

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2010133045/15, 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: 10.12.2014 Бюл. № 34

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2192888 C1 20.11.2002.
RU2008110058 A 27.09.2009. KR 20000035446 A 26.06.2000. JP 9059180 A 04.03.1997.
ВАСИЛЬЕВ А.Н. и др. "Применение сверхмалых доз антител к гамма-интерферону в лечении и профилактике вирусных инфекций". Антибиотики и химиотерапия, 2008;53:32-35. PETROVAY F. et al. Chronic infections and histamine, CRP and IL-6 levels after (см. прод.)Адрес для переписки:
127051, Москва, ОПС, а/я 158, ООО "НПФ
"Матрица Медика Холдинг"(72) Автор(ы):
Эпштейн Олег Ильич (RU),
Тарасов Сергей Александрович (RU)(73) Патентообладатель(и):
Эпштейн Олег Ильич (RU),
Тарасов Сергей Александрович (RU)C2
C3
C3
C5
C5
UR
U
2
5
3
5
0
3
3C
2

(54) ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО И СПОСОБ ПРОФИЛАКТИКИ ИНФИЦИРОВАНИЯ ВИЧ, ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ, ВЫЗЫВАЕМЫХ ВИЧ ИЛИ АССОЦИИРОВАННЫХ С ВИЧ, В ТОМ ЧИСЛЕ СПИДА

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины, а именно к фармакологии, и касается создания лекарственных средств, обладающих антиретровирусной активностью. В качестве такого средства предложена фармацевтическая композиция, содержащая активированную

потенциированную форму антител к белку или пептиду иммунной системы, который взаимодействует с ВИЧ или содержание и/или функциональная активность которого изменяется в связи с инфицированием ВИЧ. 10 з.п. ф-лы, 2 пр.

(56) (продолжение):

"percutaneous transluminal coronary angioplasty" Inflamm Res 2007 Sep;56(9):362-7, реферат, [найдено 22.08.2011], найдено из PubMed PMID:17878998.

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: 2010133045/15, 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: 10.12.2014 Bull. № 34

Mail address:

127051, Moskva, OPS, 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),
Tarasov Sergej Aleksandrovich (RU)

R U 2 5 3 5 0 3 3 2 5 3 5 0 3 3 C 2

(54) THERAPEUTIC AGENT AND METHOD FOR PREVENTION OF HIV INFECTION AND TREATMENT
OF HIV-CAUSED OR HIV-ASSOCIATED DISEASES, INCLUDING AIDS

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceutics.

SUBSTANCE: invention refers to medicine, namely to pharmacology, and concerns developing therapeutic agents possessing anti-retroviral activity. This agent represents a pharmaceutical composition containing an activated potentiated form of antibodies to immune

protein or peptide reacting to HIV, or having the concentration and/or functional activity varying in relation to HIV infection.

EFFECT: developing the therapeutic agents possessing anti-retroviral activity.

11 cl, 2 ex

R U 2 5 3 5 0 3 3 2 5 3 5 0 3 3 C 2

Изобретение относится к области медицины и может быть использовано для эффективной профилактики инфицирования ВИЧ, профилактики и лечения заболеваний, вызываемых ВИЧ или ассоциированных с ВИЧ, в том числе СПИДа.

Из уровня техники известно лекарственное средство для лечения инфекционных

5 заболеваний, в том числе вирусной этиологии, на основе активированной формы сверхмалых доз антител к интерферону (RU 2192888 С1, А61К 39/395, 20.11.2002). Однако данное лекарственное средство может быть не эффективно для профилактики инфицирования ВИЧ, а также профилактики и лечения широкого спектра заболеваний, вызываемых ВИЧ или ассоциированных с ВИЧ, в том числе СПИДа.

10 Изобретение направлено на создание комплексного лекарственного средства без выраженных побочных явлений, обеспечивающего как эффективную профилактику инфицирования ВИЧ, так и профилактику и эффективное лечение заболеваний, вызываемых ВИЧ или ассоциированных с ВИЧ, в том числе проявляющихся инфекционными и/или паразитарными болезнями, злокачественными образованиями 15 и СПИДом, у лиц, инфицированных ВИЧ.

Решение поставленной задачи обеспечивается тем, что лекарственное средство для профилактики инфицирования ВИЧ, профилактики и лечения заболеваний, вызываемых ВИЧ или ассоциированных с ВИЧ, в том числе СПИДа, согласно изобретению, содержит активированную потенцированную форму антител к антигену-белку или пептиду 20 иммунной системы или, преимущественно, вырабатываемому иммунной системой, который взаимодействует с ВИЧ или содержание и/или функциональная активность которого изменяется в связи с инфицированием ВИЧ.

