



(51) МПК
C12N 1/20 (2006.01)
A61K 35/74 (2015.01)
A61P 31/16 (2006.01)
C12R 1/425 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2013159202/10, 30.12.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 30.12.2013

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 30.12.2013

(45) Опубликовано: 20.05.2015 Бюл. № 14

(56) Список документов, цитированных в отчете о
 поиске: SU 1661214 A1, 07.07.1991 . RU
 2007185 C1, 15.02.1994 . RU 2038776 C1,
 09.07.1995 . RO 127469 A2, 29.06.2012

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),
 Афонина Вероника Сергеевна (RU),
 Андреева Ирина Сергеевна (RU),
 Селиванова Марина Александровна (RU),
 Мазуркова Наталья Алексеевна (RU),
 Макаревич Елена Викторовна (RU),
 Соловьянова Надежда Алексеевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

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

(54) ШТАММ БАКТЕРИЙ *Serratia plymuthica*, ОБЛАДАЮЩИЙ ПРОТИВОВИРУСНОЙ
 АКТИВНОСТЬЮ В ОТНОШЕНИИ ВИРУСОВ ГРИППА ТИПА А (ЕГО ВАРИАНТЫ)

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии.
 Предложены штамм бактерий *Serratia plymuthica*
 В-1288, штамм бактерий *Serratia plymuthica*
 В-1297, штамм бактерий *Serratia plymuthica*
 В-1296 и штамм бактерий *Serratia plymuthica*
 В-1285. Указанные штаммы депонированы в коллекции
 бактерий, бактериофагов и грибов Федерального
 бюджетного учреждения науки «Государственный

научный центр вирусологии и биотехнологии
 «Вектор». Штаммы обладают противовирусной
 активностью в отношении вируса гриппа типа А.
 При использовании препаратов на основе
 предложенных штаммов индекс нейтрализации
 вируса гриппа типа А составляет 2,5-6,5 lg при
 исходной концентрации вируса 10^{2.5-6.5} lg
 ТЦД₅₀/мл. 4 н.п. ф-лы, 5 табл., 13 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01)*A61K* 35/74 (2015.01)*A61P* 31/16 (2006.01)*C12R* 1/425 (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: 2013159202/10, 30.12.2013

(24) Effective date for property rights:
30.12.2013

Priority:

(22) Date of filing: 30.12.2013

(45) Date of publication: 20.05.2015 Bull. № 14

Mail address:

630559, Novosibirskaja obl., Novosibirskij r-n, r.p.
Kol'tsovo, FBUN GNTs VB "Vektor", zav.
patentnym otdelom Mistjurinu Ju.N.

(72) Inventor(s):

**Puchkova Larisa Ivanovna (RU),
Afonina Veronika Sergeevna (RU),
Andreeva Irina Sergeevna (RU),
Selivanova Marina Aleksandrovna (RU),
Mazurkova Natal'ja Alekseevna (RU),
Makarevich Elena Viktorovna (RU),
Solov'janova Nadezhda Alekseevna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federal'noe bjudzhetnoe uchrezhdenie nauki
"Gosudarstvennyj nauchnyj tsentr virusologii i
biotekhnologii "Vektor" (FBUN GNTs VB
"Vektor") (RU)**

(54) **STRAIN OF BACTERIA *Serratia plymuthica* HAVING ANTIVIRAL ACTIVITY AGAINST INFLUENZA VIRUS OF TYPE A (VERSIONS)**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: strain of bacteria *Serratia plymuthica* B-1288, a strain of bacteria *Serratia plymuthica* B-1297, a strain of bacteria *Serratia plymuthica* B-1296 and a strain of bacteria *Serratia plymuthica* B-1285 are proposed. These strains are deposited in the collection of bacteria, bacteriophages and fungi of the Federal State Institution of Science "State Research Centre of

Virology and Biotechnology "Vector". When using the preparations on the basis of the proposed strains the neutralisation index of influenza virus o type A is 2.5-6.5 lg with the initial concentration of the virus of $10^{2.5-6.5}$ lg TCD₅₀/ml.

EFFECT: strains have antiviral activity against influenza virus of type A.

4 cl, 5 tbl, 13 ex

Изобретение относится к новым штаммам бактерий рода *Serratia*, выделенных из различных источников и отобранных по признаку наибольшей нуклеазной активности для производства препаратов, обладающих противовирусной активностью, и может быть использовано в медицине, микробиологии и биотехнологии.

