

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



(19) RU (11)

2184556⁽¹³⁾ C1

(51) МПК⁷ A61K35/56, A61K31/7048,
A61P31/12

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

Статус: по данным на 08.09.2014 - действует
Пошлина: учтена за 14 год с 17.08.2014 по 16.08.2015

(21), (22) Заявка: **2001123112/14, 16.08.2001**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
16.08.2001

(45) Опубликовано: **10.07.2002**

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **Реферат из АБД Medline: Maier MS et al. Two new cytotoxic and virucidal trisulfated triterpene glycosides from the Antarctic sea cucumber Staurocucumis liouvillei, J-Nat-Prod 2001 Jun; 64 (6): 732-6. RU 2110522 C1, 10.05.1998. RU 2036654 C1, 09.06.1995. EP 0495116 A1, 22.07.1992. АВИЛОВ С.А. и др. Строение кукумариозида А₂-2-тритерпенового гликозида из голотурий *Cucumaria japonica*. Химия природных соединений. - Ташкент: Фан, 1984, № 6, с.799 и 800.**

Адрес для переписки:
**690022, г.Владивосток, пр-т 100-летия
Владивостока, 159, ТИБОХ ДВО РАН, зав.
патентным отделом Н.Н.Стадниченко**

(71) Заявитель(и):

ГУ Тихоокеанский институт биоорганической химии Дальневосточного отделения РАН

(72) Автор(ы):

**Ковалевская А.М.,
Стоник В.А.,
Гришин Ю.И.**

(73) Патентообладатель(и):

ГУ Тихоокеанский институт биоорганической химии Дальневосточного отделения РАН

(54) СРЕДСТВО, ОБЛАДАЮЩЕЕ ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, конкретно - к фармакологии. Предложено новое средство, активное против вирусов везикулярного стоматита, энцефаломиокардита мышей, Коксаки А7, Коксаки В7, полиомиелита, герпеса простого, болезни Нью-Кастла и аденовируса типа 7. Средство представляет собой смесь тритерпеновых гликозидов из отвара голотурии *Cucumaria japonica* и ранее было известно в качестве иммуно- и биостимулятора. Изобретение расширяет арсенал средств заявленного назначения. 1 табл.

Изобретение относится к области экспериментальной медицины и ветеринарии и касается средств противовирусной защиты.

Разработка и поиск эффективных препаратов для профилактики и лечения вирусных инфекций является одной из актуальных задач современной фармацевтической промышленности. Если проблема борьбы с заболеваниями бактериальной этиологии успешно решается путем создания новых антибиотиков и других эффективных средств, обладающих протективной активностью, то возможности борьбы с вирусными заболеваниями ограничены.

Имеющиеся противовирусные средства направлены на блокаду путей распространения возбудителя, на внутриклеточное подавление его репликации, на компенсацию первичных и вирусиндуцированных нарушений функций иммунной системы, а также на усиление иммунного ответа.

Наиболее известными средствами борьбы с вирусными инфекциями являются вакцины [1], представляющие собой живые, ослабленные или убитые вирусы, а также их антигены. Недостаток известных средств этого типа заключается в том, что они направлены в сущности не на сам вирус, а на усиление иммунного ответа организма к возбудителю. Как правило, они применяются как профилактические средства. При лечебном использовании вакцин всегда существует опасность усиления тяжести болезни. Особенно опасно применение вакцин во время инкубационного периода. Кроме того, вакцины способны вызывать в ряде случаев заболевания, против которых они направлены, при передозировке, неправильном хранении, нарушении правил использования и при введении в организм с ослабленной иммунной системой.

При лечебном использовании эффективными средствами являются сыворотки, содержащие антитела к возбудителю [2]. Недостаток известных средств заключается в опасности передозировки и неэффективности, связанной со скоростью, с которой вирусы меняют свою морфологическую структуру. Известным примером может служить вирус гриппа, к которому трудно подобрать сыворотку из-за чрезвычайной изменчивости этого вируса.