25 При этом можно использовать активированную потенцированную форму антител, преимущественно, к растворенному антигену (или растворимому антигену, т.е. антигену, не связанному с наружной мембраной клеток иммунной системы).

При этом в качестве растворенного антигена можно использовать цитокины, за исключением гамма-интерферона.

Кроме того, можно использовать активированную потенцированную форму антител, преимущественно, к антигену, связанному с наружной мембраной клеток иммунной 30 системы.

При этом в качестве антигена, связанного с наружной мембраной клеток иммунной системы, используют рецепторы иммунокомпетентных клеток.

Кроме того, в качестве антигена, связанного с наружной мембраной клеток иммунной системы, можно использовать кластеры дифференцировки, за исключением CD4 35 молекулы Т-лимфоцитов.

Активированную потенцированную форму антител к растворенным антигенам или активированную потенцированную форму антител к антигенам, связанным с наружной мембраной клеток иммунной системы, используют в виде активированного потенцированного водного или водно-спиртового раствора, активность которого 40 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.

45 При этом заявленное лекарственное средство может быть выполнено в твердой лекарственной форме в виде фармацевтической композиции, которая содержит технологически необходимое (эффективное) количество нейтрального носителя, насыщенного смесью водных или водно-спиртовых растворов активированной потенцированной формы антител к растворенным антигенам или активированной

потенциированной формы антител к антигенам, связанным с наружной мембраной клеток иммунной системы, и фармацевтически приемлемые добавки, которые включают, например, лактозу, целлюлозу микрокристаллическую и магния стеарат.

Водные или водно-спиртовые растворы активированных потенцированных форм

5 антител к растворенным антигенам или к антигенам, связанным с наружной мембраной клеток иммунной системы, могут быть получены путем многократного последовательного разведения матричного - исходного - раствора антител в сочетании с внешним механическим воздействием - вертикальным встряхиванием каждого разведения, при этом концентрация матричного раствора составляет 0,5÷5,0 мг/мл.

10 Активированную потенцированную форму антител могут использовать в виде смеси различных, преимущественно сотенных, разведений по гомеопатической технологии.

Решение поставленной задачи обеспечивается также тем, что в способе профилактики инфицирования ВИЧ, профилактики и лечения заболеваний, вызываемых ВИЧ или ассоциированных с ВИЧ, в том числе СПИДа, согласно изобретению, используют

15 активированную потенцированную форму антител к антигену-белку или пептиду иммунной системы или, преимущественно, вырабатываемому иммунной системой, который взаимодействует с ВИЧ или содержание и/или функциональная активность которого изменяется в связи инфицированием ВИЧ.

Активированную потенцированную форму антител к растворенным антигенам или 20 активированную потенцированную форму антител к антигенам, связанным с наружной мембраной клеток иммунной системы, используют в виде активированного потенцированного водного или водно-спиртового раствора каждого компонента, активность которого обусловлена процессом многократного разведения матричного - исходного - раствора антител в водном или водно-спиртовом растворителе в сочетании 25 с внешним механическим воздействием - вертикальным встряхиванием каждого разведения.

Предпочтительно водные или водно-спиртовые растворы активированных потенцированных форм антител к растворенным антигенам или к антигенам, связанным с наружной мембраной клеток иммунной системы получают путем многократного 30 последовательного разведения матричного - исходного - раствора антител в сочетании с внешним механическим воздействием - вертикальным встряхиванием каждого разведения, при этом концентрация матричного раствора составляет 0,5÷5,0 мг/мл.

Согласно изобретению активированная потенцированная форма представляет собой 35 форму антител, приготовленную по гомеопатической технологии потенцирования путем многократного последовательного разведения матричного - исходного - раствора антител в сочетании с внешним воздействием - вертикальным встряхиванием каждого разведения, которая обладает активностью в фармакологических моделях и/или клинических методах профилактики инфицирования ВИЧ, профилактики и лечения заболеваний, вызываемых ВИЧ или ассоциированных с ВИЧ, в том числе СПИДа.

40 Предложенное использование активированной потенцированной формы антител к растворенным антигенам (например, к фактору некроза опухоли-альфа или альфа-интерферона человека) или к антигенам, связанным с наружной мембраной клеток иммунной системы (например, к CD8 рецептору), обеспечивает получение неожиданного терапевтического эффекта, который заключается в более высокой эффективности 45 лекарственного средства как при профилактике инфицирования ВИЧ, так и при профилактике и лечении заболеваний, вызываемых ВИЧ или ассоциированных с ВИЧ, в том числе СПИДа.

