

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **034813**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.03.24

(51) Int. Cl. *C12N 7/00* (2006.01)
A61K 39/21 (2006.01)

(21) Номер заявки
201600525

(22) Дата подачи заявки
2016.06.08

**(54) ШТАММ ВИРУСА ИММУНОДЕФИЦИТА ЧЕЛОВЕКА I-ГО ТИПА ИВ748 СУБТИПА А
ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ И ВАКЦИННЫХ ПРЕПАРАТОВ**

(43) 2017.12.29

(96) 2016000044 (RU) 2016.06.08

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ "НАУЧНО-
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ ВАКЦИН И
СЫВОРОТОК ИМ. И.И.
МЕЧНИКОВА" (ФГБНУ НИИВС
ИМ. И.И. МЕЧНИКОВА) (RU)**

**Дмитрий Николаевич, Киреев
Дмитрий Евгеньевич, Шипулин
Герман Александрович, Зверев
Виталий Васильевич, Покровский
Вадим Валентинович (RU)**

(74) Представитель:
**Прозоровская Е.В., Рождественский
С.В. (RU)**

(56) SU-A1-1703686
SU-A1-1768637
RU-C1-2046138
ABECASIS Ana B. et al. HIV-1 subtype
distribution and its demographic determinants in
newly diagnosed patients in Europe suggest highly
compartmentalized epidemics. Retrovirology 2013,
10:7, pp. 1-13

(72) Изобретатель:
**Носик Марина Николаевна,
Кравченко Алексей Викторович,
Киселева Ирина Алексеевна, Носик**

(57) Изобретение относится к области вирусологии и биотехнологии и может быть использовано для получения диагностических и экспериментальных вакцинных препаратов. Описан новый штамм вируса иммунодефицита человека ИВ748, выделенный на территории РФ от больного, не получавшего АРВ-терапию; путь инфицирования - половой (гетеросексуальный контакт). Принадлежит к варианту ВИЧ субтипа А, циркулирующему в настоящее время на большей части территории РФ. Генетический анализ нуклеотидных последовательностей гена обратной транскриптазы, гена протеазы и гена интегразы, проведенный с помощью набора реагентов "АмплиСенс HIV-Resist-Seq", показал, что данный штамм вируса относится к субтипу А и не содержит мутаций резистентности к антиретровирусным препаратам. Обладает стабильной репродуктивной активностью. Инфекционный титр составляет 6 lg ТЦД 50. Предлагается для использования в качестве физиологически приемлемого средства для эффективного и высокоточного изучения антивирусного действия химиопрепаратов нового поколения и для создания вакцины.

034813 B1

034813 B1

Область техники

Изобретение относится к области вирусологии и биотехнологии и может быть использовано для получения диагностических и экспериментальных вакцинных препаратов

Уровень техники

Проблема ВИЧ-инфекции до сих пор остается одной из серьезных мировых проблем. Миллионы людей в мире уже инфицированы ВИЧ и каждую минуту происходит новое заражение вирусом. В нашей стране эта проблема, к сожалению, тоже актуальна. Свыше 80% ВИЧ-инфицированных составляют лица от 30 до 40 лет, то есть речь идет о нетрудоспособности огромного числа лиц трудоспособного возраста [1]. В итоге, данная проблема из разряда медицинской переходит в разряд социальной. В связи с этим создание вакцины против вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) является актуальной проблемой. В настоящее время в ряде стран проводятся испытания вакцинных препаратов, созданных на основе изолятов ВИЧ-1, относящихся к субтипу Е, доминирующего на Африканском континенте и Азии, и на основе изолятов ВИЧ субтипа В, преобладающего в Европе и Северной Америке [2, 3]. Однако для территории РФ характерен вариант ВИЧ, относящийся к субтипу А, поэтому для разработки диагностических и вакцинных препаратов и изучения химиопрепаратов нового поколения необходимо использовать штамм ВИЧ-1 именно данного субтипа [4, 5].

Задача изобретения - получение штамма вируса иммунодефицита человека, принадлежащего к субтипу А, доминирующему в настоящее время на большей части территории РФ.

Технический результат, который может быть получен при осуществлении изобретения, заключается в использовании его в качестве физиологически приемлемого средства для эффективного и высокоточного изучения антивирусного действия химиопрепаратов нового поколения и для создания вакцины.

