



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 201 960** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) МПК⁷ **C 12 N 5/06, 7/00**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

(21), (22) Заявка: 2001116519/13, 19.06.2001
(24) Дата начала действия патента: 19.06.2001
(46) Дата публикации: 10.04.2003
(56) Ссылки: PIRTLE E.C. et al. Cytogenetic alteration in swine kidney cells persistently infected with hog cholera virus and propagated and without antiserum in the medium, Am. J. Vet. Res., 1968, v.29, p.153-164. SU 1430403 A1, 15.10.1988. RU 1347448 C1, 10.04.1995. SU 1613487 A1, 15.12.1990. RU 2140451 C1, 27.10.1999.
(98) Адрес для переписки:
601120, Владимирская обл., г. Покров,
ВНИИВВиМ

(71) Заявитель:
ВНИИ ветеринарной вирусологии и
микробиологии
(72) Изобретатель: Колбасова О.Л.,
Юрков С.Г., Дмитренко В.В., Куриннов
В.В., Чермашенцева Н.А., Кушнир
С.Д., Смыслова Н.Ю.
(73) Патентообладатель:
ВНИИ ветеринарной вирусологии и
микробиологии

(54) **ШТАММ ПЕРЕВИВАЕМЫХ КЛЕТОК ПОЧКИ ПОРОСЕНКА SUS SCROFA РК-15/A11, ИСПОЛЬЗУЕМЫЙ ДЛЯ ВИРУСОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

(57)
Изобретение относится к вирусологии, в частности к области культивирования клеток и тканей для наработки и изучения вирусов. Штамм клеток РК-15/A11 получают путем клонирования линии клеток почки поросенка РК-15 методом предельных разведений и пассирования в среде Игла MEM с 5% фетальной сыворотки крови телят или новорожденных телят и дальнейшей трофической адаптацией в течение 5 пассажей к культивированию в среде Игла MEM с 5% сыворотки крови крупного рогатого

скота, обработанной ПЭГ. Кариотип стабилен на протяжении 50 пассажей. Модальный класс представлен клетками, содержащими 31 хромосому (58%). Культура клеток РК-15/A11 чувствительна к различным штаммам вируса классической чумы свиней и является производственным штаммом для изготовления вакцины против классической чумы свиней. Изобретение позволяет получить штамм перевиваемых клеток почки поросенка, стабильный по биологическим характеристикам, в производстве вакцин против КЧС. 1 табл.



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 201 960** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) Int. Cl.⁷ **C 12 N 5/06, 7/00**

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 2001116519/13 , 19.06.2001
(24) Effective date for property rights: 19.06.2001
(46) Date of publication: 10.04.2003
(98) Mail address:
601120, Vladimirskaja obl., g. Pokrov, VNIIViM

(71) Applicant:
VNII veterinarnoj virusologii i mikrobiologii
(72) Inventor: Kolbasova O.L.,
Jurkov S.G., Dmitrenko V.V., Kurinnov
V.V., Chermashentseva N.A., Kushnir
S.D., Smyslova N.Ju.
(73) Proprietor:
VNII veterinarnoj virusologii i mikrobiologii

(54) **STRAIN OF PIGLET KIDNEY TRANSPLANTABLE CELLS SUS SCROFA PK-15/A11 USED FOR VIROLOGY INVESTIGATION**

(57) Abstract:

FIELD: virology, biotechnology.
SUBSTANCE: invention relates to the field of culturing cells and tissues and preparing and study of viruses. The strain of cells PK-15/A11 is obtained by cloning piglet kidney cell line PK-15 by method of limiting dilution and passage in Eagle's MEM medium with 5% of calve fetal or newborn calve serum blood and the following adaptation for 5 passages to culturing in Eagle's MEM medium with 5% of cattle serum blood treated with polyethylene glycol. Karyotype is

stable for 50 passages. Modal class is represented by cells containing 31 chromosome (58%). Cell culture PK-15/A11 is sensitive to different strains of classic swine plague virus and presents the industrial strain for preparing vaccine against classic swine plague. Invention allows to obtain the strain of piglet kidney transplantable cells that is stable by biological indices and it can be used for production of vaccines against classic swine plague. EFFECT: valuable properties of strain. 1 tbl

Изобретение относится к вирусологии, в частности к культивированию клеток и тканей с целью наработки и изучения вирусов.

Известна перевиваемая линия клеток почки поросенка РК-15, изолированная в 1957 году М. Harris из культуры клеток РК-2а почки взрослой свиньи *Sus scrofa* (ATCC, CCL 33) [1, 2].

Штамм перевиваемых клеток РК-15 из-за того, что его культивировали в лабораториях мира при нестандартных режимах и в различных по составу питательных средах, стал нестабильным по культуральным, морфологическим, цитогенетическим характеристикам и чувствительности к вирусу классической чумы свиней.

Биотехнологическое использование линии клеток РК-15 лимитирует необходимость включения в состав ростовой среды фетальной сыворотки крови или сыворотки крови новорожденных телят, что неприемлемо по экономическим соображениям в биотехнологии производства вакцинных препаратов.

