



(19) KG (11) 222 (13) C2

ГОСУДАРСТВЕННОЕ АГЕНТСТВО
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ
ПРИ ПРАВИТЕЛЬСТВЕ КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ (КЫРГЫЗПАТЕНТ)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

к патенту Кыргызской Республики

- (21) 960424.1
(22) 27.06.1996
(31) 9108682.7
(32) 23.04.1991
(33) GB
(46) 01.10.1997, Бюл. №1, 1998
(71) (73) Питман-Мур Инк. (US)
(72) Виндзор Джордж Дэвид (GB)
(56) WO, заявка, №90/07935, A61K 39/02, 1990
(54) Способ получения антигена для вакцины, эффективной для защиты свиней от инфекции, вызванной микроорганизмом родов *Mycoplasma* и *Acholeplasma* отряда *Mycoplasmatales*
(57) Изобретение относится к производству вакцин и предусматривает способ инактивации организмов родов *Mycoplasma* и *Acholeplasma* отряда *Mycoplatales*, в частности, для производства вакцин против указанных организмов, включающего обработку организма этиленимином или его подходящим производным. Организм может быть инактивирован этиленимином, генерированным *in situ* путем добавления 2-бромэтиламина гидробромида к культуре организма в условиях поддержания слабощелочного pH. Изобретение можно использовать в производстве вакцин против *Mycoplasma hyopneumoniae* для борьбы с эпизоотической пневмонией свиней и 3 з.п. ф-лы, 2 пр.

Изобретение относится к производству вакцин, точнее, к производству вакцин против микоплазм.

Использованный в тексте термин "Микоплазма" относится к организмам из отряда *Mycoplasmatales* и, в особенности, к членам родов *Mycoplasma* и *Acholeplasma* внутри этого отряда.

Микоплазмы широко распространены в природе, и некоторые их патогенные линии являются возбудителями ряда болезней человека и животных. Так, респираторные заболевания, как, например, пневмония человека и животных, вызываются этими организмами, и эти болезни характеризуются длительным течением и высокой смертностью. В этой связи следует особенно упомянуть эпизоотическую пневмонию

свиней (ЭПС), которая имеет большое экономическое значение, особенно в случае интенсивного содержания животных, и возбудителем которой является *Mycoplasma hyopneumoniae* (первоначально известная как *M. suis-neumoniae*).

Ранее был сделан ряд попыток получения вакцин для защиты животных от микоплазменных инфекций, особенно ЭПС. Как правило, метод получения вакцин включал стадии роста организма, например *M. hyopneumoniae*, в культуре до желаемого количества, инактивацию и сбор клеток, и оптимальное получение вакцины из собранных клеток и подходящего адьюванта. Микоплазмы обычно трудно выращивать в культуре, и при получении вакцины важно убедиться, что антигенностъ живого организма сохранилась при инактивации. Наиболее распространенным методом инактивации бактерий при производстве вакцин является обработка формалином, и именно этот метод обычно применялся при попытках получения вакцин против микоплазм. До сих пор, таким образом, не получено вакцины, дающей достаточную защиту от ЭПС.

Известен также ряд различных методов инактивации вирусов при производстве вакцин против вирусных болезней, в том числе обработка живого вируса этиленимином. Однако, применению этиленимина сильно мешает его высокая токсичность и оно возможно только при соблюдении очень серьезных предосторожностей.

Также исследовано применение бинарного этиленамина для инактивации микоплазменных загрязнений человеческой сыворотки, применяющейся при выращивании клеточных культур (Cristianson et. Al. J. Clin. Microbiol. 11(4), 377 - 379, 1980), однако сделан вывод, о том, что бинарный этиленимин не может быть рекомендован для этой цели.

Настоящее изобретение предусматривает процесс инактивации организмов из родов *Mycoplasma* и *Acholeplasma* из отряда *Mycoplasmatales*, в частности при получении вакцины против указанных организмов, который включает обработку организма этиленимином или подходящим производным этиленимина.