Сущность изобретения

Авторы настоящего изобретения получили новый штамм вируса иммунодефицита человека I-го типа ИВ748 субтипа А для диагностических и вакцинных препаратов, не имеющий мутаций устойчивости к антиретровирусным препаратам, выделенный на территории РФ от больного, не получавшего АРВ-терапию и инфицированного половым путем. Заявляемый штамм представляет собой биологически чистую культуру и имеет нуклеотидную последовательность, приведенную в Приложении.

Депонирование биологического материала

Штамм вируса хранится в Государственной коллекции вирусов "Института вирусологии им. Д.И. Ивановского", ФГБУ "ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи" (депонент ГКВ № 1199).

Условия хранения

Штамм хранится в лиофилизированном состоянии в жидком азоте (температура -196°C) в Государственной коллекции вирусов "Института вирусологии им. Д.И. Ивановского", ФГБУ "ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи".

Подробное описание изобретения

Штамм вируса относится к семейству Retroviridae, роду Lentivirus, субтип А. Выделен из лимфоцитов периферической крови ВИЧ-инфицированного, не получавшего антиретровирусную терапию. При получении штамма использованы методы сокультивации лимфоцитов больного с лимфоцитами крови здорового донора, стимулированных митогеном, а также с человеческими перевиваемыми клеточными линиями.

Репродукция

Штамм ВИЧ-1 ИВ748 обладает высокой репродуктивной активностью и реплицируется в лимфоцитах периферической крови, лимфобластоидных клеточных культурах МГ-4 и Jurkat. Репродукция вируса сопровождается характерным цитопатическим действием и синицитеобразованием. Штамм может поддерживаться длительное время при пассировании на клеточных линиях. Через 5-6 дней после инфицирования клеток вирусосодержащей культуральной жидкостью инфицированная клеточная взвесь замораживается и после размораживания и осветления при 1000 об/мин вносится к свежим неинфицированным клеткам, в соотношении 1:10.

Инфекционный титр вируса определяли по 50% тканевой цитопатической дозе вируса на модели вышеуказанных клеточных культур в сравнении со штаммом-аналогом ВИЧ-1 LAV, который является первым изолятом ВИЧ-1, выделенным от больного СПИД [6]. Продуктивная активность штамма составляет 6,0 lg ТЦД₅₀ и сопоставима с инфекционным титром штамма-аналога (табл. 1).

Таблица 1. Сравнительное исследование инфекционной активности штаммов ВИЧ-1 LAV и ИВ748 на модели клеток МТ-4 и Jurkat

Титр, lg ТЦД ₅₀	Штаммы ВИЧ-1 (модель клеток МТ-4)		Штаммы ВИЧ-1 (модель клеток Jurkat)	
	LAV	ИВ748	LAV	ИВ748
	6,0	6,0	6,0	6,0

Антигенные свойства.

ВИЧ-1 относится к семейству Retroviridae, род Lentivirus. Вирусы этой подгруппы являются оболочечными РНК-содержащими вирусами с размером частиц около 100-150 нм. В составе частиц обнаружи-

вают не менее 6 основных структурных антигенов, обладающих иммуногенными свойствами, которые могут быть выявлены в инфицированных клетках с помощью различных иммунологических и вирусологических методов.

Иммуофлюоресценция

Исследование методом непрямой иммуофлюоресценции с использованием сыворотки больного СПИД, содержащей антитела к ВИЧ-1, показало наличие антигенов ВИЧ-1 в 45-50% инфицированных клеток.

Иммуноблот

Исследование в иммуноблоте показало, что вирус обладает антигенными детерминантами, характерными для ВИЧ-1: 120/160, 65, 55, 41, 31, 24, 17 кД (табл. 2).

Субтипирование.

Анализ нуклеотидных последовательностей гена обратной транскриптазы в области кодонов 20-270, гена протеазы в области кодонов 1-93 и гена интегразы в области кодонов 1-288, проведенный с помощью набора реагентов "АмплиСенс HIV-Resist-Seq" (регистрационное удостоверение № ФСР 2008/02414), показал, что данный штамм вируса относится к субтипу А и не содержит мутаций резистентности к антиретровирусным препаратам (табл. 3, 4, 5).

