



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **103574** (13) **C2**  
(51) МПК (2013.01)  
**A61K 35/74** (2006.01)  
**C12R 1/125** (2006.01)  
**A61P 29/00**

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

<b>(21)</b> Номер заявки: <b>а 2012 13129</b>	<b>(73)</b> Власник(и): <b>Соколовський Іван Іванович</b> , пр. Гагаріна, 104, кв. 269, м. Дніпропетровськ, 49107 (UA), <b>Брушков Анатолій Вікторовіч</b> , ул. Почтова, 23, кв. 1, г. Нахабіно, Московська обл., 143430 (RU), <b>Грива Геннадій Івановіч</b> , бул. Дм. Донського, 11, корп. 1, кв. 14, г. Москва, 117216 (RU), <b>Грива Олег Іванович</b> , вул. О. Гончара, 15/17, кв. 53, м. Дніпропетровськ, 49005 (UA), <b>Деримедвідь Людмила Віталіївна</b> , пр. Московський, 96, кв. 70, м. Харків, 61068 (UA), <b>Карпенко Наталія Володимирівна</b> , с. Дубники, 17, Новоград Волинський р-н, Житомирська обл., 11713 (UA), <b>Соколов Олег Олегович</b> , бул. Слави, 4-а, кв. 1, м. Дніпропетровськ, 49100 (UA), <b>Соколовський Сергій Сергійович</b> , вул. Мандриківська, 222, кв. 21, м. Дніпропетровськ, 49000 (UA)
<b>(22)</b> Дата подання заявки: <b>19.11.2012</b>	
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на винахід: <b>25.10.2013</b>	
<b>(41)</b> Публікація відомостей про заявку: <b>13.05.2013, Бюл.№ 9</b>	
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту: <b>25.10.2013, Бюл.№ 20</b>	
<b>(72)</b> Винахідник(и): <b>Соколовський Іван Іванович (UA),</b> <b>Брушков Анатолій Вікторовіч (RU),</b> <b>Грива Геннадій Івановіч (RU),</b> <b>Грива Олег Іванович (UA),</b> <b>Деримедвідь Людмила Віталіївна (UA),</b> <b>Карпенко Наталія Володимирівна (UA),</b> <b>Соколов Олег Олегович (UA),</b> <b>Соколовський Сергій Сергійович (UA)</b>	<b>(56)</b> Перелік документів, взятих до уваги експертизою: SU 884189 A1, 23.02.1985. RU 2340328 C1, 10.12.2008. SU 1735359 A1, 23.05.1992. SU 1210452 A1, 27.04.1996. UA 56348 C2, 15.05.2003. UA 80995 C2, 26.11.2007. JP 2008005702 A, 17.01.2008. RU 2298032 C2, 27.04.2007. RU 2208633 C1, 20.07.2003. UA 96709 C2, 25.11.2011. RU 2009116228 A, 10.11.2010. De-Chao Zhang et al. Isolation and Characterization of Bacteria from Ancient Siberian Permafrost Sediment. Biology 2013, 2, 85-106.

**(54) ЗАСТОСУВАННЯ ШТАМУ РЕЛІКТОВИХ БАКТЕРІЙ VACILLUS SP. F ЯК ПРОТИЗАПАЛЬНОГО ЗАСОБУ**

**(57)** Реферат:

UA 103574 C2

Винахід належить до штаму реліктових бактерій *Bacillus* sp. F, виділених з вічної мерзлоти, з яскраво вираженими протизапальними властивостями. Штам здатний до культивування за стандартних умов, має протизапальні властивості, може використовуватися в експериментальній і клінічній медицині як протизапальний засіб.

Винахід належить до біотехнологій, зокрема до промислових штамів мікроорганізмів, і отримання протизапальних та антисептичних препаратів.

Відомі протизапальні препарати: по авт. свід. СРСР № 884189, 1977 р., що містить в відповідній пропорції стеаринову кислоту, гліцерин, триетаноламін, ланолін, левоміцетин, анестезин, борну кислоту, обліпихову олію, пропелент у водному розчині та по авт. свід. СРСР № 1410327, 1987 р., що містить суміш компонентів: олігоєфіруретандіізоціанат, 2,4,6-трис (діметиламінометил) фенол і 2,6-ді-трет-бутил-метилфенол.