Приведенные аналоги не решают проблему внутриклеточного подавления вируса, они только способствуют коррекции иммунитета.

Многолетние интенсивные поиски антивирусных веществ привели к созданию ограниченного набора фармакологически активных препаратов. Многие из них обладают узким спектром действия и в большинстве случаев токсичны, что значительно ограничивает их применение как лекарственных средств. Немногочисленные синтетические противовирусные средства - мидинтан, метисазон - находят ограниченное профилактическое применение, идоксиуридин, оксолин применяются местно при вирусных заболеваниях кожи, причем токсичность первого очень высока [3]. Биогенное противовирусное средство интерферон находит применение для профилактики гриппа. Приведенные аналоги показывают, что создание противовирусных средств является далеко не решенной задачей. Поэтому поиск новых средств защиты от вирусных инфекций весьма актуален.

Известны противовирусные вещества, выделенные из морских животных. Это полифукозные сульфаты, эффективные против ВИЧ [4] и трисульфатированные тритерпеновые гликозиды из антарктической голотурии *Staurocucumis liouvillei*, эффективные против вируса герпеса [5]. Первые отличаются от заявляемого средства совершенно другой химической структурой (полисахариды), а вторые, хоть и относятся к классу тритерпеновых гликозидов, отличаются от заявленного средства химическим строением. И те, и другие вещества обладают узким спектром противовирусного действия.

Наиболее близким по химической структуре и достигаемому эффекту к заявляемому средству является тритерпеновый гликозид растительного происхождения - глицирризиновая кислота (глицирризин) из корней солодки голой (*Glycyrrhiza glabra*) [6, 7]. В Японии это вещество в комбинации с глицином и цестеином широко применялось для лечения хронических вирусных гепатитов [8, 9].

Недостатками известного средства являются низкая антивирусная активность, которая проявляется в концентрации 8 мМ (67,2 мг/мл) по отношению к вирусам герпеса, болезни Нью-Кастла, везикулярного стоматита, а также недостаточно широкий спектр противовирусной активности, например, отсутствие эффекта в случае вируса полиомиелита [6].

Задача изобретения - создание средства, обладающего более высокой противовирусной активностью в отношении большего числа вирусов.

Задача решена применением кукумариозида в качестве средства, обладающего противовирусной активностью.

Кукумариозид - это препарат, представляющий собой сумму тритерпеновых гликозидов, полученную из отвара голотурии *Cuscutaria japonica*. Известно применение кукумариозида в ветеринарии в качестве иммуномодулирующего и биостимулирующего средства [10] и в качестве средства для профилактики и лечения алеутской болезни норок [11]. Известно также применение кукумариозида в качестве средства для лечения лучевой болезни [12].

Способ получения кукумариозида описан в [11].

Предлагаемое средство обладает активностью против вирусов везикулярного стоматита, полиомиелита, болезни Нью-Кастла (штамм War), энцефаломиокардита мышей, герпеса простого, аденовируса и вируса Коксаки.

Новое назначение кукумариозида не вытекает с очевидностью из его известных свойств и обнаружено авторами впервые.

Кукумариозид обладает высокой противовирусной активностью, вследствие чего для достижения аналогичного глицирризину эффекта требуются дозы препарата в 10000 раз более низкие, порядка $2-7 \times 10^{-4}$ мМ. Соответственно снижаются затраты на получение препарата и его очистку. Сырьем служат отходы переработки голотурии кукумари японской, а именно выварочные воды, образующиеся при приготовлении пищевых продуктов из этого вида сырья. Кроме того, кукумариозид обладает широким спектром противовирусного действия, в частности, он эффективен, в отличие от средства из корня солодки голой, против вируса полиомиелита.

