



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **112075** (13) **C2**  
(51) МПК

**A61K 36/60** (2006.01)

**A61P 31/22** (2006.01)

**A61K 9/08** (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**

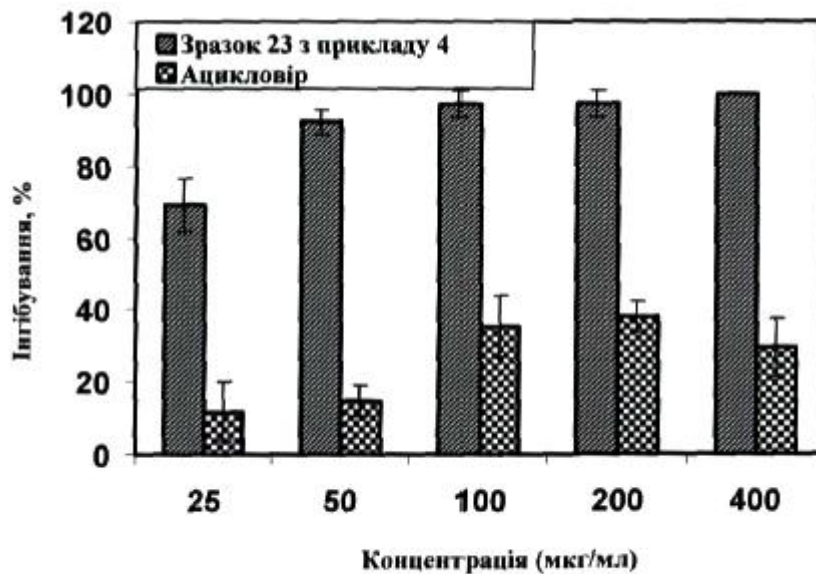
<b>(21)</b> Номер заявки:	<b>а 2013 10948</b>	<b>(74)</b> Представник:	<b>Михайлюк Валентин Іванович, реєстр. №1</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки:	<b>13.02.2012</b>	<b>(56)</b> Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	NUCSI I ET AL. COMBINED EFFECTS OF FLAVONOIDS AND ACYCLOVIR AGAINST HERPESVIRUSES IN CELL CULTURES / ACTA MICROBIOLOGICA ACADEMIAE SCIENTIARUM HUNGARICA, SCIENCES, BUDAPEST. - 1 January 1992. - vol. 39, № 2. - P. 137-147
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на винахід:	<b>25.07.2016</b>		BLONDEL O ET AL. Insulin resistance in rats with non-insulin-dependent diabetes induced by neonatal (5 days) streptozotocin: Evidence for reversal following phlorizin treatment / METABOLISM, CLINICAL AND EXPERIMENTAL, W.B. SAUNDERS CO., PHILADELPHIA, PA, US. - 1 August 1990. - vol. 39, № 8. - P. 787-793
<b>(31)</b> Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	<b>61/442,883</b>		WO 2006078848 A1, 27.07.2006
<b>(32)</b> Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	<b>15.02.2011</b>		MAZUMDER P M * ET AL. Hypoglycaemic effect of Ficus arnottiana Miq. bark extracts on streptozotocin induced diabetes in rats / MEDICINAL & AROMATIC PLANTS ABSTRACTS, SCIENTIFIC PUBLISHERS, SCIENTIFIC PUBLISHERS, NEW DELHI - INDIA. - 1 February 2010. - vol. 32, № 1. - P. 478-482
<b>(33)</b> Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	<b>US</b>		SHUBHANGI PAWAR AND D A PATIL. Observations on folkloric medicinal plants of Jalgaon district Maharashtra / INDIAN JOURNAL OF TRADITIONAL KNOWLEDGE, RESOURCES, NEW DELHI - INDIA. - 1 October 2004. - vol. 3, № 4. - P. 437-442
<b>(41)</b> Публікація відомостей про заявку:	<b>10.12.2013, Бюл.№ 23</b>		WO 2010035226 A2, 1.04.2010
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту:	<b>25.07.2016, Бюл.№ 14</b>		SHEU YA-WEN ET AL. Cytotoxic flavonoids and new chromenes from Ficus formosana f. formosana / PLANTA MEDICA. - December 2005. - vol. 71, № 12. - P. 1165-1167
<b>(86)</b> Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	<b>РСТ/IB2012/050631, 13.02.2012</b>		
<b>(72)</b> Винахідник(и): <b>Томас Бекі Марі (IN), Саклані Арвінд (IN), Капоор Наташа (IN), Еносе Арно Аппавоо (IN), Савант Сатіш Намдео (IN), Каушік Ріту (IN), Бховмік Рупа (IN), Малані Ашіш (IN)</b>			
<b>(73)</b> Власник(и): <b>ПІРАМАЛ ЕНТЕРПРАЙЗІС ЛІМІТЕД, Piramal Tower, Ganpatrao Kadam Marg, Lower Parel, Mumbai 400013, India (IN)</b>			

