

УКРАЇНА



ПАТЕНТ

НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

№ 75632

ЗАСІБ З АНТИНЕЙРАМІНІДАЗНОЮ ТА
ІНТЕРФЕРОНІНДУКУЮЧОЮ ДІЄЮ ДЛЯ ПРОФІЛАКТИКИ
ТА ЛІКУВАННЯ ГРИПОЗНОЇ ІНФЕКЦІЇ

Видано відповідно до Закону України "Про охорону прав на винаходи і корисні моделі".

Зареєстровано в Державному реєстрі патентів України на корисні моделі **10.12.2012.**

Голова Державної служби
інтелектуальної власності України

— М.В. Ковіня



(19) UA

(51) МПК (2012.01)
C12P 19/04 (2006.01)
A61K 45/00

(21) Номер заявки: **u 2012 05951**

(22) Дата подання заявки: **16.05.2012**

(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: **10.12.2012**

(46) Дата публікації відомостей про видачу патенту та номер бюлетеня: **10.12.2012, Бюл. № 23**

(72) Винахідники:
Гула Надія Максимівна, UA,
Асмолкова Валентина Сергіївна, UA,
Рибалко Світлана Леонтіївна, UA,
Дядюн Світлана Терентіївна, UA,
Старосила Дарія Борисівна, UA,
Комісаренко Сергій Васильович, UA,
Чумак Анатолій Андрійович, UA,
Бердишев Андрій Геннадійович, UA

(73) Власник:
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ІМ. О.В. ПАЛЛАДІНА НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ,
 вул. Леонтовича, 9, м. Київ,
 01601, Україна, UA

(54) Назва корисної моделі:

ЗАСІБ З АНТИНЕЙРАМІНІДАЗНОЮ ТА ІНТЕРФЕРОНІНДУКУЮЧОЮ ДІЄЮ ДЛЯ ПРОФІЛАКТИКИ ТА ЛІКУВАННЯ ГРИПОЗНОЇ ІНФЕКЦІЇ

(57) Формула корисної моделі:

1. Засіб з антинейрамінідазною та інтерфероніндукуючою дією для профілактики та лікування грипозної інфекції, який характеризується тим, що містить N-стеароїлетаноламін.
2. Засіб за п. 1, який характеризується тим, що його застосовують в інтраназальній та ін'єкційній формах.
3. Засіб за п. 1, який характеризується тим, що його лікарською формою є водна суспензія N-стеароїлетаноламіну концентрації 10^{-8} М за профілактичної схеми введення та концентрації 10^{-9} М за лікувальної схеми введення.



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **75632** (13) **U**
(51) МПК (2012.01)
C12P 19/04 (2006.01)
A61K 45/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2012 05951**
(22) Дата подання заявки: **16.05.2012**
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: **10.12.2012**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **10.12.2012, Бюл.№ 23**

(72) Винахідник(и):
**Гула Надія Максимівна (UA),
Асмолкова Валентина Сергіївна (UA),
Рибалко Світлана Леонтівна (UA),
Дядюн Світлана Терентіївна (UA),
Старосила Дарія Борисівна (UA),
Комісаренко Сергій Васильович (UA),
Чумак Анатолій Андрійович (UA),
Бердишев Андрій Геннадійович (UA)**
(73) Власник(и):
**ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ІМ. О.В. ПАЛЛАДИНА
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК
УКРАЇНИ,
вул. Леонтовича, 9, м. Київ, 01601, Україна
(UA)**

(54) ЗАСІБ З АНТИНЕЙРАМІНІДАЗНОЮ ТА ІНТЕРФЕРОНІНДУКУЮЧОЮ ДІЄЮ ДЛЯ ПРОФІЛАКТИКИ ТА ЛІКУВАННЯ ГРИПОЗНОЇ ІНФЕКЦІЇ

(57) Реферат:

Засіб з антинейрамінідазною та інтерфероніндукуючою дією для профілактики та лікування грипозної інфекції належить до медицини, зокрема, до вірусології та інфекційних захворювань, і може бути використаний для профілактики та лікування грипу. Суть полягає в застосуванні N-стеароїлетаноламіну для профілактики та лікування грипозної інфекції типу H1N1 шляхом застосування його в інтраназальній та ін'єкційній формах.

UA 75632 U

Корисна модель належить до медицини, зокрема до вірусології та інфекційних захворювань, і може бути використана для профілактики та лікування грипу.

