



УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **89522**

(13) **U**

(51) МПК

A61K 35/18 (2006.01)

A61K 35/28 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2013 13106**

(22) Дата подання заявки: **11.11.2013**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **25.04.2014**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **25.04.2014, Бюл.№ 8**

(72) Винахідник(и):

**Рибалко Світлана Леонтіївна (UA),
Варбанець Людмила Дмитрівна (UA),
Іванська Наїля Валєєвна (UA)**

(73) Власник(и):

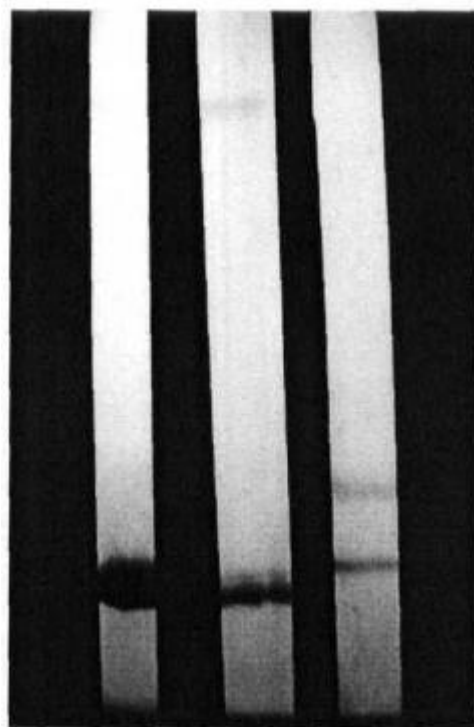
**ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ
ЕПІДЕМІОЛОГІЇ ТА ІНФЕКЦІЙНИХ
ХВОРОБ ІМ. Л.В. ГРОМАШЕВСЬКОГО
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ
НАУК УКРАЇНИ",
вул. М. Амосова, 5, м. Київ, 03038 (UA)**

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ВУГЛЕВОДВІСНИХ БІОПОЛІМЕРІВ-МІМІКРИНІВ

(57) Реферат:

Спосіб одержання вуглеводвмісних біополімерів - мімікринів полягає у вирощуванні бактерій в культуральному середовищі, осадженні клітин бактерій. З культурального середовища після вирощування бактерій виділяють осад шляхом трикратного осадження етанолом з подальшим кип'ятінням розчиненого осаду і очищенням на колонці методом гель-фільтрації. Потім за допомогою афінної хроматографії з використанням сефарози з пришитим імуноглобуліном до гемаглютиніну вірусу грипу отримують імунологічну споріднену гемаглютининподібну структуру – мімікрин.

UA 89522 U



1 2 3

Fig. 1

Корисна модель належить до біотехнології, імунохімії, ветеринарії та медицини і може бути використана для отримання вуглеводвмісних біополімерів - мімікринів.

В останні роки досить активно проводяться дослідження, пов'язані з вивченням різних аспектів антигенної мімікрії, тобто наявності у різних гомологічних чи негомологічних білкових або нуклеотидних структур ділянок, які містять тотожні послідовності. На підставі досі накопиченої інформації про структуру й функції ряду вірусних білків встановлено, що вони містять специфічні послідовності, гомологічні ендегенним регуляторним пептидам або білкам макроорганізму. Хвороботворні бактерії долають тканинні бар'єри макроорганізму шляхом контакту з поверхневими структурами клітин оскільки на поверхні бактерій є фрагменти молекул, подібні до зв'язуючих сайтів деяких фізіологічно активних сполук хазяїна. Вважають, що молекулярна мімікрія у збудників посилює міжвидове розмаїття молекул, причетних до захисту хазяїв проти вірусів та інших мікробів. З іншого боку, патогенні мікроорганізми здатні протистояти захисним антитілозалежним реакціям хазяїна, використовуючи деякі механізми молекулярної мімікрії.

Нами попередньо було показано [1], що деякі бактерії виділяють в культуральне середовище сполуки, які інгібують нейрамінідазну активність вірусів грипу і парагрипу. Ці сполуки були названі нейрамінінами, а потім мімікринами за їх здатність перехресно реагувати з різними антитілами. Спосіб отримання нейрамінінів з бактерій полягав у вирощуванні їх в культуральному середовищі, осадженні клітин шляхом центрифугування з подальшою екстракцією речовин з надосадкової рідини етанолом і осадженням цих речовин центрифугуванням. Але отримані за способом нейрамініни містили багато домішок, які зменшували специфічність реакції.

