



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(51) МПК

A61K 31/122 (2006.01)

A61K 31/355 (2006.01)

A61K 31/375 (2006.01)

A61K 35/618 (2015.01)

A61P 31/14 (2006.01)

A61P 31/22 (2006.01)

C07C 50/32 (2006.01)

C07D 307/62 (2006.01)

C07D 311/72 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 31/122 (2018.08); A61K 31/355 (2018.08); A61K 31/375 (2018.08); A61K 35/618 (2018.08); A61P 31/14 (2018.08); A61P 31/22 (2018.08)

(21)(22) Заявка: 2018129035, 06.08.2018

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
06.08.2018

Дата регистрации:
21.08.2019

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 06.08.2018

(45) Опубликовано: 21.08.2019 Бюл. № 24

Адрес для переписки:

690022, г. Владивосток, пр-кт 100 лет
Владивостоку, 159, ФГБУН Тихоокеанский
институт биоорганической химии им. Г.Б.
Елякова ДВО РАН, зав. патентным отделом
Стадниченко Н.И.

(72) Автор(ы):

Федореев Сергей Александрович (RU),
Мищенко Наталья Петровна (RU),
Васильева Елена Андреевна (RU),
Крылова Наталья Владимировна (RU),
Леонова Галина Николаевна (RU),
Лавров Вячеслав Федорович (RU),
Свитич Оксана Анатольевна (RU),
Эбралидзе Линна Константиновна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Тихоокеанский институт
биоорганической химии им. Г.Б. Елякова
Дальневосточного отделения Российской
академии наук (ТИБОХ ДВО РАН) (RU),
Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение
"Научно-исследовательский институт
эпидемиологии и микробиологии им. Г.П.
Сомова" (ФГБНУ "НИИ ЭМ имени Г.П.
Сомова") (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: US 20160082050 A1, 24.03.2016. EP
0759301 A2, 26.02.1997. Kancheva V.D. et al.
Protective effects of new antioxidant
compositions of 4-methylcoumarins and related
compounds with DL- α -tocopherol and L-ascorbic
acid. Journal of the Science Food and Agriculture,
2018, 98(10), 3784-3794. Цыбульский А.В. и др.
Оценка органических, гематологических и (см.
прод.)

(54) Противовирусная композиция

(57) Реферат:

Изобретение относится к фармакологии, а
именно к композиции антиоксидантов,
проявляющей противовирусную активность в
отношении вирусов клещевого энцефалита и

герпеса простого 1 типа. Композиция
представляет собой смесь эхинохрома А,
аскорбиновой кислоты и α -токоферола при
массовом соотношении компонентов 5:5:1.

Предлагаемая композиция является эффективным вирусиндуцирующим средством. 1
высокоэффективным вирулицидным и умеренно ил., 3 табл.

(56) (продолжение):

биохимических проявлений токсичности высоких доз эхинохрома - 1,4-нафтохинонового препарата,
полученного из морских ежей *scaphechinus mirabilis*. Токсикологический вестник, 2012, 5(116), 18-23.

R U 2 6 9 7 8 8 6 C 1

R U 2 6 9 7 8 8 6 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

A61K 31/122 (2006.01)*A61K 31/355* (2006.01)*A61K 31/375* (2006.01)*A61K 35/618* (2015.01)*A61P 31/14* (2006.01)*A61P 31/22* (2006.01)*C07C 50/32* (2006.01)*C07D 307/62* (2006.01)*C07D 311/72* (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

A61K 31/122 (2018.08); *A61K 31/355* (2018.08); *A61K 31/375* (2018.08); *A61K 35/618* (2018.08); *A61P 31/14* (2018.08); *A61P 31/22* (2018.08)

(21)(22) Application: **2018129035, 06.08.2018**

(24) Effective date for property rights:
06.08.2018

Registration date:
21.08.2019

Priority:

(22) Date of filing: **06.08.2018**(45) Date of publication: **21.08.2019 Bull. № 24**

Mail address:

**690022, g. Vladivostok, pr-kt 100 let Vladivostoku,
159, FGBUN Tikhookeanskij institut
bioorganicheskoy khimii im. G.B. Elyakova DVO
RAN, zav. patentnym otdelom Stadnichenko N.I.**

