



(51) МПК
A61K 39/02 (2006.01)
G01N 33/48 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
 ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: **2007143804/13**, **26.11.2007**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
26.11.2007

(45) Опубликовано: **10.05.2009** Бюл. № 13

(56) Список документов, цитированных в отчете о
 поиске: **RU 2293993 C1**, **20.02.2007**. **RU 2249464 C1**,
10.04.2005. **СА 2614507 A**, **17.08.2006**.

Адрес для переписки:
**400131, г.Волгоград, ул. Голубинская, 7,
 ФГУЗ ВолгоградНИПЧИ Роспотребнадзора**

(72) Автор(ы):

**Прошина Ольга Борисовна (RU),
 Жукова Светлана Ивановна (RU),
 Храпова Наталья Петровна (RU),
 Авророва Ирина Владимировна (RU),
 Пивень Николай Николаевич (RU),
 Ломова Лидия Васильевна (RU)**

(73) Патентообладатель(и):

**Федеральное государственное учреждение
 здравоохранения Волгоградский
 научно-исследовательский противочумный
 институт Роспотребнадзора (RU)**

(54) СПОСОБ ОЦЕНКИ УРОВНЯ ПРОТЕКТИВНОСТИ МЕЛИОИДОЗНЫХ АНТИГЕНОВ

(57) Реферат:

Для определения уровня протективности мелиоидозных антигенов их используют в качестве антигенов - индукторов цитокинов на культуре перитонеальных макрофагов (ПМ) мышей BALB/c. В лунки 96-луночной планшеты вносят по 200 мкл ПМ (10^5 клеток) и добавляют антигены до конечной концентрации 10 мкг/мл, в контрольные лунки добавляют физ. раствор. После 24 ч инкубации при 37°C и 5% CO₂ супернатанты собирают, стерилизуют через фильтры Millipore 0,22 мкм. Цитотоксическую активность ФНО-α в полученных монокинах определяют на культуре перевиваемой клеточной линии L-929, которые распределяют по 100 мкл ($2 \cdot 10^5$ клеток) в лунки 96-луночной планшеты и

после 24 ч инкубации добавляют к ним в трех повторностях по 100 мкл полученных монокинов. Для усиления действия ФНО-α в лунки добавляют по 10 мкл актиномицина Д до конечной концентрации 1 мкг/мл. Через 24 ч инкубации определяют цитотоксическое действие ФНО-α. Активность ФНО-α выражают числом единиц активности, обратным разведению монокинов, обеспечивающему 50% гибель клеток L-929 в лунке (ЦГЕ50). По степени активности ФНО-α в опыте и контроле оценивают уровень протективности мелиоидозных антигенов. Способ по изобретению отличается быстротой, простотой, экономичностью, не связан с использованием в качестве инструмента исследования живых возбудителей особо опасных инфекций. 2 табл.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.
A61K 39/02 (2006.01)
G01N 33/48 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: **2007143804/13, 26.11.2007**

(24) Effective date for property rights:
26.11.2007

(45) Date of publication: **10.05.2009 Bull. 13**

Mail address:

**400131, g. Volgograd, ul. Golubinskaja, 7, FGUZ
VolgogradNIPChI Rospotrebnadzora**

(72) Inventor(s):

**Proshina Ol'ga Borisovna (RU),
Zhukova Svetlana Ivanovna (RU),
Khrapova Natal'ja Petrovna (RU),
Avrorova Irina Vladimirovna (RU),
Piven' Nikolaj Nikolaevich (RU),
Lomova Lidija Vasil'evna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federal'noe gosudarstvennoe uchrezhdenie
zdravookhraneniya Volgogradskij nauchno-
issledovatel'skij protivochumnyj institut
Rospotrebnadzora (RU)**

(54) METHOD OF MELIOIDOZE ANTIGEN ESTIMATE FOR PROTECTIVITY LEVEL

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: to estimate protectivity level of melioidoze antigens, they are used as antigens being cytokine inducers on peritoneal macrophages (PM) culture of mice BALB/c. In holes of a 96-holed pad, PMs 200 mcl (10^5 cells) are introduced, then antigens are added to final concentration 10 mkg/ml, while saline is added in control holes. After incubation within 24 h at 37°C and 5% CO₂, supernatants are collected, sterilised through filters Millipore 0.22 mcm. Cytotoxic FNO-α activity in prepared monokines is evaluated on transplantable cell line L-929 culture distributed on 100 mcl ($2 \cdot 10^5$ cells) in holes of a 96-holed pad.

