



УКРАЇНА

(19) UA (11) 56794 (13) A

(51) 7 A61K39/29, C12N1/00,

C12N3/00, C12N5/00, C12N7/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ІНАКТИВАЦІЇ ІНФЕКЦІЙНИХ АГЕНТІВ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА БІОПРЕПАРАТІВ

1

2

(21) 2002097491

(22) 17 09 2002

(24) 15 05 2003

(46) 15 05 2003, Бюл. № 5, 2003 р.

(72) Бузун Андрій Ігорович, Головка Валерій Олександрович, Вербицький Петро Іванович, Яковлев Юрій Сергійович, Бузун Ірина Андрівна, Суворов Віталій Олександрович, Коновалов Вадим Павлович

(73) ХАРКІВСЬКА ДЕРЖАВНА ЗООВЕТЕРИНАРНА АКАДЕМІЯ

(57) Спосіб інактивації інфекційних агентів для виробництва біопрепаратів, що включає використання формальдепду, який відрізняється тим, що як формальдепд застосовують фармакопейний уротропін в кінцевій концентрації 1-2,5%

Передбачуваний винахід належить до галузі ветеринарної біотехнології, зокрема до засобів інактивації інфекційних агентів при виготовленні з них вакцин та діагностикумів на підприємствах біологічної промисловості.

Існують різноманітні способи інактивації інфекційних агентів при виробництві діагностичних та вакцинних біопрепаратів. Серед них - інактивація різноманітних інфекційних агентів фенолом [1,2], кристал-фіолетом [3, 4], 7-пропіонлактоном [5] чи етиленіміном [6]. Ці речовини ефективно руйнують інфекційну активність окремих збудників, майже не торкаючись їхньої антигенної активності, що є дуже цінним для біотехнологічних цілей, проте вони, за винятком кристалфіолету, є вкрай токсичними і канцерогенними навіть у залишкових кількостях і праця з ними в умовах біовиробництва вимагає спеціальних запобіжних заходів. Найбільш поширено використання в технології біопрепаратів формальдепду, у відповідних для кожного збудника концентраціях та умовах [7, 8]. Цей інактиватор є універсальним і досить надійним в сенсі повноти інактивації. Проте його головною вадою є те, що в концентраціях, придатних для інактивації інфекційності збудника, формальдепд частково інактивує більшість антигенів збудника, що вимагає збільшення у кінцевих продуктах концентрації "діючої речовини", тощо.

Прототипом може бути спосіб застосування препарату "Теотропін" для інактивації широкого спектру інфекційних агентів з метою дезинфекції (Зубаиров М.М., Миколайчук С.В., Бузун А.І. і др. Препарат "Теотропін" для дезинфекції об'єктів санітарного надзора. Патент РФ № 2123337 от

20 12 98 г.) За хімічною структурою "Теотропін" відноситься до штучних похідних уротропіну з різними бактеріо-, віро-, мікоплазмо-, хламідіє-, коцидними властивостями і виробляється підприємствами військово-промислового комплексу Російської Федерації (РФ). Численими попередніми дослідженнями було встановлено, що "теотропін" може бути використано для інактивації різних вірусів та бактерій у процесі виготовлення захисних (вакцинних та діагностичних) препаратів, у тому числі - вірусів тешенської хвороби (Бузун А.І., Жестерев В.І., Середа А.Д. і др. Спосіб виготовлення вакцини проти хвороби Тешена. Заявка Все-російського ННІ ветвірусології і мікробіології №2001103498/13(003677) пріоритет 08 02 2001) та хвороби Ауески (Бузун А.І., Яковлев Ю.С., Вербицький П.І. та ін. Спосіб виготовлення вакцини проти тешенської хвороби та псевдоскаку свиней інтрадермального застосування. Заявка Держдепартаменту ветмедицини України). Діючою речовиною цього препарату також є формальдегід, що виділяється локально - у місці його взаємодії з білковими структурами та нуклеїновими кислотами. Це дозволяє значно точніше, ніж у випадку з формальдегдом, дозувати кількість інактивованої речовини, яку достатньо для руйнування інфекційної активності, але ще замало для інактивації антигенної активності збудника. Тому біопрепарати окремих збудників, отримані з застосуванням "Теотропіну" є значно більш активними в імунологічному відношенні, ніж при використанні формальдепду. Недоліками способів інактивації біопрепаратів з використанням "Теотропіну" є те, що фармакодинаміка цієї речовини ще вивчена недостатньо, як і довго-

(13) A
(11) 56794
(19) UA

тривалі наслідки й використання в біотехнології та протиепізотичній практиці "Теортопін", як хімічний продукт, наразі ще не стандартизовано і далеко не кожна його партія придатна для застережних цілей. Нарешті цей препарат не виробляється в Україні і є малодоступним для вітчизняної біотехнологічної промисловості.

В основу передбачуваного винаходу поставлено завдання підбір препарату з числа доступних для вітчизняної промисловості, який за принципом інактивуючої дії на збудників не відрізнявся б від "Теотропіну" - тобто діяв би локально, як зазначено вище, - але був би стандартним, а його біологічна небезпечність була б цілком відомою і прогнозованою.

Поставлена задача вирішується тим що в спосіб інактивації інфекційних агентів для виробництва біопрепаратів, включаючому використання

формальдеїду, згідно винаходу, застосовують фармакопейний уротропін в кінцевій концентрації 1-2,5%. Уротропін (синоніми - гексаметилентетрамін, урізол, метенамін), розщеплюється з виділенням формальдеїду і має виражену протимікробну активність *in vitro*.

