



(51) МПК  
*A61K 35/02* (2006.01)  
*A61K 9/02* (2006.01)  
*A61P 31/12* (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2013103411/15, 25.01.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
 25.01.2013

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 25.01.2013

(43) Дата публикации заявки: 27.07.2014 Бюл. № 21

(45) Опубликовано: 27.10.2014 Бюл. № 30

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: US 6630179 В1 07.10.2003. НУ 29454 Т 30.01.1984. Гумивит" Рег. уд. МЗ РФ N001636.Р.643.06.2000. ТУ9197-011-46184368-99 [онлайн]. ЕА 11298 В1 27.02.2009. RU 2241471 С1 10.12.2004. ЧУЕШОВ В.И. "Промышленная технология лекарств", том 2, Харьков, 2002

Адрес для переписки:

115478, Москва, Каширское ш., 24, корп. 2, ФГБУ "ГНЦ Институт иммунологии" ФМБА России

(72) Автор(ы):

Хаитов Рахим Мусаевич (RU),  
 Сидорович Игорь Георгиевич (RU),  
 Николаева Ирина Александровна (RU),  
 Игнатъева Галина Алексеевна (RU),  
 Коробова Светлана Вячеславовна (RU),  
 Гудима Георгий Олегович (RU),  
 Карамов Эдуард Владимирович (RU),  
 Корнилаева Галина Владимировна (RU),  
 Павлова Татьяна Владимировна (RU),  
 Перминова Ирина Васильевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное учреждение "Государственный научный центр "Институт иммунологии" Федерального медико-биологического агентства (RU)

(54) СРЕДСТВО ПРОТИВ ПЕРЕДАЧИ ВИЧ/СПИД ПОЛОВЫМ ПУТЕМ

(57) Реферат:

Изобретение относится к средству против передачи ВИЧ/СПИД половым путем и к способу профилактики ВИЧ-инфекции путем введения указанного средства. Средство выполнено в виде суппозитория, который включает активную субстанцию и фармакологически приемлемую основу. В качестве активной субстанции используется фракция гуминовых кислот, выделенных из окисленного бурого угля, которая

обладает анти-ВИЧ-активностью. В качестве основы используется масло какао или твердый кондитерский жир и эмульгатор. Средство вводят интравагинально за 30 минут до полового акта. Изобретение направлено на создание безопасного микробицида с анти-ВИЧ-активностью на основе веществ, выделенных из природных источников. 2 н.п. ф-лы, 6 табл., 7 пр.

RU 2 531 945 C 2

RU 2 531 945 C 2



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*A61K 35/02* (2006.01)  
*A61K 9/02* (2006.01)  
*A61P 31/12* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2013103411/15, 25.01.2013**(24) Effective date for property rights:  
**25.01.2013**

Priority:

(22) Date of filing: **25.01.2013**(43) Application published: **27.07.2014** Bull. № 21(45) Date of publication: **27.10.2014** Bull. № 30

Mail address:

115478, Moskva, Kashirskoe sh., 24, korp. 2, FGBU  
"GNTs Institut immunologii" FMBA Rossii

(72) Inventor(s):

**Khaitov Rakhim Musaevich (RU),  
Sidorovich Igor' Georgievich (RU),  
Nikolaeva Irina Aleksandrovna (RU),  
Ignat'eva Galina Alekseevna (RU),  
Korobova Svetlana Vjacheslavovna (RU),  
Gudima Georgij Olegovich (RU),  
Karamov Ehdvard Vladimirovich (RU),  
Kornilaeva Galina Vladimirovna (RU),  
Pavlova Tat'jana Vladimirovna (RU),  
Perminova Irina Vasil'evna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federal'noe gosudarstvennoe bjudzhetnoe  
uchrezhdenie "Gosudarstvennyj nauchnyj tsentr  
"Institut immunologii" Federal'nogo mediko-  
biologicheskogo agentstva (RU)**

(54) **MEDICATION AGAINST HIV/AIDS TRANSMISSION THROUGH SEXUAL CONTACT**

(57) Abstract:

FIELD: medication.