Экспериментально подтверждено, что заявленное лекарственное средство обладает

высокой профилактической эффективностью в отношении ВИЧ, предупреждая инфицирование клеток вирусом иммунодефицита человека и его внутриклеточную репликацию, и, вследствие этого, может использоваться как для эффективного лечения, так для профилактики вирусных заболеваний, склонных к хроническому течению, в том числе и для вторичной профилактики ВИЧ-инфекции.

5 Возможно применение заявленного лекарственного средства в сочетании с антиретровирусными препаратами, в том числе комплексными, в том числе с ингибиторами обратной транскриптазы (например, на основе зидовудина), что позволяет снизить дозы антиретровирусных препаратов при сохранении высокой эффективности 10 терапии, повышает безопасность проводимой терапии и сокращает количество нежелательных явлений.

Лекарственное средство готовят, преимущественно, следующим образом.

Для приготовления активированной потенцированной формы действующих 15 компонентов 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

20 технологии. Причем начальная стадия процесса включает иммунизацию, основанную на принципах, уже разработанных при приготовлении поликлональных антисывороток. Дальнейшие этапы работы предусматривают получение гибридомных клеток, 25 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 специально разработанной схеме животным делают серию инъекций 30 требуемым в соответствии с изобретением веществом - антигеном или коньюгированным антигеном (белком или пептидом иммунной системы или, преимущественно, вырабатываемым иммунной системой, который взаимодействует с ВИЧ или содержание и/или функциональная активность которого изменяется в связи с инфицированием ВИЧ). В результате проведения такой процедуры получают моноспецифическую 35 антисыворотку с высоким содержанием антител, которую и используют для получения активированной потенцированной формы. При необходимости проводят очистку антител, присутствующих в антисыворотке, например, методом аффинной хроматографии, путем применения фракционирования солевым осаждением или ионообменной хроматографии.

Например, для приготовления заявленного лекарственного средства могут 40 использоваться поликлональные антитела к фактору некроза опухоли-альфа, которые в качестве матричного (первичного) раствора с концентрацией 0,5÷5,0 мг/мл используют для последующего приготовления активированной потенцированной формы.

Предпочтительным для приготовления заявленного лекарственного средства является использование поликлональных антител, которые могут быть получены иммунизацией кроликов следующим образом.

Например, поликлональные антитела к фактору некроза опухоли-альфа (ФНО- α)

45 могут быть получены с использованием цельной молекулы фактора некроза опухоли-альфа следующей последовательности:

1 MSTESMIRDV ELAEEALPKK TGGPQGSRRC LFLSLFSFLI VAGATTLFCL
LHFGVIGPQR

61 EEFPRDLSLI SPLAQAVRSS SRTPSDKPVA HVVANPQAEG QLQWLNRRAN
ALLANGVELR

121 DNQLWPSEG LYLIYSQVLF KGQGCPSTHV LLTHTISRIA VSYQTKVNLL
SAIKSPCQRE

5 181 TPEGAEAKPW YEPIYLGGVF QLEKGDRRLSA EINRPDYLDF AESGQVYFGIIAL

Возможно для получения поликлональных антител к фактору некроза опухоли-альфа (ФНО- α) использование полипептидного фрагмента фактора некроза опухоли, выбранного, например, из следующих последовательностей:

84-88:

10 PSDKP

93-97:

VANPQ

65-199:

RDLSLI SPLAQAVRSS SRTPSDKPVA HVVANPQAEG QLQWLNRRAN ALLANGVELR

15 DNQLVVPSEG LYLIYSQVLF KGQGCPSTHV LLTHTISRIA VSYQTKVNLL SAIKSPCQRE
TPEGAEAKPW YEPIYLGGV

77-93:

RSS SRTPSDKPVA HVV

32-54:

20 GGPQGSRRC LFLSLFSFLI VAGA

56-73:

IGPQR EEFPRDLSLI SPL

123-160:

QLVVPSEG LYLIYSQVLF KGQGCPSTHV LLTHTISRIA

25 176-190:

PCQRE TPEGAEAKPW

5-45:

SMIRDV ELAEEALPKK TGGPQGSRRC LFLSL

150-184:

30 V LLTHTISRIA VSYQTKVNLL SAIKSPCQRE TPEG

77-233:

VRSSSRTPSDKPVAHVVANPQAEGQLQWLNRRANALLANGVELRDNQLVVPSEGLY
LIYSQVLFKGQGCPSTHVLLTHTISRIA VSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYE
PIYLGGVFQLEKGDRRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL.

