



УКРАЇНА

(19) UA (11) 31202 (13) U  
(51) МПК (2006)  
C12N 7/04МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ  
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під  
відповідальність  
власника  
патенту

## (54) СПОСІБ ВПЛИВУ НА ВІРУС СНІДУ

1

2

(21) u200714505

(22) 24.12.2007

(24) 25.03.2008

(46) 25.03.2008, Бюл.№ 6, 2008 рік

(72) КАНЕВСЬКИЙ ВАЛЕРІЙ ОЛЕКСАНДРОВИЧ,  
UA, КАПУСТИН ВОЛОДИМИР ОЛЕКСАНДРОВИЧ,  
UA, СОЛОДОВНИКОВ ВОЛОДИМИР ІЛЛІЧ, UA(73) КАНЕВСЬКИЙ ВАЛЕРІЙ ОЛЕКСАНДРОВИЧ,  
UA, КАПУСТИН ВОЛОДИМИР ОЛЕКСАНДРОВИЧ,  
UA, СОЛОДОВНИКОВ ВОЛОДИМИР ІЛЛІЧ, UA

(56)

(57) 1. Спосіб впливу на вірус СНІДу, який включає опромінення світлом вірусного матеріалу, який **відрізняється** тим, що вірусний матеріал опромінюють монохромним світлом у діапазоні 382-385 нм протягом 7-20 хвилин.

2. Спосіб впливу на вірус СНІДу за п. 1, який **відрізняється** тим, що щільність енергії монохромного світла становить 150-200 мВт/см<sup>2</sup>.

3. Спосіб впливу на вірус СНІДу за п. 1, який **відрізняється** тим, що вплив на вірусний матеріал проводять шляхом черезшкірного опромінення світлом вірусного матеріалу.

Розробка відноситься до вірусології, і може бути використана наприклад при дослідженні засобів інактивації вірусу СНІДу.

В наш час існує постійно зростаюча кількість способів впливу на вірус СНІДу, однак більшість з них здійснює незначний вплив на вірус СНІДу, невелику вибірковість впливу, яка супроводжується подібним або більш значним впливом на інші віруси та клітини. Відомі способи впливу складні, багатоетапні у застосуванні та передбачають застосування токсичних речовин.

Провідним напрямком впливу на вірус СНІДу є застосування протівірусних препаратів.

Відомий медикаментозний спосіб впливу на вірус СНІДу, шляхом застосування протівірусного препарату азидотимидина (АЗТ, він же зидовудин, ретровир) [Л.А. Кожемякин, И.Г.Бондаренко, А.А. Тяптин "СПИД: Синдром приобретенного иммунодефицита". -Л.: Знание, 1990. - 112с].

Однак виявилось, що застосування протівірусного препарату забезпечує незначний вплив на вірус СНІДу. Крім того, застосування АЗТ має значну кількість побічних явищ. Крім того препарат надзвичайно токсичний.

Більш близьким до заявлюваного можна вважати спосіб екстракорпорального фотофореза [E. Bisacca, C. Berger, A.S. Klainer "Extracorporeal Photopheresis in the Treatment of AIDS-Related Complex" - Annal of Internal Medicine. V. 111, N4, p.270-275 (1990)]. Суть цього способу полягає в тому, що у інфікованої людини відбирається невелика кількість крові, ця кров розділюється на

фракції, й лейкоцити крові екстракорпорально опромінюються ультрафіолетовим опроміненням. При цьому перед відбором крові людини в якості фотосенсибілізатора застосовують 8-метаоксиспирален.

Недоліком цього способу є його багатостадійність яка передбачає відбір крові, розділення відібраної крові на компоненти, застосування хіміопрепарату - фотосенсибілізатора. При цьому можливе травмування організму, та можливість внесення додаткових інфекцій в матеріал в процесі цих складних маніпуляцій, а також використання достатньо складної та дорогої апаратури. Передбачене способом застосування опромінення ультрафіолетовими променями невизначено - широкого діапазону супроводжується (виявленими і опублікованими багаторазовими незалежними дослідженнями) негативними впливами такого опромінення наприклад на шкірні покриви осіб, які його застосовують.

