



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) **RU** (11) **2 480 227** (13) **C2**

(51) МПК

A61K 36/06 (2006.01)

A61K 31/785 (2006.01)

A61P 31/22 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

A61P 31/16 (2006.01)

A61P 31/18 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2011127305/15, 01.07.2011

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
01.07.2011

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 01.07.2011

(43) Дата публикации заявки: 10.01.2013 Бюл. № 1

(45) Опубликовано: 27.04.2013 Бюл. № 12

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2375073 C1, 10.12.2009. US 5057325 A1, 15.10.1991. US 20040105869 A1, 03.06.2004. BY 10670 C1, 30.06.2008.

Адрес для переписки:

630559, Новосибирская обл., Новосибирский
р-н, р.п. Кольцово, ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор",
зав. патентным отделом, Ю.Н. Мистюрину

(72) Автор(ы):

Теплякова Тамара Владимировна (RU),
Пучкова Лариса Ивановна (RU),
Косогова Татьяна Алексеевна (RU),
Булычев Леонид Егорович (RU),
Шишкина Лариса Николаевна (RU),
Мазуркова Наталья Алексеевна (RU),
Гапшикова Наталья Матвеевна (RU),
Балахнин Сергей Маркович (RU),
Кабанов Алексей Сергеевич (RU),
Казачинская Елена Ивановна (RU),
Афоница Вероника Сергеевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное бюджетное учреждение науки
"Государственный научный центр
вирусологии и биотехнологии "Вектор"
(ФБУН ГНЦ ВИ "Вектор") (RU)

(54) ПРОТИВОВИРУСНОЕ СРЕДСТВО НА ОСНОВЕ МЕЛАНИНА

(57) Реферат:

Изобретение относится к фармацевтической промышленности, а именно к противовирусному средству. Противовирусное средство на основе водорастворимого меланина, полученное экстракцией из базидиального гриба *Inonotus obliquus* и

обладающее противовирусной активностью в отношении вирусов гриппа, простого герпеса 2-го типа, иммунодефицита (ВИЧ-1) и осповакцины. Вышеописанное средство обладает широким спектром противовирусного действия. 4 з.п. ф-лы, 4 табл., 13 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

A61K 36/06 (2006.01)*A61K 31/785* (2006.01)*A61P 31/22* (2006.01)*A61P 31/12* (2006.01)*A61P 31/16* (2006.01)*A61P 31/18* (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2011127305/15, 01.07.2011**(24) Effective date for property rights:
01.07.2011

Priority:

(22) Date of filing: **01.07.2011**(43) Application published: **10.01.2013 Bull. 1**(45) Date of publication: **27.04.2013 Bull. 12**

Mail address:

**630559, Novosibirskaja obl., Novosibirskij r-n,
r.p. Kol'tsovo, FBUN GNTs VB "Vektor", zav.
patentnym otделom, Ju.N. Mistjurinu**

(72) Inventor(s):

**Tepljakova Tamara Vladimirovna (RU),
Puchkova Larisa Ivanovna (RU),
Kosogova Tat'jana Alekseevna (RU),
Bulychev Leonid Egorovich (RU),
Shishkina Larisa Nikolaevna (RU),
Mazurkova Natal'ja Alekseevna (RU),
Gashnikova Natal'ja Matveevna (RU),
Balakhnin Sergej Markovich (RU),
Kabanov Aleksej Sergeevich (RU),
Kazachinskaja Elena Ivanovna (RU),
Afonina Veronika Sergeevna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federal'noe bjudzhetnoe uchrezhdenie nauki
"Gosudarstvennyj nauchnyj tsentr virusologii i
biotekhnologii "Vektor" (FBUN GNTs VI
"Vektor") (RU)**

(54) MELANINE ANTIVIRAL AGENT

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention refers to pharmaceutical industry, namely an antiviral agent. The soluble melanine antiviral agent prepared by extraction of *Inonotus obliquus* basidium fungus and possessing

antiviral activity on viruses of influenza, type 2 herpes simplex, immunodeficiency (HIV-1) and variolovaccine.

EFFECT: agent possess a wide spectrum of antiviral action.

6 cl, 4 tbl, 13 ex

Изобретение относится к противовирусному средству на основе меланина, полученного из высшего базидиального гриба *Inonotus obliquus* (чага), и может быть использовано в биотехнологии, фармацевтической промышленности и медицине.

