



УКРАЇНА

(19) UA (11) 39348 (13) A

(51) 7 A61K39/05

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ  
НА ВИНАХІДвидається під  
відповідальність  
власника  
патенту

## (54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ ПОЗАКЛІТИННОГО ДИФТЕРІЙНОГО АНТИГЕНА

(21) 2000052925

(22) 23.05.2000

(24) 15.06.2001

(33) UA

(46) 15.06.2001, Бюл. № 5, 2001 р.

(72) Щетініна Валентина Миколаївна, Ніколаєнко  
Вероніка Миколаївна, Альсaban Абдулхакім, УЕ,  
Тарасов Олександр Андрійович, Кліса Тетяна  
Леонідівна(73) Харківський науково-дослідний інститут мікро-  
біології та імунології ім. І.І. Мечникова

(57) Спосіб отримання позаклітинного дифтерійно-го антигену шляхом культивування токсигенного штаму *Corynebacterium diphtheriae* PW-8 у рідкому живильному середовищі, який **відрізняється** тим, що використовують іммобілізовану на діетиламінноетилцелюлозі (ДЕАЕ-целюлозі) попередньо оброблену 0,08-0,12% етилендіамінтетраацетатом натрію (ЕДТА-Na2) культуру; культивування *C. diphtheriae* PW-8 проводять на живильному середовищі, виготовленому на основі відходів гамаглобулінового виробництва в присутності 40-60 мкг/мл бензилпеніциліна.

Винахід відноситься до медицини, а саме до мікробіології, зокрема до області одержання антигенних речовин з метою використання в складі протективних та діагностичних препаратів.

Відомий глибинний (реакторний) спосіб одержання дифтерійних токсинів [Руководство по вакцинно-сывороточному делу/ под ред. П.Н. Бурга-сова / - М: Медицина; 1978 - 439 ст.] полягає в культивуванні виробничого штаму *Corynebacterium diphtheriae* PW-8 в реакторах при аерації і постійному перемішуванні культури. Культивування проводять на середовищі Лінгуда з вмістом амінного азоту 120-140 мг% з домішками глюкози та мальтози (0,6%); тривалість процесу 36-40 годин, температура 34-35°C. Для стимулювання токсиноутворення використовують засів маточною культурою *C. diphtheriae*, прокультивованою в бульйоні Лінгуда, або реакторною культурою 24-годинного строку культивування, чи "посівну" культуру, взятую з реактора в фазі експоненціального росту. Препарати, що одержують при цьому, мають вихідний титр 80-100 Lf. Недоліками реакторного способу є дорожнеча, зумовлена необхідністю затрат електроенергії, наявністю спеціального обладнання.

Прототипом способу, який пропонується, є стаціонарний спосіб одержання дифтерійного токсину [О. Савицкая, Н.Шапиро. Иммунобиологическая характеристика компонентов дифтерийного анатоксина, удаляемых при получении очищенного препарата // Иммунохимия дифтерийных токсинов и комплексных антигенов. Сб. тр. Ленинградского ИВС. - Ленинград, 1966 - Т.5, вып. 2. - с. 75-82.], який здійснюється таким чином. Культуру в стані логарифмічного росту засівають в живильне

середовище (посівна доза 200 млн/мл), розлите в лабораторний посуд (колби, матраци, бутілі) і вирощують в стані спокою на поверхні живильного середовища при t 34-35°C. Як живильне середовище використовують бульйон Мартена з вмістом амінного азоту 120-140 мг%, з добавками глюкози та ацетату натрію (по 0,6%). Культивування здійснюється протягом 5-7 діб, одержувані титри флокуляції становлять 16-40 Lf.

Спільними ознаками прототипу та запропонованого рішення є культивування штаму *C. diphtheriae* PW-8 на живильному середовищі в стаціонарних умовах при t 34-35°C.

Основним недоліком прототипу є довга тривалість культивування (7 діб), яка пов'язана з відсутністю використання засобів оптимізації процесів біосинтезу позаклітинних антигенів і дорожнеча живильного середовища, яке виготовляється з високоякісного м'яса.

В основу винаходу поставлено задачу розробити спосіб одержання дифтерійного позаклітинного антигену шляхом використання іммобілізованої форми *C. diphtheriae* PW-8 та інших заходів, що сприяють оптимізації токсиноутворення, забезпечити скорочення строків одержання фільтратів культур *C. diphtheriae* з задовільними титрами флокуляції.

Суть винаходу полягає в розробці комплексу заходів підвищення технологічної активності штамів *C. diphtheriae* з урахуванням сучасних досягнень в галузі вивчення фізіологічних властивостей іммобілізованих форм мікроорганізмів.