SUBSTANCE: invention relates to medication against HIV/AIDS transmission through sexual contact and to method of HIV-infection prevention by introduction of said medication. Medication is made in form of suppository, which includes active substance and pharmacologically acceptable base. As active substance used is fraction of humic acids, extracted from oxidised brown coal, which possesses anti-HIV

activity. As base used is cocoa butter or hard confectionery fat and emulsifier. Medication is introduced intravaginally 30 minutes before sexual intercourse.

EFFECT: invention is aimed at creation of safe microbicide with anti-HIV activity based on substances, extracted from natural sources.

2 cl, 6 tbl, 7 ex

Изобретение относится к медицине, а именно к вирусологии, иммунологии, гинекологии, фармакологии и биотехнологии, и может быть использовано при создании вагинальных и ректальных микробицидов - препаратов местного применения, предотвращающих передачу возбудителя СПИДа (вируса иммунодефицита человека, ВИЧ) половым путем.

СПИД представляет собой заболевание со 100%-ной летальностью, существующая терапия не приводит к удалению вируса из организма и излечению, а потому требует пожизненного применения, токсична, приводит к селекции резистентных к лечению форм вируса. Характерной особенностью ВИЧ-инфекции/СПИДа, важной для социальных, экономических и демографических последствий, является то, что, в отличие от рака и сердечно-сосудистых заболеваний, ВИЧ-инфекция поражает, главным образом, молодое трудоспособное сексуально активное население.

Половой путь является основным путем передачи ВИЧ-инфекции [Доклад ЮНЭЙДС, 2010. Доклад ЮНЭЙДС о глобальной эпидемии СПИДа, 2010, UNAIDS Report on the global AIDS epidemic-2010, [www.unaids.org/ru](http://www.unaids.org/ru)]. На половые контакты в мире приходится более 80% новых ВИЧ-инфекций [Доклад ЮНЭЙДС о глобальной эпидемии СПИДа, 2010, UNAIDS Report on the global AIDS epidemic-2010, [www.unaids.org/ru](http://www.unaids.org/ru)]. В связи с этим среди комплекса мер по противодействию эпидемии ВИЧ-инфекции/СПИДа важнейшими являются профилактические меры, направленные на пресечение полового пути передачи. К этим мерам относятся разработка и использование микробицидов - средств местного применения для предотвращения передачи ВИЧ-инфекции половым путем.

Известны неспецифические микробициды, включающие субстанции, действующие как спермициды или поверхностные дезинфектанты, такие, как Nonoxynol-9 (N-9), octoxynol-9, benzalkonium chloride, menfegol [WHO/CONRAD Technical Consultation on Nonoxynol-9, WHO, Geneva, 9-10 - October 2001, Summary Report. WHO/CONRAD, 2001]. Однако клинические испытания ноноксинола показали, что он не способен препятствовать трансмиссии ВИЧ, поскольку ноноксинол вызывает физические повреждения влажной слизистой оболочки [Phillips D.M., et al, 2000 Phillips D.M., Taylor C.L., Zacharopoulos V.R., Maguire R.A. Nonoxynol-9 causes rapid exfoliation of sheets of rectal epithelium. *Contraception*, 2000 Sep; 62(3): 149-54]. Это привело к более частому заражению ВИЧ в группе женщин, применяющих N-9, по сравнению с контрольной группой [WHO/CONRAD 2001, Summary Report WHO/CONRAD Technical Consultation on Nonoxynol-9, WHO, Geneva, 9-10 - October 2001, Summary Report. WHO/CONRAD, 2001].

