



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,  
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**(21), (22) Заявка: **2008112753/13, 02.04.2008**(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
**02.04.2008**(43) Дата публикации заявки: **10.10.2009**(45) Опубликовано: **20.06.2010** Бюл. № 17(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **RU 2139090 C1, 10.10.1999. RU 2262950 C2, 27.10.2005. US 5854055 A, 29.12.1998. US 5504005 A, 02.04.1996. RU 2170588 C1, 20.07.2001.**Адрес для переписки:  
**305021, г.Курск, ул. К. Маркса, 70, КГСХА,  
патентный отдел**

(72) Автор(ы):

**Евглевский Анатолий Алексеевич (RU),  
Коломиец Владислав Михайлович (RU),  
Евглевский Дмитрий Анатольевич (RU),  
Тимкова Елена Анатольевна (RU),  
Епифанова Светлана Юрьевна (RU)**

(73) Патентообладатель(и):

**ФГОУ ВПО Курская государственная  
сельскохозяйственная академия им.  
профессора И.И. Иванова (RU)****(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ТУБЕРКУЛЕЗНОГО АНАТОКСИНА**

(57) Реферат:

Изобретение относится к микробиологии и биотехнологии, в частности к получению туберкулезного анатоксина для специфической профилактики туберкулеза. Туберкулезный анатоксин получают путем детоксикации туберкулезных экзо- и эндотоксинов двумя детоксикаторами - 0,2% раствором формалина в течение 7-9 суток при 42-45°C и 0,5% раствором этония в течение 7-9 суток при 42-45°C. При этом происходит полная детоксикация токсинов и инактивация их аллергенных свойств при практически 100%

расходе формалина и этония. Затем производят сорбцию туберкулезного анатоксина на 1-3 мг/мл гидроксида алюминия и вдвое увеличивают концентрацию инактивированных токсино-аллергенов путем декантации 50±5% надосадочной жидкости. При использовании анатоксина, полученного способом по изобретению, вакцинированные животные приобретают устойчивость к заражению вирулентными микобактериями туберкулеза на фоне иммунологической перестройки организма и приобретают умеренную чувствительность к туберкулину.

RU 2 392 002 C2

RU 2 392 002 C2



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,  
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

*A61K 39/00* (2006.01)*A61P 31/06* (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21), (22) Application: **2008112753/13, 02.04.2008**(24) Effective date for property rights:  
**02.04.2008**(43) Application published: **10.10.2009**(45) Date of publication: **20.06.2010 Bull. 17**

Mail address:

**305021, g.Kursk, ul. K. Marksa, 70, KGSKhA,  
patentnyj otdel**

(72) Inventor(s):

**Evglevskij Anatolij Alekseevich (RU),  
Kolomiets Vladislav Mihajlovich (RU),  
Evglevskij Dmitrij Anatol'evich (RU),  
Timkova Elena Anatol'evna (RU),  
Epifanova Svetlana Jur'evna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**FGOU VPO Kurskaja gosudarstvennaja  
sel'skokhozjajstvennaja akademija im. professora  
I.I. Ivanova (RU)****(54) TUBERCULOSIS ANATOXIN MANUFACTURE METHOD**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention belongs to microbiology and biotechnology, notably to tuberculosis anatoxin manufacture for specific prevention of tuberculosis. Tuberculosis anatoxin is made by detoxication of tuberculosis exo- and endotoxins with two detoxifiers - 0.2% formalin solution during 7-9 days at 42-45 C° and 0.5% aethonium solution during 7-9 days at 42-45 C°. Then tuberculosis anatoxin is sorbed on 1-

3 mg/ml of aluminium hydroxide, concentration of inactivated toxic allergens is doubled by decantation of 50±5% of supernatant.

EFFECT: usage of anatoxin manufactured by this method gives vaccinated animals immunity to induced by virulent tuberculosis mycobacterium infection due to immune reorganisation of organism; animals acquire moderate sensibility to tuberculin.

4 ex

RU 2 392 002 C2

RU 2 392 002 C2

Изобретение относится к микробиологии и биотехнологии, в частности к технологии изготовления биопрепаратов для специфической профилактики туберкулеза.

Известны способы получения анатоксинов, алергоидов, инактивированных вирусных и бактериальных вакцин с использованием  $0,8 \pm 0,2\%$  формалина.

При этом оценка качества вакцин проводится в определении способности выработки специфических антител - защитного титра. Однако при многих инфекционных заболеваниях (бруцеллез, туберкулез, туляремия и т.д.)

иммунологические показатели не отражают защитных свойств биопрепарата, т.к. в их патогенезе ведущая роль принадлежит клеточному иммунитету. В этих случаях остаются в силе кожно-аллергическая проба и фактическая защищенность против той или иной инфекции, безопасность и эффективность биопрепарата (Воробьев А.А. Микробиология и иммунология. М.: Медицина, 1999, с.255-268; Медуницин Н.В. Биологические препараты: настоящее и будущее. Научно-практический журнал «Биопрепараты», 2001, №1, с.2-3).

