



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,  
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**

(21), (22) Заявка: 2007135657/13, 27.09.2007

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
27.09.2007

(45) Опубликовано: 10.06.2009 Бюл. № 16

(56) Список документов, цитированных в отчете о  
поиске: RU 2036235 C1, 27.05.1995. TRANNOY L.L.  
et al. Differential sensitivities of pathogens in  
red cell concentrates to Tri-P(4)-  
photoinactivation, Vox Sang. 2006 Aug;91(2):111-  
8. US 5516629, 14.05.1996.

Адрес для переписки:

123995, Москва, ГСП-5, ул. Б. Садовая, 1,  
корп.4, ФГУП "ГНЦ "НИОПИК"

(72) Автор(ы):

Ворожцов Георгий Николаевич (RU),  
Зубаиров Муртазали Мухтарович (RU),  
Каляя Олег Леонидович (RU),  
Кузнецова Нина Александровна (RU),  
Кузьмин Сергей Георгиевич (RU),  
Лужков Юрий Михайлович (RU),  
Лукьянец Евгений Антонович (RU),  
Негримовский Владимир Михайлович (RU),  
Рубин Андрей Борисович (RU),  
Селянинов Юрий Олегович (RU),  
Страховская Марина Глебовна (RU),  
Южакова Ольга Алексеевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное Государственное унитарное  
предприятие "Государственный научный  
центр "Научно-исследовательский институт  
органических полупродуктов и красителей"  
(ФГУП "ГНЦ "НИОПИК") (RU)

**(54) СПОСОБ ФОТОИНАКТИВАЦИИ ВИРУСА ГРИППА А ПТИЦ ПОДТИПА H5N1**

(57) Реферат:

Изобретение относится к области вирусологии. Способ заключается в использовании излучения видимого спектрального диапазона с применением водорастворимых фотосенсибилизаторов катионного типа, которые вводят до облучения в вирусодержащую среду в концентрации 0,25-2 кг/мл. Способ характеризуется применением низких концентраций фотосенсибилизаторов и

безвредного белого или красного света, что обеспечивает его экономичность и безопасность. Кроме того, использование этого способа позволит уменьшить все возрастающую распространенность заболеваний, вызываемых вирусом «птичьего гриппа». Изобретение может быть использовано для фотообеззараживания различных сред от вируса гриппа А птиц подтипа H5N1 (вируса «птичьего гриппа»). 2 табл.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,  
PATENTS AND TRADEMARKS

**(12) ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: **2007135657/13, 27.09.2007**

(24) Effective date for property rights:  
**27.09.2007**

(45) Date of publication: **10.06.2009 Bull. 16**

Mail address:  
**123995, Moskva, GSP-5, ul. B. Sadovaja, 1,  
korp.4, FGUP "GNTs "NIOPIK"**

(72) Inventor(s):  
**Vorozhtsov Georgij Nikolaevich (RU),  
Zubairov Murtazali Mukhtarovich (RU),  
Kalija Oleg Leonidovich (RU),  
Kuznetsova Nina Aleksandrovna (RU),  
Kuz'min Sergej Georgievich (RU),  
Luzhkov Jurij Mikhajlovich (RU),  
Luk'janets Evgenij Antonovich (RU),  
Negrimovskij Vladimir Mikhajlovich (RU),  
Rubin Andrej Borisovich (RU),  
Seljaninov Jurij Olegovich (RU),  
Strakhovskaja Marina Glebovna (RU),  
Juzhakova Ol'ga Alekseevna (RU)**

(73) Proprietor(s):  
**Federal'noe Gosudarstvennoe unitarnoe  
predpriyatje "Gosudarstvennyj nauchnyj tsentr  
"Nauchno-issledovatel'skij institut  
organicheskikh poluproduktov i krasitelej" (FGUP  
"GNTs "NIOPIK") (RU)**

**(54) METHOD OF PHOTO INACTIVATION OF BIRD INFLUENZA A VIRUS OF SUBTYPE H5N1**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.  
SUBSTANCE: invention concerns virology. Method involves use of visible spectral range with application of water-soluble photo sensitivisers of cationic type, added to virus-containing medium in 0.25-2 kg/ml concentration before irradiation. Method is characterised by low photo sensitiviser concentrations and safe white or red light, providing

for method effectiveness and safety. Invention can be applied in photo decontamination of bird influenza A virus of H5N1 subtype ('bird flu' virus) for various media.

