



УКРАЇНА

(19) UA (11) 87251 (13) C2
(51) МПК (2009)
A61K 35/00
A61P 31/12 (2008.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ЗАСТОСУВАННЯ ВОДНОГО ЕКСТРАКТУ ІЗ ЦИСТ АРТЕМІЇ ЯК ПРОТИВІРУСНОГО ЗАСОБУ З АНТИАДЕНОВІРУСНОЮ І АНТИГЕРПЕТИЧНОЮ АКТИВНОСТЯМИ

1

2

(21) a200809987

(22) 01.08.2008

(24) 25.06.2009

(46) 25.06.2009, Бюл. № 12, 2009 р.

(72) РУДНЕВА ІРИНА ІВАНІВНА, ШАЙДА ВАЛЕНТИН ГРИГОРОВИЧ, НОСАЧ ЛІДІЯ МИКОЛАЇВНА, ПОВНИЦЯ ОЛЬГА ЮРІЇВНА

(73) ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ПІВДЕННИХ МОРИВ ІМ. О.О. КОВАЛЕВСЬКОГО НАН УКРАЇНИ, ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ І ВІРУСОЛОГІЇ ІМ. Д. К. ЗАБОЛОТНОГО НАН УКРАЇНИ

(56) RU 2317714 C2, 27.02.08.

RU 2172630 C2, 27.08.01.

RU 2136305 C1, 10.09.99.

Руднева І.І., Ответные реакции морских животных на антропогенное загрязнение Черного моря. Автореф. докт. дис.- М.: МГУ, 2000.

Носач Л.Н., Дяченко Н.С. Цитопатология аденовирусной инфекции. К.: Наук. думка, - 1982. - 124 с.

Руднева І.І. «Артемия: перспективы использования в народное хозяйство» Киев, Наукова думка, 1991.С. 113-114.

UA 21596 A, 30.04.98.

(57) Застосування водного екстракту із цист артемії як противірусного засобу з антиаденовірусною і антигерпетичною активностями.

Передбачуваний винахід відноситься до області медицини і біотехнології і може бути використаний для отримання препаратів з антивірусною дією відносно аденовірусів людини і вірусу герпесу простого типу 1.

Герпес-віруси і аденовіруси викликають у людини широкий спектр інфекційних захворювань. Більш того, вони відомі як фактори ризику для людей з імунodefіцитним станом, що приймають імунodeпресивну терапію після пересадки органів, для ВІЛ-інфікованих. В медичну практику впроваджено декілька десятків антивірусних препаратів, в основному синтетичного походження. І якщо для герпес-вірусів є декілька препаратів з різним ступенем ефективності (ацикловір і його похідні - ганцикловір, валцикловір, фармцикловір, пенцикловір, а також цидофовір, видарабін, фоскарнет, трифлюридин, бривудин, соривудин і ін.), то для специфічного лікування аденовірусних інфекцій в світі поки що відсутній специфічний ліцензований препарат [Lenaerts L., Naesens L. Antiviral therapy for adenovirus infections//Antiviral Res.-2006.-71.-P. 172-180.]. Використання за кордоном рибавіріну і цидофовіру при генералізованій аденовірусній інфекції у осіб з імунodefіцитним станом у ряді випадків було малоефективним і частина хворих помирала. Недоліком цидофовіру є розвиток резистентності, подразлива дія при лікуванні аденовірусних захворювань очей, нефротоксичність при використанні ін'єкційної форми. Розроблений в

Україні противірусний препарат на основі 6-азацитидину [див. Пат. 21596 А UA. Противірусний засіб], який має виражену: активність відносно аденовірусів, не виробляється. Недоліком антивірусних препаратів, створених на основі хімічних сполук є розвиток резистентності при тривалому їх застосуванні, поява резистентних штамів вірусів, токсичність. Тому, незважаючи на наявність на ринку протигерпетичних препаратів, продовжується пошук нових препаратів і відносно вірусів герпесу. Останнім часом зріс інтерес до лікарських препаратів природного походження, отриманих з морських організмів, які мають широкий спектр фармакологічної активності. Деякі з них мають і антивірусну активність, у тому числі відносно вірусів герпесу і аденовірусу людини типу 5.