Настоящее изобретение также предусматривает процесс получения вакцин против организмов рода *Mycoplasma* и *Acholeplasma* из отряда *Mycoplasmatales*, который включает выращивание организма в культуре, инактивацию организма обработкой этилениминою или его подходящим производным, сбор клеток организма и производство вакцины из клеток.

Кроме того, изобретение предусматривает производство вакцин против организмов из рода *Mycoplasma* и *Acholeplasma* отряда *Mycoplasmatales*, включающих клетки указанных организмов, инактивированные обработкой этилениминою или его подходящим производным.

Способ согласно настоящему изобретению включает использование этиленимина или его подходящего производного. Подходящими производными этиленимина являются его ацильные производные, например ацетилэтенимин. Далее изобретение будет описано в частности, с использованием собственно этиленимина.

Как указано выше, этиленимин является высокотоксичным и опасным веществом и, хотя он сам, согласно формуле изобретения, может быть использован для инактивации микоплазм, желательно его генерировать *in situ* в культуре организма. Способ генерации его *in situ* должен быть таким, чтобы прекурсор был безопасным в использовании, и сам этиленимин обезвреживался бы после выполнения своей функции инактивации организма. Способ генерации и инактивации этиленимина не должен сильно влиять на антигенностъ организма.

Согласно приведенной формуле изобретения этиленимин генерировали *in situ* путем добавления 2 бромэтиламингидробромида (БЕА) к культуре микоплазмы. БЕА является относительно инертным твердым веществом, но в слабощелочной среде циклизуется с образованием этиленимина. Поэтому во время добавления БЕА необходимо довести pH культуры до слабощелочного, желательно в интервале от 7.0 до 8.0, более желательно от 7.3 до 7.7, и предпочтительнее всего около 7.5.

Если непрерывно не поддерживать рН на этом слабощелочном уровне во все время инактивации организма, его величина падает. Поэтому после добавления БЕА рН культуры следует постоянно подводить, чтобы поддерживать слабощелочную реакцию среды в течение периода времени, достаточного для полной инактивации организма. Добавление щелочи безусловно необходимо в течение первых нескольких часов, например первых трех, но может также оказаться необходимым проводить подведение рН культуральной среды и дольше, например, около 20 - 24 часов. рН культуральной среды может быть доведен до желаемой слабощелочной величины добавлением любой щелочи, например гидроксида щелочного металла, лучше всего гидроксида натрия.

После окончания инактивации организма сам этиленимин может быть обезврежен добавлением подходящего реагента, переводящего его в безопасное в обращении соединение. Примером подходящих инактивирующих агентов являются тиосульфат натрия, который инактивирует этиленимин путем размыкания кольца, и лимонная кислота. Затем клетки микоплазмы собирают, например, центрифугированием, и, чтобы избежать какого-либо воздействия этиленимина на оператора, оставшуюся культуральную среду можно вылить в дополнительный объем водного раствора тиосульфата натрия.

Настоящее изобретение применимо к любому организму рода *Mycoplasma* и *Acholeplasma* отряда *Mycoplasmatales*. Примерами таких организмов являются *M. hyopneumoniae*, *M. bovis*, *M. dispar*, *M. orale*, *M. hominis*, *M. arginini* и *A. laidlawii*. Изобретение особенно применимо к производству вакцин против ЭПС, и будет далее описано на примерах, относящихся к организму *M. hyopneumoniae*.

Процесс получения вакцины против *M. hyopneumoniae* начинают с посева культуры указанного организма. Пригодны культуры из коллекций, например *M. hyopneumoniae* можно получить из Национальной коллекции культур, Colindale, Великобритания. Посевную культуру растят в подходящей среде и затем инокулируют в конечный объем культуральной среды. В зависимости от масштаба производства вакцины конечный объем среды может быть, например, от 40- 45 до 200 л или более, и посевная культура может быть наращена до объема от 1 до 10 % конечного объема культуральной среды до инокуляции в конечный объем среды.