Відомий спосіб впливу на вірус СНІДу, (в тому числі вірус СНІДу hiv-1) в крові й її компонентах [див. пат Росії №2036235, МПК C12N7/04, дата публікації 1995.05.27] шляхом змішування оброблюваного розчину або суспензії с фенотиазиновим барвником в якості якого застосовують толундіновий синій або метиленовий синій в концентрації 0,1 10 мкмоль, та наступного опромінення світлом галогенної лампи, причому опромінення здійснюють безпосередньо у прозорих ємкостях, призначених для взяття та

(19) UA (11) 31202 (13) U

збереження крові, при рН середовища 5-9, протягом 5-300 хвилин, при чому оброблюваний розчин або суспензію піддають попередньому замороженню з наступним відтаюванням перед опроміненням, а після опромінення кров або її компоненти пропускають через адсорбент для видалення барвника.

Недоліком цього способу є його багатостадійність яка має більше стадій ніж у попередньому аналогу. При цьому можливе травмування організму, та можливість внесення додаткових інфекцій в процесі цих складних маніпуляцій, а також використання достатньо складної та дорогої апаратури. Передбачене способом застосування опромінення променями галогенної лампи невизначено - широкого діапазону супроводжується невизначеними впливами такого опромінення на навколишнє середовище.

Відомий спосіб впливу на вірус СНІДу, за допомогою опромінення вірусного матеріалу світлом [див. Патент Росії 2097427, МПК С12Н7/04, дата публікації 1997.11.27]. Суть способу складається в тому, що вірусний матеріал опромінюють комбінованим світлом, яке відповідає електронним переходам атомів магнію 516,7; 517,2; 518,2нм. та атомів цинку 632,2нм. протягом 30-60 хвилин.

Недоліком зазначеного способу є низька інактивація вірусу СНІДу.

Відомий спосіб впливу на вірус СНІДу, за допомогою опромінення вірусного матеріалу світлом [див. Патент Росії №2223124, МПК А61Н5/06, дата публікації 2004.02.10]. Суть способу складається в тому, що вірусний матеріал опромінюють модульованим світлом, на довжинах хвиль 516,7; 517,2; 636,2нм., з частотою модуляції 9,4-9,5Гц.

Недоліком зазначеного способу є низька інактивація вірусу СНІДу.

Відомий лазерний спосіб впливу на вірус СНІДу, за допомогою опромінення вірусного матеріалу світлом [див. Патент Росії №2142828, МПК А61Н5/06, дата публікації: 1999.12.20]. Суть способу складається в тому, що опромінення вірусного матеріалу здійснюють шляхом черешкірного впливу променем інфрачервоного лазера з довжиною хвилі 700-1000нм. на вірусний матеріал у крові в ліктьових венах и на наступні ділянки організму: область грудини, області проекції печінки и селезінки и області паравертебральних зон.

Недоліком зазначеного способу є низька інактивація вірусу СНІДу.

Завданням розробки є створення способу впливу на вірус СНІДу в якому шляхом емпіричного підбору режимів та параметрів дій способу забезпечується підвищення впливу на вірус СНІДу.

Поставлене завдання вирішується тим, що спосіб впливу на вірус СНІДу включає опромінення світлом вірусного матеріалу.

Новим в способі є те, що вірусний матеріал опромінюють монохромним світлом у діапазоні 382-385нм. протягом 7-20 хвилин.

Застосування в способі підібраних емпіричним шляхом режимів та параметрів дій способу забезпечує підвищення впливу на вірус СНІДу.

В конкретних варіантах реалізації способу застосовують щільність енергії монохромного світла в межах 150-200мВт/см<sup>2</sup>.

Застосування в способі підбраної емпіричним шляхом щільності енергії монохромного світла забезпечує суттєвий рівень впливу на вірус СНІДу без суттєвого впливу на навколишнє середовище.

В конкретних варіантах реалізації способу вплив на вірусний матеріал, проводять шляхом черешкірного опромінення світлом вірусного матеріалу.

Застосування в способі такого методу впливу суттєво спрощує операції із вірусним матеріалом, що за рахунок зменшення маніпуляцій із вірусним матеріалом, а також вилучає операції по використанню достатньо складної та дорогої апаратури. Крім того зменшення маніпуляцій із вірусним матеріалом суттєво зменшує можливість внесення додаткових інфекцій в процесі цих складних операцій що підвищує достовірність досліджень впливу на вірус СНІДу.

Спосіб ілюструється прикладами опромінення.

В Таблиці 1 наведено характеристику вірусу імунодефіциту людини, а в Таблиці 2 результати досліджень активності впливу опромінення за способом на досліджуваний вірус.

