

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202292302 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.10.28

(22) Дата подачи заявки
2021.02.26

(51) Int. Cl. C08L 1/28 (2006.01)
C08B 37/00 (2006.01)
C08L 5/00 (2006.01)
C08B 11/12 (2006.01)
A61K 31/716 (2006.01)
A61K 31/717 (2006.01)

(54) ПРОТИВОМИКРОБНЫЕ СРЕДСТВА НА ОСНОВЕ БЕТА-ГЛЮКАНОВ, СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 2020108543
(32) 2020.02.27
(33) RU
(86) PCT/IB2021/051588
(87) WO 2021/171225 2021.09.02
(71) Заявитель:
ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
"НИАРМЕДИК ФАРМА" (RU)

(72) Изобретатель:
Нестеренко Владимир Георгиевич,
Суслов Анатолий Петрович,
Цырульников Сергей Александрович,
Киселёва Ирина Владиславовна,
Коноплёва Мария Вениаминовна,
Бляхер Мария Сергеевна, Кузнецов
Виталий Владимирович, Шпорта
Елена Юрьевна (RU)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к области органической и фармацевтической химии и касается получения бета-глюканов и их применения в фармацевтике.

202292302

A1

A1

202292302

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-302138EA/092

ПРОТИВОМИКРОБНЫЕ СРЕДСТВА НА ОСНОВЕ БЕТА-ГЛЮКАНОВ, СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ

Область техники

Настоящее изобретение относится к области органической и фармацевтической химии и касается получения бета-глюканов и их применения в фармацевтике.

Уровень техники

Бета-глюканы, представляющие собой природные полисахариды, являются одним из наиболее важных классов биополимеров, так как обладают широким спектром биологической активности. Однако на их биологические эффекты оказывают существенное влияние внутри и межмолекулярные взаимодействия между составляющими их полисахаридными молекулами. Для целенаправленного изменения биологических свойств на эти взаимодействия можно воздействовать физическими методами и химическим изменением структуры.

Самыми распространенными способами химической модификации структуры бета-глюканов являются карбоксиметилирование (Carbohydr. Polym. 2004, 57, 319-325, J. Biochem. Mol. Biol. 1998, 14, 636-640), сульфатирование (Carbohydr. Res. 2003, 338, 2863-2870) и фосфорилирование (Carbohydr. Polym. 2009, 78, 581-587., Carbohydr. Res. 1997, 299, 203-208).

Более близкой к предлагаемому изобретению является модификация структуры бета-глюканов окислением. При этом основными направлениями являются окисление спиртовой группы в 6 положении с получением соответствующей кислоты и ее производных (International Immunopharmacology 2001, 1, 539-550, J. Agric. Food Chem. 2009, 57, 439-443) и окисление с последующим получением конъюгатов с белками и полифенолами (Planta, 1991, 185, 1, 1-8, RU 2014124783 A).

Наиболее близким к предлагаемому изобретению является WO2013183049A1, описывающий противовирусные композиции окисленных до соответствующих урановых кислот глюканов, US3856775, посвященный противоопухолевой активности продуктов окисления 1,3-бета-глюканов а также (Journal of Materials Chemistry, 2017, 5, 38), посвященный противомикробной активности нанофибриллярных продуктов окисления целлюлозы.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к противомикробному средству, представляющему собой продукт обработки бета-глюкана йодной кислотой или ее солью с последующей очисткой и выделением, где обработку проводят в водной или водно-органической среде с содержанием органических растворителей в количестве от 0,1 до 100%, при pH в диапазоне от 1 до 14, при температуре от 0 до 100°C.

В предпочтительном варианте бета-глюкан представляет собой карбоксиметилцеллюлозу, бета-глюкан хлебопекарных дрожжей, бета-глюкан овса, бета-

глюкан ячменя, бета-глюкан рейши, необязательно после предварительной очистки и/или фракционирования.

В предпочтительном варианте содержание карбонильных групп в противомикробном средстве составляет от 0,1 до 3 мг/г.

Еще одним объектом изобретения является противомикробное средство, представляющее собой продукт обработки бета-глюкана галогеналкилкарбоновой кислотой или ее солью с последующей его очисткой и выделением, где обработку проводят в водной или водно-органической среде с содержанием органических растворителей в количестве от 0,1 до 100%, при pH в диапазоне от 7 до 14, при температуре от 0 до 100°C в присутствии органических и/или неорганических оснований.

В предпочтительном варианте бета-глюкан представляет собой бета-глюкан хлебопекарных дрожжей, бета-глюкан овса, бета-глюкан ячменя, бета-глюкан рейши, необязательно после предварительной очистки и/или фракционирования.

В предпочтительном варианте степень замещения составляет от 0,1 до 1,5.

Еще одним другим объектом изобретения является противомикробное средство, представляющее собой продукт обработки бета-глюкана галогеналкилкарбоновой кислотой или ее солью с последующей очисткой и выделением полупродукта и его окислением йодной кислотой или ее солью с последующей его очисткой и выделением.

В предпочтительном варианте бета-глюкан представляет собой бета-глюкан хлебопекарных дрожжей, бета-глюкан овса, бета-глюкан ячменя, бета-глюкан рейши, необязательно после предварительной очистки и/или фракционирования.

В предпочтительном варианте содержание карбонильных групп в противомикробном средстве составляет от 0,1 до 3 мг.

Еще одним другим объектом изобретения является способ получения противомикробного средства, который включает обработку бета-глюкана йодной кислотой или ее солью в водной или водно-органической среде с содержанием органических растворителей в количестве от 0,1 до 100%, при pH в диапазоне от 1 до 14, предпочтительно от 1 до 7, при температуре от 0 до 100°C, предпочтительно от 15 до 50 °C, с последующей очисткой и выделением.

Еще одним другим объектом изобретения является способ получения противомикробного средства, который включает обработку бета-глюкана галогеналкилкарбоновой кислотой или ее солью в водной или водно-органической среде с содержанием органических растворителей в количестве от 0,1 до 100%, при pH в диапазоне от 7 до 14, при температуре от 0 до 100°C, предпочтительно от 15 до 50 °C, в присутствии органических и/или неорганических оснований с последующей очисткой и выделением.

Еще одним другим объектом изобретения является способ получения противомикробного средства, который включает стадии:

обработки бета-глюкана галогеналкилкарбоновой кислотой или ее солью в водной или водно-органической среде при pH в диапазоне от 7 до 14, при температуре от 0 до 100

°С, предпочтительно от 15 до 50 °С, с последующей их очисткой и выделением полупродукта; и

обработку полученного полупродукта йодной кислотой или ее солью в водной или водно-органической среде при рН в диапазоне от 1 до 14, предпочтительно от 1 до 7, при температуре от 0 до 100 °С, предпочтительно от 15 до 50 °С, с последующей очисткой и выделением целевого продукта.

Еще одним объектом изобретения является противомикробная композиция, содержащая эффективное количество противомикробного средства по любому из п.п. 1-3 и фармацевтически приемлемые добавки.

Предложенная противомикробная композиция эффективна в отношении вирусов гриппа, герпеса, респираторных вирусных и бактериальных инфекций.

Еще одним другим объектом изобретения является противомикробная композиция, содержащая эффективное количество любого из указанных выше противомикробных средств и по меньшей мере одно другое противомикробное средство.

Предложенная противомикробная композиция эффективна в отношении вирусов гриппа, герпеса, респираторных вирусных и бактериальных инфекций.

Подробное описание изобретения

В контексте настоящего описания:

термин «бета-глюкан» означает полисахарид из мономеров бета-D-глюкозы, связанных между собой гликозидными связями;

термин «карбоксиметилцеллюлоза» означает полисахарид, получаемый по реакции взаимодействия целлюлозы с галогенуксусной кислотой или ее солями, в котором карбоксиметильная группа ($-\text{CH}_2-\text{COOH}$) в кислой или солевой форме соединяется с гидроксильными группами глюкозных мономеров.

термин «бета-глюкан хлебопекарных дрожжей» означает бета-глюкан, полученный из пекарских дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*).

термин «бета-глюкан овса» означает полисахарид бета-1,3-1,4-D глюкана, выделяемый из овса.

термин «бета-глюкан ячменя» означает полисахарид бета-1,3-1,4-D глюкана, выделяемый из ячменя.

термин «бета-глюкан рейши» означает полисахарид бета-1,3-1,6-D глюкана, выделяемый из грибов Рейши.

Термин «йодная кислота» означает тетраоксйодат водорода HIO_4 или дигидрат йодной кислоты - гексаоксйодат водорода H_5IO_6 , молекулярная масса 227,941 г/моль.

Термин «соли йодной кислоты» означает соединение, состоящее из аниона йодной кислоты (периодата) и катиона щелочного металла, предпочтительно натрия или калия.

Термин «обработка» означает воздействие химических реагентов, проведение химической реакции при определенных условиях (температура, рН раствора, концентрация реагентов и др.).