Подходящая культуральная среда включает, например, стандартный питательный бульон, обогащенный сывороткой и экстрактом дрожжей. Обычно включают также источник энергии типа глюкозы и антибиотик типа полимиксина. рН должен быть в интервале 7.2-7.6. Организм растет в культуре в условиях контролируемого рН, желательно 7.1- 7.3, рН регулируют добавлением щелочи типа гидроксида натрия. Рост ведут при нормальной температуре инкубации, например $36\pm1^{\circ}\text{C}$, и продолжают до тех пор, пока метаболическая активность культуры не начнет падать, что видно по потреблению щелочи для подведения рН.

Как только метаболическая активность культуры начнет падать, организм инактивируют добавлением БЕА к культуральной среде. Например, БЕА можно добавлять в виде водного раствора известной концентрации до конечной концентрации в среде около 0.82 г/л, что соответствует 4мМ. Одновременно или непосредственно перед добавлением БЕА рН культуральной среды доводят до слабощелочного, как правило, около 7.5, добавлением щелочи типа гидроксида натрия.

БЕА в этих условиях циклизуется, давая этиленимин, который инактивирует *M. hyopneumoniae*. Процесс инактивации требует нескольких часов, как правило, около 24 ч, в течение которых культуру поддерживают при нормальной инкубационной температуре. Важно, чтобы этиленимин продолжал присутствовать в среде в течение всего времени, необходимого для инактивации. Без подведения рН среды со временем уменьшается. Поэтому рН среды следует подводить непрерывно в течение всего процесса инактивации, и его поддерживают на желательном уровне путем добавления щелочи, если это требуется.

Как только дезактивация организма заканчивается, этиленимин в культуральной среде разрушают добавлением, например, тиосульфата натрия или лимонной кислоты. Например, добавляют избыток водного раствора тиосульфата натрия до концентрации около 1 г/л в культуральной среде.

После дезактивации этиленимина клетки собирают, а оставшуюся культуральную среду можно вылить в дополнительный объем водного раствора тиосульфата натрия снова до конечной концентрации 1 г/л.

После сбора клеток оценивают выход антигена путем определения белка. Собранный концентрат клеток может быть использован для получения вакцины. В частности, клетки разбавляют до соответствующей концентрации антигена, например, фосфат-забуференным физиологическим раствором, и, при желании, делают вакцину с подходящим адьювантом типа масла, сапонина или ДЕАДекстрана. Лучшим адьювантом является масло.

Вакцина, полученная вышеописанным общим способом из организма *M. hyopneumoniae*, сохраняла антигенные свойства живого организма и была успешно использована для защиты свиней от ЭПС.

Не вдаваясь в специальные теории, можно все же сказать, что обычные способы инактивации бактерий при получении вакцин (например, обработка формалином), влияют на поверхностные белки бактерий, и при этом влияние на антигенные свойства бактерий может быть вредным. В некоторых случаях влияние на поверхностные свойства бактериальных клеток может быть таким, что клетки становятся непригодными для получения вакцин, и это особенно применимо к таким бактериям, как микоплазма, которые трудно выращивать в культуре.

При таких обстоятельствах необходимо для получения вакцин использовать способ инактивации организма, имеющий как можно меньшее вредное влияние на антигенные свойства клеток. Считается, что этиленимин дезактивирует организм, разрушая его генетический материал (ДНК) без заметного влияния на поверхностные белки клетки.

Изобретение иллюстрируют следующие примеры.

Пример 1.

БЕА (0.082 г) добавляли к 100 мл активно растущей культуры *M. hyopneumoniae* 10110 до конечной концентрации в культуральной среде 4мМ. pH доводили до 7.5 водным раствором гидроксида натрия (1 N), и далее измеряли и подводили следующим образом: измеренный pH доведен до

1 час	6.95	7.5
2	7.2	7.5
3	7.4	7.5
4	7.45	не подводили
5	7.45	
6	7.45	

pH подводили 0.1 N раствором гидроксида натрия.