Все виды меланиновых пигментов являются длинноцепочечными полимерами с гигантским молекулярным весом и сложной жидкокристаллической структурой. Известны сообщения о практическом использовании синтетических, полусинтетических и выделенных из биологических источников меланинов в медицине, косметологии, а благодаря их полупроводниковым свойствам в технике и электронике.

Меланины, выделенные из микроорганизмов, показывают сходные свойства с меланинами животного происхождения. Это фармакологически активные вещества, обладающие антиоксидантными, антитоксическими, противовоспалительными, иммуностимулирующими свойствами, защищающие от фотодинамических повреждений и др.

Меланины - аморфные высокомолекулярные вещества, не растворимые в воде, минеральных кислотах, органических растворителях; хорошо растворимы в щелочах, а затем выпадают в осадок при подкислении растворов, что используется для их выделения.

По предшественникам меланины разделяют на эумеланины, феомеланины и алломеланины. Эумеланины (черные) и феомеланины (желтые, красные и коричневые) распространены у животных, алломеланины (черные) - в растениях, грибах, бактериях. Предшественник эумеланинов - тирозин, из него в организме получают пигменты, содержащие С, Н, N и О. Предшественники алломеланинов - дифенолы (пирокатехин и др.), из них образуются меланины, не содержащие азота.

Содержащиеся в грибах пигменты меланины - самые мощные биопротекторы, защищающие живую клетку от неблагоприятных внешних и внутренних воздействий. Это также и самые сильные природные антиоксиданты. Меланины способны нейтрализовать различные свободные радикалы, возникающие в живой клетке под действием проникающей радиации, ультрафиолетового облучения, различных токсинов и ферментов патогенных бактерий. У многих медицинских грибов, прежде всего у трутовиков, содержание меланинов высоко и может достигать 30% сухой массы и даже более. Часть грибных меланинов способна переходить в раствор и может всасываться в желудочно-кишечном тракте, разноситься кровью по организму и защищать живые клетки от разрушительного действия свободных радикалов (http://www.amrita.net.ua/pi/products_id/329).

Установлено, что меланин из чаги *Inonotus obliquus* и некоторых других трутовых грибов обладает фото- и радиопротекторным, антиоксидантным и генопротекторным свойствами [Щерба В.В., Бабицкая В.Г., Курченко В.П., Иконникова Н.В., Кукулянская Т.А. Антиоксидантные свойства меланиновых пигментов грибного происхождения // Прикладная биохимия и микробиология. 2000. - Т.36. - №5. - С.569-574; Сушинская Н.В., Курченко В.П., Горовой Л.Ф., Сенюк О.Ф. Получение и использование в медицине меланинов из трутовых грибов // Успехи медицинской микологии. - 2005. - Т.6. - С.255-259].

Наиболее близким аналогом (прототипом) является противовирусное средство на основе водорастворимых меланинов, полученных химическим синтезом из следующих компонентов: L-дезоксидопамин, L- дезоксидопамин, цистеин, L-дезоксидопамин/глутатион, L-тирозин, серотонин, допамин, адреналин и норадреналин (Патент США №5057325, МПК А61К 31/195, опубл. 1991 г.). Указанное противовирусное средство может полностью или частично защитить в условиях in

vitro лимфоциты человека от вируса иммунодефицита (ВИЧ-1 и ВИЧ-2).

Однако в публикации отсутствуют сведения о противовирусной активности заявленного средства в отношении других вирусов, в частности вирусов гриппа, простого герпеса, осповакцины.

Техническим результатом предлагаемого изобретения является получение противовирусного средства на основе меланина, обладающего более широким спектром противовирусного действия.

Указанный технический результат достигается тем, что противовирусное средство на основе меланина, согласно изобретению, в качестве меланина оно содержит водорастворимый меланин, полученный экстракцией из базидиального гриба *Inonotus obliquus* и обладающий противовирусной активностью в отношении вирусов гриппа, простого герпеса 2-го типа, иммунодефицита (ВИЧ-1) и осповакцины.

Средство содержит водный раствор меланина из базидиального гриба *Inonotus obliquus* в концентрации от 0,002 мг/мл до 25 мг/мл.

Средство содержит водный раствор меланина из базидиального гриба *Inonotus obliquus* в концентрации от 0,002 мг/мл до 0,2 мг/мл, обладающий активностью против вируса иммунодефицита (ВИЧ-1).

Средство содержит водный раствор меланина из базидиального гриба *Inonotus obliquus* в концентрации от 0,125 мг/мл до 1,56 мг/мл, обладающий активностью против вируса осповакцины.

