



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2006100574/15, 10.01.2006

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
10.01.2006

(45) Опубликовано: 20.08.2007 Бюл. № 23

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: MURPHY M.E. at al. In vitro antiviral
activity of lactoferrin and ribavirin upon
hantavirus. Arch. Virol. 2000, 145(8): 1571-
82, реферат. RU 2135518 C1, 27.08.1999. RU
2116798 C1, 10.08.1998. RU 2193039 C2,
20.11.2002.

Адрес для переписки:

690022, г. Владивосток, пр-кт 100 лет
Владивостока, 159, Тихоокеанский институт
биоорганической химии ДВО РАН, зав.
патентным отделом Н.И. Стадниченко

(72) Автор(ы):

Макаренкова Илона Дамировна (RU),
Компанец Галина Геннадьевна (RU),
Беседнова Наталия Николаевна (RU),
Звягинцева Татьяна Николаевна (RU),
Шевченко Наталия Михайловна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Тихоокеанский институт биоорганической химии
Дальневосточного отделения Российской
академии наук (ТИБОХ ДВО РАН) (RU),
Государственное учреждение Научно-
исследовательский институт эпидемиологии и
микробиологии Сибирского отделения
Российской академии медицинских наук (ГУ
НИИЭМ СО РАМН) (RU)

(54) СРЕДСТВО, ОБЛАДАЮЩЕЕ ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

(57) Реферат:

Изобретение относится к фармацевтической
промышленности и используется в качестве
средства против вируса Hantaan - возбудителя
геморрагической лихорадки с почечным синдромом
(ГЛПС). Применение фукоидана в качестве
средства, обладающего противовирусной

активностью в отношении вируса Hantaan -
возбудителя геморрагической лихорадки с
почечным синдромом. Фукоидан обладает высокой
противовирусной активностью в отношении вируса
Hantaan, возбудителя геморрагической лихорадки с
почечным синдромом. 4 табл.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 304 443** ⁽¹³⁾ **C1**

(51) Int. Cl.

A61K 36/03 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: **2006100574/15, 10.01.2006**

(24) Effective date for property rights: **10.01.2006**

(45) Date of publication: **20.08.2007 Bull. 23**

Mail address:

**690022, g.Vladivostok, pr-kt 100 let
Vladivostoka, 159, Tikhookeanskij institut
bioorganicheskoj khimii DVO RAN, zav.
patentnym otdelom N.I. Stadnichenko**

(72) Inventor(s):

**Makarenkova Iona Damirovna (RU),
Kompanets Galina Gennad'evna (RU),
Besednova Natalija Nikolaevna (RU),
Zvjagintseva Tat'jana Nikolaevna (RU),
Shevchenko Natalija Mikhajlovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Tikhookeanskij institut bioorganicheskoj
khimii Dal'nevostochnogo otdelenija
Rossijskoj akademii nauk (TIBOKh DVO RAN)**

(RU),

**Gosudarstvennoe uchrezhdenie Nauchno-
issledovatel'skij institut ehpidemiologii i
mikrobiologii Sibirskogo otdelenija
Rossijskoj akademii meditsinskikh nauk (GU
NIIeM SO RAMN) (RU)**

(54) **AGENT POSSESSING ANTIVIRAL ACTIVITY**

(57) Abstract:

FIELD: medicine, virology, pharmaceutical industry, pharmacy.

SUBSTANCE: invention proposes using drug fucoidan as an agent possessing antiviral activity with respect to Hantaan virus representing pathogen of hemorrhagic fever with renal syndrome. Fucoidan possesses high antiviral

activity with respect to Hantaan virus representing a pathogen of hemorrhagic fever with renal syndrome. Invention can be used as an agent against Hantaan virus representing a pathogen of hemorrhagic fever with renal syndrome.

EFFECT: valuable property of agent.

4 tbl

RU 2 304 443 C1

RU 2 304 443 C1

Изобретение относится к медицине и касается средств, обладающих противовирусной активностью в отношении вируса Hantaan, возбудителя геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС).