В основу корисної моделі поставлена задача створення способу одержання вуглеводвмісних біополімерів - мімікринів, в якому за рахунок нових дій по виділенню осаду з культурального середовища після вирощування бактерій та нових дій режимів та речовин по його обробці забезпечується отримання гемаглютининподібної структури - мімікрину.

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб одержання вуглеводвмісних біополімерів - мімікринів включає вирощування бактерій в культуральному середовищі, осадженні клітин бактерій.

Новим у способі є те, що з культурального середовища після вирощування бактерій виділяють осад шляхом трикратного осадження етанолом з подальшим кип'ятінням розчиненого осаду і очищенням на колонці методом гель-фільтрації, а потім за допомогою афінної хроматографії з використанням сефарози з пришитим імуноглобуліном до гемаглютиніну вірусу грипу отримують імунологічну споріднену гемаглютининподібну структуру - мімікрин.

В конкретних варіантах реалізації способу для вирощування застосовують клітини бактерій роду *Staphylococcus aureus*, або *Bacillus subtilis*.

Застосування таких клітин бактерій покращує структуру отриманого мімікрину.

В конкретних варіантах реалізації способу після трикратного осадження етанолом подальше кип'ятіння розчиненого осаду здійснюють протягом 10 хв.

Суть корисної моделі пояснює графічне зображення, на якому показана перехресна взаємодія моноклональних антитіл до гемаглютиніну ГА-1 вірусу грипу H_1N_1 і фракцією 13 мімікрину в імуноблоті:

1 - ГА-1 з моноклональних антитіл (МКА) проти вірусу грипу H_1N_1 ;

2 - фракція 13 мімікрину з МКА проти вірусу грипу H_1N_1 ;

3 - негативний контроль.

Приклад

Після культивування мікроорганізмів мадосадкову рідину, яку отримували після центрифугування при 8000 об/хв. протягом 30 хв., змішували з етиловим спиртом в об'ємах 1:1,5 (культура:спирт) і етанолову преципітацію продовжували протягом 12 год. при 4 °С. Осад після екстракції відмивали 60 % етиловим спиртом, знову центрифугували за тих же умов, що описані вище, і отриманий осад розчиняли у 10 мл фосфатного буферу. Таку етанолову преципітацію проводили тричі. Преципітат, розчинений в буферному розчині, кип'ятили протягом 10 хв. і осад видаляли центрифугуванням при 10000 об/хв. протягом 20 хв. Надосадкову рідину, яка містить мімікрини наносили на колонку сефарози з пришитими антитілами проти гемаглютиніну (ГА) вірусу грипу в концентрації 1 мг/мл і зв'язування здійснювали при 4 °С протягом 1 год. Ацетатним буфером 0,01 М відмивали незв'язані компоненти препарату, а потім ацетатним буфером градієнтної молярності елюювали препарат. Фракції препарату, одержані методом афінної хроматографії, досліджували на спектрофотометрі і визначали їх антигемаглютининуючу активність по взаємодії з сироватками до

ГА і мімікрину (MI), а також нейрамінідазну активність препаратів. Гемаглютинінподібна структура - мімікрин була елюйована 0,5 М ацетатним буфером (таблиця 1).

Таблиця 1

Характеристика фракцій після афінної хроматографії

№ фракції	оптична густина ₂₈₀	оптична густина ₂₃₀
1	0	0
2	0	0
3	0,2±0,006	0,4±0,013
4	0,6±0,018	1,0±0,03
5	1,0±0,03	1,6±0,48
6	0,6±0,018	1,0±0,3
7	0,3±0,01	0,6±0,018
8	0,090±0,001	0,25±0,019
9	0,03±0,01	0,09±0,027
10	0,010±0,003	0,05±0,015
11	0,005±0,001	0,04±0,012
12	0,1±0,003	0,15±0,04
13	0,2±0,006	2,0±0,6

5 Фракції зняті з колонки по різному реагували з сироватками до гемаглютиніну та мімікрину. Фракції 3, 4 та 7, 8 не взаємодіяли з сироваткою до гемаглютинінів ГА-1 та ГА-3. Фракція 13 реагувала з моноклональними антитілами проти ГА-1 в імуноферментному аналізі та імуноблоті.

10 Методом імуноблоту з моноклональними антитілами до вірусу грипу H₁N₁ та сироваткою до гемаглютинінподібної структури мімікрину з фракції 13 одержано характерне фарбування, що свідчить про перехресну взаємодію антитіл до грипу і мімікрину (Фіг. 1).

Антинейрамінідазну активність визначали по здатності фракцій мімікрину пригнічувати нейрамінідазну активність вірусу грипу (таблиця 2).