Средство содержит водный раствор меланина из базидиального гриба *Inonotus obliquus* в концентрации от 0,02 мг/мл до 0,25 мг/мл, обладающий активностью против вируса гриппа.

Средство содержит водный раствор меланина из базидиального гриба *Inonotus obliquus* в концентрации от 0,006 мг/мл до 25,0 мг/мл, обладающий активностью против вируса герпеса 2 типа.

В известных источниках информации отсутствуют сведения о природных меланинах грибного происхождения, в том числе в водорастворимой форме, обладающих антивирусной активностью. При наличии противовирусных свойств у химически синтезированных меланинов (патент США №5057325) неочевидно, что указанные свойства будут проявляться у природных меланинов в водорастворимой форме, что подтверждает новизну и изобретательский уровень заявляемого технического решения.

В качестве сырья, содержащего меланин, в заявленном техническом решении используют базидиальный гриб *Inonotus obliquus* (чага), произрастающий на березах лесной зоны юга Западной Сибири. В Российской Федерации этот гриб развивается на березе бородавчатой и березе белой (*Betula pendula* Roth и *Betula alba* L.), имеет широкий ареал распространения. Препараты гриба *Inonotus obliquus* нашли широкое применение в медицине.

Ниже приведены примеры составов противовирусного средства:

Пример 1. Средство содержит водный раствор меланина из базидиального гриба *Inonotus obliquus* в концентрации 0,002 мг/мл, обладающий активностью против ВИЧ-1.

Пример 2. Средство содержит водный раствор меланина из базидиального гриба *Inonotus obliquus* в концентрации 0,2 мг/мл, обладающий активностью против ВИЧ-1.

Пример 3. Средство содержит водный раствор меланина из базидиального гриба *Inonotus obliquus* в концентрации от 0,125 мг/мл, обладающий активностью

против вируса осповакцины.

Пример 4. Средство содержит водный раствор меланина из базидиального гриба *Inonotus obliquus* в концентрации от 1,56 мг/мл, обладающий активностью против вируса осповакцины.

Пример 5. Средство содержит водный раствор меланина из базидиального гриба *Inonotus obliquus* в концентрации 0,006 мг/мл, обладающий активностью против вируса простого герпеса 2-го типа.

Пример 6. Средство содержит водный раствор меланина из базидиального гриба *Inonotus obliquus* в концентрации 25,0 мг/мл, обладающий активностью против вируса простого герпеса 2-го типа.

Пример 7. Средство содержит водный раствор меланина из базидиального гриба *Inonotus obliquus* в концентрации от 0,02 мг/мл, обладающий активностью против вируса гриппа.

Пример 8. Средство содержит водный раствор меланина из базидиального гриба *Inonotus obliquus* в концентрации 0,25 мг/мл, обладающий активностью против вируса гриппа.

Пример 9. Технология приготовления водорастворимого экстракта меланина из базидиального гриба чага

Вначале осуществляют измельчение грибной массы известным способом с последующим извлечением целевого продукта посредством гидролиза при pH 12-14 под давлением 0,5-07 атм в течение 30 мин или при 50°C в течение 1-2-суток; подкислением фугата после центрифугирования до pH 2,0-3,0, осаждением осадка пигмента центрифугированием при 10000 об/мин в течение 20 мин, промыванием и высушиванием продукта при температуре 50°C. Полученный препарат не растворяется в воде, но хорошо растворяется в щелочах. Водорастворимую форму получают тщательным растворением полученного пигмента в 10% растворе аммиака с последующим мягким выпариванием остаточного аммиака и воды. Полученный препарат полностью растворим в воде.

В готовом виде меланин представляет собой черные кристаллы с ярким мерцающим блеском. Полученные пигменты идентифицировали при помощи качественной реакции с KMnO_4 , H_2O_2 , FeCl_3 . Меланин обесцвечивается под воздействием H_2O_2 , при взаимодействии с FeCl_3 , происходит выпадение хлопьевидного осадка, который растворяется при добавлении избытка хлорида железа, а при добавлении к растворам пигмента KMnO_4 окраска изменялась до зеленой с последующим выпадением осадка и обесцвечиванием растворов [Кукулянская Т.А., Курченко Н.В., Курченко В.П., Бабицкая В.Г. Физико-химические свойства меланинов, образуемых чагой в природных условиях и при культивировании. // Прикладная биохимия и микробиология. 2002. - Т.38. - №1. - С.68-72]. Поглощение УФ и видимого света водными и щелочными растворами пигмента регистрировали на спектрофотометре (Genesys 5 Spectrophotometers, United States). Спектр поглощения раствора меланина имел форму наклонной прямой, характерную для меланинов грибного происхождения [Бабицкая В.Г., Щерба В.В., Иконникова Н.В. Меланиновый комплекс гриба *Inonotus obliquus*. // Прикладная биохимия и микробиология. - 2000. - №4. - Т.36. - С.439-444].

