



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
C12N 1/20 (2006.01); *C12P 1/04* (2006.01); *C12R 1/46* (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2017102568, 26.01.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 26.01.2017

Дата регистрации:
 21.06.2018

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 26.01.2017

(45) Опубликовано: 21.06.2018 Бюл. № 18

Адрес для переписки:
 156002, г. Кострома, ул. Борьбы, 39, кв.7, Кадыров
 Р.Н.

(72) Автор(ы):

Кадыров Рашит Накипович (RU),
 Песня Дмитрий Сергеевич (RU),
 Песня Александр Сергеевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Кадыров Рашит Накипович (RU),
 Песня Дмитрий Сергеевич (RU),
 Песня Александр Сергеевич (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
 о поиске: US 8221769 B2, 26.10.2009. US
 4929547 A, 29.05.1990. RU 2263143 C2,
 27.10.2005. RU 2179855 C1, 27.02.2002.

(54) ШТАММ STREPTOCOCCUS PYOGENES N В-7612, ПРОДУЦЕНТ КОМПЛЕКСА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ, ОБЛАДАЮЩИХ ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩИМИ СВОЙСТВАМИ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии. Предложен штамм бактерий *Streptococcus pyogenes*, обладающий способностью продуцировать вещества, в том числе комплекс ферментов и других белков, обладающих высокими иммуностимулирующими свойствами. Штамм *Streptococcus pyogenes* депонирован в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-

ОБОЛЕНСК» под регистрационным номером В-7612 и может быть использован для создания вакцинных, иммуностимулирующих, противоопухолевых препаратов и др. биологически активных средств. Штамм обладает высокой иммуностимулирующей активностью, позволяющей использовать его для получения биологически активных и фармацевтических препаратов. 3 пр.

**(12) ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

C12N 1/20 (2006.01); *C12P 1/04* (2006.01); *C12R 1/46* (2006.01)

(21)(22) Application: 2017102568, 26.01.2017

(24) Effective date for property rights:
26.01.2017Registration date:
21.06.2018

Priority:

(22) Date of filing: 26.01.2017

(45) Date of publication: 21.06.2018 Bull. № 18

Mail address:

156002, g. Kostroma, ul. Borby, 39, kv.7, Kadyrov
R.N.

(72) Inventor(s):

**Kadyrov Rashit Nakipovich (RU),
Pesnya Dmitrij Sergeevich (RU),
Pesnya Aleksandr Sergeevich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Kadyrov Rashit Nakipovich (RU),
Pesnya Dmitrij Sergeevich (RU),
Pesnya Aleksandr Sergeevich (RU)****(54) STREPTOCOCCUS PYOGENES N B-7612, THE PRODUCER OF THE COMPLEX OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS WITH IMMUNOSTIMULATING PROPERTIES**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: strain of *Streptococcus pyogenes*, which has the ability to produce substances, including a complex of enzymes and other proteins with high immunostimulating properties, is proposed. *Streptococcus pyogenes* strain was deposited in the State Collection of Pathogenic Microorganisms and Cell Cultures "SCPMCC-OBOLENSK" under

registration number V-7612 and can be used to create vaccine, immunostimulating, antitumor drugs and other biologically active agents.

EFFECT: strain has a high immunostimulating activity, allowing it to be used for the production of biologically active and pharmaceutical preparations.

1 cl, 3 ex

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Изобретение относится к биотехнологии, фармакологии, косметологии, нутрициологии, микробиологии, ветеринарии и медицине. Штамм бактерий *Streptococcus pyogenes* МРК-12 № В-7612, депонированный в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточный культур «ГКПМ-ОБОЛЕНСК», представляет собой новый штамм мезофильных стрептококков, продуцент полисахаридов (в том числе гиалуроновой кислоты), комплекса ферментов (в том числе стрептокиназы) и других белков (SAGP), и предназначенный для создания вакцинных, иммуностимулирующих, противоопухолевых, пищевых добавок и других препаратов.

Выделен авирулентный штамм *Streptococcus pyogenes* МРК-12 № В-7612 из микрофлоры фарингса здорового человека-носителя. Штамм культивируют на питательных средах: питательный и мясопептонный бульон и его различные модификации. Изобретение обеспечивает получение лечебных, профилактических и других препаратов.