У основу винаходу поставлено задачу застосування високоефективного засобу природного походження з вираженим антивірусним ефектом відносно аденовірусів і вірусу герпесу.

Поставлене завдання вирішується тим, що як антивірусний засіб використовують водний екстракт із цист артемії.

Відомо, що цисти артемії містять значну кількість біологічно активних речовин (вітамінів, ростових гормонів, антиоксидантів, незамінних жирних кислот і амінокислот). В зв'язку з цим авторами було висловлено припущення, що продукти з цієї сировини можуть знайти застосування в медицині і в фармакологічній промисловості [Ру-

(13) C2

(11) 87251

(19) UA

днева И.И. «Артемия: перспективы использования в народном хозяйстве» Киев, Наукова думка, 1991.С. 113-114]. Було виявлено, що в артемії знаходиться значна кількість каротиноїдів (36-40 мкг/г ліпідів), вітаміну А, вітаміну Е (6.5 мкг/г маси), вітаміну К (7.4 мкг/г маси), встановлена висока антиоксидантна активність екстрактів цист і біомаси артемії [Руднева И.И., Ответные реакции морских животных на антропогенное загрязнение Черного моря» Автореф. докт. дисс, Москва, МГУ, 2000].

Отримання водного екстракту з цист артемії

Артемия - зяброногий рачок, що мешкає в гіперсолоних водоймищах, розташованих на півдні України і в Криму. Цисти (яйця) артемії збирали в Сакському озері і в ставках-випарниках Евпаторійського солезаводу в зимовий період. Для отримання екстракту цисти артемії ретельно промивали в проточній воді, підсушували на фільтрувальному папері, гомогенізували в скляному гомогенізаторі в охолоджену фізіологічну розчині (0.85%-ний розчин хлориду натрію) в співвідношенні 1:5 за масою. Гомогенати центрифугували протягом 10 хв. при 3000-5000 об/хв. Отриманий супернатант (надосадну рідину, екстракт) використовували для аналізу, заздалегідь визначивши концентрацію білка біуретовим методом.

Приклад 1

Антиаденовірусна дія водного екстракту із цист артемії Сакського озера.

Використовували перещеплювану лінію епітеліальних клітин людини Hela і аденовірус людини типу 2. У пробірці, що містила смужки накривних скелець вносили по 1 мл суспензії клітин (280 тис.клітин/мл) в середовищі, що складалось з 45% середовища 199, 45% середовища Ігла і 10% прогрітої сироватки великої рогатої худоби. Через 24 год. росту клітин в термостаті при 37°C середовище видалляли і клітини інфікували аденовірусом типу 2 (5 ВУО/клітину). Адсорбцію вірусу проводили при кімнатній температурі протягом 1 години, далі клітини тричі відмивали розчином Хенксу від неадсорбованого вірусу та вносили до пробірки 1 мл середовища Ігла, що містило досліджуваний препарат в різних концентраціях. Наведена схема обробки клітин препаратом дозволяє визначити дію препарату безпосередньо на репродукцію вірусу в клітині і відповідає міжнародному Протоколу. На кожну концентрацію речовини використовували 3 пробірки з інфікованими клітинами. Контролем були інфіковані клітини, які після адсорбції вірусу інкубували в середовищі Ігла без додавання препарату. Клітини інкубували при 37°C протягом 48 годин. Потім середовище з пробірок видалляли, клітини промивали розчином Хенксу і фіксували етиловим спиртом (96°) протягом 30 хв. Після цього спирт з пробірок видалляли, клітини промивали розчином Хенксу, смужки накривних скелець з клітинами укладали на предметне скло і наносили краплю 0,01% акридинового оранжевого. Через 3-5 хв. фарбування препарат накривали накривним скельцем і досліджували на наявність інфікованих клітин, використовуючи люмінесцентний мікроскоп. Інфіковані аденовірусом клітини виявляли за наявністю в ядрах клітин характерних

ДНК-вмістних вірусних включень [Носач Л.Н., Дяченко Н.С. Цитопатология аденовирусной инфекции. Киев. Наук, думка. - 1982.-124 с]. На кожному з 3-х скелець прораховували по 500 клітин і визначали відсоток клітин з вірусними включеннями. Визначали середній відсоток інфікованих клітин для кожної концентрації препарату і в контролі, а потім вираховували відсоток зменшення кількості інфікованих клітин при дії кожної концентрації препарату відносно контролю. Для визначення ЕС₅₀ препарату, тобто ефективної концентрації, в якій препарат зменшує кількість інфікованих клітин на 50%, використовували дозозалежну криву.

