

УКРАЇНА



# ПАТЕНТ

НА ВИНАХІД

№ 104650

**ЗАСТОСУВАННЯ N-СТЕАРОЇЛЕТАНОЛАМНУ ЯК  
РЕЧОВИНИ З АКТИВНОЮ АНТИЕРИЦІЗНОЮ,  
АНТИВІРУСНОЮ, АНТИНЕЙРАМІНІДАЗНОЮ,  
ІНТЕРФЕРОНІНДУКУЮЧОЮ ТА  
АНТИГЕМАГЛЮТИНУЮЧОЮ ДІЄЮ ТА ЗАСІБ 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 винаходи **25.02.2014**.

Голова Державної служби  
інтелектуальної власності України

 М.В. Ковіня



(19) UA

(51) МПК

A61P 31/12 (2006.01)

A61K 31/164 (2006.01)

- (21) Номер заявки: а 2012 05950
- (22) Дата подання заявки: 16.05.2012
- (24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 25.02.2014
- (41) Дата публікації відомостей про заявку та номер бюлетеня: 25.11.2013, Бюл. № 22
- (46) Дата публікації відомостей про видачу патенту та номер бюлетеня: 25.02.2014, Бюл. № 4

(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, UA

(54) Назва винаходу:

**ЗАСТОСУВАННЯ N-СТЕАРОЇЛЕТАНОЛАМІНУ ЯК РЕЧОВИНИ З АКТИВНОЮ АНТИГРИПОЗНОЮ, АНТИВІРУСНОЮ, АНТИНЕЙРАМІНІДАЗНОЮ, ІНТЕРФЕРОНІНДУКУЮЧОЮ ТА АНТИГЕМАГЛЮТИНУЮЧОЮ ДІЄЮ ТА ЗАСІБ ДЛЯ ПРОФІЛАКТИКИ ТА ЛІКУВАННЯ ГРИПОЗНОЇ ІНФЕКЦІЇ**

(57) Формула винаходу:

1. Застосування N-стеароїлетаноламіну як речовини з активною антигрипозною, антивірусною, антинейрамінідазною, інтерферон-індукуючою та антигемаглютинуючою дією.
2. Засіб для профілактики та лікування грипозної інфекції, який містить речовину з протигрипозною дією, який відрізняється тим, що містить N-стеароїлетаноламін в ефективній кількості.
3. Засіб за п. 2, який відрізняється тим, що його застосовують в інтраназальній та ін'єкційній формах.



УКРАЇНА

(19) UA (11) 104650 (13) C2

(51) МПК

A61P 31/12 (2006.01)

A61K 31/164 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

<p>(21) Номер заявки: а 2012 05950</p> <p>(22) Дата подання заявки: 16.05.2012</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 25.02.2014</p> <p>(41) Публікація відомостей про заяву: 25.11.2013, Бюл.№ 22</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.02.2014, Бюл.№ 4</p> <p>(72) Винахідник(и): Гула Надія Максимівна (UA), Асмолкова Валентина Сергіївна (UA), Рибалко Світлана Леоніївна (UA), Дядюн Світлана Терентіївна (UA), Старосила Дарія Борисівна (UA), Комісаренко Сергій Васильович (UA), Чумак Анатолій Андрійович (UA), Бердишев Андрій Геннадійович (UA)</p> <p>(73) Власник(и): ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ІМ. О.В. ПАЛЛАДИНА НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ, вул. Леонтовича, 9, м. Київ, 01601 (UA)</p>	<p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: Roe E.T., Miles T.D., Swern D. Fatty acid amides. V. Preparation of N-(2-acetoxyethyl)amides of aliphatic acids // J. Am. Chem. Soc.-1952. - V. 74, №13, pp. 3442-3443 WO 2008075978, A2; 26.06.2008 M. Dalle Carbonare, E. Del Giudice, A. Stecca, D. Colavito, M. Fabris, A. D'Arrigo, D. Bernardini, M. Dam and A. Leon A Saturated N-Acylethanolamine Other than N-Palmitoyl Ethanolamine with Anti-inflammatory Properties: a Neglected Story... // Journal of Neuroendocrinology 20 (Suppl. 1), pp. 26-34; (2008) MICHAELA EGERTOVA, GABRIEL M. SIMON, BENJAMIN F. CRAVATT and MAURICE R. ELPHICK Localization of N-Acyl Phosphatidylethanolamine Phospholipase D (NAPE-PLD) Expression in Mouse Brain: A New Perspective on N-Acylethanolamines as Neural Signaling Molecules // THE JOURNAL OF COMPARATIVE NEUROLOGY, 506; pp. 604-615; (2008) RU 2109731 C1; 27.04.1998</p>
--	---