After incubation within 24 h prepared monokines 100 mcl are added in three repeatabilities. To intensify FNO-α action, actinomycin D 10 mcl is added in the holes to final concentration 1 mkg/ml. After incubation within 24 h, cytotoxic FNO-α action is evaluated. FNO-α activity is expressed with a number of activity units reciprocal to monokine cultivation ensuring 50% destruction of L-929 cells in a hole ("ЦГЕ"50). FNO-α activity degree FNO-α in experimnt and control shows protectivity level of melioidoze antigens.

EFFECT: method is characterised with responsiveness, simplicity, profitability, it is not associated with using living agents of special danger infections as an examination tool.

2 tbl, 2 ex

Изобретение относится к области медицины, в частности, к микробиологии и иммунологии и касается разработки способа отбора протективных антигенов, перспективных в отношении конструирования химической вакцины для специфической профилактики мелиоидозной инфекции.

5 Как известно, вакцина против мелиоидоза не разработана до настоящего времени, что связано, прежде всего, с недостаточной изученностью механизмов формирования иммунитета, в том числе и цитокиновой иммунорегуляции при этой инфекции. В ряде зарубежных работ показано, что определение в крови уровней таких цитокинов, как
10 ФНО- α , ИЛ-6, ИЛ-10, ИФН- γ имеет прогностическое значение для исхода заболевания (1, 2). Изучены количественные показатели различных цитокинов при остром и хроническом экспериментальном мелиоидозе у мышей, а также взаимосвязь высоты бактериемии с пиком продукции цитокинов клетками селезенки (3). В целом,
15 публикации о роли отдельных цитокинов при инфекции, вызванной *Burkholderia pseudomallei*, достаточно противоречивы. Ранее нами было обнаружено, что защитные свойства антигенов буркхольдерий зависят от их способности индуцировать выработку цитокинов, стимулирующих клеточное звено иммунитета. В частности, была установлена взаимосвязь между уровнем активности фактора некроза опухоли -
20 альфа (ФНО- α) монокинов, индуцированных мелиоидозными антигенами, и защитными свойствами антигена - индуктора. Выявленная нами закономерность может быть использована в практических целях - для скрининга различных антигенных комплексов *B.pseudomallei* на протективность с целью выявления антигенов с защитными свойствами для их дальнейшего углубленного изучения на
25 предмет включения в химическую мелиоидозную вакцину.

Известен способ определения протективной активности антигенов в тесте активной защиты на лабораторных животных, включающий в себя предварительную иммунизацию, определенную экспозицию для формирования иммунитета и
30 последующее заражение животных вирулентным штаммом (4). Данный классический подход к оценке протективности антигенов имеет очевидные негативные стороны: трудоемкость, дороговизна исследований, большой расход антигенного материала, значительные временные затраты. Особенно неудобен описанный метод на этапе предварительного изучения и отбора антигенов с протективными свойствами среди
35 большого числа различных антигенных фракций и комплексов, которые могут быть в поле зрения исследователя при использовании различных методов получения антигенов.

Известен способ определения иммуногенности вакцин при экспериментальной чуме (5), при котором иммуногенность различных вакцинных препаратов оценивалась по уровню фагоцитарной активности иммунных перитонеальных макрофагов мышей в отношении вакцинного штамма чумного микроба. Однако при этом также необходимо проводить иммунизацию животных, как и в предыдущем способе.

Наиболее близким аналогом является «Способ определения уровня
45 иммуногенности капсульных антигенов *Burkholderia mallei*» (6), базирующийся на использовании фагоцитарной тест-системы на основе неиммунных макрофагов морской свинки и живых клеток бескапсульного штамма *B.mallei* в качестве объекта фагоцитоза.

50 Учитывая выраженную антигенную близость *Burkholderia mallei* и *Burkholderia pseudomallei*, данный способ можно использовать и для оценки иммуногенности мелиоидозных антигенов. Кроме того, применение этого способа не связано с предварительной иммунизацией животных. Слабой стороной описанного аналога

является необходимость работы в строгих режимных условиях, предусмотренных соответствующими санитарно-эпидемиологическими правилами (7), что возможно только для лиц, прошедших курсы специализации по особо опасным инфекциям.

5 Целью изобретения является разработка способа оценки протективности мелиоидозных антигенов, не требующего существенных материальных и временных затрат, не связанного с работой в режимных условиях, основанного на существовании взаимосвязи между защитными свойствами мелиоидозных антигенов и их цитокининдуцирующей активностью в отношении макрофагов.