Таблиця 2

Визначення антинейрамінідазної активності фракцій мімікрину

№ фракції	оптична густина ₅₄₉	Нейрамінідаза (%)	
		активність	інгібіція
1	2	3	4
Контроль вірусу	1,2±0,036	100	0
2	0,8±0,024	66,4±1,99	33,6±1,01
3	0,4±0,012	33,2±0,996	66,8±2,004
4	0,1±0,003	8,3±0,249	91,7±2,75
5	0,25±0,075	20,75±0,623	79,25±2,378
6	0,3±0,009	24,9±0,747	75,1±2,25
7	0,5±0,015	41,5±1,245	48,5±1,46
8	0,7±0,021	58,1±1,745	41,9±1,26
9	0,8±0,024	66,4±1,99	33,6±1,008
10	0,85±0,025	70,55±2,117	29,45±0,884
11	1,4±0,042	117±3,51	+ 17±0,51
12	0,45±0,013	37,35±1,121	62,65±1,88
13	0,3±0,009	24,9±0,747	75,1±2,253

15 Як видно з таблиці 2, фракції препарату мімікрину 3, 4, 5, 12 та 13 на 60-90 % пригнічували нейрамінідазну активність вірусу грипу. Препарат 7 фракції дещо збільшував її.

20 За амінокислотним складом фракції препарату кількісно відрізнялися один від одного. Так, у вихідному препараті мімікрину золотистого стафілококу були відсутні аргінін, цистеїн, а в препаратах з фракцій 3, 5, 7, 13 спостерігалася відсутність проліну, метіоніну та тирозину.

Моносахаридний склад у всіх фракціях мімікрину представлений глюкозою та манозою, але

співвідношення цих компонентів було різним. В препараті з фракції 3 співвідношення глюкози та манози становило 16:1, фракції 5 0,5:17, в 7-ої - 14:22, у 13 - вуглеводний компонент повністю був відсутній.

Таким чином, методом афінної хроматографії з використанням сефарози з пришитим імуноглобуліном до гемаглютиніну (ГА) вірусу грипу отримана гемаглютининподібна структура мімікрин.

Джерела інформації:

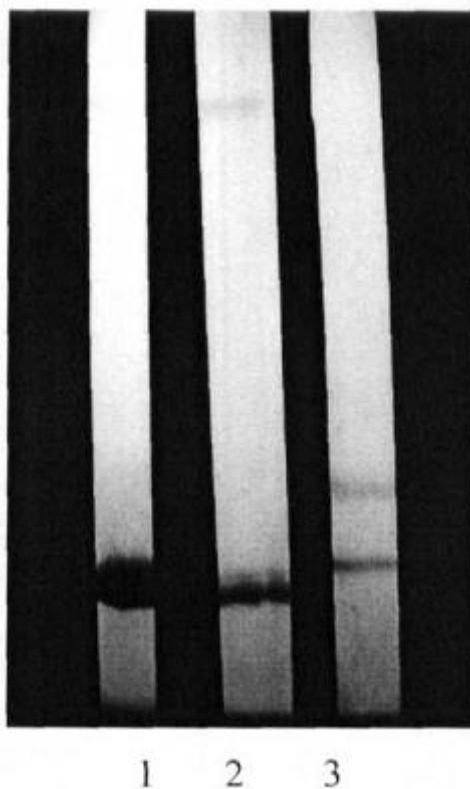
1. Авторское свидетельство № 924949 от 04.10.1982. Способ получения ингибитора нейраминидазы // Фролов А.Ф., Шапиро А.В., Рыбалко С.Л. и др.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

1. Спосіб одержання вуглеводвмісних біополімерів - мімікринів, який полягає у вирощуванні бактерій в культуральному середовищі, осадженні клітин бактерій, який **відрізняється** тим, що з культурального середовища після вирощування бактерій виділяють осад шляхом трикратного осадження етанолом з подальшим кип'ятінням розчиненого осаду і очищенням на колонці методом гель-фільтрації, а потім за допомогою афінної хроматографії з використанням сефарози з пришитим імуноглобуліном до гемаглютиніну вірусу грипу отримують імунологічну споріднену гемаглютининподібну структуру - мімікрин.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що для вирощування застосовують клітини бактерій роду *Staphylococcus aureus* або *Bacillus subtilis*.

3. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що після трикратного осадження етанолом подальше кип'ятіння розчиненого осаду здійснюють протягом 10 хв.



Комп'ютерна верстка В. Мацело

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