



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2010133046/15, 06.08.2010

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
06.08.2010

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 06.08.2010

(43) Дата публикации заявки: 20.02.2012 Бюл. № 5

(45) Опубликовано: 27.05.2014 Бюл. № 15

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2315058 C1 20.01.2008. RU 2393873 C2 10.07.2010. WO 0143779 A2 21.06.2001. US 2007232684 04.10.2007. SANHADJI K et al. "HIV-1 infection: functional competition between gp41 and interlwkun-2" C R Biol 2010 Aug;333(8):608-12, реферат, [найдено 01.11.2011], найдено из PubMed PMID: 20688281

Адрес для переписки:

127051, Москва, а/я 158, ООО "НПФ "Материя
Медика Холдинг"

(72) Автор(ы):

Эпштейн Олег Ильич (RU),

Тарасов Сергей Александрович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Эпштейн Олег Ильич (RU)

(54) СПОСОБ И СРЕДСТВО ДЛЯ ИНГИБИРОВАНИЯ ПРОДУКЦИИ ИЛИ УСИЛЕНИЯ ЭЛИМИНАЦИИ БЕЛКА P24

(57) Реферат:

Настоящая группа изобретений относится к медицине, а именно к иммунологии и вирусологии, и касается ингибирования продукции или усиления элиминации белка P24. Для этого используют активированную-потенцированную

форму антител к CD4 рецептору. Введение этого средства в опытах «ин витро» обеспечивает значительное снижение содержания белка P24 после заражения клеток штаммом ВИЧ-ILAI. 2 н. и 4 з.п. ф-лы, 1 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 517 084** (13) **C2**

(51) Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2010133046/15, 06.08.2010**

(24) Effective date for property rights:
06.08.2010

Priority:

(22) Date of filing: **06.08.2010**

(43) Application published: **20.02.2012** Bull. № 5

(45) Date of publication: **27.05.2014** Bull. № 15

Mail address:

**127051, Moskva, a/ja 158, OOO "NPF "Materia
Medika Kholding"**

(72) Inventor(s):

Ehpshtejn Oleg Il'ich (RU),

Tarasov Sergej Aleksandrovich (RU)

(73) Proprietor(s):

Ehpshtejn Oleg Il'ich (RU)

(54) **METHOD AND MEANS FOR INHIBITING PRODUCTION OR ENHANCING PROTEIN P24
ELIMINATION**

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceuticals.

SUBSTANCE: claimed group of inventions relates to medicine, namely to immunology and virology, and deals with inhibition of production or enhancement of elimination of protein P24. For this purpose an activated-potentiated form of antibodies to CD4 receptor is

used.

EFFECT: introduction of the claimed means in experiments "in vitro" ensures considerable reduction of protein P24 content after infecting cells with strain HIV-ILAI.

6 cl, 1 ex

R U 2 5 1 7 0 8 4 C 2

R U 2 5 1 7 0 8 4 C 2

Изобретение относится к области медицины и может быть использовано для ингибирования продукции или усиления элиминации белка Р24.

Из уровня техники известен белок Р24, обнаруженный в организме человека (Papadopoulos-Eleopoulos E, Turner VF, Papadimitriou JM. Is a positive western blot proof of HIV infection? Biotechnology (N Y). 1993 Jun; 11(6):696-707).

Известно также предложение по использованию анти-CD4 молекул, конъюгированных с антихемокиновыми рецепторами, для лечения ВИЧ-1 (WO 01/43779 A2, A61K 47/48, 2001). Однако экспериментальные данные о терапевтической эффективности такого препарата в указанном источнике отсутствуют.

Изобретение направлено на создание препарата для ингибирования продукции или усиления элиминации белка Р24 на основе антител к CD4.

Решение поставленной задачи обеспечивается тем, что в способе ингибирования продукции или усиления элиминации белка Р24 согласно изобретению используют активированную потенцированную форму антител к CD4 рецептору (к антигену - CD4).

При этом активированную-потенцированную форму антител к CD4 рецептору используют в виде активированного-потенцированного водного или водно-спиртового раствора, активность которого обусловлена процессом последовательного многократного разведения матричного - исходного - раствора антител в водном или водно-спиртовом растворителе в сочетании с внешним механическим воздействием - вертикальным встряхиванием каждого разведения.

Активированную-потенцированную форму антител к CD4 рецептору могут получать путем многократного последовательного разведения матричного - исходного - раствора антител в сочетании с внешним механическим воздействием - вертикальным встряхиванием каждого разведения из матричного - исходного - раствора антител к CD4 рецептору с концентрацией 0,5÷5,0 мг/мл.

Кроме того, решение поставленной задачи обеспечивается тем, что средство для ингибирования продукции или усиления элиминации белка Р24 согласно изобретению содержит активированную потенцированную форму антител к CD4 рецептору.