Известны экспериментальные микробициды на основе специфических антиретровирусных препаратов, например, аналога аденозинмонофосфата, Тенофовира. Обычно такие препараты применяются перорально в ходе специфической высокоактивной антиретровирусной терапии (ВААРТ). Клинические исследования Тенофовира (CAPRISA-004, фаза IIb) показали, что вагинальный микробицид в форме 1%-ного Тенофовира (TDF) оказался способен на 39% снизить число случаев заражения в группе из 889 женщин из ЮАР, входящих в группу высокого риска инфицирования [Abdool Karim Q. et al., 2010 Abdool Karim Q, Abdool Karim SS, Frohlich JA, Grobler AC, Baxter C, Mansoor LE, Kharsany AB, Sibeko S, Mlisana KP, Omar Z, Gengiah TN, Maarschalk S, Arulappan N, Mlotshwa M, Morris L, Taylor D; CAPRISA 004 Trial Group. Effectiveness and Safety of Tenofovir Gel, an Antiretroviral Microbicide, for the Prevention of HIV Infection in Women // *Science*. 2010; 329(5996): 1168-1174. doi:10.1126/science.1193748]. Однако в процессе проведения других клинических испытаний подобного препарата - VOICE - часть исследований, в которых проводились испытания 1%-ного геля Тенофовира - была досрочно прекращена, поскольку не была обнаружена разница по числу новых

случаев заражения по сравнению с группой плацебо [<http://data.avac.org/TrialDetailReport.aspx?TrialID=141>]. Потенциальной опасностью использования микробицидов на основе специфических антиретровирусных препаратов является возможность образования лекарственно устойчивых форм вируса.

5 В патенте US 2004/0137085 A1 [US Patent, МПК А61К 35/78, U.S. Cl. 424/725, опубл. 15 июля 2004 г.] предложено применение природных коммерчески доступных препаратов гуминовой кислоты, выделенных из почвы, для лечения ВИЧ-инфекции благодаря  
показанному автором анти-ВИЧ-действию *in vitro*, действию, направленному против  
образования синцитиев и/или иммуностимулирующему действию препарата. В последнем  
10 случае показано усиление под действием препарата синтеза интерлейкина-2 (IL-2)  
лимфоцитами периферической крови человека, стимулированными *in vitro*  
растительными лектинами (фитогемагглютинином или конканавалином А). Обсуждается  
метод подавления ВИЧ-инфекции при контакте лейкоцитов ВИЧ-инфицированного  
человека с препаратом гуминовой кислоты, метод иммуностимуляции IL-2, метод  
15 усиления иммунного ответа на вакцинацию с использованием гуминовой кислоты в  
качестве адъюванта при вакцинации пациента с ВИЧ-инфекцией или СПИДом или  
пациента со сниженной функцией иммунной системы. В качестве предпочтительного  
способа введения обсуждается внутривенное введение препарата, хотя не исключаются  
и другие методы, например, пероральный, вагинальный и ректальный и  
20 внутримышечный. Однако использование препаратов гуминовой кислоты в качестве  
активной субстанции микробицида в виде суппозитория не рассматривается.

Наиболее близким к настоящему изобретению является документ ЕА 11298 от  
27.02.2009, где раскрыто лекарственное микробицидное средство против передачи или  
заражения ВИЧ, которые происходят через половую связь при интимном контакте  
25 партнеров, которое может быть выполнено в виде суппозитория, и содержит  
фармакологически активное вещество (4-[[4-[(2,4,6-триметилфенил)амино]-2-  
пиримидинил]амино]бензонитрила) и фармацевтически приемлемый носитель. Способ  
профилактики заражения ВИЧ заключается во введении указанного средства  
интравагинально за 15-20 мин до полового контакта. Однако используемое в этом  
30 патенте средство включает синтетическое фармакологически активное вещество,  
которое наряду с микробицидным действием может вызывать нежелательные побочные  
эффекты. Активная субстанция является нуклеозидным ингибитором обратной  
транскриптазы, представляет собой лекарственное средство для специфической  
антиретровирусной терапии, при применении такого препарата для профилактики (как  
35 и для терапии) существует значительный риск образования лекарственно устойчивых  
форм вируса, причем возникновение резистентности является неизбежным следствием  
монотерапии.

