



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **103797** (13) **U**
(51) МПК (2015.01)

C12N 7/00

A61K 39/12 (2006.01)

A61K 39/245 (2006.01)

A61K 39/29 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2015 07435	(72) Винахідник(и): Варбанець Людмила Дмитрівна (UA), Кіпріанова Олена Андріївна (UA), Рибалко Світлана Леонтіївна (UA)
(22) Дата подання заявки: 23.07.2015	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.12.2015	(73) Власник(и): ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ І ВІРУСОЛОГІЇ ІМ. Д.К. ЗАБОЛОТНОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ, вул. Заболотного, 154, м. Київ, 03680 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.12.2015, Бюл.№ 24	

(54) **ШТАМ PSEUDOMONAS CHLORORAPHIS SUBSP. AUREOFACIENS - ПРОДУЦЕНТ ЛІПОПОЛІСАХАРИДУ З АКТИВНІСТЮ ЩОДО ВІРУСІВ ГРИПУ, ГЕРПЕСУ ТА ГЕПАТИТУ С**

(57) Реферат:

Штам *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* - продуцент ліпополісахариду з активністю щодо вірусів грипу, герпесу та гепатиту С, зареєстрований в Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України під номером ІМВ В-7097.

UA 103797 U

Корисна модель належить до біотехнології, а саме до одержання противірусних препаратів за допомогою мікробного синтезу.

Проблема боротьби з вірусними інфекціями є однією з актуальніших проблем сучасної медицини. Проти синдрому одержаного імунodefіциту - СПІДУ, цитомегаловірусної інфекції, геморагічних лихоманок (однією з яких є смертельна лихорадка Ебола) досі не існує ефективних лікувальних засобів. Грип та інші гострі респіраторні вірусні захворювання (ГРВЗ) займають провідне місце в структурі інфекційної патології людини, дуже швидко і широко розповсюджуються і зумовлюють істотний рівень захворюваності і смертності в усьому світі. Як підкреслюють експерти ВОЗ, зберігається тенденція до постійного росту захворюваності [Бабушкіна, 2011].

Збудники перелічених захворювань виявляються частково чи повністю стійкими до лікування. Сучасна хіміотерапія пропонує широкий арсенал противірусних заходів - аномальні нуклеозиди, похідні адамантану та тіосемікарбазонів, синтетичні амінокислоти, віруліцидні препарати, численні інтерферони та інтерфероногени [Дьячкова С.Я., Николаевский В.А., 2008]. Проте традиційні методи лікування з використанням названих противірусних препаратів часто виявляються неуспішними. Проблема відсутності високоефективних засобів профілактики і лікування вірусних інфекцій є актуальною не тільки в зв'язку з тяжкістю їх перебігу і можливими серйозними ускладненнями, але і в зв'язку з провокуванням багатьох інших, зокрема онкологічних захворювань. Таким чином, пошуки нових альтернативних засобів впливу на віруси і вірусні інфекції є актуальною задачею сучасної медицини і біотехнології.

В основу корисної моделі поставлена задача отримання штаму-продуцента ліпополісахариду з широким спектром противірусної активності, спрямованої проти вірусів грипу, герпесу та гепатиту С.

Повідомлення про здатність бактеріальних ліпополісахаридів (ЛПС) або ендотоксинів запобігати розвитку деяких експериментальних вірусних інфекцій досить давно присутні в літературі. Пізніше було висловлено припущення, що противірусний ефект бактеріальних ЛПС може бути зумовлений стимуляцією ними біосинтезу ендогенного інтерферону [Solov'ev, Bektemirov, 1973]. Це припущення підтверджене багатьма дослідженнями. Як приклад можна навести дослідження препаратів ЛПС *Escherichia coli* та *Salmonella typhimurium*, які підвищували секрецію В2 інтерферону культурою клітин фібробластів шкіри людини, що, в свою чергу, забезпечувало захист від вірусу везикулярного стоматиту [Helfgott et al., 1987].