Грип є епідемічним вірусним захворюванням, причиною важких ускладнень і, навіть, смерті. Для запобігання цього захворювання та його ускладнень використовують актуальні протигрипозні вакцини та антивірусні препарати. Часто застосування протівірусних препаратів супроводжується появою побічних наслідків і є ефективним лише проти певного штаму вірусу грипу.

Так відомо застосування Римантадину, що є похідним Амантадину, для лікування та профілактики грипу. Але Римантадин активний лише проти вірусів грипу А, до того ж, він викликає серйозні побічні ефекти з боку нервової системи, до препаратів цієї групи швидко розвивається стійкість [1].

Відомо, що український препарат Амізон є протівірусним, протизапальним та жарознижувальним засобом – ненаркотичним анальгетиком з протизапальним ефектом, який знижує жар та має інтерференогенні й імунomodуючі властивості [2]. Недоліком Амізону є той факт, що препарат не впливає безпосередньо на віруси. Крім того, застосування Амізону протипоказано дітям віком до 6 років, а також особам із підвищеною чутливістю до препаратів йоду та вагітним жінкам на першому триместрі вагітності.

Відомо, що амінокапронова кислота (АКК) належить до групи інгібіторів протеолізу, які гальмують протеоліз, що впливає на зменшення можливості проникнення вірусів до клітин, наслідком чого є зниження кількості інфекційного вірусу [3]. На моделі експериментального грипу продемонстровано не тільки пряму протівірусну, але й позитивну патогенетичну та імунomodуючу дію АКК. Недоліком застосування АКК є необхідність її комплексного застосування з тим же Амізоном із відповідними побічними ефектами.

Найближчим аналогом корисної моделі, що заявляється, за досягнутим лікувальним ефектом за умов грипозної інфекції є протівірусний препарат Озельтамівір [4], який належить до групи інгібіторів нейрамінідазної активності вірусу грипу. Озельтамівір блокує нейрамінідазний поверхневий антиген вірусів А і В, захищає від інфікування клітини респіраторного епітелію і запобігає розповсюдженню вірусу в організмі.

Недоліками його застосування є значна вартість, побічні ефекти, пов'язані з підвищенням температури, та досить швидкий розвиток резистентності збудника до вказаних препаратів [4]. Крім того, Озельтамівір не рекомендовано використовувати дітям до 1 року, а можна застосовувати лише дітям у віці після 1 року і вагою не менше 15 кг.

Суть корисної моделі, що заявляється, полягає в створенні ефективного та безпечного засобу з антинейрамінідазною та інтерфероніндукуючою дією для профілактики грипу та лікування хворих, уражених грипозною інфекцією. Задачу вирішують шляхом застосування N-стеароїлетаноламіну (NSE) в оптимальних концентраціях для профілактичної та лікувальної схем введення *in vivo* на моделі грипозної пневмонії в мишей.

Технічним рішенням корисної моделі, що заявляється, є застосування NSE дозою від 10^{-7} до 10^{-9} М у інтраназальній та ін'єкційній формах для профілактики грипу та лікування хворих, уражених грипозною інфекцією (індекс ефективності в обох випадках складає від 40,0 до 100,0, в залежності від дози). NSE індукує продукцію гамма- та альфа-інтерферону, пригнічує нейрамінідазну активність вірусу грипу, не втрачає своєї протівірусної активності протягом тривалого часу в порівнянні з найближчим аналогом.

Викладене вище ілюструється прикладами.

Приклад 1. Для визначення антигрипозної активності NSE *in vivo* використовують модель грипозної пневмонії в мишей. Для цієї мети застосовують штам вірусу грипу A/FM/1/47 (H1N1), адаптований до легенів білих мишей, який пройшов 15 пасажів на мишах, інфекційний титр - 4,0 lg LD₅₀. Через 5 діб летальність мишей становить 100 %.

Визначення протигрипозної активності NSE *in vivo* проводять за профілактичною та лікувальною схемами в інтраназальній формі, для цього використовують 92 неімбредні миші (середньою вагою 50 г). Для профілактичної схеми мишам інтраназально одноразово вводять 0,2 мл водної суспензії NSE в концентраціях 10^{-6} та 10^{-8} за 24 год. до інтраназального зараження вірусом грипу, адаптованого до легеневої тканини мишей, в дозі 10 LD₅₀; для лікувальної схеми мишам інтраназально одноразово вводять 0,2 мл водної суспензії NSE концентраціями 10^{-6} , 10^{-8} та 10^{-9} М через 24 год. після зараження вірусом грипу, адаптованого до легеневої тканини мишей, дозою 10 LD₅₀. Одночасно ставлять контроль вірусу грипу для профілактичної та лікувальної схеми дослідів. Облік ефективності дії препарату здійснюють за індексом протигрипозної ефективності пригнічення летальності та інфекційного титру вірусу грипу в легеневій тканині мишей.