Екстракт з цист артемії Сакського озера в концентраціях 7 і 2 мкг білка/мл повністю блокував репродукцію аденовірусу оскільки при дослідженні клітин в люмінесцентному мікроскопі не виявляли клітин з вірусними включеннями за наявності їх в контролі (інфіковані клітини не оброблені препаратом) в 62% клітин. Інкубація інфікованих клітин в присутності препарату в концентрації 0,3 мкг білка/мл зменшувала кількість інфікованих клітин на 17%. ЕС₅₀ препарату складає 1 мкг/мл.

Приклад 2

Антиаденовірусна дія водного екстракту із цист артемії Сасик-Сивашського солезаводу.

Схема проведення досліджень така ж, як і в прикладі 1. У досліджених концентраціях 4 і 1 мкг білка/мл водний екстракт із цист артемії зменшував кількість інфікованих клітин на 74%, в концентрації 0,2 мкг/мл - на 70%. ЕС₅₀ препарату - <0,3 мкг/мл.

Приклад 3

Антигерпетична дія водного екстракту із цист артемії Сасик-Сивашського солезаводу.

Використовували перещеплювану лінію епітеліальних клітин людини Hela і вірус герпесу простого типу 1 (штам УС). До лунок 24-х лункової плашки вносили по 1 мл суспензії клітин (280 тис. клітин/мл) в ростовому середовищі (45% середовища 199, 45% середовища Ігла і 10% сироватки великої рогатої худоби). Через 24 год. росту клітин в атмосфері 5% CO₂ в термостаті при 37°C середовище видалляли, а клітини інфікували вірусом герпесу простого типу 1 (1 ВУО/клітину). Адсорбцію вірусу проводили в атмосфері 5% CO₂ при кімнатній температурі протягом 2 годин. Після адсорбції вірусу клітини відмивали від неадсорбованого вірусу промиванням розчином Хенксу та вносили до лунки по 1 мл середовища Ігла, що містило 0,5% агару Gibco, 2% ембріональної сироватки теляти і досліджуваний препарат в різних концентраціях. На кожну концентрацію препарату використовували не менше 3 лунок плашки. Контролем були інфіковані клітини, які після адсорбції вірусу інкубували в середовищі, що не містило досліджуваний препарат. Клітини інкубували в атмосфері 5% CO₂ при 37°C протягом 48 годин. Далі агарове покриття видалляли, клітини фарбували 0,1% розчином генціанового фіолетового в 20% етанолі протягом 20 хв. при кімнатній температурі. Після видалення фарбника плашку підсушували при кімнатній температурі та досліджували в світловому мікроскопі на наявність вірусних бляшок, що утворюються при репродукції вірусу. Антигерпетичну дію препарату визначали за відсо-

тком зменшення кількості бляшок при дії кожної концентрації препарату відносно контролю вірусу.

Екстракт із цист артемії Сасик-Сивашського солезаводу в концентрації 16 мкг білка/мл пригнічував репродукцію вірусу герпесу простого типу 1 на 85%, в концентрації 4 мкг/мл - на 56%, а в концентрації 0,5 мкг/мл на 26%. EC_{50} препарату складала 2,75 мкг білка/мл.

Таким чином, водний екстракт із цист артемії Сакського озера і Сасик-Сивашського солезаводу має виражену інгібуючу дію відносно репродукції аденовірусу людини типу 2 і вірусу герпесу простого типу 1 в культурі клітин.

Антивірусна активність білкового продукту з цист артемії раніше не досліджувалась. Антивірусний ефект біологічно активного препарату з цист артемії має прояв в інгібуванні репродукції аденовірусу людини типу 2 і вірусу герпесу простого типу 1 в культурі клітин. Наявність вітчизняної сировинної бази сприятиме виробництву препарату в Україні, його широкому застосуванню в нашій країні з можливим виходом на міжнародний ринок. Також застосування водного екстракту із цист артемії як протівірусного засобу сприятиме раціональному використанню ресурсів солоних озер.