10 Поставленная цель достигается тем, что в качестве продуцентов цитокинов используются перитонеальные макрофаги интактных мышей, а индукторами цитокинов служат антигенные комплексы возбудителя мелиоидоза. Активность полученных монокинов тестируется только в отношении ФНО- α , уровень цитотоксичности которого определяется на мышинных фибробластах L-929 и

15 коррелирует с протективностью испытуемых мелиоидозных антигенов.

Методика проведения опыта по оценке уровня протективности мелиоидозных антигенов

20 Для получения перитонеальных макрофагов (ПМ) мышам BALB/c после их хлороформирования в стерильных условиях отсепааровывают кожу передней брюшной стенки, после чего шприцом вводят в брюшную полость 5 мл полной среды RPMI-1640.

После 3 мин легкого наружного массажа внутренностей перитонеальный экссудат отсасывают шприцем во флакон (на холоду). Подсчитывают клетки в камере Горяева, доводят концентрацию до $5 \cdot 10^5$ кл/мл, вносят в лунки 96-луночной планшеты по 200

25 мкл (10^5 клеток на лунку). Мелиоидозные антигены (индукторы цитокинов), предварительно стерилизованные фильтрацией через фильтры Millipore 0,22 мкм, добавляют по 100 мкл на лунку с ПМ до конечной концентрации 10 мкг/мл. В контроле в лунки с ПМ добавляют по 100 мкл 0,15 М раствора хлорида натрия

30 (физ.раствор). Планшеты инкубируют при 37°C в присутствии 5% CO₂ 24 ч. После инкубации супернатанты (цитокины) собирают, центрифугируют при 1000 об/мин 7 мин, стерилизуют через фильтры и исследуют цитотоксическую активность ФНО- α , присутствующего в супернатантах, на клеточный линии мышинных фибробластов L-929 или замораживают при - 20°C для хранения с последующим исследованием

35 биологической активности.

Для определения биологической активности ФНО- α используют фибробласты L-929. Клетки L-929 культивируют в пластиковых чашках («Медполимер», Санкт-Петербург) в полной питательной среде RPMI-1640 с 10% сыворотки крупного

40 рогатого скота или эмбриональной телячьей сыворотки, 2 mM L-глутамин, 1 mM пирувата натрия и 10 мкг/мл гентамицина сульфата. Пересев клеток производят 1 раз в неделю путем открепления от подложки с помощью раствора трипсин-версена (1:3). Для постановки пробы на цитотоксичность клетки L-929 открепляют от пластика

45 раствором трипсин-версена, отмывают 1 раз полной питательной средой 7 мин при 800 об/мин, доводят до концентрации $2 \cdot 10^6$ кл/мл и распределяют по 100 мкл ($2 \cdot 10^5$ клеток) в лунки 96-луночной планшеты для культивирования. После 24 ч инкубации при 37°C и 5% CO₂ к прилипшим к пластику клеткам-мишеням добавляют в трех

50 повторностях по 100 мкл монокинов, предварительно раститрованных в отдельной планшете в полной питательной среде, в контрольные лунки с клетками L-929 вносят питательную среду. На этом этапе для усиления действия ФНО- α в культуры добавляют актиномицин D в объеме 10 мкл до конечной концентрации 1 мкг/мл.

Цитотоксическое действие ФНО- α оценивают через 24 ч инкубации при просмотре планшетов под инвертированным микроскопом. Мертвые клетки выглядят более темными, имеют неровные контуры, зернистость, дефекты в клеточной стенке.

Активность ФНО- α выражают числом единиц активности, обратным разведению монокинов, обеспечивающему 50% гибель клеток L-929 в лунке (ЦТЕ50). Степень активности ФНО- α в опыте (монокины, индуцированные мелиоидозными антигенами) сравнивают с таковой в контроле (монокины, индуцированные физ.раствором). Уровень протективности испытуемых мелиоидозных антигенов находится в прямой пропорциональной зависимости от степени выраженности цитотоксической активности ФНО- α в опыте по сравнению с контролем.