5 Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом занимает одно из первых мест среди природно-очаговых инфекций в нашей стране, а также в ряде других стран, и характеризуется развитием иммунокомплексного генерализованного деструктивного панваскулита с последующим возникновением диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови (ДВС-синдрома) и нарушением микроциркуляции. Важная роль в развитии заболевания принадлежит нарушениям механизмов клеточного и гуморального
10 иммунитета [Иванис В.А. Иммунопатогенез, клиника, иммунокорригирующая терапия геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС) в регионе циркуляции разных серотипов хантавируса. Автореферат докторской диссертации. 2004, 52 с.; Сиротин Б.З. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом. Хабаровск. 1994, 302 с.]. Поэтому актуален поиск новых средств для лечения этого заболевания.

15 До сих пор лечение больных ГЛПС является сложной задачей. Использование противовирусных препаратов, в частности рибавирина, не нашло широкого применения в практике и согласно данным литературы, остается спорным вопросом [Huggins JW., et al. Ribavirin therapy for Hantaan virus infection in suckling mice. J. Infect. Dis. 1986, 153(3):489-497. Mertz C.J et al. Placebo-controlled, double-blind trial of
20 intravenous ribavirin for the treatment of hantavirus cardiopulmonary syndrome in North America. Clin. Infect Dis. 2004, 1;39(9):1307-13].

В связи с тем, что тяжесть течения заболевания во многом определяют иммунные нарушения, в комплексном лечении стали применять иммунокорректирующую терапию. До
25 настоящего времени в медицинской практике использовали специфический иммуноглобулин и α -интерферон, недавно появились данные о применении в комплексном лечении ГЛПС ронколейкина [Иванис В.А. Иммунопатогенез, клиника, иммунокорригирующая терапия геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС) в регионе циркуляции разных серотипов хантавируса. Автореферат докторской диссертации. 2004, 52 с.].

30 Известно применение противовирусного препарата амиксина в комплексной терапии ГЛПС [RU 2196576 C1, 2003.01.20]. Амиксин относится к низкомолекулярным синтетическим соединениям флуоренонов и является пероральным индуктором эндогенного интерферона. Воздействует преимущественно на Т-клетки, а также на энтероциты, гепатоциты и гранулоциты и стимулирует в них синтез интерферонов 1 и 2
35 типов.

Показано применение нестероидного противовоспалительного препарата йодантипирина на фоне общепринятой терапии ГЛПС [RU 2181046 C2, 2002.04.10]. Йодантипирин относится к группе производных пиразолола, обладает
40 противовоспалительным, антивирусным, иммуностимулирующим и интерферогенным свойствами. Препарат является индуктором интерферонов, существенно повышает активность фибропластов, задерживает проникновение вируса в клетку за счет стабилизирующего действия на биологические мембраны, значительно стимулирует продукцию антител. Несмотря на то, что побочного действия при назначении индукторов интерферона не выявлено, следует отметить возможность обострения заболеваний
45 желудочно-кишечного тракта и развитие аллергических реакций.

Известно, что одним из пусковых этапов в развитии вирусных инфекций является прикрепление вируса к клеткам-мишеням. Изучение механизма репликации вирусов показало, что некоторые вещества могут действовать избирательно, не затрагивая клетку-
50 хозяина [Ершов Ф.И. Антивирусные препараты. М., 1998, 192 с.]. Поэтому актуальным является поиск новых, высокоэффективных нетоксичных биологически активных препаратов для прерывания или полного блокирования адсорбции вируса Hantaan.

Наиболее близким к заявляемому средству по механизму действия на хантавирус является лактоферрин [Kariwa H. et al. In vitro antiviral activity of lactoferrin

and ribavirin upon hantavirus. Arch Virol. 2000, 145(8):1571-82]. Лактоферрин - железосвязывающий гликопротеин с высокой молекулярной массой обнаружен в молозиве, слюне, слезах, продуцируется клетками железистого эпителия, является маркером воспалительного процесса и одним из факторов неспецифической защиты организма, обладает антиоксидантным действием, участвует в развитии иммунного ответа [Сухарев А.Е. и др. Вопросы медицинской химии, 1990, 3:81-83]. Установлено, что бычий лактоферрин препятствует адсорбции хантавирусов на культуре клеток, подавляя их инфицирование как при обработке вируса, так и клеток. Связываясь с вирусными частицами, лактоферрин препятствует их проникновению в клетки, тем самым предупреждая или ослабляя развитие заболевания. В то же время отмывание обработанных лактоферрином клеток фосфатно-солевым буфером снижает ингибирующее действие, что свидетельствует о непрочной адгезии препарата к клеткам [Kariwa H. et al. In vitro antiviral activity of lactoferrin and ribavirin upon hantavirus. Arch Virol. 2000,145(8):1571-82].