UA 104650 C2

(54) ЗАСТОСУВАННЯ N-СТЕАРОІЛЕТАНОЛАМІНУ ЯК РЕЧОВИНИ З АКТИВНОЮ АНТИГРИПОЗНОЮ, АНТИВІРУСНОЮ, АНТИНЕЙРАМІНІДАЗНОЮ, ІНТЕРФЕРОНІНДУКУЮЧОЮ ТА АНТИГЕМАГЛЮТИНУЮЧОЮ ДІЄЮ ТА ЗАСІБ ДЛЯ ПРОФІЛАКТИКИ ТА ЛІКУВАННЯ ГРИПОЗНОЇ ІНФЕКЦІЇ

## (57) Реферат:

Застосування N-стеароїлетаноламіну як речовини з активною антигрипозною, антивірусною дією, засіб з антинейрамінідазною, інтерфероніндукуючою та антигемаглютинуючою дією для профілактики та лікування грипозної інфекції належить до медицини, зокрема до вірусології та інфекційних захворювань, і можуть бути використані для профілактики та лікування грипу.

Застосування N-стеароїлетаноламіну як речовини з активною антигрипозною, антивірусною дією показано на клітинах МДСК (культура клітин нирки собаки) (банк культур клітин лабораторії експериментальної хіміотерапії вірусних інфекцій, ДУ "Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського" НАМН України).

За показниками максимально переносимої концентрації, мінімальної активної концентрації по відношенню до вірусу грипу та хіміотерапевтичного індексу N-стеароїлетаноламін належить до речовин з активною антигрипозною дією.

Засіб з антинейрамінідазною, інтерфероніндукуючою та антигемаглютинуючою дією на основі N-стеароїлетаноламіну для профілактики та лікування грипозної інфекції типу H1N1 використовують шляхом застосування його в інтраназальній та ін'єкційній формах. Індекс

протигрипозної ефективності NSE складає 100 % у дозі 0,2 мл  $10^{-9}$  М при лікувальній схемі введення та в дозі 0,2 мл  $10^{-8}$  М при профілактичній схемі введення. N-стеароїлетаноламін є ефективним вітчизняним засобом для профілактики та лікування грипу шляхом блокування поверхневих глікопротеїнів вірусу грипу, інгібування його нейрамінідазної активності та індукування продукції гамма- та альфа-інтерферонів, захисту клітин від атипової проліферативної активності, не втрачає своєї противірусної активності протягом тривалого часу (до 5 діб).

Винахід належить до медицини, зокрема до вірусології та інфекційних захворювань, і може бути використаний 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 протигрипозним, протизапальним та жарознижувальним засобом - ненаркотичним анальгетиком з протизапальним ефектом, який знижує жар та має інтерференогенні й імуномодулюючі 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 амінокапрінова 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 імуномодулюючу дію АКК. Недоліком застосування АКК є необхідність її комплексного застосування з тим же Амізоном із відповідними побічними ефектами.

