



(51) МПК

*A61K 39/07* (2006.01)*A61K 38/19* (2006.01)*A61K 38/21* (2006.01)*A61K 38/20* (2006.01)*A61P 31/04* (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,  
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2008127677/14, 07.07.2008

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
07.07.2008

(45) Опубликовано: 20.12.2009 Бюл. № 35

(56) Список документов, цитированных в отчете о  
поиске: WO 2008/017826, 14.02.2008. RU 2065308  
C1, 20.08.1996. RU 2249464 C1, 10.04.2005. RU  
2262949 C1, 27.10.2005. GB 2439259,  
19.12.2007. СУПОТНИЦКИЙ М.В.  
Порообразующие белки - иммуногенные  
компоненты ветеринарных вакцин.  
Ветеринария. 1996, №4, с.19-24. PIVEN' N.N. et  
al. Immunogenicity of surface and capsular  
antigens of *Burkholderia*. Zh (см. прод.)

Адрес для переписки:

400131, г. Волгоград, ул. Голубинская, 7,  
ФГУЗ ВолгоградНИПЧИ Роспотребнадзора

(72) Автор(ы):

Жукова Светлана Ивановна (RU),  
Демьянова Ольга Борисовна (RU),  
Алексеев Владимир Валерьевич (RU),  
Авророва Ирина Владимировна (RU),  
Храпова Наталья Петровна (RU),  
Ломова Лидия Васильевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

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

(54) СПОСОБ ПОВЫШЕНИЯ ПРОТЕКТИВНОСТИ МЕЛИОИДОЗНЫХ АНТИГЕНОВ  
ЦИТОКИНАМИ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области  
медицины, в частности к микробиологии и  
иммунологии, и может быть использовано при  
разработке вакцины против мелиоидоза.  
Сущность способа заключается в том, что  
иммунизируют животных поверхностным  
мелиоидозным комплексом, состоящим из  
антигена 6 (АГ6) и антигена d, который вводят  
животным подкожно, дважды, с интервалом 10  
суток, в дозах 30 мкг по белку для мышей  
или 150 мкг для крыс. Одновременно с  
первичной иммунизацией вводят  
рекомбинантный ИФН-γ - ингарон в дозах 8  
МЕ для мышей или 120 МЕ для крыс, а при

вторичной иммунизации вводят  
рекомбинантный ИЛ-2 - ронколейкин в  
дозах 0,6 мкг для мышей или 10 мкг для крыс,  
причем цитокины вводят животным подкожно,  
ежедневно, одновременно с иммунизацией и в  
последующие 2 суток. Через 21 сутки после  
первичной иммунизации заражают животных 4-  
32 ЛД<sub>50</sub> высоковирулентного штамма 100  
возбудителя мелиоидоза, через 30 суток после  
заражения определяют показатели летальности  
животных. Использование изобретения  
позволяет повысить протективность  
мелиоидозных антигенов за счет стимуляции  
цитокинами первичного и вторичного  
иммунного ответа на эти антигены. 5 табл.

(56) (продолжение):

Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2007 Jan-Feb;(1):47-52. реферат, он лайн [Найдено в Интернет  
на [www.pubmed.com](http://www.pubmed.com) 10.04.2009], PMID: 17523429 [PubMed - indexed for MEDLINE].



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,  
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

**A61K 39/07** (2006.01)**A61K 38/19** (2006.01)**A61K 38/21** (2006.01)**A61K 38/20** (2006.01)**A61P 31/04** (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21), (22) Application: **2008127677/14, 07.07.2008**(24) Effective date for property rights:  
**07.07.2008**(45) Date of publication: **20.12.2009 Bull. 35**

Mail address:

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

(72) Inventor(s):

**Zhukova Svetlana Ivanovna (RU),  
Dem'janova Ol'ga Borisovna (RU),  
Alekseev Vladimir Valer'evich (RU),  
Avrorova Irina Vladimirovna (RU),  
Khrapova Natal'ja Petrovna (RU),  
Lomova Lidija Vasil'evna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federal'noe gosudarstvennoe uchrezhdenie  
zdravookhraneniya Volgogradskij nauchno-  
issledovatel'skij protivochumnyj institut  
Rospotrebnadzora (RU)****(54) METHOD FOR INCREASE OF MELIOIDOSIS ANTIGENS PROTECTIVITY BY CYTOKINES**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention is related to the field of medicine, in particular to microbiology and immunology and may be used in development of vaccine against melioidosis. Substance of method consists in the fact that animals are immunised with surface melioidosis complex, which consists of antigen 6 (AG6) and antigen d, which is injected to animals subcutaneously, twice, with interval of 10 days, in doses of 30 mcg by protein for mice or 150 mcg for rats. Simultaneously with primary immunisation recombinant interferon- $\gamma$  - ingaron is injected in doses 8 ME for mice or 120 ME for rats, and in case of secondary immunisation, recombinant

