



(51) МПК  
*A61K 38/46* (2006.01)  
*C12N 9/14* (2006.01)  
*C12N 1/20* (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2014131421/10, 29.07.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
 29.07.2014

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 29.07.2014

(43) Дата публикации заявки: 20.02.2016 Бюл. № 5

(45) Опубликовано: 10.04.2016 Бюл. № 10

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2420309 C2, 10.06.2011. RU 2038776 C1, 09.07.1995. SU 998502 A1, 23.02.1983. MICHAEL J. BENEDIK et al., *Serratia marcescens and its extracellular nuclease*, *obiology Letters*, 1998, N165, pp.1-13.

Адрес для переписки:

630559, Новосибирская обл., Новосибирский р-н, р.п. Кольцово, ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор", зав. патентным отделом Мистюрину Ю.Н.

(72) Автор(ы):

Пучкова Лариса Ивановна (RU),  
 Ибрагимова Жанна Борисовна (RU),  
 Мазуркова Наталья Алексеевна (RU),  
 Андреева Ирина Сергеевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное бюджетное учреждение науки  
 "Государственный научный центр  
 вирусологии и биотехнологии "Вектор"  
 (ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор") (RU)

(54) ПРОТИВОВИРУСНОЕ СРЕДСТВО НА ОСНОВЕ НУКЛЕАЗЫ БАКТЕРИЙ РОДА SERRATIA

(57) Реферат:

Изобретение касается средства, обладающего противовирусной активностью относительно вирусов гриппа, осповакцины (ВОВ), вируса оспы мышей (ВОМ) и вируса герпеса 2-го типа (ВПГ-2) Представлено средство на основе нуклеазы бактерий рода *Serratia*. В качестве источника нуклеазы бактерий рода *Serratia* оно содержит очищенную культуральную жидкость штамма бактерий *Serratia plymuthica*, имеющую РНКазную активность от 109,0 до 926 ед/мл и содержание белка от 3,6 до 13,5 мг/мл. В качестве штамма бактерий *Serratia plymuthica* может быть

использован штамм бактерий *Serratia plymuthica* Dg-91, или Dg-98, или Bp-868, или Az-372, депонированные в коллекции бактерий, бактериофагов и грибов Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» под регистрационными номерами В-1288, или В-1297, или В-1296, или В-1285 соответственно. Изобретение может быть использовано в медицине, микробиологической промышленности. 5 з.п. ф-лы, 4 табл., 22 пр.

RU 2 580 242 C2

RU 2 580 242 C2



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 580 242**<sup>(13)</sup> **C2**

(51) Int. Cl.

*A61K* 38/46 (2006.01)

*C12N* 9/14 (2006.01)

*C12N* 1/20 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: 2014131421/10, 29.07.2014

(24) Effective date for property rights:  
29.07.2014

Priority:

(22) Date of filing: 29.07.2014

(43) Application published: 20.02.2016 Bull. № 5

(45) Date of publication: 10.04.2016 Bull. № 10

Mail address:

630559, Novosibirskaja obl., Novosibirskij r-n, r.p.  
Koltsovo, FBUN GNTS VB "Vektor", zav.  
patentnym otdelom Mistjurinu JU.N.

(72) Inventor(s):

**Puchkova Larisa Ivanovna (RU),  
Ibragimova ZHanna Borisovna (RU),  
Mazurkova Natalja Alekseevna (RU),  
Andreeva Irina Sergeevna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe bjudzhetnoe uchrezhdenie nauki  
"Gosudarstvennyj nauchnyj tsentr virusologii i  
biotekhnologii "Vektor" (FBUN GNTS VB  
"Vektor") (RU)**

(54) **ANTIVIRAL AGENT BASED ON SERRATIA-FAMILY BACTERIA NUCLEASE**

(57) Abstract:

FIELD: bioengineering.

SUBSTANCE: invention relates to a substance with antiviral activity with respect to an influenza virus, variolovaccine, mousepox virus and herpes virus of the 2<sup>nd</sup> type. It discloses the Serratia-family nucleases-based bacteria. As the source of the latter it includes the purified culture fluid of the Serratia plymuthica bacteria strain with the PNA-like activity of 190.0-926 unit/ml and protein content of 3.6-13.5 mg/ml. The said Serratia

plymuthica bacteria strain can represent the Serratia plymuthica bacteria strain Dg-91 or Dg-98, or Bp-868 or Az-372 deposited in the collection of bacteria, bacteriophages and fungi of the Federal budget scientific Centre "State R&D centre of virology and biotechnology "Vector" enumerated as B-1288, or B-1297, or B-1296, or B-1285, respectively. The invention may be used in medicine and microbiological industry.

EFFECT: higher efficiency.

6 cl, 4 tbl, 22 ex

RU 2 580 242 C2

RU 2 580 242 C2

Изобретение относится к новому средству, обладающему противовирусной активностью относительно вирусов гриппа, осповакцины (ВОВ), вируса оспы мышей (ВОМ) и вируса герпеса 2-го типа (ВПГ-2) и может быть использовано в медицине, 5 микробиологической промышленности и биотехнологии. Указанное противовирусное средство представляет собой культуральную жидкость (КЖ) штаммов *Serratia plymuthica* Вр-868, или штамма *Serratia plymuthica* Dg-91, или штамма *Serratia plymuthica* Dg-98, или *Serratia plymuthica* Az-372.

В связи с широким распространением вирусных заболеваний, вызванных вирусами различной этиологии, в настоящее время особую актуальность имеет поиск средств 10 противовирусной защиты с широким спектром действия против РНК- и ДНК-содержащих вирусов, углубленное изучение вирусных инфекций и создание препаратов, направленных на их подавление.