Уже много лет известна противораковая и иммуностимулирующая активность бактерий вида *Streptococcus pyogenes*. Эти бактерии вырабатывают целый спектр веществ (гиалуроновую кислоту, стрептолизин, кислый стрептококковый гликопротеид (SAGP), стрептокиназу), одни из которых являются активаторами клеточного и гуморального иммунитета человека и животных, а другие угнетают рост клеток рака, что хорошо показано в исследованиях *in vitro* и *in vivo*. При этом все штаммы бактерий вида *Streptococcus pyogenes* являются продуцентами данных веществ, отличаясь лишь в количественных характеристиках (Maletzki et al., 2008; Yang et al., 2006; Vobek et al., 2006). Важнейшим веществом, вырабатываемым данным видом бактерий, является фермент стрептолизин, который, с одной стороны, стимулирует созревание дендритных клеток иммунитета, повышает активность т-лимфоцитов и цитотоксических лимфоцитов, стимулирует в организме выработку интерферона альфа и гамма, интерлейкинов-2, -6 и -12, а с другой стороны, фермент стрептолизин избирательно встраивается в мембраны раковых клеток и активирует их апоптоз по типу «суицида» (Maletzki et al., 2008; Yang et al., 2006). Этот вид бактерий так же производит фермент стрептокиназу, которая угнетает рост некоторых типов рака (Vobek et al., 2006). Другим важным белком, который вырабатывают бактерии вида *Streptococcus pyogenes*, является кислый стрептококковый гликопротеид (SAGP), который угнетает процесс деления у раковых клеток и сдерживает рост опухоли, при этом стимулирует активность лимфоцитов, проявляя иммуностимулирующие свойства. При этом данный белок эффективно подавляет деление клеток рака в даже в очень малых концентрациях (0,03 мкг/мл) и не оказывает токсического воздействия на нормальные клетки (Yoshida et al., 1987). Гиалуроновая кислота или гиалуронан - это полисахарид, составляющий капсулу вокруг клеток бактерий вида *Streptococcus pyogenes*. Показано, что низкомолекулярный гиалуронан угнетает рост клеток колоректальной карциномы путем угнетения деления клеток рака с одной стороны и стимуляцией иммунного ответа с другой стороны, благодаря высоким иммуностимулирующим свойствам гиалуронана (Wu Yue et al., 2012). В исследованиях было показано, что именно живые бактерии *Streptococcus pyogenes* проявляют максимальный противораковый и иммуностимулирующий эффект благодаря общему синергетическому эффекту комплекса всех вышеуказанных веществ, приводя к полной регрессии рака у животных в эксперименте (Maletzki et al., 2008). Убитые термической обработкой бактерии проявляют иммуностимулирующие свойства, но в меньшей степени, чем живые. Выделенные из бактерий компоненты по отдельности также обладают противораковыми и иммуностимулирующими свойствами, но в еще меньшей

степени убитые или живые бактерии (Higuchi et al., 1980). Основная проблема, которая препятствует использованию живых бактерий, заключается в том, что большинство штаммов *Streptococcus pyogenes* патогенны и могут вызывать системные инфекции, что делает их неприменимыми для создания препаратов из живых культур бактерий. Поэтому ведется разработка методов пересадки генов бактерий *Streptococcus pyogenes* в более безопасные виды бактерий (например, кишечной палочки) для наработки необходимого белка.

Известен способ наработки ненасыщенных жирных кислот путем пересадки гена от *Streptococcus pyogenes* в кишечную палочку (KR 20140026912 A). В другом патенте приводится способ получения аминокислоты треонина путем пересадки гена от *Streptococcus pyogenes* в штамм коринебактерий (KR 20140044469 A). Недостатком данных изобретений является необходимость в сложной и дорогостоящей процедуре генной инженерии. В патенте (US 5559211 A1) отмечается, что бактерии, принадлежащие к виду *Streptococcus pyogenes*, обладают противоопухолевой активностью, благодаря комплексу биологически активных веществ. Поскольку доступные штаммы *Streptococcus pyogenes* патогенны, предлагается использовать не сами бактериальные штаммы, а особый белок, который они вырабатывают - стрептококковый кислый гликопротеид (SAGP), который стимулирует деление лейкоцитов, защищает от бактериальных и вирусных инфекций и предотвращает метастазы. Авторы отмечают, что все штаммы бактерий вида *Streptococcus pyogenes* вырабатывает противоопухолевый белок SAGP, и потому любой штамм может быть использован для получения указанного белка. В патенте приводятся примеры с использованием для наработки белка патогенных штаммов *Streptococcus pyogenes* Su (ATCC 21060), *Streptococcus pyogenes* Sv (ATCC 21059), *Streptococcus pyogenes* T-12 (ATCC 12353), *Streptococcus pyogenes* C-203 (ATCC 12384). Приведен пример, в котором группа мышей прививается любым живым штаммом из указанных. Все мыши, привитые живым штаммом, погибают. В группе мышей, привитых белком SAGP, гибели мышей не отмечено. В патенте US 4929547 A1 отмечается, что многие штаммы *Streptococcus pyogenes* обладают клинически выраженным противоопухолевым эффектом, но все известные штаммы патогенны и в испытаниях на мышах вызывают гибель животных. Определяется генетическая структура гена противоопухолевого белка SAGP и описывается метод пересадки этого гена в культуру клеток или бактерий для наработки белка SAGP.