interleukin-2 - roncoleukin in doses of 0.6 mcg for mice or 10 mcg for rats, besides cytokines are injected to animals subcutaneously, daily, simultaneously with immunisation and in the next 2 days. In 21 days after primary immunisation animals are infected with 4-32 LD<sub>50</sub> of highly virulent strain 100 of melioidosis causative agent, in 30 days after infection parametres of animal lethality are identified.

EFFECT: application of invention makes it possible to increase protectivity of melioidosis antigens due to cytokine stimulation of primary and secondary immune response to these antigens.

5 tbl, 2 ex

Изобретение относится к области медицины, в частности к микробиологии и иммунологии, и касается способа повышения протективности мелиоидозных антигенов для специфической профилактики мелиоидозной инфекции.

5 Мелиоидоз - особо опасное инфекционное заболевание, эндемичное для стран Юго-Восточной Азии. В связи с ростом туризма и постоянно развивающимися экономическими и культурными связями России с данным регионом мира возрастает опасность завоза мелиоидоза в нашу страну, что диктует необходимость разработки соответствующих мер и средств защиты.

10 Наиболее адекватным способом защиты от инфекций является, как известно, вакцинопрофилактика, которая в отношении мелиоидозной инфекции пока не разработана. Основные трудности на пути создания мелиоидозной вакцины связаны с низкой протективностью мелиоидозных антигенов, поэтому особую актуальность приобретает поиск эффективных иммуностимулирующих препаратов, а также  
15 разработка новых современных подходов к проблеме иммунорегуляции при мелиоидозе. Одним из таких подходов является направленная стимуляция определенных звеньев иммунной системы препаратами цитокинов.

В доступной литературе мы не обнаружили сведений о возможности использования  
20 цитокинов для стимуляции поствакцинального иммунитета, хотя имеются отдельные публикации о применении цитокиновых препаратов с целью повышения иммунореактивности организма при экспериментальных инфекциях. В ряде зарубежных работ показана важная роль провоспалительных цитокинов (ТНФ- $\alpha$ , ИЛ-1, ИЛ-6) при экспериментальной мелиоидозной инфекции, а также цитокинов,  
25 продуцируемых Th-1 лимфоцитами (ИЛ-2, ИНФ- $\gamma$ ), отвечающими за развитие клеточного типа иммунного ответа [1, 2, 3]. По данным Cheng e.a. [4], применение для лечения наряду с антибиотиками препаратов гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF) существенно снижало смертность людей,  
30 больных мелиоидозом, хотя в экспериментах на мышах использование G-CSF не оказывало заметного влияния на результаты антибиотикотерапии острого мелиоидоза [5]. В литературе нам не встретилось сообщений о применении цитокиновых препаратов для повышения иммунного ответа при иммунизации мелиоидозными антигенами.

35 Наиболее близким аналогом предлагаемому способу повышения протективности мелиоидозных антигенов является работа Зезюлина П.Н. с соавт. [6], изучавших противoinфекционные действия ИЛ-1 $\beta$  на модели экспериментальной псевдотуберкулезной инфекции у мышей. Показано, что ИЛ-1 $\beta$  при введении мышам в  
40 первые 3 дня после инфицирования летальными дозами *Y.pseudotuberculosis* достоверно увеличивал выживаемость животных. В данной статье речь идет о повышении иммунного ответа цитокином ИЛ-1 при инфекционном процессе, мы же преследовали цель использовать цитокины для стимуляции иммунного ответа при иммунизации с целью создания протективного иммунитета. Учитывая важность  
45 формирования специфического иммунитета к мелиоидозу преимущественно клеточного типа, с нашей точки зрения, целесообразно использовать как при первичной, так и при повторной иммунизации мелиоидозными антигенами препараты цитокинов, стимулирующие преимущественно Т-систему иммунитета.