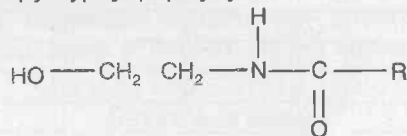
Найближчим аналогом корисної моделі, що заявляється, за досягнутим лікувальним ефектом за умов грипозної інфекції є протівірусний препарат Озельтамівір [4], який належить до групи інгібіторів нейрамінідазної активності вірусу грипу. Озельтамівір блокує нейрамінідазний поверхневий антиген вірусів А і 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 з вагою не менше 15 кг у віці після 1 року.

В основу винаходу, що заявляється, поставлена задача створити ефективний та безпечний засіб з антигрипозною, антивірусною, антинейрамінідазною та інтерфероніндукуючою дією для профілактики та лікування грипозної інфекції.

Задачу винаходу, що заявляється, вирішують шляхом застосування N-стеароїлетаноламіну (NSE) як речовини з активною антигрипозною, антивірусною, антинейрамінідазною та інтерфероніндукуючою дією для створення на основі NSE ефективного та безпечного засобу для профілактики та лікування грипозної інфекції на моделі грипозної пневмонії в мишей при застосуванні його в інтраназальній або 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 дозування). NSE індукує продукцію гамма- та альфа - інтерферону, пригнічує нейрамінідазну та гемаглютинуючу активність вірусу грипу, не втрачає своєї протівірусної активності протягом тривалого часу в порівнянні з найближчим аналогом.

N - стеароїлетаноламін має структурну формулу:



де R - вуглеводневий ланцюг стеаринової кислоти.

NSE - дрібнодисперсний кристалічний порошок білого кольору, масний на дотик, без специфічного запаху та смаку, розчинний в органічних розчинниках, не розчинні у воді, не виділяє токсичних речовин і не створює вибухонебезпечних сумішей. Температура плавлення 98 - 101 °C [5].

Викладене вище ілюструється прикладами.

Приклад 1. Протигрипозна активність NSE

На клітинах МДСК (культура клітин нирки собаки) (банк культур клітин лабораторії експериментальної хіміотерапії вірусних інфекцій, ДУ "Інститут епідеміології та інфекційних

5 хвороб ім. Л.В. Громашевського" НАМН України) визначають максимально переносиму концентрацію (МПК) NSE: в експериментах використовують десять лунок у пластикових  
 10 5 плашках із культурою клітин для кожного розведення препарату в поживному середовищі. Планшети з культурою клітин інкубують при температурі 37 °С із подачею 5 % CO<sub>2</sub> протягом 5 діб. Щоденно проводять перегляд дослідних та контрольних культур із метою виявлення наявності або відсутності цитопатичної дії (ЦПД) на клітини. Ступінь ЦПД визначають за зміною морфології клітин (закруглення та зморщення клітин, відторгнення від поверхні лунок клітин, що дегенерували) за 4-плюсовою системою від "1+" до "4+". За МПК вважають найбільшу кількість NSE, яка не викликає дегенерацію клітин. МПК NSE становить 10<sup>-5</sup> М (табл. 1).

Таблиця 1

Результати визначення МПК NSE

Концентрація препарату, М	Показники цитопатичної дії в лунках									
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0 (Інтактний контроль)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 <sup>-5</sup>	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+
10 <sup>-6</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 <sup>-7</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 <sup>-8</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 <sup>-9</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 <sup>-10</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

15 Згідно з методичними рекомендаціями, речовину або препарат вважають таким, що виявляє протівірусну активність, якщо рівень репродукції вірусу під його дією зменшується на 2,0 lg та більше [6] NSE пригнічує репродукцію вірусу грипу на 3,0 lg ID<sub>50</sub> в дозах 10<sup>-6</sup> та 10<sup>-7</sup> М/мл (табл. 2), мінімальна активна концентрація (МАК) NSE становить 10<sup>-7</sup> М (табл. 3).