Известны данные об антивирусной активности панкреатической рибонуклеазы в отношении ряда РНК- и ДНК-содержащих вирусов, а также об их применении в клинике 15 для лечения вирусных заболеваний. Рядом исследователей изучаются антивирусные свойства нуклеаз, выделенных из микроорганизмов, которые обладают более выраженными антивирусными свойствами, чем панкреатическая рибонуклеаза [Шапот В.С., Нуклеазы. М., 1968; Нуклеазы микроорганизмов, под ред. А.М. Безбородова. М., 1974 *Nucleases*, ed. by S.M. Linn, R.J. Roberts, Cold Spring Harbour, 1982].

Известны сообщения об антивирусной, в частности антигриппозной, активности 20 веществ, имеющих природное происхождение. Так, авторы И.Д. Макаренкова и др. (2010) сообщают о способности сульфатированного полисахарида - фукоидана из морской бурой водоросли *Laminaria japonica* подавлять продукцию высокопатогенного вируса гриппа птиц А/Н5N1 в течение 24 ч инфекции при профилактической и лечебно- 25 профилактической схемах применения. [Противовирусная активность сульфатированного полисахарида из бурой водоросли *LAMINARIA JAPONICA* в отношении инфекции культур клеток, вызванной вирусом гриппа А птиц (H5N1). Макаренкова И.Д., Дерябин П.Г., Львов Д.К., Звягинцева Т.Н., Беседнова Н.Н. Вопросы вирусологии. 2010. Т. 55. №1. С. 41-45].

Показана противовирусная активность препаратов грибного происхождения [Разумов 30 И.А., Косогова Т.А., Казачинская Е.В., Пучкова Л.И., Щербакова Н.С., Горбунова И.А., Михайловская И.Н., Локтев В.Б., Теплякова Т.В. Противовирусная активность водных экстрактов и полисахаридных фракций, полученных из мицелия и плодовых тел высших грибов. // Антибиотики и Химиотерапия, т. 55, №9-10, 2010].

Рибонуклеазы обладают выраженной противовирусной активностью в отношении 35 таких РНК-содержащих вирусов, как вирусы гриппа, полиомиелита, клещевого энцефалита, бешенства [ГРИБЕНЧА С.В. Противовирусная активность РНКазы *Bacillus intermedius* у морских свинок и кроликов, зараженных вирусом бешенства // Вопросы вирусологии, 2006, №5, с. 41-43]. Дезоксирибонуклеазы тормозят синтез и размножение 40 ДНК-содержащих вирусов, осповакцины, аденовируса, герпеса.

Одним из наиболее изученных энзимов этого класса является секретируемая 45 эндонуклеаза *Serratia marcescens*. Грамотрицательные бактерии рода *Serratia*, в культуральной жидкости отдельных штаммов которых обнаружены высокие РНК-азная и ДНК-азная активности широко известны как продуценты различного рода препаратов [Габдуллина Г.К. Действие нуклеазы *Serratia marcescens* на клетки и рост асцитной опухоли Эрлиха: Автореф. дис... канд. биол. наук. - Казань, 1980. - 20 с.; Патент РФ №2148645, МПК С12N 9/20, опубл. 10.05.2000 г. «Штамм бактерий *Serratia marcescens* - продуцент липазы». Фермент тормозит размножение вирусов везикулярного

стоматита и осповакцины в культуре клеток куриных фибробластов.

Известен штамм *Serratia marcescens* В-10 М-1 продуцент дезоксирибонуклеазы наиболее часто используемой в лабораторных условиях. [Нуклеазы микроорганизмов и их практическое использование. Рига, 1989, с. 3. 2. Биосинтез микроорганизмами нуклеаз и протеаз. М.: Наука, 1979, с. 7].

Первый созданный на основе эндонуклеазы *Serratia marcescens* противовирусный препарат получил название эндонуклеаза бактериальная. В настоящее время нуклеазы из бактерий *Serratia marcescens* используют для лечения вирусных заболеваний пчел [Патент РФ №2038776, МПК А01К 51/00, опубл. 09.07.1995 г., «Средство "Эндоглиокин" для профилактики и лечения вирусных заболеваний пчел и стимуляции развития пчелиных семей»]

Наиболее близким аналогом (прототипом) является средство на основе культуральной жидкости штамма бактерий *Serratia marcescens* [патент РФ №2420309, МПК А61К 39/00, опубл. 10.06.2011 г.].

Однако не известны опубликованные данные о том, что выше приведенные аналоги, в том числе и прототип, обладают ингибирующим действием против вирусов осповакцины (ВОВ), вируса оспы мышей (ВОМ) и вируса герпеса 2-го типа (ВПГ-2), а также высокопатогенных вирусов гриппа птиц А/Н5N1 и человека А/Н3N2.

Техническим результатом предлагаемого изобретения является создание нового противовирусного средства на основе нуклеазы бактерий рода *Serratia*, обладающей ингибирующей активностью в отношении вирусов осповакцины (ВОВ), вируса оспы мышей (ВОМ) и вируса герпеса 2-го типа (ВПГ-2), а также высокопатогенных вирусов гриппа птиц А/Н5N1 и человека А/Н3N2.

Указанный технический результат достигается тем, что в противовирусном средстве на основе нуклеазы бактерий рода *Serratia*, согласно изобретению, в качестве источника нуклеазы бактерий рода *Serratia* оно содержит очищенную культуральную жидкость штамма бактерий *Serratia plymuthica*, имеющую РНКазную активность от 109,0 до 926 ед/мл и содержание белка от 3,6 до 13,5 мг/мл.

Очищенная культуральная жидкость штамма бактерий *Serratia plymuthica* получена центрифугированием при 10000-12000 об/мин и ультрафильтрацией через фильтр с размерами пор 0,1-0,3 мкм.

В качестве штамма бактерий *Serratia plymuthica* оно содержит штамм бактерий *Serratia plymuthica* Dg-91, депонированный в коллекции бактерий, бактериофагов и грибов Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» под регистрационным номером В-1288. Средство обладает ингибирующей активностью против вируса гриппа птиц типа А и вирусов ВОМ и ВПГ-2.