Таким образом, технический результат, получаемый при реализации настоящего  
изобретения, состоит в создании безопасного микробицида с анти-ВИЧ-активностью  
40 - средства против передачи ВИЧ/СПИД половым путем на основе веществ, выделенных  
из природных источников.

Для решения поставленной задачи создания анти-ВИЧ-микробицида используются  
суппозитории, активной субстанцией которых является средство с анти-ВИЧ-  
активностью - фракция гуминовых кислот, выделенных из окисленного бурого угля.

45 Указанный технический результат достигается тем, что микробицид содержит в  
качестве активной субстанции с анти-ВИЧ-активностью фракцию гуминовых кислот,  
выделенных из окисленного бурого угля, и фармакологически приемлемую основу, а  
в качестве основы содержит масло какао или кондитерский жир и эмульгатор. Еще

одним из аспектов изобретения является способ профилактики ВИЧ-инфекции путем введения суппозитория, отличающийся тем, что суппозиторий, содержащий гуминовое вещество с анти-ВИЧ-активностью, вводят интравагинально за 30 мин до полового контакта. Изобретение иллюстрируется следующим примером.

5 Фракцию гуминовых кислот выделяют из высоко окисленного бурого угля путем добавления раствора гидроксида натрия и с последующим прогреванием на кипящей водяной бане. После охлаждения содержимое центрифугируют, раствор декантируют, нерастворившийся остаток промывают раствором гидроксида натрия и вновь центрифугируют, собирая основной экстракт и промывные воды в один приемник. К  
10 полученному раствору добавляют раствор концентрированной соляной кислоты до рН 2 для осаждения гуминовых кислот. Образовавшийся осадок гуминовых кислот отделяют центрифугированием и обессоливают с помощью диализа. Полученный препарат гуминовых кислот высушивают при 80°C в сушильном шкафу.

15 Готовят раствор сухого препарата в воде с концентрацией 10 мг/мл, стерилизуют фильтрацией через фильтр 0,25 мк, готовят разведения и используют для определения цитотоксичности и анти-ВИЧ-активности.

Оценку цитотоксичности и анти-ВИЧ-активности проводят в культуре *in vitro*. Цитотоксические свойства препаратов определяют колориметрическим методом МТТ по Mossman и по результатам окрашивания трипановым синим.

20 Анти-ВИЧ-активность препарата определяют по ингибированию развития инфекции в клетках, зараженных ВИЧ. Клетки человека, чувствительные к ВИЧ, инкубируют *in vitro* с различными концентрациями препарата (фракции гуминовых кислот), а затем заражают вирусом. Уровень ингибирования инфекции в опытных образцах по отношению к контролю инфекции (без препарата) определяют с помощью р24 ИФА  
25 (иммуноферментного анализа для определения содержания основного белка вириона ВИЧ1 - маркера ВИЧ-инфекции капсидного белка р24).

Ниже представлены примеры реализации описываемого изобретения, где в примере 1 показан способ получения фракции гуминовых кислот, в примерах 2-6 показаны результаты определения цитотоксических свойств и анти-ВИЧ-активности, а в примере  
30 7 описано приготовление суппозиториев, содержащих препарат фракции гуминовых кислот.

Здесь и далее препарат обозначен как НАС-1 (от humic acid coal).