EFFECT: additionally, shrinkage of ever expanding prevalence of diseases caused by 'bird flu' virus.

2 tbl, 5 ex

RU 2 3 5 7 7 0 C 1

RU 2 3 5 7 7 0 C 1

Настоящее изобретение относится к вирусологии и может быть использовано для фотообеззараживания различных сред от вируса гриппа А птиц подтипа H5N1 (вируса «птичьего гриппа»).

Известно инактивирующее, или повреждающее, действие света, фотосенсибилизированное некоторыми органическими соединениями, преимущественно относящимися к красителям. Характерным примером является фотосенсибилизация различных биологических систем псораленами при УФ блучении.

Так, известен способ фотосенсибилизированной псораленами инактивации вирусов, бактерий и простейших в препаратах крови [Corash L. Inactivation of viruses, bacteria, protozoa and leukocytes in platelet and red cell concentrates. *Vox Sang.* 2000. V. 78. P.P. 205-210].

Основным недостатком псораленов является их мутагенный потенциал, в том числе в отношении животных клеток, обусловленный фотоиндуцированными ими сшивками ДНК.

Эффект образования цитотоксичных активных форм кислорода (синглетный кислород, супероксид) из молекулярного кислорода при участии красителя называют фотодинамическим, а соответствующий способ фотоинактивации патогенных микроорганизмов и лечения инфекционных заболеваний - антимикробной фотодинамической терапией (АФДТ) [Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J. Antimicrob. Chemother.* 1998. V. 42, P.P. 13-28]. Селективность антимикробной ФДТ основана на большей чувствительности микроорганизмов по сравнению с животными клетками к активным формам кислорода.

Наиболее широко известен способ фотодинамической инактивации бактерий. В связи с широким распространением лекарственной устойчивости среди возбудителей различных инфекционных заболеваний этому способу придают большое значение и рассматривают как альтернативу традиционной химиотерапии [Hamblin M.R., Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem. Photobiol. Sci.* 2004. V.3.P.P.436-450].

Однако различные виды бактерий сильно отличаются по чувствительности к фотодинамической инактивации. Наиболее устойчивыми являются грамотрицательные бактерии. Это связано с низкой проницаемостью их внешней клеточной мембраны для красителей. Отрицательный заряд поверхности бактериальных клеток определяет активное связывание с ними и, соответственно, широкую антибактериальную активность красителей катонного тала [Minnock A., Vernon D.I., Schofield J., Griffiths J., Parish J.H., Brown S.T. Photoinactivation of bacteria. Use of a cationic water-soluble zinc phthalocyanine to photoinactivate both gram-negative and gram-positive bacteria. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 1996. V. 32. P.P. 159-164; Jori G. Photodynamic therapy of microbial infections: state of the art and perspectives. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 2006. V. 25. P.P. 505-519. Патент РФ №2282647, С09В 47/32, 2006 г.].

Грибы имеют более просто устроенную внешнюю клеточную стенку. Для фотодинамической инактивации патогенов грибковой природы, например, дрожжевых грибов рода *Candida*, могут применяться анионные [Bertoloni G., Reddi E., Gatta M., Burlini C., Jori G. Factors influencing the haematoporphyrin-sensitized photoinactivation of *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.* 1989. V. 135. P. 957-966], амфифильные [Патент РФ №2230110, С12N 1/14, 2004 г.] и катионные фотосенсибилизаторы [Патент РФ №2282647, С09В 47/32, 2006 г.].