Таблиця 2

МАК NSE по відношенню до вірусу грипу

Титр вірусу, lg ТЦД <sub>50</sub>	Концентрація препарату	Інгібуюча активність lg ID <sub>50</sub>
6,0	0 (Контроль вірусу)	-
6,0	10 <sup>-5</sup> М	0
3,0	10 <sup>-6</sup> М	3,0
3,0	10 <sup>-7</sup> М	3,0
6,0	10 <sup>-8</sup> М	0
6,0	10 <sup>-9</sup> М	0
6,0	10 <sup>-10</sup> М	0

20 Хіміотерапевтичний індекс (ХТІ) NSE відносно вірусу грипу визначають шляхом встановлення співвідношення МПК до мінімально активної концентрації (МАК), яка є мінімальною кількістю препарату, що пригнічує розвиток вірусоспецифічної цитопатичної дії на 50 % [6, 7]. Для визначення МАК тест - вірус у дозі 100 ТЦД<sub>50</sub> /0,1 мл вносять у культуру клітин МДСК та інкубують протягом 1 год. при температурі 37 °С. Після адсорбції вірусу на клітинах його видаляють, клітини промивають поживним середовищем RPMI-1640, після чого в підтримуюче середовище (RPMI-1640+2 % фетальної сироватки) вносять NSE в концентрації  
 25 від 10<sup>-5</sup> до 10<sup>-10</sup> М.

Таблиця 3

Результати визначення МПК, МАК та ХТІ NSE

Препарат	МПК, М	МАК, М	ХТІ
NSE	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-7</sup>	100

Згідно даних табл. 3 за показниками МПК, МАК та ХТІ NSE належить до активних антивірусних речовин.

Таким чином, згідно даних табл. 3 за показниками максимально переносимої концентрації, мінімальної активної концентрації по відношенню до вірусу грипу та хіміотерапевтичного індексу N - стеароїлетаноламін стосується активних антивірусних речовин.

Приклад 2

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 LD<sub>50</sub>. 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<sup>-6</sup> та 10<sup>-8</sup> за 24 год. До інтраназального зараження вірусом грипу, адаптованого до легеневої тканини мишей, в дозі 10 LD<sub>50</sub>; для лікувальної схеми мишам інтраназально одноразово вводять 0,2 мл водної суспензії NSE в концентраціях 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-8</sup> та 10<sup>-10</sup> М через 24 год. після зараження вірусом грипу, адаптованого до легеневої тканини мишей, в дозі 10 LD<sub>50</sub>. 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 [6]:

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

де: K3 - 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<sup>-8</sup> та 10<sup>-9</sup> 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 (K3)	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 <sup>-6</sup> М	10	6	60,0	1,66	40	2,0
	10 <sup>-8</sup> 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 <sup>-6</sup> М	10	6	60,0	1,66	40,0	2,0
	10 <sup>-8</sup> М	10	8	80,0	1,25	20,0	4,0
	10 <sup>-9</sup> М	10	0	0	-	100,0	<0,5

Індекс ефективності NSE при одноразовому введенні при концентрації 10<sup>-9</sup> М при лікувальній схемі введення NSE становить 100,0 %, а пригнічення репродукції вірусу грипу в

легеневій тканині становить 2,0 - 3,5 Іg. 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 Іg (табл. 4).

Приклад 3. Антинейрамінідазна активність NSE

5 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  $\mu$ мл/хв водної суспензії NSE в концентрації  $10^{-5}$  -  $10^{-10}$  М [7]. Відсоток інгібування розраховується за фактичною зміною оптичної густини (ОГ) розчину нейрамінідази за умов додавання NSE у відповідних досліджуваних концентраціях.

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

Таблиця 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 $\mu$ мл/хв)	
		ОГ/549*	% інгібування	ОГ/549*	% інгібування
Контроль вірусу		0,935	-	0,975	-
Контроль фетуїну		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.

15 Приклад 4. Вплив NSE на гемаглютинуючу активність (ГА) вірусу грипу

Спочатку визначають гемаглютинуючу активність NSE [8]. 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.