В качестве штамма бактерий *Serratia plymuthica* оно содержит штамм бактерий *Serratia plymuthica* Dg-98, депонированный в коллекции бактерий, бактериофагов и грибов Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» под регистрационным номером В-1297. Средство обладает ингибирующей активностью против вируса гриппа типа А и вирусов ВОВ и ВПГ-2. В качестве штамма бактерий *Serratia plymuthica* оно содержит штамм бактерий *Serratia plymuthica* Вр-868, депонированный в коллекции бактерий, бактериофагов и грибов Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» под регистрационным номером В-1296. Средство обладает ингибирующей активностью против вируса гриппа типа А и вируса ВПГ-2.

В качестве штамма бактерий *Serratia plymuthica* оно содержит штамм бактерий *Serratia*

plymuthica Az-372, депонированный в коллекции бактерий, бактериофагов и грибов Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» под регистрационным номером В-1285. Средство обладает ингибирующей активностью против вируса гриппа типа А и вирусов ВОМ и ВПГ-2.

Штаммы, использованные для получения противовирусного средства, изолированы при высевах исследуемых образцов на среду РПА (рН 7,0-7,2, температура инкубирования 30-37°C). Характеристика заявляемых штаммов, связанная с источниками их выделения, представлена в таблице 1.

Таблица 1. Характеристика бактериальных штаммов по месту выделения

№ п/п	Штамм	Колл.номер	Источник выделения
1	<i>Serratia plymuthica</i> Вр-868 (Вр-868)	В-1296	Донные осадки Байкала
2	<i>Serratia plymuthica</i> Dg-91 (Dg-91)	В-1288	Грунт Долины гейзеров (Камчатка)
3	<i>Serratia plymuthica</i> Dg-98 (Dg-98)	В-1297	-«-
4	<i>Serratia plymuthica</i> Az-372 (Az-372)	В-1285	Выделен из аэрозоля атмосферного воздуха

Штаммы являются факультативными анаэробами, хорошо растут при температуре 30-37°C. Согласно результатам определения нуклеотидной последовательности 16S рРНК бактерии данной группы отнесены к роду *Serratia*.

Совокупные данные по фенотипическим и геномным признакам позволяют идентифицировать штаммы Dg-91, Dg-98, Вр-868, Az-372, как принадлежащие к виду *Serratia plymuthica*.

Субкультуры штаммов хранят периодическими пересевами на среде LB ("Difco") с добавлением агара до 1,5%, рН 7,0-7,2) и в 15%-ном растворе глицерина в LB при низкотемпературном замораживании при минус 65°C. Справки о депонировании штаммов прилагаются.

Свойства средства на основе продуктов метаболизма штаммов *Serratia plymuthica*, обладающих активностью против вирусов гриппа, ВОВ, ВПГ-2, ВОМ обнаружены впервые, в связи с чем можно сделать вывод о соответствии предлагаемых технических решений критериям изобретения «новизны» и «изобретательский уровень».

При культивировании применяли питательную среду "S" следующего состава в г/л: (Пептон Difco - 16,0; NaCl - 5,0; MgCl<sub>2</sub> - 0,1-, Трикс - 6,05; рН 8,0) или "Lb" (дрожжевой экстракт Difco - 10,0; пептон - 5,0; NaCl - 5,0; рН 7,2).

Для получения образцов культуральной жидкости (КЖ) штаммы культивировали в среде "S" или "LB" в течение 18 час при температуре 28-30°C с последующим центрифугированием в течение 20 мин при 8000 об/мин на центрифуге JA-21. Полученные образцы КЖ и биомассы хранили до использования в замороженном состоянии при температуре минус 20°C.

Количественную оценку нуклеазной активности проводили по превращению субстратных нуклеиновых кислот (дрожжевой РНК или ДНК из молок лосося, «Медиген», Россия) во фрагменты, растворимые в 4%-ной HClO<sub>4</sub>, с появлением кислоторастворимого материала с адсорбцией при 260 нм. (Лещинская И.Б., Балабан Н.П., Капранова М.Н., Голубенко И.А. Методы определения активности нуклеаз и родственных ферментов. В кн.: Современные методы изучения нуклеиновых кислот и

нуклеаз микроорганизмов. Казань: Изд-во КГУ - 1980. - С. 53-60).

Удельную активность измеряли в Е/мг белка. Концентрацию белка в образцах определяли по формуле:  $C \text{ мг/мл} = (D_{228,5} - D_{234,5}) : 3 \times n$ , где  $n$  - разведение образца []. (Ehresman E., Imbault P. and Weil L.N.. // Anal. Biochem. 1973. V. 54. №2. P. 454-463).

5 Получение и анализ культуральной жидкости (КЖ) на содержание внеклеточных нуклеаз.

Клетки выращивали в колбах со средой LB или средой S на качалке со скоростью перемешивания 150 об/мин. Время культивирования при температуре 30-37°C составляло 18-20 часов. КЖ собирали центрифугированием и замораживали до использования при 10 температуре минус 20°C. Анализировали КЖ на наличие нуклеаз методом скрининга в агарозе с последующим определением ферментативной активности.

Анализ биомассы на содержание нуклеаз.

Для анализа использовали клеточные экстракты (КЭ). Для этого биомассу, полученную после центрифугирования и отбора КЖ в количестве 0,3-0,5 г, подвергали 15 разрушению в 4-х мл дистиллированной воды на ультразвуковом дезинтеграторе («MSE», Англия) при температуре 4-5°C. Контролируя на спектрофотометре падение величины D560 обработку суспензии ультразвуком проводили до уменьшения оптической плотности суспензии на 80-90% от исходной. Далее суспензию клеток освобождали от клеточных остатков центрифугированием при 8000 об/мин, в течение 20 20 мин, при температуре 4°C. Полученный экстракт клеток замораживали и хранили при температуре минус 20°C.

Результаты анализа субстанций культуральной жидкости (КЖ) и клеточного экстракта (КЭ) представлены в таблице 1.

В таблице 1 приведены средние данные по 2-м экспериментам. В качестве контроля 25 использовали культуральную жидкость (кж) музейного штамма *S.marcescens*.

