. при кімнатній температурі, періодично перемішуючи. Далі адсорбенти (TiO_2 , SiO_2 , Al_2O_3 , $\text{TiO}_2/\text{SiO}_2$ (25,1%), $\text{TiO}_2/\text{SiO}_2$ (11,27%), $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ (3,07%), $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ (1,94%), Ag/SiO_2) і вірусовмісну рідину центрифугують при 3тис.об./хв. 15хв., осаджують магніточутливі адсо-

(13) **U**
(11) **41066**
(19) **UA**

рбенти Fe_3O_4 , γ -АПТЭС / Fe_3O_4 за допомогою зовнішнього магніту. Надосад відбирають для тестування. Активність вірусу у культурамній рідині після експозиції з мікрочастками адсорбентів визначають титруванням методом граничних розведень у перещеплюваній культурі клітин Нер-2с. Клітини культивують у 96-лункових мікропланшетах у CO_2 -інкубаторі.

Інфекційний титр розраховують, використовуючи метод Ріда та Мепча, і виражають у $\text{lg TCID}_{50}/\text{cm}^3$. Результати сорбції ВВС із культуральної

рідини адсорбентами представлені в таблиці 1 і показують їх здатність видаляти вірус.

Застосування адсорбентів у лабораторних умовах дозволило зменшити кількість вірусу в культуральній рідині на 2 lg після експозиції з Al_2O_3 , $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ (3,07%), SiO_2 , на 3 lg після експозиції з $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ (1,94%), $\text{TiO}_2/\text{SiO}_2$ (25,1%) і на 4 lg після експозиції з $\text{TiO}_2/\text{SiO}_2$ (11,27%). Повна сорбція-інактивація вихідного ВВС спостерігалась після контакту з магнетитом (Fe_3O_4), диоксидом титану (TiO_2), Ag/SiO_2 , γ -АПТЭС / Fe_3O_4 .

Таблиця 1

Адсорбенти, що випробувалися	Інфекційна активність вихідної біологічної рідини	Інфекційна активність після експозиції з адсорбентом
SiO_2	5,7 $\text{lg TCID}_{50}/\text{cm}^3$	3,7 $\text{lg TCID}_{50}/\text{cm}^3$
Al_2O_3 (піроген)	5,7 $\text{lg TCID}_{50}/\text{cm}^3$	3,7 $\text{lg TCID}_{50}/\text{cm}^3$
$\text{Al}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ (3,07%)	5,7 $\text{lg TCID}_{50}/\text{cm}^3$	3,7 $\text{lg TCID}_{50}/\text{cm}^3$
$\text{Al}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ (1,94%)	5,7 $\text{lg TCID}_{50}/\text{cm}^3$	2,7 $\text{lg TCID}_{50}/\text{cm}^3$
$\text{TiO}_2/\text{SiO}_2$ (25,1%)	5,7 $\text{lg TCID}_{50}/\text{cm}^3$	2,7 $\text{lg TCID}_{50}/\text{cm}^3$
$\text{TiO}_2/\text{SiO}_2$ (11,27%)	5,7 $\text{lg TCID}_{50}/\text{cm}^3$	1,7 $\text{lg TCID}_{50}/\text{cm}^3$
Fe_3O_4	5,7 $\text{lg TCID}_{50}/\text{cm}^3$	0
TiO_2 (анатаз)	5,7 $\text{lg TCID}_{50}/\text{cm}^3$	0
Ag/SiO_2	4,7 $\text{lg TCID}_{50}/\text{cm}^3$	0
γ -АПТЭС / Fe_3O_4	5,7 $\text{lg TCID}_{50}/\text{cm}^3$	0

Вивчалися адсорбційні можливості 10 оксидів і їх композитів з різним вмістом у кремнеземі. Запропоновані адсорбенти на основі оксидів металів та їх композитів сорбують на своїй поверхні оболонковий ВВС у різному ступені від 2 lg до 5 lg . Застосування магніточутливих адсорбентів має особливу цінність та значно спрощує процедуру розділення біологічної рідини і адсорбенту при використанні зовнішнього магніту.

Джерела інформації:

1. Smith R.G., Lee S.A. Large-scale isolation and partial purification of type C RNA viruses on hydroxyapatite. -Analytical Biochemistry, 1978, 86, 252-263.

2. Федоров Д.Г. и др. Инактивація вірусів різних таксономічних груп сернокислою міддю. - Вопросы вирусологии, 2004, 4, 43-45.

3. Barrett Noel, Kistner Otfried, Dornes Friedrich. Патент Австрія №405939, МПК⁶ C12N7/06, C12N7/00, 1999.