Цей препарат більш ніж 100 років використовується в клінічній практиці як гуманної, так і ветеринарної медицини, його фармакокінетика і біо-небезпечність вивчена з виснажливою повнотою і нешкідливість не викликає жодних сумнівів. В той же час, як було з'ясовано перевіркою *in vitro* на моделях збудників тешенської хвороби, хламідіозу вівців, міксоматозу та стрептококозу кролів, уротропін в певних концентраціях цілком надійно руйнує структури мікробів, відповідальні за їхню інфекційну активність (таблиця).

Таблиця

Визначення ефективних доз уротропіну для інактивації різних збудників

№ з/п	Назва тест-культур збудників і їх активність до дії уротропіну	Інактивація (%) після експозиції з уротропіном в концентрації								
		0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	1,0	2,5
1	Тешовірус, шт "Бу-зун-ХДЗВА", 4,5 Ig ТЦД ₅₀ /мл	10	Н/д	90	Н/д	100	Н/д	100	100	Н/д
2	Тешовірус, шт "Навля-96", 8,25 Ig ТЦД ₅₀ /мл	10	Н/д	Н/д	Н/д	90	Н/д	95	100	Н/д
3	Вірус міксоматозу кролів, шт "МР" 4,5 Ig ТЦД ₅₀ /мл	0	Н/д	Н/д	Н/д	50	Н/д	75	100	Н/д
4	Хламідія, шт " ", 4,5 Ig ТЦД ₅₀ /мл	0	Н/д	Н/д	Н/д	20	Н/д	50	90	100
5	Стрептококк, млрд /мл	0	Н/д	Н/д	Н/д	10	Н/д	40	80	100

Зауваження. Тест-культури збудників в обсязі 5,0 мл кожна в 4-7 дублях обробляли зазначеними концентраціями уротропіну при 37°C протягом 48 годин і потім титрували у відповідних тест-системах - тешовіруси і хламідії в перещеплюваних клітинах РК-15, вірус міксоматозу в первинних клітинах тестесів кроленят, стрептококк - в МПБ у пробірках.

Проведені дослідження свідчать про високу інактивуючу активність уротропіну відносно інфекційності вірусів, хламідій, бактерій. Після обробки їх тест-культур протягом 48 годин при 37°C інфекційна активність вірусів тешенської хвороби і міксоматозу повністю руйнувалася 1%-ним уротропіном, а хламідії абортів вівців і стрептококку кролів - 2,5% препаратом. Оброблені тест-культури не виявляли інфекційної активності після трьох сліпих пасажів у відповідних тест-системах. Аналіз антигенної активності інактивованих тест-культур зазначених збудників в реакції зв'язування комплекменту (віруси і хламідія) та реакції аглютинації (стрептококк) не виявив розбіжності титрів специфічного антигену з вихідними нативними препара-

тами збудників. Це свідчить про збереження антигенних властивостей збудників після їх обробки уротропіном в концентраціях, що руйнують їхню інфекційність.

Стандартні умови застосування уротропіну

Необхідну кількість фармацевтичного уротропіну (з розрахунку 1-2,5% кінцевої концентрації) зважують на терезах з похибкою $\pm 1\%$ і додають у рідину зі збудником, який треба інактивувати, з дотриманням вимог септики та антисептики. Після повного розчинення уротропіну зазначену рідину інкубують при 37°C протягом 24-72 годин (ефективну концентрацію уротропіну та термін і температуру інкубації оптимізують для кожного агента окремими дослідженнями). Протягом інкубації оброблювану рідину кілька разів на добу (не менше 3-х) ретельно перемішують. По закінченні інкубації визначають інфекційну активність обробленої уротропіном рідини і роблять висновок щодо повноти інактивації збудника.

Приклад 1. Інактивація віральної сировини

До бутля з 5 л культуральної сировини вірусу тешенської хвороби (шт ХДЗВА-814) в умовах

вірусологічного боксу з дотриманням вимог антисептики додають 50г фармакопейного уротропіну, зваженого на аптечних терезах. Ретельно перемішують рідину в бутлі - до повного розчинення уротропіну. Бутлю ставлять на шутель-апарат в термальній кімнаті (37°C) і інкубують на ньому протягом 48 годин.

Після закінчення терміну інкубації беруть зразок рідини на аналіз залишкової інфекційної активності і випробування антигенної специфічності.

Приклад 2. Контроль повноти інактивації препарату збудника, інактивованого уротропіном.

Зразок рідини за прикладом 1, паралельно зі зразком вихідної (не обробленої теотропіном) віральної сировини титрують в пробірочній культурі перещеплюваних клітин нирки свині РК-15 з розведення 10^3 до 10^8 за стандартною методикою. Титр вірусу "ХДЗВА-814" в зразку неінактивованої сировини становить не менше 7,5 Іг ТЦД₅₀/мл, тоді

як зразок сировини після інактивації за прикладом 1 не визиває змін моношару РК-15 в жодній з пробірок. Три сліпих пасажі досліджуваного зразку на клітинах РК-15 не приводять до накопичення вірусу "ХДЗВА-814", що свідчить про його повну інактивацію уротропіном.

Приклад 3. Контроль повноти інактивації та антигенної активності препарату збудника, інактивованого уротропіном.

Зразок рідини за прикладом 1, паралельно зі зразком вихідної (не обробленої теотропіном) віральної сировини титрують в реакції зв'язування комплементу з розведення 1:2 до 1:16 з використанням 4 одиниць комплементу та 8 комплементзв'язуючих одиниць специфічної сироватки, у загальному об'ємі 125 мкл (в 96-лункових планшетах). Постановку реакції супроводжують контролюми специфічності реакції, гемтоксичності та антикомплементарності зразка.