(72) Inventor(s):

**Fedoreev Sergej Aleksandrovich (RU),
Mishchenko Natalya Petrovna (RU),
Vasileva Elena Andreevna (RU),
Krylova Natalya Vladimirovna (RU),
Leonova Galina Nikolaevna (RU),
Lavrov Vyacheslav Fedorovich (RU),
Svitich Oksana Anatolevna (RU),
Ebralidze Linna Konstantinovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe byudzhethoe
uchrezhdenie nauki Tikhookeanskij institut
bioorganicheskoy khimii im. G.B. Elyakova
Dalnevostochnogo otdeleniya Rossijskoj
akademii nauk (TIBOKH DVO RAN) (RU),
Federalnoe gosudarstvennoe byudzhethoe
nauchnoe uchrezhdenie
"Nauchno-issledovatel'skij institut epidemiologii
i mikrobiologii im. G.P. Somova" (FGBNU "NII
EM imeni G.P. Somova") (RU)**

(54) ANTIVIRAL COMPOSITION

(57) Abstract:

FIELD: medicine; pharmacology.

SUBSTANCE: invention refers to pharmacology,
namely to a composition of antioxidants exhibiting
antiviral activity against tick-borne encephalitis viruses
and herpes simplex type 1. Composition is a mixture

of echinochrome A, ascorbic acid and α -tocopherol at
weight ratio of components of 5:5:1.

EFFECT: disclosed composition is highly effective
virucidal and moderately effective virus-inducing agent.
1 cl, 1 dwg, 3 tbl

Изобретение относится к фармакологии и касается композиции антиоксидантов, обладающей противовирусной активностью в отношении вирусов клещевого энцефалита (ВКЭ) и герпеса простого 1 типа (ВГП-1).

5 Возрастание доли вирусных инфекций в структуре общей инфекционной заболеваемости населения достигает 90%, а отсутствие вакцинных и противовирусных препаратов при многих вирусных инфекциях является одной из самых серьезных проблем современного здравоохранения. Вирусные заболевания представляют собой общую угрозу здоровью населения во всем мире. Вирусы, содержащие геном в виде РНК, а также ДНК, вызывают целый ряд серьезных заболеваний животных и являются наиболее
10 опасными для человека. Опасность эпидемий и пандемий, вызванных РНК- и ДНК-содержащими вирусами, делает разработку новых противовирусных препаратов и новых средств и способов их инактивации одной из наиболее актуальных задач сегодняшнего дня.

Окислительный стресс, индуцированный вирусной инфекцией, играет важную роль
15 в патогенезе многих вирусных заболеваний [1]. Он определяет не только вмешательство в ведущие метаболические процессы организма, но и регулирует репликацию вируса [2, 3]. Интенсификация процессов свободно-радикального окисления и резкое угнетение антиоксидантной и антирадикальной системы защиты организма наблюдается у больных клещевым энцефалитом [4] и при манифестации герпесвирусной инфекции [5, 6].

20 Считается, что антиоксиданты противодействуют разрушительному воздействию активных форм кислорода (АФК), в том числе и свободных радикалов, и, следовательно, предотвращают или лечат заболевания, связанные с окислительным стрессом [7].

Поскольку наиболее важным аспектом лечения вирусных заболеваний является подавление репликации вируса, то поиск препаратов среди природных антиоксидантов,
25 обладающих противовирусными свойствами, остается актуальным, а применение препаратов с противовирусной и антиоксидантной активностью является потенциально полезной стратегией при любой вирусной инфекции.

Показан широкий спектр противовирусной активности природных фенольных антиоксидантов - розмариновой кислоты и лютеолина - компонентов полифенольного
30 комплекса, выделенного из морских трав семейства Zosteraceae. Эти соединения проявляют противовирусное действие в отношении вирусов гриппа, папилломы человека, ротавируса, герпеса 1 типа, клещевого энцефалита и др. Противовирусная активность розмариновой кислоты и лютеолина обусловлена их высоким антиоксидантным, противовоспалительным и нейропротективным потенциалом [8].

