



УКРАЇНА

(19) UA (11) 94781 (13) C2

(51) МПК

A61K 31/731 (2006.01)

A61K 31/737 (2006.01)

A61P 31/16 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ЗАСТОСУВАННЯ ЙОТА-КАРАГЕНАНУ ДЛЯ ПРОФІЛАКТИКИ АБО ТЕРАПЕВТИЧНОГО ЛІКУВАННЯ РИНОВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ

1

2

(21) а200906939

(22) 04.12.2007

(24) 10.06.2011

(86) РСТ/ЕР2007/010512, 04.12.2007

(31) 06450176.0

(32) 05.12.2006

(33) ЕР

(31) 11/567,078

(32) 05.12.2006

(33) US

(46) 10.06.2011, Бюл.№ 11, 2011 р.

(72) ГРАССАУЕР АНДРЕАС, АТ, ПРИШЛ-
ГРАССАУЕР ЄВА, АТ, МАЙЕР КРИСТІАНЕ, АТ,
ПРЕТЧ АЛЕКСАНДЕР, АТ

(73) МАРИНОМЕД БІОТЕХНОЛОГІ ГМБХ, АТ

(56) WO 2006/003521 A1, 12.01.2006

WO 2005/004882 A1, 20.01.2005

(57) 1. Застосування йота-карагенану в антивірусній ефективній кількості як активного антивірусного інгредієнта для виготовлення фармацевтичної композиції для профілактики або терапевтичного лікування риновірусної інфекції.

2. Застосування за п. 1, де вказана риновірусна інфекція є гострою або хронічною риновірусною інфекцією.

3. Застосування за п. 1 або 2, де композиція придатна для місцевого застосування або нанесення на слизову оболонку, переважно для використання у вигляді спрею для носа, порошку, включаючи порошок для інгаляції, гелю, мазі, піни або рідкого розчину, зокрема лосьйону, розчину для полоскання рота або горла, або крапель.

4. Застосування за будь-яким з пп. 1-3, де композиція додатково містить щонайменше один фармацевтично прийнятний носій або добавку.

5. Застосування за будь-яким з пп. 1-4, де композиція придатна для місцевого застосування і містить йота-карагенан в кількості від 0,01 до 20 %, переважно від 0,1 до 10 %, найбільш переважно від 0,5 до 5 % (мас./об.) препарату.

6. Застосування за будь-яким з пп. 1-5, де композиція додатково містить щонайменше один інший карагенан, вибраний з каппа-карагенану і лямбда-карагенану.

7. Застосування за будь-яким з пп. 1-6, де композиція містить не менше 50 %, необов'язково, не менше 80 %, і переважно, не менше 95 % (мас./мас.) з розрахунку на масу йота-карагенану відносно загальної маси карагенанів, присутніх в композиції.

8. Застосування за будь-яким з пп. 1-7, де композиція додатково містить щонайменше ще один фармацевтично активний антивірусний компонент.

9. Застосування за будь-яким з пп. 1-8, де композиція нанесена на тверду поверхню предмета гігієни або санітарії, зокрема, гігієнічних або санітарних рукавичок, тканини або паперу, особливо тканини або паперу для носа.

10. Застосування за будь-яким з пп. 1-9, де композиція додатково містить щонайменше ще одну фармацевтично активну сполуку, переважно стероїд або антигістамінний препарат.

11. Застосування за будь-яким з пп. 1-10, де вказана риновірусна інфекція вражає людину, що являє собою пацієнта з високим ризиком, вибраного з групи, яка складається із хворого бронхіальною астмою, людини, страждаючої на алергію, і людини, страждаючої на запальне захворювання.

12. Твердий предмет гігієни або санітарії, покритий або просочений антивірусною композицією, згаданою в будь-якому з пп. 1-8.

13. Твердий предмет гігієни або санітарії за п. 12, де предмет вибраний з групи, що складається з рукавичок, гігієнічних тканин, гігієнічного паперу, предметів гігієни обличчя і предметів санітарії обличчя, що застосовуються в ділянці рота і/або носа, зокрема, тканини або паперу для носа і носовичків.

(13) C2

(11) 94781

(19) UA

Даний винахід належить до галузі імунології і противірусних засобів, а саме до фармацевтичної композиції, що містить карагенан як активний антивірусний інгредієнт, і до її використання для попередження або терапії риновірусних інфекцій.

Пікорнавіруси - це дуже велике сімейство вірусів, що складається з дрібних вірусів, що містять рибонуклеїнову кислоту і що викликають багато які серйозні захворювання людини і тварин. Пікорнавіруси діляться на чотири основних групи: ентеровіруси, риновіруси, кардіовіруси і афтовіруси.

Риновіруси людини діляться щонайменше на 100 серотипів і є основними збудниками простуди. Через велику кількість серотипів створення вакцини ускладнене; тому противірусні засоби можуть представляти кращий спосіб лікування. Риновіруси містять капсид, який складається з чотирьох вірусних білків VP1, VP2, VP3 і VP4. Білки VP1, VP2 і VP3 організовані в 60 повторюваних протамерних ікосаедричних одиниць. Вважається, що ці білки є причиною різноманітності антигенів риновірусів.