**(54) ВИДІЛЕНИЙ ЕКСТРАКТ З РОСЛИНИ FICUS ARNOTTIANA**

**(57)** Реферат:

UA 112075 C2

Винахід стосується композиції, що містить екстракт із стовбура або кори, або гілок, або стовбура з корою рослини *Ficus arnottiana*, способу отримання такої композиції та застосування такої композиції в лікуванні вірусних інфекцій, спричинюваних вірусами простого герпесу (HSV).



Фігура 10

## ГАЛУЗЬ ВИНАХОДУ

Даний винахід стосується композиції, яка містить екстракт рослини *Ficus arnottiana*, що має протівірусну активність. Даний винахід також стосується способу отримання композиції. Даний винахід додатково стосується композиції для застосування в лікуванні вірусних інфекцій, особливо спричинюваних вірусами простого герпесу (HSV).

## ПЕРЕДУМОВИ ВИНАХОДУ

Віруси є етіологічною причиною багатьох захворювань, що загрожують життю або погіршують якість життя людини. Особливе занепокоєння спричиняють віруси герпесу, як-от вірус простого герпесу 1 типу (HSV-1), вірус простого герпесу 2 типу (HSV-2), цитомегаловірус (CMV), вірус Епштейна-Барр (EBV), вірус оперізувального лишая (VZV) та віруси герпесу людини 6, 7 і 8 типів (HHV-6, HHV-7 і HHV-8) тощо.

Простий герпес - це вірусне захворювання, спричинюване вірусами простого герпесу (HSV). HSV-1 часто асоціюється з герпетичним ураженням шкіри обличчя, яке відоме як герпес губ або герпетична лихоманка. Інфекція, спричинювана HSV-1, зазвичай виникає в слизовій оболонці орофарингеальної зони, де вірус починає колонізувати ганглії трійчастого нерва та персистує у ньому в латентному стані. HSV-2 частіше асоціюється з генітальним герпесом. HSV-2 зазвичай передається статевим шляхом і трапляється в анусі, прямій кишці, верхньому відділі травного тракту, а також в ділянці статевих органів з дисемінацією в ділянку крижових гангліїв. Залежно від зон контакту обидва віруси можуть, навпаки, інфікувати слизову оболонку ротової порожнини або статевих органів. Ці віруси можуть проникати в центральну нервову систему, де вони реплікуються, і спричиняти латентну інфекцію в гангліях задніх корінців.

За захворювання, спричинювані HSV, можуть стати загрозливими для життя пацієнтів з послабленим імунітетом, особливо пацієнтів, інфікованих вірусом імунодефіциту людини (ВІЛ). Після первинного інфікування HSV зберігається в організмі хазяїна протягом усього його життя, тому інфекція, спричинювана HSV, вважається довічною інфекцією (The Journal of Infectious Diseases, 2002, 186, S71-S77).

Декілька протівірусних препаратів, які застосовуються для лікування герпесу, включають ацикловір, валацикловір, фамцикловір і пенцикловір. З числа перерахованих протівірусних засобів для лікування вірусних інфекцій, спричинюваних HSV-1 і HSV-2, використовується ацикловір.

Рослина *Ficus arnottiana*, широко розповсюджена в Індії та на Шрі-Ланці, являє собою листяне дерево середніх розмірів без повітряних коренів. Рослину застосовують для лікування захворювань шкіри, запалень, діареї, діабету, відчуття печіння, лепри, корости та ран відповідно до традиційної системи медицини Аюрведа (Natural Product Radiance, 2009, 8 (5), 478-482).

Як і раніше, існує необхідність в ефективних композиціях і способах попередження та лікування вірусних інфекцій, особливо герпетичних інфекцій. Частота та ступінь тяжкості герпетичних інфекцій збільшилися через зростання числа пацієнтів з послабленим імунітетом, причиною чого є агресивні схеми хіміотерапії, частота трансплантації органів, яка зростає, і збільшення частоти інфікування ВІЛ.