При этом активированную-потенцированную форму антител к CD4 рецептору используют в виде активированного потенцированного водного или водно-спиртового раствора, активность которого обусловлена процессом последовательного многократного разведения матричного - исходного - раствора антител в водном или водно-спиртовом растворителе в сочетании с внешним механическим воздействием - вертикальным встряхиванием каждого разведения.

Причем активированную-потенцированную форму антител к CD4 рецептору могут получать путем многократного последовательного разведения в сочетании с внешним механическим воздействием - вертикальным встряхиванием каждого разведения из матричного - исходного - раствора антител к CD4 рецептору с концентрацией 0,5÷5,0 мг/мл.

Экспериментально показано, что использование активированной-потенцированной формы антител к CD4 рецептору обеспечивает эффективное ингибирование продукции или усиление элиминации белка Р24.

Заявленное средство готовят, преимущественно, следующим образом.

Для приготовления активированной-потенцированной формы заявленного средства используют моноклональные или, преимущественно, поликлональные антитела, которые могут быть получены по известным технологиям - методикам, описанным, например, в книге: Иммунологические методы./ Под ред. Г.Фримеля. М.: «Медицина», 1987, с.9-33; или, например, в статье Laffly E., Sadoyer R. Hum. Antibodies. Monoclonal and recombinant

antibodies, 30 years after. - 2005 - Vol.14. - N 1-2. P33-55.

Моноклональные антитела получают, например, с помощью гибридомной технологии. Причем начальная стадия процесса включает иммунизацию, основанную на принципах, уже разработанных при приготовлении поликлональных антисывороток.

5 Дальнейшие этапы работы предусматривают получение гибридомных клеток, продуцирующих клоны одинаковых по специфичности антител. Их выделение проводится теми же методами, что и в случае поликлональных антисывороток.

Поликлональные антитела могут быть получены активной иммунизацией животных. Для этого по специально разработанной схеме животным делают серию инъекций

10 требуемым в соответствии с изобретением веществом - антигеном или конъюгированным антигеном: CD4 рецептором. В результате проведения такой процедуры получают моноспецифическую антисыворотку с высоким содержанием антител, которую и используют для получения активированной-потенцированной формы. При необходимости проводят очистку антител, присутствующих в антисыворотке, например,

15 методом аффинной хроматографии, путем применения фракционирования солевым осаждением или ионообменной хроматографии.

Предпочтительным для приготовления заявленного средства является использование поликлональных антител к CD4, которые в качестве матричного (исходного) раствора с концентрацией 0,5÷5,0 мг/мл используют для последующего приготовления

20 активированной-потенцированной формы.

Предпочтительной для приготовления каждого компонента является использование смеси трех водно-спиртовых разведений первичного матричного раствора антител, разведенных соответственно в 100^{12} , 100^{30} и 100^{50} раз, что эквивалентно сотенным разведениям C12, C30 и C50, приготовленных по гомеопатической технологии.

25 Предпочтительным для приготовления заявленного средства является использование поликлональных антител к CD4 рецептору, которые могут быть получены иммунизацией кроликов следующим образом.

Поликлональные антитела к CD4 рецептору получают, используя в качестве иммуногена (антигена) для иммунизации кроликов адъювант и цельную молекулу или

30 один полипептидный фрагмент CD4 рецептора, выбранный, например, из следующих аминокислотных последовательностей:

412-458:

IGLGIFFCV RCRHRRRQAE RMSQIKRLLS EKKTCQCPHR FQKTCSPI

26-60:

35 MNRGVPFRHL LVLQLALLP AATQGKKVVL GKKGD

105-119:

A DSRRSLWDQG NFPL

115-139:

G NFPLIKNLK IEDSDTYICE VEDQ

40 26-458:

MNRGVPFRHL LVLQLALLP AATQGKKVVL GKKGDTVELT CTASQKKSIQ FHWKN-SNQIK ILGNQGSFLT KGPSKLNDRA DSRRSLWDQG NFPLIKNLK IEDSDTYICE VEDQKEEVQL LVFGLTANS DTHLLQGQSLT LTLESPPGSS PSVQCRSPRG KNIQGGKTLVSQLELQDSG TWTCTVLQNN KKVEFKIDIV VLAFAQASSI VYKKEGEQVE FSFPLAFTVE

45 KLTGSGELWW QAERASSSKS WITFDLKNKE VSVKRVTDQP KLQMGKKLPL HLTLPQALPQ YAGSGNLTLA LEAKTGKHLQ EVNLWMRAT QLQKNLTCEV WGPTSP-KLML SLKLENKEAK VSKREKAVWV LNPEAGMWQC LLSDSGQVLL ESNIKVLPTW STPVQPMALI VLGGVAGLLL FIGLGIFFCV RCRHRRRQAE RMSQIKRLLS EKKTCQCPHR