Зазначені препарати ефективні при лікуванні різноманітних ранових та виразкових поверхонь за рахунок антисептичних властивостей, але в умовах інтенсивного хімічного забруднення навколишнього середовища в останні роки використання медикаментів, заснованих на хімічному синтезу, поєднано із появою в організмі людини побічних ефектів і зі зниженням їх ефективності, тому в процесі лікування необхідний моніторинг біохімічного складу крові, функціонального стану печінки і нирок.

Тому сучасна фармакологія все частіше використовує лікарські речовини рослинного та бактеріального походження. Встановлено, що природні речовини краще, ніж хімічно синтезовані, вписуються в обмін речовин організму людини і мають мінімальну побічну дію. Так, відомий протигрибковий засіб, базовим компонентом якого є гумат натрію із деревно-трав'яного торфу (пат. 2340328 RU, 2008 р.), який значно перевищує ефективність таких препаратів, як ністатин та нітрофунгін.

Рекордну біологічну активність мають види рослин, що належать до реліктових форм життя. Стародавні види виробили особливі захисні механізми, що дозволяють їм, врешті-решт, ставати абсолютно стійкими в еволюційному відношенні. Логічно тому вважати, що мікроорганізми, які збереглися до наших днів, саме бактерії, можуть стати активним продуцентом біологічно активної речовини і надалі - лікувальним засобом.

Відомий штам бактерії *Bacillus megaterium*, призначений для деструкції фосфатоорганічних пестицидів (авт. свід. СРСР № 1735359, 1992 р.). Штам може виконувати важливу функцію очищення природних середовищ, але вузька направленість не дозволяє використовувати його як базу для виробництва лікарських засобів для людей і тварин.

Відомий штам бактерій *Bacillus mucilaginosus* продукт біостимулятора неспецифічного імунітету телят (авт. свід. RU 1210452, 1996 р.).

Недоліками зазначеного штаму є те, що він незадовільно росте в лабораторних умовах разом з низькою біологічною (ферментативною) активністю і складним технологічним процесом його отримання, який включає ультрафіолетове опромінення та заморожування у рідкому азоті.

Відомі штами бактерій групи *Bacillus subtilis* (патенти UA 56348, 15.05.2003 та 80995, 26.11.2007), які одержані шляхом аналітичного селекціонування та виділені із фунтів відповідно, і які мають імуностимулюючу та протипухлинну активність.

Відомий штам бактерії *Bacillus subtilis* P-1 - переважно як продуцент протеази (патент RU 2208633, 2001 р.).

Відомий також штам бактерій *Bacillus macroides* Excel 00, виділений з міцелію лікарського гриба *Agaricus Blazei* Murill, що проявляє імунну активність і здатність перешкоджати старінню і хворобам (заявка JP 2008-005702 A, 2008 р.).

Основним недоліком вказаних штамів є тривалість процесу культивування і необхідність вирощування на дорогих живильних середовищах, що включають нестандартні і рідкісні харчові компоненти, а також нестабільність біологічних продуктів.

Відомий штам бактерій *Bacillus subtilis* 1779 (прототип), по видовій подібності найближчий до штаму, протизахисні властивості якого заявляються, виділений в природних умовах, проявляє широкий спектр активності антагоніста, низьку адгезивну здатність, імуномодулюючу активність і продукує комплекс гідролітичних ферментів (патент RU 2298032, 2007 р.).

Проте вузька сировинна база для штаму-прототипу, обмежений діапазон живильних середовищ для його культивування, відсутність даних про його протизапальну активність і про фармакокінетику в дослідженнях *in vivo* вимушують вести пошук інших штамів з більш високими споживчими характеристиками.

В Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології НАН України 03 грудня 2010 р. задепоновано новий штам реліктової бактерії *Bacillus* sp. F. (реєстровий номер *Bacillus* sp. IMB B-7323), і в патенті UA96709, 2011 р. представлено технологію культивування штаму та його імуномодулюючі та геропротекторні властивості.

Протизапальна активність не виявлена. В основу пропонованого винаходу поставлено задачу застосування штаму реліктових бактерій *Bacillus* sp. F. як протизапальний засіб.

Для вирішення поставленої задачі пропонується застосування штаму реліктових бактерій *Bacillus* sp. F., задепонованого в Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології НАН України, в якості протизапального засобу.

Штам виділений із стародавніх багаторічномерзлих порід верхньоплейстоценового віку в геологічному оголенні Мамонтової гори (Центральна Якутія).

