



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2013110939/10, 12.03.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
12.03.2013

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 12.03.2013

(45) Опубликовано: 10.09.2014 Бюл. № 25

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: (см. прод.)

Адрес для переписки:

355035, г.Ставрополь, ул. Советская, 13-15,
СтавНИПЧИ

(72) Автор(ы):

Будька Дмитрий Александрович (RU),
Катунина Людмила Семёновна (RU),
Куличенко Александр Николаевич (RU),
Абзаева Наталья Вячеславовна (RU),
Иванова Галина Филипповна (RU),
Тюменцева Ирина Степановна (RU),
Старцева Ольга Леонидовна (RU),
Фисун Алиса Анатольевна (RU),
Гостищева Светлана Евгеньевна (RU),
Коготкова Ольга Ивановна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное казённое учреждение
здравоохранения Ставропольский научно-
исследовательский противочумный институт
Федеральной службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей и благополучия
человека (RU)(54) СРЕДА ВЫСУШИВАНИЯ ЖИДКАЯ ДЛЯ СТАБИЛИЗАЦИИ БИОМАССЫ ВТОРИЧНОГО
СБОРА ЧУМНОГО МИКРОБА ВАКЦИННОГО ШТАММА EV

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии и микробиологии и представляет собой жидкую среду высушивания для стабилизации биомассы вторичного сбора чумного микроба вакцинного штамма EV. Среда содержит 8,0-12,0 г/л желатина медицинского; 80,0-120,0 г/л сахарозы; 8,0-12,0 г/л тиомочевины; 2-3 мл 20% раствора натрия едкого в чешуйках и воду для инъекций до 1 л. Настоящее изобретение позволяет получить

качественную жидкую среду высушивания для стабилизации биомассы вторичного сбора чумного микроба вакцинного штамма EV с повышенными стабилизирующими свойствами и может быть использовано для приготовления суспензии для инъекций, кожного скарификационного нанесения в ампулы объеме 1 мл. 3 пр.

(56) (продолжение):

RU2088656 C1, 27.08.1997. . KZ22420 A4, 15.04.2010. . RU2291193 C2, 10.01.2007. .



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 528 069** (13) **C1**

(51) Int. Cl.
C12N 1/20 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: 2013110939/10, 12.03.2013

(24) Effective date for property rights:
12.03.2013

Priority:

(22) Date of filing: 12.03.2013

(45) Date of publication: 10.09.2014 Bull. № 25

Mail address:

355035, g.Stavropol', ul. Sovetskaja, 13-15,
StavNIPChI

(72) Inventor(s):

**Budyka Dmitrij Aleksandrovich (RU),
Katunina Ljudmila Semenovna (RU),
Kulichenko Aleksandr Nikolaevich (RU),
Abzaeva Natal'ja Vjacheslavovna (RU),
Ivanova Galina Filippovna (RU),
Tjumentseva Irina Stepanovna (RU),
Startseva Ol'ga Leonidovna (RU),
Fisun Alisa Anatol'evna (RU),
Gostishcheva Svetlana Evgen'evna (RU),
Kogotkova Ol'ga Ivanovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federal'noe kazennoe uchrezhdenie
zdravookhraneniya Stavropol'skij nauchno-
issledovatel'skij protivochumnyj institut
Federal'noj sluzhby po nadzoru v sfere zashchity
prav potrebitelej i blagopoluchija cheloveka
(RU)**

(54) **LIQUID MEDIUM OF DRYING FOR STABILISATION OF BIOMASS OF SECONDARY HARVESTING OF PLAGUE MICROBE OF VACCINE STRAIN EV**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention is a liquid medium of drying for stabilisation of biomass of secondary harvesting of plague microbe of vaccine strain EV. The medium comprises 8.0-12.0 g/l medical gelatine; 80.0-120.0 g/l sucrose; 8.0-12.0 g/l thiourea; 2-3 ml of 20% sodium hydroxide solution in flakes, and water for injection up to 1 litre.

EFFECT: invention enables to obtain high-quality liquid medium of drying for stabilisation of biomass of secondary harvesting of plague microbe of vaccine strain EV with enhanced stabilising properties and can be used to prepare suspension for injections, cutaneous scarification application in ampoules in the volume of 1 ml.

3 ex

R U 2 5 2 8 0 6 9 C 1

R U 2 5 2 8 0 6 9 C 1

Изобретение относится к биотехнологии и микробиологии, может быть использовано для приготовления суспензии для инъекций и накожного скарификационного нанесения.

