

Изобретение относится к микробиологии, а именно к штаммам микроорганизмов, используемых в микробиологической и медицинской промышленности для получения иммуномодуляторов, в частности полисахаридов, обладающих способностью стимулировать образование фактора некроза опухоли (ФНО) и интерлейкина-1 (ИЛ-1) в клетках человека и животных.

В качестве продуцента липополисахарида, проявляющего способность индуцировать образование ФНО и ИЛ-1, используется *Escherichia coli* [1]. Выращивание указанного продуцента проводится на средах, содержащих дорогостоящие реактивы - мясо - пептонный бульон, мясопептонный агар. Выход липополисахарида - 4-5% от сухой массы клеток. Липополисахарид получают экстракцией клеток горячим водным фенолом. Этот реактив является очень токсичным для людей. Наличие липида А в составе липополисахарида обуславливает его токсические свойства, пирогенность. Максимально переносимая доза липополисахарида в опытах на белых мышях 0,125-5,00 мг/мг; ЛД50 равняется 2-3,5 мг/кг. Кроме того, получаемые водно-фенольным методом липополисахариды содержат обычно высокий процент нуклеиновых кислот. Указанные обстоятельства обуславливают невозможность терапевтического применения липополисахаридов для человека и животных.

В связи с этим перспективным является использование штаммов микроорганизмов, выращивание которых проводится на дешевых синтетических средах, получение полисахаридов из которых будет более экономичным, безвредным и менее трудоемким. Эти штаммы проявляют высокую активность в стимуляции образования ФНО и ИЛ-1. Предлагаемый биополимер иной химической природы, в нем отсутствует липид А, обуславливающий токсичность липополисахаридов. В связи с тем, что полисахариды нетоксичны, они могут быть использованы в качестве терапевтических препаратов.

В основу изобретения поставлена задача получения активного штамма микроорганизма - продуцента полисахарида, являющегося эффективным индуктором образования ряда цитокинов ФНО и ИЛ-1.

Поставленная задача решается тем, что в качестве микроорганизма-продуцента полисахарида используют штамм бактерий *Corynebacterium insidiosum* ИМБ 72466.

Штамм *Corynebacterium insidiosum* ИМБ 72466, обладающий указанными свойствами, выделен из пораженных стеблей люцерны. Для этой цели часть пораженной ткани на границе с внешне здоровой тканью вырезали скальпелем, промывали в течение 15-20 мин несколькими порциями стерильной воды. Затем растительную ткань растирали в стерильной ступке с небольшим количеством стерильной воды и образующуюся гомогенную кашицу высевали петлей на поверхность агара а чашках Петри. Чашки помещали в термостат (температура $(25\pm 3)^{\circ}\text{C}$).

Питательными средами для выделения бактерий обычно служат: картофельный агар, картофельный агар + 10% глюкозы, картофельный агар + 1% дрожжевого экстракта, мясопептонный агар.

Культуру хранят: на косяках с картофельным агаром при комнатной температуре либо в пробирках на косяках с картофельным агаром, поверхность которого заливают минеральным маслом.

Состав среды картофельный агар: на 1 л дистиллированной воды 200 г картофеля, 0,5% хлористого натрия, 1,5-2,0% агара, pH 7,0-7,2. Штамм *Corynebacterium insidiosum* ИМБ 72466 депонирован в коллекции культур Всесоюзного научно-исследовательского института антибиотиков Минмедмикропрома и имеет регистрационный № 2060.

Штамм *C. insidiosum* ИМБ 72466 имеет следующие морфологические и биохимические признаки.

Морфологические признаки. Клетки - неспороносные палочки ($0,4-0,6$ $0,7-1,1$ мкм), прямые, иногда слабо изогнутые. Располагаются одиночно, парами, могут Y-образно. Грамположительные.

Культуральные признаки. Хорошо растет на обычных питательных средах. На картофельном агаре - колонии круглые, гладкие, приподнятые, блестящие, слабо слизистые, прозрачные, желтого цвета.

На мясопептонном агаре - колонии круглые, гладкие, более прозрачные, чем при росте на картофельном агаре, слабо слизистые, желтого цвета, со временем маслообразной консистенции.

При росте в мясопептонном бульоне - культура растет умеренно, образует нежную пленку и осадок.

Культура растет в аэробных условиях, оптимальная температура роста $21-24^{\circ}\text{C}$. минимальная 1°C , максимальная $28-31^{\circ}\text{C}$.

Биохимические признаки. Культура не образует кислоту из глюкозы, лактозы, мальтозы, сахарозы, маннита, рамнозы, салицина. Молоко лептонизирует, желатин слабо разжижает, нитраты не редуцирует, не образует индол и сероводород.

Используют глюкозу, сахарозу, лактозу, галактозу, глицерин, крахмал.

Факторы роста - биотин, никотиновая кислота, гистидин, пурины, пиридинные основания.

Безвредность. Штамм *C. insidiosum* ИМБ 72466 не вирулентен, не токсичен для теплокровных животных. Введение 24-часовой культуры *C. insidiosum* ИМБ 72466 внутрибрюшинно, подкожно и перорально в дозах 5 и 10 млрд микробных клеток на 1 мыш. а также фильтратов среды роста (после культивирования бактерий на жидкой синтетической среде) не вызывало у животных патологического процесса, регистрируемого клинически или при макроскопическом изучении внутренних органов животных.

Штамм ИМБ 72466 *C. insidiosum* непатогенен для теплокровных животных.