35 Перед отбором крови за 7-9 дней проводят 1-3 внутривенных инъекций 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

40 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

45 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% NaN₃ до конечной

концентрации 0,02% и хранить до использования в замороженном состоянии при температуре -20°C (или без добавления NaN₃ - при температуре -70°). Выделение из антисыворотки антител к фактору некроза опухоли-альфа возможно следующим образом:

5 1) 10 мл антисыворотки кролика разбавляют в 2 раза 0,15 M NaCl, добавляют 6,26 г Na₂SO₄, перемешивают и инкубируют 12-16 ч при 4°C;

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

15 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 антителом путем связывания антител к фактору некроза опухоли-альфа с антителом (фактором некроза опухоли-альфа), прикрепленным к нерастворимому матриксу колонки, с последующим элюированием антител концентрированными растворами соли.

20 Полученный таким образом буферный раствор поликлональных антител к фактору некроза опухоли-альфа 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.

25 Предпочтительной для приготовления лекарственного средства является использование смеси трех водно-спиртовых разведений первичного матричного раствора антител, разведенных, соответственно, в 100¹², 100³⁰, и 100²⁰⁰ раз, что соответствует сотенным разведениям C12, C30 и C200, приготовленным по гомеопатической технологии. При выполнении заявленного лекарственного средства в твердой лекарственной форме на нейтральный носитель наносится смесь указанных компонентов.

30 Активированную потенцированную форму каждого компонента готовят путем равномерного уменьшения концентрации в результате последовательного разведения 1 части каждого подвергаемого разведению раствора, начиная с 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 в сочетании 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).

40 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 матричного (исходного) раствора антител, например к фактору некроза опухоли-альфа, 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, получая 1-е сотенное C1 разведение. Из 1-го сотенного C1 разведения приготовляют 2-ое сотенное разведение C2. Данную операцию повторяют 11 раз,

получая 12-е сотенное разведение С12. Таким образом, 12-е сотенное разведение С12 представляет собой раствор, полученный разбавлением последовательно 12 раз в разных емкостях 1-ой части исходного матричного раствора антител к гамма-интерферону человека с концентрацией 2,5 мг/мл в 99-ти частях нейтрального

5 растворителя, т.е. раствор, полученный разведением матричного раствора в 10012 раз. Аналогичные операции с соответствующей кратностью разведения проводят для получения разведений С30 и С200.

При использовании, например, активированной потенцированной формы антител к фактору некроза опухоли-альфа в виде смеси различных, преимущественно сотенных, 10 разведений каждое разведение (например, С12, С30, С200) приготавливают раздельно по описанной выше технологии до разведения на 3 разведения меньше, чем конечное (соответственно, до получения С9, С27, С197), 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).

15 Далее полученную смесь последовательно дважды разводят в соотношении 1 к 100, потенцируя полученный раствор после каждого разведения. При этом получают активированную потенцированную форму антител, например, к гамма-интерферону человека в сверхмалой дозе, полученной разведением матричного раствора в 100^{12} , 20 100^{30} , 100^{200} раз, эквивалентной смеси сотенных разведений С12, С30, С200.

Возможно использование каждого компонента в виде смеси других различных разведений, например десятичных и/или сотенных (D20, С30, С100 или С12, С30, С50 и т.д.), приготовленных по гомеопатической технологии, эффективность которых определяют экспериментально.