35 Наиболее близкой к заявляемой композиции по составу (прототип) является эквимоллярная тройная смесь антиоксидантов, таких как 7,8-дигидрокси-4-метил-2Н-хромен-2-он (производное дигидрокси-4-метилкумарина) с α -токоферолом и аскорбиновой кислотой [9]. Антиоксиданты в этой смеси проявляют сильный синергизм и показывают существенно более высокую антиоксидантную активность в стабилизации
40 липидного субстрата, чем отдельные ее компоненты.

Однако указание на противовирусные свойства известной антиоксидантной композиции в доступной патентной и другой научно-технической литературе не обнаружено.

Задача изобретения - расширение арсенала противовирусных средств.

45 Задача решена созданием композиции антиоксидантов, проявляющей противовирусную активность в отношении вирусов клещевого энцефалита и герпеса простого 1 типа, представляющая собой смесь эхинохрома А, аскорбиновой кислоты и α -токоферола при массовом соотношении компонентов 5:5:1.

Технический результат, обеспечиваемый изобретением, заключается в создании новой композиции антиоксидантов, проявляющей активность, как в отношении РНК-содержащего вируса - вируса клещевого энцефалита, так и в отношении ДНК-содержащего вируса - вируса герпеса простого 1 типа.

Заявляемая композиция проявляет синергизм, который заключается в том, что количественный показатель ее антиоксидантной активности значительно выше, чем показатели каждого из компонентов, добавленных в одном и том же количестве для стабилизации липидного субстрата, а также проявляет синергетическое противовирусное действие в отношении вирусов клещевого энцефалита и герпеса простого 1 типа.

Антиоксидант эхинохром А (2,3,5,6,8-пентагидрокси-7-этил-1,4-нафтохинон) - природный хиноидный пигмент морских ежей является действующим веществом препарата Гистохром[®], который применяют в кардиологической и офтальмологической практике [10, 11]. Гистохром также может использоваться для лечения геморрагического инсульта [12], в качестве средства для лечения ишемии сосудов головного [13] и в качестве диуретического средства [14].

Известны композиции на основе эхинохрома А, которые используют для лечения и/или предотвращения сердечных заболеваний, таких как повреждение сердца, при аритмии, фибрилляции желудочков, сердечной недостаточности и ишемии-реперфузии [15], а также для профилактики или лечения нейродегенеративных заболеваний, вызванных дефицитом ацетилхолина [16].

Надо отметить то, что эхинохром А подвергается окислительной деструкции в присутствии кислорода воздуха. Однако в предлагаемой композиции антиоксидантов его стабильность значительно повышается.

Аскорбиновая кислота нормализует окислительно-восстановительные процессы, является мощным антиоксидантом в живом организме, продуктах питания в водных, но не липидных растворах. В медицине аскорбиновая кислота используется, как витамин С. Она применяется при гиповитаминозе С, геморрагическом диатезе, капилляротоксикозе, геморрагическом инсульте, кровотечениях, инфекционных заболеваниях и др. Аскорбиновая кислота используется в пищевой и фармацевтической промышленности для стабилизации лекарственных средств.

α -Токоферол (витамин Е) с терапевтической целью применяют перорально, парентерально и местно при дерматомиозитах, мышечных дистрофиях, в комбинированном лечении сердечно-сосудистой патологии, заболеваний глаз, для снижения побочных эффектов при терапии химиотерапевтическими лекарственными препаратами. В терапевтических дозах α -токоферол является относительно нетоксичным веществом и не вызывает серьезных побочных эффектов. При применении α -токоферола в высоких дозах может возникнуть метеоризм, тошнота, диарея, а у ряда пациентов - повышение артериального давления.

В фармацевтической промышленности α -токоферол широко используется как вспомогательное вещество в виде его ацетата. В концентрации 0,001-0,05% α -токоферол входит в состав лекарственных препаратов как антиоксидант. Также α -токоферол является отличным растворителем для плохорастворимых лекарственных субстанций.

То, что заявляемая композиция будет обладать противовирусной активностью в отношении вирусов клещевого энцефалита и герпеса простого 1 типа, явным образом не вытекает из известных из уровня техники свойств компонентов композиции и не является очевидным для специалиста.

Для подтверждения синергизма заявляемой композиции были проведены следующие экспериментальные исследования.

Определение антиоксидантной активности комплексов эхинохрома с аскорбиновой кислотой и α -токоферолом при различных соотношениях компонентов.