При переработке 1 кг голотурии *Sisumaria japonica* выход кукумариозида составляет 0,02% или 0,2 г, что соответствует 200000 доз (1 доза - 1 мкг/мл) в опытах *in vitro*. При переработке такого же количества растения солодки голая, в котором содержание глицирризина составляет 6% [13], получается 890 доз противовирусного вещества (1 доза - 67,2 мг/мл) в аналогичных опытах. Нетрудно подсчитать, что для получения одного и того же количества доз потребуется переработать растительного сырья в 225 раз больше чем животного, что естественно связано с более высокими производственными затратами.

Пример. Противовирусное действие кукумариозида определяли по подавлению цитопатического действия вирусов везикулярного стоматита, полиомиелита, болезни Нью-Кастла (штамм Wag), энцефаломиокардита мышей, герпеса простого, аденовируса и вируса Коксаки.

В качестве тест-системы использовали перевиваемые культуры лейкоцитов L-41 и АМН амнионов человека. Клеточные культуры в виде монослоя выращивали на среде 199 с добавлением глутамина и 10-15% сыворотки крупного рогатого скота. За титр вируса принимали то конечное разведение, при котором в 50 % лунок с клетками обнаруживали вирус-специфический антиген. Титр вируса вычисляли по Риду и Менчу.

Учет результатов проводили через 24-48 ч после внесения вируса в клеточную культуру по цитопатическому эффекту, который определяли микроскопически по окрашиванию клеток красителями трипановым синим или нейтральным красным.

Метод применялся в двух модификациях, позволяющих более целенаправленно определять противовирусное действие исследуемого средства.

В первом случае исследуемое вещество вносили в клеточную культуру, смесь инкубировали в течение 1 часа, затем добавляли вирус (профилактическое действие). Во втором - сначала заражали вирусом культуру клеток, через 1 час отмывали несвязавшийся вирус и добавляли вещество (лечебное действие).

Кукумариозид проявляет противовирусную активность в отношении вируса везикулярного стоматита как в профилактической, так и в лечебной схемах в диапазоне доз 0,5-1 мкг/мл. Для остальных вирусов он был эффективен только в профилактической схеме (см. таблицу). Токсического действия препарата на клетки в этих концентрациях не отмечено. Кукумариозид был токсичен для клеток в дозе 5 мкг/мл.

Проведенное исследование показывает, что доза кукумариозида - 1 мкг/мл - является оптимальной для всех видов исследованных вирусов. Следует отметить, что в указанной дозе препарат не проявляет цитотоксического и гемолитического действия.

Кукумариозид проявляет широкую антивирусную активность, в том числе и действует против вируса полиомиелита.

Литература

1. Иммунология. Справочник. Киев. "Наукова думка". 1981, стр. 124.
2. Иммунология. Справочник. Киев. "Наукова думка", 1981, стр. 387.
3. Фармакология. М., Медицина, 1981, с. 399-401.
4. EP 0495116 A1, 22.07.92 (11 с.).
5. J. Nat. Prod. 2001 Jun; 64 (6): 732-6.
6. Nature. 1979, v. 281. p. 689.
7. EP 0255420.
8. Asian Med. J., 1980, v. 23. p. 754-756.
9. Suzuki et al. Medicines progress. 1977, v. 102. p. 526-578.
10. ТУ 9388-018-02698170-94 на препарат КД (кукумариозид). Зарегистрированы Приморским центром стандартизации и метрологии 035/001357 от 05.05.94.
11. Патент РФ 2036654.
12. Патент РФ 2141833.
13. Дикорастущие лекарственные растения СССР. М., Медицина, 1976, с. 139.

Формула изобретения

Применение кукумариозида из *Sisumaria japonica* в качестве средства, обладающего активностью против вирусов везикулярного стоматита, энцефаломиокардита мышей, Коксаки А7, Коксаки В7, полиомиелита, герпеса простого, болезни Нью-Кастла и аденовируса типа 7.

РИСУНКИ

[Рисунок 1](#)