Штам являє собою слаборухомі прямі палички із закруглюючими кінцями розмірами (1-1,2)×(3-10) мкм, по 1-2 ланцюжки і іноді до 7, ендоспори бацилярного типу, грампозитивний, психротолерантний, факультативний анаероб. На щільних живильних середовищах утворює непрозорі блискучі м'які колонії жовтуватого кольору. Зростання при температурі від +5 до +43 °C і pH 5-12.

Протизапальна активність штаму *Bacillus* sp. F вивчалась по антиексудативній дії штаму на моделях карагенінового та зимозанового набряків щурів.

Найбільш інформативною моделлю для визначення антиексудативної активності є карагеніновий набряк, оскільки в його розвитку беруть участь різні медіатори запалення: простагландини, біогенні аміни, кінінова система, лейкоцитриєни тощо [Калинина Е.П. Нарушения межсистемных взаимодействий при хроническом воспалительном процессе / Е.П. Калинина, Е.М. Иванов, Е.Г. Исаченко // Медицинская иммунология.-2007. -Т. 9, № 6. - С. 581-588].

Результати дослідження антиексудативної активності лізату штаму *Bacillus* sp. F на моделі карагенінового набряку представлені в таблиці 1 та на фіг. 1.

Таблица 1

Антиексудативна активність лізату на моделі карагенінового набряку у щурів (n=7), M±m

Групи тварин	Доза, мг/кг, мл/кг*	Початковий об'єм лапи (в умовних одиницях)	Об'єм лапи (в умовних одиницях) / антиексудативна активність (в %) протягом					
			1 година	2 години	3 години	6 годин	24 години	Середня (за 24 години)
Контрольна патологія	-	45,6±1,2	57,6±1,0	66,4±1,1	79,2±1,6	75,3±0,9	69,5±1,2	-
Лізат	0,5*	48,2±1,6	56,6±2,3 30,0	63,5±1,2 26,4	72,5±1,7* 27,7	69,8±2,0* 27,3	64,4±1,8* 32,2	28,7
Лізат	1*	44,3±1,1	51,3±2,1* 41,4	55,3±3,4* 47,0	59,5±3,9** 54,8	60,2±2,6** 46,2	56,6±3,9** 44,6	46,8
Лізат	2*	46,1±1,0	53,9±1,3* 35,0	58,7±3,0* 39,4	65,0±2,7* 43,8	60,3±3,8* 42,2	59,6±2,2** 37,4	40,6
Диклофенак натрію	8	45,8±1,3	50,2±2,9* 63,3	50,0±4,8* 79,8	57,9±4,5* 63,9	65,2±2,5* 34,7	66,7±2,8 12,5	50,9

У контрольній групі тварин, яким вводили тільки карагенін, максимум набряку лапи (в 1,7 разу у порівнянні з початковим розміром) був зареєстрований на третю та на шосту годину після введення флогогену. Через 24 години зафіксовано зменшення набряку, але величина лап тварин ще перевищувала початковий розмір 1,5 разу.

Як показали результати досліджень, протягом перших двох годин досліді достовірну антиексудативну активність виявили лізат у дозах 1 мл/кг (41,4-47 %) і 2 мл/кг (35,1-39,4 %) та диклофенак натрію (63,3-79,8 %).

Введення піддослідним тваринам лізату штаму у дозі 0,5 мл/кг теж супроводжувалось зменшенням набряку лап, однак ці зміни були недостовірними. Таким чином, найбільша протинабрякова активність в перші дві години дослідження спостерігалась у групі тварин, яких лікували диклофенаком натрію. Так, наприкінці другої години дослідження вона складала 79,8 %.

До кінця третьої години експерименту всі досліджувані препарати виявили антиексудативну дію, але найвища антиексудативна дія, як і досі, зафіксована в диклофенаку натрію (63,9 %).

Антиексудативна активність лізату у дозах 1 та 2 мл/кг дещо поступалась дії референс-препарату та становила 54,8 та 43,8 % відповідно. Різниця у протинабряковій дії між цими дозами лізату була недостовірною.

На шостій годині досліджу ефективність диклофенаку натрію почала зменшуватись (34,7 %), дія лізату у дозах 0,5 та 2 мл/кг підтримувалась на попередньому рівні. Протинабрякова активність лізату у дозі 1 мг/кг теж зменшилась до 46,2 %, але достовірно перевищувала аналогічний показник препарату порівняння. Ймовірно, це пов'язане з фармакокінетикою диклофенаку натрію, який є препаратом короткої дії [К вопросу о механизмах действия диклофенака / Т.А. Шуматова, А.И. Дубиков, Е.В. Карпеева и др. // Человек и лекарство: сб. тр. XIII Рос. Нац. конгр. - М., 2006, - С. 340-341].