Дані про захисну дію бактеріальних ендотоксинів стосуються лише окремих експериментальних вірусних інфекцій, а більшість досліджених ЛПС була одержана із штамів патогенних або умовно патогенних грамнегативних бактерій і характеризувалася значною токсичністю.

На відміну від цитованих робіт, об'єктом наших досліджень були сапрофітні бактерії роду *Pseudomonas*, що широко населяють ґрунти, воду, ризосферу рослин. В попередні роки нами були досліджені і вперше встановлені противірусні властивості ліпополісахаридів *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* - виду, що широко використовується для біологічного захисту сільськогосподарських культур від шкідників і патогенів [Кипріанова та інш., 2013]. Було запропоновано і захищено патентом штам *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* УКМ В-7096 - продуцент ліпополісахариду, високо ефективного щодо вірусів тютюнової мозаїки і вірусу герпесу [Патент України №76879, 2013]. Продовження цих досліджень дозволило нам одержати нові дані і запропонувати патент Штам *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* УКМ В-7097 - продуцент ліпополісахариду, високоефективного щодо широкого спектру вірусів людини (вірусу грипу, вірусу герпесу та вірусу бичачої діареї, що використовується як модель вірусу гепатиту С).

Найбільш близьким до корисної моделі є згаданий вище захищений патентом України штам *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* УКМ В-7096, ліпополісахарид якого забезпечує зниження інфекційного титру вірусу герпесу на 3,0 lg ID₅₀. Його ефективність щодо вірусу грипу, а тим більше щодо вірусу гепатиту С, невідомі.

Досліджений нами штам *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* ізолювано з ґрунту в 1980 р. співробітниками відділу антибіотиків ІМВ НАН України під номером ІМВ В-7097.

Культурально-морфологічні та фізіолого-біохімічні особливості продуцента.

Грам-негативна рухома паличка, лофотрих. Не утворює включень полі-β-оксимасляної кислоти. На м'ясопептонному агарі колонії гладкі, круглі, блискучі, пастоподібні, на м'ясопептонному бульйоні - рівномірна муть. Виділяють у середовище жовто-зелений флюоресціюючий пігмент, характерний для багатьох видів псевдомонад, та червоно-оранжовий пігмент, який вилучається хлороформом і являє собою комплекс похідних феназину. Аероб, що використовує глюкозу тільки окислювальним шляхом. Оксидазопозитивні за Ковачем.

Оптимальна для росту температура 27 °С. При 42 °С не ростуть. Анаеробно розщеплюють аргінін, не здатні до денітрифікації, не мають лізин декарбоксилази, не гідролізують крохмаль та ескулін. Гідролізують желатин, окислюють глюконат, утворюють леван із сахарози. Як єдине джерело вуглецю використовують більше 60 органічних сполук різної хімічної будови, в тому числі триптофан, антранілат, феніл ацетат.

Штам зберігається в ліофілізованому стані або у високому (8-10 мл) стовпчику з 0,5 % м'ясопептонного агару (МПА) під шаром стерильного вазелінового масла при кімнатній температурі. Пересів 1 раз на рік.

Добре росте на м'ясопептонному агарі при 25-30 °С. Ідентифікація проведена за визначником: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2 ed.), Volume 3. 2008 та публікацією, присвяченою таксономічній структурі виду [Peix et al. 2007].

Штам-продуцент *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* B-7097 не вірулентний, не токсигенний і не токсичний для теплокровних організмів, не проникає і не розмножується в клітинах організму, не спричиняє запальної дії на слизові оболонки та шкіру, належать до 4-го класу небезпеки.

Температурні умови теплокровного організму не є сприятливими для життєдіяльності цих бактерій, оптимальна температура росту яких складає 26-28 °С.

Спосіб одержання ліпополісахариду (ЛПС) включає вирощування штаму-продуцента в умовах аерації на середовищі Кінг А (г/л): пептон - 20, K₂SO₄-20, гліцерин - 20, MgCl₂-7 на протязі 72 год. при 27 °С. Ліпополісахарид одержували з клітин штаму B-7097 водно-фенольним методом за Вестфалем-Янном.