(19) UA (11) 39348 (13) A

Суттєвими ознаками запропонованого способу є використання прийомів, що служать оптимізації процесу токсиноутворення:

1. Використання преобробленої 0,08-0,12% етилендіамінтетраацетатом натрію (ЕДТА-Na<sub>2</sub>) та іммобілізованої на діетиламіноетилцелюлозі (ДЕАЕ-целюлозі) культури.

2. Використання живильного середовища, розробленого спеціально для токсиноутворення *C. diphtheriae* на основі відходів гамаглобулінового виробництва (Пат. № 96041475).

3. Використання добавок бензилпеніциліну в кількості 40-60 мкг/мл з метою стимулювання продукції флокулюючого антигену *C. diphtheriae* та стабілізації іммобілізованої форми.

Ознаки 1-3 є достатніми у всіх випадках, що доводиться нижче наведеними даними.

Доведено, що приєднання клітин до твердої основи дає можливість стимулювання певних ланок метаболізму, яке дозволяє оптимізувати технології одержання позаклітинних речовин [Anderson J.C. Immobilized cell physiology // Proc. Eng. Asp. Immobilized cell sys. - 1986 - V 9., № 1. - P. 153-176; Cainer J. Z. Immobilization of Microorganisms // Ann. N.J.Acad. Sci. - 1986. - V 147. - P 465-467].

В способі, що пропонується, як носій використовується діетиламіноетилцелюлоза (ДЕАЕ-целюлоза). Доцільність вибору цього носія встановлено експериментально, дані з порівняльної характеристики різних способів іммобілізації *C. diphtheriae* наведені в табл. 1.

Як видно із приведених даних, найбільша щільність іммобілізації із збереженням життєздатності, що оцінювалась за показником дегідрогеназної активності, має місце при використанні ДЕАЕ-целюлози.

Відомо, що оптимізація технологічних процесів, заснованих на іммобілізованих клітинах, часто досягається використанням частково пошкоджених клітин, які, однак, не втратили необхідні метаболічні послідовності або життєздатність [Saburo Fukui, Atsuo Tanaka. Immobilized microbial cells.// Ann.Rev.Microbiol. - 1982. - v. 36. - P. 145-172]. Порівняльна ефективність використання різних пошкоджуючих речовин на здатність *C. diphtheriae* до продукції позаклітинного антигену наведена в табл. 2.

Дані табл. 2 доводять, що здатність до задільної продукції флокулюючих антигенів після проведеної преобробки стимулюється тільки при використанні ЕДТА. В роботі використовувалась комерційна динатрієва сіль етилендіамінтетраацетат:  $C_{10}H_{14}O_8N_2Na_2 \times 2H_2O$

Було визначено оптимальну концентрацію ЕДТА (табл. 3).

Як видно із приведених результатів, найбільшою мірою вихід флокулюючого антигену відбувається при преобробці клітин *C. diphtheriae* в діапазоні концентрацій ЕДТА 0,08-0,16%, а більш високі концентрації преоброблюючого агента не сприяють досягненню ефекту.

Відомо, що присутність в середовищі бактеріостатичних концентрацій пеніциліну сприяє утворенню позаклітинних антигенів (токсинів) [Кушнарьов В.М., Смирнова Г.А., Ильинская Е.А., Лобанова А.Н. Электронномикроскопическое изучение

дифтерийных бактерий в процессе токсинообразования // ЖМЭИ. - 1978. - № 6. - с. 12-17; Кушнарьов В.М., Иващенко В.И., Смирнова Г.А., Лобанова А.Н. и др. Ультраструктура и токсинообразование *Corynebacterium diphtheriae* PW-8 при концентрировании в присутствии пенициллина // ЖМЭИ. - 1973. - № 9. - с. 25-30]. Результати, що підтверджують доцільність добавок бензилпеніциліну для оптимізації продукції флокулюючого антигену іммобілізованою формою, приведені в табл. 4.

Як видно із приведених даних, добавка бензилпеніциліна в суббактеріостатичних концентраціях (40-60 мкг/мл) стимулює продукцію антигену, що вступає в реакцію флокуляції, і може розглядатись як фактор, що сприяє стабільності іммобілізованої культури, перешкоджаючи виходу мікроорганізмів в середовище культивування.

Результати, що були одержані у наведених вище експериментах, дозволили визначити такі параметри способу одержання флокулюючого антигену *C. diphtheriae*:

- носій для іммобілізації - ДЕАЕ-целюлоза;
- реагент для преобробки - ЕДТА-Na<sub>2</sub> в концентрації 0,08-0,12;
- добавка бензилпеніциліну - 40-60 мкг/мл;
- середовище культивування - середовище, виготовлене на основі відходів гама-глобулінового виробництва (Пат. № 96041475).