Проведено сравнительное исследование *in vitro* антиоксидантной активности эхинохрома, аскорбиновой кислоты и α -токоферола и их смеси на модели перекисного окисления линетол по известной методике [17]. Готовили стоковые растворы эхинохрома, аскорбиновой кислоты и α -токоферола в концентрации 10 мг/мл в этиловом спирте. Бинарные и тройные композиции антиоксидантов получали, смешивая объемы стоковых растворов в указанных соотношениях. 10 мкл каждого раствора помещали во взвешенные с точностью 0,0005 г стеклянные бюксы, добавляли 300 мкл линетол и помещали реакционные сосуды в термостат (37°C). Концентрация антиоксидантных препаратов в линетоле во всех случаях была равна 0,05 мг/мл или 0,005%. Дважды в сутки измеряли массу предварительно охлажденных до комнатной температуры реакционных смесей, когда масса увеличивалась примерно на 10 мг, реакцию останавливали. Период ингибирования окисления линетол (Δt) вычисляли как разность времен, за которые происходило увеличение массы линетол на 10 мг в опытах с добавкой вещества и без него (контроль) по формуле $\Delta t = t - t_0$, где t - время начала окисления линетол в присутствии антиоксиданта (ч); t_0 - время начала окисления линетол без добавки антиоксиданта (ч).

В таблице 1 представлены периоды ингибирования реакции окисления линетол в присутствии эхинохрома, аскорбиновой кислоты, α -токоферола и их смесей в разных соотношениях.

Таблица 1

Эффективность эхинохрома (Эх), аскорбиновой кислоты (Аск), α -токоферола (Ток) и их композиций в концентрации 0,05 мг/мл в модели автоокисления линетол

Антиоксиданты и их композиции	Период ингибирования автоокисления линетол, ч	Эффект смеси по отношению к эффекту Эх
Эх	100	-
Аск	24	-
Ток	125	-
Эх+Аск (1:1)	69	Нет эффекта
Эх+Ток (1:1)	201	Синергизм
Аск+Ток (2:1)	195	Синергизм
Эх+Аск+Ток (5:5:1)	223	Синергизм
Контроль - линетол	24	

Из таблицы 1 видно, что наиболее эффективным антиоксидантом в этом эксперименте оказался α -токоферол (Δt 125 ч). Эхинохром был менее эффективен (Δt 100 ч), аскорбиновая кислота не проявляла антиоксидантного эффекта в данной модели. Низкая эффективность аскорбиновой кислоты в данной модели объясняется ее высокой способностью к автоокислению в растворе линетол. Известно, что в экспериментах *in vitro* аскорбиновая кислота в отсутствии альфа-токоферола не проявляет антиоксидантной активности, что и продемонстрировал наш эксперимент (Δt для смеси Аск+Ток (2:1) равнялось 195 ч). Наилучший результат по защите линетол от окисления показала тройная смесь Эх+Аск+Ток (5:5:1), в которой проявлялось синергетическое действие антиоксидантов (Δt 223 ч).

Подтверждена стабильность заявляемой композиции (определено, что активные компоненты сохраняются без изменения в течение 12 месяцев).

Определение противовирусной активности эхинохрома А и его композиции с другими

антиоксидантами.

Используемые вирусы и культуры клеток.

РНК-содержащий вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) (штамм Dal'negorsk дальневосточного субтипа) был выделен в лаборатории флавивирусных инфекций НИИ
 5 эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова в 1973 году из мозга умершего
 больного с очаговой формой. Его номер полногеномной последовательности в GenBank
 - FJ402886 [18, 19]. Использована 10% вируссодержащая суспензия мозга мышей-
 сосунков, инфицированных этим штаммом (10 пассажей). Титр ВКЭ составил $10^{8,8}$
 TCID₅₀/мл. ДНК-содержащий вирус герпеса (ВГП-1, штамм VR3), получен из
 10 Национальной коллекции вирусов США (Rockville, Maryland, USA). Штамм ВГП-1
 прошел 5-7 последовательных пассажей на культуре клеток Vero. Титр ВГП-1 составил
 $10^{8,25}$ TCID₅₀/мл.