Из водорастворимого сухого меланина приготавливают 2,5% растворы в дистиллированной воде для изучения противовирусных свойств. Растворимость меланина составила 94-98%.

Пример 10. Определение противовирусной активности экстракта меланина в

отношении вируса гриппа на культуре клеток

Данную работу проводили на перевиваемой культуре клеток MDCK. Сначала при добавлении разных разведений препаратов к монослою клеток MDCK определяли концентрации экстрактов, оказывающих токсическое действие на клетки, с использованием инвертированного микроскопа. Для исследования противовирусной активности брали те разведения экстрактов, которые не оказывали токсического действия на клетки MDCK. Противовирусную активность препаратов оценивали в отношении штамма вируса гриппа птиц A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1). Наличие вируса в среде культивирования клеток MDCK определяли через 2 сут после их инфицирования по реакции гемагглютинации (РГА) с 1% эритроцитами кур.

Культуры клеток. Для тестирования противовирусной активности препаратов использовали перевиваемую культуру клеток MDCK, полученных из коллекции культур клеток ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор». Клеточную культуру MDCK получали из лаборатории в виде суспензии с указанной концентрацией. В стерильном месте суспензию разводили предварительно подогретой до температуры +37°C средой Ахсевир - MDCK до концентрации 1×10^5 клеток/мл. По 100 мкл суспензии клеток MDCK вносили в 96-луночные планшеты 12-канальной автоматической пипеткой. Планшеты с клетками помещали в термостат при температуре +37°C, 5% CO₂ и 100% влажности на 2-3 сут до образования клеточного монослоя.

Для определения токсических доз препаратов экстракты разводили несколько раз и оценивали наличие токсического действия в монослоях культуры клеток MDCK с помощью инвертированного микроскопа. Для этого делали разведения исходного препарата в 2 раза, в 10, 50, 100, 500, 1000, 10000 раз средой Ахсевир - MDCK, вносили по 150 мкл в соответствующие лунки планшета и ставили в термостат при температуре +37°C, 5% CO₂ и 100% влажности на 2 сут. Через 2 сут с помощью инвертированного микроскопа оценивали наличие токсического действия в монослоях клеток MDCK, инкубированных с разными концентрациями грибных экстрактов. На следующем этапе для определения противовирусной активности грибных экстрактов брали максимально переносимые концентрации (МПК) и меньшие. Токсичная доза для клеток MDCK (разведение 1:100) составляла 0,25 мг/мл.

Вирус. В работе использовали штамм вируса гриппа птиц A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) и штамм вируса гриппа человека A/Aichi/2/68 (H3N2) из коллекции ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор», наработанные на 10-суточных куриных эмбрионах (КЭ). Концентрацию вируса в исследуемых образцах определяли путем титрования на КЭ или на клетках MDCK, рассчитывали и выражали в lgЭИД₅₀/мл (десятичных логарифмах 50% эмбриональных инфицирующих доз в мл) или в lgТЦД₅₀/мл (десятичных логарифмах 50% тканевых цитопатических доз в мл), соответственно, по методу Спирмана-Кербера. Нарботанные и использованные в работе серии вирусаллантоисной жидкости (ВАЖ) со штаммами вируса гриппа хранили при -70°C.

Концентрации вируса в вирусаллантоисной жидкости (ВАЖ) составляли по разным экспериментам от 6,3 до 8,3 lg ЭИД₅₀/мл (50% эмбриональных инфицирующих доз в мл).

Готовили разведения ВАЖ от 1 до 8 с десятикратным шагом с использованием среды Ахсевир-MDCK, содержащей 2 мкг/мл трипсина. Для определения противовирусной активности препаратов в монослой культуры клеток MDCK вносили по 50 мкл выбранного разведения экстракта и 100 мкл разведения ВАЖ. Заражение клеточного монослоя проводили по общепринятой методике, при этом для культивирования вирусов использовали поддерживающую среду Ахсевир - MDCK (Stem

Alpha, Франция), содержащую 2 мкг/мл трипсина TPCK (Sigma, США). Клетки инкубировали 2 сут при температуре +37°C в атмосфере 5% CO₂ в термостате TC-1/80 СПУ (Россия). Через 2 сут в каждой лунке с помощью инвертированного микроскопа регистрировали ЦПД в монослое клеток и определяли наличие вируса в среде культивирования по реакции гемагглютинации (РГА) с 1% эритроцитами кур.