5 Известны данные об антивирусной активности панкреатической рибонуклеазы в отношении ряда РНК- и ДНК-содержащих вирусов, а также об их применении в клинике для лечения вирусных заболеваний. Рядом исследователей изучаются антивирусные свойства нуклеаз, выделенных из микроорганизмов, которые обладают более
10 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 веществ, имеющих природное происхождение. Так, авторы И.Д. Макаренкова и др. (2010) сообщают о способности сульфатированного полисахарида - фукоидана из
15 морской бурой водоросли *Laminaria japonica* подавлять продукцию высокопатогенного вируса гриппа птиц А/Н5N1 в течение 24 ч инфекции при профилактической и лечебно-профилактической схемах применения [Противовирусная активность сульфатированного полисахарида из бурой водоросли LAMINARIA JAPONICA в отношении инфекции культур клеток, вызванной вирусом гриппа А птиц (Н5N1) Макаренкова И.Д., Дерябин
20 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 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
25 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 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
30 вирусологии, 2006, №5, с.41-43]. Дезоксирибонуклеазы тормозят синтез и размножение ДНК-содержащих вирусов, осповакцины, аденовируса, герпеса.

Одним из наиболее изученных энзимов этого класса является секретируемая эндонуклеаза *Serratia marcescens*. Грамотрицательные бактерии рода *Serratia*, в
35 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: Афтореф. 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
40 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
45 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 “Эндоглокин” для профилактики и лечения вирусных заболеваний пчел и стимуляции развития пчелиных семей»].

Наиболее близким аналогом (прототипом) является штамм *Serratia marcescens*, опубликованный в патенте на средство на основе культуральной жидкости, полученной с использованием указанного штамма [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 высокопатогенного вируса гриппа птиц А/Н5N1 и человека А/Н3N2.

Техническим результатом заявляемого решения является выявление бактериальных штаммов, обладающих противовирусными свойствами, в отношении вируса гриппа птиц А/Н5N1 и гриппа человека (Н3N2).

Указанный технический результат достигается тем, что получен штамм бактерий *Serratia plumuthica* Dg-91, обладающий противовирусной активностью в отношении вирусов гриппа типа А и депонированный в коллекции бактерий, бактериофагов и грибов Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»» под регистрационным номером В-1288.

Указанный технический результат достигается также получением штамма бактерий *Serratia plumuthica* Dg-98, обладающий противовирусной активностью в отношении вирусов гриппа типа А и депонированный в коллекции бактерий, бактериофагов и грибов Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»» под регистрационным номером В-1297.

Указанный технический результат достигается также получением штамма бактерий *Serratia plumuthica* Bp-868, обладающий противовирусной активностью в отношении вирусов гриппа типа А и депонированный в коллекции бактерий, бактериофагов и грибов Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»» под регистрационным номером В-1296.

Указанный технический результат достигается также получением штамма бактерий *Serratia plumuthica* Az-372, обладающий противовирусной активностью в отношении вирусов гриппа типа А и депонированный в коллекции бактерий, бактериофагов и грибов Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»» под регистрационным номером В-1285.

Заявляемые штаммы изолированы при высеве 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 изолятов (штаммов) по месту выделения

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

Определение таксономической принадлежности бактериальных изолятов.

Для определения таксономической принадлежности бактерий Bp-868, Dg-91, Dg-98 и Az-372, выделенных из природных источников, стандартными методами исследовали их фенотипические признаки и определяли нуклеотидные последовательности продуктов ПНР, соответствующие гену 16S рРНК штаммов. Определение исследуемых бактерий

до вида проводили по Бердже [“Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology”. 8 th ed. / Ed. John G. Holt. - Baltimore-London, Williams and Wilkins, 1986. - V.1-2. - 1105 p.].

Для получения геномных характеристик выделяли суммарные ДНК из чистых культур и проводили ПНР с универсальными праймерами, соответствующими гену 16S рРНК эубактерий: 5’-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3’ и 5’-CGGCTACCTTGTACGACTT-3’.

Нуклеотидные последовательности продуктов ПЦР определяли с использованием BigDye 3,1 Terminator Cycle Sequencing Kit и автоматического анализатора ДНК модели ABI 3130xl (Applied Biosystems, США), в Межинститутском Центре секвенирования ДНК СО РАН (г. Новосибирск). Филогенетический анализ выполняли с использованием программы MEGA версии 4 для нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК, определенных в данной работе, и близкородственных видов из базы данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

При культивировании применяли питательную среду “S” (Пептон, NaCl, MgCl₂×6H₂O, Трис-аминометан, pH 8.0) или “LB” (“Difco”, США) состава: дрожжевой экстракт, пептон, NaCl, pH 7,2.