FQKTCSP1

Перед отбором крови за 7-9 дней проводят 1-3 внутривенные инъекции для повышения уровня антител. В процессе иммунизации у кроликов отбирают небольшие пробы крови для оценки количества антител. Максимальный уровень иммунного ответа на введение большинства антигенов достигается через 40-60 дней после первой инъекции. После окончания первого цикла иммунизации кроликов в течение 30 дней дают восстановиться здоровью и проводят реиммунизацию, включающую 1-3 внутривенные инъекции. Для получения антисыворотки из иммунизированных кроликов собирают кровь в центрифужную пробирку объемом 50 мл. С помощью деревянного шпателя удаляют со стенок пробирки образовавшиеся сгустки и помещают палочку в сгусток, образовавшийся в центре пробирки. Кровь помещают в холодильник (температура 4°C) на ночь. На следующий день удаляют сгусток, прикрепившийся к шпателю, и центрифугируют оставшуюся жидкость при 13000g в течение 10 мин. Супернатант (надосадочная жидкость) является антисывороткой. Полученная антисыворотка должна быть желтого цвета. Можно добавлять к антисыворотке 20% NaN_3 до конечной концентрации 0,02% и хранить до использования в замороженном состоянии при температуре -20°C (или без добавления NaN_3 - при температуре -70°). Выделение из антисыворотки антител к CD4 рецептору возможно следующим образом:

1) 10 мл антисыворотки кролика разбавляют в 2 раза 0,15 М NaCl добавляют 6,26 г Na_2SO_4 , перемешивают и инкубируют 12-16 ч при 4°C;

2) выпавший осадок удаляют центрифугированием, растворяют в 10 мл фосфатного буфера и затем диализуют против того же буфера в течение ночи при комнатной температуре;

3) после удаления осадка центрифугированием раствор наносят на колонку с ДЭАЭ-целлюлозой, уравновешенную фосфатным буфером;

4) фракцию антител определяют измеряя оптическую плотность элюата при 280 нм.

Очистку антител производят методом аффинной хроматографии на колонке с антигеном путем связывания антител к CD4 рецептору с антигеном (CD4 рецептором), прикрепленным к нерастворимому матриксу колонки, с последующим элюированием антител концентрированными растворами соли.

Полученный таким образом буферный раствор поликлональных антител к CD4 рецептору с концентрацией 0,5÷5,0 мг/мл, предпочтительно 2,0÷3,0 мг/мл, используют в качестве матричного (исходного) раствора для последующего приготовления активированной-потенцированной формы антител.

Активированную-потенцированную форму готовят путем равномерного уменьшения концентрации в результате последовательного разведения 1 части упомянутого матричного раствора в 9 частях (для десятичного разведения D), или в 99 частях (для сотенного разведения C), или в 999 частях (для тысячного разведения M) нейтрального растворителя с многократным вертикальным встряхиванием (потенцированием, или "динамизацией") каждого полученного разведения и использованием отдельных емкостей для каждого последующего разведения до получения требуемой потенции - кратности разведения по гомеопатическому методу (см., например, В.Швабе. "Гомеопатические лекарственные средства". М., 1967 г., с.14-29).

Внешнюю обработку в процессе уменьшения концентрации также можно осуществлять ультразвуком, электромагнитным или иным физическим воздействием.

Например, для приготовления 12-го сотенного разведения C12 одну часть упомянутого матричного раствора антител к CD4 рецептору Т-лимфоцитов с

концентрацией 2,5 мг/мл разводят в 99 частях нейтрального водного или водно-спиртового растворителя и многократно (10 и более раз) вертикально встряхивают - потенцируют полученное 1-е сотенное C1 разведение. Из 1-го сотенного C1 разведения готовят 2-е сотенное разведение C2. Данную операцию повторяют 11 раз, получая 12-е сотенное разведение C12. Таким образом, 12-е сотенное разведение C12 представляет собой раствор, полученный разбавлением последовательно в разных емкостях 12 раз 1-й части исходного матричного раствора антител к CD4 рецептору с концентрацией 2,5 мг/мл в 99-ти частях нейтрального растворителя, т.е. раствор, полученный разведением матричного раствора в 100^{12} раз. Аналогичные операции с соответствующей кратностью разведения проводят для получения разведений C30 и C50.