В качестве контроля использовали:

1) контроль клеток MDCK, культивируемых в питательной среде Axcevir - MDCK (Stem Alpha, Франция), содержащей 2 мкг/мл трипсина TPCK (Sigma, США), без вируса и без препаратов;

2) контроль репродукции вируса гриппа в разведениях с 1 до 8 с десятикратным шагом в клетках MDCK, культивируемых в питательной среде Axcevir - MDCK (Stem Alpha, Франция), содержащей 2 мкг/мл трипсина TPCK (Sigma, США), без внесения разведений грибных экстрактов.

В табл.1 представлены данные по определению противовирусной активности меланина в отношении вируса гриппа птиц A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) на клетках MDCK.

Таблица 1			
Результаты противовирусной активности экстракта меланина в культуре клеток MDCK, инфицированных штаммом вируса гриппа A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1)			
Раствор меланина и его разведение	Эффективная доза раствора меланина, мг/мл	Инфекционность вируса (титр ВАЖ) в клетках MDCK (ИД ₅₀ в IgTЦД ₅₀ /мл) через 2 суток	Индекс нейтрализации ИД ₅₀ конт - ИД ₅₀ опыт (lg) через 2 суток
Контроль вируса		6,7	0
Пример 1. Меланин (1:500)	0,02	4,5	2,2

Как видно из табл.1, индекс нейтрализации вируса раствором меланина составил 2,2 lg, эффективная доза водного раствора меланина при этом была 0,02 мг/мл.

Пример 11. Определение противовирусной активности экстракта меланина в отношении вируса простого герпеса 2-го типа (ВПГ-2)

Штамм MS вируса простого герпеса 2-го типа (ВПГ-2) был получен из Американской коллекции типовых культур (ATCC). В ГНЦ ВБ "Вектор" вирусный штамм прошел 1 пассаж на культуре клеток Vero. До начала работ исходную суспензию, содержащую вирус, хранили в жидком азоте. Штамм Egypt 101 (Eg101) вируса Западного Нила (ВЗН) был получен из Государственной коллекции вирусных штаммов ГУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН (Москва, Россия).

Определение токсичности проб для клеток. Для определения токсичности на клетки в 96-луночные планшеты с культурой клеток Vero вносили экспериментальные пробы, которые предварительно были разведены на питательной среде DMEM (ГНЦ ВБ "Вектор"), содержащей 5% сыворотки. Экспозицию проводили в течение 1 часа при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Затем клетки трехкратно промывали средой DMEM без сыворотки и заливали средой DMEM с 2% сыворотки крупного рогатого скота (ООО "БиолоТ", Москва), прогретой до 56°C. Наблюдение за состоянием клеток, обработанных препаратами и в контрольных, необработанных рядах, проводили в течение семи суток при помощи световой микроскопии. Нетоксичной для клеток Vero по данной методике была исходная концентрация 25,0 мг/мл.

Экспериментальные образцы стерилизовали путем фильтрования через фильтр 0,2 мкм (Millipore, США).

Определение антивирусной активности. Изучение антивирусной активности

грибных проб проводили, руководствуясь методами, представленными в Руководстве по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ и статьей Госфармакопии (Государственная фармакопея СССР. Общие методы анализа. Лекарственное сырье. - М.: Медицина, 1990. - II изд. - Вып.2. - том 2. - С.187-209). Снижение инфекционного титра вируса оценивали после инкубации вирусной суспензии с экспериментальными препаратами в течение часа при 37°C. Далее, эти суспензии препаратов с вирусом вносили в лунки 96-луночных планшетов с культурой клеток. После адсорбции в течение 1 часа при 37°C монослой клеток промывали средой без сыворотки и заливали поддерживающую среду. Снижение инфекционного титра вируса, обработанного или инаktivированного пробами, выражали для вируса простого герпеса 2-го типа (ВПГ-2) в бляшкообразующих единицах (БОЕ). Результаты учитывали визуально при ежедневном наблюдении в световой микроскоп. Протоколы заполнялись на каждые сутки наблюдений. В тот день, когда выявляли ЦПД в лунках контрольного ряда титрования вируса (для ВПГ-2 обычно на 2-3 сут), учитывали результат титрования ВПГ-2 в БОЕ, и инаktivации вируса исследуемыми препаратами, то есть меньшее количество или отсутствие 10-100 БОЕ для ВПГ по сравнению с контролем. Результаты представлены в табл.2.