Задача изобретения - расширение арсенала средств, обладающих активностью против вируса Hantaan.

Задача решена применением фукоидана в качестве средства, обладающего противовирусной активностью за счет ингибирования адсорбции на клетках-мишенях вируса Hantaan - возбудителя геморрагической лихорадки с почечным синдромом.

Известно применение фукоидана из *Fucus evanescens* в качестве средства, обладающего антикоагулянтным и иммуностропным действием [RU 2247574 C2 A61K 35/80; Кузнецова Т.А., Запорожец Т.С., Беседнова и др. Иммуностимулирующая и антикоагулянтная активность фукоидана из бурой водоросли Охотского моря *Fucus evanescens*. Антибиотики и химиотерапия. 2003, 48(4): 11-13], применение фукоидана из *Laminaria japonica* - для ингибирования ВИЧ-инфекции [RU 2019186 C1, 1994.09.15].

Препараты фукоидана из *Laminaria sichorioides*, *Laminaria japonica*, *Fucus evanescens* действуют на систему комплимента [Tatiana N. Zvyagintseva, Natalia M. Shevchenko, Irina V. Nazarova et al. "Inhibition of complement activation by water-soluble polysaccharides of some far-eastern brown seaweeds". CBP. Part C. 126. 2000, 209-215]

. Фукоидан из *Laminaria japonica* стимулирует фагоцитарную и бактерицидную активность нейтрофилов [Запорожец Т.С., Макаренкова И.Д. и др. Активация эффекторных функций нейтрофилов биополимерами морских гидробионтов. Медицинская иммунология, 2003, 5(1-2):149-156].

В отношении фукоиданов, выделенных из других видов водорослей, установлено, что фукоидан из *Leathesia difformis* снижает проникновение в клетку вируса простого герпеса I и II типа и цитомегаловируса [Feldman S.C., et al. Antiviral properties of fucoidan fractions from *Leathesia difformis*. Phytomedicine. 1999, 6(5):335-40.], фукоидан из *Sargassum horneri* in vitro ингибирует прикрепление и пенетрацию вирусов простого герпеса I, цитомегаловируса и вируса иммунодефицита человека I типа [Hoshino T. et al. An antivirally active sulfated polysaccharide from *Sargassum homeri* (TURNER) C. AGARDH. Biol. Pharm. Bull. 1998, 21(7):730-4.], фукоидан из *Macrocystis pyrifera* подавляет действие вируса везикулярного стоматита [Mayer A.MS. et al. Biological activity in *Macrocystis pyrifera* from Argentina: sodium alginate, fucoidan and laminaran. I. Antitumor, cytotoxicity and humoral response. Hydrobiologia 1987, 151:483-489], сульфатированные полисахариды из водоросли *Sargassum patens* подавляют адсорбцию и репликацию вируса простого герпеса 2 типа [Zhu W., et al. Antiviral property and mode of action of a sulphated polysaccharide from *Sargassum patens* against herpes simplex virus type 2. Int. J. Antimicrob. Agents. 2004,24(3), 279-83].

Однако новое назначение фукоидана, заявляемого в качестве средства, ингибирующего адсорбцию хантавируса, не вытекает с очевидностью из его известных свойств и обнаружено авторами впервые.

Препараты фукоидана, обладающего активностью против вируса Hantaan, получают в результате осуществления способа комплексной переработки бурых водорослей,

разработанного в Тихоокеанском институте биоорганической химии ДВО РАН [RU 2240816 C1, 27.11.2004]. Структурные характеристики препаратов фукоидана представлены в вышеуказанном источнике информации.

Технический результат, обеспечиваемый изобретением, заключается в более выраженном ингибирующем действии фукоидана на адсорбцию вируса Hantaan. Установлено, что при отмывании буфером клеток, обработанных фукоиданом, ингибирующее действие фукоидана на адсорбцию хантавируса не уменьшается в отличие от прототипа.

