



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **74992** (13) **U**
(51) МПК
C12N 1/20 (2006.01)
A61K 35/74 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

| | |
|--|--|
| (21) Номер заявки: а 2012 02492 | (72) Винахідник(и): Желдак Людмила Дмитрівна (UA) |
| (22) Дата подання заявки: 01.03.2012 | (73) Власник(и): Желдак Людмила Дмитрівна, вул. Ф. Пушиної, 2, кв. 105, м. Київ, 03115 (UA) |
| (24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 26.11.2012 | |
| (46) Публікація відомостей про видачу патенту: 26.11.2012, Бюл.№ 22 | |

**(54) НОВИЙ ШТАМ ГРАМ-ПОЗИТИВНОЇ СПОРОУТВОРЮЮЧОЇ АЕРОБНОЇ ҐРУНТОВОЇ БАКТЕРІЇ
BACILLUS SUBTILIS**

(57) Реферат:

Штам грам-позитивної спороутворюючої аеробної ґрунтової бактерії *Bacillus Subtilis*, депонований в Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології НАН України (реєстраційний № IBM B-7321 від 6 березня 2010 року), за складом біологічно активних речовин здатен до створення на його базі лікувально-профілактичних препаратів для потреб медицини та ветеринарії і після проведення з ним температурно-проточно-ультразвукової обробки значно підвищується ефективність дії біологічно активних компонентів, отриманих із штаму IBM B-7321 *Bacillus Subtilis*.

UA 74992 U

Корисна модель належить до виділення з природного середовища нового штаму грам-позитивної спороутворюючої аеробної ґрунтової бактерії *Bacillus Subtilis*, який за складом біологічно активних речовин здатен до створення на його базі нових оригінальних лікувально-профілактичних препаратів для потреб медицини та ветеринарії.

5 Корисна модель належить до мікробіології і біотехнології. Новий штам бактерій *Bacillus Subtilis* є антагоністом відносно штамів хвороботворних мікроорганізмів, що можуть викликати захворювання у людей і тварин.

В господарстві, що спеціалізується на відгодівлі тварин, Козелецького району, Чернігівської області, із сіна було виділено мікробні клітини. Було встановлено, що вони є грам-позитивні, спороутворюючі аеробні рухливі палички з розмірами на однодобовій агаровій культурі (2-4)×(0,5-0,8) мкм, що утворюють центрально розташовані еліпсоїдні ендоспори на 2-3 добу росту (1-2)×0,6 мкм, при цьому клітину не роздувають. Колонії на м'ясо-пептонному агарі (МПА) сухі, бархатисті, білого кольору, округлої форми з діаметром до 0,5-0,7 см. Розщеплюють глюкозу, маніт. Не зброджують сахарозу, мальтозу, лактозу.

15 Мікробні клітини, які були виділені із бактеріальних колоній на МПА, віднесені до грам-позитивної спороутворюючої аеробної ґрунтової бактерії *Bacillus Subtilis*, що підтверджено в Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології НАН України.

Свідцтво про первісне депонування нового штаму мікроорганізму *Bacillus Subtilis* (реєстраційний № IBM B-7321) отримане 6 вересня 2010 року.

20 Доведено, що штами *Bacillus subtilis* зовсім не шкідливі для людини та тварин.

Відсутність патогенності у штамів *Bacillus subtilis* дало підставу для присвоєння їм Управлінням за контролем якості продовольчих і лікувальних засобів США статусу GRAS (generally regarded as safe) - безпечних організмів (К. Харвуд, 1992).

25 Механізми лікувальної дії мікробних культур, що отримані із *Bacillus subtilis*, широко вивчалися нами в експериментах на тваринах та *in vitro*.

Лікувальний ефект визначається комплексом факторів, до яких відносять: продукування культурами *Bacillus subtilis* бактеріоцинів, що пригнічують ріст патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів; утворення високоактивних ферментів: протеаз, рибонуклеаз, трансаміназ та інших; продукування субстанцій, що нейтралізують бактеріальні токсини (В. В. Смірнов та ін., 1982, 1985, 1988, 1992; А. Т. Слабоспицька та ін., 1990; К. Харвуд, 1992).