Примеры конкретного осуществления изобретения

35 Пример 1. Выделение фракции гуминовых кислот (НАС-1) из высоко окисленного бурого угля

Навеску угля (2-5 г) помещают в коническую колбу вместимостью 250 мл, приливают 100 мл 1%-го раствора гидроксида натрия и нагревают в течение 2 часов на кипящей водяной бане (при температуре 80°C). После охлаждения содержимое колбы центрифугируют, раствор декантируют, нерастворившийся остаток промывают один  
40 - два раза 100 мл 1%-ого раствора гидроксида натрия и вновь центрифугируют, собирая основной экстракт и промывные воды в один приемник. К полученному раствору добавляют раствор концентрированной соляной кислоты до рН 2 для осаждения гуминовых кислот. Образовавшийся осадок гуминовых кислот отделяют центрифугированием и обессоливают с помощью диализа. Полученный препарат  
45 гуминовых кислот высушивают при 80°C в сушильном шкафу.

Пример 2. Определение цитотоксичности препарата НАС-1

Цитотоксическое действие препарата оценивают, сравнивая жизнеспособность клеток в присутствии различных доз препарата с жизнеспособностью клеток без препарата.

Клетки вносят в стерильный 96-луночный планшет в концентрации  $450 \times 10^3$  и культивируют в присутствии различных доз соединений в течение 3-4 дней. Для каждой концентрации выполняют три параллельных определения (3 лунки). По истечении указанных сроков определяют жизнеспособность клеток колориметрическим методом МТТ по Т. Mossmann [Mossmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays// J. Immunol. Methods - 1983. - 65:55-63] и по результатам окрашивания трипановым синим.

Определение цитотоксических свойств препаратов колориметрическим методом МТТ

Суть метода МТТ заключается в способности живых клеток превращать хорошо растворимый желтый бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия (МТТ) в нерастворимые внутриклеточные кристаллы МТТ-формаза. Эффективность такого превращения отражает общий уровень дегидрогеназной активности исследуемых клеток и в известных пределах пропорциональна концентрации живых (но не мертвых) клеток.

В лунки 96-луночного планшета с исследуемым материалом вносят 20 мкл раствора МТТ (с концентрацией 11 мг/мл в ФСБ) и помещают на 3 часа в термостат при  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ . Из лунок отбирают 175 мкл супернатанта, вносят по 175 мкл DMSO (для растворения кристаллов МТТ-формаза) и помещают на 20-30 мин в термостат при  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ . После растворения кристаллов измеряют оптическую плотность при 630 нм ( $\text{OP}_{630}$ ,  $\text{OD}_{630}$ ) на спектрофотометре-ридере ImmunoChem-2100 Microplate Reader (США).

За 100% принимают оптическую плотность в МТТ-тесте, установленную для контрольных клеток (без препарата), и определяют жизнеспособность клеток, культивировавшихся в присутствии различных доз препаратов по формуле 1:

Формула 1

$$\frac{\text{OP}_{630} \text{ образец}}{\text{OP}_{630} \text{ контроль}} \times 100\%,$$

где  $\text{OP}_{630}$  образец - среднее значение для трех параллельных определений (лунок) с данной концентрацией анализируемого препарата, а

$\text{OP}_{630}$  контроль - среднее значение для параллельных определений (лунок) без анализируемого препарата (не менее трех параллельных определений).

Рассчитывают 50%-ную токсическую дозу препарата. 50%-ная цитотоксическая доза ( $\text{TD}_{50}$ ) - доза, при которой 50% исследуемых клеток сохраняют жизнеспособность.

Определение жизнеспособности клеток по окрашиванию трипановым синим

Исследуемые растворы потенциальных активных субстанций микробицидов могут быть окрашены. Эта окрашенность может исказить результаты колориметрического теста МТТ. В связи с этим жизнеспособность клеток при наиболее высокой (1000 мкг/мл) концентрации веществ дополнительно определяют путем подсчета живых и мертвых клеток в камере Горяева после окрашивания 0.2% раствором трипанового синего. Раствор трипанового синего 0,4% смешивают в лунке 96-ти луночного планшета с равным объемом клеточной суспензии и 10 мкл смеси с помощью микропипетки вносят в камеру Горяева. Трипановый синий проникает в мертвые клетки, окрашивая их в голубой цвет. Соотношение живых и мертвых клеток при подсчете 100 единиц определяет жизнеспособность клеток в процентах.