50 Целью изобретения является повышение протективности мелиоидозных антигенов препаратами цитокинов при использовании их для стимуляции первичного и вторичного иммунного ответа.

Поставленная цель достигается тем, что при первичной иммунизации совместно с

мелиоидозными антигенами применяют цитокины первой фазы иммунного ответа, а именно медиатор клеточного иммунитета - ИФН- $\gamma$ , а при вторичной иммунизации используют цитокины, регулирующие, главным образом, клеточные механизмы специфического иммунитета, в частности, ИЛ-2.

5 Для иммунизации животных применяют поверхностные мелиоидозные антигенные комплексы, в частности, смесь антигена б и антигена d по классификации Пивня Н.Н. [7] (АГб+d), в дозах - 30 мкг по белку для мышей и 150 мкг по белку - для крыс. Животных иммунизируют дважды подкожно, без адъюванта, с интервалом 10 сут.

10 Препараты рекомбинантных цитокинов вводят животным подкожно, одновременно с иммунизацией мелиоидозными антигенами и в последующие 2 сут, причем при первичной иммунизации используют ИФН- $\gamma$  (ингарон) в дозах 0,6 мкг для мышей и 10 мкг для крыс, а для вторичной иммунизации - ИЛ-2 (ронколейкин) в дозах 8 МЕ для мышей и 120 МЕ для крыс. На 21 сут после первичной иммунизации животных

15 заражают подкожно суточной агаровой культурой высоковирулентного штамма 100 возбудителя мелиоидоза. За животными наблюдают 30 сут, после чего определяют показатели летальности: процент погибших и среднюю продолжительность жизни (СПЖ), по которым судят о протективной активности изучаемых мелиоидозных

20 антигенов.

#### Пример 1

Из поверхностных антигенных мелиоидозных комплексов, изучавшихся на предмет возможного использования для конструирования вакцинного препарата, нами был

25 получен комплекс АГб+d, представляющий собой смесь двух поверхностных антигенов белковополисахаридной природы. При анализе данного комплекса в иммуноэлектрофорезе и вертикальном электрофорезе в полиакриламидном геле он разделялся на 2 компонента: один - АГб - с м.м. 500 кД, другой - АГd - с м.м. 40-55 кД.

В предварительных опытах на белых мышах АГб+d при изолированном

30 применении был слабоиммуногенным: в дозе 30-50 мкг он защищал всего 14-17% животных, зараженных 4-150 ЛД<sub>50</sub> *V.pseudomallei* 100. В последующих экспериментах на мышах были испытаны различные схемы стимуляции иммунного ответа на АГб+d цитокинами. Препараты рекомбинантных цитокинов ИЛ-1 (беталейкин) в дозе 0,4 нг, ИФН- $\alpha$  (интераль) в дозе 400 МЕ. ИФН- $\gamma$  (ингарон) в дозе 8 МЕ вводили в течение 3

35 сут для стимуляции первичного иммунного ответа (в первые сутки - совместно с АГб+d), препарат ИЛ-2 (ронколейкин) в дозе 0,6 мкг применяли для стимуляции вторичного иммунного ответа на 10 сут после первичной иммунизации также в течение 3 сут (в первые сутки - совместно с АГб+d). Иммунизированных животных заражали на 21 сут

40 после первичной иммунизации *V.pseudomallei* 100 в дозах 4-150 ЛД<sub>50</sub>, после чего, спустя 30 сут, вычисляли показатели летальности, по которым делали вывод о влиянии той или иной схемы стимуляции иммунного ответа на протективность мелиоидозных антигенов. Результаты этих и других опытов обрабатывали статистически,

45 используя t - критерий Стьюдента, а также непараметричный критерий Вилкинсона [8, 9].

Результаты экспериментов приведены в табл.1, 2. Как видно из данных табл.1, включение в схему иммунизации одного цитокинового препарата существенно не

50 отражалось на протективности комплекса АГб+d, использование же двух цитокинов в разных фазах иммунного ответа (ИЛ-1 при первичной иммунизации, ИЛ-2 при вторичной) способствовало повышению выживаемости мышей от 4 ЛД<sub>50</sub> на 23% и достоверно значимому увеличению СПЖ по сравнению с контролем.