30 Антагоністична дія вищеназваних бацил здійснюється за рахунок продукування різних по походженню біологічно активних речовин: поліпептидних антибіотиків, лізоциму, літичних і протеолітичних ферментів (В. В. Смірнов і ін., 1993; Г. К. Олейнікова і ін. 1995; І. Г. Ахалкіна і ін. 1995; І. Б. Сорокулова, 1996; Kugler M. et al., 1990, Loeffler W. et al., 1990).

35 Понад усе добре вивченим антибіотиком із *Bacillus subtilis* є субтилін з м.в. 3,2 кД. Він складається із трьох поліпептидів - субтилінів А, В і С. Субтилін пригнічує ріст грампозитивних бактерій - стафілококів, стрептококів, туберкульозних паличок та низку інших бактерій, а також патогенних грибів, дріжджів, аміб (В. В. Смірнов і ін., 1993; Katzer W. et al., 1990).

40 Більшість антибіотиків, що утворюються бактеріями роду *Bacillus*, активні проти всіх груп мікроорганізмів, це: субтилізин, бацилін, субтенолін, бациліпіни, глобіцин та ін. Антибіотики, що утворюються *Bacillus* і є пептидами, мають значно меншу масу, ніж білки - від 270 Д (бацилізин) до 4500 Д (ліхеніформін). В більшості випадків штами-продуценти утворюють одночасно декілька антибіотичних речовин, які відрізняються одне від одного невеликою кількістю амінокислотних залишків.

45 Розмножуючись, бактерії роду *Bacillus subtilis* виробляють ферменти протеази, які активно лізують усі непритаманні організму ссавців білки, денатуровані білки і нуклеопротейди. При цьому знищуються бактерійні токсини, елементи пухлинних утворень та інші дефектні клітини.

50 Терапевтичні ферменти - протеази, пептидні антибіотики - субтилін та інші біологічно активні протеїни (БАП), є важливими активними лікувальними компонентами, що отримують із *Bacillus subtilis*.

55 Доведено, що бактерії роду *Bacillus subtilis*, продукують позаклітинні глікопротеїни - лектини, які специфічно зв'язують полісахариди. Вони виконують функцію розпізнавання патогенних мікроорганізмів, аглютинують вірулентні штами бактерій, зупиняють ріст патогенних грибів, і тим самим являються фактором неспецифічного захисту.

Задачею корисної моделі є пошук нового штаму із бактерій роду *Bacillus*, який має окрім антагоністичної активності проти патогенних штамів бактерій і грибів, що викликають захворювання людини і тварин, максимальною противірусною активністю, а також такого, що позитивно впливає на процеси імунокорекції організму.

В світовій практиці використовують різні штами бацилярних бактерій для створення на їх базі нових імуномодельючих лікувальних препаратів.

Відомий штам бактерій *Bacillus licheniformis* № 31 (Інститут мікробіології і вірусології ім. акад. Д.З. Заболотного АН України), який використовують при лікуванні гнійно-септичних післяродових захворювань як компонент препарату Біоспорин. Однак, вказаний штам не має протівірусну активність (Авт. св. СРСР № 1722502, МКІ А61К 39/2, 1989 р.)

Відомий бактеріальний препарат на базі штаму *Bacillus Subtilis* С-3102 утримує крім бактеріальної культури в сухому вигляді, також, і харчові добавки - наповнювачі для фармацевтичного препарату. Недоліком даного препарату є те, що він не володіє протівірусною активністю (Заявка ЕПВ № 0287699, МКІ С12N 1/20, надр. 26.10.88 р.)

