



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 139 348** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) МПК⁶ **C 12 N 9/00, 1/06**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

(21), (22) Заявка: 97116922/13, 06.10.1997

(24) Дата начала действия патента: 06.10.1997

(46) Дата публикации: 10.10.1999

(56) Ссылки: Osborn M.I., Munson R. Separation of the inner (cytoplasmic) and outer membranes of gram-negative bacteria. 1974, Meth. Enzymol., v.31, p.642-653. Takahara, Y., Hurose, N., Yasuda, K., Mitsugi, S., Murao. Effect of peptidolipids produced by Bacillus on the enzymatic lysis of Gram-negative bacterial cells. 1976, Agr. Biol. Chem., v.40, No9, pp.1901-1903. Франклин Т., Сноу Дж. Биохимия антимикробного действия. - М.: Мир, 1984, с.78-80. Кулаев И.С. Бактериологические ферменты микробного происхождения в биологии и медицине. В сб. Бактериологический препарат лизоамидаза. Физиологические, биохимические и клинические аспекты, 1989, Пущино, с.3-9. Кислухина О.В. и др. Ферментативный лизис микроорганизмов. А.-А. "Фаутан", 1990, с.30-44.

(98) Адрес для переписки:
142292, Пущино, Московская обл., пр-т Науки
5, Институт биохимии и физиологии
микроорганизмов, рук.патентно-лицензионной
группы Л.Г.Беляковой

(71) Заявитель:

Институт биохимии и физиологии
микроорганизмов им.Г.К.Скрябина РАН

(72) Изобретатель: Степная О.А.,

Ледова Л.А., Кулаев И.С., Прудникова О.В.

(73) Патентообладатель:

Институт биохимии и физиологии
микроорганизмов им.Г.К.Скрябина РАН

(54) **СРЕДСТВО ДЛЯ ЛИЗИСА КЛЕТОК ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ И ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ
МИКРООРГАНИЗМОВ**

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии и может быть использовано для получения ферментных средств широкого спектра действия, используемых в медицине для лечения наружных инфекционных заболеваний, а также в генетике, молекулярной биологии и биохимии в лабораторной практике. Предложено средство для лизиса клеток грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, включающее лизоамидазу,

полимиксин В и буферный раствор при следующем соотношении компонентов, мкг/мл: лизоамидаза 1000-3000, полимиксин В 20-50, буферный раствор остальное. Предлагаемое средство способно лизировать клетки представителей как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий, в том числе и патогенных, способных вызывать серьезные инфекционные заболевания, в частности заболевания полости рта. 3 табл.



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 139 348** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) Int. Cl.⁶ **C 12 N 9/00, 1/06**

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 97116922/13, 06.10.1997

(24) Effective date for property rights: 06.10.1997

(46) Date of publication: 10.10.1999

(98) Mail address:
142292, Pushchino, Moskovskaja obl., pr-t
Nauki 5, Institut biokhimii i fiziologii
mikroorganizmov, ruk.patentno-litsenzionnoj
gruppy L.G.Beljakovoj

(71) Applicant:
Institut biokhimii i fiziologii
mikroorganizmov im.G.K.Skrjabina RAN

(72) Inventor: Stepnaja O.A.,
Ledova L.A., Kulaev I.S., Prudnikova O.V.

(73) Proprietor:
Institut biokhimii i fiziologii
mikroorganizmov im.G.K.Skrjabina RAN

(54) **AGENT FOR LYSIS OF CELLS OF GRAM-POSITIVE AND GRAM-NEGATIVE MICROORGANISMS**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology, microbiology.
SUBSTANCE: invention proposes an agent for
lysis of cells of gram-positive and
gram-negative-microorganisms containing
lysoamidase, polymixin B and buffer solution
at the following ratio of components,
mcg/ml: lysoamidase 1 000-3 000; polymixin B
20-50 and buffer solution - the rest.
Proposed agent is able to lyse cells of both
gram-positive and gram-negative bacteria

including pathogenic ones that are able to
cause serious infection diseases, in part,
in the mouth cavity. Invention can be used
for preparing enzyme agents of the broad
spectrum of effect that are used in medicine
for treatment of external infection diseases
and in genetics, molecular biology,
biochemistry and laboratory practice also.
EFFECT: enhanced effectiveness of an agent.
3 tbl, 5 ex