Риновірусні інфекції викликають простуду з такими симптомами, як лихоманка, кашель і закладеність носа. Риновіруси - другі по частоті збудники пневмонії і бронхіоліту у дітей молодшого віку, а також часта причина загострення захворювання дихальних шляхів у хворих бронхіальною астмою, хронічними обструктивними захворюваннями легень або муковісцидозом. У залежності від віку риновірусна інфекція викликає від третини до половини загострень бронхіальної астми, крім того, риновірусна інфекція пов'язана з госпіталізацією з приводу астми дорослих і дітей.

Сучасні підходи до лікування включають введення специфічної по відношенню до риновірусів РНК, як розкрито в DE 19825395, що зв'язується з капсидом вірусу в області поглиблення («каньйону»), яке необхідне для зв'язування з рецептором хазяїна (наприклад, ICAM-1 - міжклітинна молекула адгезії 1) і зараження клітини.

Інший спосіб передбачає введення розчинних білків ICAM-1 або похідних

ICAM-1, як розкрито в патентах США 6326004 і 6096862 (ICAM-1 - укорочена ICAM-1), щоб нейтралізувати вірусні частинки (віриони).

Хімічні сполуки з антивірусною активністю проти риновірусів розкриті в EP 0523803.

Симптоми риновірусної інфекції викликаються надмірною або неспецифічною реакцією імунної системи. Тому звичайні форми лікування риновірусної інфекції включають введення анальгезуючих засобів, таких як аспірин або ацетамінофен/парацетамол, а локалізовані форми лікування, спрямовані на глотку (часто в формі пастилок), включають назальні протинабрякові засоби, які ослабляють запалення в порожнині носа за рахунок звуження місцевих кровоносних судин, протикашлеві засоби (які придушують кашельний рефлекс головного мозку або розріджують слиз в легенях) і антигістамінні препарати першого покоління, наприклад, бромфенірамін, хлорфенірамін і клемастин (які ослабляють секрецію слизових залоз і тим самим протидіють закладеності/рідким виділенням з носа, але також можуть викликати у користувача сонливість).

Сульфатовані полісахариди, включаючи карагенани, відомі в даній галузі техніки своєю антивірусною ефективністю. У самому цікавому огляді, Gonzalez M.E. et al. (1987, *Antimicrob. Agents Chemoth.* 31, 1388-1393) повідомляють про антивірусну ефективність різних сульфатованих полісахаридів, включаючи йота-карагенан, проти деяких вірусів тварин. Йота-карагенан продемонстрував антивірусну активність проти вірусів, що мають зовнішню оболонку - HSV-1, HSV-2, вірусу лісу Семліки (SFV), вірусу осповакцини і африканського вірусу лихоманки свиней (ASF); а також проти позбавленого такої оболонки вірусу енцефаломіокардиту (EMC). Йота-карагенан не впливав ніяким чином на покриті оболонкою вірус везикулярного стоматиту (VSV) і вірус кору, а також на позбавлені оболонки вірус поліомієліту типу 1 і аденовірус типу 5.

У патенті США 2003/181415 А розкрита антивірусна активність сульфатованих полісахаридів, таких як сульфат целюлози, проти різних вірусів, що мають оболонку, зокрема, проти вірусу простого герпеса (HSV), вірусу папіломи і ВІЛ.

У WO 2005/004882 А розкрита терапія вірусних інфекцій, виключаючи риновірусну інфекцію, сульфатованими полісахаридами, такими як карагени.

У патенті США 2005/171053 А1 розкрито застосування лямбда-карагенану для придушення поширення інфекції, що передається статевим шляхом, включаючи ВІЛ-1-інфекцію.

Yamada et al. (1997, *Carbohydrate Polymers*, Appl. Scien. Publishers 32, 51-55) розкрили активність проти ВІЛ-1 активність лямбда-, каппа- і йота-карагенану, а також їх сульфатованих похідних.

S.F.Tischer et al. (2006, *Carbohydrate Polymers*, Appl. Scien. Publishers 63, 459-465) розкрили активність карагенану, виділеного від *Meristiella gelidium*, проти вірусів лихоманки денге і простого герпесу.

Carlucci et al. (2004, *Antiviral Research*, Elsevier Science BV. 64, 137-141) розкрили захисний вплив лямбда-карагенану при генітальній інфекції, викликаний вірусом простого герпесу у мишей.

Pujol et al. (2006, *Planta Medica* 72, 121-125) розкрили антивірусну активність карагенану, виділеного від *Gigartina skottsbergii*, проти інтраперитонеальної інфекції, викликаної вірусом простого герпесу у мишей.

Термін «карагенан» часто використовується як збірний для тих, що витягуються з морських водоростей (rhodophyceae) лінійних сульфатованих полісахаридів, побудованих із залишків галактози. Карагенан використовується, головним чином, як загусник, желатинуючий засіб, стабілізатор або емульгатор в фармацевтичних і продовольчих продуктах. Існує більше 10 різних карагенанів в залежності від роду морської водорості, з якого їх витягують. Три основних типи - йота-, каппа- і лямбда-карагенан, які мало відрізняються по будові і мірі сульфатування. Йота-карагенан - це створюючий м'який гель сульфатований галактан, який переважно витягують з червоної морської водорості *Gigartina stellata* і *Chondrus crispus*. Каппа-карагенан утворює тверді, жорсткі гелі; його переважно отримують з *Carphagysus cottonii*. Лямбда-

карагенан - найбільш поширена форма, її часто використовують для загущення молочних продуктів.