Найбільш близьким аналогом препарату щодо компонентного складу біологічно активних речовин із *Bacillus Subtilis* є бактеріальний лікувально-профілактичний препарат, який включає композиційний склад біомаси бацилярних бактерій (*Bacillus Subtilis*-2 штами, та *Bacillus licheniformis* № 31). Суміш вказаних компонентів препарату являє собою мікробну асоціацію при об'ємному співвідношенні 1:1:1. Вміст кожного компоненту препарату 100-150 млрд. мікробних клітин в 1 мл фізрозчину. Таку рідину використовують для лікування гнійно-септичних післяродових захворювань (Авт. свід. СРСР № 1398868, МКІ А61К 35/74, надр. 1988 р.)

Недоліком даного препарату є те, що він не має протівірусної активності.

Задачею корисної моделі є пошук нового штаму із бактерій роду *Bacillus*, який має крім антагоністичної активності проти патогенних штамів бактерій і грибів, що викликають захворювання людини і тварин, максимальну протівірусну активність, а також такого, що позитивно впливає на процеси імунокорекції організму.

Суть корисної моделі пояснюється тим, що бактерії нового штаму *Bacillus Subtilis* IBM В-7321 після проведення з ними додаткової спеціальної обробки мають більш широкий спектр антивірусної дії, а також виражені імуномодельючі властивості.

Доведено, що біологічно-активні компоненти нового штаму *Bacillus Subtilis* IBM В-732 не є пірогенними, не впливають на рівень мітотичних процесів, і не здійснюють токсичну дію на органи і тканини експериментальних тварин при тривалому застосуванні, а також мають хороший профіль безпеки і мають високі імуноотропні властивості, що дозволяє віднести його до активних антивірусних препаратів.

Суть винаходу доводиться такими прикладами

При вивченні антивірусної активності бактерії нового штаму *Bacillus Subtilis* IBM В-7321 після проведення з ними додаткової спеціальної обробки було показано інгібування реплікації вірусу грипу А/М/1/47(Н1N1) *in vitro*.

В дослідях *in vivo* на моделі експериментальної грипозної інфекції (профілактична і лікувальна схема) індекс ефективності склав відповідно 80,0-60,0 в порівнянні із стандартним препаратом Таміфлю - 80-70.

Таблиця 1

Профілактична дія біологічно активних компонентів (БАК) нового штаму *Bacillus Subtilis* IBM В-7321 після спеціальної обробки при введенні мишам, інфікованим вірусом грипу

| Препарат, розведення | Кількість мишей | Із них загинуло | | КЗ | ІЕ |
|--|-----------------|-----------------|-------|-----|------|
| | | всього | % | | |
| БАК В. <i>Subtilis</i> IBM В-7321 1:10 | 10 | 2 | 20,0 | 5,0 | 80,0 |
| БАК В. <i>Subtilis</i> IBM В-7321 1:50 | 10 | 2 | 20,0 | 5,0 | 80,0 |
| Таміфлю | 10 | 2 | 20,0 | 5,0 | 80,0 |
| Контроль вірусу | 10 | 10 | 100,0 | - | - |

Як свідчать дані, наведені в табл. 1, при профілактичному застосуванні біологічно активних компонентів (БАК) нового штаму *Bacillus Subtilis* IBM В-7321 після спеціальної обробки у різних розведеннях до зараження вірусом грипу А/М/1/47 (Н1N1), адаптованого до легеневої тканини мишей, встановлено, що препарат в дозах 1:10 та 1:50 ефективно захищає мишей від грипозної інфекції (ІЕ=80,0).

Таблица 2

Лікувальна дія біологічно активних компонентів БАК штаму *Bacillus Subtilis* IBM B-7321 після спеціальної обробки при введенні мишам, інфікованим вірусом грипу

| Препарат, розведення | Кількість мишей | Із них загинуло | | КЗ | ІЕ |
|---------------------------------|-----------------|-----------------|-------|------|------|
| | | всього | % | | |
| БАК В. Subtilis IBM B-7321 1:10 | 10 | 4 | 40,0 | 2,5 | 60,0 |
| БАК В. Subtilis IBM B-7321 1:50 | 10 | 8 | 80,0 | 1,25 | 20,0 |
| Таміфлю | 10 | 3 | 30,0 | 3,3 | 77,0 |
| Контроль вірусу | 10 | 10 | 100,0 | - | - |

5 При лікувальній схемі введення біологічно активних компонентів (БАК) штаму *Bacillus Subtilis* IBM B-7321 після спеціальної обробки встановлено, що вони ефективно захищають мишей від грипоподібної інфекції при розведенні 1:10, індекс ефективності при цьому дорівнює 60,0.

