

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 interlukin-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 Р24

(57) Реферат:

Настоящая группа изобретений относится к медицине, а именно к иммунологии и вирусологии, и касается ингибирования продукции или усиления элиминации белка Р24. Для этого используют активированную-потенцированную

форму антител к CD4 рецептору. Введение этого средства в опытах «ин витро» обеспечивает значительное снижение содержания белка Р24 после заражения клеток штаммом ВИЧ-ILAI. 2 н. и 4 з.п. ф-лы, 1 пр.

RU 2 517 084 C2

RU 2 517 084 C2

FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

## (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, pharmaceutics.

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

RU 2 517 084 C2

RU 2 517 084 C2

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?

5 Biotechnology (N Y). 1993 Jun; 11(6):696-707).

Известно также предложение по использованию анти-CD4 молекул, конъюгированных с антihемокиновыми 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.

10 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).

15 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.

20 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

25 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.

30 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.

35 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.

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

Заявленное средство приготавливают, преимущественно, следующим образом.

45 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., Sodoyer R. Hum. Antibodies. Monoclonal and recombinant

antibodies, 30 years after. - 2005. - Vol.14. - N 1-2. P.33-55.

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, производящих 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 специальному 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<sup>12</sup>, 100<sup>30</sup> и 100<sup>50</sup> раз, что эквивалентно сотенным 25 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 адьювант и цельную молекулу или один полипептидный фрагмент CD4 рецептора, выбранный, например, из следующих 30 аминокислотных последовательностей:

412-458:

IGLGIFFCV RCRHRRRQAE RMSQIKRLLS EKKTCQCPHR FQKTCSPI

26-60:

35 MNRGVPFRHL LLVLQLALLP AATQGKKVVL GKKGD

105-119:

A DSRRSLWDQG NFPL

115-139:

40 G NFPLIINKNLK IEDSDTYICE VEDQ

26-458:

MNRGVPFRHL LLVLQLALLP AATQGKKVVL GKKGDTVELT CTASQKKSQ FHWKN-  
SNQIK ILGNQGSFLT KGPSKLNDRA DSRRSLWDQG NFPLIINKNLK IEDSDTYICE

VEDQKEEVQL LVFGLTANS THLLQGQSLT LTLESPPGSS PSVQCRSPRG KNIQGGKTLS  
VSQLELQDSG TWTCTVLQNZ KKVEFKIDIV VLAFQKASSI VYKKEGEQVE FSFPLAFTVE

45 KLTGSGELWW QAERASSSKS WITFDLKNKE VSVKRTQDP KLQMGKKLPL  
HLTPQALPQ YAGSGNLTLA LEAKTGKLHQ 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 восстановить здоровье 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<sub>3</sub> до конечной концентрации 0,02% и хранить до использования в замороженном состоянии при температуре -20°C (или без добавления NaN<sub>3</sub> - при температуре -70°). Выделение из антисыворотки антител к CD4 рецептору возможно следующим образом:

1) 10 мл антисыворотки кролика разбавляют в 2 раза 0,15 M NaCl добавляют 6,26 г Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, перемешивают и инкубируют 12-16 ч при 4°C;

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

25 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), 30 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 35 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).

45 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 С1 разведение. Из 1-го сотенного С1 разведения приготавляют 2-е сотенное разведение С2. Данную операцию повторяют 11 раз, получая 5 12-е сотенное разведение С12. Таким образом, 12-е сотенное разведение С12 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, 10 полученный разведением матричного раствора в  $100^{12}$  раз. Аналогичные операции с соответствующей кратностью разведения проводят для получения разведений С30 и С50.

При использовании в качестве активированной-потенцированной формы антител к CD4 рецептору смеси различных, преимущественно сотенных, разведений каждое разведение состава смеси (например, С12, С30, С50) приготавляют раздельно по 15 описанной выше технологии до разведения на 3 разведения меньше, чем конечное (соответственно, до получения С9, С27, С47), 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, 20 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 С12, С30, С50.

25 Возможно использование каждого компонента в виде смеси других различных, разведений, например, десятичных и/или сотенных (D20, С30, С100 или С12, С30, С200 и т.д.), приготовленных по гомеопатической технологии, эффективность которых определяют экспериментально.

#### Пример

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

Эффективность ингибиования продукции или усиления элиминации белка Р24 определяли в мононуклеарных клетках периферической крови человека, зараженных *in vitro* штаммом ВИЧ-1-LAI.

35 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 фитогеммаглютина Р и 5 МЕ/мл рекомбинантного интерлейкина-2 человека.

Для оценки эффективности ингибиования продукции или усиления элиминации 40 белка Р24 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 С12, С30, С50 (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 45 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 ингибиования продукции или усиления элиминации белка Р24 определяли методом ИФА (Retrotek Elisa kit).

Определено, что СМД АТ к CD4 снижает содержание белка Р24 в супернатанте на 86±10% при внесении в лунку за 24 часа до и на 51±3% при внесении в лунку через 15

5 минут после заражения клеток штаммом ВИЧ-1-LAI соответственно.

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

#### Формула изобретения

1. Способ ингибиования продукции или усиления элиминации белка Р24,

10 характеризующийся тем, что используют активированную-потенциированную форму антител к CD4.

2. Способ по п.1, характеризующийся тем, что активированную-потенциюированную форму антител к CD4 используют в виде активированного-потенцированного водного или водно-спиртового раствора, активность которого обусловлена процессом

15 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-

потенциированную форму антител к CD4 получают путем многократного

20 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.

4. Средство для ингибиования продукции или усиления элиминации белка Р24, характеризующееся тем, что содержит активированную-потенциюированную форму

25 антител к CD4.

5. Средство по п.4, характеризующееся тем, что активированную-потенциюированную форму антител к CD4 используют в виде активированного-потенцированного водного или водно-спиртового раствора, активность которого обусловлена процессом

30 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-

потенциированную форму антител к CD4 получают путем многократного

35 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.