Незважаючи на давно відому антивірусну активність деяких карагенанів проти вірусів, наприклад, ВІЛ або HSV, механізм антивірусної активності карагенанів все ще потребує пояснення.

У світлі вищезазначеного даний винахід стосується антивірусної композиції на основі карагенану, придатної для профілактики або терапії риновірусної інфекції (риніту).

Експерименти, що привели до даного винаходу, несподівано продемонстрували, що незважаючи на можливе резервування в даній галузі техніки, вибрані карагенани виявляють антивірусну активність проти риновірусних інфекцій (риніту), причому кращі результати дає йота-карагенан.

Перший варіант здійснення даного винаходу стосується застосування карагенану як активного антивірусного інгредієнта при виготовленні фармацевтичної композиції для профілактики або терапії риновірусної інфекції.

Термін «активний антивірусний інгредієнт», що використовується в даному документі, стосується сполуки карагенану, яка при введенні в ефективній дозі або кількості втручається прямо або непрямо або і прямо, і непрямо, в цикл риновірусної інфекції в еукаріотичній клітині, конкретніше втручається щонайменше в одну частину циклу риновірусної інфекції, вибраної з групи, що складається з проникнення вірусу в еукаріотичну клітину, реплікації вірусу в еукаріотичній клітині, збирання вірусу і вивільнення вірусу з інфікованої еукаріотичної клітини. Сюди також включений будь-який ефект по неспецифічному інгібуванню підвищення титру вірусу або неспецифічному зниженню титру вірусу в еукаріотичній системі хазяїна або системі хазяїна-савця. Крім того, цей термін стосується сполуки з профілактичною ефективністю, яка захищає щонайменше в деякій мірі або знижує імовірність захворіти вірусною інфекцією.

Таким чином, дана фармацевтична композиція може вводитися до або після початку вірусної інфекції. Термін «профілактика» або «профілактичне лікування», який використовується в даному документі, стосується введення даної фармацевтичної композиції, щоб захистити, щонайменше до деякої міри, або ослабити ризик захворювання вірусною інфекцією.

Термін «лікування» або «терапевтичне лікування», який використовується в даному документі, стосується введення даної фармацевтичної композиції людині, інфікованій вірусом, щоб полегшити патологічний вплив інфекції, включаючи зниження тяжкості і/або частоти симптомів, що з'являються, або усунення таких симптомів, виправлення можливих пошкоджень, викликаних або пов'язаних з такою вірусною інфекцією, включаючи інгібування або профілактику повторних вірусних, бактерійних, грибкових або будь-яких інших видів мікробної інфекції.

Збірний термін «карагенан», який використовується надалі, стосується суміші щонайменше двох гомо- або гетерополімерів йота-, каппа- або лямбда-карагенану, тобто суміші гомо- або гетерополімерів йота- і лямбда-карагенану, йота- і ка-

ппа-карагенану або йота-, каппа- і лямбда карагенану, якщо явно не вказано іншого або якщо інше значення не може бути виведене з суті розкриття.

Гомополімер карагенану являє собою молекулярно чисту сполуку карагенану, що складається з карагенану одного типу: йота-, каппа- або лямбда. Гетерополімер карагенану містить субодиниці щонайменше двох різних типів карагенану, переважно вибраних з групи, що складається з субодиниць йота-, каппа- і лямбда-карагенану.

Термін «суміш» карагенанів, що згадується надалі, може також стосуватися композиції, що містить як активний антивірусний інгредієнт щонайменше один вид гетерополімера карагенану, таким чином «суміш» переважно буде сумішшю різних субодиниць карагенану, як частини згаданого щонайменше одного гетерополімерного карагенану, присутнього в композиції.

Наступний варіант здійснення винаходу стосується такої антириновірусної композиції для профілактичного або терапевтичного застосування, де вказана риновірусна інфекція є гострою або хронічною риновірусною інфекцією.

Дана композиція на основі карагенану придатна для місцевого застосування з метою терапії запалення шкіри або слизової. Однак можливе і системне, наприклад, парентеральне або пероральне, введення, особливо композиції, що переважно містить низькомолекулярні фракції карагенану. У карагенана, застосовного за даним винаходом, середня молекулярна маса дорівнює приблизно 15000-5000000 Да. Низькомолекулярна фракція містить карагенан зі середньою молекулярною масою від приблизно 15000 до приблизно 50000 Да, середньомолекулярна фракція - із середньою молекулярною масою від приблизно 50000 до приблизно 500000 Да, а високомолекулярна фракція - від приблизно 500000 до приблизно 5000000 Да.

У переважному варіанті здійснення фармацевтична композиція придатна для місцевого використання або нанесення на слизові оболонки. Відповідними формами готових до вживання галенових препаратів є креми, гелі, мазі, порошки (включаючи порошки для інгаляції), аерозолі, піни або рідкі розчини, наприклад, лосьйони для шкіри, розчини для полоскання або краплі в ніс. Інші відповідні форми галенового препарату будуть очевидні для середнього фахівця в даній галузі техніки, включаючи, наприклад, назальні системи для введення препарату, розкриті в патенті США 6391452.