Таблица 3. Чувствительность штамма ИВ748 к антиретровирусным препаратам класса НИОТ и ННИОТ

Химиопрепараты					
НИОТ			ННИОТ		
<i>(нуклеозидные транскриптазы)</i>	<i>ингибиторы</i>	<i>обратной</i>	<i>(нуклеозидные транскриптазы)</i>	<i>ингибиторы</i>	<i>обратной</i>
Ламивудин			Эфавиринец		
Абакавир			Этравирин		
Зидовудин			Невирапин		
Диданозин			Рилпивирин		
Эмтрицитабин					
Ставудин					
Тенофовир					

Таблица 4. Чувствительность штамма ИВ748 к антиретровирусным препаратам, ингибирующим протеазу ВИЧ-1

Химиопрепараты, ИП (ингибиторы протеазы)
Атаназавир
Дарунавир
Фозампренавир
Индинавир
Лопинавир
Нелфинавир
Саквинавир
Типранавир

Таблица 5. Чувствительность штамма ИВ748 к антиретровирусным препаратам, ингибирующим интегразу ВИЧ-1

Химиопрепараты, ИИ (ингибиторы интегразы)
Долутегравир
Элвитегравир
Ралтегравир

Возможность использования изобретения иллюстрируется примерами, которые не ограничивают объем и сущность притязаний, связанных с ними.

Пример 1. Сравнительное исследование инфекционной активности штаммов ВИЧ-1 LAV и ИВ748 по цитопатическому действию.

Исследование инфекционной активности штаммов ВИЧ проводили на модели лимфобластоидных клеток МТ-4 и Jurkat в пластиковой 24-луночной панели (Costar, США). Клетки инфицировали вирусом в дозе 0,01 инфекционных единиц на клетку. Далее инкубировали культуры клеток при 37°C в течение 1 ч и дважды отмывали. После этого к культуре клеток добавляли питательную среду RPMI-1640 с 10% сыворотки эмбрионов коров (производства Sigma) и 100 мкг/мл гентамицина (конечная концентрация кле-

ток 400000 клеток/мл). Учет результатов противовирусной активности производили по жизнеспособности клеток путем окрашивания клеток красителем трипановым синим на 6-7 сутки. За титр вируса принимали величину, обратную его максимальному разведению, вызывающему как минимум двукратное превышение показателя гибели клеток по сравнению с контролем. Результаты исследования представлены в табл. 1.

Сравнительный анализ показал, что инфекционные титры штамма ИВ748 сопоставимы с инфекционным титром штамма-аналога LAV, что свидетельствует об их сходной активности. Данный инфекционный титр позволяет успешно инфицировать лимфобластоидные клеточные культуры с целью дальнейшей наработки инфекционного материала.

Пример 2. Диагностика антител к ВИЧ-1 методом иммуноблота.

Материал для исследования антител к ВИЧ-1 представлен 8 сыворотками, полученными от ВИЧ-инфицированных лиц и содержащих анти-ВИЧ антитела. Сыворотки были предварительно охарактеризованы в коммерческой тест-системе фирмы "Биорад" (США). В качестве антигена использован штамм ИВ748 и штамм-аналог LAV. Выявление антител к ВИЧ-1 проводили с помощью нитроцеллюлозных стрипованных мембран (стрип) с нанесенными на них антигенами ВИЧ-1, фирмы "Биорад" (США). Готовую стрипованную мембрану предварительно замачивали на 5 мин в фосфатно-солевом буфере с твином (ФСБ-Т). Сыворотку крови в количестве 20 мкл разводили в 1 мл ФСБ-Т, содержащего 0,5% БСА (бычий сывороточный альбумин) и вносили в лунку со стрипом. После инкубации в течение 1 ч при комнатной температуре и отмывки ФСБ-Т вносили конъюгат, разведенный в 1 мл ФСБ-Т. Далее снова проводили инкубацию в течение 1 ч при комнатной температуре и после отмывки ФСБ-Т вносили 1 мл раствора тетраметилбензидина (ТМБ) в цитратно-фосфатном буфере (ЦФБ). Затем инкубировали в темноте до появления четких полос в контрольном стрипе. Реакцию останавливали 1 н серной кислотой. После промывки стрипа дистиллированной водой его высушивали при комнатной температуре и визуально проводили учет результатов.

Результаты исследований представлены в табл. 2. В результате проведенных исследований установлено, что антиген штамма ИВ748 позволяет выявлять антитела ко всем основным структурным белкам ВИЧ-1 и, следовательно, может быть использован для изучения сероконверсии лиц, инфицированных ВИЧ-1 а также для изучения противовирусного действия химиопрепаратов и создания вакцины против ВИЧ.

Таблица 2. Исследование штамма ИВ748 методом иммуноблота

Вirusный антиген	Выявленные антитела								
Контроль (LAV)	160	120	65	55	53	41	31	24	17
ИВ748	160	120	65	55	53	41	31	24	17

Пример 3. Сравнительный анализ инфекционной активности штаммов ВИЧ-1 LAV и ИВ748 по уровню антигена, вируса (p24).