Выращивание бактериальной массы *C. insidiosum* ИМБ 72466 и получение полисахарида из него осуществляли следующим образом. Для получения инокулята используют 24-часовую культуру, выращенную на картофельном агаре при $(25\pm 3)^{\circ}\text{C}$. Выращивание продуцента осуществляют в колбах объемом 500 мл, содержащих 200 мл жидкой синтетической среды следующего состава, г/л: MgO_4 0,2; Na_4HPO_4 6,0; KH_2PO_4 3,0; NH_4Cl 1,0; глюкоза 5,0. Стоимость 1 л среды дешевле более чем в 10 раз.

Из выращенной культуры продуцента выделяют целевой продукт мягким щелочным гидролизом клеток.

Пример 1. Культуру *C. insidiosum* ИМБ 72466, хранящуюся на косяках с картофельным агаром, засевают на косяк той же средой и выращивают в термостате при $(25\pm 3)^{\circ}\text{C}$ в течение 24 ч. Затем культуру смывают с косяков жидкой питательной средой описанного состава и засевают в колбы емкостью 500 мл, содержащие 200 мл аналогичной питательной среды; выращивают в условиях качалок (240 об/мин) в течение 35 ч. Клетки осаждают центрифугированием при 5000 об/мин в течение 20-25 мин, промывают физиологическим раствором и подвергают гидролизу в 5%-ном растворе КОН/100 мл на 10 г влажных клеток в течение 1,5-2,0 ч. Гидролизат

диализуют против водородной, а затем дистиллированной воды до нейтрального значения pH, центрифугируют для осаждения неразрушенных клеток, а также загрязняющих компонентов клеточной стенки при 5 000 об/мин в течение 20-25 мин. Полисахарид осаждают из надосадочной жидкости добавлением 5-ти объемов спирта. Осадок освобождают от липидов последовательной обработкой ацетоном, эфиром, а затем смесью хлороформа с метанолом (2:1) и подвергают ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-ТСК гелях. Полисахарид, целевой продукт, элюируют 0,25 М фосфатным буфером, pH 6,0. Фракции полисахарида собирают, диализуют против водопроводной, а затем дистиллированной воды, лиофильно высушивают. В целевом продукте содержится до 80% углеводов.

Моносахаридный состав целевого продукта изучали методом газожидкостной хроматографии и ^{13}C -ЯМР-спектроскопии. Установлено, что полисахарид состоит из тетрасахаридных повторяющихся звеньев, представленных остатками галактозы и рамнозы. В качестве кислого компонента присутствует пировиноградная кислота.

Молекулярная масса полисахарида, установленная гель-фильтрацией на сефарозе 6В, составляет ~ 70000.

Выход очищенного полисахарида составляет ~ 10% от сухой массы клеток.

Выделенный полисахарид проверяют на способность стимулировать образование ФНО и ИЛ-1.

Способность полисахарида индуцировать образование ОНО и ИЛ-1 исследовали в культуре стимулированных тигликолатов мышинных перитонеальных макрофагов (МФ). Перитонеальные МО собирали путем промывания брюшной полости мышей линии ДВА средой RPMI-1640, отмывали центрифугированием и вносили в лунки плат (Linbro) в концентрации $1,0 \cdot 10^6$ клеток/мл. После 2 ч инкубации при 37°C в атмосфере 5% CO_2 и 95% влажности монослой МФ в каждой лунке тщательно отмывали для удаления неприлипших клеток. Затем в лунки вносили свежую среду с 2 мМ-глутамин и 80 мкг/мл гентамицина, а также исследуемый полисахарид в соответствующей концентрации.

После 20 ч культивирования надосадочные жидкости культур МФ тестировали на наличие в них ФНО и ИЛ-1.

Исследование активности ФНО в супернатантах макрофагальных культур проводили по методу (Fish et al). В качестве клеток-мишеней используют мышинные фибропласты линии L929, полученные из коллекции клеточных культур Института цитологии АН СССР. Единицы цитотоксической активности ФНО рассчитывали по уровню 50%-ной цитотоксичности путем использования Logitlog преобразования и анализа полученных прямых. Стандартная кривая построена по рекомбинантному ФНО.

Содержание ИЛ-1 в исследуемых супернатантах МФ оценивали по их комитогенному эффекту в реакции бластной трансформации (РБТ) мышинных тимоцитов в присутствии субоптимальной дозы (0,5 мкм/мл Кона). Результаты РБТ оценивали по уровню включения ^3H -тимидина во вновь синтезируемую ДНК лимфоцитов. Интенсивность включения метки в культуры лимфоцитов определяли на β -счетчике.

Способность полисахарида *C.insidiosum* ИМВ 7246 б в концентрации 10 мкг/мл стимулировать образование ФНО и ИЛ-1 перитонеальными МФ мышей более чем в два раза превышает способность липосахарида *Escherichia coli* 055:B5, производимого американской фирмой "Sigma" (см. таблицу).

Таким образом, предлагаемый штамм ИМА 7246б *C.insidiosum* является штаммом, продуцирующим полисахарид, являющийся активным индуктором образования факторов некроза опухоли и интерлейкина-1.

Выращивание культуры продуцента более, чем в 10 раз дешевле выращивания *E.coli*.

Полисахарид в отличие от липополисахарида *E.coli* является не токсичным и не обладает побочным действием.

Изобретение может быть использовано в микробиологической промышленности и в медицине, при этом не требуется дополнительных ассигнований для осуществления технологических процессов выращивания продуцента и выделения из него полисахарида.

Штамм	Препарат	ФНО, ед. акт.	ИЛ-1, имп/мин
<i>C. insidiosum</i> ИМВ 7246 б	Полисахарид	5000 ± 490	25100 ± 730
<i>E. coli</i> 055:B5	Липополисахарид	180 ± 170	10270 ± 1120