Ступінь впливу на вірус досліджено на моделі клітинних лімфобластоїдних клітинних ліній СЕМ та МТ-4, інфікованих вірусом імунодефіциту людини (ВІЛ) - штам ВІЛ-1/В RU (гостра інфекція).

Для проведення досліджень впливу опромінення на клітини вірусу імунодефіциту людини (референс-штам ВІЛ-І<sub>RF</sub>) - у вигляді культури МТ4/ВІІІ ЛБК -Т-лейкоцити людини - продуцента вірусу імунодефіциту І типу, отриманий з музею вірусів Інституту вірусології ім. Д.І. Івановського. Вірус зберігався при -70°C.

Джерелом ВІЛ було культуральне середовище клітин МТ4/ВІІІ ЛБК. Попередньо було визначено, що інфікованість цих клітин досягала практично 100%, заданими непрямої імунофлюоресценції з моноклональними антитілами до антигену р24 ВІЛ-1. Тотожність вірусу, що продукується клітинами МТ4/ВІІІ ЛБК, з ВІЛ-1 було підтверджено в реакції нейтралізації.

Вірус імунодефіциту людини культивували в суспензійній культурі МТ-4. Характеристика вірусу ВІЛ-1 наведена в таблиці 1

Характеристика вірусу імунодефіциту

Культура клітин	Експресія р24 (ОП 492)	
МТ-4	3.069	

Верифікацію наявності антигену р24 в досліджуваних зразках підтверджували за допомогою реакції нейтралізації з використанням діагностичного набору Genetic Systems™ HIV-1 Confirmatory Assay, який складався з двох компонентів: нейтралізуючого реагенту -

сироватки крові людини, яка містить антитіла до р24 ВІЛ-1 (HIV-1 Antigen Confirmatory Reagent, HP) та ненейтралізуючого реагенту - нормальної сироватки людини, яка не містить антигену ВІЛ, HBsAg вірусу гепатиту В та антитіл до ВІЛ 1/2, вірусу гепатиту С, HTLV-1 (Negative Control, НК).

Відсоток нейтралізації розраховували за формулою:

$$\% \text{нейтралізації} = \frac{\text{ОГсер. (зразок + НК)} - \text{ОГсер. (зразок + HP)}}{\text{ОГсер. (зразок + НК)} - \text{ОГсер. НК}}$$

де:

ОГсер. - оптична густина за результатами спектрофотометричного обліку результатів.

Розрахунок індекса нейтралізації ВІЛ в клітинах МТ-4

$$K^+ \text{сер} = 0,962; K^+ \text{сер} + N = 0,031; K^- \text{сер} = 0,025$$

Для клітин МТ-4

$$\text{ОГКВсер} = 1,215; \text{ОГ КВ} + N = 0,044$$

$$\% \text{нейтралізації} = \frac{1,215 - 0,044}{1,215 - 0,025} \times 100 = \frac{1,171}{1,190} \times 100 = 98,4\%$$

Дослідження впливу монохромного світла у діапазоні 382-385нм. проводили за наступною схемою: в кожен пробір культури клітин МТ-4 вносили вірус імунодефіциту людини, потім з зразки культури клітин МТ-4, інфіковані ВІЛ опромінювали у відповідному діапазоні за способом, що заявляється. Інфіковані опромінені та не опромінені клітини культивували протягом 5 діб, потім в кожній пробі визначали інфекційний титр вірусу. Режим опромінення був наступним: монохромне світло у діапазоні 382-385нм. протягом 7-20 хвилин.

Результати досліджень наведені в табл. 2. (cut off 0.191).

Таблиця 2

Анти-ВІЛ активність опромінення

№ дослідження	Показники ОГ для розведень ВІЛ при lg ID50						Інф. титр, lgID50	Інгібіція, lg ID50
	1	2	3	4	5	6		
Зразок 1	2,722	1,976	0,729	0,412	0,150	0,110	4,0	2,5
Зразок 2	2,764	1,732	0,630	0,320	0,125	0,090	4,0	2,5
Зразок 3	2,764	1,717	0,768	0,375	0,130	0,090	4,0	2,5
Комбівір	3,055	0,205	0,148				2,8	3,7
Контр. ВІЛ	3,028	2,779	1,150	0,915	0,599	0,350	6,5	

На підставі цих результатів визначено, що опромінення в зоні монохромного світла у діапазоні 382-385нм. інфікованих клітин МТ-4 призводить до достовірного зниження інфекційного титру ВІЛ на 2,5 lg ID50.