Таблица 2		
Антивирусная активность экстракта меланина против вируса простого герпеса 2-го типа (ВПГ-2)		
Исходный раствор меланина, %	Разведение препарата, 100% подавляющего адсорбцию вируса на клетки Vero	
	Множественность заражения вируса	
	0,1 БОЕ/клетка	0,01 БОЕ/клетка
Меланин (2,5% раствор)	1:4046	1:4046

Как видно из полученных результатов (табл.2), полное подавление развития вируса ВПГ-2 на культуре клеток Vero происходило при очень низких концентрациях меланина. Эффективная доза составляла 0,006 мг/мл (пример 5).

Пример 12. Оценка противовирусного действия экстракта меланина на репродукцию вируса иммунодефицита человека в культуре клеток МТ-4

Токсичность образца водного раствора меланина исследовали с использованием лимфоидной культуры клеток человека МТ-4. Для этого суспензию клеток МТ-4, разведенную до посевной концентрации $0,5 \times 10^6$ клеток в миллилитре питательной средой RPMI-1640 с добавлением 10% фетальной сыворотки, предварительно инаktivированной прогреванием при 56°C в течение 30 минут, 300 мг/мл L-глутамина, 80 мкг/мл гентамицина и 30 мг/мл линкомицина, помещали в лунки 96-луночных планшетов по 180 мкл в лунку. К клеткам добавляют раствор меланина (по 20 мкл в лунку), до конечных разведений 1:10, 1:20, 1:40, 1:80...1:1280. Максимальная исследованная концентрация меланина на культуре клеток МТ-4 в тесте на «токсичность» составляла 300 мг/мл. Использовали по 3 лунки на каждую дозу. Контролем служили клетки, в которые вместо исследуемого соединения добавляли то же количество растворителя (среда RPMI-1640 без сыворотки и антибиотиков). Планшеты инкубировали в термостате при 37°C. На 5 сутки культивирования подсчитывали концентрацию и жизнеспособность клеток методом прижизненного окрашивания клеток МТТ (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Результат учитывали на спектрофотометре Anthos при 570-620 нм. Разведение, оказывающее 50% токсическое действие на клетки МТ-4 (при котором клетки сохраняли 50% жизнеспособность, $ТС_{50}$), определяли по графику зависимости оптической плотности от концентрации и жизнеспособности клеток. В

результате эксперимента определяли 50% токсическую концентрацию меланина (TC_{50}) для культуры клеток МТ-4, которая составила 200 мкг/мл.

Противовирусное действие меланина оценивали по подавлению вируспродукции в клетках МТ-4. В суспензию клеток МТ-4 добавляли вируссодержащий материал (ВИЧ-1, штамм ГКВ 4046), клетки разносили по лункам 96-луночных планшето-
Одновременно в лунки вносили образец меланина, разведенный в среде RPMI-1640, с шагом 3-кратных последовательных разведений препарата (1:3, 1:9, 1:27 и т.д.), по три лунки на каждую дозу. Планшеты инкубировали в течение часа при 37°C для адсорбции вируса, затем клетки разводили до посевной концентрации питательной средой RPMI-1640 с добавлением 10% фетальной сыворотки, предварительно инактивированной прогреванием при 56°C в течение 30 минут, 300 мг/мл L-глутамина, 80 мкг/мл гентамицина и 30 мг/мл линкомицина, содержащей соответствующие дозы меланина. Контролями служили инфицированные ВИЧ-1 клетки МТ-4 без добавления меланина. Планшеты инкубируют при 37°C в атмосфере 5% CO_2 в течение 5 сут.

Анти-ВИЧ активность меланина (IC_{50}) оценивали по методу МТТ (сравнительная оценка жизнеспособности инфицированных ВИЧ-1 и неинфицированных клеток МТ-4) и по подавлению накопления вирусного белка р24 в инфицированных ВИЧ-1 клетках с использованием количественного определения р24 методом прямого иммуноферментного анализа. 50% ингибирующая концентрация меланина (IC_{50}) в отношении ВИЧ-1 в экспериментах с использованием культуры клеток человека МТ-4 методом МТТ составила 1,3 мкг/мл. Подавление прироста вирусспецифического белка р24 различными разведениями меланина определяли с помощью тест-системы производства «Вектор-Бест». Результат учитывали на спектрофотометре BioRad при 450 нм. Базовый уровень белка р24 в момент инфицирования составил 6,67 нг/мл ($\lg 6,67=0,8241$). Концентрация белка р24 через 5 дней при культивировании ВИЧ-1 на клетках МТ-4 без добавления меланина составила $1,03 \times 10^4$ нг/мл ($\lg 1,03 \times 10^4=4,0128$), при этом 50% подавление прироста вирусспецифического белка р24 происходило при добавлении меланина в концентрации 2,6 мкг/мл. Усредненные данные по двум независимым методам оценки противовирусной эффективности препарата показали, что меланин обладает способностью к 50% подавлению репродукции ВИЧ-1 при концентрации $1,95 \pm 0,65$ мкг/мл, индекс селективности (TC_{50}/IC_{50}) для меланина превышает 100.