Хранение штаммов: Штаммы хранили в лиофильно-высушенном состоянии, в 30%-ном растворе глицерина при температуре минус 65°С и при периодических пересевах на агаризованную среду LB.

Морфологические и биохимические признаки штаммов

Грамотрицательные, неспороносные, подвижные или неподвижные клетки штаммов Вр-868, Dg-91, Dg-98 и Az-372 представлены палочками, в основном укороченными, размером 0,5-0,8×1,0-2,5 мкм (табл.2).

Таблица 2

Морфология клеток и колоний исследуемых штаммов, Вр-868, Dg-91, Dg-98 и Az-372.

Штамм	Среда выделения	Морфология	
		Клеток	Колоний
Вр-868	РПА	Грамотрицательные разрозненные палочки, много укороченных до коккобацилл, 0,6-0,8×1,0-2,5 мкм. Подвижные, капсулированные	Белесые, круглые, край ровный, непрозрачные, блестящие, компактные.
Dg-91	РПА	Грамотрицательные капсулированные, укороченные, разрозненные. 0,5-0,8×1,0-1,8 мкм.	Белесые, непрозрачные, компактные, круглые, край ровный.
Dg-98	РПА	Грамотрицательные капсулированные, укороченные, разрозненные. 0,8×1,0-2,0 мкм.	Белесые, непрозрачные, компактные, круглые, край ровный.
Az-372	РПА	Грамотрицательные капсулированные, укороченные, разрозненные. 0,8×1,0-2,0 мкм.	Белесые, непрозрачные, компактные, круглые, край ровный.

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

Показано, что штаммы Вр-868, Dg-91, Dg-98 Az-372 в соответствии с признаками представителей рода *Serratia*, отрицательны в тестах по уреазе, на индол, сероводород, амилазу; образуют ДНКазу, гидролизуют желатин, утилизируют цитрат, восстанавливают нитрат, с образованием кислоты гидролизуют сахарозу, лактозу, манит, мальтозу, глюкозу. Все культуры, за исключением штамма Az-372, были отрицательны в тесте с метиловым красным. В реакции Фогес-Проскауэра штаммы имеют отличия допустимые в рамках признаков бактерий рода *Serratia* (табл.3).

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

Таблица 3

Биохимические признаки штаммов

Штамм	Идентификация по н.п. р16S РНК (род/вид)	Признак																	
		Уре-аза	Вост. нитратов	Ин-дол	Коа-гула-за	Ами-лаза	По-дви-жность	FP	MR	Гидролиз углеводов									
										сахароза		мальто-за		лактоза		манит		глюкоза	
										К	Г	К	Г	К	Г	К	Г	К	Г
5	Bp-868	Serratia plumuthica	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	±	±	+	+
	Dg-91	Serratia plumuthica	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	±	±
	Dg-98	Serratia plumuthica	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	±	±
	Az-372	Serratia plumuthica	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	±	±
10	Обозначения: + положительная реакция; - отрицательная реакция; ± слабо выраженное проявление признака.																		

Посевной материал получали при выращивании штаммов на среде LB, на агаризованной среде LB (0,25% LB, 1,7% агара) и среде А (0,7% пептона, 0,4% рыбного гидролизата, 0,5% NaCl, 1,7% агара). Значение рН всех сред составляло 7,0-7,2.

Для получения образцов культуральной жидкости (КЖ) штаммы культивировали в среде "S" или "LB" в течение 18 ч при температуре 37°C с последующим центрифугированием в течение 20 мин при 8000 об/мин на центрифуге JA-21 (Beckman, США). Полученные образцы КЖ и биомассы хранили до использования в замороженном состоянии при температуре минус 20°C.

Для получения клеточных экстрактов (КЭ) бактериальные клетки разрушали ультразвуком в стерильной дистиллированной воде на дезинтеграторе MSE (Великобритания). Степень разрушения контролировали на спектрофотометре при длине волны 560 нм.

Ниже приведены данные по исследованию нуклеазной активности штаммов.

Количественное определение РНКазной и ДНКазной активности проводили по превращению субстратных нуклеиновых кислот: суммарной дрожжевой РНК (НИКТИ БАН ГНЦ ВБ «Вектор») и ДНК из молок лосося (Медиген, Новосибирск) во фрагменты, которые растворимы в 4%-ной HClO₄, с появлением кислоторастворимого материала с адсорбцией при 260 нм.