Термин «выделение» означает процесс высаживание в растворитель, декантация, ультрафильтрация (диализ), центрифугирование, фильтрование, нейтрализация, растворение, сушка при комнатной или повышенной температуре, сушка лиофилизацией и их сочетание.

Термин «очистка» означает обессоливание, промывка растворителем, ультрафильтрация (диализ) и их сочетание.

Термин «галогеналкилкарбоновая кислота» означает алифатическая карбоновая кислота, у которой один или несколько атомов водорода в радикале замещен атомами галогена общей формулы $R_2R_3(CH)_nCOOR_1$; где

R_1 представляет собой H;

R_2 , представляют собой H, линейный или разветвленный C_1 - C_{10} алкил, предпочтительно H;

n принимает значения от 0 до 10, предпочтительно n принимает значения от 1 до 2;

R_3 представляет собой галоген F, Cl, Br, I, предпочтительно Cl, Br.

Предпочтительно, галогеналкилкарбоновая кислота представляет собой моноклоруксусную кислоту, монобромуксусную кислоту, 2-хлорпропионовую кислоту.

Термин «соль галогеналкилкарбоновой кислоты» означает соединение общей формулы $R_2R_3(CH)_nCOOR_1$;

R_1 представляет собой Li, Na, K, предпочтительно Na;

R_2 , представляют собой H, линейный или разветвленный C_1 - C_{10} алкил, предпочтительно H;

n принимает значения от 0 до 10, предпочтительно n принимает значения от 1 до 2;

R_3 представляет собой галоген F, Cl, Br, I, предпочтительно Cl, Br.

Предпочтительно, галогеналкилкарбоновая кислота представляет собой натриевые соли моноклоруксусной кислоты, монобромуксусной кислоты, 2-хлорпропионовой кислоты.

Термин «фармацевтически приемлемая добавка» означает вещество, разрешенное для использования в фармацевтической промышленности для создания готовых лекарственных форм и не являющееся действующим веществом, но способное влиять как на биологическую эффективность действующего вещества, так и на физические свойства готовой лекарственной формы, например карбонат натрия, гидрокарбонат натрия, аскорбат натрия, лактоза, кальция стеарат, крахмал.

термин «другое противомикробное средство» означает вещество, применяемое для уничтожения вирусов, бактерий, низших грибов и простейших или подавления их жизнедеятельности, например осельтамивир, арбидол.

Термин «полупродукт» означает промежуточный продукт, который применяют для дальнейшего синтеза.

Термин «предварительная очистка» означает очистка исходного сырья с целью удаления примесей перед обработкой.

Термин «фракционирование» означает разделение исходного сырья на фракции с определенной молекулярной массы.

Термин «водно-органическая среда» означает раствор с концентрацией растворенного вещества от 0,00001 до 99,999 массовых %, в котором в качестве растворителя выступает гомогенная смесь воды и органического растворителя в массовом отношении от 100:0,1 до 0,1:100, в частности, смеси воды с этанолом, воды с ацетоном, воды с изопропанолом, воды с диоксаном;.

Термин «неорганическое основание» означает любое неорганическое соединение, способное принимать положительно заряженные ионы, в частности, карбонат натрия, гидроксид калия, ацетат натрия, гидроксид натрия, гидрокарбонат натрия, карбонат цезия, карбонат калия, гидроксид лития;

Термин «органическое основание» означает любое органическое соединение, способное принимать положительно заряженные ионы, в частности, триэтиламин, 4-метилморфолин, N-этилдиизопропиламин, трет-бутилат калия, этилат натрия.

Термин «степень замещения» означает количество функциональных групп, введенных в молекулу, предпочтительно карбоксиметильных.

Методы исследования

Высокоэффективная жидкостная хроматография с УФ-спектрофотометрическим и масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-УФ-МС)

Метод использовали для количественного определения осельтамивира в образцах. Анализ проводили на жидкостном хроматографе Agilent 1260 с последовательным детектированием на диодно-матричном и масс-селективном детекторах. Разделение проводили на хроматографической колонке Purospher STAR RP-18e, размером 125 × 4,6 мм с размером частиц 3 мкм, снабженной защитной предколонкой 12,5 × 4,6 мм с тем же сорбентом производства «Agilent», используя в качестве элюента состав, содержащий 50 об. % 100 мМ ацетата аммония с pH=6,9 и 50 об. % ацетонитрила в изократическом режиме элюирования.

Колонку поддерживали при постоянных температуре 40 °С и скорости потока 0,5 мл/мин. В используемом одноквадрупольном масс-спектрометрическом детекторе ионизация осуществляется методом электрораспыления. Масс - спектрометрическое детектирование проводили в режиме регистрации положительных ионов, давление на небулайзере - 35 psi, напряжение на фрагменторе - 100 В, поток газа осушителя - 10 л/мин, напряжение на капилляре - 4000 В, режим сканирования по диапазону масс (Scan) - 300-400 Да и режим регистрации по выделенным ионам (SIM) - 313.

Гель-проникающая хроматография (ГПХ)

Метод гель-проникающей хроматографии использовали для определения молекулярной массы и молекулярно-массовых характеристик получаемых 1,4 и исходных бета-глюканов и сырья. Анализ проводили на жидкостном хроматографе Waters с последовательным детектированием на рефрактометрическом и диодно-матричном детекторах. Разделение проводили на соединенных последовательно колонках

Ultrahydrogel 1000 и Ultrahydrogel 120 размером 300×7.8 мм, заполненных гелем на основе гидроксилат полиметакрилата с размером пор 1000 и 120 Å соответственно (Waters), используя в качестве элюента 0,05 М фосфатный буферный раствор (pH=7,0) при изократическом режиме элюирования.

Для калибровки колонки использовали стандарты декстрана со средневесовыми молекулярными массами (Mw) 9900, 16230, 41100, 60300, 129000, 214800, 456800.

Калибровочные кривые аппроксимировали полиномом 3-го порядка. Расчет молекулярно-массовых характеристик полимера проводили с использованием универсальной калибровки и программного обеспечения «Breeze 2».

Йодометрическое титрование

Метод йодометрического титрования использовали для определения количества карбонильных групп в образцах.

Данный метод основан на окислении карбонильных групп йодом в щелочной среде. Из-за обратимости данной реакции добавляется щелочь для перевода образующихся кислот в соли. При этом щелочь также реагирует с йодом с образованием гипойодита, который окисляет карбонильную группу до карбоксильной. После окисления карбонила добавляется кислота, для выделения йода из оставшегося гипойодита натрия. Выделившийся в свободном виде йод оттитровывается тиосульфатом натрия. По разнице количества тиосульфата, пошедшего на титрование добавленного йода и избытка, оставшегося после реакции, определяется количество йода, пошедшего на окисление карбонильных групп.

Потенциометрическое кислотно-основное титрование

Данный метод используется для определения степени замещения и определения содержания карбонатов и гидрокарбонатов. Он основан на сжигании солевой формы 1,4-бета-глюкана с образованием карбоната натрия, с последующим определением его количества ацидиметрическим титрованием соляной кислотой.

Определение цитотоксического действия субстанций в культуре клеток

Исследования проводили на клеточной линии MDCK ECACC (Sigma, кат. № 85011435), на 67-70 пассажах. Линию культивировали в среде Игла MEM (ПанЭко), содержащей 10% фетальной сыворотки (HyClone), 300 мкг/мл L-глутамина и 0,1 мг/мл нормоцина.

Клетки линии MDCK ECACC вносили в 96-луночные планшеты в среде Игла MEM (ПанЭко), содержащей 10% фетальной сыворотки (HyClone), 300 мкг/мл L-глутамина и 0,1 мг/мл нормоцина из расчета 18000 кл/лунку, культивировали 24 ч и промывали бесывороточной средой 1 раз перед внесением субстанций.

Для разведения тестируемых веществ использовали поддерживающую среду следующего состава: среда Игла MEM (ПанЭко), содержащую 2% фетальной сыворотки (HyClone), 300 мкг/мл L-глутамина, 12 мкг/мл химопсин-трипсина и 0,1 мг/мл нормоцина.

Каждую точку тестировали в 4 параллельных лунках. Последнее разведение помещали в первые 2 лунки из 4, в две последние лунки из 4 вносили поддерживающую среду (контроль среды культивирования).

Клетки инкубировали с тестируемыми веществами в течение 48 ч в CO₂-инкубаторе при температуре 37°C, после чего удаляли культуральную среду и в каждую лунку добавляли по 100 мкл поддерживающей среды и 20 мкл раствора витального красителя MTS (Promega, кат.№ G3581). После инкубации в течение 3 ч при 37°C определяли оптическую плотность при длине волны 492 нм и референсной длине волны 620 нм при помощи планшетного спектрофотометра BIO-RAD. Концентрация тестируемого вещества, уменьшающая значение оптической плотности на 50% по сравнению с контролем клеток, принималась за 50% цитотоксическую дозу (CC₅₀). Диапазон от 1 до 30 мг/мл считается малотоксичным.