Крім активних антивірусних інгредієнтів, дана композиція типово містить щонайменше один фармацевтично прийнятний носій і необов'язково додаткові добавки або інгредієнти.

Відповідний носій може бути розріджувачем, наприклад, водою або фізіологічним розчином, наповнювачем або іншим носієм, придатним і застосовним для введення активних інгредієнтів. Необов'язкові добавки можуть бути вибрані з групи, що складається з SiO_2 , TiO_2 , зв'язуючого, такого як мікрокристалічна целюлоза, полівінілпіролідон, камедь трагаканта, желатин, крохмаль, лактоза, моногідрат лактози, альгінова кислота або кукурудзяний крохмаль; змашувальної або поверхнево-активної речовини, такої як стеарат

магнію або лаурилсульфат натрію; ковзної речовини, такої як колоїдний діоксид кремнію; підсолоджувача, такого як сахароза або сахарин. Додаткові добавки в препараті можуть бути, але не обмежені, буферами або засобами, регулюючими рН, наприклад, вибраними з лимонної кислоти, оцтової кислоти, фумарової кислоти, хлористоводневої кислоти, яблучної кислоти, азотної кислоти, фосфорної кислоти, пропіонової кислоти, сірчаної кислоти, винної кислоти або їх комбінації.

Можуть бути присутнім додаткові інгредієнти, включаючи лікарські засоби, відмінні від карагенану, або фармацевтично активні речовини.

Карагенан може використовуватися в формі будь-якої фармацевтично прийнятної солі, наприклад, можуть використовуватися натрієві солі карагенану. Інші фармацевтично прийнятні солі включають, серед іншого, калійні, літійові і амонієві солі карагенану.

В іншому варіанті здійснення винаходу композиція призначена для місцевого застосування і містить карагенан в кількості від 0,01 до 20%, переважно від 0,1 до 10%, найбільш переважно від 0,5 до 5 мас. % (мас/мас.) препарату.

Звичайно композиція буде являти собою апірогенний, стерильний препарат. У випадку рідкого препарату стерильність може забезпечуватися, наприклад, шляхом фільтрації через відповідний мембранний фільтр. Способи виготовлення стерильних або асептичних фармацевтичних композицій відомі в даній галузі техніки і не є частиною даного винаходу.

Фармацевтична композиція за даним винаходом також може бути нанесена у вигляді покриття на тверді поверхні предметів гігієни або санітарії, наприклад, предметів для гігієни або санітарії особи, які типово використовуються в ділянці рота або носа, такого як тканина або папір для носа і носовички. Конкретніше, фармацевтична композиція може бути нанесена, наприклад, розпилена подібно дезинфікуючим засобам на рукавички, гігієнічні тканини або папір, включаючи тканини для носа, щоб виявити вірусцидний ефект щонайменше до деякої міри, тим самим сприяючи зниженню повторного аутоінфікування людини забрудненими кінчиками пальців, а також ослабити поширення вірусу між різними людьми, які знаходяться в тісному контакті, наприклад, контакт рук, один з одним. У залежності від природи предмета санітарії або гігієни, предмет може бути покритий, зволожений або іншим способом просочений фармацевтичною композицією.

Такі оброблені карагенаном предмети також можуть включати, але не обмежуватися ватяними тампонами, протипиловими масками або лицьовими масками. Навіть помада може містити антивірусну ефективну кількість карагенану. Ці предмети гігієни або санітарії можуть використовуватися профілактично або нарівні з терапевтичним лікуванням проти вірусної інфекції і можуть допомогти в профілактиці або зниженні ризику інфекції.

Відповідно, один варіант здійснення винахіду стосується такого застосування, де антивірусна композиція нанесена на тверду поверхню продукту гігієни або санітарії, зокрема, гігієнічної або саніта-

рної рукавички, тканини або паперів, особливо тканини або паперу для носа, за допомогою або нанесення покриття, або просочення.

Застосовні за даним винаходом йота-, каппа- і лямбда-карагенани є в продажу, але також можуть бути одержані витяганням з морських водоростей відповідно до процедур екстракції, відомих в даній галузі техніки.

Переважаючий варіант здійснення винаходу стосується застосування щонайменше однієї речовини, вибраної з групи, що складається з гомо- і гетерополімерів йота-, каппа- і лямбда-карагенану.

У конкретному варіанті здійснення антивірусна фармацевтична композиція за даним винаходом по суті вільна від форм карагенану, відмінних від йота-, каппа- і лямбда-карагенану, хоча слідові кількості таких інших карагенанів можуть бути присутніми. Для різних застосувань йота-карагенан може бути по суті єдиним видом карагенану, присутнього в композиції.

Інший варіант здійснення винаходу стосується застосування карагенану в одержанні антивірусної композиції, де композиція містить або тільки йота-, каппа- або лямбда-карагенан, або суміш щонайменше двох з вказаних карагенанів, в кількості 80% і більше, 90% і більше, 95% і більше або навіть 99% і більше від всіх карагенанів, присутніх в композиції. Процентні вмісти наведені в процентах по масі (мас/мас. %) відносно сухої маси згаданих карагенанів.

Інший варіант здійснення винаходу стосується такого застосування, де композиція містить не менше 50%, не менше 70%, не менше 80% і переважно не менше 95% (мас/мас.) з розрахунку на суху масу йота-карагенану по відношенню до загальної сухої маси всіх карагенанів, присутніх в композиції.