Таблица 1 Анализ КЖ и КЭ штаммов *Serratia plymuthica* на нуклеазную активность

Штамм/вид препарата	ДНКазная активность, ед/мг белка	РНКазная активность, ед/мг белка
Dg-98/ кж	21,25	25,4
Dg-98/ кэ	69,16	95,3
Dg-91/кж	8,94	26,7
Dg-91/ кэ	68,81	77,6
Az-372/ кэ	18,9	49,0
Az 372кж	11,7	17,8
Вр-868 кэ	-	39,6
<i>S.marcescens./ кж</i>	43,9	65,9

40 Изучение противовирусной активности образцов на основе бактериальных штаммов *Serratia plymuthica*

Подготовка вируса и культуры клеток к тестированию штамма.

Для тестирования токсичности и противовирусной эффективности бактериальных метаболитов относительно ортопоксвирусов и вируса простого герпеса 2-го типа (ВПГ- 2) использовали перевиваемую культуру клеток Vero, полученных из «Коллекции 45 культур клеток» ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Суспензию клеток с концентрацией  $1 \times 10^5$  кл./мл питательной среды DMEM, содержащей 10% сыворотки крови плодов коровы фирмы «Gibco», вносили в объеме 100 мкл/лунку 96-луночного планшета. Планшеты

с клетками помещали в термостат на 4 суток до образования монослоя при температуре 37°C, 5% CO<sub>2</sub> и 100% влажности.

В качестве ДНК-содержащих вирусов в работе использовали ортопоксвирусы: вирус осповакцины (ВОВ, штамм Л-ИВП) и вирус оспы мышей (ВОМ, штамм К-1), а также вирус простого герпеса 2-го типа (ВПГ-2, штамм MS), полученные из «Коллекции микроорганизмов» ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Концентрация вирусов на культуре клеток Vero по разным экспериментам составляла (4,4-5,5) lgТЦД<sub>50</sub>/мл (50% тканевых цитоплазматических доз в мл).

Определение токсических доз и противовирусного действия препаратов.

Для определения токсических доз препараты разводили в 2, 5, 10, 20, раз средой DMEM, вносили по 100 мкл в соответствующие лунки планшета с клетками Vero и инкубировали в термостате при температуре 37°C, 5% CO<sub>2</sub> и 100% влажности на 4 суток. Через 4 суток с помощью инвертированного микроскопа оценивали наличие токсического действия в монослоях клеток Vero, инкубированных с разными концентрациями препаратов. Для определения противовирусной активности препаратов использовали максимально переносимые концентрации (МПК). Данные по токсичности образцов представлены в табл. 2

Таблица 2. Токсичность бактериальных образцов относительно культуры клеток Vero.

№ образца (препарата)	Образец (препарат)	Наличие токсичности при разведении:	
		в 5 раз	в 10 раз
11-47	Az-372 (КЖ)	++++	----
12-116	Az-372 (КЖ)	----	----
12-118	Dg-91 (КЖ)	----	----
12-120	Az-372 /SA60%/	----	----
12-05	Dg 98(КЖ)	+---	----
14-08	Dg 98(КЖ)	----	----
14-12	Bp-868 (КЖ)	----	----

Обозначение: (++++, +---)- степень токсичности препаратов, (----)-

отсутствие токсичности.

Исследование противовирусной активности образцов проводили по профилактической схеме: сначала на культуру клеток вносится образец и затем вирус. В монослой культуры клеток вносили по 50 мкл/лунку выбранного разведения образца, через 1 ч инкубации при температуре +37°C, 5% CO<sub>2</sub> и 100% влажности вносили по 50 мкл/лунку разведенной ВСЖ. Клетки инкубировали 4 сут при температуре +37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в термостате ТС-1/80 СПУ (Россия). Через 4 сут в каждой лунке с помощью инвертированного микроскопа регистрировали ЦПД в монослое клеток. Определяли инфекционность вирусов в клетках, то есть титры вирусов в lgТЦД<sub>50</sub>/мл в опыте и контроле (ИД<sub>50</sub> in vitro с образцом и без него), а затем высчитывали индекс нейтрализации (ИН) вирусов под влиянием образца:  $ИН = ИД_{50} \text{ контроль (lg)} - ИД_{50} \text{ опыт (lg)}$ . Каждый вариант опыта выполняли в трех параллельных повторах, для анализа использовали средние величины полученных данных.

В качестве контроля использовали:

1. Контроль клеток, культивируемых в питательной среде DMEM.

2. Контроль репродукции ДНК-геномных вирусов в разведениях с 1 до 8 с десятикратным шагом без внесения препаратов, но с предварительным внесением питательной среды DMEM соответственно в объеме 50 мкл/лунку.

Ниже приведены примеры исследования противовирусной активности образцов препаратов на основе КЖ бактерий *Serratia plymuthica* Dg-91, *Serratia plymuthica* Az-372, *Serratia plymuthica* Вр-868, *Serratia plymuthica* Dg-98 относительно вирусов ВОВ, ВОМ, ВПГ-2.

Пример 1. Подготовка препарата (12-118) на основе водорастворимых метаболитов штамма *Serratia plymuthica* Dg-91 для испытания на противовирусную активность. Препарат получен на основе культуральной жидкости (КЖ). Суспензию клеток штамма *Serratia plymuthica* Dg-91, наработанных на агаризованной среде «LB» в течение 18 часов при температуре 28-30°C, вносили в количестве 2% в колбы с 50 мл среды LB и культивировали в течение 24 часов на термостатированной качалке (КТ 104, Россия). Полученную КЖ штамма *Serratia plymuthica* Dg-91 центрифугировали при 10000 об/мин в течение 30 мин на центрифуге JA-21. Осветленную надосадочную жидкость стерилизовали ультрафильтрацией через миллиметровские фильтры Whatman с размерами пор 0,22 мкм и использовали для испытания в качестве противовирусного препарата в профилактической схеме. Хранили препарат до использования при температуре минус 20°C.