Известна питательная среда для высушивания биомассы чумного микроба, для приготовления которой используют, г/л: сахарозу - 0,4 кг; желатин - 0,04 кг; натрий глутаминовоокислый - 0,06 кг; тиомочевину - 0,02 кг; пептон ферментативный - 0,002 кг; дистиллированную воду до 1 л. Дистиллированную воду рН 7,0-7,1 подогревают до температуры $(50\pm 2)^\circ\text{C}$, растворяют в ней сахарозу; лактозу; натрий глутаминовоокислый; тиомочевину 0,02; пептон ферментативный - 0,002; проверяют рН и, в случае необходимости, исправляют 20% раствором натра едкого до рН 7,1-7,2. После полного растворения ингредиентов среду фильтруют через полотно фильтровальное, разливают по бутылкам, затем стерилизуют. После стерилизации бутылкам дают остыть до температуры $(22\pm 3)^\circ\text{C}$, затем ставят в термостат при температуре $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ на (48 ± 2) ч. При отсутствии пророста среды высушивания в бутылках ее используют в производстве. (Регламент Производства №368-92. Вакцина чумная живая сухая. 1997 г. 238 с.).

Недостатком данной питательной среды высушивания является ее недостаточные стабилизирующие свойства.

Наиболее близкой к предлагаемому изобретению по технологической сущности является питательная среда высушивания биомассы чумного микроба вакцинного штамма EV, для приготовления которой используют сахарозу - 1 кг; желатин - 0,1 кг; тиомочевину - 0,1 кг; натрий глутаминовоокислый - 0,15 кг; пептон ферментативный - 0,05 кг; натр едкий $(20\pm 1)\%$ раствор - 2,5 мл; дистиллированную воду до 1л. Дистиллированную воду рН 7,0-7,1 подогревают до температуры $(50\pm 2)^\circ\text{C}$, растворяют в ней желатин, проверяют рН и, в случае необходимости, исправляют 20% раствором натра едкого до рН 7,1-7,2, добавляют сахарозу, тиомочевину, пептон, натрий глутаминовоокислый и желатин медицинский. После полного растворения ингредиентов среду фильтруют через полотно фильтровальное, разливают по бутылкам, затем стерилизуют. После стерилизации бутылкам дают остыть до температуры $(22\pm 3)^\circ\text{C}$, затем ставят в термостат при температуре $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ на (48 ± 2) ч. При отсутствии пророста среды высушивания ее используют в производстве. (Регламент Производства №702-97. Вакцина чумная живая сухая. 2002 г. 262 с.).

Недостатком данной питательной среды высушивания является большое количество составляющих ингредиентов в ее составе и то обстоятельство, что сбор биомассы производится в ампулы объемом 5 мл по 2 мл и при недостаточном количестве вакцинируемых остатки вакцины приходится уничтожать, что нерентабельно.

Технологическим результатом предлагаемого изобретения является получение среды высушивания жидкой как стабилизирующей среды нового состава для получения качественной вакцины чумного микроба в достаточном количестве для вторичного сбора биомассы, полученной при более низкой температуре при $-(21\pm 1)^\circ\text{C}$ и в разлитой в ампулы по 1 мл.

Указанный технологический результат достигается тем, что среда высушивания жидкая стабилизирующая содержит сахарозу, желатин медицинский, тиомочевину и очищенную воду при следующем содержании ингредиентов, г/л:

| | |
|-------------------------------------|------------|
| Желатин медицинский | 8,0-12,0 |
| Сахароза | 80,0-120,0 |
| Тиомочевина | 8,0-12,0 |
| Натрий едкий в чешуйках раствор 20% | 2-3 мл |
| Вода для инъекций | до 1 л |

Желатин - сырье для медицинской промышленности ГОСТ 23058-89. Показатели обязательные для проверки: внешний вид - крупинки светло-желтого цвета; вкус - пресный; подлинность - выдерживает испытание по ГФ X, статья 309; продолжительность растворения, мин, не более 25, рН $5,6 \pm 0,4$; запах - специфический, без гнилостного; микроорганизмы - (при отсутствии бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*). Для получения вакцины.

Сахароза ГОСТ 5833-75 ЧДА. Показатели обязательные для контроля: внешний вид - мелкокристаллический порошок; подлинность - выдерживает испытание по X - Государственной Фармакопее (ГФ - X); растворимость - растворим в воде, нерастворим в абсолютном спирте, хлороформе; цветность - выдерживает испытание по ГОСТ 5833-75; кислотность в виде CH_3COOH , % по стандарту 0,005; инвертный сахар 0,05. Для получения вакцины.