Наскільки відомо, на сьогодні відсутня інформація про який-небудь лікарський препарат для лікування вірусних інфекцій, що містить екстракт рослини *Ficus arnottiana*.

## КОРОТКИЙ ОПИС ФІГУР

На фігурі 1 представлено хроматограму зразка 23 з прикладу 4, проаналізованого за допомогою ВЕРХ. На хроматограмі представлено два піки біологічно активних маркерів (BM), а саме BM-1 і BM-2.

На фігурі 2 представлено хроматограму складу ІВ з прикладу 6, проаналізованого за допомогою ВЕРХ. На хроматограмі представлено два піки біологічно активних маркерів (BM), а саме BM-1 і BM-2.

На фігурі 3 показана інгібувальна активність зразка 23 з прикладу 4 стосовно HSV-1 до інфікування порівняно з інгібувальною активністю ацикловіру.

На фігурі 4 показана інгібувальна активність зразка 23 з прикладу 4 стосовно HSV-2 до інфікування порівняно з інгібувальною активністю ацикловіру.

На фігурі 5 показаний інгібувальний ефект зразка 23 з прикладу 4 стосовно адсорбції HSV-1 порівняно з інгібувальним ефектом ацикловіру.

На фігурі 6 показаний інгібувальний ефект зразка 23 з прикладу 4 стосовно адсорбції HSV-2 порівняно з інгібувальним ефектом ацикловіру.

На фігурі 7 показана інгібувальна активність зразка 23 з прикладу 4 стосовно проникнення HSV-1 порівняно з інгібувальною активністю ацикловіру.

На фігурі 8 показана інгібувальна активність зразка 23 з прикладу 4 стосовно проникнення HSV-2 порівняно з інгібувальною активністю ацикловіру.

На фігурі 9 показаний віруліцидний ефект зразка 23 з прикладу 4 стосовно HSV-1 порівняно з віруліцидним ефектом ацикловіру.

На фігурі 10 показаний віруліцидний ефект зразка 23 з прикладу 4 стосовно HSV-2 порівняно з віруліцидним ефектом ацикловіру.

#### 5 КОРОТКИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

Даний винахід стосується композиції, що містить терапевтично ефективну кількість виділеного екстракту рослини *Ficus arnottiana* у комбінації з фармацевтично прийнятним носієм.

Даний винахід також стосується способу отримання екстракту рослини *Ficus arnottiana* і композиції, що містить виділений екстракт як активний інгредієнт.

10 Даний винахід також стосується протівірусної активності композиції.

В одному з аспектів даного винаходу протівірусна активність композиції являє собою активність проти HSV. В одному з аспектів даний винахід стосується композиції, що містить терапевтично ефективну кількість виділеного екстракту рослини *Ficus arnottiana* і фармацевтично прийнятний носій, для застосування в попередженні та лікуванні вірусної інфекції, спричинюваної вірусом простого герпесу (HSV).

15 Даний винахід додатково стосується способу лікування у суб'єкта вірусної інфекції, спричинюваної вірусом простого герпесу (HSV), який включає введення суб'єктові композиції, що містить терапевтично ефективну кількість виділеного екстракту рослини *Ficus arnottiana* у комбінації з фармацевтично прийнятним носієм.

20 Даний винахід також стосується композиції, що містить терапевтично ефективну кількість виділеного екстракту рослини *Ficus arnottiana* і фармацевтично прийнятний носій, для застосування в попередженні вірусної інфекції разом з використанням презервативів або інших бар'єрних засобів контрацепції.

25 Даний винахід включає композицію, що містить терапевтично ефективну кількість виділеного екстракту рослини *Ficus arnottiana* у комбінації з фармацевтично прийнятним носієм, для застосування в попередженні та лікуванні вірусних інфекцій, спричинюваних вірусом простого герпесу (HSV).

30 Даний винахід також включає застосування виділеного екстракту рослини *Ficus arnottiana* з метою виробництва лікарського препарату для лікування вірусної інфекції, спричинюваної вірусом простого герпесу (HSV).

#### ДОКЛАДНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

35 Перш ніж перейти до докладного опису даного винаходу, слід зрозуміти, що даний винахід не обмежується конкретними варіантами здійснення. Також слід розуміти, що використовується в даному документі термінологія застосовується тільки для опису конкретних варіантів здійснення та не розглядається як обмежувальна.

Використовувані в описі та формулі винаходу форми однини охоплюють також посилання на множини, якщо в контексті чітко не зазначено інше.