Наприкінці експерименту (24 години) лізат в усіх дозах виявляв достовірну протинабрякову активність у межах 32,2-44,6 %, а дія диклофенаку натрію суттєво знизилась і не була статистично значущою (12,5 %).

За результатами, отриманими на даній моделі запалення, ми визначили значення середньої антиексудативної активності для вибраних препаратів, які можна розташувати таким чином: диклофенак (50,9 %)  $\geq$  лізат у дозі 1 мл/кг (46,8 %)  $>$  лізат у дозі 2 мл/кг (40,6 %)  $>$  лізат у дозі 0,5 мл/кг (28,7 %). Через добу протинабрякова активність диклофенаку натрію була недостатньою, а лізат в усіх дозах проявляв антиексудативну дію в середньому 32-45 %. Тобто, за тривалістю фармакологічного ефекту лізат в усіх дозах не поступався референс-препарату.

Таким чином, можна зробити висновок, що на моделі карагенінового набряку лізат штаму *Bacillus sp. F* у дозі 1 мл/кг виявив найбільшу протизапальну активність, яка достовірно не поступається дії референс-препарату.

Вивчалось також антиексудативна дія штаму на моделі зимозанового набряку.

Відомо, що метаболізм арахідонової кислоти може відбуватись не тільки кисневим (циклооксигеназним), але й безкисневим (ліпоксигеназним) шляхом, який призводить до утворення лейкотрієнів. Тому доцільно було вивчити вплив лізату на фазу ексудації запального процесу у щурів при зимозановому набряці, провідна роль у розвитку якого належить саме лейкотрієнам. Як препарат порівняння, разом з диклофенаком натрію, ми вибрали кверцетин - антиоксидант з протизапальними властивостями, який має здатність пригнічувати ліпоксигеназний шлях перетворення арахідонової кислоти та гальмувати утворення лейкотрієнів. Кверцетин вводили в умовно-ефективній дозі 5 мг/кг.

Результати дослідження антиексудативної дії лізату штаму *Bacillus sp. F* на моделі зимозанового набряку наведені в таблиці 2 та на фіг. 2.

Таблиця 2

Антиексудативна активність  
порівнюваних препаратів на моделі зимозанового набряку (n=7), M $\pm$ m

Групи тварин	Доза, мг/кг, мл/кг*	Початковий об'єм лапи (в умовних одиницях)	Об'єм лапи (в умовних одиницях) / антиексудативна активність (в %) протягом					Середня (за 4 години)
			30 хвилин	1 години	2 години	3 години	4 години	
Контрольна патологія	-	45,6 $\pm$ 1,2	67,1 $\pm$ 1,3	69,3 $\pm$ 1,8	66,5 $\pm$ 1,0	62,2 $\pm$ 1,4	62,2 $\pm$ 1,6	-
Лізат	0,5*	48,2 $\pm$ 1,6	65,7 $\pm$ 1,0 18,6	66,9 $\pm$ 1,2 21,2	63,2 $\pm$ 2,1 28,2	60,6 $\pm$ 1,4 26,3	61,0 $\pm$ 1,5 22,9	23,4
Лізат	1*	47,1 $\pm$ 1,5	62,6 $\pm$ 1,9 27,9	62,9 $\pm$ 1,0* 33,3	59,6 $\pm$ 1,2* 37,4	55,6 $\pm$ 1,6* 41,1	55,2 $\pm$ 1,9*/ 51,6	38,3
Лізат	2*	46,9 $\pm$ 1,1	63,2 $\pm$ 1,2 21,7	64,6 $\pm$ 1,5 25,3	60,8 $\pm$ 2,2* 33,5	55,7 $\pm$ 1,8* 47,0	55,8 $\pm$ 1,1*/ 46,4	36,2
Диклофенак натрію	8	47,4 $\pm$ 1,4	65,9 $\pm$ 0,7 14,0	66,1 $\pm$ 1,7 21,1	61,7 $\pm$ 1,4* 31,6	58,8 $\pm$ 1,0 31,3	56,2 $\pm$ 2,0*/ 47,0	29,0
Кверцетин	5	49,7 $\pm$ 1,1	64,9 $\pm$ 1,6 29,3	62,8 $\pm$ 1,2* 44,7	58,5 $\pm$ 0,9* 43,1	61,1 $\pm$ 1,7 31,4	62,2 $\pm$ 1,3** 24,7	32,8

Введення зимозану викликало виражений набряк: збільшення об'єму лапи у щурів після першої години досліджу складо 50 % та зберігалось протягом 4-х годин. Перші дві години дослідження приходилися на лейкотрієнову фазу, протягом останніх двох годин зимозанового набряку переважала простагландинова фаза запалення.