Тиомочевина ГОСТ 6344-73 Чда, хч. Показатели обязательные для контроля: внешний вид - бесцветные блестящие кристаллы; растворимость - хорошо растворимы в воде, растворимы при нагревании в спирте; массовая доля основного вещества, в %, не менее 99.

Натрий едкий в чешуйках ГОСТ - 4328-77, (чда) используется для установления рН $7,6 \pm 0,2$.

Вода для инъекций - показатели по стандарту ФС 42-2619-97. Бесцветная прозрачная жидкость без запаха и вкуса: удельная электропроводность, мк С/см - не более 0,5; рН - 5,0-7,0; восстанавливающие вещества по ФС - 2619-97; хлориды, мг/мл не более 0,0001; сульфиты, мг/мл не более 0,003; кальций, мг/мл - 0,0035; тяжелые металлы, мг/мл не более 0,0005; микроорганизмы, ед./мл не более 100 при отсутствии бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Проведенные опыты по отработке температурных режимов культивирования чумного микроба в градиенте 21°C в сравнении с регламентным 27°C показали, что температура выращивания существенно влияет на количество микробных клеток. При этом температура выступает как фактор, влияющий на биосинтетические процессы в цитоплазматических мембранах клеток за счет увеличения содержания ненасыщенных жирных кислот, накопление которых в мембранах клеток способствует их большей устойчивости к лиофилизации (Иванова Г.Ф., Будыка Д.А., Абзаева Н.В. Сборник научных трудов. - Ставрополь, 2007. - С.186-188; Тинкер А.И., Будыка Д.А., Верховцева Г.Н., Печников Е.Н. Актуальные вопросы профилактики особо опасных инфекционных заболеваний. Киров, 1991. - С.38-40).

В отличие от прототипа предлагаемая среда обеспечивает высокие стабилизирующие свойства, проста в применении для получения вторичного сбора биомассы вакцины чумной живой сухой.

При получении вторичного сбора биомассы чумного микроба вакцинного штамма EV необходимо вести подсчет количества микробных клеток на питательной среде плотной для культивирования чумного микроба вакцинного штамма EV, приготовленной на ферментативном гидролизате говяжьего мяса.

Методика подсчета количества микробных клеток

Питательные агары из панкреатического перевара мяса (агар Хоттингера для чумного микроба по ФС 42-3204-98), применяемые для определения количества живых микробных клеток, должны обеспечивать, без добавления стимуляторов, рост микробов вакцинного штамма EV на всех чашках Петри с агаром, засеянных 10 м.к. по ОСО мутности 42-28-85П 10 МЕ. В качестве стимулятора роста к питательным средам перед розливом их в чашки Петри добавляют 1 мл/л гемолизированной крови или 0,25 г/л

свежеприготовленного прокипяченного натрия сернистоокислого. Пробирки с 0,9% раствором натрия хлорида и пипетки, используемые при определении содержания живых микробов в биомассе, должны быть охлаждены до температуры $(4\pm 2)^\circ\text{C}$. Из каждой пробирки с жидкой питательной средой содержимое в количестве 0,1 мл разводят

5 0,9% раствором натрия хлорида в количестве 0,9 мл (основное разведение 10^{-1}). Добавляют последовательно физиологический раствор до получения 1 млрд м.к./мл. Затем пипеткой делают последовательные десятикратные разведения полученной взвеси в 0,9% растворе натрия хлорида, начиная с 10^{-1} ($0,5\pm 0,01$) мл взвеси с $4,5\pm 0,05$ мл 0,9% раствора натрия хлорида и заканчивая 10^{-5} . Разведенную биомассу из двух последних пробирок (10^{-5}) засевают пипеткой по ($0,1\pm 0,01$) мл на 2 чашки Петри с питательным агаром (рН 7,2) и выдерживают при температуре $(21\pm 1)^\circ\text{C}$ 2-3 суток.

Приготовление ферментативного гидролизата из говяжьего мяса.