Вищезазначені значення концентрації карагенану аналогічним чином застосовні до гомо- і гетерополімерних карагенанів.

Виявлено, що карагенан нетоксичний після перорального або підшкірного введення, або після інгаляції навіть в надзвичайно великих дозах, тому Food and Drug Administration (FDA) віднесла його до категорії речовин «загалом визнаних безпечними».

Інший варіант здійснення винаходу стосується застосування карагенанів у виготовленні антивірусної композиції, яка містить щонайменше одну додаткову фармацевтично активну речовину, антивірусну сполуку, переважно сульфат целюлози.

Інший варіант здійснення даного винаходу стосується застосування карагенану, переважно йота-карагенану, у виготовленні фармацевтичної композиції для профілактики або терапевтичного лікування фізичного стану, вибраного з групи, що складається з мікробної інфекції, запального захворювання, алергії і пошкодженої або пригніченої імунної системи, де карагенан присутній в комбінації щонайменше з однією іншою фармацевтичною активною сполукою або лікарським засобом. У такій композиції карагенан може виявляти ад'ювантну антириновірусну функцію. Згадана щонайменше одна інша фармацевтично активна сполука або лікарський засіб можуть бути вибрані з групи, що складається з стероїду, наприклад, кортизону, і антигістамінного засобу.

Інший варіант здійснення стосується антивірусного фармацевтичного препарату для лікування або профілактики у людини, яка особливо сприйнятлива до риновірусної інфекції або має підвищений ризик її розвитку, і який вибраний з групи, що складається з хворого бронхіальною астмою, людини з алергією і людини, що має запальне захворювання.

Фіг. 1 показує результати визначення інгібування клітинної смерті, індукованої HRV (ХТТ).

Ордината - оптична густина (OD), виміряна при 492 нм; абсциса - різні тестові проби; 1 - неінфіковані клітини; 2 - необроблені, інфіковані клітини; 3 - інфіковані клітини, оброблені йота-карагенаном; 4 - інфіковані клітини, оброблені каппа-карагенаном; 5 - інфіковані клітини, оброблені лямбда-карагенаном; Фіг. 1А - клітини, інфіковані HRV-2; Фіг. 1В - клітини, інфіковані HRV-14.

Фіг. 2 показує визначення пікових титрів в суспензії від клітин, що інфікували HeLa з допомогою TCID₅₀.

Ордината - титр TCID₅₀; абсциса - концентрація йота-карагенану в мкг/мл; U - необроблені клітини; T (лікування) - клітини були інфіковані протягом однієї години, і через одну годину після обробки була додана вказана концентрація йота-карагенану; P (профілактика) - суспензію вірусу інкубували з вказаною концентрацією йота-карагенану протягом години перед інфекцією. Додаткова обробка ідентична T: клітини інфікували при MOI 0,01. Пікові титри HRV-2 спостерігали на 3-й день (Фіг. 2А), HRV-14 - на 4-й день (Фіг. 2В).

Фіг. 3 показує ефективність йота-карагенану в інгібуванні реплікації риновірусу в інфікованих клітинах носового епітелію людини, визначену методом TCID₅₀.

Ордината - log титру TCID₅₀; абсциса - концентрація йота-карагенану в мкг/мл; МОСК - необроблені контрольні клітини; Фіг. 3А - клітини, інфіковані HRV-1А; Фіг. 3В - клітини, інфіковані HRV-2; Фіг. 3С - клітини, інфіковані HRV-8; Фіг. 3D - клітини, інфіковані HRV-16; Фіг. 3Е - клітини, інфіковані HRV-39; Фіг. 3F - клітини, інфіковані HRV-83.

Фіг. 4 показує ефективність йота-карагенану проти риновірусу при повторному лікуванні, визна-

чену по зниженню цитопатичного ефекту. Ордината - зниження цитопатичного ефекту, %; абсциса - концентрація йота-карагенану, нг/мл; HRV2P0 - оригінальний штам риновірусу (без циклів реплікації); HRV2P10 - штам риновірусу HRV2P0 після 10 циклів реплікації в клітинах HeLa.

Наступні приклади наведені для кращого розуміння винаходу, описаного в даному документі. Приклади призначені тільки для ілюстративних цілей і не повинні розглядатися як такі, що обмежують даний винахід в будь-якому відношенні. Крім того, мається на увазі, що даний винахід повинен також включати варіації явно розкритих варіантів здійснення до міри, яка буде зрозуміла середньому фахівцеві в даній галузі техніки.

Приклад 1: Вплив різних типів карагенанів на риновіруси людини типу 2 (HRV-2) і типу 14 (HRV-14)

Субзлиті клітини HeLa інкубували з вірусною суспензією, яку перед цим інкубували протягом 5 хв. з 125 мкг/мл полімерів, як вказано в

Фігура 1. Через 48 год. життєздатність клітин визначили методом TOX2 ХТТ (Sigma).

Як показано на Фіг. 1, найбільш ефективним полімером був йота-карагенан (стовпчик 3), який був ефективний проти обох типів риновірусу, в той час як лямбда- (стовпчик 5) і каппа-карагенани (стовпчик 4) продемонстрували ефективність проти HRV-2, але не HRV-14. «Вусами» на графіку показане стандартне відхилення між шістьма незалежними ямками.