Пример 2. Определение токсичности препарата №12-118.

Для определения токсических доз препарат №12-118 разводили в 5 и 10, раз средой DMEM, вносили по 50 мкл в соответствующие лунки планшета и ставили в термостат при температуре 37°C, 5% CO<sub>2</sub> и 100% влажности на 4 суток. Через 4 суток с помощью инвертированного микроскопа оценивали наличие токсического действия в монослоях клеток DMEM, инкубированных с разными концентрациями препарата. Препарат был не токсичен на клеточной культуре MDCK при разведении в 5 и 10 раз (табл. 2).

Пример 3. Испытание противовирусного действия препарата 12-118.

Перед использованием препарат разводили на среде DMEM в 10 раз. Исследование противовирусной активности образцов проводили по профилактической схеме. В монослой культуры клеток вносили по 50 мкл/лунку выбранного разведения образца, через 1 ч инкубации при температуре +37°C, 5% CO<sub>2</sub> и 100% влажности вносили по 50 мкл/лунку разведенной ВСЖ. Клетки инкубировали 4 сут при температуре +37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в термостате ТС-1/80 СПУ (Россия). Через 4 сут в каждой лунке с помощью инвертированного микроскопа регистрировали ЦПД в монослое клеток. Индекс нейтрализации составил для вируса ВОМ - 2,03 lg, для вируса ВПГ-2 - 2,0 lg (табл. 3).

Пример 4. Испытание противовирусного действия препарата 12-116, приготовленного на основе культуральной жидкости штамма *Serratia plymuthica* Az-372. Клетки штамма выращивали в LB pH 7,2. Препарат готовили, как в примере 1. Перед использованием препарат разводили в 10 раз. При инфекционности вируса ВОМ (титр составил 4,6 lgТЦД<sub>50</sub>/мл) его нейтрализация на клетках Vero в профилактической схеме под влиянием препарата 12-116 составила 2,03 lg, а для вируса ВПГ-2 (титр 5,31)-индекс нейтрализации - 2,0 lg.

Пример 5. Получение препарата 11-47, приготовленного на основе культуральной жидкости штамма *Serratia plymuthica* Az-372. Клетки штамма выращивали в среде S при



pH 7,8 в течение 18 ч. Далее образец получали как в примере 1.

Пример 6. Испытание противовирусного действия препарата 11-47, приготовленного на основе культуральной жидкости штамма *Serratia plymuthica* Az-372. Перед использованием препарат разводили в 10 раз. При инфекционности вируса ВОМ (титр 4,6 lgТЦД<sub>50</sub>/мл) его нейтрализация на клетках Vero в профилактической схеме под влиянием препарата 11-47 составила 3,0 lg, а для вируса ВПГ-2 (титр 5,31)-индекс нейтрализации - около 2,0 lg (табл. 3).

Пример 7. Получение препарата 12-05 и испытание его на противовирусную активность. Препарат получен на основе культуральной жидкости (КЖ) штамма *Serratia plymuthica* Dg-98. Суспензию клеток штамма, наработанных на агаризованной среде «S» в течение 20 часов при температуре 28-30°C, вносили в количестве 2% в колбы с 50 мл среды S и культивировали в течение 24 часов на термостатированной качалке (КТ 104, Россия). Полученную КЖ штамма *Serratia plymuthica* Dg-98 центрифугировали при 10000 об/мин в течение 30 мин на центрифуге JA-21. Осветленную надосадочную жидкость стерилизовали ультрафильтрацией через миллиметровые фильтры Whatman с размерами пор 0,22 мкм и использовали для испытания в качестве противовирусного препарата в профилактической схеме. Хранили препарат до использования при температуре минус 20°C. Перед использованием препарат разводили в 10 раз. При инфекционности вируса ВОВ (титр 4,47±0,03 lgТЦД<sub>50</sub>/мл) и вируса ВПГ-2 (титр 5,31±0,19) нейтрализация на клетках Vero в профилактической схеме под влиянием препарата 12-05 составила 2,0 lg для обоих вирусов (табл. 3).

Пример 8. Получение препарата 14-08 и испытание его на противовирусную активность. Препарат получен на основе культуральной жидкости (КЖ) штамма *Serratia plymuthica* Dg-98. Суспензию клеток штамма, наработанных на агаризованной среде «LB» в течение 20 часов при температуре 28-30°C, вносили в количестве 2% в колбы с 50 мл среды LB и культивировали в течение 24 часов на термостатированной качалке (КТ 104, Россия). Полученную КЖ штамма *Serratia plymuthica* Dg-98 центрифугировали при 10000 об/мин в течение 30 мин на центрифуге JA-21. Осветленную надосадочную жидкость стерилизовали ультрафильтрацией через миллиметровые фильтры Whatman с размерами пор 0,22 мкм и использовали для испытания в качестве противовирусного препарата в профилактической схеме. Хранили препарат до использования при температуре минус 20°C. Перед использованием препарат разводили в 5 раз. При инфекционности вируса ВОВ (титр 4,47±0,03 lgТЦД<sub>50</sub>/мл) и вируса ВПГ-2 (титр 5,31±0,19) нейтрализация на клетках Vero в профилактической схеме под влиянием препарата 14-08 составила 2,0 lg для обоих вирусов (табл. 3).

Пример 9. Получение препарата 14-12 и испытание его на противовирусную активность. Препарат получен на основе культуральной жидкости (КЖ) штамма *Serratia plymuthica* Bp-868. Суспензию клеток штамма, наработанных на агаризованной среде «LB» в течение 20 часов при температуре 28-30°C, вносили в количестве 2% в колбы с 50 мл среды LB и культивировали в течение 24 часов на термостатированной качалке (КТ 104, Россия). Полученную КЖ штамма *Serratia plymuthica* Bp-868 центрифугировали при 10000 об/мин в течение 30 мин на центрифуге JA-21. Осветленную надосадочную жидкость стерилизовали ультрафильтрацией через миллиметровые фильтры Whatman с размерами пор 0,22 мкм и использовали для испытания в качестве противовирусного препарата в профилактической схеме. Хранили препарат до использования при температуре минус 20°C. Перед использованием препарат разводили в 5 раз. Нейтрализация вирусов на клетках Vero под влиянием препарата 14-12 составила в

профилактической схеме для ВОВ - 1,0 lg, а для вируса ВПГ-2 - 2,0 lg (табл. 3).