Несмотря на длительное использование, с 1923 г., формалина для получения инактивированных вакцин, анатоксинов, исследования по замене формалина остаются актуальными.

Это связано с тем, что формалин способен вызывать аллергические реакции, денатурацию белков, онкогенные процессы. Сведения о возможной замене формалина или его производных на этоний при изготовлении инактивированных вирусных и бактериальных вакцин и анатоксинов и тем более в отношении детоксикации и инактивации туберкулезных токсино-аллергенов отсутствуют. Поэтому необходимы исследования не только по повышению эффективности инактивированных биопрепаратов, но и в направлении их безвредности.

За прототип взят «Способ получения туберкулезного анатоксина», Евглевский Ан. А., патент РФ №2139090 от 26.01.99, включающий выращивание микобактерий туберкулеза на синтетической среде в течение 55-60 суток, стерилизацию и детоксикацию токсино-аллергенов  $0,8 \pm 0,2\%$  раствором формалина при  $42-45^\circ\text{C}$  в течение 12-15 суток, сорбцию на гидроксиде алюминия из расчета 1-3 мг/мл.

Недостатком указанного способа является проведение детоксикации туберкулезных токсино-аллергенов одним детоксикатором - формалином в высокой концентрации в пределах  $0,8\%$  и низкое содержание исходных токсино-аллергенов до 2 мг/мл.

Для устранения указанных недостатков предлагается использование двух детоксикаторов в два этапа - первоначально  $0,2\%$  раствора формалина вместо  $0,8\%$ , а затем  $0,5\%$  раствора этония в течение 7-9 суток при  $42-45^\circ\text{C}$ , сорбция на гидроксиде алюминия и увеличение вдвое концентрации инактивированных токсино-аллергенов путем декантации  $50 \pm 5\%$  надосадочной жидкости.

Целью предлагаемого изобретения является снижение токсичности и повышение активности препарата путем детоксикации туберкулезных токсино-аллергенов двумя детоксикаторами - первоначально  $0,2\%$  раствором формалина вместо  $0,8\%$ , а затем  $0,5\%$  раствором этония при  $42-45^\circ\text{C}$  в течение 7-9 суток для обеспечения полной и необратимой детоксикации туберкулезных экзо- и эндотоксинов, сорбцией на гидроксиде алюминия из расчета 1-3 мг/мл и увеличение вдвое концентрации инактивированных токсино-аллергенов путем декантации  $50 \pm 5\%$  надосадочной жидкости.

Поставленная цель достигается снижением концентрации канцерогенного формалина с  $0,8\%$  до  $0,2\%$  и последующим прибавлением второго детоксикатора -

0,5% этония для полной детоксикации туберкулезных токсино-аллергенов из расчета  $120 \pm 20$  тысяч туберкулиновых единиц (международных) в 1 мл ( $\approx 2,5 \pm 0,2$  мг/мл тубпротеина) при  $42-45^\circ\text{C}$  в течение 7-9 суток, сорбцией на гидроксиде алюминия 1-3 мг/мл и удалением декантацией 50% надосадочной жидкости, позволяющим увеличить вдвое концентрацию инактивированных токсино-аллергенов.

Следует дополнить, что безопасность и полезность использования этония (1,2-этилен-бис-(N-диметилкарбдецилоксиметил) аммония дихлорид - бисчетвертичное аммониевое соединение) подтверждена в выпуске различных растворов, мазей, паст в гуманной медицине при различных заболеваниях кожи (раны, ожоги, радиация), трофических язвах, дерматозах, кариесе зубов, стоматите, кератитах, язвах роговицы.

В патентной и научно-технической литературе не обнаружены технические решения, аналогичные заявляемому с использованием этония, что свидетельствует о новизне предлагаемого решения.

Применение двух детоксикаторов в предложенном режиме и увеличение вдвое концентрации инактивированных токсино-аллергенов позволяет достичь положительного эффекта - снижения токсичности препарата при повышении его эффективности.

Установлена возможность полной детоксикации всего комплекса туберкулезных экзо- и эндотоксина-аллергенов с помощью двух детоксикаторов и определена их концентрация, температурный и временной режим технологического процесса, позволяющие получить эффективный и безопасный туберкулезный анатоксин.

Результаты редуцирующего действия на туберкулезные токсино-аллергены этония и протективные свойства туберкулезного анатоксина представлены в следующих примерах.

Пример 1. Способ получения туберкулезного анатоксина и его проверка на полноту детоксикации токсино-аллергенов на сенсibilизированных морских свинках.