Спосіб одержання фільтратів, що містять позаклітинний флокулюючий антиген, з використанням іммобілізованої *C. diphtheriae* здійснюється в три етапи:

1. Преобробка клітин *C. diphtheriae*;
2. Іммобілізація преоброблених клітин *C. diphtheriae* на ДЕАЕ-целюлозі;
3. Одержання фільтратів, що містять флокулюючий антиген *C. diphtheriae*.

#### 1. Преобробка клітин *C. diphtheriae*.

*C. diphtheriae* вирощують на щільному середовищі. 24-годинну культуру змивають 0,08-0,12% водним розчином ЕДТА-Na<sub>2</sub> і готують суспензію з щільністю 15-20 млрд/мл. Суспензію витримують при кімнатній температурі 1-2 год., після чого відмивають 1/15 М Na-K фосфатним буфером рН 6,8.

2. Іммобілізація преоброблених клітин *C. diphtheriae* на ДЕАЕ-целюлозі.

Відмиті преоброблені клітини *C. diphtheriae* іммобілізують на ДЕАЕ-целюлозі за відомим методом [Д.Ф. Кеннеди, И.А. Кабрал. Иммунизация биокатализаторов металлохелатным методом / В кн. Иммунизированные клетки и ферменты. - М.: Мир, 1988. - 215 с]. Целюлозу з іммобілізованими клітинами зберігають в холодильнику.

3. Одержання фільтратів, що містять флокулюючий антиген *C. diphtheriae*.

Іммобілізовану культуру поміщають в рідке живильне середовище, виготовлене за патентом № 96041475 з вмістом амінного азоту 180 мг%, вносять бензилпеніцилін із розрахунку 40-60 мкг/мл і витримують в термостаті при t 37°C протягом 120 год., контролюючи процес наростання титрів Lf щодобово (табл. 5).

Як видно із приведених даних, використання іммобілізованої форми дає більш високий титр реакції флокуляції (45-56 Lf) і накопичення відбувається раніше, ніж у вільної культури.

Прозору рідину відділяють від іммобілізата, фільтрують через стерилізуючі пластини фільтра Зейтца і використовують в роботі.

#### Приклад № 1

Штам *C. diphtheriae* PW-8 (ізолят № 667) засіяно газоном на чашку Петрі з середовищем, виготовленим за Пат. № 96041475. Посів проінкубовано 24 год. в термостаті при  $t$  35°C, після чого змито 0,085% розчином ЕДТА-Na2. Об'єм змитої культури становив 10 мл, оптична щільність за стандартом каламутності - 16 млрд/мл. Клітини залишили при кімнатній температурі 1 год., після чого відділили від рідкої фази центрифугуванням при 6000 g, відмили двічі 1/15 М К-На фосфатним буфером pH 6,8.

Відмиту преоброблену культуру іммобілізували на ДЕАЕ-целюлозі. Для цього відмиту культуру ресуспендували в 10 мл 1/15 М К-На фосфатного буфера pH 6,8 і з'єднали з 2 см<sup>3</sup> ДЕАЕ-целюлози, приготованій в аніонітній формі і урівноваженій тим же буфером (Аналитические методы белковой химии // Под ред. В. Ореховича. - М.: Издательство иностранной литературы.-1963. - 643 с.). Суміш розмішали і залишили при кімнатній температурі 1 год. збовтуючи протягом перших 30 хвилин. Через 1 год. вміст пробірки просвітлішав. Надосадову рідину злили, ДЕАЕ-целюлозу з іммобілізованими клітинами помістили в живильне середовище, виготовлене за Пат. № 96041475. Об'єм середовища - 50 мл, вміст амінного азоту - 148 мг%, вміст бензилпеніциліна - 40 мкг/мл.

Суміш витримали при  $t$  35°C 96 год., контролюючи наростання титру Lf. Кінцевий титр 48 Lf.

Прозору рідину злили з іммобілізованої культури і використали в роботі.

#### Приклад № 2

*C. diphtheriae* шт. PW-8 (ізолят № 195) виростили на чашках Петрі на кров'яному агарі. 24-годинну культуру змили 0,098% ЕДТА-Na2, витримали при кімнатній температурі 1 год.; відділили клітини від рідкої фази центрифугуванням при 6000 g і двічі відмили 1/15 М К-На фосфатним буфером pH 6,8.

Клітини іммобілізували на ДЕАЕ-целюлозі як описано вище. Іммобілізовану культуру помістили в живильне середовище, виготовлене за патентом № 96041475 з вмістом бензилпеніциліна 50 мкг/мл. Інкубація в термостаті тривала 96 год.

Кінцевий титр Lf - 39 Lf.