Оцінку активності NSE проводять шляхом порівняння ступеню летальності в дослідній і контрольній групах. При цьому враховують, що відсоток летальності тварин в контрольній групі через 5 діб становить 100 %.

Індекс протигрипозної ефективності (ІЕ) препарату визначають за формулою [5]:

$$IE = \frac{K3 - 1}{K3} \times 100\%$$

де: КЗ - кратність зменшення кількості мишей (частка від ділення кількості мишей, що загинули в дослідній групі, на кількість мишей, що загинули в контрольній групі).

Для порівняння використовують відомий і широкоживаний препарат Озельтамівір (комерційна назва "Таміфлю"). NSE захищає мишей від летальної грипозної інфекції (при профілактичній та лікувальній схемах введення) в концентраціях 10^{-8} та 10^{-9} М відповідно (табл. 4) протягом 5 діб.

Таблиця 4

Ефект профілактичної та лікувальної дії NSE на моделі експериментальної грипозної інфекції in vivo

Умови експерименту	Концентрація NSE, М	Кількість мишей			Коефіцієнт захисту (КЗ)	Індекс ефективності (ІЕ, %)	Титр (lg) вірусу грипу в легенях мишей
		Всього (n)	Із них загинуло				
				тварин	%		
Профілактична схема							
Контроль вірусу	0	12	12	100	-	-	4,0
Таміфлю	1000 мкг/мл	10	2	20,0	5,0	80	1,5
NSE	10^{-6} М	10	6	60,0	1,66	40	2,0
	10^{-8} М	10	0	0	-	100,0	<0,5
Лікувальна схема							
Контроль вірусу	0	10	10	100	-	-	4,0
Таміфлю	1000 мкг/мл	10	3	30	3,3	77,0	2,5
NSE	10^{-6} М	10	6	60,0	1,66	40,0	2,0
	10^{-8} М	10	8	80,0	1,25	20,0	4,0
	10^{-9} М	10	0	0	-	100,0	<0,5

Індекс ефективності NSE при одноразовому введенні при концентрації 10^{-9} М при лікувальній схемі введення NSE становить 100,0 %, а пригнічення репродукції вірусу грипу в легеневій тканині становить 2,0-3,5 lg. При профілактичній схемі введення водної суспензії NSE в концентрації 10^{-8} М індекс ефективності складає 100,0 %, а пригнічення репродукції вірусу грипу - 2,0-3,5 lg.

Приклад 2. Антинейрамінідазна активність NSE.

Антинейрамінідазну активність NSE визначають на прикладі інгібування нейрамінідази вірусу грипу A/FM/1/47 (H1N1) та стандартного препарату нейрамінідази, виділеного з *Astrobacter ureafaciens*, в концентрації 103,0 та 51,5 γ /мл/хв водної суспензії NSE в концентрації 10^{-5} - 10^{-10} М [6]. Відсоток інгібування розраховується за фактичною зміною оптичної густини (ОГ) розчину нейрамінідази за умов додавання NSE у відповідних досліджуваних концентраціях.

NSE дозою 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} М повністю інгібує 1/6 ензимної одиниці, або 51,5 γ /мл/хв нейрамінідази (Neuraminidase *Astrobacter ureafaciens* 1 unit Caibiochem, Hoest) та на 100 % нейтралізує активність нейрамінідази вірусу грипу A/FM/1/47 (H1N1) на субстраті фетуїні (табл. 5).

Інгібування нейрамінідазної активності NSE

Умови експерименту	Концентрація NSE, М	Інгібування нейрамінідазної активності, %			
		Вірус грипу A/FM/1/47 (H1N1)		Neuraminidase <i>Astrobacter ureafaciens</i> 1/6 ензимної одиниці, (або 51,5 μ мл/хв.)	
		ОГ/549*	% інгібування	ОГ/549*	% інгібування
Контроль вірусу	0	0,935	-	0,975	-
Контроль фетуїну	0	0,655	-	-	-
NSE	10^{-5}	0,885	0	0,930	0
	10^{-6}	0,425	50	0,525	42,0
	10^{-7}	0,0835	100	0,070	100,0
	10^{-8}	0,0775	100	0,065	100,0
	10^{-9}	0,070	100	0,072	100,0
	10^{-10}	0,660	25	0,730	21,5

* Примітка: ОГ/549 - абсорбція при довжині хвилі 549 нм.