В процессе работы нами показано, что все эти штаммы бактерий обладают не только РНКазной, но и ДНКазной активностью и гидролизуют не только ДНК из молок лосося, но и ДНК фага λ и ДНК фага T7.

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 ТЦД₅₀/мл. Вирус гриппа человека A/Aichi/2/68(A/H3N2) (из коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»), титр 10^{2,5-6,5} lg ТЦД₅₀/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 Ахсевир-MDCK, вносили по 150 мкл в соответствующие лунки планшета с клетками MDCK и ставили в термостат при температуре 37°C, 5% CO₂ 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).

5 Определение противовирусной активности препаратов. Для определения противовирусной активности препаратов готовили десятикратные разведения ВАЖ от 1 до 8 с использованием среды Axsevir-MDCK, содержащей 2 мкг/мл трипсина. В
10 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% CO₂ в термостате ТС-1/80 СПУ (Россия). Через 2 суток в каждой лунке с помощью инвертированного микроскопа регистрировали ЦПД в монослое
10 клеток и определяли наличие вируса в среде культивирования по реакции гемагглютинации (РГА) с 1% эритроцитами петуха. Ниже приведены примеры конкретного применения заявляемых штаммов.

15 Определение наличия нуклеолитической и противовирусной активности штаммов *Serratia plumuthica* Bp-868, *Serratia plumuthica* Dg-91, *Serratia plumuthica* Dg-98, *Serratia plumuthica* Az-372 относительно вирусов гриппа человека A/Aichi/2/68, а штаммов *Serratia plumuthica* Dg-91, *Serratia plumuthica* Az-372 (H3N2) относительно птичьего гриппа A/chicken/Kurgan/05/2005 (A/H5N1), проводится впервые, в связи с чем можно сделать вывод о соответствии предлагаемых штаммов критериям изобретения «новизны» и «изобретательский уровень».

20

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

30

Изобретение подтверждено следующими примерами практического применения.

35 Получение образцов (препаратов).

Пример 1. Получение препарата (образец 11-13), на основе экстракта клеток (КЭ) штамма *Serratia plumuthica*. Bp-868.

40 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
45 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 3,6 мг/мл, активность РНКазы 332,2 ед/мл или 3322 ед/г влажной биомассы.

Пример 2. Испытание противовирусного действия препарата №11-13,

приготовленного на основе КЭ штамма *Serratia plumuthica* 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 А/Aichi/2/68 (Н3N2) 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% CO₂ и 100% влажности на 2-3 суток до образования монослоя.

Индекс нейтрализации составил 2,5 lg при исходной концентрации вируса 10^{2,5} lg ТЦД₅₀/мл (табл.4).

Пример 3. Получение препарата (образца) 12-16, на основе экстракта клеток (КЭ) штамма *Serratia plumuthica* Dg-91.

Биомассу клеток штамма *Serratia plumuthica* 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 4. Испытание противовирусного действия КЭ штамма *Serratia plumuthica* Dg-91 на вирусе гриппа человека А/Aichi/2/68(А/Н3N2). Анализ противовирусной активности штамма как в примере 2.

Клеточный экстракт (КЭ) штамма *Serratia plumuthica* Dg-91 (препарат №12-16) проверили в профилактической схеме на противовирусную активность. Индекс нейтрализации составил 6,5 lg при исходной концентрации вируса 10^{6,5} lg ТЦД₅₀/мл (табл.4).

Пример 5. Получение препарата (образца) 12-01 на основе культуральной жидкости (КЖ) штамма *Serratia plumuthica* Dg-91.

Суспензию клеток готовили с использованием культуры штамма *Serratia plumuthica* 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 plumuthica* 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 6. Испытание противовирусного действия КЖ штамма *Serratia plumuthica* Dg-91 на вирусе гриппа человека А/Aichi/2/68(А/Н3N2). Анализ противовирусной активности штамма как в примере 2.

Культуральную жидкость штамма *Serratia plumuthica* Dg-91 (препарат №12-01)

проверили в профилактической схеме на противовирусную активность. Индекс нейтрализации составил 6,5 lg при исходной концентрации вируса $10^{6,5}$ lg ТЦД₅₀/мл (табл.4).

5 Пример 7. Испытание противовирусного действия КЖ штамма *Serratia plumuthica* 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
10 на лунку. Инкубация 2 сут. Учет с 1% эритроцитами петуха.

Планшеты с обработанными клетками и вирусом помещали в термостат при температуре 37°C, 5% CO₂ и 100% влажности на 2-3 суток до образования монослоя.