Изучение противовирусной активности препаратов по отношению к ВКЭ
 15 проводилось на перевиваемой культуре клеток почек эмбриона свиньи (СПЭВ),
 выращенных в стандартной питательной среде «199» с добавлением 10% фетальной
 бычьей сыворотки (ПанЭко, Россия) и 100 ЕД/мл гентамицина при 37°C в
 СО₂-инкубаторе, в поддерживающей среде концентрация FBS была снижена до 1%.

Исследования антигерпетической активности препаратов проводилось на
 20 перевиваемой клеточной линии почек африканской зеленой мартышки Vero. Клетки
 выращивали в полной культуральной среде DMEM с добавлением 5-10% фетальной
 сыворотки телят, 0,008% раствора гентамицина сульфата и глутамина при 37°C в
 СО₂-инкубаторе. Во всех экспериментах концентрация клеток составила 10^4 кл/мл.

25 Препараты, приготовленные для исследования:

Эхинохром А - водный стоковый раствор 10 мг/мл.

Композиция антиоксидантов - заявляемый препарат, эхинохром А, аскорбиновая
 кислота, α-токоферол в массовом соотношении 5:5:1. Стоковый раствор с концентрацией
 10 мг/мл препарата в диметилсульфоксиде (DMSO, Sigma, USA) хранили при -20°C.

30 Плацебо - препарат сравнения: композиция, содержащая аскорбиновую кислоту и
 α-токоферол в массовом соотношении 5:1. Стоковый раствор с концентрацией 10 мг/
 мл препарата в диметилсульфоксиде хранили при -20°C.

Рабочие растворы препаратов готовили из стоковых растворов (10 мг/мл), разводя
 соответствующей клеточной культуральной средой. Конечная концентрация DMSO в
 35 рабочих растворах составляла 0,5%. Растворы использовали свежеприготовленными.

Определение цитотоксичности.

Цитотоксичность препаратов оценивали по жизнеспособности СПЭВ и Vero клеток
 с использованием МТТ-теста [20]. Монослой клеток (2×10^4 клеток/лунку), выращенных
 в 96-луночных планшетах, обрабатывали различными концентрациями (от 0 до 400
 40 мкг/мл) тестируемых препаратов, необработанные клетки служили контролем. Клетки
 культивировали при 37°C в СО₂-инкубаторе в течение 6 сут. После инкубации к
 монослою клеток добавляли по 20 мкл/лунку раствора МТТ (метилтиазолилтетразолий
 бромид, Sigma, USA) с концентрацией 5 мг/мл, оставляли на 2 ч при 37°C, затем
 прибавляли изопропиловый спирт, подкисленный 0,4М HCl (150 мкл/лунку).

45 Оптическую плотность (ОП) измеряли при 540 нм на 96-луночном ридере (Labsystems
 Multiskan RC, Finland). Жизнеспособность клеток рассчитывали как (ОП_о)/(ОП_к)×100%,
 где ОП_о - оптическая плотность клеток, обработанных тестируемыми препаратами,
 ОП_к - оптическая плотность необработанных клеток. Значение 50% цитотоксической

концентрации (CC_{50}) определяли с помощью регрессионного анализа как концентрацию препарата, которая уменьшала количество жизнеспособных клеток на 50% по сравнению с контролем клеток.

Определение противовирусной активности.

Противовирусную активность определяли по ингибированию цитопатогенного действия (ЦПД) вируса с помощью инвертированного микроскопа (Биолам П-1, ЛОМО, Россия) и с использованием МТТ-теста [21, 22]. Препараты исследовали в диапазоне концентраций от 0 до 400 мкг/мл и при нескольких инфицирующих дозах вируса (от 10^1 до 10^3 TCID₅₀/мл). Каждую инфицирующую дозу вируса соединяли с различными концентрациями соединений в соотношении 1:1, инкубировали 1 ч при 37°C. Затем наносили на монослой клеток (2×10^4 клеток/лунку), выращенных в 96-луночных планшетах и культивировали в течение 6 суток при 37°C в CO₂-инкубаторе.

Противовирусную активность препаратов (при каждой инфицирующей дозе вируса) оценивали по степени ингибирования (IR) вируса препаратом, по 50% ингибирующей концентрации (IC₅₀) и по селективному индексу (SI).