Изучение действия препаратов на инфекционный титр вируса гриппа в культуре клеток MDCK

В исследованиях использовали вирус гриппа А/Пуэрто-Рико/8/34 (H1N1), адаптированный к линии MDCK. Инфекционную и гемагглютинирующую активность вируса определяли согласно методам, рекомендованным ВОЗ.

Исследования вируссpezifического действия тестируемых веществ в отношении штамма А/Пуэрто Рико/8/34 проводили на клетках MDCK ECACC, используя в качестве поддерживающей среды Игла MEM (ПанЭко), содержащую 2% фетальной сыворотки (HyClone), 300 мкг/мл L-глутамина, 12 мкг/мл химопсин-трипсина и 0,1 мг/мл нормоцина. Культуру клеток MDCK ECACC подготавливали так же, как и в опытах по определению цитотоксического действия изучаемых веществ. Перед заражением вирусом клетки MDCK 1 раз промывали бесывороточной средой Игла MEM, добавляли предварительно подготовленные разведения препаратов в 100 мкл поддерживающей среды (однократной концентрации) и инкубировали 1 ч при 37°C. Затем добавляли по 10 мкл предварительно приготовленных 10-кратных разведений вируса. Контроли вируса и клеток культивировали в той же среде. Учет результатов проводили через 48 ч по цитопатическому действию и в реакции агглютинации (РГА). В РГА использовали 0,75% взвесь эритроцитов человека (I группа) в физиологическом растворе.

Расчет значений 50% цитотоксической концентрации (CC₅₀) и 50% эффективной концентрации (IC₅₀) для каждого из изученных соединений проводили при помощи пакета программ Excel и GraphPad Prism 6.01. За рабочую модель для анализа CC₅₀ принимали 4-параметрическое уравнение логистической кривой (пункты меню «Нелинейная регрессия» - «Sigmoidal dose-response (variable slope)»). Для анализа IC₅₀ принимали 4-параметрическое уравнение логистической кривой (пункты меню «Нелинейная регрессия» - «log (inhibitor) vs. response (variable slope)»). Вирусингибирующее действие исследуемых веществ ($\Delta \lg \text{TCID}_{50}$) оценивали по снижению заражающей вирусной дозы в опыте по сравнению с контролем, вычисляемое по методу Риды и Менча. На основании всех полученных данных, рассчитывали химиотерапевтический индекс (ХТИ) по уравнению:

$ХТИ = CC_{50} / IC_{50}$.

Активация культуры ФЛЭЧ веществами

Клетки ФЛЭЧ использовали в концентрации 2×10^5 в 1 мл ростовой питательной среды, содержащей ЭТС. Клеточную взвесь разливали в 96-луночные плоскодонные планшеты (Costar/Corning, USA) по 100 мкл в лунку. Планшеты инкубировали при температуре 37°C в атмосфере с 5%-содержанием CO₂. Инкубация продолжалась 24 ч.

Раститровку раствора препаратов проводили двойными разведениями в лунках с ФЛЭЧ. В результате концентрация препаратов составляла от 2000 до 15 мкг/мл.

Каждая доза препаратов была внесена в 2 лунки планшета с клетками ФЛЭЧ для получения достаточного объема надосадка. Для контроля влияния культуральной среды на планшете были отведены по 1 вертикальному ряду (всего по 8 лунок).

Инкубацию проводили при температуре 37°C в атмосфере с 5%-содержанием CO₂. Через 4 ч надосадки отбирали для дальнейших исследований.

В лунки с монослоем ФЛЭЧ вносили вирус энцефаломиокардита мышей (ВЭМ) в цитопатогенной дозе (100 ЦПД вируса) в среде Игла MEM без сыворотки. Учет цитопатического действия вируса на монослой фибробластов осуществляли через 24 ч на инвертированном микроскопе, согласно методике постановки интерферонового статуса (Ф.И. Ершов, 1984).

Определение противовирусной эффективности вещества в отношении вируса гриппа A/California/7/09 pdm (H1N1) на модели гриппозной пневмонии мышей при экстренно-профилактической схеме введения

Предварительно взвешенные мыши линии BALB/c и ICR (CD-1) из питомника НПП «Питомник лабораторных животных» ФИБХ РАН (Московская обл., г. Пущино) (100% самцов, средний вес 12-16 г) инфицировались интраназально под легким наркозом вирусом гриппа A/California/7/09 pdm (H1N1) в дозе 10MLD₅₀/50 мкл (в случае BALB/c) или 1MLD₅₀/50 мкл (в случае ICR). В предварительном опыте было проведено определение доз путем титрования аллантоисного вируса на таких же мышях, которые затем использовались в основном опыте.

Изучение действия исследуемых препаратов при экстренно-профилактической схеме введения осуществляли путем перорального введения (внутрижелудочно с помощью зонда) вещества инфицированным животным через 1 ч, 25 ч, 49 ч, 73 ч и 97 ч после заражения в объеме 100 мкл в пяти дозах (0,1 мг/кг/мышь, 1 мг/кг/мышь, 12 мг/кг/мышь, 100 мг/кг/мышь и 400 мг/кг/мышь) в случае использования мышей BALB/c и в четырех дозах (0,1 мг/кг/мышь, 1 мг/кг/мышь, 12 мг/кг/мышь, 100 мг/кг/мышь) в случае использования мышей ICR.

Препарат сравнения Озельтамивира фосфат зараженным животным вводили внутрижелудочно с помощью зонда один раз в сутки через 1 ч, 25 ч, 49 ч, 73 ч и 97 ч после инфицирования в дозе 25 мг/кг/мышь. Мышам контрольной группы вводили в тех же условиях плацебо (физиологический раствор). За животными наблюдали в течение 14 сут. после заражения, учитывая гибель мышей от гриппозной пневмонии в группах леченых

животных и в контроле. Специфичность гибели животных от гриппозной пневмонии подтверждали регистрацией патологоанатомических изменений в легких павших животных опытной и контрольных групп.

В каждой группе было по 15 животных. За лечеными и контрольными животными велось ежедневное наблюдение. Химиотерапевтическую активность соединений на модели гриппозной пневмонии мышей оценивали по трем критериям: показатель защиты от смертельной вирусной инфекции, увеличение средней продолжительности жизни и весу животных по сравнению с контрольной группой (интактные мыши).

Активность препаратов оценивали, сравнивая летальность у животных, принимавших препарат и контрольной группы. Снижение летальности леченых животных по отношению к контролю выражали в процентах.

Все результаты были статистически обработаны по программе EXEL и представлены в виде средних значений и средних отклонений.

Оценка способности образцов активировать иммунологически активные рецепторы

Исследование способности образцов активировать рецептор dectin-1a человека проводилось ген-репортерным методом с использованием специализированных трансгенных клеточных линий производства компании Invivogen: «HEK-Blue™ hDectin-1a Cells» - репортерная клеточная линия на основе клеток HEK 293, экспрессирующая ген dectin-1a человека и «HEK-Blue™ Null1 Cells» - контрольная клеточная линия, являющаяся родительской по отношению к линии, экспрессирующей dectin-1a. Активацию рецепторов оценивали по цветной реакции с секретируемой щелочной фосфатазой (SEAP). При оценке специфичности реакции учитывали, что родительская клеточная линия экспрессирует низкие уровни TLR3, TLR5 и NOD1-рецепторов.

Аналогичным образом, с использованием ген-репортерных линий «THP-1 CD14» и «HEK293-hTLR4 CD14/MD2» оценивали способность образцов активировать рецептор CD14.

Исследования проводили согласно инструкции производителя клеточных линий в диапазоне нетоксичных концентраций β -глюканов, что контролировалось в параллельном эксперименте при помощи витального красителя MTS.

Постановка стимуляции лимфоцитов крови веществами

Из периферической крови, взятой в пробирки BD VACUTAINER с гепарином, выделяли лимфоциты в градиенте плотности HISTOPAQUE-1077 центрифугированием 15 мин при 400 g.

Выделенные и отмытые лимфоциты в полной питательной среде (рабочая среда RPMI-1640 с 10% - эмбриональной телячьей сывороткой) вносили в лунки 96-луночного круглодонного планшета в концентрации $2,5-3 \times 10^6$ кл в 1 мл (в объеме 100 мкл). Количество лимфоцитов в лунке $2,5-3 \times 10^5$.

Рабочая концентрация растворов исследуемых препаратов для стимуляции составляла 2 мг/мл (концентрация в лунке - 1 мг/мл, т.е. вносили 100 мкл указанного раствора вещества).

Инкубацию проводили при температуре 37°C в атмосфере с 5%-содержанием CO₂. Через 20 ч надосадки отбирали для дальнейших исследований и хранили порционно при -40°C, а лимфоциты, собранные из тех же лунок, исследовали на содержание среди них CD69+ Т-клеток. Токсичность веществ в данной концентрации не проявлялась, так как лимфоциты при цитофлюорометрии выглядели стандартно и находились в определенном для них гейте.