#### Приклад № 3

Клітини *C. diphtheriae* шт. PW-8 (ізолят № 155) вирощені на чашках Петрі з агаризованим середовищем, виготовленим за патентом № 96041475 змили 10 мл 0,12% ЕДТА-Na2. Щільність суспензії - 16,3 млрд/мл. Суспензію витримали при кімнатній температурі 1 год., відмили та іммобілізували, як в попередніх прикладах. Іммобілізовану культуру перенесли в 50 мл середовища, виготовленого за патентом № 96041475 з вмістом бензилпеніциліна 60 мкг/мл. Інкубація тривала 96 год. Кінцевий титр Lf - 47 Lf.

Таблиця 1

Підбір носіїв для іммобілізації *C. diphtheriae*.

Носій	Тип зв'язку мікроб-носій, що має місце	% іммобілізації	<i>Corynebacterium diphtheriae</i> в	Дегідрогеназна активність (показник життєздатності) мкг дф/млрд.год	Стабільність при зберіганні в холодильнику
1	2	3	4	5	6
Активоване вугілля	адсорбція	10-13	4,8	0,010	3 доби
Пемза, активована CrCl <sub>3</sub>	хелатний зв'язок	6,0	2,6	0,005	5 діб
Хлорид титана	хелатний зв'язок	100	80-85	0,000	Весь час спостереження (1 міс.)
Целюлоза	адсорбція	15-20	10-12	0,015	3 доби
Целюлоза, активована FeCl <sub>3</sub>	хелатний зв'язок	20-30	15-20	0,004	3 доби
Діетиламіноетилцелюлоза (ДЕАЕ-целюлоза в аніонітній формі)	Іонний зв'язок	56-65	61,5	0,038	Весь час спостереження (1 міс.)
Поліакріламідний гель (ПААГ)	Включення в гель	100	100	0	-

тф-трифенілформазан

Таблиця 2.

Дія пошкоджуючих речовин на здатність *C. diphtheriae* до іммобілізації і продукція флокулюючого антигену пошкодженою культурою *C. diphtheriae*

Пошкоджуюча речовина	Концентрація	Здатність до іммобілізації (% іммобілізації)	Продукція флокулюючого антигену [по годинах]				
			24	48	72	96	120
ЕДТА етилендіамінтетраацетат	0,1%	57%	-	-	16 Lf	32 Lf	48 Lf
ДСН додецилсульфат натрію	0,1%	33%	-	-	-	10 Lf	12 Lf
Хлороформ	1-2 краплини на 2мл культури 16 млрд/мл	54%	антиген не утворюється				
Пеніцилін	50 мг/мл культури 15 млрд/мл	56%	антиген не утворюється				
Контроль	необроблена культура	65%	-	-	-	12 Lf	16 Lf

Таблиця 3.

Накопичення антигену, здатного вступати в реакцію флокуляції, іммобілізованою *C. diphtheriae*, преобробленою різними концентраціями ЕДТА.

Концентрація преоброблюючого агента (ЕДТА), %	Накопичення антигену, Lf/мл. Тривалість експозиції. [по годинах]			
	24	48	72	96
0,02	-	-	18	22
0,04	-	-	12	16
0,06	-	5	10	12
0,08	5	12	15	15
0,10	10	12	30	36
0,12	5	12	30	46
0,16	8	12	32	46
0,18	антиген не утворюється			
0,20	антиген не утворюється			
0,25	антиген не утворюється			

Таблиця 4.

Накопичення позаклітинного антигену *C. diphtheriae* іммобілізованою формою культури в присутності бензилпеніциліну.

Концентрація антибіотика мкг/мл	Титр антигену в реакції флокуляції, Lf/мл			
	Тривалість культивування [по годинах]			Вигляд культури
	24	48	72	
25	12	36	38	72 год.-частковий вихід культури з носія
40	36	38	40	надосадова рідина прозора
50	38	38	42	надосадова рідина прозора
60	32	36	40	надосадова рідина прозора
75	-	10	11	надосадова рідина прозора
100	-	-	-	надосадова рідина прозора
без антибіотика	-	16	28	72 год.-часткове від'єднання культури від носія

Наростання титрів флокулюючого антигену в досліді.

Тривалість культивування, год.	Титр флокулюючого антигену, Lf/мл	
	імобілізована культура	вільна культура на бульйоні Мартена (прототип)
24	Флокуляція відсутня	Флокуляція відсутня
48	28	Флокуляція відсутня
72	30	Флокуляція відсутня
96	45	16
120	45-56	38

---

ДП "Український інститут промислової власності" (Укрпатент)  
Україна, 01133, Київ-133, бульв. Лесі Українки, 26  
(044) 295-81-42, 295-61-97

---

Підписано до друку \_\_\_\_\_ 2001 р. Формат 60x84 1/8.  
Обсяг \_\_\_\_\_ обл.-вид. арк. Тираж 50 прим. Зам. \_\_\_\_\_

---

УкрІНТЕІ, 03680, Київ-39 МСП, вул. Горького, 180.  
(044) 268-25-22

---