Изобретение относится к биотехнологии и может быть использовано для получения ферментных средств широкого спектра действия, используемых в медицине для лечения наружных инфекционных заболеваний, а также в генетике, молекулярной биологии и биохимии в лабораторной практике.

Экоклеточные бактериолитические ферменты широко распространены в природе. Они обнаружены у бактерий, грибов, насекомых, растений, животных и человека. Бактериолитические ферменты имеют различные функции: защитные функции у высших организмов, завоевание экологической ниши и снабжение клеток энергией у микроорганизмов. Защитные функции осуществляются путем лизиса патогенных микроорганизмов [1]. Субстратом бактериолитических ферментов являются пептидогликаны, входящие в состав клеточных стенок грамотрицательных и грамположительных бактерий, но подавляющее количество бактериолитических ферментов не способны самостоятельно лизировать нативные клетки грамотрицательных бактерий.

Известны ферментные препараты на основе бактериолитических ферментов, лизирующие клетки грамположительных микроорганизмов: лизоцим яичного белка [2], лизостафин [3] и лизоамидаза [4].

Лизоцим используют в медицине для лечения наружных инфекционных заболеваний. Недостатком лизоцима является то, что он лизирует узкий спектр грамположительных микроорганизмов. Он нестабилен и дорог.

Лизостафин используется только в лабораторной практике для получения внутриклеточного содержимого грамположительных бактерий [5]. Он также недостаточно стабилен при хранении.

Лизоамидаза - комплексный ферментный препарат, содержащий бактериолитические, протеолитические ферменты и полисахарид [4]. Этот ферментный препарат лизирует широкий спектр грамположительных, в том числе антибиотикоустойчивых микроорганизмов. Препарат очень стабилен, так как присутствующий в нем полисахарид стабилизирует активность ферментов. Лизоамидаза, так же как и другие бактериолитические ферменты, не лизирует нативные клетки грамотрицательных микроорганизмов из-за наличия в их клеточной стенке внешней мембраны, которая защищает пептидогликановый слой от действия бактериолитических ферментов лизоамидазы.

Известно, что при совместном действии бактериолитического фермента из бактерии *Bacillus subtilis* IT-25 и полимиксина В (колистин) наблюдается лизис грамотрицательного микроорганизма *Pseudomonas aeruginosa* [6]. Не известно действуют ли указанные вещества на другие грамотрицательные микроорганизмы, не показано использование действия фермента и антибиотика в медицине.

Полимиксин В - антибиотик, действующий на грамотрицательные микроорганизмы - дезорганизует клеточную мембрану, следствием чего является гибель клеток микроорганизмов [7]. Полимиксин В оказывает

слабое действие на грамположительные микроорганизмы. Он используется в очень редких случаях при тяжелых инфекциях, вызываемых грамотрицательными бактериями рода *Pseudomonas*, так как применение средства связано с большим риском из-за возможного нарушения функции почек. Лизирующего действия на клетки полимиксин В не оказывает.

Средство для осуществления лизиса грамположительных и грамотрицательных бактерий, пригодное для использования в медицине, не известно. Но известно использование лизоцима в сочетании с ЭДТА для лизиса грамположительных и грамотрицательных бактерий [8].

Задачей данного изобретения является создание средства для осуществления лизиса грамположительных и грамотрицательных бактерий, пригодное для использования в медицине.

Технический результат от использования изобретения - одновременный лизис грамположительных и грамотрицательных бактерий.