Постановка костимуляции клеток крови веществами и ФГА

Образцы цельной крови доноров обрабатывали следующим образом: в лунки культурального 96-луночного круглодонного планшета с 60 мкл рабочей культуральной среды RPMI-1640 добавляли 20 мкл крови, 20 мкл ФГА (12,5 мкг/мл), 100 мкл раствора исследуемых препаратов (2 мг/мл). Общий объем содержимого каждой лунки - 200 мкл, итоговая концентрация экспериментальных веществ - 1 мг/мл.

Через 24 часа культивирования при 37 °C с 5% содержанием CO₂ собирали культуральные супернатанты, которые разливали порционно и хранили до постановки ИФА при -40 °C.

Определение активации Т-лимфоцитов, произошедшей в ходе стимуляции, по повышению процента клеток, экспрессирующих маркер CD69

С лимфоцитов, прошедших этап стимуляции, собирали надосадок в объеме 100 мкл, а лимфоциты ресуспендировали в оставшемся объеме культуральной среды (100 мкл). Далее к ним добавляли моноклональные антитела, меченные флуорохромами: CD3 (FITC), CD69 (PE), CD8 (PC5), - все производства Beckman Coulter (США). Пробоподготовка проводилась на автоматической станции TQprep (Beckman Coulter) по безотмывочной технологии. Измерения проводились на проточном цитометре Cytomics FC500 (Beckman Coulter, США) в измерительном протоколе для 3-х цветной метки. Таким образом, получали сведения, какие именно Т-клетки активировались веществами и в каком количестве (%).

Значимым являлось повышение % CD69+ клеток на 2% по сравнению с их содержанием в культуре, не стимулированной веществами (т.е. со спонтанной экспрессией).

Реактивы

Бланоза 7 MF (Na-карбоксиметилцеллюлоза) - продукт фирмы «Ashland». Порошок светло-желтого цвета. Степень карбоксиметилирования 0,80. Содержание основного вещества 99,5% (мин.).

Бета-глюканы рейши, хлебопекарных дрожжей, овса, ячменя - продукт фирмы «Purest-R».

Осельтамивир фосфат - продукт фирмы «Sigma Aldrich». Порошок белого цвета. Содержание основного вещества 99,2%.

Монохлоруксусная кислота - продукт фирмы «ООО ИРса 2000». Квалификация ч. Изготовлен согласно ГОСТ 5836-85.

Йодная кислота - продукт фирмы «Panreac». Белый кристаллический порошок. Содержание основного вещества - 98%.

Пункт 1.

Образец 1.

В химический стакан емкостью 2000 мл добавляют 960 мл воды и 80 г КМЦ. Реакционную смесь перемешивают 3 часа, после чего к раствору добавляют раствор 7,5 г йодной кислоты в 50 г воды и перемешивают 24 часа при 25 ° С. Избыток окислителя нейтрализуют, высаживают продукт в ацетоне. Выпавший осадок фильтруют, промывают водным раствором ацетона и чистым ацетоном и сушат.

Образец 2.

В химический стакан емкостью 2000 мл добавляют 960 мл воды и 80 г КМЦ. Реакционную смесь перемешивают 3 часа, после чего к раствору добавляют раствор 7,5 г йодной кислоты в 50 г воды и перемешивают 24 часа при 25 ° С. Избыток окислителя нейтрализуют, высаживают продукт в ацетоне. Выпавший осадок фильтруют, промывают водным раствором ацетона и чистым ацетоном и сушат. Полученный продукт растворяют в растворе карбоната натрия, доводят рН до 3-4, высаживают продукт в ацетоне, осадок отфильтровывают и промывают водным ацетоном, ацетоном и сушат.

Образец 3.

В химический стакан емкостью 2000 мл добавляют 960 мл воды и 80 г КМЦ. Реакционную смесь перемешивают 3 часа, после чего к раствору добавляют раствор 7,5 г йодной кислоты в 50 г воды и перемешивают 24 часа при 25 ° С. Избыток окислителя нейтрализуют, высаживают продукт в ацетоне. Выпавший осадок фильтруют, промывают водным раствором ацетона и чистым ацетоном и сушат. Полученный продукт растворяют в растворе карбоната натрия, доводят рН до 3-4, высаживают продукт в ацетоне, осадок отфильтровывают и промывают водным ацетоном, ацетоном и сушат. Полученный продукт растворяют в растворе гидрокарбоната натрия, доводят рН до 6-7, перемешивают 30 минут. Полученный продукт сушат.

Образец 4.

В химический стакан емкостью 2000 мл добавляют 960 мл воды и 80 г КМЦ. Реакционную смесь перемешивают 3 часа, после чего к раствору добавляют раствор 7,5 г йодной кислоты в 50 г воды и перемешивают 24 часа при 25 ° С. Избыток окислителя нейтрализуют, высаживают продукт в ацетоне. Выпавший осадок фильтруют, промывают водным раствором ацетона и чистым ацетоном и сушат. Полученный продукт растворяют в растворе карбоната натрия, доводят рН до 3-4, высаживают продукт в ацетоне, осадок отфильтровывают и промывают водным ацетоном, ацетоном и сушат. Полученный продукт растворяют в растворе карбоната натрия, доводят рН до 9-10, перемешивают 30 минут. Полученный продукт сушат.

Образец 5.

В химический стакан емкостью 2000 мл добавляют 960 мл воды и 80 г КМЦ. Реакционную смесь перемешивают 3 часа, после чего к раствору добавляют раствор 22,5 г

йодной кислоты в 50 г воды и перемешивают 24 часа при 25 ° С. Избыток окислителя нейтрализуют, высаживают продукт в ацетоне. Выпавший осадок фильтруют, промывают водным раствором ацетона и чистым ацетоном и сушат.

Образец 6.

В химический стакан емкостью 2000 мл добавляют 960 мл воды и 80 г КМЦ. Реакционную смесь перемешивают 3 часа, после чего к раствору добавляют раствор 22,5 г йодной кислоты в 50 г воды и перемешивают 24 часа при 25 ° С. Избыток окислителя нейтрализуют, высаживают продукт в ацетоне. Выпавший осадок фильтруют, промывают водным раствором ацетона и чистым ацетоном и сушат. Полученный продукт растворяют в 5% карбонате натрия, фракционируют через мембрану 10 кДа, полученный продукт сушат.

Образец 7.

В химический стакан емкостью 2000 мл добавляют 960 мл воды и 80 г КМЦ. Реакционную смесь перемешивают 3 часа, после чего к раствору добавляют раствор 22,5 г йодной кислоты в 50 г воды и перемешивают 24 часа при 25 ° С. Избыток окислителя нейтрализуют, высаживают продукт в ацетоне. Выпавший осадок фильтруют, промывают водным раствором ацетона и чистым ацетоном и сушат. Полученный продукт растворяют в растворе карбоната натрия, доводят рН до 3-4, высаживают продукт в ацетоне, осадок отфильтровывают и промывают водным ацетоном, ацетоном и сушат.

Образец 8.

В химический стакан емкостью 2000 мл добавляют 960 мл воды и 80 г КМЦ. Реакционную смесь перемешивают 3 часа, после чего к раствору добавляют раствор 22,5 г йодной кислоты в 50 г воды и перемешивают 24 часа при 25 ° С. Избыток окислителя нейтрализуют, высаживают продукт в ацетоне. Выпавший осадок фильтруют, промывают водным раствором ацетона и чистым ацетоном и сушат. Полученный продукт растворяют в растворе карбоната натрия, доводят рН до 3-4, высаживают продукт в ацетоне, осадок отфильтровывают и промывают водным ацетоном, ацетоном и сушат. Полученный продукт растворяют в растворе гидрокарбоната натрия, доводят рН до 6-7, перемешивают 30 минут. Полученный продукт сушат.

Образец 9.

В химический стакан емкостью 2000 мл добавляют 960 мл воды и 80 г КМЦ. Реакционную смесь перемешивают 3 часа, после чего к раствору добавляют раствор 22,5 г йодной кислоты в 50 г воды и перемешивают 24 часа при 25 ° С. Избыток окислителя нейтрализуют, высаживают продукт в ацетоне. Выпавший осадок фильтруют, промывают водным раствором ацетона и чистым ацетоном и сушат. Полученный продукт растворяют в растворе карбоната натрия, доводят рН до 3-4, высаживают продукт в ацетоне, осадок отфильтровывают и промывают водным ацетоном, ацетоном и сушат. Полученный продукт растворяют в растворе карбоната натрия, доводят рН до 9-10, перемешивают 30 минут. Полученный продукт сушат.

Образец 10.

В химический стакан емкостью 5000 мл добавляют 1800 мл воды и 75 г КМЦ. Реакционную смесь перемешивают 3 часа, после чего к раствору добавляют раствор 15 г йодной кислоты в 150 г воды и перемешивают несколько часов при 40 °С и 20 часов при 25 ° С. Затем к реакционной массе добавляют карбонат натрия, доводят рН до 8-9, фракционируют через мембрану 10 кДа, доводят рН до 3-4. Полученный продукт сушат.