25 Для получения твердой оральной формы заявленного лекарственного средства производят в установке кипящего слоя (например, типа «Huttlin Pilotlab» производства компании Huttlin GmbH) орошение до насыщения вводимых в псевдоожиженный - кипящий слой гранул нейтрального вещества - лактозы (молочного сахара) с размером частиц 50÷500 мкм, предварительно полученным водным или водно-спиртовым 30 раствором активированной потенцированной формы антител к CD4 рецептору, преимущественно, в соотношении 1 кг раствора антител на 5 или 10 кг лактозы (1:5-1:10) с одновременной сушкой в потоке подаваемого под решетку нагретого воздуха при температуре не выше 40°C. Расчетное количество лактозы (10÷91% от таблеточной массы), насыщенной активированной потенцированной формой антител по вышеуказанной методике, загружают в смеситель и смешивают с лактозой, увлажненной активированной потенцированной формой антител, в количестве 3÷10% таблеточной массы и с чистой лактозой в количестве не более 84% от таблеточной массы (для снижения стоимости и некоторого упрощения и ускорения технологического процесса без снижения эффективности лечебного воздействия). Затем в эту смесь добавляют 35 микрокристаллическую целлюлозу в количестве 5÷10% от таблеточной массы и стеарат магния в количестве 1% от таблеточной массы. Полученную таблеточную массу равномерно перемешивают и таблетируют прямым сухим прессованием (например, в таблет-прессе Korsch-XL 400). После таблетирования получают таблетки массой 300 мг, пропитанные водно-спиртовым раствором активированной потенцированной 40 формой антител к фактору некроза опухоли-альфа в сверхмалой дозе каждого компонента, приготовленной из матричного раствора, разведенного в 100^{12} , в 100^{30} в 100^{200} , что эквивалентно смеси сотенных разведений С12, С30 и С200, приготовленных по гомеопатической технологии.

Предпочтительно заявленное лекарственное средство рекомендуется принимать по 1-2 таблетке 2-4 раза в день.

Пример 1.

Антиретровирусное действие заявленного лекарственного препарата изучали,

5 ингибируя репликацию ВИЧ в культуре мононуклеарных клеток периферической крови человека, зараженных *in vitro* штаммом ВИЧ-1-LAI. Эффективность ингибирования репликации ВИЧ оценивали по содержанию основного нуклеокапидного белка p24 ВИЧ в супернатантах.

10 Для проведения экспериментальных исследований были использованы аффинно очищенные кроличьи поликлональные антитела к фактору некроза опухоли-альфа, приготовленные по заказу специализированной биотехнологической фирмой, на основе которых была приготовлена активированная потенцированная форма антител к фактору некроза опухоли-альфа в сверхмалой дозе в виде смеси разведений С12+С30+С200, полученных по гомеопатической технологии (далее - СМД АТ к ФНО альфа).

15 Оценка противовирусной активности комплексного препарата проводилась с использованием мононуклеарных клеток периферической крови человека, зараженных *in vitro* штаммом ВИЧ-1-LAI.

20 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.

25 Для оценки антиретровирусной активности препараты 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 ФНО альфа (12,5 мкл) или азидотимидин (действующее вещество - зидовудин) в дозе 1000 нМ (препарат сравнения) смешивали со средой RPMI1640 (DIFCO) до достижения конечного объема в 50 мкл.

30 Супернатанты культуры клеток были собраны на 7 день после заражения. Эффективность препаратов определяли по ингибированию репликации ВИЧ, которая оценивалась по содержанию основного нуклеокапидного белка p24 ВИЧ в супернатантах клеток методом ИФА (Retrotek Elisa kit).

35 Показано, что СМД АТ к ФНО альфа ингибируют репликацию ВИЧ на 92±3% при внесении в лунку за 24 часа до и на 13±13% при внесении в лунку через 15 минут после заражения клеток штаммом ВИЧ-1-LAI, соответственно. Азидотимидин в дозе 1000 нМ ингибировал репликацию ВИЧ на 99±0 и 99±1% при внесении в лунку за 24 часа до и через 15 минут после заражения клеток штаммом ВИЧ-1-LAI, соответственно.

40 Таким образом, в *in vitro* исследовании показана высокая антиретровирусная активность заявленного препарата на основе активированной потенцированной формы кроличьих поликлональных антител к ФНО альфа.

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

Пример 2.

Антиретровирусное действие заявленного лекарственного препарата изучали, ингибируя репликацию ВИЧ в культуре мононуклеарных клеток периферической крови человека, зараженных *in vitro* штаммом ВИЧ-1-LAI. Эффективность ингибирования репликации ВИЧ оценивали по содержанию основного нуклеокапидного белка p24 ВИЧ в супернатантах.

Для проведения экспериментальных исследований были использованы аффинно

очищенные кроличьи поликлональные антитела к CD8, приготовленные по заказу специализированной биотехнологической фирмой, на основе которых была приготовлена активированная потенцированная форма антител к CD8 в сверхмалой дозе в виде смеси разведений V12+C30+C50, полученных по гомеопатической технологии

5 (далее - СМД АТ к CD8).

Оценка противовирусной активности комплексного препарата проводилась с использованием мононуклеарных клеток периферической крови человека, зараженных *in vitro* штаммом ВИЧ-1-LAI.