Технический результат заключается также в сочетании ингибирующих свойств фукоидана на адсорбцию вируса Hantaan, с его антикоагулянтным и иммуностимулирующим действием в широком диапазоне доз. Это является очень важным преимуществом заявляемого средства по сравнению с известными препаратами, используемыми в комплексном лечении геморрагической лихорадки с почечным синдромом, т.к. известно, что это заболевание сопровождается выраженными нарушениями механизмов клеточного и гуморального иммунитета и возникновением тромболитических явлений.

Заявляемое средство нетоксично. Технология его производства экологически чистая, а источник получения фукоидана - бурые водоросли широко распространены у побережья северных и восточных морей России и характеризуются быстрым возобновлением. Все эти преимущества открывают возможность для производства заявляемого средства и его применения в комплексном лечении ГЛПС с официальными лечебными препаратами.

Исследование острой токсичности фукоидана.

Проведено на линейных мышах при внутрибрюшинном и пероральном способах введения в дозах 0,5, 5, 25, 50 и 250 мг/кг, срок наблюдения составил 10 дней.

Изучаемые показатели: выживаемость, общая масса тела, общее состояние. Контрольные животные получали физиологический раствор либо дистиллированную воду. Все мыши, получившие фукоидан внутрибрюшинно (в/б) или перорально (п/о), оставались живыми в течение всего срока наблюдения (таблица 1).

| | | Таблица 1 | | | | | | | | | |
|---|--------------------------|-----------|----|----|----|----|----|----|----|----|--|
| Выживаемость мышей при внутрибрюшинном и пероральном введении фукоидана | | | | | | | | | | | |
| Доза (мг/кг), способ введения | Сроки наблюдения (сутки) | | | | | | | | | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | |
| 0,5 в/б | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | |
| 5 в/б | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | |
| 25 в/б | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | |
| 50 в/б | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | |
| 250 в/б | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | |
| 50 п/о | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | |
| 250 п/о | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | |
| Контроль | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | |

Наблюдение в динамике за массой тела мышей, получивших фукоидан, не выявило различий по сравнению с контролем. Таким образом, установлено, что фукоидан не токсичен в исследуемом диапазоне доз (от 0,5 до 250 мг/кг).

Изучение действия фукоидана на адсорбцию хантавируса на модели перитонеальных макрофагов.

Материалы.

1. Мыши - белые, беспородные, вес 18-20 г.

2. Вирус Hantaan - штамм 76-118, выделенный из суспензии легких полевой мыши *Apodemus agrarius koreae*. В эксперименте использовали вирусосодержащую культуральную жидкость, полученную при культивировании вируса на клетках Vero E6 (перевиваемая линия почек африканской зеленой мартышки, C1106-CRL-1586 American Type Collection).

3. Препараты фукоидана из бурых водорослей *Laminaria japonica* (L. japonica), *Laminaria cichorioides* (L. cichorioides), *Fucus evanescens* (F. evanescens).

4. Среды: для роста клеток Vero E6 и размножения хантавируса использовалась среда

Игла МЭМ с двойным набором аминокислот и витаминов, дополненная L-глутамином (1 мг/мл), 7% СЭК, пенициллином (100 ЕД/мл) и стрептомицином (50 мг/мл), а также 3,5% сыворотки эмбрионов коров (СЭК). Для выделения макрофагов использовали питательную среду 199 (производство ГУП ИПВЭ им. М.П.Чумакова РАМН, Москва).

5 Методы исследования.

Макрофаги получали путем введения в брюшную полость белым беспородным мышам 1 мл стерильного 10% пептона. Животных вскрывали на 3 сутки. Для выделения макрофагов брюшную полость промывали средой 199 с гепарином (5 Ед/мл). Пробирки предварительно обрабатывали силиконом (15-30 мин) и держали на льду, чтобы избежать прилипания макрофагов к стенкам и дну пробирок. Полученный экссудат фильтровали и центрифугировали 10 мин при 1000 об/мин (2 раза). Клетки считали в камере Горяева (0,1 экссудата + 4,9 мл 3% уксусной кислоты). Клеточную суспензию ресуспендировали в среде 199 до объема 2×10^6 [Методы лабораторной диагностики геморрагической лихорадки с почечным синдромом. Методические рекомендации. М., 1982].