Образец 11.

В химический стакан емкостью 5000 мл добавляют 1800 мл воды и 75 г КМЦ. Реакционную смесь перемешивают 3 часа, после чего к раствору добавляют раствор 30 г йодной кислоты в 150 г воды и перемешивают несколько часов при 40 °С и 20 часов при 25 ° С. Затем диализуют относительно воды через диализные мешки 12-14 кДа в течение 48 часов. Полученный продукт сушат.

Образец 12.

В химический стакан емкостью 5000 мл добавляют 1800 мл воды и 75 г КМЦ. Реакционную смесь перемешивают 3 часа, после чего к раствору добавляют раствор 30 г йодной кислоты в 150 г воды и перемешивают несколько часов при 40 °С и 20 часов при 25 ° С. Затем диализуют относительно воды через диализные мешки 12-14 кДа в течение 48 часов. Полученный продукт сушат. Полученный продукт растворяют в воде, добавляют раствор аскорбата натрия в 0,1М растворе гидроксида натрия, перемешивают 30 минут. Полученный продукт сушат.

Образец 13.

В химический стакан емкостью 5000 мл добавляют 1800 мл воды и 75 г КМЦ. Реакционную смесь перемешивают 3 часа, после чего к раствору добавляют раствор 30 г йодной кислоты в 150 г воды и перемешивают несколько часов при 40 °С и 20 часов при 25 ° С. Избыток окислителя нейтрализуют, высаживают продукт в ацетоне. Выпавший осадок фильтруют, промывают водным раствором ацетона и чистым ацетоном и сушат. Полученный продукт растворяют в 5% карбонате натрия, фракционируют через мембрану 10 кДа, полученный продукт сушат.

Образец 14.

В химический стакан емкостью 150 мл добавляют 62,5 мл воды и 5 г бета-глюкана ячменя. Реакционную смесь перемешивают 1 час, после чего к суспензии добавляют раствор 2,03 г йодной кислоты в 6,9 мл воды и перемешивают 18 часов при 25 ° С. Осадок отделяют центрифугированием и промывают сначала водой, затем чистым ацетоном и сушат.

Образец 15.

В химический стакан емкостью 250 мл добавляют 50 мл воды и 5 г бета-глюкана овса. Реакционную смесь перемешивают 1 час, после чего к суспензии добавляют раствор 2,5 г йодной кислоты в 10 мл воды, доводят рН до 3-4 и перемешивают 20 часов при 25 ° С. Затем реакционную смесь диализуют относительно воды через диализные мешки 1 кДа в течение 120 часов, после чего лиофилизируют.

Образец 16.

В химический стакан емкостью 600 мл добавляют 300 мл воды и 15 г бета-глюкана овса. Реакционную смесь перемешивают 1 час, после чего к суспензии добавляют раствор 7,6 г йодной кислоты в 30 мл воды, доводят рН до 3-4 и перемешивают 18 часов при 25 ° С. Осадок отделяют центрифугированием и промывают сначала водой, затем чистым ацетоном и сушат.

Образец 17.

В химический стакан емкостью 500 мл добавляют 365 мл 0,5М водного раствора натрия гидроксида и растворяют 7,3 г бета-глюкана ячменя, после чего фракционируют через мембрану 10 кДа, полученный продукт сушат. Полученный продукт растворяют в 62,5 мл воды, после чего добавляют раствор 1,42 г йодной кислоты в 4,7 мл воды и перемешивают 20 часов при 25 ° С. Избыток окислителя нейтрализуют, высаждают продукт в ацетон, осадок отфильтровывают, промывают водным раствором ацетона и чистым ацетоном и сушат.

Образец 18.

В химический стакан добавляют 70 мл воды и 5 г β -глюкана грибов Рейши. Реакционную смесь перемешивают 1 час, после чего добавляют раствор 2,1 г йодной кислоты в 10 мл воды и перемешивают 72 часа при 25 ° С. Избыток окислителя нейтрализуют, высаждают продукт в ацетон, осадок отфильтровывают, промывают водным раствором ацетона и чистым ацетоном и сушат.

Путем периодатного окисления исходных бета-глюканов по реакции Малапрада был получен ряд образцов, приведенный в таблице 1. Для работы были использованы как природные бета-глюканы (хлебопекарных дрожжей, овса, ячменя, грибов рейши), так и синтетический 1,4- бета-глюкан (карбоксиметилцеллюлоза).

Согласно литературным данным, окисление протекает преимущественно по С2 и С3 пиранозного кольца с его разрывом. В нашем случае реакция сопровождалась снижением молекулярной массы и увеличением числа карбонильных групп в продукте по сравнению с исходным глюканом (Таблица 1).

Таблица 1

Образцы, полученные путем периодатного окисления бета-глюканов

Образец	Бета-глюкан	Mw, Да	Поли дисперсность	СОН, ммоль/г
1	КМЦ	23080	2,2	0,50
2	КМЦ	214030	10,9	0,62
3	КМЦ	44490	3,12	0,51
4	КМЦ	27210	2,02	0,46
5	КМЦ	7410	1,8	1,27
6	КМЦ	15250	1,4	0,73
7	КМЦ	27260	2,6	1,79
8	КМЦ	25990	2,67	1,69
9	КМЦ	11570	1,91	1,66
10	КМЦ	33300	2,0	1,15
11	КМЦ	15370	1,7	1,08

12	КМЦ	14070	1,9	0,53
13	КМЦ	11740	1,4	1,47
14	Бета-глюкан ячменя	14070	1,9	0,53
15	Бета-глюкан овса	3790	1,52	1,18
16	Бета-глюкан овса	3250	1,48	1,46
17	Бета-глюкан ячменя	12770	1,93	1,10
18	Бета-глюкан Рейши	20560	5,77	1,93

Все продукты обработки бета-глюкана йодной кислотой в указанных условиях проведения процесса (интервалах pH и температуры, состав растворителей) в указанном интервале содержания карбонильных групп обладали противовирусной активностью в отношении вируса гриппа (см. таблица 2) и вируса энцефаломиокардита мышей (см. таблица 3), отсутствующей у исходных бета-глюканов. При этом активность возрастала пропорционально росту числа карбонильных групп.

Таблица 2.

Противовирусная активность образцов *in vitro* в отношении вируса гриппа А/Пуэрто-Рико/8/34 (H1N1)

Образец	Бета-глюкан	Цитотоксичность (CC ₅₀ ср.), мг/мл	Противовирусная активность в отношении вируса гриппа А/Пуэрто-Рико/8/34 (H1N1)		Химioterапeвтический индекс
			Эффективная доза (IC ₅₀ ср.), мг/мл	Вирусингибирующее действие, ΔlgTCID ₅₀ ср.	
1	КМЦ	8,39	0,09	1,25	89,66
2	КМЦ	>60,00	2,33	1,00	>25
3	КМЦ	14,80	0,13	2,50	115,96
4	КМЦ	19,25	0,54	2,43	35,48
5	КМЦ	9,50	0,05	1,56	195,71
6	КМЦ	31,20	1,07	1,25	29,17
7	КМЦ	26,44	1,59	2,25	16,59
8	КМЦ	6,10	0,28	3,42	21,74
9	КМЦ	8,13	0,22	3,61	36,43
10	КМЦ	3,98	0,13	2,21	30,27
11	КМЦ	2,49	0,31	3,75	8,00
12	КМЦ	2,98	0,05	1,50	63,81
13	КМЦ	6,94	0,21	1,90	32,52
14	Бета-глюкан ячменя	20,10	0,43	3,66	46,39
15	Бета-глюкан овса	18,50	0,41	3,11	45,40
16	Бета-глюкан овса	29,02	0,32	2,59	89,87
17	Бета-глюкан ячменя	24,02	0,38	4,06	63,93
18	Бета-глюкан гриба Рейши	13,32	0,27	3,24	49,56

* Вещества с выраженной противовирусной активностью имеют ΔlgTCID₅₀ ср. ≥ 1,50.

Таблица 3.

Защищенность культуры ФЛЭЧ от цитопатического воздействия вируса энцефаломиокардита мышей (ВЭМ), возникающая после стимуляции ее тестируемыми веществами (% защиты монослоя ФЛЭЧ) в течение 4 ч

Дозы, мкг	Тестируемые вещества			
	-	Образец 12	Образец 13	КМЦ 7 MF
2000	3	18	32	16
1000	2	31	40	41
500	0	39	41	33
250	6	32	42	25
125	0	28	31	15
62	1	18	33	14
31	0	10	24	9
15	0	1	7	1

Следует отметить, что вещества 12, 13 и КМЦ 7 MF способны оказывать защиту от цитопатического действия ВЭБ на монослой клеток ФЛЭЧ (% защищенности монослоя - 20-40%), однако у веществ 12 и 13 эта способность выше.