Як тест-об'єкт використовували: 1) вірус грипу - штам A/FM/1/47(H1N1) - інфекційний титр алантоїсної культури - 8,0 lg ID₅₀/0,2 мл, титр гемаглютиніну - 1:512 ГАО/0,2 мл; 2) вірус простого герпесу 2 типу (ВПГ-2) - штам ВН, інфекційний титр за ЦПД в культурі клітин складав -7,0. До початку експериментальних досліджень вірус зберігали при -70 °С; 3) вірус бичачої вірусної діареї (ВБВД): інфекційний титр вірусу після десяти проведених пасажів в культурі клітин VLDR складав 6-7 lg ID₅₀, який є тест-моделлю вірусу гепатиту С (ВГС).

Здатність ЛПС гальмувати розвиток вірусної інфекції проводили на трьох типах культур клітин: 1) MDCK - перещеплювана культура клітин нирки собак; 2) Vero - перещеплювана культура клітин нирки африканської зеленої мавпи; 3) VLDR - перещеплювана культура клітин нирки бика.

Визначення цитотоксичної концентрації (CC₅₀) ЛПС проводили на трьох типах клітин. Досліджувані концентрації ЛПС складали від 1.55 до 100 мкг/мл. Встановлено, що CC₅₀ ЛПС для всіх трьох типів культур дорівнювала 100,0 мкг/мл.

Для визначення антигрипозної активності препарату ЛПС в умовах *in vitro* використовували добову перещеплювану культуру клітин MDCK із суцільним шаром. Клітини вирощували в плашках на середовищі RPMI-1640+10 % фетальної сироватки (Nunc, Surface, Denmark) при температурі 37 °С в термостаті з подачею CO₂. Для підвищення чутливості клітин до зараження їх вірусом грипу проводили їх обробку трипсином. Маточний розчин трипсину готували, додаючи до 3 г наважки ферменту 3 мл поживного середовища DMEM. Клітини тричі промивали цим розчином по 50 мкл на лунку. Середовище росту зливали, до клітин додавали досліджувані препарати в різних концентраціях і вносили вірус грипу в дозі 100 ТЦД₅₀. Культури інкубували в термостаті з подачею CO₂ протягом 3 діб, щодня контролюючи за допомогою мікроскопу. Через 48-72 год. інкубації клітин культуральну рідину збирали і в ній визначали інфекційний титр вірусу грипу титруванням в культурі клітин. В досліді використовували вірус грипу, штам A/FM/1/47 (H1N1) інфекційний титр в MDCK-8,0 lg ID₅₀. Результати вивчення впливу різних концентрацій (від 1,55 до 25,0 мкг/мл) препарату ЛПС свідчать про пригнічення репродукції вірусу грипу під його впливом: ED₅₀ (мінімальна кількість препарату, що пригнічує розвиток віруспецифічного ЦПД на 50 %) дорівнювала 1,55. Визначення індексу селективності (IS) препарату ЛПС відносно вірусу грипу A/FM/1/47(H1N1) шляхом встановлення співвідношення CC₅₀ до ED₅₀, свідчить, що досліджуваний препарат ЛПС є ефективним інгібітором репродукції вірусу грипу: IS складає 64.

Для вивчення антигерпетичної активності препарату ЛПС використовували перещеплювану культуру клітин Vero. Клітини вирощували в плашках на середовищі RPMI-1640+10 % фетальної сироватки (Nunc, Surface, Denmark) при температурі 37 °С в термостаті з подачею CO₂. Використовували вірус герпесу 2 типу шт. ВН, інфекційний титр 7,0 lg ID₅₀.