Пример 3. Определение цитотоксичности препарата НАС-1 для клеток СЕМ SS

Клетки СЕМ SS представляют собой перевиваемую суспензионную Т-лимфобластоидную линию клеток человека. Клетки вносят в стерильный 96-луночный планшет в концентрации 300-500 тысяч и культивируют в присутствии различных доз препарата в течение 3 дней. По истечении этого срока определяют жизнеспособность клеток методом МТТ, как указано в примере 2. Результаты показаны в таблицах 1 и 2.

10

Таблица 1					
Цитотоксичность препарата НАС-1 для клеток СЕМ SS, определенная в МТТ-тесте. В таблице приведены значения оптической плотности при 630 нм					
Концентрация НАС-1, мкг/мл					
	100	10	1	0.1	0 (контроль клеток, без препарата)
ОП <sub>630</sub>	1,099	1,105	1,093	1,095	1,109

15

Таблица 2						
Жизнеспособность клеток СЕМ SS в присутствии различных концентраций препарата НАС-1, определенная в МТТ-тесте (в % от контроля клеток без препарата)						
Концентрация НАС-1, мкг/мл						TD <sub>50</sub> , мкг/мл >100
	100	10	1	0.1	0*	
% от контроля клеток без препарата	99,1	99,6	98,6	98,7	100,0*	

20 \* За 100% принят контроль клеток без препарата

Таким образом, препарат фракции гуминовых кислот НАС-1, являющийся предметом данного изобретения, характеризуется низкой цитотоксичностью: жизнеспособность культивируемых клеток СЕМ SS снижается менее чем на 5%.

25 Пример 4. Определение цитотоксичности препарата НАС-1 для мононуклеаров периферической крови человека (МПК)

Мононуклеары выделяют из венозной крови человека путем центрифугирования в одноступенчатом градиенте плотности фиколл d=1.077 по обычной методике [Boyum A. Separation of leucocytes from blood and bone marrow. //Scand. J. Clin. and Lab. Invest. - 1968. - Vol.21, Suppl. 97 - P.77-821]. Вакутайнеры с антикоагулянтом (ЭДТА), содержащие 10 мл донорской крови, центрифугируют при 1000 об/мин в течение 5 мин. После отделения плазмы клетки стерильно собирают в 50 мл центрифужные пробирки и разводят 1:1 фосфатно-солевым буфером без Mg<sup>2+</sup> и Ca<sup>2+</sup> (ФСБ). Клетки наслаивают на фиколл и центрифугируют при 2000 об/мин в течение 30 мин при комнатной температуре. После центрифугирования на границе раздела фаз наблюдается кольцо лимфоцитов. Собранные МПК помещают в стерильную пробирку, разбавляют ФСБ, суспендируют и центрифугируют при 1000 об/мин при 4°С в течение 10 мин. Осадок клеток собирают и повторяют отмывку еще раз. Осадок клеток суспендируют в ростовой среде (полной питательной среде, в состав которой входит среда RPMI, дополненная 10% фетальной телячьей сывороткой, 2 mM L-глутамин, 20 mM HEPES-буфера pH 7,4 и 10 мкг/мл гентамицина). Выделенные лимфоциты в полной питательной среде помещают в 25-мл культуральные флаконы из расчета 1-2×10<sup>6</sup> кл/мл, добавляют митогенный стимулятор фитогемагглютинин (ФГА) из расчета 5 мкг/мл и инкубируют 72 час при 37°С и 5% CO<sub>2</sub>. Затем лимфоциты переводят в ростовую среду, содержащую 200 ед/мл интерлейкина-2 (ИЛ-2). Замену среды проводят каждые 3-4 дня.

Результаты определения цитотоксичности препарата НАС-1 для МПК человека приведены в таблицах 3 и 4.