Противовирусная активность образца 10 in vivo в отношении вируса гриппа A/California/7/09 pdm (H1N1) на модели гриппозной пневмонии мышей при экстренно-профилактической схеме введения

Результаты исследований показали, что образец 10 дозозависимым способом проявляет противовирусную активность в отношении вируса гриппа A/California/7/09 pdm (H1N1) как на белых беспородных мышах ICR, так и на линейных мышах BALB/c, при заражающей дозе от 1 до 10 MLD₅₀. При этом в протестированном диапазоне наибольшей активностью обладает доза 0,1 мг/кг/мышь, которая не только достоверно вызывает защиту зараженных гриппом животных, но и существенно увеличивает продолжительность их жизни по сравнению с вирусным контролем, лишь немного уступая контрольному препарату прямого действия (озельтамивиру фосфату) (см. таблицу 4).

Таблица 4.

Вещество		% защиты		Средняя продолжительность жизни, сутки, (M ± σ)	
Название	Доза, мг/кг/мышь				
		ICR, 1MLD ₅₀	BALB/c, 10 MLD ₅₀	ICR, 1MLD ₅₀	BALB/c, 10 MLD ₅₀
Образец 10	0,1	26,67	13,34	12,33±2,87	7,40±4,61
	1	6,67	13,34	10,60±3,79	6,60±4,60
	12	0,00 (-	0,00	10,53±3,48	6,27±3,35

		6,67)			
	100	0,00	0,00	10,47±3,64	5,40±3,50
	400	н/д*	6,66	н/д	6,00±4,05
Озельтамивира фосфат	25	40,00	20,00	13,25±2,05	7,87±4,09
Контроль вируса	-	0,00	0,00	10,93±3,43	5,00±2,96
Интактные	-	100,00	100,00	14,00±0,00	14,00±0,00

*н/д - нет данных

Способность вещества 13 активировать иммунологически значимые рецепторы

Введение в структуру бета-глюкана карбонильных групп путем обработки йодной кислотой в указанных условиях для 1,4-бета-глюкана (карбоксиметилцеллюлоза) привело к появлению способности к активации рецептора CD14, отсутствующей у исходного бета-глюкана. Проведенные исследования показали, что образец 13, в отличие от 1,3- и 1,6-β-глюканов, не активирует рецептор dectin-1a, однако приобретает способность активировать рецептор CD14. Таким образом, образец 13 обладает уникальными иммунологическими свойствами, отличающими его от других β-глюканов.

Активация Т-лимфоцитов образцами 12 и 13, регистрируемая по изменению количества клеток, экспрессирующих CD69, среди Т-хелперов и цитотоксических лимфоцитов (ЦТЛ)

Молекула CD69 является маркером ранней (в первые 4-24 ч воздействия) активации Т-лимфоцитов и удобным объектом для быстрой оценки различных веществ в плане их способности активировать лимфоциты. В ходе культивирования лимфоцитов обычно процент CD3+CD69+ клеток несколько возрастает даже в отсутствие стимулирующих добавок, но у здоровых людей редко превышает 5-8%. Характер влияния веществ, добавляемых в культуру для стимуляции лимфоцитов, оценивается по $\Delta = (\% \text{ CD3+CD69+ в стимулированной пробе}) - (\% \text{ CD3+CD69+ в спонтанной пробе})$. В нашем исследовании активирующее влияние исследуемых веществ оценивалось отдельно на Т-хелперы (CD3+CD4+CD69+) и на ЦТЛ (CD3+CD8+CD69+). Результаты наших исследований см. в табл. 5

Таблица 5.

Влияние исследуемых веществ на уровень активации Т-хелперов и ЦТЛ в культуре у 12 человек (индивидуальные данные)

№ донора крови	Спонтанно активированные (%)		Дополнительно активированные веществами (Δ, %)					
	Т-хелперы	ЦТЛ	Т-хелперы			ЦТЛ		
			Образец 12	Образец 13	КМЦ 7 MF	Образец 12	Образец 13	КМЦ 7 MF
1	3,0	2,6	2,1	4,6		2,7	5,0	
2	3,5	7,5	9,8	9,3		10,0	9,8	

3	2,8	7,7	4,0	1,9		2,7	0,0	
4	1,0	1,7	2,3	2,4		2,8	1,6	
5	2,0	6,9	8,0	7,2		5,1	2,0	
6	3,2	11,0	5,1	4,4		2,0	1,3	
7	3,5	2,8			1,8			0,7
8	2,6	5,7			0,0			0,0
9	0,1	1,0			0,2			0,0
10	0,1	1,2			0,2			1,2
11	0,7	4,0			0,1			2,3
12	0,3	1,0			0,0			1,7

В данной серии экспериментов оказалось, что вещества 12 и 13 активируют и Т-хелперы, и ЦТЛ практически у всех людей, в то время как вещество КМЦ 7 MF - у 1 донора. Следовательно, вещества 12 и 13 оказывают более выраженное активирующее действие на лимфоциты по повышению процента CD69+ Т-лимфоцитов, чем вещество КМЦ 7 MF.

В условиях ко-стимуляции с ФГА в клетках крови людей со «сниженным соотношением CD4/CD8 клеток» вещества 12, 13 и КМЦ 7 MF высоко стимулируют продукцию IL-1 β клетками крови, при этом 12 и 13 - значительно больше, чем КМЦ 7 MF (определяли методом ИФА с помощью тест-системы производства «Вектор-Бест»). В группе здоровых доноров вещества 12 и 13 также высоко продуцируют IL-1 β , в отличие от КМЦ 7 MF, неспособного к продукции данного цитокина.

Таким образом, введение в структуру бета-глюкана карбонильных групп обработкой йодной кислотой в указанных условиях для 1,4-бета-глюкана (карбоксиметилцеллюлоза) привело к увеличению способности вызывать продукцию цитокинов и активации иммунокомпетентных клеток по сравнению с исходным бета-глюканом.

Пункт 2.

Образец 19.

В химический стакан емкостью 250 мл добавляют 100 мл изопропилового спирта и 5 г бета-глюкана овса. Реакционную смесь перемешивают ночь, после чего к раствору добавляют 25 г 30%-масс. водного раствора натрия гидроксида и перемешивают 1 час. Затем к полученной суспензии добавляют раствор 3,5 г монохлоруксусной кислоты в 25 мл изопропилового спирта и перемешивают 3 часа при температуре 72 °С. Раствор декантируют, осадок растворяют в воде, доводят pH до 2-3, высаждают продукт в ацетон, осадок отфильтровывают и промывают ацетоном. После этого осадок растворяют в воде, доводят pH до 8 и высаждают продукт в ацетон, промывают чистым ацетоном и сушат.

Образец 20.

В химический стакан емкостью 250 мл добавляют 100 мл изопропилового спирта и 5 г бета-глюкана хлебопекарных дрожжей. Реакционную смесь перемешивают ночь, после чего к раствору добавляют 25 г 30%-масс. водного раствора натрия гидроксида и перемешивают 1 час. Затем к полученной суспензии добавляют раствор 3,5 г монохлоруксусной кислоты в 25 мл изопропилового спирта и перемешивают 5 часов при температуре 72 °С. Раствор декантируют, осадок растворяют в воде, доводят рН до 2-3, высаждают продукт в ацетон, осадок отфильтровывают и промывают ацетоном. После этого осадок растворяют в воде, доводят рН до 8 и высаждают продукт в ацетон, промывают чистым ацетоном и сушат.

Образец 21.

В химический стакан емкостью 600 мл добавляют 200 мл изопропилового спирта и 15 г бета-глюкана хлебопекарных дрожжей. Реакционную смесь перемешивают 1 час, после чего к раствору добавляют 75 г 10%-масс. водного раствора натрия гидроксида и перемешивают еще 1 час. Затем к полученной суспензии добавляют раствор 10,70 г монохлоруксусной кислоты в 55 мл изопропилового спирта и перемешивают 5 часов при температуре 72 °С. Раствор декантируют, осадок растворяют в воде, доводят рН до 2-3, высаждают продукт в ацетон, осадок отфильтровывают и промывают ацетоном. После этого осадок растворяют в воде, доводят рН до 8 и высаждают продукт в ацетон, промывают чистым ацетоном и сушат.

Путем алкилирования исходных бета-глюканов монохлоруксусной кислотой был получен ряд образцов (таблица 6). Данный тип модификации структуры приводит к возрастанию содержания в бета-глюкане карбоксильных групп, отражаемому показателем степени замещения.

Таблица 6

Образцы, полученные путем алкилирования бета-глюканов

Образец	Бета-глюкан	Mw, Да	Поли дисперсность	Степень замещения
19	овса	101980	2,51	0,25
20	хлебопекарных дрожжей	636820	6,61	0,89
21	хлебопекарных дрожжей	285100	11,4	0,42

Полученные продукты обработки бета-глюкана галогеналкилкарбоновой кислотой в указанных условиях проведения процесса (интервалах рН и температуры, состав растворителей) в указанном интервале степени замещения обладали противовирусной активностью в отношении вируса гриппа (см. таблица 7) отсутствующей у исходных бета-глюканов. Однако, в отличие от окисленных образцов, отсутствовала однозначная зависимость между значением степени замещения и биологической эффективностью.