IR рассчитывали по формуле: $IR = (OP \text{ опыт} - OP \text{ вир. контроль}) / (OP \text{ кл. контроль} - OP \text{ вир. контроль}) \times 100\%$. В качестве контроля клеток использовали клетки, необработанные вирусом и препаратами, а контролем вируса служили клетки, необработанные препаратами.

IC₅₀ определяли с помощью регрессионного анализа зависимости степени ингибирования вируса (IR) в % от концентрации препарата, как концентрацию препарата, которая ингибировала цитопатогенное действие вируса на 50% по сравнению с контролем.

Индекс селективности (SI) - терапевтический индекс препарата рассчитывали как отношение CC_{50} к IC₅₀.

Противовирусная активность исследуемых препаратов в отношении вируса клещевого энцефалита.

На основании результатов МТТ-анализа для каждого препарата в отношении клеточной культуры СПЭВ была рассчитана 50% цитотоксическая концентрация (CC_{50}). Основные показатели противовирусной активности в отношении различных инфицирующих доз вируса клещевого энцефалита представлены в таблице 2.

Таблица 2

**Противовирусная активность исследуемых препаратов в отношении
вируса клещевого энцефалита**

Препарат	Цитотоксичность CC ₅₀ , мкг/мл	Вirus- инфицирующая доза (TCID ₅₀ /мл)	Ингибирующая концентрация IC ₅₀ , мкг/мл	Терапевтический индекс препарата (SI)
Композиция антиоксидантов	57,9±2,3	10 ¹	6,7±0,7	8,8±0,9
		10 ²	12,6±1,5	4,8±0,5
		10 ³	27,6±3,0	2,1±0,2
Эхинохром А	54,4±1,8	10 ¹	10,7±1,2*	5,2±0,5*
		10 ²	21,8±2,6*	2,5±0,2*
		10 ³	39,8±5,2*	1,3±0,1*
Плацебо	521,7±5,3*	10 ¹	526,9±50,6*	0,99±0,2*
		10 ²	1304±145*	0,4±0,1*
		10 ³	-	-

Примечание: * - статистически значимые различия между показателями композиции антиоксидантов и остальными препаратами ($p \leq 0,05$).

Как видно из представленных данных, эхинохром А и композиция антиоксидантов проявляли примерно одинаковую умеренную цитотоксичность. Показатель цитотоксичности плацебо был на порядок меньше. Однако, композиция антиоксидантов проявляла противовирусную активность при концентрации (IC₅₀) примерно в полтора раза меньшей, чем эхинохром А, а следовательно, и показывала более высокий терапевтический индекс (SI). Величина последнего показателя является важной при разработке лекарств, так как она говорит о его высокой безопасности. Плацебо, представляющее собой смесь аскорбиновой кислоты и α-токоферола в таком же весовом соотношении 5:1, как и в заявляемой композиции, было мало токсично и мало активно в отношении вируса клещевого энцефалита (SI<1).

Противовирусная активность исследуемых препаратов в отношении вируса герпеса простого 1 типа.

На основании результатов МТТ-анализа для каждого препарата в отношении клеточной культуры Vero была рассчитана 50% цитотоксическая концентрация (CC₅₀) и основные показатели противовирусной активности в отношении различных инфицирующих доз вируса герпеса простого I типа как описано выше. Результаты исследования представлены в таблице 3.

Таблица 3

Противовирусная активность препаратов в отношении вируса герпеса простого 1 типа

Препарат	Цитотоксичность CC ₅₀ , мкг/мл	Вirus- инфицирующая доза (TCID ₅₀ /мл)	Ингибирующая концентрация IC ₅₀ , мкг/мл	Терапевтический индекс препарата (SI)
Композиция антиоксидантов	57,9±2,3	10 ¹	6,7±0,7	8,8±0,9
		10 ²	12,6±1,5	4,8±0,5
		10 ³	27,6±3,0	2,1±0,2
Эхинохром А	54,4±1,8	10 ¹	10,7±1,2*	5,2±0,5*
		10 ²	21,8±2,6*	2,5±0,2*
		10 ³	39,8±5,2*	1,3±0,1*
Плацебо	521,7±5,3*	10 ¹	526,9±50,6*	0,99±0,2*
		10 ²	1304±145*	0,4±0,1*
		10 ³	-	-

Примечание: * - статистически значимые различия между показателями композиции антиоксидантов и остальными препаратами ($p \leq 0,05$).