В следующем опыте для стимуляции клеточного иммунного ответа при первичной

иммунизации был применен ИФН- $\gamma$ , являющийся, по современным представлениям, одним из ключевых цитокинов клеточного иммунитета [10]. Как следует из результатов этого опыта (табл.2), ИФН- $\gamma$  был более эффективен при стимуляции первичного иммунного ответа, чем ИЛ-1, а при дополнительной стимуляции вторичного иммунного ответа ИЛ-2 протективность АГ6+d еще более возрастала: он защищал 50% мышей от 15 ЛД<sub>50</sub> высоковирулентного штамма и достоверно увеличивал СПЖ животных. Применение для стимуляции иммунитета схемы ИЛ-1+ИЛ-2 также способствовало увеличению показателей выживаемости и СПЖ, хотя и в меньшей степени, чем при использовании схемы ИФН- $\gamma$ +ИЛ-2.

Известно, что иммунитет при мелиоидозной инфекции связан, в основном, с клеточными факторами защиты [11]. В связи с этим становится понятным, что повышение протективности мелиоидозных антигенов возможно при максимальном вовлечении в процессе иммуногенеза различных субпопуляций Т-клеток. Подобное действие, по-видимому, обеспечивается в наших опытах ИФН- $\gamma$ , который на самых ранних этапах иммунной перестройки организма стимулирует неспецифические клеточные реакции, прежде всего, за счет активации макрофагов, а также усиливает иммунологические реакции с участием Т-хелперов. Дополнительная стимуляция вторичного иммунного ответа ИЛ-2, являющегося преимущественно Т-клеточным ростовым фактором, способствует формированию специфического иммунитета за счет активации процессов пролиферации и дифференцировки Т-лимфоцитов.

Таким образом, направленная стимуляция первичного и вторичного иммунного ответа на АГ6+d цитокинами ИФН- $\gamma$  и ИЛ-2, регулирующими неспецифические и специфические механизмы клеточного иммунитета, способствует существенному повышению защитных свойств мелиоидозных антигенов.

#### Пример 2

В экспериментах на мышах нами было установлено, что более эффективным для стимуляции иммунного ответа на мелиоидозный антигенный комплекс АГ6+d является комбинированное воздействие двумя цитокинами по сравнению с использованием одного из цитокиновых препаратов. Схемы двойного применения цитокинов в процессе иммуногенеза при мелиоидозе были испытаны нами на крысах как экспериментальной модели, наиболее приближенной к человеку по уровню чувствительности к возбудителю мелиоидоза.

Белых крыс массой 250-300 г иммунизировали двукратно подкожно АГ6+d в дозе 150 мкг, без адьюванта. Стимуляцию первичного иммунного ответа осуществляли ИЛ-1 в дозе 6 нг или ИФН- $\gamma$  в дозе 120 МЕ, вторичного - ИЛ-2 в дозе 10 мкг. Цитокины вводили подкожно в течение 3 сут, в первые сутки совместно с АГ6+d. На 21 сут после первичной иммунизации животных заражали 32 ЛД<sub>50</sub> *V.pseudomallei* 100. Протективность АГ6+d оценивали через 30 сут после заражения по показателям летальности. Результаты опыта суммированы в табл.3. Как видно из данных табл.3, АГ6+d при изолированном применении не защищал крыс от 17 ЛД<sub>50</sub> высоковирулентного штамма 100 возбудителя мелиоидоза. При стимуляции иммунного ответа двумя цитокинами единичные крысы выживали, а показатель СПЖ был достоверен выше, чем в контроле, особенно при использовании схемы ИФН- $\gamma$ +ИЛ-2. Следует отметить, что применение цитокинов без специфических антигенов было неэффективным в защите крыс от инфекции.

В данном опыте за 1 сут до заражения у части иммунизированных и контрольных крыс (по 5 животных в каждой группе) изучали показатели клеточного иммунитета: фагоцитарную активность перитональных макрофагов (ПМ) и уровень ГЗТ.

Фагоцитарную активность ПМ определяли хемилюминесцентным методом [12], используя в качестве тест-объекта частицы зимозана, для определения ГЗТ крысам за 24 ч до опыта вводили в подушечку правой задней лапки разрешающую дозу АГ6+d (30 мкг) в объеме 20 мкл. Уровень ГЗТ определяли по выраженности отека правой лапки по сравнению с левой, в которую вводили 20 мкл физиологического раствора [13].

Результаты определения уровня иммунореактивности крыс перед заражением представлены в табл.4, 5.