Таблица 7.

Противовирусная активность образцов *in vitro* в отношении вируса гриппа А/Пуэрто-Рико/8/34 (H1N1)

Образец	Бета-глюкан	Цитотоксичность (CC ₅₀ ср.), мг/мл	Противовирусная активность в отношении вируса гриппа А/Пуэрто-Рико/8/34 (H1N1)		Химioterапeвтичеcкий индекс
			Эффективная доза (IC ₅₀ ср.), мг/мл	Вирусингибирующее действие, ΔlgTCID ₅₀ ср.	
19	Бета-глюкан овса	16,06	0,18	1,41	87,33
20	Бета-глюкан хлебопекарных дрожжей	8,22	1,04	1,00	7,88
21	Бета-глюкан хлебопекарных дрожжей	>35	0,39	2,25	>88

Пункт 3.

Образец 22.

В химический стакан емкостью 600 мл добавляют 173 мл изопропилового спирта и 10,5 г бета-глюкана овса. Реакционную смесь перемешивают ночь, после чего к раствору добавляют 65 г 10%-масс. водного раствора натрия гидроксида и перемешивают 1 час. Затем к полученной суспензии добавляют раствор 9,13 г монохлоруксусной кислоты в 47 мл изопропилового спирта и перемешивают 5 часов при температуре 72 °С. Раствор декантируют, осадок растворяют в воде, доводят рН до 2-3, высаждают продукт в ацетон, осадок отфильтровывают и промывают ацетоном. После этого осадок растворяют в воде, доводят рН до 8 и высаждают продукт в ацетон, промывают чистым ацетоном и сушат. Полученный продукт растворяют в 162,5 мл воды, после чего добавляют раствор 1,77 г йодной кислоты в 6,32 мл воды и перемешивают 18 часов при 25 °С. Избыток окислителя нейтрализуют, высаждают продукт в ацетон. Выпавший осадок отфильтровывают, промывают ацетоном. Полученный продукт растворяют в воде, доводят до рН 8 и высаждают в ацетон, промывают водным раствором ацетона и чистым ацетоном и сушат.

Образец 23.

В химический стакан емкостью 600 мл добавляют 160 мл изопропилового спирта и 12,0 г бета-глюкана хлебопекарных дрожжей. Реакционную смесь перемешивают ночь, после чего к раствору добавляют 60 г 10%-масс. водного раствора натрия гидроксида и перемешивают 1 час. Затем к полученной суспензии добавляют раствор 8,56 г монохлоруксусной кислоты в 44 мл изопропилового спирта и перемешивают 5 часов при температуре 72 °С. Раствор декантируют, осадок растворяют в воде, доводят рН до 2-3, высаждают продукт в ацетон, осадок отфильтровывают и промывают ацетоном. После этого осадок растворяют в воде, доводят рН до 8 и высаждают продукт в ацетон, промывают чистым ацетоном и сушат. Полученный продукт растворяют в 175 мл воды, после чего добавляют раствор 1,45 г йодной кислоты в 4,8 мл воды и перемешивают 18 часов при 25 °С. Избыток окислителя нейтрализуют, высаждают продукт в ацетон. Выпавший осадок отфильтровывают, промывают ацетоном. Полученный продукт растворяют в воде, доводят до рН 8 и высаждают в ацетон, промывают водным раствором ацетона и чистым ацетоном и сушат.

Образец 24.

В химический стакан емкостью 300 мл добавляют 118 мл изопропилового спирта и 8,85 г бета-глюкана ячменя. Реакционную смесь перемешивают ночь, после чего к раствору добавляют 44,25 г 10%-масс. водного раствора натрия гидроксида и перемешивают 1 час. Затем к полученной суспензии добавляют раствор 3,88 г монохлоруксусной кислоты в 25 мл изопропилового спирта и перемешивают 5 часов при температуре 72 °С. Раствор декантируют, осадок растворяют в воде, доводят рН до 2-3, высаждают продукт в ацетон, осадок отфильтровывают и промывают ацетоном. После этого осадок растворяют в воде, доводят рН до 8 и высаждают продукт в ацетон, промывают чистым ацетоном и сушат. Полученный продукт растворяют в 131 мл воды, после чего добавляют раствор 1,77 г йодной кислоты в 6,2 мл воды и перемешивают 18 часов при 25 ° С. Избыток окислителя нейтрализуют, высаждают продукт в ацетон. Выпавший осадок отфильтровывают, промывают ацетоном. Полученный продукт растворяют в воде, доводят до рН 8 и высаждают в ацетон, промывают водным раствором ацетона и чистым ацетоном и сушат.

Комбинация алкилирования монохлоруксусной кислотой с последующим окислением по Малапраду карбоксиметилированных бета-глюканов были получены образцы, отличающиеся от исходных бета-глюканов содержанием карбонильных групп и степенью замещения (таблица 8).

Таблица 8

Образцы, полученные путем окисления и алкилирования бета-глюканов

Образец	бета-глюкан	Mw, Да	Поли дисперсность	СОН, ммоль/г	Степень замещения
22	Бета-глюкан овса	14790	2,0	0,70	0,33
23	Бета-глюкан хлебопекарных дрожжей	285100	11,4	0,66	0,42
24	Бета-глюкан ячменя	32510	2,2	0,47	0,49

Полученные продукты обработки бета-глюкана галогеналкилкарбоновой кислотой с последующей обработкой полупродукта йодной кислотой в указанных условиях проведения процесса (интервалах рН и температуры, состав растворителей) в указанном интервале содержания карбонильных групп обладали противовирусной активностью в отношении вируса гриппа (см. таблица 9), отсутствующей у исходных бета-глюканов.

Таблица 9.

Противовирусная активность образцов *in vitro* в отношении вируса гриппа А/Пуэрто-Рико/8/34 (H1N1)

Образец	Бета-глюкан	Цитотоксичность (CC ₅₀ ср.), мг/мл	Противовирусная активность в отношении вируса гриппа А/Пуэрто-Рико/8/34 (H1N1)		Химиотерапевтический индекс
			Эффективная	Вирусингиб	

			доза (IC ₅₀ ср.), мг/мл	ирующее действие, ΔlgTCID ₅₀ ср.	
22	Бета-глюкан овса	27,50	1,69	1,00	16,31
23	Бета-глюкан хлебопекарных дрожжей	>36	0,52	1,97	>69
24	Бета-глюкан ячменя	40,60	0,52	1,00	78,08

Композиции, содержащие фармацевтически приемлемые добавки.

Вышеописанные способы модификации структуры бета-глюканов позволяют вводить в состав получаемых продуктов фармацевтически приемлемые добавки. Данная возможность иллюстрируется нижеприведенными примерами.

Таблица 10.

Образец	Бета-глюкан	Фармацевтически приемлемые добавки			Цитотоксичность (CC ₅₀ ср.), мг/мл	Противовирусная активность в отношении вируса гриппа А/Пуэрто-Рико/8/34 (H1N1)		Химический индекс
		Na ₂ CO ₃ , %	NaHCO ₃ , %	Аскорбат натрия, %		Эффективная доза (IC ₅₀ ср.), мг/мл	Вирусингибирующее действие, ΔlgTCID ₅₀ ср.	
3	КМЦ	1,28	16,28	-	14,80	0,13	2,50	115,96
4	КМЦ	17,36	13,26	-	19,25	0,54	2,43	35,48
8	КМЦ	0,89	16,51	-	6,10	0,28	3,42	21,74
9	КМЦ	12,80	18,56	-	8,13	0,22	3,61	36,43
12	КМЦ	-	-	0,21	2,98	0,05	1,50	63,81
20	Бета-глюкан хлебопекарных дрожжей	5,43	-	-	8,22	1,04	1,00	7,88
22	Бета-глюкан овса	0,42	1,67	-	27,50	1,69	1,00	16,31
23	Бета-глюкан хлебопекарных дрожжей	0,51	-	-	>36	0,52	1,97	>69
24	Бета-глюкан ячменя	0,94	-	-	40,60	0,52	1,00	78,08

Композиции с противомикробными субстанциями.

Образец 25.

В химический стакан емкостью 2000 мл добавляют 960 мл воды и 80 г КМЦ. Реакционную смесь перемешивают 3 часа, после чего к раствору добавляют раствор 7,5 г

йодной кислоты в 50 г воды и перемешивают 24 часа при 25 ° С. Избыток окислителя нейтрализуют, высаживают продукт в ацетоне. Выпавший осадок фильтруют, промывают водным раствором ацетона и чистым ацетоном и сушат. Полученный продукт растворяют в 5% карбонате натрия, фракционируют через мембрану 10 кДа, доводят рН до 3-4, полученный продукт сушат. Полученный продукт растворяют в воде, добавляют 0,02% масс. осельтамивира фосфата, перемешивают 30 минут. Полученный продукт сушат.