Вирусы в связи с особенностями строения представляют собой принципиально отличающуюся от клеточных форм микроорганизмов мишень для антимикробной

ФДТ. Наибольшее значение для эффективности фотодинамической инактивации с тем или иным типом красителей имеет наличие, состав и строение оболочки вирионов. Так, анионные красители эффективны в отношении вирусов, имеющих оболочку, а механизм инактивации заключается в окислительной деструкции ее компонентов, в частности, индукции сшивок белков. Общепринято, что вирусы, не имеющие оболочек, более чувствительны к фотосенсибилизаторам катионного типа, которые имеют сродство к нуклеиновым кислотам и индуцируют окисление их азотистых оснований, главным образом, гуанозина [Wainwright M. Photoinactivation of viruses. Photochem. Photobiol. Sci. 2004. V. 3. P.P. 406-411]. Однако в связи с особенностями строения разных видов вирусов их чувствительность к фотодинамической инактивации с тем или иным красителем является индивидуальной характеристикой.

Для некоторых вирусов, имеющих оболочку, известны способы фотодинамической инактивации также с использованием катионных красителей. Так, имеющий оболочку вирус герпеса более эффективно инактивируется в присутствии катионных и амфифильных производных фталоцианинов по сравнению с анионным Мероцианином 540 [Smetana Z., Mendelson E., Manor J., van Lier E., Ben-Hur E., Salzberg S., Malik Z. Photodynamic inactivation of herpes viruses with phthalocyanine derivatives. J. Photochem. Photobiol. B. 1994. V. 22. P.P. 37-43].

Фталоцианины с положительно заряженными остатками на центральном атоме кремния используются для инактивации вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) при обеззараживании компонентов крови [Ben Hur E., Moor C.E., Margolis-Nunno H, Gottlieb P., Zuk M.M. et al. The photodecontamination of cellular blood components: mechanisms and use of photosensitization in transfusion medicine. Transf. Med Rev. 1996. V.10. P. 15-22].

Монокатионный краситель метиленовый голубой эффективен в инактивации лишенного оболочки аденовируса [Schagen F., Moor A.C, Cheong S.C., Cramer S.J., van Ormondt H., van der Eb A J., Dubbelman T., Hoeben R.C. Photodynamic treatment of adenoviral vectors with visible light: an easy and convenient method for viral inactivation. Gene Therapy. 1999. V. 6 P.P. 873-881] и имеющего оболочку денге вируса [Huang O., Fu W.L., Chen B., Huang J.F., Zhang X., Xue O. Inactivation of dengue virus by methylene blue/narrow bandwidth light system. J Photochem Photobiol B. 2004. V. 77. P.P. 39-43].

В то же время катионный порфилин, вызывающий инактивацию ряда вирусов, имеющих липидные оболочки, оказался неэффективен в отношении лишенного оболочки парвовируса [Trannoy L.L., Terpstra F.G., de Korte D., Lagerberg J.W., Verhoeven A.J., Brand A., van Engelenburg F.A. Differential sensitivities of pathogens in red cell concentrates to Tri-P(4)-photoinactivation. 2006. Vox Sang V 91. P.P. 111-118].

Таким образом, антивирусная активность сложным образом зависит от физико-химических характеристик красителя и природы объекта фотоинактивации, что затрудняет прогнозирование на основании имеющихся в литературе данных эффективности новых фотосенсибилизаторов и чувствительности неиспытанных видов вирусов.

Несмотря на большое значение разработки эффективных способов борьбы с вирусом «птичьего гриппа», возможность его фотодинамической инактивации для обеззараживания различных сред не изучалась.

Известен способ фотоинактивации вируса гриппа H5 серогруппы и вируса «птичьего гриппа», выбранных авторами за прототип, с использованием ультрафиолетовых бактерицидных (253,7 нм) облучателей (Информационное письмо ФГУП ГНЦ ВБ «Вектор» от 2005 г.). Недостатком этого способа является применение коротковолнового УФ излучения, оказывающего вредное воздействие на организмы

человека и животных.

Задача предлагаемого изобретения заключалась в разработке такого способа фотоинактивации вируса «птичьего гриппа», который бы обеспечил 100% инактивацию вируса при кратковременном (в течение нескольких минут) действии безвредного излучения видимого спектрального диапазона - белого или красного света.