20 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 [8]. При наявності антитіл у матеріалі відбувається затримка аглютинації еритроцитів. За титр гальмування приймають граничне розведення, яке дає повну затримку реакції гемаглютинації.

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

30 Приклад 5. Інтерфероніндукуюча активність NSE in vivo

35 Інтерфероніндукуючу активність NSE визначають в експерименті in vivo на білих неінбредних мишах середньої 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) [9]. 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  $\beta$  мишей, активність 100 000 МО, Sigma - Aldrich).

5 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 в концентраціях  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  М. Для цього мишей розподіляють на 6 груп (в кожній групі по 10 тварин):

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

15 NSE у разі внутрішньочеревного введення в концентраціях  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  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  $\gamma$ - та  $\alpha$ -ІФНу.

Таблиця 6

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

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

20

Таким чином, NSE є нетоксичним, не викликає проліферативної та мутагенної дії, та є активним індуктором переважно  $\gamma$ -ІФН.

Приклад 6. Вплив NSE та вірусу грипу на мітотичний режим клітин МДСК.

25 Клітини МДСК вирощують на покривних скельцях в поживному середовищі RPMI-1640+10% фетальної сироватки теляти. Через 24 години клітини обробляють водною суспензією NSE в концентрації  $10^{-6}$  М (контроль NSE), вірусом грипу (A/FM/1/47 H1N1, інфекційний титр в МДСК- 4,0 Іg ID<sub>50</sub>) - контроль вірусу; NSE + вірус грипу - дослідні клітини; та інтактні клітини - контроль клітин. Через 24 год. культивування клітин в термостаті при температурі 37 °С клітини на скельцях фіксують у розчині Шабадашу та фарбують

30 гематоксилін - еозином за загальноприйнятою методикою [10] і проводять цитологічний аналіз.

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 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).

35

Таблиця 7

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

Умови досліджу	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

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 атиполої проліферативної активності.

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

Джерела інформації:

1. Злыдников Д.М. Опыт клинического изучения противогриппозного препарата ремантадина // Врачебное дело. - 1991. - № 4, - С. 15 - 18.
2. Деклараційний 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) // NIAID, NIH, USA- 2008, - Vol. 1, - Chapter 19. - P. 193 - 198.
4. Weekly C. // Epidemiological record- 2000. - Vol. 75. - N 35. - P. 281 - 288.
5. Roe E.T., Miles T.D., Swern D. Fatty acid amides. V. Preparation of N-(2-acetoxyethyl)-amides of aliphatic acids // J. Am. Chem. Soc.- 1952. - V. 74, №13.-P. 3442 - 3443.
6. Стефанов О.В. Доклінічні дослідження лікарських засобів, методичні рекомендації. // Київ, - 2001, - С. 321 - 334.
7. Aminoff N. Methods for the quantitative estimation of N - acetyl - neuraminic acid and their application to hydrolysates of sialomucoids // Biochem. J., - 1961, V.8L - P. 384 - 392.
8. Горбунова А.С., Соколов М.И. Руководство по лабораторной диагностике гриппа, парагриппозных и аденовирусных заболеваний // М., Медгиз, 1960, - 167 с.
9. 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.
10. Роскин Г.И., Левинсон Л.Б. Микроскопическая техник" // Сов. наук. - 1957.
11. Блюмкин В.Н., Жданов В.М. Влияние вирусов на хромосомный аппарат и деление клеток. // Изд. Медицина, Москва, 1973, - С. 7 - 30.

#### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Застосування N-стеароїлетаноламіну як речовини з активною антигрипозною, антивірусною, антинейрамінідазною, інтерферон-індукуючою та антигеммаглютинуючою дією.
2. Засіб для профілактики та лікування грипозної інфекції, який містить речовину з протигрипозною дією, який відрізняється тим, що містить N-стеароїлетаноламін в ефективній кількості.
3. Засіб за п. 2, який відрізняється тим, що його застосовують в інтраназальній та ін'єкційній формах.

Комп'ютерна верстка І. Мироненко

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