Пример 10. Получение препарата 12-120. В образец КЖ полученный как препарат 12-116 (пример 4) добавили сульфат аммония до 60% для осаждения белков. Хранили препарат до использования при температуре минус 20°C. Перед использованием его стерилизовали ультрафильтрацией и разводили в 5 раз стерильной средой DMEM. Противовирусную активность испытали на 3-х вирусах. Данные по активности представлены в табл. 3.

Таблица 3. Противовирусная активность бактериальных препаратов в отношении ДНК-содержащих вирусов.

№ образца (препарата)	Штамм	Индекс нейтрализации (ИН) вируса (lg):		
		оспы мышей (ВОМ)	Осповакцины (ВОВ)	простого герпеса 2-го типа (ВПГ-2)
11-47	Az 372 КЖ	3,0	1,0	1,98
12-116	Az 372 КЖ	2,03	1,0	2,0
12-118	Dg 91КЖ	2,03	1,2	2,0
12-120	Az- 372 /CA	1,89	2,0	1,98
12-05	Dg-98	-	2,0	2,0
14-12	Bp-868	-	1,0	2,0
14-08	Dg-98	-	2,0	2,0
Титр вируса без препарата (контроль), lg		4,60±0,10	4,47±0,03	5,31±0,19

Подготовка к тестированию штаммов вируса гриппа и культуры клеток.

Для оценки противовирусной эффективности полученных препаратов использовали высокопатогенный вирус гриппа птиц A/chicken/Kurgan/05/2005 (A/H5N1) из коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор, наработанный на 10-суточных развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ). Концентрация вируса составила:  $10^{3,5-6,5}$  lg ТЦД<sub>50</sub>/мл. Вирус гриппа человека A/Aichi/2/68(A/H3N2) (из коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»), титр  $10^{2,5-6,5}$  lg ТЦД<sub>50</sub>/мл вирусаллантоисной жидкости (ВАЖ)). Для тестирования токсичности и противовирусной активности препаратов использовали перевиваемую культуру клеток MDCK.

Определение токсичности препаратов. Для определения токсических доз препараты разводили в 2, 5, 10, раз средой Axsevir-MDCK, вносили по 150 мкл в соответствующие лунки планшета с клетками MDCK и ставили в термостат при температуре 37°C, 5% CO<sub>2</sub> и 100% влажности на 2 суток.

Через 2 суток с помощью инвертированного микроскопа оценивали наличие токсического действия в монослоях клеток MDCK, инкубированных с разными концентрациями препаратов.

Для определения противовирусной активности препаратов использовали максимально переносимые концентрации (МПК).

Таблица 4. Определение противовирусной активности заявляемого средства на основе бактериальных штаммов *Serratia plymuthica*

№ образца	Штамм	С белка мг/мл	Активность (РНК-азная) ед/мл	Контроль вируса	Индекс нейтрализации вируса
<b>Вирус: A/Aichi/2/68 (H3N2)</b>					
11-13	Вр-868 КЭ	3,6	332,2	2,5±0,08lg	2,5 lg
12-01	Dg-91 КЖ	12,2	220,5	6,5±0,1lg	6,5 lg
12-16	Dg-91 КЭ	7,4	574,75	6,5±0,1lg	6,5 lg
12-25	Az-372 КЖ	10,25	108,9	6,5±0,1lg	3,0 lg
12-20	Dg 98 КЭ	4,6	465,3	3,5±0,08lg	3,5 lg
<b>Вирус: A/chickenKurgan/05/2005 (H5N1)</b>					
11-41	Az 372 КЖ	8,8	185,3	3,5±0,05lg	3,5 lg
12-01	Dg 91 КЖ	12,2	220,5	6,5±0,08lg	6,5 lg
12-54	Dg 91 КЖ	9,1	129,8	6,5±0,08lg	6,5 lg
12-55	Dg 91 КЭ	13,5	926,2	6,5±0,08lg	6,5 lg
12-16	Dg 91 КЭ	7,4	574,75	6,5±0,08lg	6,5 lg

Определение противовирусной активности препаратов. Для определения противовирусной активности препаратов готовили десятикратные разведения ВАЖ от 1 до 8 с использованием среды Ахсевir-MDCK, содержащей 2 мкг/мл трипсина. В монослой культуры клеток MDCK вносили по 50 мкл выбранного разведения препарата и 100 мкл от 1 до 8 разведения ВАЖ. Клетки инкубировали 2 суток при температуре 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в термостате ТС-1/80 СПУ (Россия). Через 2 суток в каждой лунке с помощью инвертированного микроскопа регистрировали ЦПД в монослое клеток и определяли наличие вируса в среде культивирования по реакции гемагглютинации (РГА) с 1% эритроцитами петуха. Ниже приведены примеры конкретного применения заявляемых штаммов.

Пример 11. Получение препарата (образец 11-13), на основе экстракта клеток (КЭ) штамма *Serratia plymuthica*. Вр-868.

Биомассу клеток штамма (0,4 г), полученную после культивирования в «LB» и последующего центрифугирования и освобождения от надосадочной жидкости, ресуспендировали в 4 мл дистиллированной воды и обрабатывали 4 раза по 30" с интервалом 30", на ультразвуковом (УЗ)-дезинтеграторе. (с амплитудой 18), добиваясь максимально возможного разрушения клеток После УЗ-обработки разрушенные клетки осаждали центрифугированием 10 мин при 12000 об/мин на микроцентрифуге "Eppendorf", КЭ отбирали и стерилизовали ультрафильтрацией через Whatman-фильтр с размерами пор 0,1 мкм. Полученный препарат хранили до использования при температуре минус 20°C. Концентрация белка в образце составила 3,6 мг/мл, активность РНКазы 332,2 ед/мл или 3322 ед/г влажной биомассы.