Аналіз фармакологічної дії досліджуваних препаратів виявив, що на першій годині експерименту достовірна антиексудативна дія спостерігалась у групах тварин, яких лікували кверцетином та лізату у дозі 1 мл/кг, причому найбільшу антиексудативну активність виявив кверцетин (44,7 %). Протинабрякова дія кверцетину зберігалась на цьому рівні протягом 2-ї години експерименту, потім почала знижуватись і на 3-4 годинах дослідження була недостовірною (31,4-24,7 %). Антиексудативна дія лізату у дозі 1 мл/кг, навпаки, зростала і наприкінці дослідження (після 4 години) складала 51,6 %.

Найменш активним протягом усього дослідження був лізат у дозі 0,5 мл/кг, за 4 години він не виявив статистично значимої активності.

Лізат штаму *Bacillus* sp. F у дозі 2 мл/кг виявив достовірну протинабрякову активність на другій годині дослідження (33,5 %), на третій годині вона дещо переважала аналогічний показник лізат у дозі 2 мл/кг і зберігалась на однаковому рівні до кінця експерименту (47-46,4 %). Диклофенак натрію на другу годину дослідження виявив достовірну антиексудативну активність на рівні лізату у дозі 1 мл/кг (31,6 %).

Починаючи з третьої години, коли розпочалась простагландинова фаза гострого запалення, здатність диклофенаку натрію зменшувати набряк лапи піддослідних тварин зростала і наприкінці досліду складала 47 %.

Після 4 години експерименту антиексудативна активність кверцетину зменшилась з 31,4 % до 24,7 %, дія лізату у дозах 0,5 та 2 мл/кг залишалась на попередньому рівні.

За середнім значенням антиексудативної активності на даній моделі препарати можливо розмістити так: лізат штаму у дозі 1 мг/кг (38,3 %)  $\geq$  лізат штаму у дозі 2 мл/кг (36,2 %)  $\geq$  кверцетин (32,8 %)  $\geq$  диклофенак натрію (29 %)  $\geq$  лізат штаму у дозі 0,5 мл/кг (23,4 %).

Таким чином, на моделях карагенінового та зимозанового набряків щурів лізат штаму *Bacillus* sp. F виявляв суттєві протизапальні властивості, за якими переважав дію референс-препаратів - диклофенаку натрію та кверцетину.

У дослідженнях були використані статевозрілі білі рандомбредні щури масою 180-280 г.

Дослідження проводилися відповідно до Національних "Загальних етичних принципів експериментів на тваринах" (Україна, 2001), що відповідають положенням "Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей" (Страсбург, 1985). Процедури, що супроводжуються болем (хірургічні втручання, евтаназія, вилучення органів), проводили під наркозом (внутрішньоочеревинно тіопентал натрію в дозі 80 мг/кг маси тіла або етамінал натрію в дозі 40 мг/кг).