Единым недостатком вышеперечисленных изобретений является то, что конечный результат данных изобретений не позволяет использовать весь комплексный противораковый и иммуностимулирующий потенциал живых бактерий, в которых содержится весь комплекс действующих веществ.

Наиболее близким аналогом текущей заявки на изобретение является патент (US 8221769 B2). В данном патенте отмечается историческая эффективность штаммов *Streptococcus pyogenes* в лечении ряда опухолей, но поскольку все известные штаммы в живой форме патогенны, предлагаются способы получения различных ослабленных генномодифицированных штаммов бактерий и вирусов, которые бы проникали в опухолевые ткани и вызвали их распад. В частности, приводится пример ослабленного генномодифицированного штамма *Streptococcus pyogenes* (ATCC 700294) со встроенной плазмидой pDC123-luxF, несущей ген люциферазы. Мышам с привитой злокачественной опухолью, введенным в наркоз изофлураном, делали инъекцию данного штамма бактерий. Данный штамм приводил к уменьшению темпов роста опухоли во всех опытных группах мышей. К недостаткам данного изобретения относится необходимость в проведении сложной и дорогостоящей процедуры генной модификации штамма,

необходимость в введении наркотического анестетика изофлурана при введении штамма животным.

В предлагаемом изобретении, выделенный штамм бактерий *Streptococcus pyogenes* МРК-12 является природным и не патогенным, не нуждается в генной модификации, в отличие от других известных штаммов. Он является безопасным для животных, что демонстрируют проведенные на мышах и морских свинках испытания. Штамм МРК-12 не вызывает гибели мышей и морских свинок при прививке в дозах в 500 раз выше рекомендуемых. Данный штамм может быть использован для инъекций животным в живой форме, не требует применения анестетиков и наркоза.

Задача заявляемого изобретения - получение непатогенного штамма бактерий *Streptococcus pyogenes* МРК-12 № В-7612, который продуцирует в питательную среду комплекс биологически активных соединений и предназначенный для создания вакцинных, иммуностимулирующих, противоопухолевых и других препаратов.

Идентификацию штамма проводили с использованием иммунохроматографического теста "Streptatest" (Lasseter et al., 2009; Pelucchi et al., 2012), биохимических и морфологических показателей (Yoshino et al., 2010; Lancefield, 1934).

Штамм *Streptococcus pyogenes* МРК-12 № В-7612 имеет следующие характеристики:

1. Культурально-морфологические:

- факультативный анаэроб;
- грамположительные кокки;
- диаметр 300-800 нм;
- неподвижные;
- расположенные цепочками;
- эндоспор не образуют.

На поверхности плотных питательных сред через 24-48 часов при температуре 37°C образуют:

- колонии округлой формы,
- размер 0,5-5 мм;
- характер контура края - ровный, четкий;
- форма - округлая;
- поверхность - влажная, блестящая;
- цвет - кремово-белый;
- структура - однородная;
- консистенция мягкая.

Изучение культуральных или морфологических свойств отобранного штамма проводили на плотной питательной среде - питательном агаре с 5% крови.