Каждый час брали образцы для разбавления и подсчета клеток, и также через 24 ч для прямого подсчета. Через 24 ч живых организмов не было обнаружено.

Пример 2.

M. hyopneumoniae субкультивировали на среде следующего состава:

основной питательный бульон	65 мл
сыворотка свиней	15 мл
прокипяченный экстракт крови	10
дрожжевой экстракт	10
цистеин-HCl (1 %)	1
глюкоза (20 %)	5
феноловый красный (0.4 %)	1
амфициллин (0.5 %)	0.5

ацетат таллия (1 %)	2.5
---------------------	-----

Субкультивирование вели в последовательности 10, 100, 400 и 4000 мл. Когда культура в объеме 4 л обнаружила признаки активного роста (легкое помутнение и сдвиг pH в кислую сторону), ее инокулировали в 40 л свежей среды, pH культуры поддерживали равным 7.2 путем добавления водного гидроксида натрия, когда это было необходимо.

Через 13 дней расход гидроксида натрия снизился, и 36.5 г БЕА в 100 мл дистиллированной воды были введены в культуру путем продавливания через стерилизующий фильтр. В среде поддерживали pH 7.5 путем добавления по мере необходимости водного раствора гидроксида натрия. Через 24 ч клетки собирали центрифугированием, и отработанная среда была выпита в лимонную кислоту до 0.2 % концентрации конечного раствора. Альтернативной процедурой на этой стадии может быть добавление через 24 ч тиосульфата натрия до концентрации 1 г/л перед центрифугированием и выливание отработанной культуральной среды в дополнительный объем водного раствора тиосульфата. Альтернативная процедура дает те же результаты.

Полученный после центрифугирования концентрированный антиген гомогенизировали в 300 мл фосфат-забуференного физиологического раствора (ФБС), гомогенизировали и центрифугировали снова. Второй осадок антигена снова сусpendировали в 300 мл ФБС и хранили в аликвотах при -70°C.

Достаточное количество антигена эмульгировали с масляным адьювантом (Marcol: Arlacel) так, чтобы получить примерно 13 мг на подкожную дозу, и вводили 6 свиньям при 10 неинокулированных контрольных животных. Через 4 недели все свиньи были подвергнуты контролльному заражению путем введения последовательно в течение 3 дней в полость носа 5 мл гомогената легких, содержащих организмы *M. hyopneumoniae*. После забоя через 4 недели после контрольного заражения были обнаружены сильные изъязвления у контрольных, но не у вакцинированных животных, т.е. вакцинацией была достигнута полная защита от контрольного заражения.

Формула изобретения

1. Способ получения антигена для вакцины, эффективной для защиты свиней от инфекции, вызванной микроорганизмом родов *Mycoplasma* и *Acholeplasma* отряда *Mycoplasmatales*, включающий выращивание микроорганизма в культуральной среде, его инактивацию, сбор клеток микроорганизма и выделение антигена из клеток, отличающийся тем, что микроорганизм инактивируют обработкой этиленимином, вырабатываемым *in situ* в процессе добавления 2-бромэтиламингидробромида в культуральную среду, pH которой регулируют добавлением щелочи, такой как гидрооксид щелочного металла, на уровне от выше 7.0 до около 8.0 в течение, по меньшей мере, 3 ч для обеспечения полной инактивации микроорганизма.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что pH поддерживают в пределах 7.3 - 7.7, предпочтительно 7.5.

3. Способ по пп. 1 или 2, отличающийся тем, что после инактивации микроорганизма этиленимин или его производное инактивируют добавлением тиосульфата натрия или лимонной кислоты, которые превращают этиленимин в безопасную форму.

4. Способ по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что микроорганизмом является *M. hyopneumoniae*.

Составитель описания
Ответственный за выпуск

Кожомкулова Г.А.
Ногай С.А.

Кыргызпатент, 720021, г. Бишкек, ул. Московская, 62, тел.: (312) 68 08 19, 68 16 41, факс: (312) 68 17 03