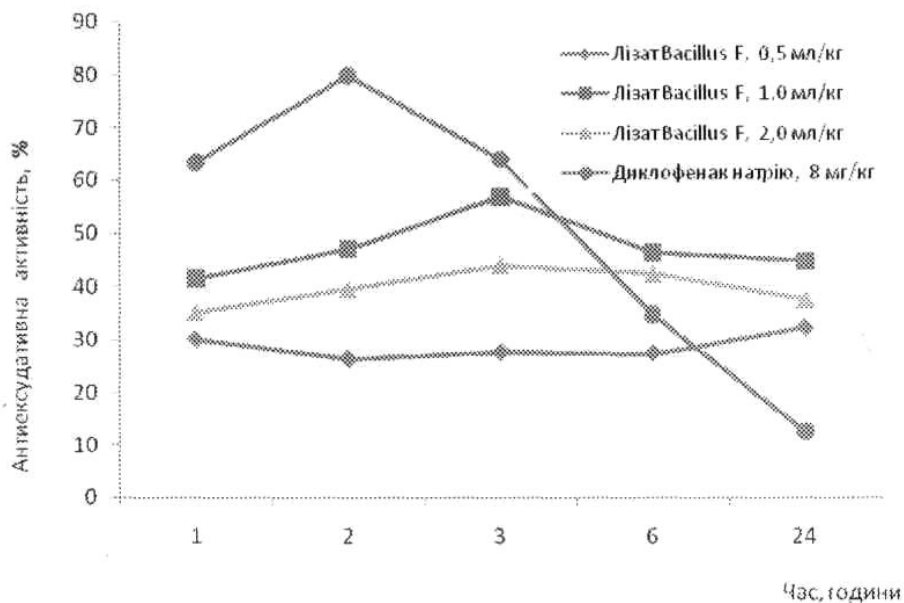
Кількісні дані обробляли за допомогою програми статистичної обробки StatPlus 2009: за критерієм t Ст'юдента у випадках нормального розподілу, за критерієм W. Уайта - за його відсутності; внутрішньогрупові відмінності аналізували за парним критерієм Т. Вілкоксона, альтернативні (виживаність, наявність/відсутність певної ознаки) - за кутовим перетворенням Фішера (в необхідних випадках - із поправкою Єйтса); для аналізу закономірностей зв'язку між окремими показниками використовували коефіцієнт кореляції Спірмена.

Сировинна база початкового мікроорганізму на планеті практично невичерпна, тільки в Російській Федерації кріолітозона займає близько 70 % території країни, яка може бути "постачальником" і інших унікальних і поки що не відкритих реліктових мікроорганізмів. Зазначимо також, що останнім часом реліктові бактерії цього типу були виділені із більш молодих повторно-жильних льодів льодяного комплексу Якутії, із стінок підземелля Інституту мерзлотоведення ім. П.І. Мельникова в Якутську, а також із під земляних льодів в тунелі Фокс і на золотому руднику поблизу Фербекса на Алясці.

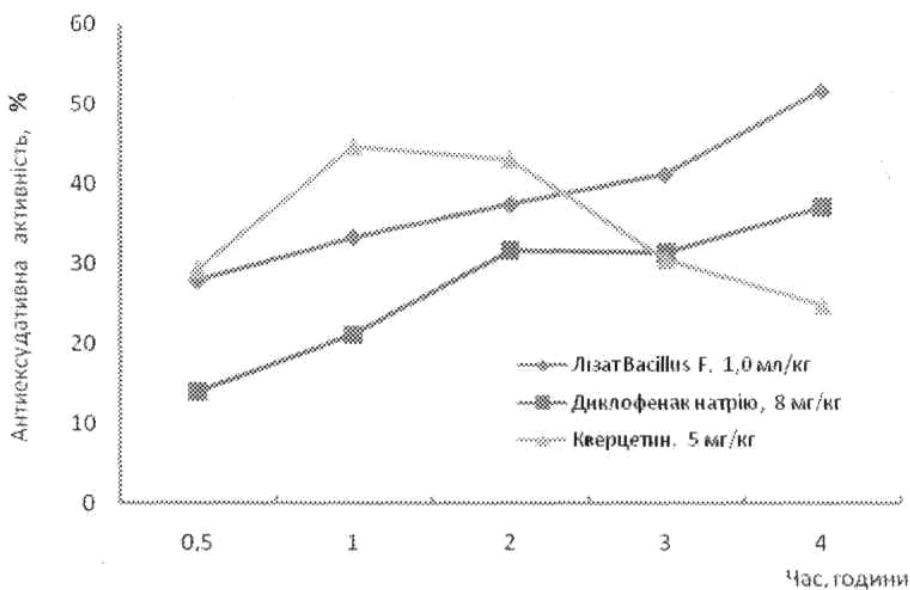
Вважаємо, що після більш детального дослідження механізмів виживання виявленої реліктової бактерії протягом багатьох тисячоліть і дії її культури на макроорганізми в аптечних мережах Росії, України і інших країн з'являться нові препарати, які дозволять серйозно (і, можливо, кардинально) змінити стратегію лікування запальних захворювань.

# ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

Застосування штаму реліктових бактерій *Bacillus* sp. F, депонованого під номером IMB B-7323, як протизапального засобу.



Фіг. 1



Фіг. 2

Комп'ютерна верстка Л. Литвиненко

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