Пример 1

В ходе работы по скринингу антигенных фракций на иммуногенность и протективность были испытаны следующие препараты, полученные из возбудителя мелиоидоза разных штаммов различными методами. ЛПС-100 (липополисахарид), КПС-56738 (капсульный полисахарид) были получены по методу Адамса из *V.pseudomallei* 100 и *V.pseudomallei* 56738. ВМФ-ВРА (высокомолекулярная фракция) извлекалась из бульонной культуры *V.pseudomallei* ВРА разделением на мембранных фильтрах ХМ-300 («Amicon»). ЭЦА-57576 (экстрацеллюлярные антигены) представляли собой комплекс растворимых антигенов бульонной культуры *V.pseudomallei* 57576. ВСЭ С-141, ВСЭ-100, ВСЭ *V.thailandensis* 251 (водно-солевые экстракты) - комплекс водорастворимых антигенов агаровых культур возбудителя мелиоидоза штаммов С-141 и 100 и близкородственного непатогенного вида буркхольдерий - *V.thailandensis* 251. ДХР - С-141 (растворимый дезоксихолатный комплекс) - антигенный комплекс, экстрагированный 2% раствором дезоксихолата натрия из микробных клеток мелиоидозного штамма С-141. Фф - С-141 (фенольная фракция) - комплекс фенолрастворимых антигенов, экстрагированных из клеток штамма С-141 50% фенолом.

ВСЭ-100, ВСЭ-С-141 и ВСЭ *V.thailandensis* 251 вводили мышам подкожно по 30 мкг по белку в смеси с гидратом окиси алюминия (до конечной концентрации 1,2 мг/мл), дважды, с интервалом 10 сут. На 21 сут после первичной иммунизации животных заражали 5 ЛД₅₀ суточной агаровой культуры вирулентного штамма *V.pseudomallei* 115. Спустя 45 сут после заражения определяли показатели летальности: процент павших животных и среднюю продолжительность жизни (СПЖ).

Антигенные комплексы ЭЦА, КПС, ДХР, ВМФ, ЛПС и Фф вводили животным подкожно дважды, с интервалом 7 сут, в дозе 100 мкг по белку в смеси (1:1) с полным адьювантом Фрейнда. На 21 сут животных заражали 5 ЛД₅₀ вирулентного мелиоидозного штамма С-141.

Цитокининдуцирующую активность всех антигенных комплексов изучали на макрофагах мышей BALB/c. Цитотоксические свойства полученных монокинов тестировали на клеточной линии L-929.

Взаимосвязь между уровнем протективности ВСЭ буркхольдерий и их цитокининдуцирующей активностью представлена в таблице 1.

Как видно из данных табл.1, ВСЭ-100 обеспечивал наибольшую защиту животных (50%) от заражения вирулентным штаммом *V.pseudomallei* 115, несколько меньшая протективность отмечена у препарата ВСЭ - С-141 (40% выживших), а ВСЭ *V.thailandensis* оказался слабоиммуногенным, он защищал только 22% зараженных мышей.

В такой же последовательности располагаются данные по цитотоксической

активности ФНО- α монокинов, индуцированных ВСЭ-100, ВСЭ-С-141 и ВСЭ *V.thailandensis*, т.е. наблюдается прямая зависимость между степенью активности ФНО- α в монокинах и уровнем протективности антигена - индуктора.

Пример 2

Выявленная закономерность прослеживается и при использовании для иммунизации мелиоидозными антигенами другой антигенной нагрузки, другого адъюванта и другого заражающего штамма (таблица 2). В данном опыте наибольшей протективностью обладал препарат ДХР - С-141, который также проявил наибольшую активность в индукции ФНО- α мышинными макрофагами, в то время как наиболее низкая протективность препарата Фф - С-141 сочеталась с низким уровнем цитотоксической активности ФНО- α монокинов, индуцированных Фф - С-141.

Таким образом, отмечена четкая прямая зависимость между уровнем протективности мелиоидозных антигенов и степенью цитотоксической активностью ФНО- α в монокинах, индуцированных этими антигенами.

Приведенные примеры показывают, что предлагаемый способ оценки уровня протективности мелиоидозных антигенов достаточно прост, экономичен (для индукции цитокинов необходимы микрограммовые количества антигенов, а предварительной иммунизации животным не требуется), может использоваться широким кругом исследователей, т.к. не требует для выполнения режимных условий.

Предлагаемый способ может использоваться в учреждениях, занимающихся разработкой средств специфической профилактики мелиоидоза, для более адекватного отбора антигенных препаратов, перспективных для конструирования химической вакцины против мелиоидозной инфекции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Law F.N., Simpson A.Y., Prins I.M. et al. Elevated plasma concentration of interferon (IFN)-gamma and the IFN-gamma-inducing cytokines interleukin (IL)-18, IL-12 and IL-15 in severe melioidosis // *J.Infect.Dis.* - 1999. - Vol.180, N 6. - P.1878-1885.

2. Simpson A.I., Smith M.D., Weverling G.I. et al. Prognostic value of cytokine concentrations (tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6 and interleukin-10) and clinical parameters in severe melioidosis // *J.Infect.Dis.* - 2000. - Vol.181, N 2. - P.621-625.