Таблица 3  
Цитотоксичность препарата НАС-1 для мононуклеаров периферической крови человека (МПК), определенная в МТТ-тесте. В таблице приведены значения оптической плотности при 630 нм

	Концентрация НАС-1, мкг/мл				
	100	10	1	0.1	0 (контроль клеток, без препарата)
ОП <sub>630</sub>	1,101	1,173	1,127	1,100	1,159

Таблица 4  
Жизнеспособность МПК, культивируемых в присутствии различных концентраций препарата НАС-1, определенная в МТТ-тесте (в % от контроля клеток без препарата)

	Концентрация НАС-1, мкг/мл					TD <sub>50</sub> , мкг/мл
	100	10	1	0.1	0*	
% от контроля клеток без препарата	94,9	101,2	97,2	95,9	100,0*	>1000

\* За 100% принят контроль клеток без препарата

Таким образом, препарат фракции гуминовых кислот НАС-1, являющийся предметом данного изобретения, характеризуется низкой цитотоксичностью: жизнеспособность МПК даже при самой высокой концентрации препарата снижается примерно на 5%.

В культуре МПК 50%-ная цитотоксическая доза препарата НАС-1 не была достигнута. Препарат нетоксичен для МПК даже при концентрациях 1000 мкг/мл.

Пример 5. Анти-ВИЧ-активность препарата НАС-1 на модели HIV-1<sub>BRU</sub>/CEM SS

Модель представляет собой Т-лимфобластоидную линию CD4+ клеток CEM SS, в которых активно реплицируется референс-штамм ВИЧ HIV-1<sub>BRU</sub>.

Клетки CEM SS в течение 2 часов инкубируют при 37°C с различными концентрациями НАС-1, а затем заражают вирусом HIV-1<sub>BRU</sub> с множественностью заражения 100 TCID<sub>50</sub>. Через 24 часа планшеты центрифугируют для удаления несвязавшегося вируса при 1200 об/мин 10 мин, и к клеткам добавляют свежую ростовую среду с соответствующими концентрациями НАС-1. Аналогичную процедуру проводят на вторые и третьи сутки. За развитием инфекции наблюдают визуально, оценивая цитопатическое действие.

На 6-7-е сутки отбирают пробы надосадочной жидкости и определяют уровень ингибирования инфекции в опытных образцах по отношению к контролю инфекции (без препарата) на основании данных р24 ИФА по формуле 2.

Формула 2

$(\text{ОП}_{450\text{опыт}} - \text{ОП}_{450\text{контроль клеток}})$

----- x 100 %, где

$(\text{ОП}_{450\text{ контроль инфекции}} - \text{ОП}_{450\text{ контроль клеток}})$

ОП<sub>450</sub> опыт - оптическая плотность в ИФА в лунке с препаратом,

ОП<sub>450</sub> контроль инфекции - оптическая плотность в ИФА в лунке без добавления препарата

ОП<sub>450</sub> контроль клеток - оптическая плотность в ИФА в лунке без добавления вируса.

Постановку анализа р24 ИФА выполняют в соответствии с инструкцией производителя диагностических наборов. В каждую постановку включают положительный контроль (К+) из набора и две параллели отрицательного контроля (К-) из набора.

Результаты определения анти-ВИЧ-активности препарата НАС-1 на модели HIV-1<sub>BRU</sub>/CEM SS приведены в таблице 5.