2. Физиолого-биохимические:

- обладает способностью к бета-гемолизу на кровяном агаре;
- штамм сбраживает глюкозу, лактозу, мальтозу, сахарозу;
- Voges-Проскауэр тест отрицательный;
- РУР тест положительный;
- растет при температуре 37°C;
- растет в мясопептонном бульоне при рН 7,3;
- не растет на солевом бульоне 6,5%.
- штамм не выдерживает нагревание при температуре 60°C в течение 30 минут;
- штамм чувствителен к бацитрацину и пенициллину;
- вырабатывает гиалуроновую кислоту (гиалуронан);
- вырабатывает стрептолизин;

- вырабатывает стрептокиназу;
- вырабатывает кислый стрептококковый гликопротеид (SAGP).

Способ, условия и состав сред для длительного хранения штамма - лиофилизация; в пробирках с питательным бульоном при температуре от -15 до -200°C для долговременного хранения; пробирки с культурой хранят при температуре +4-8°C в течение 1 месяца.

Способ, условия и состав сред для размножения штамма - при температуре 37°C; среды: различные варианты питательного бульона.

Предлагаемый новый штамм прост в культивировании и хранении, не вирулентен для человека и животных.

Пример 1. Пассаж культуры: штамма *Streptococcus pyogenes* МРК-12 № В-7612 вносят в пробирки с питательным бульоном и помещают в термостат при 37 гр на 48 ч до образования осадка. По окончании процесса ферментации питательная среда и осадок содержат полисахариды, ферменты и белки, которые используются для приготовления препаратов. Количественное определение фермента стрептокиназы проводили по методу Монтера-Шипли путем ферментирования казеина. В 1 мл культуры штамма *Streptococcus pyogenes* МРК-12 содержится 0,2 (ед./мл) стрептокиназы (Bhardwaj et al., 2015). Определение полисахарида гиалуроновой кислоты проводилось по методу Шрейгера и экстракции хлороформом, в 1 мл культуры штамма *Streptococcus pyogenes* МРК-12 содержится 1964 мкг гиалуроновой кислоты (Ouskova et al., 2004). Наличие фермента стрептолизина определяется путем регистрации зоны бета-гемолиза вокруг колоний штамма *Streptococcus pyogenes* МРК-12 на кровяном агаре, что в количественном выражении составило 0,5 гемолитических единиц на мл при зоне гемолиза 3 мм (Hadasová et al., 1995). Концентрация кислого стрептококкового гликопротеида (SAGP) определялась в жидкой культуре бактерий путем экстракции в раствор фосфатного буфера по методу Йошиды, штамм *Streptococcus pyogenes* МРК-12 вырабатывает 1 мкг/мл данного вещества (Yoshida et al., 1987).

Пример 2. Иммуностимулирующий эффект: Было изучено иммуномодулирующее действие ветеринарного препарата «Стрептобластолизин» на организм собак на базе лаборатории болезней молодняка Федерального государственного бюджетного учреждения институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока (ФГБНУ ИЭВСиДВ) Российской академии наук и приюта для бездомных животных п. Краснообск. В опыте были использованы беспородные собаки в возрасте 2-3 лет, весом 10-20 кг, с признаками иммунодефицитных состояний, разделенные по принципу аналогов в 2 группы (n=10). Все собаки содержались в приюте для бродячих животных п. Краснообск, в вольерах по 5 голов. Каждому животному присваивался индивидуальный порядковый номер (в соответствии с номером группы и порядковым номером). Животным опытной группы в течение 25 суток внутривенно вводили препарат «Стрептобластолизин» в дозах и по схеме согласно инструкции (0,02-0,04 мл внутривенно в течение 20 дней с интервалом 5 суток). Животным контрольной группы проводили инъекции 0,9% NaCl в аналогичных дозировках. В начале опыта и на каждые 5 сут, у всех животных производили взятие проб крови для определения показателей иммунитета: количество форменных элементов (лейкоциты, лейкоцитарная формула), белок, альбумины, глобулины, ОФР, БАСК, ЛАСК. Кровь брали с помощью систем для взятия крови. Подсчет форменных элементов крови производили на ветеринарном полуавтоматическом гематологическом анализаторе «Mindray BC-2800 Vet». Динамику изменения биохимических показателей крови изучали на биохимическом анализаторе «Erba Mannheim», с использованием наборов для биохимических исследований