Пример 12. Испытание противовирусного действия препарата №11-13, приготовленного на основе КЭ штамма *Serratia plymuthica* Вр-868 (в профилактической схеме) на вирусе гриппа человека (А/Н3N2).

Для испытания препарат №11-13 развели в 5 раз и внесли на клетки MDCK в объеме 50 мкл на лунку 96-луночного планшета. Инкубация 2 часа. Удалили препарат, затем

в лунки внесли среду RPMI-1640 без сыворотки и без трипсина. Добавили вирус A/Aichi/2/68 (H3N2) с -1 по -7 по 50 мкл на лунку. Инкубация 2 сут. Учет с 1% эритроцитами петуха.

Планшеты с обработанными клетками и вирусом помещали в термостат при температуре 37°C, 5% CO<sub>2</sub> и 100% влажности на 2-3 суток до образования монослоя.

Индекс нейтрализации составил 2,5 lg при исходной концентрации вируса 10<sup>2,5</sup> lg ТЦД<sub>50</sub>/мл (табл. 4).

Пример 13. Получение препарата (образца) 12-16, на основе экстракта клеток (КЭ) штамма *Serratia plymuthica* Dg-91.

Биомассу клеток штамма *Serratia plymuthica* Dg-91. (0,4 г), полученную после культивирования в «LB» и последующего центрифугирования и освобождения от надосадочной жидкости, ресуспендировали в 4 мл стерильной дистиллированной воды и обрабатывали 4 раза по 30" с интервалом 30", на ультразвуковом (УЗ)-дезинтеграторе. После УЗ-обработки разрушенные клетки осаждали центрифугированием 10 мин при 12000 об/мин на микроцентрифуге "Eppendorf", КЭ отбирали и стерилизовали ультрафильтрацией через Whatman-фильтр с размерами пор 0,2 мкм. Полученный препарат хранили до использования при температуре минус 20°C. Концентрация белка в образце составила 7,4 мг/мл, активность РНКазы 574,75 ед/мл, а ДНКазы - 463,1 ед/мл.

Пример 14. Испытание противовирусного действия КЭ штамма *Serratia plymuthica* Dg-91 на вирусе гриппа человека A/Aichi/2/68(A/H3N2). Анализ противовирусной активности штамма как в примере 12.

Клеточный экстракт (КЭ) штамма *Serratia plymuthica* Dg-91 (препарат №12-16) проверили в профилактической схеме на противовирусную активность. Индекс нейтрализации составил 6,5 lg при исходной концентрации вируса 10<sup>6,5</sup> lg ТЦД<sub>50</sub>/мл (табл. 4).

Пример 15. Получение препарата (образца) 12-01 на основе культуральной жидкости (КЖ) штамма *Serratia plymuthica* Dg-91.

Суспензию клеток готовили с использованием культуры штамма *Serratia plymuthica* Dg-91, наработанного на агаризованной среде «LB» в течение 18 часов при температуре 28-30°C. Суспензию вносили в количестве 2% в колбы с 50 мл среды LB и культивировали в течение 24 часов на термостатированной качалке (КТ 104, Россия). Для приготовления препарата на основе культуральной жидкости полученную КЖ штамма *Serratia plymuthica* Dg-91 центрифугировали при 10000 об/мин в течение 30 мин на центрифуге JA-21. Осветленную надосадочную жидкость стерилизовали ультрафильтрацией через Whatman-фильтр с размерами пор 0,2 мкм и использовали для испытания в качестве противовирусного препарата в профилактической схеме. РНКазная активность в КЖ составила 220,5 ед/мл. Хранили препарат до использования при температуре минус 20°C.

Пример 16. Испытание противовирусного действия КЖ штамма *Serratia plymuthica* Dg-91 на вирусе гриппа человека A/Aichi/2/68(A/H3N2). Анализ противовирусной активности штамма как в примере 12.

Культуральную жидкость штамма *Serratia plymuthica* Dg-91 (препарат №12-01) проверили в профилактической схеме на противовирусную активность. Индекс нейтрализации составил 6,5 lg при исходной концентрации вируса 10<sup>6,5</sup> lg ТЦД<sub>50</sub>/мл (табл. 4).

Пример 17. Испытание противовирусного действия КЖ штамма *Serratia plymuthica* Dg-91 на вирусе гриппа птиц A/chicken/Kurgan/05/2005 (A/H5N1). Для испытания препарат №12-01 развели в 5 раз и внесли на клетки MDCK в объеме 50 мкл на лунку 96-луночного планшета. Инкубация 2 часа. Удалили препарат, затем в лунки внесли среду RPMI-1640 без сыворотки и без трипсина. Добавили вирус A/Aichi/2/68 (H3N2) с -1 по -7 по 50 мкл на лунку. Инкубация 2 сут. Учет с 1% эритроцитами петуха.

Планшеты с обработанными клетками и вирусом помещали в термостат при температуре 37°C, 5% CO<sub>2</sub> и 100% влажности на 2-3 суток до образования монослоя.

Индекс нейтрализации составил 6,5 lg (табл. 4) при исходной концентрации вируса 10<sup>6,5</sup> lg ТЦД<sub>50</sub>/мл.

Пример 18. Получение препарата (образца) 12-25 на основе культуральной жидкости (КЖ) штамма *Serratia plymuthica*. Az-372.

Образец 12-25 получен как в примере 15.

Испытание противовирусного действия препарата 12-25 на вирусе гриппа человека (A/H3N2) (профилактическая схема) как в примере 8. Индекс нейтрализации составил 3,0 lg при исходной концентрации вируса гриппа человека (A/H3N2) 10<sup>6,5</sup> lg ТЦД<sub>50</sub>/мл. Концентрация белка составила 10,2 мг/мл, РНКазная активность - 108,9 ед/мл кж. (табл. 4).