15 В реакции нейтрализации на культуре клеток Vero E6 под действием фукоидана (в дозе 5 мг/кг) из *Laminaria japonica* снижение тканевой инфекционной дозы вируса (ТКИД₅₀/0,2) по отношению к контролю составило 2,0 lg при предварительной обработке клеток и 3,0 lg при обработке вируса. Действие фукоидана из *Laminaria sichorioides* составило 2,0 и 2,5 lg соответственно. Наименьшим действием обладал фукоидан из *Fucus evanescens* (снижение на 1,5 и 2,0 lg).

20 Таким образом, проведенное исследование показало, что все исследованные препараты фукоидана препятствуют адсорбции хантавируса на культуре клеток Vero E6. Снижение ТКИД вируса свидетельствует об эффективности действия фукоидана, которое более выражено при предварительной обработке вируса.

25 Принимая во внимание, что макрофаги являются клетками-мишенями для хантавируса, и, учитывая полученные результаты, мы продолжили исследование действия фукоидана на модели перитонеальных макрофагов мышей *in vitro*.

Для исследования ингибирующего действия фукоидана на адсорбцию хантавируса применяли метод Брилиса [Брилис В.И. и др. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов. Лаб. дело 1986, 4:210-212.] в собственной модификации.

30 1. Для предварительной обработки макрофагов, в стерильные парные флаконы с покровными стеклами вносили по 2 мл клеток и 0,2 мкл фукоидана в конечной концентрации - 5, 2,5 и 0,5 мг/мл. Клеточную суспензию инкубировали при температуре 37°C в течение 15, 30 мин и 1 ч. Затем к обработанным макрофагам добавляли по 0,2 мкл вирусосодержащей жидкости (титр 10^5 ТКИД 50/мл), и оставляли для взаимодействия, в зависимости от условий эксперимента, на 15, 30 мин и 1 ч при температуре 37°C.

40 2. Для предварительной обработки хантавируса в стерильные парные флаконы с покровными стеклами вносили по 0,2 мкл вирусосодержащей жидкости и фукоидана в конечной концентрации - 5, 2,5 и 0,5 мг/мл. Затем инкубировали при температуре 37°C в течение 15, 30 мин и 1 ч и добавляли по 2 мл необработанных макрофагов. Клеточную взвесь оставляли для взаимодействия на 15, 30 мин и 1 ч при температуре 37°C.

В контроле использовали интактные макрофаги и вирусосодержащую жидкость. Время взаимодействия также составляло 15, 30 мин и 1 ч при температуре 37°C.

45 3. Для изучения влияния фукоидана на дальнейшее размножение вируса Hantaan в культуре макрофагов после предварительного контакта вируса с фукоиданом и макрофагов с фукоиданом в течение 1 часа культуральную жидкость и не прикрепившиеся макрофаги сливали, препарат отмывали дважды средой МЭМ. Затем во флаконы добавляли поддерживающую среду МЭМ, содержащую 3,5% СЭК, и инкубировали в течение 2, 4, 6 часов при температуре 37°C, исследуя препарат на каждый временной интервал. В контроле использовали интактные макрофаги и вирусосодержащую жидкость. Время взаимодействия составляло 2, 4 и 6 ч при температуре 37°C.

50 После взаимодействия вирусосодержащей жидкости с макрофагами фиксированные на

стеклах клетки отмывали физиологическим раствором (3 сек), фиксировали в 96° спирте (8-10 сек) и окрашивали в непрямом методе флюоресцирующих антител - НФМА [Беседнова Н.Н. Экспериментальное и клинико-иммунологическое изучение псевдотуберкулезной инфекции - дис. док. мед. наук, 1980, 352 с.]. На фиксированные парные покровные стекла наносили иммунные мышинные сыворотки, содержащие антитела к вирусу Hantaan (50 мкл) и оставляли во влажной камере при температуре 37°С на 45 минут. В качестве вторичных антител использовали рабочее разведение антивидовых, приготовленных против иммуноглобулинов мыши, иммуноглобулины меченные флюоресцеином изотиоцианатом - ФИТЦ (производство Института им. Н.Ф.Гамалеи, Москва) в дозе 50 мкл. Для контрастирования препарата применяли раствор голубого Эванса на ФСБ рН 7,2, в конечной концентрации 1:100000. После нанесения иммуноглобулина препарат оставляли для контакта на 45 минут во влажной камере при температуре 37°С. После каждого контакта препарат трижды в течение 3 минут отмывали фосфатно-солевым буфером рН 7,2, затем двукратно дистиллированной водой и подсушивали при комнатной температуре. Окрашенные препараты просматривали в люминесцентном микроскопе ЛЮМАМ-И2, используя вводно-иммерсионный объектив (с увеличением×100). Наличие антигена вируса оценивали по наличию яркого зеленого люминесцентного свечения клеток. Результаты подсчитывали по формуле: среднее количество светящихся клеток /100 макрофагов (СКК/100 МФ). Результаты представлены в таблице 2.