Поставленная задача решается применением фотосенсибилизаторов - водорастворимых красителей катионного типа путем их введения до облучения в вирусосодержащую среду в концентрации 0,25-2 мкг/мл.

Применение фотосенсибилизатора в концентрации менее 0,25 мкг/мл не обеспечивает эффективную фотоинактивацию, а повышение ее выше 2 мкг/мл нецелесообразно, т.к. не дает повышения эффективности.

Способ осуществляется следующим образом.

В экспериментах используют вирус гриппа А птиц подтипа H5N1 (РНК-содержащий, имеющий оболочку вирус) в экстраэмбриональной жидкости с исходным титром  $10^9$  ЭЛД<sub>50</sub> (эмбриональных летальных доз). Готовят ряд десятикратных разведений вируса, для чего к 0,5 см<sup>3</sup> вирусосодержащей жидкости добавляют 4,5 см<sup>3</sup> физиологического раствора.

В вирусосодержащую жидкость с дозой вируса  $10^2$ - $10^7$  ЭЛД<sub>50</sub>/мл вводят катионный краситель в концентрации 0,25-2 мкг/мл и через 10 мин облучают 5 мин с использованием галогенового источника белого света (освещенность на уровне образца - 65000 люкс) или светодиодного источника красного света (плотность мощности на уровне образца 17 мВт/см<sup>2</sup>).

В качестве фотосенсибилизаторов применяют, например, монокатионные красители профлавин ацетат и метиленовый голубой или октакатионный октакис(N-(2-гидроксиэтил)-N,N-диметиламмонийметил фталоцианин цинка октахлорид (Холосенс).

Заражение проводят на 10-дневных развивающихся куриных эмбрионах. Обработанным материалом с различными разведениями вируса заражают по 6 эмбрионов. Для заражения эмбриона пробойником пробивают в скорлупе 2 отверстия на глубину  $1,2 \pm 0,3$  мм, в которые 1 инокулируют по 0,1 см<sup>3</sup>, отверстия заливают расплавленным парафином. Зараженные эмбрионы помещают в термостат при температуре  $37 \pm 0,5$ °C и овоскопируют 2 раза в день. Учет гибели зараженных эмбрионов заканчивают через 72 часа (через 24 часа после гибели последних эмбрионов). Погибшие эмбрионы вскрывают в день гибели. Результат специфичности гибели куриных эмбрионов подтверждают в реакции гемагглютинации (РГА). Для этого от каждого погибшего эмбриона отдельно стерильно собирают аллантоисную жидкость, которую проверяют на гемагглютинирующую активность и идентичность в РГА.

Контролями служат: вирусосодержащие жидкости без обработки светом (Контроль 1); вирусосодержащие жидкости с препаратом без обработки светом (Контроль 2); вирусосодержащие жидкости без препарата, обработанные светом (Контроль 3); интактные куриные эмбрионы (Контроль 4).

Об инактивации вируса в инокуляте, используемом для заражения куриных эмбрионов, судят по полному падению инфекционности, т.е. потере способности вызывать гибель эмбрионов. Определяют дозу вируса, которая может быть инактивирована с помощью фотодинамической обработки при определенной

концентрации катионного красителя.

Предлагаемое изобретение иллюстрируется приведенными ниже примерами.

#### Пример 1

5 В вирусодержащие жидкости с различными дозами вируса вводят краситель профлавин ацетат в концентрации 1,0 или 2,0 мкг/мл и через 10 мин облучают белым светом (доза 15 Дж/см<sup>2</sup>). Результаты представлены в таблице 1. Наблюдают полное падение инфекционности (100% выживания куриных эмбрионов) при дозе вируса в обрабатываемой жидкости не более 10<sup>4</sup> ЭЛД<sub>50</sub>/мл. Результаты представлены в  
10 таблице 1.

#### Пример 2

Аналогично при использовании 1,0 мкг/мл красителя метиленового голубого наблюдают полное падение инфекционности при дозе вируса не более 10<sup>6</sup> ЭЛД<sub>50</sub>/мл.  
15 Результаты представлены в таблице 1.