Как видно из приведенных данных, стимуляция иммунного ответа на мелиоидозные антигены ИФН-γ+ИЛ-2 в наибольшей степени способствовала повышению функциональной активности ПМ крыс, при этом уровень хемилюминесценции ПМ в 4,5 раза превышал таковой у контрольных животных (табл.4). Уровень ГЗТ также был более высоким в группе животных, получавших вместе с АГ6+d рекомбинантные цитокины ИФН-γ и ИЛ-2 (табл.5).

Таким образом, применения ИФН-γ и ИЛ-2 для стимуляции иммунного ответа позволяет в значительной степени повысить показатели клеточного иммунитета как наиболее значимые в защите от мелиоидозной инфекции.

Приведенные примеры показывают, что предлагаемый способ повышения протективности мелиоидозных антигенов позволяет существенно стимулировать иммунный ответ, что приводит к увеличению показателей выживаемости животных. Предлагаемый способ может использоваться в учреждениях, занимающихся разработкой средств специфической профилактики особо опасных инфекций.

#### ЛИТЕРАТУРА

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

2. Ulett G.C., Ketheesan N., Tlirst R.G. Proinflammatory cytokine mRNA responses in experimental Burkholderia pseudomallei infection in mice // Acta Trop. - 2000. - N 74 (2-3). - P.229-234.

3. Prognostic value of cytokine concentrations (tumor necrosis factor - alpha, interleukin-6 and interleukin-10) and clinical parameters in severe melioidosis / Simpson A.J., Smith M.D., Weverling G.J. et al // J. Infect. Dis. - 2000. - N18(2). P.621-625.

4. Cheng A.C., Stephens D.P., Anstey N.M., Currie B.Y. / Adjunctive granulocyte colony-stimulating factor for treatment of septic shock due to melioidosis // Clin.Infect. Dis. - 2004. - N 38 (1). - P.32-37.

5. Powell K., Ulett G., Hirst R., Norton R. / G-CSF - immunotherapy for treatment of acute disseminated murine melioidosis // FEMS Microbiol lett - 2003 / - № 224(2). - P.315-318.

6. Зезюлин П.Н., Минаева Е.Н., Синкевич И.Е., Симбирцев А.С. Изучение противoinфекционного защитного действия рекомбинантного интерлейкина-1 бета на модели летальной бактериальной инфекции // Мед. иммунол. - 2005. - Т.7, № 2-3, С.299.

7. Пивень Н.Н. Антигенный состав возбудителей мелиоидоза и сапа в аспектах идентификации, диагностики и патогенности // Дисс...докт.мед. наук. - Волгоград, - 1997. - 296 с.

8. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях.- Л., 1962. - 180 с.

9. Гублер Е.В., Генкин А.А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. - Л.: Медицина, 1973. - 141 с.

10. Железникова Г.Ф., Иванова В.В., Скрипченко Н.В. Уникальная защитная роль

гамма-интерферона при острых инфекциях у детей // Мед. иммунол. - 2007. - т.9. - № 2-3. - С.223.

11. Тихонов Н.Г., Рыбкин В.С., Жукова С.И., Авророва И.В. Иммунология мелиоидоза // Мелиоидоз: Сб. научн. трудов. Волгоград. н.-иссл. противочум. ин-та. - Волгоград: Нижнее Волжское книжное изд-во, 1995. - С.119-141.

12. Любимов Г.Ю., Зенков Н.К., Вольский Н.Н., Козлов В.А. Хемилюминесценция перитонеальных макрофагов при действии макрофагаактивирующего фактора // Иммунология. - 1992.- № 1. - С.40-43.

13. Попова А.Е. Методические рекомендации по определению отекогенного эффекта на белых мышах. - Волгоград. - 1980. - 18 с.

Таблица 1

Протективная активность мелиоидозных антигенов для мышей при сочетанном применении с цитокиновыми препаратами

Препараты для иммунизации	Летальность при заражении <i>B.pseudomallei</i> 100:					
	4ЛД <sub>50</sub>			40 ЛД <sub>50</sub>		
	пало/взято	% павших	СПЖ	пало/взято	% павших	СПЖ
АГ6+d	10/12	83	8,2	12/12	100	6,9
АГ6+d+ИЛ-1	10/13	77	9,8	13/13	100	7,5
АГ6+d+ИФН-α	12/14	86	8,8	12/12	100	6,3
АГ6+d+ИЛ-2	12/14	86	8,3	9/9	100	7,0
АГ6+d+ИЛ-1+ИЛ-2	8/12	67	11,4*	11/12	92	9,8
Контроль (интактные)	9/10	90	6,2	10/10	100	5,9

\* - здесь и далее - различия с контролем статически достоверны. Иммунизирующая доза АГ6+d - 30 мкг (двукратно).