40 Якщо не зазначено інше, усі використовувані в даному документі технічні та наукові терміни мають те саме значення, яке звичайно розуміє середній фахівець у тій галузі, якої стосується даний винахід.

Використовувані в даному документі терміни "лікування", "лікувати" або "обробка" включають превентивне (профілактичне) і паліативне лікування.

Термін "*Ficus arnottiana*" також включає синоніми, такі як "*Ficus populifolia*", "*Urostigma arnottianum*" або "*Urostigma cordifolium*".

45 Згадувані в даному документі "екстракт" або "виділений екстракт" означають суміш сполук, які присутні в рослині, або фракцій, отримуваних з рослини *Ficus arnottiana*. Такі сполуки або фракції отримують шляхом екстракції з подрібненої цілої рослини або частин рослини *Ficus arnottiana*, наприклад, стовбура (стовбура з корою), стовбура без кори, кори та гілок із застосуванням відповідних розчинників, при цьому за етапом екстракції необов'язково може йти додаткове збагачення. Терміни "екстракт" і "виділений екстракт" можуть використовуватися 50 взаємозамінно.

Згадувані в даному документі "протівірусні лікарські засоби" належать до класу терапевтичних засобів, застосовуваних, зокрема, для лікування вірусних інфекцій, особливо спричинюваних вірусами простого герпесу, такими як вірус простого герпесу 1 типу (HSV-1), вірус простого герпесу 2 типу (HSV-2), цитомегаловірус (CMV), вірус Епштейна-Барр (EBV), вірус оперізувального лишая (VZV) і віруси герпесу людини 6, 7 і 8 типів (HHV-6, HHV-7 і HHV-8) тощо.

60 Згадувана в даному документі "композиція" стосується рослинної композиції або фармацевтичної композиції, що містить терапевтично ефективну кількість екстракту або виділеного екстракту рослини *Ficus arnottiana* у комбінації з фармацевтично прийнятним носієм.

Необхідно зауважити, що термін "композиція" слід інтерпретувати в широкому сенсі, і він включає будь-яку композицію, призначену для досягнення терапевтичного ефекту, будучи при цьому наявною в продажу або як фармацевтичний препарат, наприклад, з маркуванням для призначеного застосування, або наявною в продажу як препарат, що відпускається без рецепта, або наявною в продажу як рослинний лікарський препарат.

Використовуваний у даному документі термін "терапевтично ефективна кількість" означає кількість екстракту рослини *Ficus arnottiana*, яка дає бажану терапевтичну відповідь, таку як полегшення, лікування та/або попередження вірусної інфекції або симптомів ураження шкіри, свистів, герпесу губ, пухирів, наростів, припухлості, вузликів, папул, висипання та виразок, асоційованих з вірусною інфекцією або спричинюваних вірусною інфекцією, особливо спричинюваних HSV-1 або HSV-2.

Під "фармацевтично прийнятним" мається на увазі те, що носій, розріджувач, наповнювачі та/або сіль повинні бути сумісними з іншими інгредієнтами, що входять до складу, і не бути шкідливими для пацієнта, що їх отримує.

Використовуваний у даному документі термін "фармацевтично прийнятний носій" означає нетоксичну, інертну тверду, напівтверду речовину, розріджувач, такий як вода, інкапсулювальний матеріал або допоміжну речовину будь-якого типу для лікарського складу. Деякі необмежувальні приклади матеріалів, які можуть слугувати як фармацевтично прийнятні носії, являють собою цукри, такі як лактоза, глюкоза та цукроза; крохмалі, такі як кукурудзяний крохмаль і картопляний крохмаль, целюлозу та її похідні, такі як натрій-карбоксиметилцелюлоза, етилцелюлоза та ацетат целюлози, солод, желатин, тальк, а також інші нетоксичні сумісні змащувальні речовини, такі як лаурилсульфат натрію та стеарат магнію, а також барвники, антиадгезивні засоби; засоби покриття, підсолоджувачі, смакові та ароматизувальні засоби; консерванти, такі як феноліп, метилпарабен, бутилпарабен і пропілпарабен; антиоксиданти; олії або воски, такі як бджолиний віск, карнаубський віск, твердий віск, жовтий віск і цетилові естери; емульгатори, такі як моностеарат гліцерину; петролатуми, такі як парафін, ланолінові спирти, білий вазелін, жовтий вазелін, спирти вовняного жиру, нафтовий вазелін і нафтовий віск; гліколі, такі як пропіленгліколь, метилгліколь і метилетилгліколь; карбомери, такі як карбопол 974P; поліоксєтиленові алкілові етери, такі як цетостеариловий спирт; пластифікатори, такі як триетаноламін; розчинники та гідрофільні желатинувальні засоби також можуть бути присутніми в композиції згідно з рішенням розробника рецептури.