15 В реактор наливают питьевую воду из расчета имеющегося мяса (на 1 кг мяса 1,5 л воды). Мясо без жира и сухожилий режут на кусочки размером 2,5 на 2,5 см. Варят мясо 15 мин, затем вынимают. Охлаждают и пропускают через мясорубку. Бульон остывший до 50°C подщелачивают Na_2CO_3 из расчета 3,0 г соды на 1 л. Добавляют поджелудочную железу из расчета 80,0-100,0 г на 1 кг мяса в зависимости от активности поджелудочной железы. Активность должна быть не менее 5 тыс. единиц по Фульд-Гроссу. Добавляют хлороформ - 2% к общему объему содержимого реактора. 20 Переваривание идет при 37°C . Первые сутки гидролизат перемешивают механической мешалкой, которую включают через каждые 2 ч на 5 мин. Ежедневно определяют аминный азот в гидролизате. С прекращением нарастания аминного азота, что бывает на 7-10 сутки, мешалку отключают, подогревание прекращают. Дают отстояться в течение 2 суток, затем жидкость отфильтровывают от осадка на пресс-фильтре, разливают по бутылкам с добавлением 1% хлороформа, запробковывают и хранят при температуре $4-6^\circ\text{C}$.

30 Характеристика ферментативного гидролизата говяжьего мяса - рН 7,0; аминный азот 1100 мг %; аминный азот 878 мг %; процент расщепления 78,0%; натрия хлорида 0,087; пептон 1,2; кальций 4,2 мг %; магний 5,21 мг %; фосфор общий 6,5 мг %; фосфор неорганический 57,1 мг %; сухой остаток 10,0-1,5%; редуцирующие вещества 367 мг %.

Подготовка ферментативного гидролизата из говяжьего мяса (по МУК 4.1/2.588-96, с.45)

35 Ферментативный гидролизат из говяжьего мяса декантируют из баллона, затем фильтруют через ткань. Определяют количество аминного азота и по его содержанию рассчитывают количество гидролизата, необходимое для приготовления питательной среды. Если требуется осветление углем (темный гидролизат), то его берут на 10% больше, учитывая адсорбцию аминокислот при обработке углем. Если гидролизат 40 после разведения по аминному азоту имеет соломенно-желтый цвет, то его не осветляют. Разводят очищенной водой в 2 раза, нагревают до кипения и добавляют 2% активированного угля марки ОУ-А (в расчете на разведенный гидролизат). Кипятят 15-20 мин при помешивании. Дают отстояться 20-30 мин и фильтруют сначала через вату, а затем через фильтровальное полотно.

45 Приготовление питательной среды для культивирования чумного микроба вакцинного штамма EV.

Питательные агары из панкреатического перевара мяса (агар Хоттингера для чумного микроба по ФС 42-3204-98), применяемые для определения количества живых микробных клеток, должны обеспечивать (без добавления стимуляторов) рост микробов

вакцинного штамма EV на всех чашках Петри с агаром, засеянных 10 м.к. по ОСО мутности 42-28-85П 10МЕ. В качестве стимулятора роста к питательным средам перед розливом их в чашки Петри добавляют 1 мл/л гемолизированной крови или 0,25 г/л свежеприготовленного прокипяченного натрия сернистокислового. Пробирки с 0,9% раствором натрия хлорида и пипетки, используемые при определении содержания живых микробов в биомассе, должны быть охлаждены до температуры $(4\pm 2)^\circ\text{C}$. Из каждой пробирки с жидкой питательной средой содержимое в количестве 0,1 мл разводят 0,9% раствором натрия хлорида в количестве 0,9 мл (основное разведение 10^{-1}). Добавляют последовательно физиологический раствор до получения 1 млрд м.к./мл. Затем пипеткой делают последовательные десятикратные разведения полученной взвеси в 0,9% растворе натрия хлорида, начиная с 10^{-1} ($0,5\pm 0,01$) мл взвеси с $4,5\pm 0,05$ мл 0,9% раствора натрия хлорида и кончая 10^{-7} . Разведенную биомассу из двух последних пробирок (10^{-6} и 10^{-7}) засевают пипеткой по $(0,1\pm 0,01)$ мл на 2 чашки Петри с питательным агаром рН $7,2\pm 0,2$ и выдерживают при температуре $(21\pm 1)^\circ\text{C}$ 2-3 суток.

Приготовление среды высушивания жидкой для стабилизации биомассы вторичного сбора чумного микроба вакцинного штамма EV.