3. Barnes I.L., Ketheesan N. et al. Induction of multiple chemokine and colonystimulating factor genes in experimental *Burkholderia pseudomallei* infection // *Immunol.Cell.Biol.* - 2001. - Vol.79, N 5. - P.490-501.

4. *Burkholderia mallei* и *Burkholderia pseudomallei*. Изучение иммуно- и патогенеза сапа и мелиоидоза. Гетерологичные вакцины / Манзенюк И.Н., Ганина Е.А., Дорохин В.В., Калачев И.Я., Борзенков В.Н., Светоч Э.А. // *Антибиотики и химиотерапия.* - 1999. - №44. - С.21-26.

5. Способ определения иммуногенности препаратов для профилактики чумы / Васильева Г.И., Дорошенко Е.П., Киселева А.К., Беспалова И.А. // *Клин. лаб. диагностика.* - 1999. - №3. - С.37-39.

6. Способ определения уровня иммуногенности капсульных антигенов *Burkholderia mallei* / Пивень Н.Н., Авророва И.В., Алексеев В.В., Ломова Л.В., Прошина О.Б. // Патент на изобретение. - 12.07.2005. - RU 2293.993 С.1.

7. Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности). Санитарно-эпидемиологические правила. - СП 1.3. / Собрание законодательства Российской Федерации. - 2003. - С.3295.

Таблица 1

Взаимосвязь между уровнем протективности ВСЭ буркхольдерий и их цитокининдуцирующей активностью

Антигенный препарат	Летальность при заражении 5 ЛД ₅₀ B.pseudomallei 115			Цитотоксическая активность ФНО-α монокинов в отношении фибробластов L-929 (ед. актив.)
	пало/взято	% павших	СПЖ (сут)	
BCЭ-С-141	6/10	60	12,8	32
BCЭ-100	5/10	50	13,4	128
BCЭ B.thailandensis 251	7/9	78	13,6	16
Контроль заражения (интактные мыши)	9/10	90	7,3	-
Контроль цитотоксичности монокинов (индуктор - физ.раствор)	-	-	-	4

10

Таблица 2 Защитное действие мелиоидозных антигенных фракций и их цитокининдуцирующая активность в отношении перитонеальных макрофагов мышей				
Антигенный препарат	Летальность при заражении B.pseudomallei C-141			Цитотоксическая активность ФНО-α монокинов в отношении фибробластов L-929 (ед. актив.)
	пало/взято	% павших	СПЖ (сут)	
ЭЦА-57576	6/12	50	13,8	32
КПС-56738	6/10	60	11,6	16
ДХР-С-141	4/9	44	14,2	64
ВМФ - С-141	6/10	60	15,2	32
Фф - С-141	7/10	70	10,2	4
ЛПС-100	6/10	60	12,1	16
Контроль заражения (интактные мыши)	10/10	100	7,2	-
Контроль цитотоксичности монокинов (индуктор - физ.раствор)	-	-	-	2

25

Формула изобретения

Способ оценки уровня протективности мелиоидозных антигенов, включающий использование антигенов в качестве индукторов монокинов с последующим определением цитотоксической активности находящегося в них фактора некроза опухоли - альфа (ФНО-α) на мышинных фибробластах L-929, отличающийся тем, что для индукции монокинов мелиоидозные антигены добавляют в лунки 96-луночной планшеты, содержащие по 200 мкл (10⁵ клеток) перитонеальных макрофагов мышей BALB/c, до конечной концентрации 10 мкг/мл, а в контрольные лунки добавляют физраствор, затем планшеты инкубируют при 37°C и 5% CO₂ 24 ч, супернатанты (монокины) собирают и добавляют по 100 мкл в различных разведениях и в трех повторностях в лунки планшеты с клетками L-929, прикрепленными к пластику по 100 мкл на лунку (2·10⁵ клеток) за 24 ч до опыта, одновременно добавляют по 10 мкл актиномицина Д в конечной концентрации 1 мкг/мл, после чего через 24 ч инкубации определяют цитотоксическую активность ФНО-α монокинов по числу единиц активности, обратному разведению монокинов, приводящему к 50%-ной гибели клеток L-929 в лунке (ЦТЕ50), сравнивая ее с таковой в контроле, где тестируют монокины, индуцированные физраствором, и по степени выраженности цитотоксической активности ФНО-α в опыте по сравнению с контролем, находящейся в прямой корреляции с защитными свойствами мелиоидозных антигенов, судят об уровне их протективности.

50