Определение уровня вирусного антигена в вируссодержащей жидкости проводили с помощью иммуноферментного анализа, с использованием коммерческого иммуноферментного набора фирмы "Биорад" (США) на 96-луночных панелях. В лунки, в которые предварительно был внесены исследуемые образцы, добавляли конъюгат, содержащий биотинилированные поликлональные антитела к p24 ВИЧ-1. После инкубации в течение 1 ч при 37°C панель отмывали трис-солевым буфером и вносили стрептавидин-пероксидазный конъюгат. Проводили инкубацию в течение 30 мин при комнатной температуре, отмывали панель трис-солевым буфером и затем для визуализации реакции добавляли тетраметилбензидин (ТМБ). После инкубации в течение 30 мин в темноте, при комнатной температуре в лунки для остановки реакции вносили 1 н серную кислоту. Результаты учитывали с помощью фотометра "Multiscan" при длине волны 630 нм. За положительный контроль принимали не менее чем 3-кратное превышение оптической плотности по сравнению с таковым показателем неинфицированной клеточной линии.

Результаты исследований представлены в табл. 6. В результате проведенных исследований установлено, что штамм ИВ748 не уступает по уровню выработки антигена ВИЧ-1, штамму-аналогу LAV и обладает высокой репродуктивной активностью, что позволяет успешно инфицировать им лимфобластоидные клеточные культуры с целью дальнейшей наработки инфекционного материала.

Таблица 6. Сравнительный анализ инфекционной активности штаммов ВИЧ-1 LAV и ИВ748 по уровню антигена вируса (p24).

Контроль клеток	Штаммы ВИЧ-1	
	Контроль (LAV)	ИВ748
0,159*	2,961	2,955

*оптическая плотность

Источники информации

1. Постановление от 13.02.2012 №6 «О неотложных мерах по противодействию распространения ВИЧ-инфекции в Российской Федерации».
2. Spira S., Wainberg M.A., Loomba H. et al. Impact of clade diversity on HIV-1 virulence, antiretroviral drug sensitivity and drug resistance // J. Antimicrob. Chem. – 2003. – V.51. – P. 229-240.
3. Kathy Stover. "In Thailand Clinical Study, HIV Vaccine Regimen Demonstrates Modest Preventive Effect." *Medical News Today*. MediLexicon, Intl., 25 Sep. 2009. Web.
22 Jun. 2012. <http://www.medicalnewstoday.com/releases/165277.php>
4. Bobkov A.F., Kazennova E.V., Selimova L.M. et al. Temporal trends in the HIV-1 epidemic in Russia: predominance of subtype A // J. Med. Virol. – 2004. – V.74. – P.191-196.
5. Nosik M., Ryzhov K., Kravtchenko A. et al. Genotypic Analyses of HIV in antiretroviral drug-naïve patients from Moscow and Moscow Region, Russia// 6th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention, 17-20 July 2011, Rome, Italy, Abs.CDA002
6. Barre-Sinoussi F., Mugeyre M., Dauguet C. Isolation of a T-lymphotropic retroviruses from a patient at risk for AIDS // Science.-1983.-Vol.220.-P.868-871

Данные, относящиеся к депонированному микроорганизму или другому биологическому материалу

Дата депонирования: 12 ноября 2012 г.

Номер доступа: депонент ГКБ № 1199

Название и адрес депозитного учреждения: Государственная коллекция вирусов "Института вирусологии им. Д.И. Ивановского", ФГБУ "ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи". Россия, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 16

Перечень последовательностей

Нуклеотидная последовательность гена протеазы и обратной транскриптазы (кодоны PR:1-93/RT:20-270)