Приклад 3. Вплив NSE на гемаглютинуючу активність (ГА) вірусу грипу.

Спочатку визначають гемаглютинуючу активність NSE [7]. Для цього до двократних розведень NSE в концентраціях 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} М додають еритроцити морських свинок в концентрації 0,75 %. При концентрації 10^{-4} М NSE має гемаглютинуючу активність (ГА) 1:40, тобто NSE здатен до аглютинації еритроцитів морської свинки.

Для вивчення впливу NSE на ГА вірусу грипу A/FM/1/47 (H1N1) проводять реакцію гальмування гемаглютинації (РГГА). Для цього готують двократні розведення NSE в діапазоні від 1:10 до 1:320. Потім додають вірус, що містить 4 аглютинуючих одиниці (АО), додають еритроцити морських свинок в концентрації 0,75 %, струшують та залишають при кімнатній температурі протягом 60 хв, після чого візуально оцінюють результати реакції [7]. При наявності антитіл у матеріалі відбувається затримка аглютинації еритроцитів. За титр гальмування приймають граничне розведення, яке дає повну затримку реакції гемаглютинації.

При взаємодії різних концентрацій препарату з чотирма гемаглютинуючими одиницями вірусу грипу візуально відмічають гальмування гемаглютинуючої активності. Тобто, NSE взаємодіє з ГА-рецепторами вірусу грипу.

Приклад 4. Інтерфероніндукуюча активність NSE in vivo

Інтерфероніндукуючу активність NSE визначають в експерименті in vivo на білих неінbredних мишах середньою масою 50 г. Водну суспензію NSE вводять по 0,2 мл внутрішньочеревно у вказаних нижче концентраціях. Через 24 години у мишей беруть кров і визначають інтерферон (ІФН) в сироватках крові за загальноприйнятою методикою пригнічення цитопатогенної дії вірусу везикулярного стоматиту в гомологічній культурі тканин - ОН-1 (лімфобластоїдні клітини миші) [8]. За активність ІФН приймають число, зворотне розведенню NSE при якому культура клітин в 50 % лунок є повністю захищеною від цитопатогенної дії індикаторного вірусу. Для визначення активності ІФН в міжнародних одиницях у дослідженнях використовують міжнародний стандарт (Interferon β мишей, активність 100 000 МО, Sigma-Aldrich).

Як маркер диференціювання за типами інтерферону використовують кислотостійкість альфа-ІФН. Визначення типу інтерферону проводять в інтерфероніндукованих розчинах, змінюючи рН від 2,0 до 7,5.

Водну суспензію NSE вводять внутрішньочеревно по 0,2 мл концентраціями 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} М. Для цього мишей розподіляють на 6 груп (в кожній групі по 10 тварин):

- 1 група - вводять NSE концентрацією 10^{-6} М.
- 2 група - вводять NSE концентрацією 10^{-7} М.
- 3 група - вводять NSE концентрацією 10^{-8} М.
- 4 група - вводять NSE концентрацією 10^{-9} М.
- 5 група - вводять еталонний індуктор ІФН Поліі:ПоліЦ (10 мг/кг).
- 6 група - вводять фізіологічний розчин.

NSE у разі внутрішньочеревного введення концентраціями 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} М індукує продукцію інтерферону (табл. 6). Через 24 години після введення NSE ІФН визначається у

високих титрах - 320-640 МО/мл. При цьому зміна рН в сироватці мишей впливає на активність ІФН, що індукується. Отже, цей ІФН відноситься до γ - та α -ІФНу.

Таблиця 6

Рівень інтерферону в сироватці крові мишей
після внутрішньочеревного введення NSE (n=3)

Речовина	Активність ІФН в МО/мл	
	pH 7,0	pH 2,0
NSE, 10^{-6} M	640	40
NSE, 10^{-7} M	320	40
NSE, 10^{-8} M	320	80
NSE, 10^{-9} M	320	160
Еталонний індуктор інтерферону Поліі:ПоліЦ, 10 мг/кг	640	640
Фізіологічний розчин	<20	<20

5 Таким чином, NSE є нетоксичним, не викликає проліферативної та мутагенної дії, та є активним індуктором переважно γ -ІФН.

Приклад 5. Вплив NSE та вірусу грипу на мітотичний режим клітин МДСК.