Використовуваний у даному документі термін "біологічно активний маркер" стосується біологічно активних хімічних сполук, які присутні в екстракті цілої рослини або частин рослини *Ficus arnottiana*, таких як стовбур (стовбур з корою), стовбур без кори, кора та гілки. Біологічно активні маркери, виділені з екстракту стовбура рослини *Ficus arnottiana*, проявляють протівірусну активність.

Використовуваний у даному документі термін "суб'єкт" стосується тварини, зокрема ссавця, і конкретніше людини. Використовуваний у даному документі термін "ссавець" стосується теплокровних хребетних тварин класу ссавців, включаючи людей, які відрізняються наявністю волоссяного покриву на шкірі та наявністю в особин жіночої статі молочних залоз, в яких утворюється молоко, для вигодовування потомства. Термін "ссавці" включає таких тварин, як кіт, собака, кріль, ведмідь, лисиця, вовк, мавпа, олень, миша, свиня, а також включає людину.

Рослина *Ficus arnottiana* є широко розповсюдженим видом в Індії та Шрі-Ланці. У різних місцях штату Махараштра, Індія, і поблизу цього регіону, у Белгаумі, Колхапурі, Гоа, збирали цілі рослини цього виду або частини рослин, такі як стовбур, стовбур без кори, кора та гілки. Свіжозібрані рослини або частини рослин висушували. Для визначення таксономічних характеристик під час цвітіння та плодоношення збирали гербарні зразки та зберігали в підвідомчому гербарії компанії Piramal Healthcare Limited (раніше Piramal Life Sciences Limited), Гореган, Мумбай, Індія. На основі морфологічних ознак гербарні зразки були зараховані до *Ficus arnottiana*. Отримані та використані в даному винаході екстракти не обмежуються тими, які були отримані з рослин *Ficus arnottiana*, вирощених у Махараштрі, Індія; екстракт може бути отриманий з будь-якої рослини *Ficus arnottiana*, вирощеної в інших регіонах.

Даний винахід стосується виділеного екстракту з цілої рослини або однієї або декількох частин рослини *Ficus arnottiana*, отриманого шляхом перемішування подрібненої цілої рослини або однієї або декількох частин рослини з розчинником з наступним концентруванням отриманого екстракту та необов'язковим збагаченням екстракту шляхом розділення розчинником. Частини рослин, які можуть бути використані, включають стовбур з корою, стовбур без кори, кору, листя, гілки, корені, квітки, суцвіття, насіння та плоди. Краще, щоб для застосування вибиралися такі частини рослини, як стовбур (стовбур з корою), стовбур без кори,

кора та гілки.

Даний винахід додатково стосується композиції, що містить терапевтично ефективну кількість виділеного екстракту цілої рослини або однієї або декількох частин рослини *Ficus arnottiana* у комбінації з фармацевтично прийнятним носієм.

5 Даний винахід також стосується способу отримання екстракту рослини *Ficus arnottiana* і композиції, що містить екстракт як активний інгредієнт.

Спосіб отримання композиції включає наступні етапи, на яких:

(а) отримують екстракт із подрібненої цілої рослини або однієї або декількох частин рослини *Ficus arnottiana* шляхом перемішування з розчинником у співвідношенні від 1:8 до 1:10 вага/об'єм протягом 3-12 годин при 30-50 °C;

(b) концентрують екстракт, отриманий на етапі (а);

10 (c) необов'язково висушують екстракт, отриманий на етапі (b), під дією високого вакууму (0,01-5 мм рт. ст.);

(d) необов'язково збагачують екстракт, отриманий на етапі (b) або етапі (c), шляхом розділення розчинником, і

(e) змішують екстракт, отриманий на етапі (b), етапі (c) або етапі (d), з фармацевтично прийнятним носієм з отриманням композиції.

В одному з аспектів даного винаходу екстракт, отриманий на етапі (b), етапі (c) або етапі (d), можна застосовувати без фармацевтично прийнятного носія.

20 В іншому аспекті даного винаходу частини рослини обирають зі стовбура, кори, стовбура без кори та гілок.