#### Пример 3

Аналогично при использовании 2,0 мкг/мл метиленового и голубого наблюдают полное падение инфекционности при всех испытанных дозах вируса вплоть до 10<sup>7</sup> ЭЛД<sub>50</sub>/мл. Результаты представлены в таблице 1.  
20

#### Пример 4

Аналогично при использовании 1,0 или 2,0 мкг/мл Холосенса наблюдают полное падение инфекционности при всех испытанных дозах вируса вплоть до 10<sup>7</sup> ЭЛД<sub>50</sub>/мл.  
25 Результаты представлены в таблице 1.

#### Пример 5

В вирусодержащие жидкости с различными дозами вируса вводят Холосенс в концентрации 0,25, 0,5 или 1,0 мкг/мл и через 10 мин облучают красным светом (доза 5,1 Дж/см<sup>2</sup>). Результаты представлены в таблице 2. Наблюдают полное падение  
30 инфекционности при дозах вируса в обрабатываемой жидкости 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup> или 10<sup>7</sup> ЭЛД<sub>50</sub>/мл. Результаты представлены в таблице 2.

Таким образом, введение в вирусодержащую среду доступных монокатионных красителей профлавина ацетата или метиленового голубого и последующее облучение  
35 в течение 5 мин с использованием источника белого света, создающего освещенность, сходную с естественным солнечным светом, обеспечивает 100% инактивацию вируса «птичьего гриппа» при определенных титрах. Профлавин ацетат в концентрации 1,0-2,0 мкг/мл может быть использован для фотоинактивации вируса «птичьего гриппа»  
40 при титрах не более 10<sup>4</sup> ЭЛД<sub>50</sub>/мл. В случае более высокой вирусной контаминации целесообразно применять метиленовый голубой в концентрации до 2,0 мкг/мл.

Использование предложенного способа с применением нового октакатионного красителя Холосенса позволяет надежно обеззараживать жидкости с высокими  
45 титрами вируса «птичьего гриппа». Обработка Холосенсом в концентрации 1,0-2,0 мкг/мл и облучение в течение 5 мин белым или красным светом обеспечивает 100% инактивацию вируса «птичьего гриппа» при всех испытанных титрах, включая 10<sup>7</sup> ЭЛД<sub>50</sub>/мл.

Противовирусная, а также антибактериальная и противогрибковая активности  
50 [Патент РФ №2282647, С09В 47/32, 2006 г.] Холосенса проявляются при сходных режимах фотодинамического воздействия, в связи с чем Холосенс целесообразно также использовать для фотообеззараживания в случае смешанных микробных контаминаций.

Напротив, при фотоинактивации с применением бактерицидного УФ излучения выявлена большая (3,4-кратная) устойчивость вирусов по сравнению с вегетирующими бактериями [Chang J., Ossoff S.F., Lobe D.C., Dorfman M.H., Dumais C.M., Qualls R.G., Johnson J.D. UV inactivation of pathogenic and indicator microorganisms. Applied and Environmental Microbiology. 1985. P.P. 1361-1365], в результате чего для обеззараживания воды при смешанной контаминации необходимо применять повышенные дозы вредного УФ излучения.

Внедрение нового способа фотоинактивации вируса гриппа А птиц подтипа H5N1 может уменьшить все возрастающую распространенность вызываемых им заболеваний.

Предлагаемый способ включает применение низких концентраций фотосенсибилизаторов и безвредного белого или красного света, что обеспечивает его безопасность и экономические преимущества.