Сущность предлагаемого объекта - предложено средство для лизиса клеток грамположительных и грамотрицательных бактерий, включающее лизоамидазу и полимиксин В в эффективном количестве.

Средство для лизиса клеток грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов содержит компоненты в следующем соотношении, мг/мл:

Лизоамидаза - 1000 - 3000,

Полимиксин В - 20 - 50,

Буферный раствор - Остальное

Указанное средство может быть получено двумя способами.

1. К раствору лизоамидазы в 0.01 молярном буферном растворе, pH 8, добавляют раствор полимиксина В в том же буфере до определенной конечной концентрации полимиксина В.

Концентрации лизоамидазы в средстве - от 1000 до 3000 мг/мл, конечная концентрация полимиксина В - 20 - 50 мг/мл (156 - 390 Е/мл).

Для получения раствора лизоамидазы растворяют порцию лиофилизированного фермента в буфере.

Раствор полимиксина В готовят непосредственно перед применением путем разведения в буфере порции порошка с активностью 250000 Е/мл.

В качестве буфера могут быть использованы в частности Na-фосфатный и трис-HCl буферы.

2. Порошки лизоамидазы и полимиксина В смешивают в соотношении лизоамидаза: полимиксин В 1000 - 3000 : 20 - 50 (мкг), затем добавляют буферный раствор до 1 мл.

Концентрация лизоамидазы определяется тем, что при значениях меньше 1000 мг/мл не достигается нужный эффект, а при концентрациях больших 3000 мг/мл из-за наличия в средстве полисахарида наблюдается стабилизация протопластов, получаемых при лизисе клеток, и как следствие - рост микроорганизмов.

Концентрация полимиксина В определяется тем, что при значениях меньших 20 мг/мл не достигается нужный эффект, а при концентрациях больших 50 мг/мл наблюдается ингибирование действия

лизоамидазы. Это подтверждается на примере действия лизоамидазы на клетки золотистого стафилококка данными таблицы 1.

Предполагается, что полимиксин В, дезорганизуя внешнюю мембрану, создает для лизоамидазы возможность проникнуть к пептидогликановому слою и разрушить его.

Возможность осуществления предложенного изобретения показана в следующих примерах, но не исчерпывается ими.

Пример 1. Получение средства для лизиса.

К 1 мл раствора лизоамидазы в 0,01 молярном растворе Na-фосфатного буфера в концентрации 3000 мкг/мл добавляют 17 мкл раствора полимиксина В в концентрации 8000 мкг/мл (62500 Е/мл) в том же буфере, конечная концентрация полимиксина при этом будет составлять 40 мкг/мл (312 Е/мл).

Пример 2. Получение средства для лизиса.

3000 мкг лизоамидазы смешивают с 40 мкг полимиксина В, к полученной смеси добавляют 1 мл 0,01 молярного трис-НСI буфера, рН 8,0.

Пример 3. Лизис условно патогенных лабораторных штаммов бактерий.

К 2 мл микробной взвеси в 0,01 М Na-фосфатном буфере, рН 8,0 (оптическая плотность 0,7 при длине волны 590 нм) добавляют 500 мкл раствора средства, содержащего лизоамидазу и полимиксин В, полученного в примере 1.

Смесь инкубируют 30 минут при 37 град. С. Реакцию останавливают добавлением насыщенного раствора хлористого натрия.

За единицу бактериолитической активности принимают такое количество фермента, которое приводит к снижению оптической плотности бактериальной суспензии на 0,01 оптическую ед. в 1 мин.

В качестве контроля вместо предлагаемого средства используют 500 мкл раствора лизоамидазы в буфере в концентрации 3000 мкг/мл или 500 мкл полимиксина В в буфере в концентрации 40 мкг/мл (312 Е/мл) или в концентрации 80 мкг/мл (625 Е/мл).

Данные, представленные в таблице 2, подтверждают, что предложенное средство может быть использовано для лизиса грамотрицательных бактерий.