Как видно из таблицы 3, эхинохром А и композиция антиоксидантов на его основе проявляют более высокую цитотоксичность ($CC_{50}=54,4 \pm 1,8$ и $57,9 \pm 2,3$ мкг/мл соответственно), чем плацебо ($CC_{50}=521,7 \pm 5,3$ мкг/мл). Однако эхинохром А и композиция антиоксидантов при различных инфицирующих дозах намного эффективнее подавляют репликацию вируса герпеса простого 1 типа, чем плацебо, и следовательно, имеют более высокий терапевтический индекс и могут быть использованы для разработки лекарственных средств. Наиболее эффективной является заявляемая композиция антиоксидантов на основе эхинохрома А, так как ее терапевтический индекс почти в два раза выше, чем у эхинохрома А.

Сравнительную противовирусную эффективность композиции антиоксидантов, эхинохрома А и плацебо определили при одной инфицирующей дозе вирусов ВКЭ и ВГП-1 - 10^2 TCID₅₀/мл и одинаковой концентрации препаратов - 20 мкг/мл на разных стадиях жизненного цикла вирусов. Исследовали вирулицидное действие - воздействие препаратов на сами вирусы, профилактическое действие - перед заражением вирусами клетки предварительно обрабатывали препаратами, и ингибирующее действие - эффективность препаратов на ранней стадии репликации вируса. Противовирусную активность препаратов оценивали по степени ингибирования цитопатогенного действия вирусов с помощью МТТ-теста, как описано выше.

Вирулицидная активность исследуемых соединений.

Вирусы обрабатывали раствором исследуемых препаратов в соотношении 1:1, инкубировали 1 ч при 37°C, затем наносили на монослой клеток и культивировали в течение 6 суток при 37°C в CO₂-инкубаторе.

Профилактическая активность исследуемых соединений.

Монослой клеток обрабатывали исследуемыми препаратами в течение 1 ч при 37°C, затем инфицировали вирусом и культивировали в течение 6 суток при 37°C в

СО₂-инкубаторе.

Вирусингибирующая активность исследуемых соединений.

Монослой клеток инфицировали вирусом и выдерживали в течение 1 ч (для вируса КЭ) либо 10-15 мин (для вируса ВГП-1) при 37°C, затем клетки обрабатывали
5 исследуемыми препаратами и в течение 6 суток культивировали при 37°C в СО₂-инкубаторе.

На фигуре представлены результаты определения вирулицидной, профилактической и вирусингибирующей активности препаратов в отношении вируса клещевого
10 энцефалита и вируса герпеса простого 1 типа. * - Статистически значимые различия между показателями композиции антиоксидантов и плацебо ($p \leq 0,05$).

Как видно из фигуры, заявляемая композиция антиоксидантов обладает высоким вирулицидным действием. Предварительная инкубация вирусов с исследуемыми
15 препаратами в течение 1 ч перед инфицированием клеток показала следующую картину: вирулицидная активность эхинохрома А была незначительно ниже, чем у композиции, а плацебо проявляло низкую активность (менее 35%). Заявляемая композиция проявляла значимую активность в отношении обоих вирусов, так как ингибировала ВКЭ и ВГП-1 на 90% и 100%, соответственно.

Внесение исследуемых препаратов за 1 ч до инфицирования клеток не оказало
20 значимого эффекта на репродукцию вируса. Степень ингибирования вирусов при профилактическом применении композиции и плацебо в отношении ВГП-1 составляет 35% и 25%, соответственно. При этом профилактическое действие эхинохрома А было гораздо слабее, чем у композиции и плацебо.

При воздействии заявляемой композиции антиоксидантов на раннюю стадию
25 репликации вирусов ВКЭ и ВГП-1 (через 1 ч после инфицирования клеток), вирусингибирующий эффект был умеренный (35 и 42% соответственно), эхинохром А был примерно в полтора раза менее активным, а плацебо всего на 5 и 15% подавляло репликацию вирусов соответственно.

Таким образом, показано, что заявляемая композиция антиоксидантов является
30 высокоэффективным вирулицидным и умеренноэффективным вирусиндуцирующим средством в отношении РНК-содержащего вируса - вируса клещевого энцефалита и ДНК-содержащего вируса - вируса герпеса простого 1 типа.