Таблица 1. Вирулицидная активность красителей катионного типа в отношении вируса гриппа А птиц подтипа H5N1 при облучении в течение 5 минут белым светом

Вещество	Концентрация	Доза вируса ЭЛД <sub>50</sub> /мл	% выживания КЭ	Титр в РГА
Профлавин ацетат	1,0 мкг/мл Пример 1	10 <sup>2</sup>	100,0	0
		10 <sup>3</sup>	100,0	0
		10 <sup>4</sup>	100,0	0
		10 <sup>5</sup>	33,3	>1:16
		10 <sup>6</sup>	0	>1:16
	2,0 мкг/мл Пример 1	10 <sup>2</sup>	100,0	0
		10 <sup>3</sup>	100,0	0
		10 <sup>4</sup>	100,0	0
		10 <sup>5</sup>	50,0	>1:16
		10 <sup>6</sup>	0	>1:16
Метиленовый голубой	1,0 мкг/мл Пример 2	10 <sup>2</sup>	100,0	0
		10 <sup>3</sup>	100,0	0
		10 <sup>4</sup>	100,0	0
		10 <sup>5</sup>	100,0	0
		10 <sup>6</sup>	100,0	0
	2,0 мкг/мл Пример 3	10 <sup>2</sup>	100,0	0
		10 <sup>3</sup>	100,0	0
		10 <sup>4</sup>	100,0	0
		10 <sup>5</sup>	100,0	0
		10 <sup>6</sup>	100,0	0
Холосенс	1,0 мкг/мл Пример 4	10 <sup>2</sup>	100,0	0
		10 <sup>3</sup>	100,0	0
		10 <sup>4</sup>	100,0	0
		10 <sup>5</sup>	100,0	0
		10 <sup>6</sup>	100,0	0
	2,0 мкг/мл Пример 4	10 <sup>2</sup>	100,0	0
		10 <sup>3</sup>	100,0	0
		10 <sup>4</sup>	100,0	0
		10 <sup>5</sup>	100,0	0
		10 <sup>6</sup>	100,0	0

		10 <sup>6</sup>	100,0	0
		10 <sup>7</sup>	100,0	0
5	Контроль 1	-	10 <sup>7</sup>	0
	Контроль 2	2,0 мкг/мл Профлавин ацетат	10 <sup>7</sup>	0
	Контроль 2	2,0 мкг/мл Метиленовый голубой	10 <sup>7</sup>	0
	Контроль 2	2,0 мкг/мл Холосенс	10 <sup>7</sup>	0
10	Контроль 3	-	10 <sup>7</sup>	0
	Контроль 4	-	-	100,0
				0

15 Таблица 2. Вирулицидная активность Холосенса в отношении вируса гриппа А птиц подтипа H5N1 при облучении в течение 5 мин красным светом (5,1 Дж/см<sup>2</sup>)

		Доза вируса	% выживания КЭ	Титр в РГА
	0,25 мкг/мл Пример 5	10 <sup>2</sup>	100,0	0
		10 <sup>3</sup>	66,6	>1:16
		10 <sup>4</sup>	0	>1:16
		10 <sup>5</sup>	0	>1:16
20		10 <sup>6</sup>	0	>1:16
		10 <sup>7</sup>	0	>1:16
	0,5 мкг/мл Пример 5	10 <sup>2</sup>	100,0	0
		10 <sup>3</sup>	100,0	0
25		10 <sup>4</sup>	66,6	>1:16
		10 <sup>5</sup>	33,3	>1:16
		10 <sup>6</sup>	0	>1:16
		10 <sup>7</sup>	0	>1:16
	1,0 мкг/мл Пример 5	10 <sup>2</sup>	100,0	0
30		10 <sup>3</sup>	100,0	0
		10 <sup>4</sup>	100,0	0
		10 <sup>5</sup>	100,0	0
		10 <sup>6</sup>	100,0	0
		10 <sup>7</sup>	100,0	0
35	Контроль 1	-	10 <sup>7</sup>	0
	Контроль 2	1,0 мкг/мл Холосенса	10 <sup>7</sup>	0
	Контроль 3	-	10 <sup>7</sup>	0
	Контроль 4	-	-	100,0
				0

40

Формула изобретения

Способ фотоинактивации вируса гриппа А птиц подтипа H5N1, отличающийся тем, что в вирусосодержащую среду вводят водорастворимые фотосенсибилизаторы катионного типа в концентрации 0,25-2 мкг/мл, затем облучают белым или красным светом в дозе 5-15 Дж/см<sup>2</sup> не менее 5 мин.

45

50