Влияние фукоидана на адсорбцию вируса Hantaan

| Вещества | Контроль | | Обработка макрофагов | |
|----------------------------|------------|-----|----------------------|------------|
| | 1 час | | 1 час | |
| Доза 5,0 мг/кг | Абс. | % | Абс. | % |
| Фукоидан (L. japonica) | 21.87±2.67 | 100 | 6.84±1.55 | ↓ до 31.27 |
| Фукоидан (L. cichorioides) | 22.44±9.0 | 100 | 6.47±3.06 | ↓ до 28.83 |
| Фукоидан (F. evanescens) | 22.44±9.0 | 100 | 9.66±4.56 | ↓ до 43.05 |
| Вещества | Контроль | | Обработка вируса | |
| | 1 час | | 1 час | |
| Доза 5,0 мг/кг | Абс. | % | Абс. | % |
| Фукоидан (L. japonica) | 21.87±2.67 | 100 | 2.77±0.82 | ↓ до 12.66 |
| Фукоидан (L. cichorioides) | 33.74±2.3 | 100 | 5.27±1.39 | ↓ до 15.61 |
| Фукоидан (F. evanescens) | 33.74±2.3 | 100 | 9.70±4.81 | ↓ до 28.74 |

Результаты эксперимента показали, что все препараты фукоидана в дозе 5 мг/кг ингибируют адсорбцию вируса Hantaan. Наибольшим действием обладает фукоидан из L. japonica. Поэтому в дальнейших экспериментах мы изучали его действие на адсорбцию в зависимости от дозы и сроков взаимодействия. Результаты исследования представлены в таблице 3.

Влияние фукоидана (L. japonica) на адсорбцию вируса Hantaan на модели перитонеальных макрофагов в зависимости от дозы и времени взаимодействия

| Контроль | Фукоидан (L. japonica) 5 мг/кг | | | | | |
|-------------------|----------------------------------|--------------|-------------------|-------------|---------------|--|
| | 1 час | | 1 час (макрофаги) | | 1 час (вирус) | |
| 21.22±2.0 100% | 6.98±1.1** | ↓ до 32.89% | 3.15±0.69* | ↓ до 14.84% | | |
| 30 мин | | 30 мин | | 30 мин | | |
| 27.97±2.33 100% | 8.41±1.51** | ↓ до 30.06 % | 3.34±0.68* | ↓ до 11.94% | | |
| 15 мин | | 15 мин | | 15 мин | | |
| 37.59±5.13 100% | 9.05±1.28** | ↓ до 24.07% | 5.035±1.02** | ↓ до 13.39% | | |
| Контроль | Фукоидан (L. japonica) 2,5 мг/кг | | | | | |
| | 1 час | | 1 час (макрофаги) | | 1 час (вирус) | |
| 21.22±2.0 100% | 7.71±1.28 ** | ↓ до 36.33% | 4.56±1.62* | ↓ до 21.48% | | |
| 30 мин | | 30 мин | | 30 мин | | |
| 27.97±2.33 100% | 10.79±1.86** | ↓ до 38.57% | 5.015±1.40* | ↓ до 17.92% | | |
| 15 мин | | 15 мин | | 15 мин | | |
| 37.59±5.13 100% | 15.28±2.56** | ↓ до 40.64% | 5.79±0.79** | ↓ до 15.40% | | |