Воду для инъекций подогревают до температуры $(50\pm 2)^\circ\text{C}$, растворяют в ней желатин, устанавливают рН 20% раствором едкого натра до $(7,6\pm 0,2)$, добавляют сахарозу и тиомочевину, доводят до кипения. После полного растворения ингредиентов среду фильтруют через полотно фильтровальное и фильтровальную бумагу, разливают по градуированным колбам и сифонам. В последнем случае воронку с фильтром вставляют прямо в бутылку, предварительно простерилизованную вместе с монтажом, и разливают среду мерно. Затем в бутылку снова вставляют монтаж, завязывают его шпагатом и горло бутылки обертывают марлей, сложенной в несколько слоев. Среду стерилизуют при 121°C в течение 30 мин. После стерилизации дают бутылкам остыть до температуры $(22\pm 3)^\circ\text{C}$. Затем снимают с них марлю и тут же горло бутылей тщательно обмазывают горячей смесью воска с парафином в соотношении (3:2) или заливают парафином. Бутылки со средой ставят в термостат при $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ на (48 ± 2) ч. При отсутствии пророста среды ее используют в производстве.

В качестве примера испытывали культуру чумного микроба вакцинного штамма EV, выращенную на пластинках 2% агара Хоттингера рН $(7,2\pm 0,1)$ при температуре $(27\pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 24 ч. Из суточной культуры готовили взвесь 1 млрд м.к./мл вакцинного штамма чумного микроба EV, равную 10 ед. по оптическому стандарту мутности (ОСО 42-28-85 П), эквивалентную $1,0\times 10^9$ м.к./мл в стерильном 0,9% растворе натрия хлорида. Серийными 10-кратными разведениями в физиологическом растворе в объеме 4,5 мл довели до содержания в 1 мл $1,03\cdot 10^6$ живых микробных клеток. Из данного разведения взвеси культуры высевали по 0,1 мл в 5 мл жидкой питательной среды. Посевы инкубировали при $(21\pm 0,1)^\circ\text{C}$. Учет результатов проводили через каждые 3 часа в течение 48 ч для определения количества микробных клеток.

Пример 1. При вторичном сборе биомассы чумного микроба вакцинного штамма EV, выросшей на плотной питательной среде, при применении стабилизирующей среды жидкой, содержащей, г/л: желатин медицинский - 8,0; сахароза - 80,0; тиомочевина - 8,0; натрий едкий в чешуйках раствор 20% - 2 мл; вода для инъекций до 1 л. При таком соотношении ингредиентов количество микробных клеток при температуре $21\pm 1^\circ\text{C}$ через 48 ч культивирования составило 11 млрд м.к./мл.

Пример 2. При вторичном сборе биомассы чумного микроба вакцинного штамма

EV, выросшей на плотной питательной среде, при применении стабилизирующей среды жидкой, содержащей, г/л: желатин медицинский - 10,0; сахара - 100,0; тиомочевина - 10,0; натрий едкий в чешуйках раствор 20% - 2,5 мл; вода для инъекций до 1 л. При таком соотношении ингредиентов количество микробных клеток при температуре $21 \pm 1^\circ\text{C}$ через 48 ч культивирования составило 30 млрд м.к./мл.

Пример 3. При вторичном сборе биомассы чумного микроба вакцинного штамма EV, выросшей на плотной питательной среде, при применении стабилизирующей среды жидкой, содержащей, г/л: желатин медицинский - 10,0; сахара - 100,0; тиомочевина - 10,0; натрий едкий в чешуйках раствор 20% - 2,5 мл; вода для инъекций до 1 л. При таком соотношении ингредиентов количество микробных клеток, при температуре $21 \pm 1^\circ\text{C}$ через 48 ч культивирования составило 13 млрд м.к./мл.

Таким образом, заявленная среда высушивания жидкая для стабилизации биомассы вторичного сбора чумного микроба вакцинного штамма EV (пример №2) является оптимальной по количеству подобранных ингредиентов, что в совокупности позволяет получить достаточное количество микробных клеток при температуре $21 \pm 1^\circ\text{C}$ через 48 ч культивирования. При вторичном сборе биомассы чумного микроба вакцинного штамма рентабельность производства вакцины увеличивается на 5%.

Формула изобретения

Среда высушивания жидкая для стабилизации биомассы вторичного сбора чумного микроба вакцинного штамма EV, состоящая, г/л:

| | |
|-------------------------------------|------------|
| Желатин медицинский | 8,0-12,0 |
| Сахароза | 80,0-120,0 |
| Тиомочевина | 8,0-12,0 |
| Натрий едкий в чешуйках раствор 20% | 2-3 мл |
| Вода для инъекций | до 1 л |