Приклад 2

Полімери, вказані в таблиці 1, досліджували за допомогою тесту на інгібування індукованої HRV-2 і HRV-14 клітинної смерті (ХТТ) при концентрації 100 мкг/мл.

Як показано в таблиці 1, йота-карагенан забезпечив захист проти обох типів риновірусу («+» вказує на щонайменше 95%-ий захист в порівнянні з неінфікованими контрольними клітинами). Каппа-карагенан і лямбда-карагенан були активні проти HRV-2, але не HRV-14. Полімери хітозану, карбоксиметилцелюлоза і карбоксиметилхітозан не продемонстрували інгібуючого ефекту взагалі.

Таблиця 1

Антивірусна активність декількох досліджених полімерів

Полімер	HRV-2	HRV-14
Йота-карагенан	+	+
Каппа-карагенан	+	-
Лямбда-карагенан	+	-
Хітозан	-	-
Карбоксиметилцелюлоза	-	-
Карбоксиметилхітозан	-	-

Приклад 3

Йота-карагенан був ефективний проти HRV-2 і HRV-14 в лікуванні і профілактиці на вірусній моделі реплікації. Статистично значуще зниження пікового титру вірусу спостерігалось при концентраціях, які дорівнювали 6,25 пг/мл і більше. Найбільш ефективним на моделі профілактики проти HRV-2 був йота-карагенан, який приводив до зни-

ження пікового титру вірусу більш ніж на 99,9%.

Приклад 4: Ефект йота-карагенану проти вибраних підтипів риновірусу людини

Субзлиті клітини HeLa на 96-ямкових планшетах інкубували з вірусною суспензією з MOI (multiplicity of infection), що дорівнювала 0,5.

Через 20 хвилин після зараження вірусною суспензією додали поживне середовище, що містить

3-кратне розведення полімеру. Через 48-72 год. життєздатність клітин визначили з допомогою

TOX2 XTT (Sigma). EC₅₀ обчислили з допомогою Excel-Fit.

Таблиця 2

Вірус	HRV-1	HRV-2	HRV-8	HRV-14	HRV-16	HRV-39
EC ₅₀	0,7 мкг/мл	21 мкг/мл	<0,5 мкг/мл	400 мкг/мл	381 мкг/мл	117 мкг/мл

Йота-карагенан був активний проти всіх досліджених риновірусів людини на клітинах, що раніше інфікували HeLa. Концентрація карагенану, необхідна, щоб інгібувати цитопатичний ефект на 50%, коливалася в широких межах: від <0,5 мкг/мл для HRV-8 до 400 мкг/мл для HRV-14. Одержаний результат вказує, що йота-карагенан інгібує реплікацію широкого спектра підтипів риновірусу в клітинах, що інфікували HeLa.

Приклад 5: Інгібування реплікації риновірусу на клітинах носового епітелію людини йота-карагенаном

Первинні клітини носового епітелію людини (Promocell) висівали в 24-ямкові планшети (2,9x10⁴ клітин на ямку) і культивували протягом 3 днів при 37°C, 5% CO₂ і 95% вологості. Клітини інфікували в момент злиття майже 60% штамми риновірусу HRV-1 A, HRV-2, HRV-8, HRV-14, HRV-16, HRV-39, HRV-83 і HRV-84. Риновіруси HRV-1 A, HRV-2, HRV-8, HRV-16, HRV-39 і HRV-83 надають літичний ефект при реплікації в клітинах носового епітелію людини. HRV-14 і HRV-84 не викликають лізису клітин, а тому не зазнавали подальшого тестування. Заздалегідь віруси інкубувалися з йота-карагенаном в концентрації 4, 40 і 400 мкг/мл, а також з МОСК як контроль. MOI дорівнював 0,34. Супернатант забирали в період з 48 до 72 год. після зараження і використали для визначення титру TCID₅₀. Як показано на Фіг. 3, обробка йота-карагенаном в концентрації 40 мкг/мл знижувала титр вірусу в супернатантах щонайменше на два порядки (>99%) в порівнянні з контрольними клітинами з імітацією обробки (на осі Y відкладений лог титру вірусу). Ці дані ясно вказують на те, що йота-карагенан інгібує реплікацію вірусу в первинних клітинах епітелію людини. Оскільки в цей час не існує тваринної моделі для дослідження риновірусу людини *in vivo*, використані в цих експериментах епітеліальні клітини носового епітелію людини являють собою найбільш важливу *in vitro* модель, доступну в цей час. «Вуси» на графіках означають стандартне відхилення між трьома дослідженими вибірками.

Приклад 6: Визначення ефективності йота-карагенану проти риновірусної інфекції після повторного лікування (перевірка на можливий розвиток стійкості вірусу)

Оригінальні віруси HRV2P0 і HRV2P10, одержані після 10 селективних циклів реплікації в клітинах HeLa досліджували на зниження цитопатичного ефекту. Клітини HeLa (8x10⁴ клітин на ямку) висівали на шестиямкові планшети. Клітини заражали відповідним поживним середовищем з додаванням полімеру карагенану до фінальної концентрації карагенану 1,6; 5,3; 17, 50, 150 і 450 мкг/мл, також що містить вірус з MOI 0,1.