| Контроль | | Фукоидан (L. japonica) 0,5 мг/кг | | | |
|------------------------------------|------|----------------------------------|-------------|---------------|--------------|
| 1 час | | 1 час (макрофаги) | | 1 час (вирус) | |
| 21.22±2.0 | 100% | 9.62±0.94** | ↓ до 45.33% | 6.32±1.97* | ↓ до 29.78 % |
| 30 мин | | 30 мин | | | |
| 27.97±2.33 | 100% | 12.53±1.97** | ↓ до 44.79% | 7.87±0.57* | ↓ до 28.13% |
| 15 мин | | 15 мин | | | |
| 33.14±4.45 | 100% | 15.635±0.005** | ↓ до 47.17% | 5.715±0.005* | ↓ до 17.24% |
| Примечание * - p 0.01; ** - p<0.05 | | | | | |

5

Исследования показали, что фукоидан, при предварительной обработке макрофагов, в дозе 0,5 мг/кг (в течение 15, 30 мин и 1 часа) снижает адсорбцию хантавируса в среднем до 46%. При обработке вируса в течение 15 мин - до 17%, 30 мин и 1 часа - до 29% по отношению к контролю. Действие фукоидана в дозе 2,5 мг/кг - до 38% при обработке макрофагов и до 18% - при предварительном контакте с вирусом. В дозе 5 мг/кг адсорбция хантавируса в среднем снижалась до 29% и до 13,5% соответственно. Установлено, что ингибирующее действие фукоидана более выражено при предварительном контакте с вирусом, тем не менее его действие на макрофаги было также эффективно.

10

15

При исследовании действия фукоидана на размножение вируса Hantaan было установлено, что предварительная обработка препаратом (в дозе 5 мг/кг) при последующем взаимодействии в течение 2, 4 и 6 часов препятствует размножению вируса за счет блокирования рецепторов и ингибирования адсорбции на клетках-мишенях (таблица 4).

20

Влияние фукоидана (Z. japonica) на размножение вируса Hantaan

| Время взаимодействия | Таблица 4 | | | |
|---------------------------|------------|-------------|------------|-------------|
| | Макрофаги | | Вирус | |
| Контроль 2 часа | 11.57±0.62 | 100% | 11.57±0.62 | 100% |
| Фукоидан 5 мкг/мл 2 часа | 3.95±0.81 | ↓ до 34.18% | 3.86±0.52 | ↓ до 33.40% |
| Контроль 4 часа | 16.72±3.69 | 100% | 16.72±3.69 | 100% |
| Фукоидан 5 мкг/мл 4 часа | 5.53±0.46 | ↓ до 33.11% | 5.42±0.069 | ↓ до 32.41% |
| Контроль 6 часов | 19.15±0.71 | 100% | 19.15±0.71 | 100% |
| Фукоидан 5 мкг/мл 6 часов | 8.45±0.12 | ↓ до 44.12% | 7.28±0.36 | ↓ до 38.01% |

25

30

Известно, что на поверхностной оболочке хантавируса расположены многочисленные выступы, являющиеся гликопротеинами G-1 и G-2 [Dantas JR. Jr., et. al. Characterization of glycoproteins of viruses causing hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) using monoclonal antibodies. Virol 1986, 151: 379-384], которые обладают гемагглютинирующей активностью и индуцируют рН-зависимое клеточное взаимодействие [Arikawa J. et. al. Characterization of Hantaan virus envelope glycoprotein antigenic determinants defined by monoclonal antibodies. J. Gen. Virol. 1989, 70: 615-624]. Эти функции играют важнейшую роль в прикреплении вируса к поверхности чувствительных клеток при "раздевании" вируса на начальной стадии инфекции. Мы считаем, что при обработке вируса фукоиданом происходит блокирование гликопротеинов вируса, что ведет к ингибированию адсорбции на клетках-мишенях и последовательно приводит к снижению репликации вируса.

35

40

Механизм противовирусного действия фукоидана при обработке макрофагов реализуется за счет их связывания с определенными мембранными рецепторами на клеточной поверхности. Блокирование рецепторов и изменение поверхностных структур клеток является препятствием для адсорбции и дальнейшей пенетрации вируса в клетки макроорганизма.

45

50

Формула изобретения

Применение фукоидана в качестве средства, обладающего противовирусной активностью в отношении вируса Hantaan, возбудителя геморрагической лихорадки с почечным синдромом.