Встановлено, що застосування біологічно-активних компонентів нового штаму *Bacillus Subtilis* IBM B-7321 достеменно пригнічують репродукцію ВІЛ при лікувальній і профілактичній схемі введення препарату.

Таблица 3

Вплив біологічно активних компонентів БАК штаму *Bacillus Subtilis* IBM B-7321 після спеціальної обробки на репродукцію ВІЛ в культурі МТ-4

| БАК В. Subtilis IBM B-7321 - розведення препарату | Показники репродукції ВІЛ-інфекційний титр в Ig ID ₅₀ | |
|---|--|-----------|
| | профілактика | лікування |
| 20 | 1,8 | <1,0 |
| 50 | 1,1 | <1,0 |
| 100 | 1,3 | <1,0 |
| Контроль ВІЛ | 2,8 | 2,8 |

10

На підставі цих результатів визначено, що БАК штаму *Bacillus Subtilis* IBM B-7321 після спеціальної обробки пригнічує репродукцію ВІЛ в розведенні 1:20; 1:50; 1:100 статистично достовірно при лікувальній схемі введення препарату; в розведенні 1:50 пригнічується репродукція ВІЛ при профілактичній схемі введення.

15

Профілактичне застосування при генітальному герпесі знижує вираженість симптоматики захворювання до 72,0 балів, що відповідає терапевтичному ефекту на рівні 41,0 % і достеменно знижує тривалість захворювання (до 4 діб). При лікувальній схемі введення спостерігалось зниження симптоматики до 36,0 балів, терапевтичний ефект складає 70,0 %, тривалість захворювання у тварин складає 3 доби, що статистично достеменно за всіма параметрами і вказує на ефективність препарату.

20

Таблица 4

Ефективність БАК штаму *Bacillus Subtilis* IBM B-7321 після спеціальної обробки на моделі генітального герпесу (ВПГ-2) у морських свинок

| Групи тварин | Препарат | Тривалість захворювання (доби) | P | СІВЗ (бали) | ІЛД, % |
|--------------|---|--------------------------------|--------|-------------|--------|
| 1 | Контроль зараження ВПГ-2 | 16,0±3,2 | | 122,0 | - |
| 2 | Віролекс | 9,75±2,86 | <0,05 | 22,0 | 56,0 |
| 3 | БАК В. Subtilis IBM B-7321 (профілактика) | 4,0±0,39 | <0,001 | 72,0 | 41,0 |
| 4 | БАК В. Subtilis IBM B-7321 (лікування) | 3,0±0,35 | <0,05 | 36,0 | 70,0 |

Отримані результати досліджень свідчать про наявність високих імунотропних властивостей біологічно активних компонентів нового штаму *Bacillus Subtilis* IBM B-7321 і дозволяє віднести його до активних антивірусних препаратів.

5

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

10

Новий штам грам-позитивної спороутворюючої аеробної ґрунтової бактерії *Bacillus Subtilis*, депонований в Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології НАН України (реєстраційний № IBM B-7321 від 6 березня 2010 року), який за складом біологічно активних речовин здатен до створення на його базі нових оригінальних лікувально-профілактичних препаратів для потреб медицини та ветеринарії і після проведення з ним додаткової спеціальної температурно-проточно-ультразвукової обробки, значно підвищується ефективність як антимікробної, так і протівірусної та імуномодельючої дії біологічно активних компонентів отриманих із штаму IBM B-7321 *Bacillus Subtilis* і за своїми властивостями має виражений лікувальний ефект.

15

Комп'ютерна верстка І. Мироненко

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601