Индекс нейтрализации составил 6,5 lg (табл.4) при исходной концентрации вируса $10^{6,5}$ lg ТЦД₅₀/мл.

15 Пример 8. Получение препарата (образца) 12-25 на основе культуральной жидкости (КЖ) штамма *Serratia plumuthica*. Az-372.

Образец 12-25 получен как в примере 5.

Испытание противовирусного действия препарата 12-25 на вирусе гриппа человека (A/H3N2) (профилактическая схема) как в примере 8. Индекс нейтрализации составил
20 3,0 lg при исходной концентрации вируса гриппа человека (A/H3N2) $10^{6,5}$ lg ТЦД₅₀/мл. Концентрация белка составила 10,2 мг/мл., РНКазная активность - 108,9 ед/мл кж. (табл.4).

Пример 9. Испытание КЖ *Serratia plumuthica*. Az-372 на вирусе гриппа птиц (A/H5N1).
25 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 $10^{3,5}$ lg ТЦД₅₀/мл (табл.4)

30 Пример 10. Получение препарата (образца) 12-54 на основе культуральной жидкости (КЖ) штамма *Serratia plumuthica* Dg-91.

Образец получали, как в примере 5, за исключением того, что клетки культивировали на среде «S».

Для приготовления препарата полученную КЖ штамма *Serratia plumuthica* Dg-91
35 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.

40 Испытание противовирусного действия образца 12-54 проводили на вирусе гриппа птиц A/chicken/Kurgan/05/2005 (A/H5N1) как в примере 7. Индекс нейтрализации составил 6,5 lg при исходной концентрации вируса $10^{6,5}$ lg ТЦД₅₀/мл (табл.4).

Пример 11. Образец (12-20) получали как описано в примере 1. За исключением того, что использовали штамм *Serratia plumuthica* Dg-98. Осадок клеток штамма, полученный
45 после центрифугирования и освобождения от надосадочной жидкости, как в примере 1, 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 ТЦД₅₀/мл (табл.4).

Пример 12. 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 2. 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 ТЦД₅₀/мл, а вируса гриппа человека A/Aichi/2/68(A/H3N2): $10^{2,5-6,5}$ lg ТЦД₅₀/мл в зависимости от эксперимента.

Пример 13. КЖ штамма *Serratia plymuthica* Dg-91 (образец 12-01) и КЭ (образец 12-16), а также КЭ штамма *Serratia plymuthica* Dg-91 хранились в течение 4-5 месяцев (время наблюдения) при температуре -20°C. Определение противовирусной активности проводили, как в примерах 7-8. Титр вируса (A/H3N2) в lg ТЦД₅₀/мл через 48 ч обработки препаратом (профилактическая схема) равен 0 при концентрации вируса в контроле $10^{3,5}$ lg ТЦД₅₀/мл (Табл.5).

Образец	Штамм	Условия хранения	Титр вируса в lg ТЦД ₅₀ /мл через 48 ч (профилактическая схема)
			A/Aichi/2/68 (H3N2)
12-01	Dg 91	5 мес при -20°C	0
12-16	Dg 91	4 мес при -20°C	0
12-20	Dg 98	4 мес при -20°C	0
Контроль вируса			3,5±0,08

Таким образом, из приведенных таблиц 4 и 5 видно, что заявляемые штаммы обеспечивают достижение технического результата, а именно обладают противовирусными свойствами, в отношении вируса гриппа птиц A/H5N1 и гриппа человека (H3N2).

Формула изобретения

1. Штамм бактерий *Serratia plymuthica*, обладающий противовирусной активностью в отношении вирусов гриппа типа А и депонированный в коллекции бактерий, бактериофагов и грибов Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»» под регистрационным номером В-1288.

2. Штамм бактерий *Serratia plymuthica*, обладающий противовирусной активностью в отношении вирусов гриппа типа А и депонированный в коллекции бактерий, бактериофагов и грибов Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»» под регистрационным номером В-1297.

3. Штамм бактерий *Serratia plymuthica*, обладающий противовирусной активностью в отношении вирусов гриппа типа А и депонированный в коллекции бактерий,

бактериофагов и грибов Федерального бюджетного учреждения науки
«Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»» под
регистрационным номером В-1296.

- 5 4. Штамм бактерий *Serratia plymuthica*, обладающий противовирусной активностью
в отношении вирусов гриппа типа А и депонированный в коллекции бактерий,
бактериофагов и грибов Федерального бюджетного учреждения науки
«Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»» под
регистрационным номером В-1285.

10

15

20

25

30

35

40

45