Литература

1. Valyi-Nagy T, Dermody T.S. Role of oxidative damage in the pathogenesis of viral infections of the nervous system. *Histol Histopathol* 2005. Vol. 20. P. 957-967.

2. Reshi M L, Su Y.-C, Hong J.-R. RNA viruses: ROS-mediated cell death. *Int J Cell Biol* 2014; ID 467452.

3. Gullberg R.C, Steel J.J., Moon S.L., et al. Oxidative stress influences positive strand RNA virus genome synthesis and capping. *Virology* 2015. Vol. 475. P. 219-229.

4. Захарычева Т.А, Ковальский Ю.Г., Лебедько О.А. и др. Оксидативный стресс у
40 больных клещевым энцефалитом на Дальнем Востоке Российской Федерации. *Дальневост. журн. инфекц. патол.* 2012 Т. 20. С. 41-45.

5. Sebastiano M., Chastel O., de Thoisy B., et al. Oxidative stress favours herpes virus infection in vertebrates: a meta-analysis. *Current Zoology*, 2016, 62(4), 325-332.

6. Kavouras J.H., Prandovszky E., Valyi-Nagy K., et al. Herpes simplex virus type 1 infection induces oxidative stress and the release of bioactive lipid peroxidation by-products in mouse P19N
45 neural cell cultures. *JNeurovirol.* 2007 Oct; 13(5):416-25.

7. Firuzi O, Miri R, Tavakkoli M, et al. Antioxidant therapy: current status and future prospects. *Curr. Med. Chem.* 2011. Vol. 18. P. 3871-3888.

8. Крылова Н.В., Попов А.М., Леонова Г.Н. Антиоксиданты как потенциальные противовирусные препараты при флавивирусных инфекциях. Антибиотики и химиотер. 2016. Vol. 61. P. 5-6.

9. Kancheva V.D., Slavova-Kazakova A.K., Angelova S.E., et al. Protective effects of new antioxidant compositions of 4-methylcoumarins and related compounds with dl- α -tocopherol and l-ascorbic acid. *Parpar. Sci Food Agric.* 2018. Vol. 98. P. 3784-3794.

10. RU 2134107 C1, 10.08.1999

11. RU 2137472 C1, 23.04.1999

12. RU 2266737 C1, 27.12.2005

13. RU 2625740 C1, 18.07.2017

14. RU 2408367 C1, 10.01.2011

15. KR 20150106996 A, 23.09.2015

16. KR 20150114096 A, 12.10.2015

17. Веселова М.В., Федореев С.А., Василевская Н.А., и др. Антиоксидантная активность полифенолов из дальневосточного растения тиса остроконечного. *Хим. фарм. журн.* 2007. Т. 41, №2. С. 29-34.

18. Belikov SI, Kondratov IG, Potapova UV, et al. The relationship between the structure of the tick-borne encephalitis virus strains and their pathogenic properties. *PLoS One* 2014. T: 9 Вып. 4. e94946.

19. Leonova GN, Maystrovskaya OS, Kondratov IG, et al. The nature of replication of tick-borne encephalitis virus strains isolated from residents of the Russian Far East with inapparent and clinical forms of infection. *Virus Res.* 2014. Vol. 189. P. 34-42.

20. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65:55-63.

21. Bastos JCS, de Menezes CBA, Fantinatti-Garboggini F, et al. Antiviral Activity of Marine Actinobacteria against Bovine Viral Diarrhea Virus, a Surrogate Model of the Hepatitis C Virus. *RRJMB.* 2015. Vol. 4, N 4. P. 55-62.

22. Matsuda M, Shigeta S, Okutani K. Antiviral activities of marine *Pseudomonas* polysaccharides and their oversulfated derivatives. *Mar. Biotechnol.* 1999. Vol. 1. P. 68-73.

(57) Формула изобретения

Композиция антиоксидантов, проявляющая противовирусную активность в отношении вирусов клещевого энцефалита и герпеса простого 1 типа, представляющая собой смесь эхинохрома А, аскорбиновой кислоты и α -токоферола при массовом соотношении компонентов 5:5:1.