В табл.3 приведены результаты изучения токсического и противовирусного действия меланина в отношении ВИЧ-1.

Оценка эффективности противовирусного действия меланина на культуре клеток человека МТ-4, инфицированной ВИЧ-1, показала, что при низкой токсичности (TC_{50} составляет 200 мкг/мл) экстракт меланина обладает способностью к 50% подавлению репродукции ВИЧ-1 при концентрации $1,95 \pm 0,65$ мкг/мл (пример 1), индекс селективности (TC_{50}/IC_{50}) для меланина превышает 100. Пример подтверждает, что меланин оказывает выраженный ингибирующий эффект в отношении вируса иммунодефицита человека I типа.

Исследование токсического и противовирусного действия экстракта меланина в отношении ВИЧ-1 (штамм ГКВ 4046) в экспериментах на клетках МТ-4				
Исходный раствор меланина, %	Метод оценки анти-ВИЧ активности	TC_{50} , мкг/мл	IC_{50} , мкг/мл	Индекс селективности
Меланин (2,5% раствор)	МТТ	200,0	2,6	76,9

Меланин (2,5% раствор)	Количественный анализ р24 ВИЧ-1	200,0	1,3	153,8
Меланин (2,5% раствор)	Средние данные по двум независимым методам	200,0	1,95±0,65	102,6

Пример 13. Оценка противовирусного действия экстракта меланина на репродукцию вируса осповакцины в культуре клеток Vero

Вирус. Вирус осповакцины (ВОВ), штамм Л-ИВП был получен из коллекции ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» и наработан на культуре клеток Vero с титром 5×10^5 БОЕ/мл.

Культура клеток. Культура клеток Vero была получена из коллекции культур клеток ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор». Для получения монослоя клетки выращивали в течение 1-3 суток в 96-луночных пластиковых планшетах в питательной среде (100 мкл/лунку): среда ДМЭМ, содержащая 125 мкг/мл канамицина, 150 мкг/мл L-глутамина и 2% эмбриональной сыворотки плодов коров (Fetal Bovine Serum, HyClone, Lot. No. CSC0518), инаktivированной при 56°C в течение 30 мин).

Противовирусное действие экстракта меланина. Противовирусное действие препарата оценивали, используя метод (Paragas J., Whitehouse C.A., Endy T.P., Bray M. A simple assay for determining antiviral activity against Crimean-Congo hemorrhagic fever virus // Antiviral Research. - 2004. - V 62. P.21-25).

Меланин с исходной концентрацией 25 мг/мл разводили в питательной среде семь раз с трехкратным шагом. К содержащимся в лунках с монослоем клеток Vero 100 мкл питательной среды добавляли по 50 мкл разведения препарата, включая и препарат без разведения (нулевое разведение). Концентрация меланина в лунках планшет составляла 6,25; 2,08; 0,69; 0,23; 0,08; 0,025; 0,0086 и 0,0029 мг/мл. Каждое разведение препарата было внесено в шесть лунок. В три из них был внесен вирус, разведенный в питательной среде, в объеме 50 мкл в дозе 1000 БОЕ, а в три внесено по 50 мкл питательной среды - эти лунки использовались для определения токсичности препарата. По шесть лунок было использовано для контроля вируса и контроля клеток.

Планшеты инкубировали при 37°C в CO₂ инкубаторе в течение 5 суток, ежедневно с помощью инвертированного микроскопа, наблюдая состояние клеточного монослоя и убеждаясь, что через 5 суток в лунках с вирусом, но без препарата (контроль вируса) наблюдается полное 100% цитопатическое действие вируса.