Для вивчення антивірусної активності препаратів відбирали добові культури клітин Vero із суцільним моношаром клітин. Середовище росту зливали, на моношар клітин додавали досліджуваний препарат у різних концентраціях. Через 1 год. контакту додавали вірус герпесу в дозі 100 ТЦД₅₀. Культури інкубували в термостаті з подачею CO₂ протягом 5 діб, щодня контролюючи за допомогою мікроскопу і відмічаючи репродукцію вірусу по цитопатичній дії ВПГ

на клітини Vero у порівнянні з контрольними культурами, де моношар не піддавався ніяким впливам. Цитопатична дія ВПГ на клітини морфологічно проявляється в утворенні симпластів або округлих клітин у сполученні з проліферацією і появою гігантських багатоядерних клітин. Через 3 доби збирали культуральне середовище з лунок плашок і в ньому визначали інфекційний титр у кожній пробі при введенні препарату ЛПС. Результати вивчення впливу різних концентрацій (від 1,55 до 25,0 мкг/мл) препарату ЛПС свідчать, що досліджуваний ЛПС був ефективним інгібітором репродукції вірусу герпесу 2 типу: ED₅₀ дорівнювала 1,55 мкг/мл. Визначення індексу селективності (IS) препарату ЛПС відносно вірусу герпесу 2 типу свідчить, що досліджуваний препарат ЛПС є ефективним інгібітором репродукції вірусу герпесу: IS складає 64.

Як сурогатний вірус гепатиту С (ВГС) використовували вірус бичачої вірусної діареї (ВБВД). Антивірусну активність вивчали в культурі VLDR, до якої вносили різні концентрації препарату ЛПС (від 1,55 до 12,5 мкг/мл) і додавали ВБВД в дозі 100 ТЦД₅₀. Культури інкубували в термостаті до специфічної цитопатогенної дії в контролі вірусу, а потім в культуральному середовищі визначали інфекційний титр вірусу. Аналізуючи одержані результати, слід відмітити, що препарат ЛПС пригнічував репродукцію сурогатного вірусу гепатиту С на 4,0-2,5 lg ID₅₀. На основі встановлених даних CC₅₀ (100 мкг/мл) і ED₅₀ (1,55 мкг/мл) було розраховано значення IS препарату ЛПС відносно вірусу ВБВД, яке складало 64.

Високий показник IS свідчить, що препарат ЛПС є ефективним інгібітором сурогатного вірусу гепатиту С - ВБВД.

Таким чином встановлено, що ЛПС *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* IMB B-7097 є високо активним противірусним агентом. Він пригнічував репродукцію вірусу грипу A/FM/1/47(H1N1), вірусу герпесу 2 типу, а також вірусу бичачої вірусної діареї - сурогатного вірусу гепатиту С.

Джерела інформації:

1. Бабушкина А.В. Острые вирусные заболевания и бронхообструктивный синдром. Укр. Медичний часопис (2011) №1 (81)1-11.
2. Дьячкова С.Я., Николаевский В.А. Противовирусные средства. Воронеж, 2008.
3. Solov'ev V.D., Bektemirov T.A. Interferon. Theory and Applications. Plenum Press, New York 117-139 (1973).
4. Helfgott D.C. et al. Bacterial lipopolysaccharides (exotoxin) enhances expression and secretion of B2 interferon by human fibroblasts // J. Exp. Med. V.166, 1987, № 5, p. 1300-1309.
5. Кіпріанова О.А., Варбанець Л.Д., Шепелевич В.В., Войчук С.І. Противірусна активність ліпополісахаридів *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* II Biotechnologia Acta т.6, № 2, 2013, 68-73.
6. Штам *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* - продуцент ліпополісахариду з противірусною активністю. Патент України № 76689, МПК C12N1/100, 2013.01.
7. Peix A., Valverde A., Rivas R., Igual J., Ramirez-Bahena M., Mateos P., Santa-Regina I., Rodrigues-Barrueco C, Martinez-Molina E., Velazquez E. Reclassification of *Pseudomonas aurantiaca* as a synonym of *Pseudomonas chlororaphis* and proposal of three subspecies, *P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis* subsp. nov., *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* subsp. nov., comb. nov. and *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* subsp. nov., comb. nov. // Intern. J. Syst. Evol. Microbiol., 2007,57,1286-1290.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Штам *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* - продуцент ліпополісахариду з активністю щодо вірусів грипу, герпесу та гепатиту С, зареєстрований в Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України під номером IMB B-7097.

Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

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