производства ЗАО «Вектор-Бест» и ООО «Ольвекс-диагностикум». Оценку фагоцитарной активности нейтрофилов проводили согласно методике Горчакова А.М., Кручинского Н.Г. (2003 г.). Оценивали изменение фагоцитарного индекса, фагоцитарной активности и фагоцитарного числа. Оценка бактерицидной (БАСК) активности сыворотки крови проводилась нефелометрическим методом согласно методике Бухарина (1979 г.). Динамику лизоцимной активности сыворотки крови (ЛАСК) определяли по нефелометрическим способом по методике Саруханова В.Я. (2012 г.). Определение белковых фракций сыворотки крови проводили турбидиметрическим методом (Кондрахин П.К. и др. 1984 г.). В результате эксперимента было установлено, что ветеринарный препарат «Стрептобластолизин», применяемый собакам по схеме, предложенной разработчиками (0,02-0,04 мл в/к в течение 20 сут с интервалом в 5 сут), оказывает стимулирующее действие на клеточное звено иммунитета, выражающееся в повышении общего количества лейкоцитов (преимущественно гранулоцитов, моноцитов и лимфоцитов), активизации фагоцитарной активности нейтрофилов крови, при одновременном росте фагоцитарного индекса и фагоцитарного числа (количества поглощаемых микробных клеток). Препарат «Стрептобластолизин», применяемый в дозе 0,02-0,04 мл в/к в течение 20 сут с интервалом в 5 сут, оказывает влияние на активность гуморальных факторов (система комплемента, пропердин и др.) и стимулирует повышение естественной устойчивости иммунной системы (увеличение показателей БАСК и ЛАСК в опытной группе). При применении ветеринарного препарата «Стрептобластолизин» по схеме, предложенной разработчиками, в крови опытных животных увеличивается количество γ -глобулинов, что может быть связано с активизацией иммунных процессов (фракция иммуноглобулинов состоит главным образом из γ -глобулинов). Таким образом, было установлено, что препарат «Стрептобластолизин» (лиофилизат для приготовления раствора для внутрикожного введения, невирулентный штамм *Streptococcus pyogenes* МРК-12 в культуральной жидкости со стабилизатором сушки) обладает высокими иммуностимулирующими свойствами, выражающимися в повышении клеточного и гуморального иммунитета опытных животных.

Пример 3. Исследование на острую и хроническую токсичность: Было проведено определение параметров острой и субхронической токсичности ветеринарного препарата «Стрептобластолизин» - лиофилизат для приготовления раствора для внутрикожного введения, невирулентный штамм *Streptococcus pyogenes* МРК-12 в культуральной жидкости со стабилизатором сушки. Рекомендуемая для введения доза - 0,001 мл/кг, что соответствует 10^5 КОЕ/кг. В экспериментах использовали конвенциональных животных. Производители животных: виварий ФГБНУ ИЭВСиДВ (мыши, морские свинки). Общее количество животных, используемое в данном исследовании:

1. острая токсичность - 120 мышей (нелинейные, самцы)
2. острая токсичность - 30 морских свинок (самцы)
3. хроническая токсичность - 40 белых мышей (нелинейные, самцы).

В эксперименте по определению острой токсичности исследуемый препарат и препарат сравнения вводили подкожно и внутрибрюшинно в широком диапазоне доз - увеличенных от 5 до 500 раз относительно рекомендованной для введения дозы - 0,001 мл/кг. В эксперименте по определению субхронической (подострой) токсичности исследуемый препарат вводили подкожно ежедневно в 5кратно, 10кратно и 50кратно увеличенной относительно рекомендованной дозы - 0,001 мл/кг. Длительность наблюдения за лабораторными животными составила 14 дней после введения препаратов. В ходе эксперимента следили за их поведением, внешним видом,

двигательной активностью, реакцией на внешние раздражители. Клиническую картину «острого» отравления лабораторных животных регистрировали при введении исследуемых препаратов в максимально достижимых дозах.

Ежедневно регистрировались следующие параметры функционального состояния лабораторных животных: Активность - вялость, нормальная активность, повышенная активность. Передвижение - нарушения координации, мышечный тонус, тремор.

Внешний вид: Состояние - ожирение, норма, истощение, кахексия. Шерсть - блестящая, тусклая, гладкая, торчащая, выпадение шерсти. Глаза - слезотечение, воспаление, помутнение роговицы, адгезия. Уши - цвет - норма, бледность, покраснение; воспаление, выделение секрета, образование струпа, подергивание. Зубы - цвет, поломка, потеря. Конечности - цвет, отек.