Образец 26.

В химический стакан емкостью 2000 мл добавляют 960 мл воды и 80 г КМЦ. Реакционную смесь перемешивают 3 часа, после чего к раствору добавляют раствор 7,5 г йодной кислоты в 50 г воды и перемешивают 24 часа при 25 ° С. Избыток окислителя нейтрализуют, высаживают продукт в ацетоне. Выпавший осадок фильтруют, промывают водным раствором ацетона и чистым ацетоном и сушат. Полученный продукт растворяют в 5% карбонате натрия, фракционируют через мембрану 10 кДа, доводят рН до 3-4, полученный продукт сушат. Полученный продукт растворяют в воде, добавляют 0,2% масс. осельтамивира фосфата, перемешивают 30 минут. Полученный продукт сушат.

Образец 27.

В химический стакан емкостью 2000 мл добавляют 960 мл воды и 80 г КМЦ. Реакционную смесь перемешивают 3 часа, после чего к раствору добавляют раствор 7,5 г йодной кислоты в 50 г воды и перемешивают 24 часа при 25 ° С. Избыток окислителя нейтрализуют, высаживают продукт в ацетоне. Выпавший осадок фильтруют, промывают водным раствором ацетона и чистым ацетоном и сушат. Полученный продукт растворяют в 5% карбонате натрия, фракционируют через мембрану 10 кДа, доводят рН до 3-4, полученный продукт сушат. Полученный продукт растворяют в воде, добавляют 2% масс. осельтамивира фосфата, перемешивают 30 минут. Полученный продукт сушат.

Образец 28.

В химический стакан емкостью 5000 мл добавляют 1800 мл воды и 75 г КМЦ. Реакционную смесь перемешивают 3 часа, после чего к раствору добавляют раствор 15 г йодной кислоты в 150 г воды и перемешивают несколько часов при 40 °С и 20 часов при 25 ° С. Затем к реакционной массе добавляют карбонат натрия, доводят рН до 8-9, фракционируют через мембрану 10 кДа, доводят рН до 3-4. Полученный продукт сушат. Полученный продукт растворяют в воде, добавляют 0,02% масс. осельтамивира фосфата, перемешивают 30 минут. Полученный продукт сушат.

Образец 29.

В химический стакан емкостью 5000 мл добавляют 1800 мл воды и 75 г КМЦ. Реакционную смесь перемешивают 3 часа, после чего к раствору добавляют раствор 15 г йодной кислоты в 150 г воды и перемешивают несколько часов при 40 °С и 20 часов при 25 ° С. Затем к реакционной массе добавляют карбонат натрия, доводят рН до 8-9, фракционируют через мембрану 10 кДа, доводят рН до 3-4. Полученный продукт сушат. Полученный продукт растворяют в воде, добавляют 0,2% масс. осельтамивира фосфата, перемешивают 30 минут. Полученный продукт сушат.

Образец 30.

В химический стакан емкостью 5000 мл добавляют 1800 мл воды и 75 г КМЦ. Реакционную смесь перемешивают 3 часа, после чего к раствору добавляют раствор 15 г йодной кислоты в 150 г воды и перемешивают несколько часов при 40 °С и 20 часов при 25 °С. Затем к реакционной массе добавляют карбонат натрия, доводят рН до 8-9, фракционируют через мембрану 10 кДа, доводят рН до 3-4. Полученный продукт сушат. Полученный продукт растворяют в воде, добавляют 2% масс. осельтамивира фосфата, перемешивают 30 минут. Полученный продукт сушат.

При добавлении субстанции осельтамивира фосфата к модифицированным бета-глюканам были получены композиции, обладающие противовирусной активностью (таблицы 11, 12).

Таблица 11

Композиции с осельтамивиром

Образец	бета-глюкан	Mw, Да	Поли дисперсность	СОН, ммоль/г	Содержание осельтамивира, % масс
25	КМЦ	52150	2,53	0,33	0,02
26	КМЦ	52150	2,53	0,33	0,20
27	КМЦ	52150	2,53	0,33	2,00
28	КМЦ	33300	2,0	1,15	0,02
29	КМЦ	33300	2,0	1,15	0,20
30	КМЦ	33300	2,0	1,15	2,00

Таблица 12.

Противовирусная активность образцов *in vitro* в отношении вируса гриппа А/Пуэрто-Рико/8/34 (H1N1)

Номер образца	бета-глюкан	Цитотоксичность (CC ₅₀ ср.), мг/мл	Противовирусная активность в отношении вируса гриппа А/Пуэрто-Рико/8/34 (H1N1)		Химioterапeвтический индекс
			Эффективная доза (IC ₅₀ ср.), мг/мл	Вирусингибирующее действие, ΔlgTCID ₅₀ ср.	
25	КМЦ	32,68	0,0044	2,44	7 423,90
26	КМЦ	38,52	0,00054	2,50	71 856,73
27	КМЦ	32,63	0,000025	2,44	1 280 315,52
28	КМЦ	32,47	0,0453	2,68	716,66
29	КМЦ	26,70	0,00043	2,81	61 990,09
30	КМЦ	26,23	0,0000065	2,53	4 048 672,57

Получение бета-глюканов, комбинирующих противовирусные и иммуноактивные свойства

Таблица 13.

Приобретение противовирусной активности у иммунологически активных образцов бета-глюканов

№ образца	бета-глюкан	Иммунологическая	Цитотоксичность	Противовирусная активность в отношении	Химioterапeвтический
-----------	-------------	------------------	-----------------	--	----------------------

		активность на репортерной клеточной линии hDectin-1a	(CC ₅₀ ср.), мг/мл	вируса гриппа А/Пуэрто-Рико/8/34 (H1N1)		еский индекс
				Эффекти вная доза (IC ₅₀ ср.), мг/мл	Вирсингибир ующее действие, ΔlgTCID ₅₀ ср.	
Бета- глюкан хлебопека рных дрожжей	Бета-глюкан хлебопекарн ых дрожжей	+	>2*	?	1,00	?
Бета- глюкан овса	Бета-глюкан овса	+	>2*	0,21	0,75	-
Бета- глюкан рейши	Бета-глюкан рейши	+	н/д	-	0,25	-
КМЦ	КМЦ	-	н/д	н/д	н/д	н/д
15	Бета-глюкан овса	+	18,50	0,41	3,11	45,40
16	Бета-глюкан овса	+	29,02	0,32	2,59	89,87
17	Бета-глюкан ячменя	+	24,02	0,38	4,06	63,93
18	Бета-глюкан гриба Рейши	н/д	13,32	0,27	3,24	49,56
19	Бета-глюкан овса	+	16,06	0,18	1,41	87,33
20	Бета-глюкан хлебопекарн ых дрожжей	+	8,22	1,04	1,00	7,88

*предел растворимости препарата.

Результаты экспериментов показали, что протестированные варианты β-глюканов, за исключением КМЦ, обладали способностью специфическим образом активировать рецептор дектин-1a, не оказывая стимулирующего действия на родительскую клеточную линию. При этом наблюдались различия в способности β-глюканов активировать дектин-1a, в зависимости от их структуры (см. табл. 13).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Противомикробное средство, представляющее собой продукт обработки бета-глюкана йодной кислотой или ее солью с последующей очисткой и выделением, где обработку проводят в водной или водно-органической среде с содержанием органических растворителей в количестве от 0,1 до 100%, при pH в диапазоне от 1 до 14, при температуре от 0 до 100°C; и где содержание карбонильных групп в противомикробном средстве составляет от 0,1 до 3 ммоль/г.

2. Противомикробное средство по п. 1, где бета-глюкан представляет собой карбоксиметилцеллюлозу, бета-глюкан хлебопекарных дрожжей, бета-глюкан овса, бета-глюкан ячменя, бета-глюкан рейши, необязательно после предварительной очистки и/или фракционирования.

3. Противомикробное средство по п. 1 или 2, эффективное в отношении вирусов гриппа, герпеса, респираторных вирусных и бактериальных инфекций.

4. Способ получения противомикробного средства по п. 1, который включает обработку бета-глюкана йодной кислотой или ее солью в водной или водно-органической среде с содержанием органических растворителей в количестве от 0,1 до 100%, при pH в диапазоне от 1 до 14, при температуре от 0 до 100°C с последующей очисткой и выделением.

5. Противомикробная композиция, содержащая эффективное количество противомикробного средства по любому из пп. 1-3 и фармацевтически приемлемые добавки.

6. Противомикробная композиция, содержащая эффективное количество противомикробного средства по любому из пп. 1- 3 и по меньшей мере одно другое противомикробное средство.

7. Противомикробная композиция по п.6, дополнительно содержащая фармацевтически приемлемые добавки.

8. Противомикробная композиция по любому из п.п. 5-7, эффективная в отношении вирусов гриппа, герпеса, респираторных вирусных и бактериальных инфекций.

По доверенности