Таблица 2

Влияние цитокиновых препаратов на протективность мелиоидозных антигенов для мышей

Препараты для иммунизации	Летальность при заражении <i>B.pseudomallei</i> 100:					
	15 ЛД <sub>50</sub>			150 ЛД <sub>50</sub>		
	пало/взято	% павших	СПЖ	пало/взято	% павших	СПЖ
АГ6+d	12/14	86	8,5	13/15	87	6,6
АГ6+d+ИЛ-1	10/13	77	8,9	11/13	85	6,9
АГ6+d+ИЛ-2	9/11	82	8,1	10/11	91	6,1
АГ6+d+ИФН-γ	10/15	67	10,4*	14/15	93	8,1
АГ6+d+ИЛ-1+ИЛ-2	8/14	57*	11,7*	12/15	80	10,4*
АГ6+d+ИФН-γ+ИЛ-2	5/10	50*	12,4*	8/10	80	10,5*
Контроль (интактные)	10/10	100	6,3	10/10	100	5,8

Иммунизирующая доза АГ6+d - 50 мкг (двукратно).

Таблица 3

Влияние рекомбинантных цитокинов на иммуногенность мелиоидозных антигенов для крыс

Препараты для иммунизации	Летальность при заражении 32 ЛД <sub>50</sub> <i>B.pseudomallei</i> 100:		
	пало/взято	% павших	СПЖ
АГ6+d	10/10	100	9,0
АГ6+d+ИЛ-1+ИЛ-2	9/10	90	12,3*
АГ6+d+ИФН-γ+ИЛ-2	8/10	80	14,1*
ИЛ-1+ИЛ-2	10/10	100	8,4
ИФН-γ+ИЛ-2	10/10	100	8,7
Контроль (интактные)	10/10	100	7,3

Иммунизирующая доза АГ6+d - 150 мкг (двукратно)

Таблица 4

Хемилюминесцентный ответ перитонеальных макрофагов крыс на зимозан в конце периода иммунизации мелиоидозными антигенами и цитокинами	
Препараты для иммунизации	Уровень хемилюминесценции ПМ (светосумма, mv)
АГ6+d	52,53±4,2*
АГ6+d+ИЛ-1+ИЛ-2	70,24±2,3*
АГ6+d+ИФН-γ+ИЛ-2	96,8±1,8*
ИЛ-1+ИЛ-2	40,3±2,6*
ИФН-γ+ИЛ-2	45,6±1,9*
Контроль (интактные)	21,5±0,8

10

Уровень ГЗТ у крыс, иммунизированных мелиоидозными антигенами и цитокинами, перед контрольным заражением	
Препараты для иммунизации	Индекс реакции ГЗТ (ИР, %)
АГ6+d	16,1±2,1*
АГ6+d+ИЛ-1+ИЛ-2	28,4±3,3*
АГ6+d+ИФН-γ+ИЛ-2	36,8±1,9*
Контроль (интактные)	5,85±0,8

15

### Формула изобретения

20

Способ повышения протективности мелиоидозных антигенов, отличающийся тем, что животных иммунизируют поверхностным мелиоидозным комплексом, состоящим из антигена 6 (АГ6) и антигена d, который вводят животным подкожно, дважды, с интервалом 10 суток, в дозах 30 мкг по белку для мышей или 150 мкг для крыс, одновременно с первичной иммунизацией вводят рекомбинантный ИФН-γ - ингарон в дозах 8 МЕ для мышей или 120 МЕ для крыс, а при вторичной иммунизации вводят рекомбинантный ИЛ-2 - ронколейкин в дозах 0,6 мкг для мышей или 10 мкг для крыс, причем цитокины вводят животным подкожно, ежедневно, одновременно с иммунизацией и в последующие 2 суток, через 21 суток после первичной иммунизации заражают животных 4-32 ЛД<sub>50</sub> высоковирулентного штамма 100 возбудителя мелиоидоза, через 30 суток после заражения определяют показатели летальности животных.

35

40

45

50