Таблица 5 Анти-ВИЧ-активность препарата НАС-1 на модели HIV-1 <sub>BRU</sub> /CEM SS (по результатам определения в р24 ИФА)						
Конц. НАС-1, мкг/мл	10	1	0,1	0 (без препарата)	ED <sub>50</sub> , мкг	IS (TD <sub>50</sub> /ED <sub>50</sub> )
ОП <sub>450</sub>	0,128	0,160	2,582	2,936	0,29	2000-4000
% от контроля инфекции	3,1	4,1	87,8			
Подавление инфекции, %	96,9	95,9	12,2			

Как видно из таблицы 5, препарат НАС-1 в концентрации 10 мкг/мл подавляет ВИЧ-инфекцию в культуре *in vitro* на 96,9% и в концентрации 1 мкг/мл - на 95,6. В культуре CEM SS 50%-ная цитотоксическая доза препарата НАС-1 не была достигнута. Для него характерна низкая цитотоксичность. Препарат нетоксичен для клеток CEM SS при концентрации 1000 мкг/мл. Значение IS находится в пределах 2000 - 4000.

Таким образом, препарат фракции гуминовых кислот НАС-1, являющийся предметом данного изобретения, проявляет сильную анти-ВИЧ-активность при низкой цитотоксичности.

Пример 6. Анти-ВИЧ-активность препарата НАС-1 на модели первичный изолят ВИЧ1/МПК

МПК получают и стимулируют, как описано в примере 4. МПК, полученные от трех здоровых неинфицированных ВИЧ доноров, смешивают непосредственно перед заражением, инкубируют с различными концентрациями препарата и заражают клиническим изолятом с множественностью инфекции 100 TCID<sub>50</sub>. Культивирование и определение ингибирования инфекции выполняют, как описано в примере 5. Результаты определения анти-ВИЧ-активности препарата НАС-1 на модели первичный изолят ВИЧ1/МПК приведены в табл.6.

Таблица 6 Анти-ВИЧ-активность препарата НАС-1 на модели первичный изолят ВИЧ1/МПК (по результатам определения в р24 ИФА)						
Конц. НАС-1, мкг/мл	10	1	0,1	0 (без препарата)	ED <sub>50</sub> , мкг	IS (TD <sub>50</sub> /ED <sub>50</sub> )
ОП <sub>450</sub>	0,076	0,144	2,658	2,850	0,29	>3448
% от контроля инфекции	2,0	4,4	93,2			
Подавление инфекции, %	98	95,6	6,8			

Как видно из таблицы 6, препарат НАС-1 на модели первичный изолят ВИЧ1/МПК подавляет ВИЧ-инфекцию в культуре *in vitro* в концентрации 10 мкг/мл на 98% и при концентрации 1 мкг/мл на 95,6%. Значение индекса селективности (IS), который представляет собой отношение 50-процентной токсической дозы к 50-процентной эффективной дозе (TD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub>) и отражает терапевтическую ценность препарата, превышает 3000.

Таким образом, препарат фракции гуминовых кислот НАС-1, являющийся предметом данного изобретения, является малотоксичным и обладает высоким ингибирующим действием на ВИЧ-инфекцию.

Пример 7. Приготовление суппозитория, содержащего препарат НАС-1

Суппозитории массой 1,3 г готовят на основе масла какао или твердого кондитерского жира с эмульгатором, которые легко высвобождают активную субстанцию при температуре тела человека. С учетом того, что доза активной субстанции (препарата НАС-1) 100 мкг/мл нетоксична и эффективна *in vitro*, эта доза может быть рекомендована для использования в составе суппозитория.

Предыдущие описания и примеры приведены в качестве иллюстрации и не исчерпывают возможностей данного изобретения.

Формула изобретения

- 5 1. Средство против передачи ВИЧ/СПИД половым путем, выполненное в виде суппозитория, содержащего фармакологически приемлемую основу и активную субстанцию, отличающееся тем, что в качестве активной субстанции с анти-ВИЧ-активностью используют фракцию гуминовых кислот, выделенных из окисленного бурого угля, а в качестве основы используется масло какао или твердый кондитерский
- 10 жир и эмульгатор.
2. Способ профилактики ВИЧ-инфекции путем введения, по меньшей мере, одного суппозитория, отличающийся тем, что средство по п.1, выполненное в виде суппозитория, вводят интравaginaльно за 30 мин до полового контакта.

15

20

25

30

35

40

45