Пример 4. Лизис патогенных штаммов бактерий.

К 1 мл взвеси микробных клеток в 0,01М Na-фосфатном буфере рН 8,0 в стерильных пробирках добавляют стерильно:

1,5 мл раствора лизоамидазы с полимиксином В в том же буфере (конечная концентрация лизоамидазы 1000 мкг/мл (10 ЛЕ/мл), конечная концентрация полимиксина - 40 мкг/мл (312 Е/мл).

Полученную смесь инкубируют в термостате при 37 град. С в течение 24 часов. Затем делают десятикратные разведения и высевают на чашки со средой Лурия-Бертани [8] по 0,1 мл из каждого разведения.

После инкубации чашек в термостате проводят учет результатов. Положительным (+) считают результат, когда при высеве на чашки из пробирок, содержащих 10 - 10 клеток/мл, наблюдают отсутствие роста

колоний. Отрицательным (-) - в случае роста колоний. Количество микробных клеток в исходной взвеси определяют, используя контрольный вариант, в котором вместо предлагаемого средства к микробной взвеси добавляют стерильный буфер.

В качестве контроля вместо средства, содержащего лизоамидазу и полимиксин В, используют:

1,5 мл раствора лизоамидазы в том же буфере в конечной концентрации 1000 мкг/мл (10 ЛЕ/мл);

1,5 мл 0,01 М трис-НСI буфера, рН 8,0.

Данные представлены в таблице 3.

Полмиксин В не использовали в данном примере в качестве контроля в связи с тем, что после действия предлагаемого средства на клеточную суспензию визуализацию количества нелизированных клеток проводят методом их инкубации на твердой питательной среде. Известно, что полимиксин В подавляет рост грамотрицательных микроорганизмов и их нелизированные при инкубации в жидкой среде с полимиксином В клетки не прорастают в присутствии полимиксина В на твердой питательной среде. Положительный эффект действия самого полимиксина В связан не с лизисом клеток, а с подавлением их роста.

Пример 5. Применение лизоамидазы с полимиксином В для лечения заболеваний периодонта

Лизоамидазу с полимиксином В использовали для лечения 25 больных с хроническим фиброзным, гранулематозным, гранулирующим периодонтитом и хроническим периодонтитом в стадии обострения. В первые 3 - 5 часов после обработки корневых каналов у пациентов исчезали боли, уменьшалась гиперимия и отек слизистой оболочки. Герметизация корневых каналов с препаратом под временной пломбой переносилась безболезненно. В течение месяца полностью исчезали свищевые ходы.

Клинико-рентгенологический контроль отдаленных результатов лечения воспалительных процессов в периодонте показал, что полное и частичное восстановление костной ткани у верхушки зуба отмечается в 89%.

Таким образом показано, что предлагаемое средство, включающее лизоамидазу в сочетании с полимиксином В, способно лизировать клетки представителей как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий, в том числе и патогенных, способных вызывать серьезные инфекционные заболевания: в частности заболевания полости рта.

Литература

1. Imoto T., Johnson L.N., North A.C.T., Phillips D.C. and Rupley J.A. In The Enzymes, 1972. Academic Press, New York, London, pp. 665 - 868.

2. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. 1979, "Высшая школа", стр. 347 - 349.

3. Schindler C.A., Schuhardt V.T. Lysostaphin: a new bacteriolytic agent for the Staphylococcus. 1964, Proc. of the Nation. Acad. Sci. USA, v. 51, N 3, pp. 415 - 421.

4. Кулаев И. С. Бактериолитические ферменты микробного происхождения в биологии и медицине. В сборнике:

"Бактериолитический препарат лизоамидаза. Физиологические, биохимические и клинические аспекты", 1989, Пущино, стр. 3 - 9.