Окраска планшетов производится с помощью витального красителя нейтрального красного и основана на поглощении красителя живыми клетками. Для приготовления основного раствора красителя 3,33 г сухого красителя растворяли в 1 л дистиллированной воды, раствор фильтровали через бумажный фильтр и хранили + 4°C. Перед употреблением 1 часть раствора красителя смешивали с 2 частями питательной среды, полученный раствор подогревали до +37°C и в объеме 50 мкл вносили в лунки планшет. Планшеты возвращали в CO₂ инкубатор на 1,5 часа. После инкубации среду из планшет удаляли, и лунки планшет промывали двукратно физиологическим раствором (по 300 мкл/лунку). Оставшийся в лунках краситель нейтральный красный растворяли, добавляя в лунки по 100 мкл раствора 50% этилового спирта и 50% 0,1М NH₄H₂PO₄ (pH 3.5). Планшеты выдерживали 30 мин при комнатной температуре и измеряли оптическую плотность (ОП) раствора в лунках при длине волны 490 нм с помощью планшетного спектрофотометра, соединенного с компьютером.

Анализ данных. Противовирусное действие экстракта меланина оценивали по увеличению ОП в лунках, содержащих препарат, и вирус по сравнению с контролем вируса. Для построения кривой зависимости ОП от концентрации препарата в лунках

использовали опцию «4-Parameter» программы SOFTmax PRO, version 4.0. С помощью данной программы определяли ингибирующую 50% концентрацию препарата (IC_{50}) - концентрацию препарата, при которой 50% клеточного монослоя остается защищенным от действия вируса, а также токсическую 50% концентрацию препарата (TC_{50}) - концентрацию препарата, при которой 50% клеточного монослоя повреждается за счет токсического действия самого препарата. TC_{50} и IC_{50} были вычислены как средние величины из трех значений, полученных при проведении эксперимента на одном планшете. Индекс селективности (SI) был вычислен как отношение TC_{50} к IC_{50} (Duraffour S, Snoeck R, de Vos R, van Den Oord JJ, Crance JM, Garin D, Hmby DE, Jordan R, De Clercq E, Andrei G. Activity of the anti-orthopoxvirus compound ST-246 against vaccinia, cowpox and camelpox viruses in cell monolayers and organotypic raft cultures // Antivir Ther. 2007; 12(8):1205-16).

Результаты изучения эффективности противовирусного действия экстрактов меланина в отношении осповакцины представлены в табл.4.

Таблица 4					
Результаты изучения токсического и противовирусного действия экстракта меланина из чаги в отношении вируса осповакцины(штамм Л-ИВП)в экспериментах на клетках Vero					
Исходный раствор меланина, %	Диапазон изученных концентраций	Диапазон концентраций, оказывающих противовирусное действие	TC_{50} , мг/мл	IC_{50} , мг/мл	SI
Меланин (2,5% раствор	от 0,0029 до 6,25мг/мл	от 0,125 до 1,56 мг/мл (примеры 3-4)	1,56	0,125	12,5

На основании представленных в табл.4 данных можно заключить, что экстракт меланина, полученный из *Inonotus obliquus*, обладает противовирусной активностью в отношении вируса осповакцины (индекс селективности $SI=12,5$).

Формула изобретения

1. Противовирусное средство на основе меланина, отличающееся тем, что в качестве меланина оно содержит водорастворимый меланин в концентрации от 0,002 мг/мл до 25 мг/мл, полученный экстракцией из базидиального гриба *Inonotus obliquus* и обладающий противовирусной активностью в отношении вирусов гриппа, простого герпеса 2-го типа, иммунодефицита (ВИЧ-1) и осповакцины.

2. Средство по п.1, отличающееся тем, что оно содержит водный раствор меланина из базидиального гриба *Inonotus obliquus* в концентрации от 0,002 мг/мл до 0,2 мг/мл, обладающий активностью против вируса иммунодефицита (ВИЧ-1).

3. Средство по п.1, отличающееся тем, что оно содержит водный раствор меланина из базидиального гриба *Inonotus obliquus* в концентрации от 0,125 мг/мл до 1,56 мг/мл, обладающий активностью против вируса осповакцины.

4. Средство по п.1, отличающееся тем, что оно содержит водный раствор меланина из базидиального гриба *Inonotus obliquus* в концентрации от 0,02 мг/мл до 0,25 мг/мл, обладающий активностью против вируса гриппа.

5. Средство по п.1, отличающееся тем, что оно содержит водный раствор меланина из базидиального гриба *Inonotus obliquus* в концентрации от 0,006 мг/мл до 25,0 мг/мл, обладающий активностью против вируса простого герпеса 2 типа.