Як контроль одну ямку піддали помилковому зараженню поживним середовищем з добавкою карагенану, що не містить вірусу, а ще одну ямку інфікували суспензією вірусу, що містить поживне середовище без карагенану. Після інкубації протягом 20 хв. після зараження, ямки двічі промили і до всіх ямок, крім негативного контролю (тобто чиста інфекція без інгібування) додали контрольне середовище (без вірусу, з додаванням карагенану у вибраних концентраціях). Проби брали з кожної експериментальної ямки відразу після того, як спостерігався явний цитопатичний ефект в ямці, що служила негативним контролем. У подальшому циклі селекції для зараження клітин HeLa використали супернатант з ямок, оброблених карагенаном, що містить вірус, в яких спостерігався явний цитопатичний ефект в порівнянні з незараженим контролем. Типово, в експериментальних ямках цитопатичний ефект спостерігався при двох найменших концентраціях карагенану, тобто 1,6 і 5,3 мкг/мл.

Процедуру повторили 10 разів і одержані в результаті віруси порівняли по цитопатичному ефекту з оригінальними вірусами. Короткий опис: через 48 год. після зараження додавали реагент TOX2 (Sigma) і визначали OD_{450 nm}, і вимірювали зниження цитопатичного ефекту у % в порівнянні з неінфікованим контролем.

Щоб перевірити на можливе виникнення стійкості вірусу до карагенану, вірус, використаний для першої інокуляції (вірус 2_001 на Фіг. 4), і вірус, одержаний після 10 циклів реплікації (вірус 20_001 на Фіг. 4), досліджували на зниження цитопатичного ефекту, використовуючи клітини HeLa по експериментальному протоколу, що дещо відрізнявся від описаного вище. Короткий виклад: клітини HeLa заражали відповідним вірусом при MOI 0,1 і через 20 хв. після зараження інокулянт видаляли і додавали поживне середовище, що містить полімер карагенану в кінцевій концентрації 1,6; 5,3; 17, 50, 150 і 450 мкг/мл (див. абсцису на Фіг. 4). Через 48 год. після зараження додавали реагент TOX2 (Sigma) і визначали OD_{450 nm}, і вимірювали зниження цитопатичного ефекту у % в порівнянні з неінфікованим контролем (Фіг. 4, ордината). «Вуси» на графіках означають стандартне відхилення між 6 незалежними ямками.

Як графічно представлено в Фіг. 4, в пробах, одержаних з супернатанту першого і десятого циклу інфекції, не виявлено статистично значущих відмінностей в чутливості вірусу до карагенану. Це вказує на те, що під час процедур відбору не виникло стійких мутантів. Отже, ці дані свідчать, що розвиток стійкості риновірусів під час *in vivo* терапії йота-карагенаном малоімовірний, навіть у випадку безперервного або повторного введення протягом тривалого періоду.