5. Mulder R.R., Brennen C., Wagener M.M., Viskers R.M., Rihs J.D., Hancock G.A., Yee Y.C., Miller J.M., Yu V.J. Methicillin-Resistant Staphylococcal Colonization and Infection in a Long-Term Care Facility. *Annals of Internal Medicine*, 1991, v. 114, N 2, pp. 107 - 112.

6. Takahara, Y. Hurose, N. Yasuda, K. Mitsugi, S. Murao. Effect of peptidolipids produced by *Bacillus* on the enzymatic lysis of Gram-negative bacterial cells. 1976, *Agr. Biol. Chem.*, v. 40, N 9, pp. 1901-1903.

7. Франклин Т., Сноу Дж. Биохимия антимикробного действия. 1984, М., "Мир", стр. 78 - 80.

8. Osborn M. I., Munson R. Separation of the inner (cytoplasmic) and outer membranes of gram-negative bacteria. 1974, *Meth. Enzymol.*, v. 31, p. 642 - 653.

9. Девис Р., Ботстайн Д., Рот Дж. Методы генетической инженерии. М.: Мир, 1984, стр. 142.

Формула изобретения:

5 Средство для лизиса клеток грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, включающее ферментный препарат, содержащий фермент, лизирующий грамположительные микроорганизмы, и
10 вещество, нарушающее структуру мембран грамотрицательных микроорганизмов, отличающееся тем, что в качестве ферментного препарата оно содержит лизоамидазу, а в качестве вещества, нарушающего структуру мембран грамотрицательных микроорганизмов, -
15 полимиксин В и дополнительно буферный раствор при следующем соотношении компонентов, мкг/мл:
Лизоамидаза - 1000 - 3000
Полимиксин В - 20 - 50
20 Буферный раствор - Остальное

25

30

35

40

45

50

55

60

Таблица 1.

Влияние полимиксина В на активность лизоамидазы
в отношении клеток золотистого стафилококка.

Концентрация лизоамидазы (мкг/мл)	Концентрация полимиксина В (Е/мл)	Литическая активность (Е /мл)	Литическая активность %
3000	0	15,0	100
3000	312	15,0	100
3000	400	13,5	90
3000	625	12,5	83
3000	1250	12,0	80
3000	1875	10,0	67
3000	2500	7,0	47
3000	3125	0,0	0

Таблица 2.

Действие лизоамидазы в сочетании с полимиксином В
на лабораторные штаммы грамотрицательных бактерий.

\ Бактерия	А к т и в н о с т ь (Е/мл)		
	!		
	!E. coli !	E. coli	Pseudomonas
Средство\	!C 600 !	K 12	putida
!			
Лизоамидаза +			
полимиксин В			
40мкг/мл (312 Е/мл)	8	5	7
Лизоамидаза +			
полимиксин В			
80мкг/мл (625 Е/мл)	7	2	5
Лизоамидаза			
(3000 мкг/мл)	0	0	0
Полимиксин В			
80мкг/мл (625 Е/мл)	0	0	0

Таблица 3.

Действие лизоамидазы и лизоамидазы в сочетании с полимиксином В на клетки грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов, в том числе патогенных.

N	Микроорганизмы	Количество штаммов	Лизирующий эффект	
			Лизоамидаза	Лизоамиаза + полимиксин В
Грамположительные бактерии				
1.	Staphylococcus aureus	17	+	+
2.	Bacillus subtilis	4	+	+
3.	Streptomyces chrisomallus	1	+	+
4.	Streptococcus mutans	1	+	+
5.	Peptostreptococ- cus intermedius	1	+	+
6.	Streptomyces azureus	1	+	+
Грамотрицательные бактерии				
1.	Escherichia coli	2	-	+
2.	Pseudomonas putida	1	-	+
3.	Pseudomonas aeruginosa	6	-	+
4.	Salmonella marcescens	1	-	+
5.	Proteus vulgaris	1	-	-
6.	Proteus mirabilis	1	-	-