При использовании в качестве активированной-потенцированной формы антител к CD4 рецептору смеси различных, преимущественно сотенных, разведений каждое разведение состава смеси (например, C12, C30, C50) готовят отдельно по описанной выше технологии до разведения на 3 разведения меньше, чем конечное (соответственно, до получения C9, C27, C47), и затем вносят в соответствии с составом смеси в одну емкость по одной части каждого компонента и смешивают с требуемым количеством растворителя (соответственно, с 97 частями для сотенного разведения). Далее полученную смесь последовательно дважды разводят в соотношении 1 к 100, потенцируя полученный раствор после каждого разведения. При этом получают активированную-потенцированную форму антител к CD4 рецептору в сверхмалой дозе, полученной разведением матричного раствора в 100^{12} , 100^{30} , 100^{50} раз, эквивалентной смеси сотенных разведений C12, C30, C50.

Возможно использование каждого компонента в виде смеси других различных, разведений, например, десятичных и/или сотенных (D20, C30, C100 или C12, C30, C200 и т.д.), приготовленных по гомеопатической технологии, эффективность которых определяют экспериментально.

Пример

Для проведения экспериментальных исследований были использованы антитела, приготовленные по заказу специализированной биотехнологической фирмой.

Эффективность ингибирования продукции или усиления элиминации белка P24 определяли в мононуклеарных клетках периферической крови человека, зараженных *in vitro* штаммом ВИЧ-1-LAI.

Мононуклеары периферической крови человека были выделены из крови здоровых серонегативных доноров при помощи центрифугирования в градиенте плотности фиколла-гипака. Клетки активировали в течение 3 дней с использованием 1 мкг/мл фитогемагглютина Р и 5 МЕ/мл рекомбинантного интерлейкина-2 человека.

Для оценки эффективности ингибирования продукции или усиления элиминации белка P24 заявленное средство: активированную-потенцированную форму антител к CD4 рецептору в сверхмалой дозе, полученной разведением матричного раствора в 100^{12} , 100^{30} , 100^{50} раз, эквивалентной смеси сотенных разведений C12, C30, C50 (далее СМД АТ к CD4), вносили в лунку, содержащую 100 мкл активированных мононуклеаров периферической крови человека, за 24 часа или через 15 минут после заражения клеток штаммом ВИЧ-1-LAI в дозе 100 TCID₅₀ (50 мкл инокулята штамма ВИЧ-1-LAI). Перед внесением в лунку СМД АТ к CD4 (12,5 мкл) смешивали со средой RPMI1640 (DIFCO) до достижения конечного объема в 50 мкл.

Супернатанты культуры клеток были собраны на 7 день после заражения.

Эффективность ингибирования продукции или усиления элиминации белка P24 определяли методом ИФА (Retrotek Elisa kit).

Определено, что СМД АТ к CD4 снижает содержание белка P24 в супернатанте на $86 \pm 10\%$ при внесении в лунку за 24 часа до и на $51 \pm 3\%$ при внесении в лунку через 15 минут после заражения клеток штаммом ВИЧ-1-LAI соответственно.

Примечание: TCID₅₀ - доза, инфицирующая 50% клеток культуры ткани.

Формула изобретения

1. Способ ингибирования продукции или усиления элиминации белка P24, характеризующийся тем, что используют активированную-потенцированную форму антител к CD4.

2. Способ по п.1, характеризующийся тем, что активированную-потенцированную форму антител к CD4 используют в виде активированного-потенцированного водного или водно-спиртового раствора, активность которого обусловлена процессом последовательного многократного разведения матричного - исходного - раствора антител в водном или водно-спиртовом растворителе в сочетании с внешним механическим воздействием - вертикальным встряхиванием каждого разведения.

3. Способ по п.1 или 2, характеризующийся тем, что активированную-потенцированную форму антител к CD4 получают путем многократного последовательного разведения в сочетании с внешним механическим воздействием - вертикальным встряхиванием каждого разведения из матричного - исходного - раствора антител к CD4 рецептору с концентрацией $0,5 \div 5,0$ мг/мл.

4. Средство для ингибирования продукции или усиления элиминации белка P24, характеризующееся тем, что содержит активированную-потенцированную форму антител к CD4.

5. Средство по п.4, характеризующееся тем, что активированную-потенцированную форму антител к CD4 используют в виде активированного-потенцированного водного или водно-спиртового раствора, активность которого обусловлена процессом последовательного многократного разведения матричного - исходного - раствора антител в водном или водно-спиртовом растворителе в сочетании с внешним механическим воздействием - вертикальным встряхиванием каждого разведения.

6. Средство по п.4 или 5, характеризующееся тем, что активированную-потенцированную форму антител к CD4 получают путем многократного последовательного разведения в сочетании с внешним механическим воздействием - вертикальным встряхиванием каждого разведения из матричного - исходного - раствора антител к CD4 рецептору с концентрацией $0,5 \div 5,0$ мг/мл.