Физиологические функции: Дыхание - учащенное, нормальное замедленное, свистящее, хрипящее, затрудненное. Слюноотделение - недостаточное или избыточное. Слюна - водянистая или липкая. Моча - цвет. Экскрет - цвет, качество.

Взвешивание животных производили раз в неделю, что позволило определить динамику массы тела лабораторных животных в процессе эксперимента. В эксперименте по определению субхронической (подострой) токсичности наблюдение за животными для выявления отклонений в состоянии здоровья и смертности проводили один раз в день непосредственно перед введением препарата. Ежедневно регистрировались те же параметры функционального состояния лабораторных животных, что и в эксперименте по определению острой токсичности.

Результаты исследований

Величина LD₅₀ не установлена, так как при введении подкожно максимально возможной 500 кратно увеличенной суточной дозы белым мышам не вызывала гибели.

Величина LD₅₀ не установлена, так как при введении внутрибрюшинно максимально возможной 500 кратно увеличенной суточной дозы белым мышам не вызывала гибели.

Величина LD₅₀ не установлена, так как при введении подкожно максимально возможной 500 кратно увеличенной суточной дозы морским свинкам не вызывала гибели.

У животных, получавших высокие дозы ветеринарного препарата «Стрептобластолизин» однократно, на 14 сутки не устанавливали влияние на эритроцитарную фракцию крови лабораторных животных. Однократное введение высоких доз ветеринарного препарата «Стрептобластолизин» не вызывает отклонений в референтных значениях биохимических показателей.

Согласно классификации химических веществ по параметрам острой токсичности при парентеральных способах введения препарат можно отнести к 5 классу опасности - практически не токсично по Hodge & Sterner, 1943 г., и к 3 классу опасности - умеренно токсичный при подкожном и внутрибрюшинном способе введения в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76.

Определение субхронической (подострой) токсичности проводилось на белых нелинейных мышах, препараты вводились 1 раз в день, подкожно в течение 14 суток в дозах 5×10⁵ КОЕ/кг, 10⁶ КОЕ/кг и 5×10⁶ КОЕ/кг, не было зафиксировано ни одного летального случая и видимых признаков интоксикации.

Четырнадцать дневное введение ветеринарного препарата «Стрептобластолизин» в дозах 5×10⁵ КОЕ/кг подкожно не вызывает функциональных изменений в организме мышей, следовательно, эти дозу можно считать безопасной.

Наружный осмотр животных, проведенный в конце эксперимента, показал, что все

они нормально упитанны, имеют правильное телосложение, гладкий и блестящий шерстный покров, очагов облысения не отмечается. Зубы сохранены. Шерсть мягкая, блестящая, плотно прилегает к поверхности тела, без признаков расчесов и опрелости. Внешний вид кожи ушной раковины и наружного слухового прохода нормальные, выделение секрета и образование корок, а также подергивание ушей отсутствуют. Слезотечение, выделение секрета из глаз не отмечено, конъюнктивы век и глаз влажные, помутнения роговицы не выявлены. Состояние носовых отверстий и слизистых оболочек ротовой полости не изменены, поверхность языка не обложена, без признаков десквамации и трещин. На твердом небе не отмечается наличие геморрагических везикул и сыпи. Видимые слизистые оболочки были блестящими, гладкими, бледного цвета.

На вскрытии животных визуально во всех исследуемых органах патологических изменений не выявлено.

Литература

1. Федеральное государственное бюджетное учреждение институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока (ФГБНУ ИЭВСиДВ). Отчет по научно-исследовательской работе по договору №24/15 от 3 августа 2015 г. по теме: «Изучить острую и субхроническую (подострую) токсичность ветеринарного препарата «Стрептобластилин», лиофилизат для приготовления раствора для внутрикожного введения, организация-разработчик ООО «КВАДРО-БИОТЕХ», на организм лабораторных животных».

2. Федеральное государственное бюджетное учреждение институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока (ФГБНУ ИЭВСиДВ). Отчет о научно-исследовательской работе «Экспериментальное изучение местной реакции и хронической токсичности при использовании ветеринарного препарата «Стрептобластилин».

3. Федеральное государственное бюджетное учреждение институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока (ФГБНУ ИЭВСиДВ). Отчет по научно-исследовательской работе по договору №1/16 с ООО «КВАДРО-БИОТЕХ» по теме: «Изучение иммуномодулирующего действия ветеринарного препарата «Стрептобластилин» на организм собак».