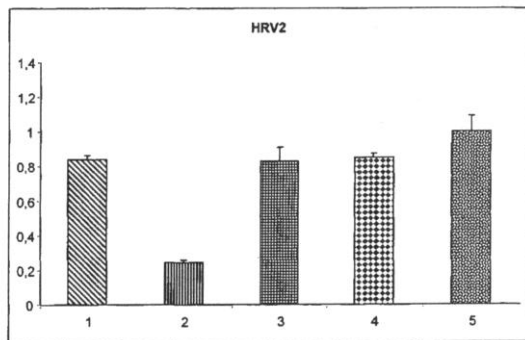


Fig. 1A

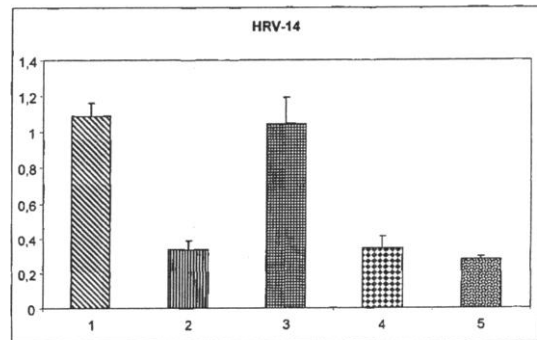


Fig. 1B

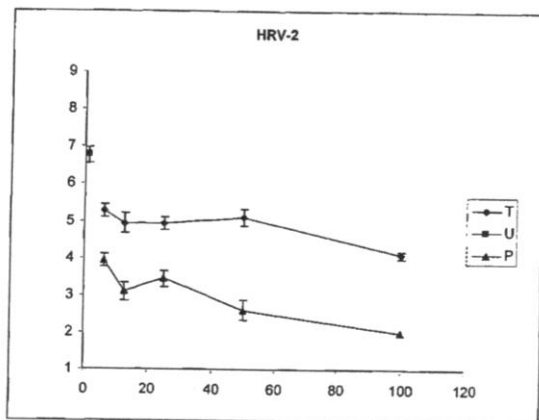


Fig. 2A

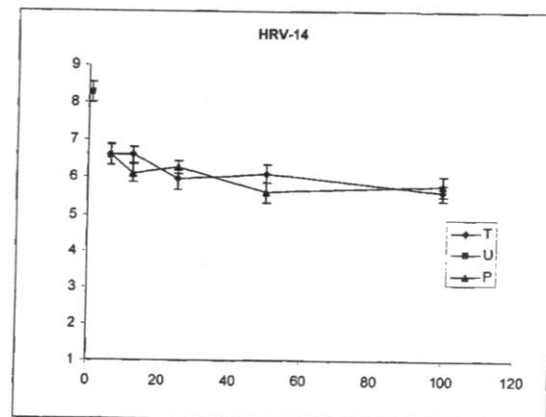


Fig. 2B

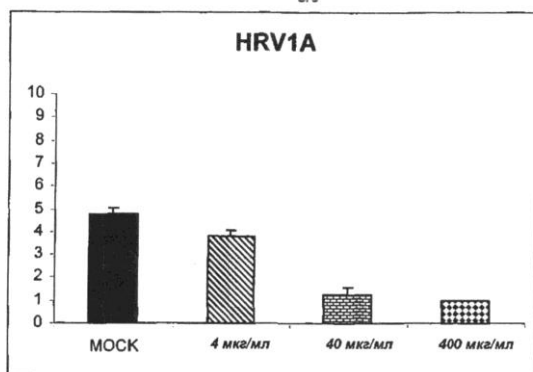


Fig. 3A

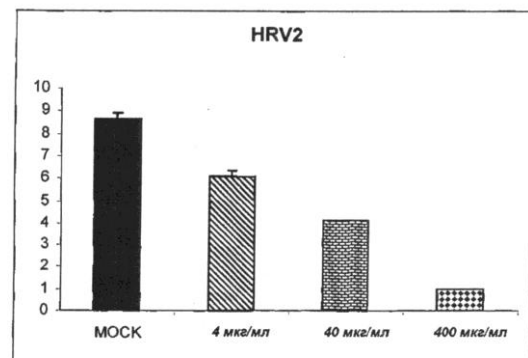
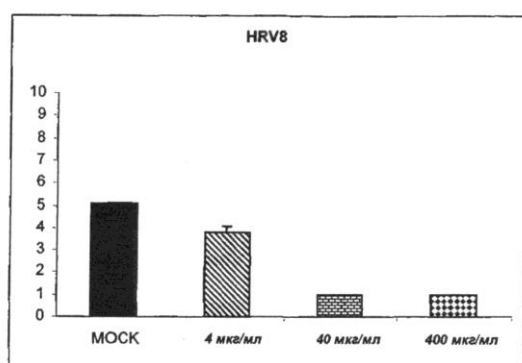


Fig. 3B

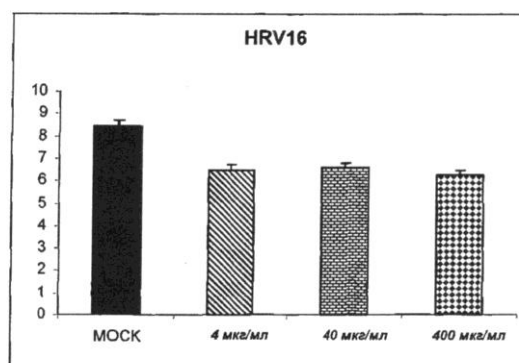
15



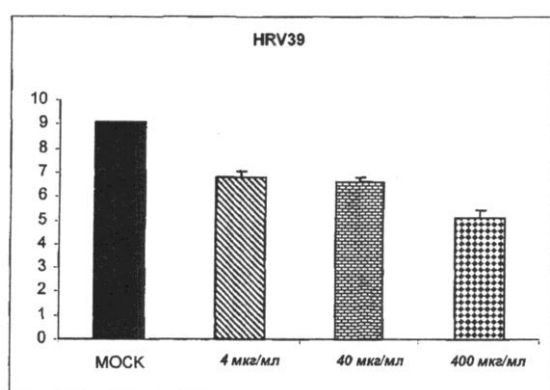
Фиг. 3С

94781

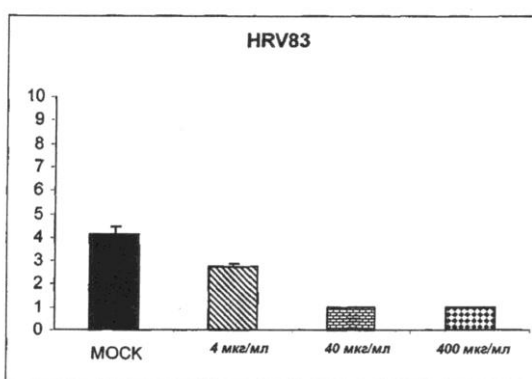
16



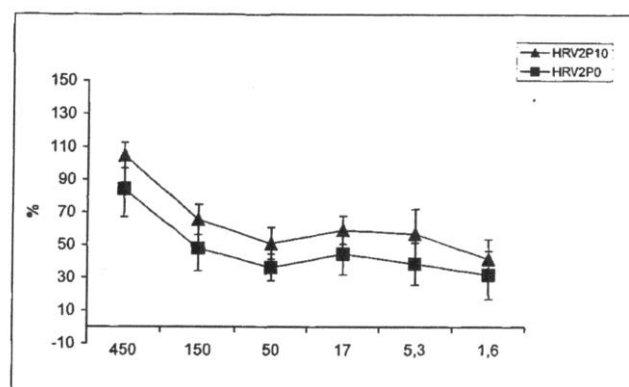
Фиг. 3D



Фиг. 3Е



Фиг. 3F



Фиг. 4