Мононуклеары периферической крови человека были выделены из крови здоровых

10 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 антиретровирусной активности препараты вносили в лунку, содержащую 100 мкл активированных мононуклеаров периферической крови человека, за 24 часа

15 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 CD8 (12,5 мкл) или азидотимидин (действующее вещество - зидовудин) в дозе 1000 нМ (препарат сравнения) смешивали со средой RPMI1640 (DIFCO) до достижения конечного объема в 50 мкл.

20 Супернатанты культуры клеток были собраны на 7 день после заражения.

Эффективность препаратов определяли по ингибированию репликации ВИЧ, которая оценивалась по содержанию основного нуклеосапидного белка p24 ВИЧ в супернатантах клеток методом ИФА (Retrotek Elisa kit).

Показано, что СМД АТ к CD8 ингибируют репликацию ВИЧ на 87±11% при внесении 25 в лунку за 24 часа до и на 40±4% при внесении в лунку через 15 минут после заражения клеток штаммом ВИЧ-1-LAI, соответственно. Азидотимидин в дозе 1000 нМ ингибировал репликацию ВИЧ на 99±0 и 99±1% при внесении в лунку за 24 часа до и через 15 минут после заражения клеток штаммом ВИЧ-1-LAI, соответственно.

30 Таким образом, в *in vitro* исследовании показана высокая антиретровирусная активность сверхмалых доз кроличьих поликлональных антител к CD8.

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

Формула изобретения

1. Фармацевтическая композиция, обладающая антиретровирусной активностью, 35 характеризующаяся тем, что содержит активированную потенцированную форму антител к белку или пептиду иммунной системы, который взаимодействует с ВИЧ или содержание и/или функциональная активность которого изменяется в связи с инфицированием ВИЧ.

2. Фармацевтическая композиция по п.1, характеризующаяся тем, что используют 40 активированную потенцированную форму антител к растворенному антигену.

3. Фармацевтическая композиция по п.2, характеризующаяся тем, что в качестве растворенного антигена используют цитокины, за исключением гамма-интерферона.

4. Фармацевтическая композиция по п.1, характеризующаяся тем, что используют активированную потенцированную форму антител к антигену, связанному с наружной мембраной клеток иммунной системы.

45 5. Фармацевтическая композиция по п.4, характеризующаяся тем, что в качестве антигена, связанного с наружной мембраной клеток иммунной системы, используют рецепторы иммунокомпетентных клеток.

6. Фармацевтическая композиция по п.4, характеризующееся тем, что в качестве антигена, связанного с наружной мембраной клеток иммунной системы, используют кластеры дифференцировки, за исключением CD4 молекулы Т-лимфоцитов.

7. Фармацевтическая композиция по п.1 или 4, характеризующаяся тем, что

- 5 активированную потенцированную форму антител к растворенному антигену или активированную потенцированную форму антител к антигену, связанному с наружной мембраной клеток иммунной системы, используют в виде активированного потенцированного водного или водно-спиртового раствора, активность которого обусловлена процессом последовательного многократного разведения матричного -
- 10 исходного - раствора антител в водном или водно-спиртовом растворителе в сочетании с внешним механическим воздействием - встряхиванием каждого разведения.

8. Фармацевтическая композиция по п.1 или 4, характеризующаяся тем, что выполнена в твердой лекарственной форме в виде фармацевтической композиции, которая содержит технологически необходимое количество нейтрального носителя, насыщенного смесью

- 15 водных или водно-спиртовых растворов активированной потенцированной формы антител к растворенному антигену или активированной потенцированной формы антител к антигену, связанному с наружной мембраной клеток иммунной системы, и фармацевтически приемлемые добавки.

9. Фармацевтическая композиция по п.1 или 4, характеризующаяся тем, что водные

- 20 или водно-спиртовые растворы активированных потенцированных форм антител к растворенному антигену или к антигену, связанному с наружной мембраной клеток иммунной системы, получены путем многократного последовательного разведения матричного - исходного - раствора антител в сочетании с внешним механическим воздействием - встряхиванием каждого разведения, при этом концентрация матричного
- 25 раствора составляет 0,5÷5,0 мг/мл.

10. Фармацевтическая композиция по п.1 или 4, характеризующаяся тем, что активированную потенцированную форму антител используют в виде смеси различных, преимущественно сотенных, разведений по гомеопатической технологии.

11. Фармацевтическая композиция по п.8, характеризующаяся тем, что

- 30 фармацевтически приемлемые добавки включают лактозу, целлюлозу микрокристаллическую и магния стеарат.

35

40

45