4. US 4929547 A1 (OHGEN RESEARCH LABORATORIES LIMITED), 29.05.1990.

5. US 5559211 A1 (KABUSHIKI KAISHA SAIKIN KUGAKU KENKYUJO), 24.09.1996.

6. US 8221769 B2 (GENELUX CORPORATION), 17.07.2012.

7. KR 20140026912 A (UNIV SOGANG RES FOUNDATION (KR), SOGANG UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION), 06.03.2014.

8. KR 20140044469 A (UNIV SANGJI INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION (KR), SANGJI INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION), 15.04.2014.

9. US 2014065218 A1 (LANG CHRISTINE, RAAB ANDREAS, et al.), 06.03.2014.

10. Pelucchi C, Grigoryan L, Galeone C, Esposito S, Huovinen P, Little P, Verheij T. 2012. Guideline for the management of acute sore throat. Clin. Microbiol. Infect. 18:1-28.

11. Lassetter GM, McNulty CA, Richard Hobbs FD, Mant D, Little P; PRISM Investigators. 2009. In vitro evaluation of five rapid antigen detection tests for group A beta-haemolytic streptococcal sore throat infections. Fam. Pract. 26(6):437-44.

12. Lancefield R. 1934. Loss of the properties of hemolysin and pigment formation without change in immunological specificity in a strain of Streptococcus haemolyticus. J. Exp. Med. 59: 459-469.

13. Yoshino M, Murayama SY, Sunaoshi K, Wajima T, Takahashi M, Masaki J, Kurokawa I, Ubukata K. 2010. Nonhemolytic Streptococcus pyogenes isolates that lack large regions of the

sag operon mediating streptolysin S production. *J. Clin. Microbiol.* 48:635-638.

14. Maletzki C, Linnebacher M, Kreikemeyer B, Emmrich J. Pancreatic cancer regression by intratumoural injection of live *Streptococcus pyogenes* in a syngeneic mouse model // *Gut.* - 2008. - С. 483-491.

15. Yang WS, Park SO, Yoon AR, Yoo JY, Kim MK, Yun CO, Kim CW Suicide cancer gene therapy using pore-forming toxin, streptolysin O // *Mol. Cancer Ther.* 2006 Jun; 5(6):1610-9.

16. Bobek V., Pinterova D., Kolostova K., Boubelik M., Douglas J., Teyssler P, Pavlasek J., Kovarik J. Streptokinase increases the sensitivity of colon cancer cells to chemotherapy by gemcitabine and cis-platine in vitro // *Cancer. Lett.* - 2006. - С. 95-101.

17. Higuchi Y., Kigoshi S., Shoin S. Comparative experiments with hemolytic streptococcus and its anticancer preparations (OK-431 and OK-432) for their cytolytic activity // *Jpn. J. Exp. Med.* - 1980. - С. 7-12.

18. Bhardwaj S., Angayarkanni J. Streptokinase production from *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* SK-6 in the presence of surfactants, growth factors and trace elements // *Biotech.* 2015 Apr; 5(2): 187-193.

19. Ouskova G., Spellerberg B., Prehm P. Hyaluronan release from *Streptococcus pyogenes*: export by an ABC transporter// *Glycobiology* vol. 14 no. 10, pp. 931-938, 2004.

20. Hadasova E1, Siegmund W, Walter R, Scheuch E, Franke G. Effects of streptolysin O, picibanil (OK 432) and interferon alpha 2A on cytochrome P-450-dependent monooxygenases and arylamine N-acetyltransferase in rat liver // *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 1995 May; 17(2):283-300.

21. Wu Yue Preparation of low-molecular-weight hyaluronic acid by ozone treatment // *Carbohydrate Polymers* 89 (2012) 709-712.

22. Yoshida J, Takamura S, Suzuki S. Cell growth-inhibitory action of SAGP, an antitumor glycoprotein from *Streptococcus pyogenes* (Su strain) // *Jpn J Pharmacol.* 1987 Oct;45(2): 143-7.

(57) Формула изобретения

Штамм бактерий *Streptococcus pyogenes* № В-7612, депонированный в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточный культур «ГКПМ-ОБОЛЕНСК» - продуцент комплекса биологически активных соединений, обладающих иммуностимулирующими свойствами.