Целью изобретения является получение штамма перевиваемых клеток почки поросенка РК-15/A11, стабильного по биотехнологическим характеристикам, обеспечивающего высокий уровень репродукции вируса классической чумы свиней, пригодного для научно-исследовательской работы и производства вакцин против КЧС.

Штамм клеток РК-15/A11 получен из перевиваемой линии клеток почки поросенка РК-15, клонированной методом предельных разведений в питательной среде Игла MEM, содержащей 20% фетальной сыворотки крови телят с отбором и селекцией высокочувствительного к вирусу классической чумы свиней и генетически однородного клона клеток, и дальнейшей трофической адаптацией клеток в течение 5 пассажей к культивированию в среде Игла MEM с 5% сыворотки крови крупного рогатого скота, обработанной полиэтиленгликолем.

Штамм РК-15/A11 характеризуется следующими признаками.

Культуральные свойства. Жизненный цикл штамма, при котором сохраняются основные биологические показатели клеток, составляет 50±5 пассажей. При посевной дозе 80-110 тыс. клеток/мл монослой формируется на 2-3 сутки культивирования и сохраняется без смены среды в течение 10-12 дней. В литровом матрасе накапливается 75-80 млн. клеток. Коэффициент пересева -1:3-1:5

Штамм РК-15/A11 культивируют в монослойных культурах в среде Игла MEM с 5% сыворотки крови крупного рогатого скота, обработанной полиэтиленгликолем с молекулярной массой 6000, в конечной концентрации 7-10% от объема сыворотки. Для диспергирования клеточного пласта при пересевах используют смесь 0,02% раствора версена и 0,25% раствора трипсина в соотношении 3:1 при температуре 37°C.

Для криоконсервирования при -196 °C применяют смесь, состоящую из 85% среды Игла MEM, 5% сыворотки крови крупного рогатого скота, обработанной ПЭГ и 10% диметилсульфоксида, при концентрации клеток 8-12·10⁶ в мл. Жизнеспособность клеток по тесту витального окрашивания трипановой синью после хранения в жидком

азоте составляет 80-90%. Клетки восстанавливают исходные ростовые и морфологические свойства в течение 2-3 пассажей.

Создан банк рабочих клеток изготовителя (БРКИ) в количестве 300 млн. клеток. Клетки криоконсервированы в жидком азоте на уровне 11, 15, и 16 пассажах во ВНИИВВиМ (регистрационный 2.11).

Морфологические признаки. Культура клеток представлена мелкими эпителиоподобными клетками с умеренно зернистой цитоплазмой и четко очерченными границами. Ядро округлой формы с 1-2 ядрышками.

Кариологическая характеристика. Популяция гетероплоидная. Варьирование хромосомных наборов от 28 до 50. Модальный класс (58%) составляют клетки, содержащие 31 хромосому.

Гистохимическим методом азосочетания (с использованием в качестве субстрата α-нафтилацетата) установлена высокая активность неспецифических эстераз.

Видовая идентичность подтверждена кариологическими методами.

Прививаемость изогенным животным отсутствует.

Контроль штамма РК-15/A11 на посторонние штаммы. При обследовании клеток штамма РК-15/A11 на стерильность (наличие бактерий, грибов, микоплазм) получены отрицательные результаты.

Чувствительность к вирусам. Клетки штамма РК-15/A11 чувствительны к различным штаммам вируса классической чумы свиней (таблица)

Штамм перевиваемых клеток РК-15/A11 предназначен для использования в производстве вакцинных препаратов против классической чумы свиней.

Штамм перевиваемых клеток почки поросенка *Sus scrofa* РК-15/A11 депонирован в Специализированной коллекции перевиваемых соматических культур клеток сельскохозяйственных и промысловых животных Российской коллекции культур клеток при Всероссийском научно-исследовательском институте экспериментальной ветеринарии (СХЖ РАСХН) под 54.

Источники информации

1. Pirtle EC and Woods LK. Cytogenetic alterations in swine kidney cells persistently infected with hog cholera virus and propagated with and without antiserum in the medium // Am. J. Vet. Res., 1968, 29, 153-164;

2. Armstrong JA et al. C-type virus particles in pig kidney cell lines // J. Genet. Virol., 1971, 10, 195-198.

Формула изобретения:

Штамм перевиваемых клеток почки поросенка *Sus scrofa* РК-15/A11 депонирован в Специализированной коллекции перевиваемых соматических культур клеток сельскохозяйственных и промысловых животных Российской коллекции культур клеток при Всероссийском научно-исследовательском институте экспериментальной ветеринарии (СХЖ РАСХН) под 54, используемый для вирусологических исследований.

пассажный уровень куль- туры клеток	Накопление вируса КЧС вакцинных штаммов (lg ККИД ₅₀ /см ₃)	
	ЛК-ВНИИВВиМ	ЛК-К
10	6,0 ± 0,51	6,0 ± 0,21
30	6,0 ± 0,5	6,0 ± 0,18
60	6,0 ± 0,48	6,0 ± 0,23