В раствор (300 мл) растворимых туберкулезных токсино-аллергенов ( $2,5$  мг/мл  $\approx 120000$  ТЕ(МЕ)) внесен формалин до 0,2% концентрации для проведения детоксикации при  $42-45^\circ\text{C}$  в течение 7 суток, а затем добавлен второй детоксикатор этоний до 0,5% концентрации для заключительной детоксикации при  $42-45^\circ\text{C}$  в течение 7 суток. Температурный режим  $42-45^\circ\text{C}$  является наиболее оптимальным. Затем проведена сорбция полученного анатоксина на гидроксиде алюминия из расчета 1-3 мг гидроксида/мл анатоксина и декантация  $50 \pm 5\%$  надосадочной жидкости для увеличения вдвое концентрации инактивированных токсино-аллергенов (до 5 мг/мл). Полученный анатоксин расфасовывают по флаконам и стерилизуют 30 минут при 1,0 атм.

Проверку туберкулезного анатоксина на остаточную аллергенную активность и токсичность провели на 9 морских свинках, сенсibilизированных внутрикожным введением суспензии вакцины БЦЖ (1 мг на голову) путем внутрикожного введения по 0,1 мл препарата в разведении 1:100 и 1:1000 в депилированные боковые поверхности.

При учете реакции через 24 и 48 часов у морских свинок не было отмечено гиперемии кожи до 6-8 мм на внутрикожное введение туберкулезного анатоксина.

В то же время на внутрикожное введение туберкулина с аллергенной активностью (1 мг/мл  $= 50000$  ТЕ) в разведении 1:1000 и 1:2000 отмечена гиперемия кожи в диаметре 14-18 мм.

Полученные результаты дают основание считать, что этоний с формалином способен ин активировать аллергенную активность молекулярного туберкулезного

токсико-аллергена и детоксикацию его токсических свойств.

Пример 2. Изучение сенсибилизирующих свойств туберкулезного анатоксина после детоксикации токсико-аллергенов 0,2% раствором формалина с 0,5% этонием у коров. В исследованиях использовано 10 коров, которым двукратно подкожно с интервалом 12 суток был введен по 5,0 мл туберкулезный анатоксин. По истечении 30 суток после повторного введения туберкулезного анатоксина всех животных подвергли туберкулинизации путем внутрикожного введения туберкулина для млекопитающих - ППД серии №12 по 0,2 мл. При учете реакции через 72 часа у животных отмечено увеличение кожной складки в пределах 3-5-7 мм. Следовательно, подкожное введение туберкулезного анатоксина сопровождается аллергизацией организма, достоверно выраженными кожно-аллергическими реакциями.

Пример 3. Изучение сенсибилизирующих свойств туберкулезного анатоксина, полученного детоксикацией токсико-аллергенов 0,2% формалином с 0,5% этонием на морских свинках.

Туберкулезный анатоксин по 0,2 мл был введен двукратно подкожно 6 здоровым морским свинкам с интервалом 12 суток. По истечении 30 суток после второго введения туберкулезного анатоксина был введен туберкулин для млекопитающих с аллергенной активностью 50000 ТЕ/мл (МЕ) в разведении 1:1000 и 1:2000 по 0,1 мл в депилированные боковые поверхности каждой морской свинки. Учет реакции через 24 часа выявил у всех вакцинированных морских свинок кожно-аллергические реакции в виде гиперемии кожи до 8-9 мм в диаметре.

Пример 4. Изучение протективной активности туберкулезного анатоксина на морских свинках и кроликах.

В опыте использовано 6 морских свинок и 4 кролика, которым трехкратно с интервалом 10 дней был введен подкожно туберкулезный анатоксин в объеме 0,5 мл. По истечении 30 суток после 3-й вакцинации животных заразили свежесделанными от больных туберкулезом людей лекарственно устойчивыми микобактериями туберкулеза в дозе 0,1 мг на одно животное. Наблюдение за животными проводили в течение 3-х месяцев.

При убое у кроликов и морских свинок не обнаружено поражений органов (печени, легких и лимфоузлов), за исключением одной свинки, у которой в лимфоузле от места заражения и в печени обнаружены макроскопические изменения, характерные для туберкулезных поражений. Контрольные 3 морские свинки погибли через 2-2,5 месяца после заражения микобактериями туберкулеза. Из результатов исследований следует, что туберкулезный анатоксин, полученный детоксикацией токсико-аллергенов 0,2% раствором формалина с 0,5% этонием, обеспечивает защиту от заболевания кроликов и морских свинок при массивной дозе заражения вирулентными микобактериями туберкулеза.

#### Формула изобретения

Способ получения туберкулезного анатоксина, включающий детоксикацию туберкулезных экзо- и эндотоксико-аллергенов, сорбцию полученного анатоксина на гидроксиде алюминия, стерилизацию, отличающийся тем, что детоксикацию 2,5±0,2 мг/мл туберкулезных токсико-аллергенов проводят последовательно двумя детоксикаторами - 0,2%-ным раствором формалина в течение 7-9 суток при 42-45°C и 0,5%-ным раствором этония при 42-45°C в течение 7-9 суток, сорбцию анатоксина на гидроксиде алюминия проводят из расчета 1-3 мг гидроксида на 1 мл анатоксина и концентрируют адсорбированный анатоксин декантацией 50±5% надосадочной

ЖИДКОСТИ.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50