CAGCAGAAGTCTTTGGGATGAGAGAAGAGACGACCCCTCCCTGAGACAGGAACAGAAGGACAGGGAACAACGTCCTCCTCAATTTCCCTCAAAATCACTCTTTGGCAACGACCCCTTGTCACAATAAAATAGGAGGACAGCTAAAGAAGCTCTATTAGATACAGGAGCAGATGATACAGTATTAGAAGACATAAAATTTGCCAGGAAAATGGAACCAAAAAATGATAGGGGGAATTGGAGGTTTATCAAAGTAAGACAGATGATCAGATACCTATAGAAAATTTGTGGAAGGGAAGGCTATAGGTACGGTATTAATAGGGCCTACCCCTGTCAACATAATTGGAAGAAAATGTTGACAAAAGGTTAAACAATGGCCATTGACAGAAGAAAAGATAAAAGCATTAAACAGACATTTGTAAGGAGATGGAAGGAAGGAAAAATTTCAAATAATTGGGCTGAAAATCCATACATACTCCAGTATTTGTTATAAAGAAAAAGACAGCACTAAGTGGAGGAAGTAGTAGATTTTCAGGGAGCTCAATAAAGAACTCAGGACTTTTGGGAARTTCAATTAGGAATACCCCATCCAGCGGTTTAAAAAAGAAAAATCAGTAACAGTGCTAGATGTGGGGATGCATATTTTCAGTTCCCTTTAGATGAAAACCTCAGRAAGTATACTGCATTCACTATACCAAGTATAAACAATGAGACACAGGGATCAGATATCAGTACAATGTACTACCACAGGGATGGAAGGATCACCATCAATATCCAGAGTAGCATGACAAAAATCTTAGAGCCATTAGRYTAAA AAAYCCAGAAATAGTTATCTATCAATACATGGATGACTTGTATGTAGGCTCTGATTTAGAAATAGGGCAACATAGAACAAAAATAGAGGAGTTAAGAGCTCACCTATTGAGCTGGGGATTACTACCCAGACAAAAAGCATCAGAAAAGAACCTCCWTTCTTTGGATGGGATATGAATCCATCTGACAAATGGACAGTCCAGCCTATAATGCTACCAGATAAAGACAGCTGGAGTGTCAATGATATACAGAAATTAGTGGGAAAACTAAATTTGGGCAAGTCAAAATTT

Нуклеотидная последовательность гена интегразы (кодоны 1-288)

CCAGCACASAAGGGGATTGGAGGAAATGAACAAGTAGATAAACTAGTCAGTCATGGAATCAGAAGGGTGTATTTT TAGACGGGATAGATAAGGCTCAAGAAGAATATCAAGCAATTTGGAAGCAATGGCTAGTGTATTT AATCTGCCACSTATAGTAGCAAAGGAAATAGTAGCCAGCTGTGATAAATGTCAATTTAAAGGGGAAGCTATGCAT GGACAGGTAGACTGTAGTCCAGGGATATGGCAATTAGATTGCACACATCTAGAAGGGAAAGTAATCATAGTAGCA GTYCATGTAGCCAGTGGCTATATAGAAGCAGAAGTTATCCAGCAGAAACAGGACAGGARACAGCATACTTTCTG CTAATAATTAGCAGGAAGATGGCCAGTAAAGTAGTACACACAGATAATGGCCCCAATTTACCAGCAGTGCAGTT AAGGCTGCCTGTTGGTGGGCAAAATATCCAACAGGAATTTGGGATTCCTACAATCCCCAAAGTCAAGGAGTAGTG GAGTCTATGAATAAGGAATTAAGAAAAATCATAGGGCAGGTAAGAGACCAAGCTGAACACCTTAAGACAGCAGT GCAAAATGGCAGTATTCATTCACAATTTAAAGAAAAAGGGGGGATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAA TAGACATAATAGCAACAGACATACAACTAAAGAAATCAAAAAACAAATTTAAAAATTTCAAAATTTTCGGGTTT ATTACAGAGACAGCAGAGRTCCAAATTTGGAAGAGGACCAAGCAAACTACTTGGAAAGGTGAAGGGGCAAGTGGTA ATACAGGACAATAACGATATAAAGTAGTACCAAGAAGAAAGCAAGATCATTAGGGATTATGGAAGACAGAT GGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGAT

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Штамм вируса иммунодефицита человека I-го типа IB748 семейства Retroviridae, род Lentivirus, субтипа А для диагностических и вакцинных препаратов, не имеющий мутаций устойчивости к антиретровирусным препаратам, выделенный на территории РФ от больного, не получавшего АРВ-терапию и инфицированного половым путем, штамм вируса имеет нуклеотидную последовательность, приведен-

ную в приложении, и депонирован в Государственную коллекцию вирусов "Института вирусологии им. Д.И. Ивановского", ФГБУ "ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи" (депонент ГКВ № 1199) и хранится в лиофилизированном состоянии в жидком азоте, при температуре -196°C.

2. Штамм по п.1, представляющий собой биологически чистую культуру: не контаминирован бактериальной микрофлорой, грибами, вирусами-контаминантами.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2