Пример 19. Испытание КЖ *Serratia plymuthica*. Az-372. на вирусе гриппа птиц (A/H5N1). Препарат (образец) штамма под №11-41 получен как в примере 5 на среде «S». Концентрация белка составила 8,8 мг/мл, а РНКазная активность - 185,3 ед/мл. Индекс нейтрализации вируса гриппа (A/H5N1) составил 3,5 lg при исходной концентрации вируса 10<sup>3,5</sup> lg ТЦД<sub>50</sub>/мл (табл. 4)

Пример 20. Получение препарата (образца) 12-54 на основе культуральной жидкости (КЖ) штамма *Serratia plymuthica* Dg-91.

Образец получали, как в примере 15, за исключением того, что клетки культивировали на среде «S».

Для приготовления препарата полученную КЖ штамма *Serratia plymuthica* Dg-91 центрифугировали при 10000 об/мин в течение 30 мин на центрифуге JA-21. Осветленную надосадочную жидкость стерилизовали ультрафильтрацией через Whatman-фильтр с размерами пор 0,2 мкм и использовали для испытания в качестве противовирусного препарата.

Хранили препарат до использования при температуре минус 20°C. РНКазная активность в КЖ составила 129,8 ед/мл.

Испытание противовирусного действия образца 12-54 проводили на вирусе гриппа птиц A/chicken/Kurgan/05/2005 (A/H5N1), как в примере 17. Индекс нейтрализации составил 6,5 lg при исходной концентрации вируса 10<sup>6,5</sup> ТЦД<sub>50</sub>/мл (табл. 4).

Пример 21. Образец (12-20) получали как описано в примере 11. За исключением того, что использовали штамм *Serratia plymuthica* Dg-98. Осадок клеток штамма, полученный после центрифугирования и освобождения от надосадочной жидкости, как в примере 11, ресуспендировали в 4 мл дистиллированной воды и обрабатывали 4 раза по 30" с интервалом 30", на ультразвуковом (УЗ)-дезинтеграторе Процент разрушения 90%. После УЗ-обработки разрушенные клетки осаждали центрифугированием при 10000 об/мин на микроцентрифуге "Eppendorf", КЭ отбирали и стерилизовали ультрафильтрацией через Whatman-фильтр с размерами пор 0,2 мкм. Полученный препарат хранили до использования при температуре минус 20°C.

Полученный КЭ после размораживания разводили в 2 раза дистиллированной водой и использовали для испытания на противовирусное действие на вирусе гриппа человека A/Aichi/2/68(A/H3N2): Индекс нейтрализации составил 3,5 lg при исходной концентрации вируса  $10^{3,5}$  lg ТЦД<sub>50</sub>/мл (табл. 4).

Пример 22. Для испытания использовали чистые стерильные среды «LB» и «S» в качестве противовирусного агента. Испытание проводили для исключения влияния компонентов среды на вирусы гриппа. Обработку клеток проводили как в примере 12. Данные среды не оказывали противовирусного эффекта и не влияли на культуру клеток MDCK. Титр вирусов не изменился по сравнению с контролем и составил: A/chickenKurgan/05/2005 (H5N1)  $10^{3,5-6,5}$  lg ТЦД<sub>50</sub>/мл, а вируса гриппа человека A/Aichi/2/68(A/H3N2):  $10^{2,5-6,5}$  lg ТЦД<sub>50</sub>/мл в зависимости от эксперимента.

Таким образом, из приведенных таблиц 3 и 4 видно, что заявляемое средство на основе нуклеазы бактерий штаммов бактерий *Serratia plymuthica* обеспечивает достижение технического результата, а именно обеспечивает ингибирующую активность в отношении вирусов осповакцины (ВОВ), вируса оспы мышей (ВОМ) и вируса герпеса 2-го типа (ВПП-2), а также высокопатогенных вирусов гриппа птиц А/Н5N1 и человека А/Н3N2.

#### Формула изобретения

1. Противовирусное средство на основе нуклеазы бактерий рода *Serratia*, отличающееся тем, что в качестве источника нуклеазы бактерий рода *Serratia* оно содержит очищенную культуральную жидкость штамма бактерий *Serratia plymuthica*, имеющую РНКазную активность от 109,0 до 926 ед/мл и содержание белка от 3,6 до 13,5 мг/мл.

2. Противовирусное средство по п. 1, отличающееся тем, что очищенная культуральная жидкость штамма бактерий *Serratia plymuthica* получена центрифугированием при 10000-12000 об/мин и ультрафильтрацией через фильтр с размерами пор 0,1-0,3 мкм.

3. Противовирусное средство по п. 1, отличающееся тем, что в качестве штамма бактерий *Serratia plymuthica* оно содержит штамм бактерий *Serratia plymuthica* Dg-91, депонированный в коллекции бактерий, бактериофагов и грибов Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» под регистрационным номером В-1288.

4. Противовирусное средство по п. 1, отличающееся тем, что в качестве штамма бактерий *Serratia plymuthica* оно содержит штамм бактерий *Serratia plymuthica* Dg-98, депонированный в коллекции бактерий, бактериофагов и грибов Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» под регистрационным номером В-1297.

5. Противовирусное средство по п. 1, отличающееся тем, что в качестве штамма бактерий *Serratia plymuthica* оно содержит штамм бактерий *Serratia plymuthica* Вр-868, депонированный в коллекции бактерий, бактериофагов и грибов Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» под регистрационным номером В-1296.

6. Противовирусное средство по п. 1, отличающееся тем, что в качестве штамма бактерий *Serratia plymuthica* оно содержит штамм бактерий *Serratia plymuthica* Az-372, депонированный в коллекции бактерий, бактериофагов и грибов Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр вирусологии и

биотехнологии «Вектор» под регистрационным номером В-1285.

5

10

15

20

25

30

35

40

45