10 Клітини МДСК вирощують на покривних скельцях в поживному середовищі RPMI-1640+10 % фетальної сироватки теляти. Через 24 години клітини обробляють водною суспензією NSE концентрацією 10^{-6} M (контроль NSE), вірусом грипу (A/FM/1/47 H1N1, інфекційний титр в МДСК - 4,0 lg LD₅₀) - контроль вірусу; NSE + вірус грипу - дослідні клітини; та інтактні клітини - контроль клітин. Через 24 год. культивування клітин в термостаті при температурі 37 °C клітини на скельцях фіксують у розчині Шабадашу та фарбують гематоксилін-еозином за загальноприйнятою методикою [9] і проводять цитологічний аналіз.

15 Мітотичний індекс встановлюють шляхом підрахування 3000-10000 клітин і виражають в проміле (‰) - число мітозів на 1000 клітин. Одночасно визначають наявність патологічних форм мітозів, кількість яких виражають

20 NSE не впливає на зміну мітотичного режиму: мітотичний індекс реєструється на рівні показника інтактних клітин; в клітинах, оброблених NSE та заражених вірусом грипу, мітотичний індекс нижчий, ніж для інтактних клітин (але ця різниця невірогідна (t=2,200), в той самий час у разі зараження клітин вірусом грипу проліферативна активність клітин знижується вдвічі (табл. 7).

Таблиця 7

Мітотичний режим клітин МДСК, оброблених NSE та вірусом грипу (n=3)

Умови досліді	Мітотичний індекс (‰)	Аномальні мітози (‰)
Контроль клітин	24,0±0,8	18,0±1,0
NSE	22,6±0,8	16,5±0,9
Контроль вірусу	11,0±0,4	33,3±1,7
NSE + вірус	21,06±0,7	17,7±1,0

25 Кількість аномальних форм мітозів залишається на одному рівні - 16,5-18,0 % у всіх групах за винятком контролю вірусу грипу: тут кількість патологічних форм мітозу перевищує показники інших груп вдвічі й дорівнює 33,3 %, що говорить про те, що NSE захищає клітини в культурі від атипової проліферативної активності.

30 Таким чином, N-стеароїлетаноламін є ефективним вітчизняним засобом для профілактики та лікування грипу шляхом блокування поверхневих глікопротеїнів вірусу грипу, інгібування його нейрамінідазної активності та індукування гама- та альфа-інтерферону, не втрачає своєї противірусної активності протягом тривалого часу (5 діб).

Список використаних джерел

35 1. Злыдников Д.М. Опыт клинического изучения противогриппозного препарата ремантадина // Врачебное дело.-1991. - №4., - С. 15-18.

2. Декларативний патент України № 51263 А - Спосіб лікування хворих на грип. - Опубл. 15.11.2002 р. Бюл. № 11.

3. Lozitsky V.P. Anti-infectious actions of proteolysis inhibitor E-aminocaproic acid (E-ACA) // MAID, NTH, USA-2008, - Vol. 1, - Chapter 19. - P. 193-198.

4. Weekly C. // Epidemiological record-2000. - Vol. 75. - N 35. - P. 281-288.

5. Стефанов О.В. Доклінічні дослідження лікарських засобів, методичні рекомендації. // Київ, - 2001, с. 321-334.

6. Aminoff N. Methods for the quantitative estimation of N-acetyl-neuraminic acid and their application to hydrolysates of sialomucoids // Biochem. J.,-1961, V.81. - P. 384-392.

7. Горбунова А.С., Соколов М.И. Руководство по лабораторной диагностике гриппа, парагриппозных и аденовирусных заболеваний // М., Медгиз, 1960,-167 с.

10 8. Ho M, Enders J.F. An inhibitor of viral activity appearing in infected cell cultures. // Proc Natl Acad Sci USA.-1959, V.3. - P. 385-389.

9. Г.И. Роскин, Л.Б. Левинсон "Микроскопическая техника" // Сов. наук, -1957.

15 10. Блюмкин В.Н., Жданов В.М. Влияние вирусов на хромосомный аппарат и деление клеток. // Изд. Медицина, Москва, 1973, с. 7-30.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

1. Засіб з антинейрамінідазною та інтерфероніндукуючою дією для профілактики та лікування грипозної інфекції, який характеризується тим, що містить N-стеароїлетаноламін.

20 2. Засіб за п. 1, який характеризується тим, що його застосовують в інтраназальній та ін'єкційній формах.

3. Засіб за п. 1, який характеризується тим, що його лікарською формою є водна суспензія N-стеароїлетаноламіну концентрації 10^{-8} М за профілактичної схеми введення та концентрації 10^{-9} М за лікувальної схеми введення.

25

Комп'ютерна верстка М. Ломалова

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601