В одному з варіантів здійснення композиція даного винаходу містить екстракт зі стовбура рослини *Ficus arnottiana*. Відповідно, представлено спосіб отримання композиції, яка містить екстракт зі стовбура рослини *Ficus arnottiana*, що включає наступні етапи, на яких:

25 (а) отримують екстракт зі стовбура рослини *Ficus arnottiana* шляхом перемішування з розчинником у співвідношенні від 1:8 до 1:10 вага/об'єм протягом 3-12 годин при 30-50 °C;

(b) концентрують екстракт, отриманий на етапі (а);

(c) необов'язково висушують екстракт, отриманий на етапі (b), під дією високого вакууму (0,01-5 мм рт. ст.);

30 (d) необов'язково збагачують екстракт, отриманий на етапі (b) або етапі (c), шляхом розділення розчинником, і

(e) змішують екстракт, отриманий на етапі (b), етапі (c) або етапі (d), з фармацевтично прийнятним носієм та складають у терапевтичні лікарські форми.

35 В одному з аспектів даного винаходу екстракт, отриманий на етапі (b), етапі (c) або етапі (d), можна застосовувати без фармацевтично прийнятного носія.

Цілу рослину або одну або декілька частин рослини *Ficus arnottiana* можна подрібнювати, при цьому цілу рослину або одну або декілька частин рослини *Ficus arnottiana* можна грубо подрібнювати, або подрібнювати на порошок, або подрібнювати до структури іншого типу.

40 В одному з варіантів здійснення даного винаходу розчинник для екстракції подрібненої цілої рослини або однієї або декількох частин рослини *Ficus arnottiana* обирають з метанолу, етанолу, н-пропанолу, ізопропанолу, н-бутанолу, ацетону, етилацетату, дихлорметану, води або їх сумішей, переважно суміші метанолу та води.

В одному з варіантів здійснення даного винаходу екстракт в розчиннику перед концентруванням фільтрують.

45 В одному з варіантів здійснення даного винаходу концентрування екстракту в розчиннику здійснюють із застосуванням одного або декількох способів, обраних з: (i) перегонки за зниженого тиску (150-600 мм рт. ст.) при 30-50 °C; (ii) ліофілізації та (iii) сушіння розпиленням, з отриманням екстракту.

50 В одному з варіантів здійснення даного винаходу розчинники для збагачення екстракту шляхом розділення розчинником обирають з води, петролейного етеру, дихлорметану, хлороформу, етилацетату, метанолу, ацетону, ацетонітрилу, н-пропанолу, ізопропанолу та бутанолу або їх сумішей.

В одному з аспектів даного винаходу з екстракту цілої рослини або однієї або декількох частин рослини *Ficus arnottiana* виділяють один або декілька біологічно активних маркерів.

55 В одному з варіантів здійснення даного винаходу в екстракті рослини *Ficus arnottiana* ідентифікують два біологічно активні маркери. Біологічно активні маркери виділяють з екстракту та конкретно ідентифікують як флоризин і 5,7,4'-тригідроксифлавоон.

60 В іншому варіанті здійснення даного винаходу з композиції, що містить екстракт рослини *Ficus arnottiana*, виділяють два біологічно активні маркери. Біологічно активні маркери ідентифікують як флоризин і 5,7,4'-тригідроксифлавоон.

Відповідно, в одному з аспектів даний винахід стосується композиції, яка містить терапевтично ефективну кількість екстракту рослини *Ficus arnottiana*, що містить один або декілька біологічно активних маркерів, для застосування в попередженні та лікуванні вірусної інфекції, спричинюваної вірусом простого герпесу (HSV).

5 В одному з варіантів здійснення біологічно активними маркерами, які містяться в екстракті, є флоризин і 5,7,4'-тригідроксифлавіон або їх суміш.

В одному з варіантів здійснення даний винахід стосується біологічно активного(их) маркера(ів), виділеного(их) з екстракту рослини *Ficus arnottiana*, для застосування в лікуванні вірусної інфекції, спричинюваної вірусом простого герпесу (HSV), де HSV може бути HSV-1 або HSV-2; і де біологічно активний маркер обирають з флоризину, або 5,7,4'-тригідроксифлавіону, або їх сумішей.

Даний винахід додатково стосується способу лікування у суб'єкта вірусної інфекції, спричинюваної вірусом простого герпесу (HSV), який включає введення суб'єктові композиції, що містить терапевтично ефективну кількість виділеного екстракту рослини *Ficus arnottiana*.

15 Даний винахід, крім того, додатково стосується способу лікування у суб'єкта вірусної інфекції, спричинюваної HSV, де HSV являє собою HSV-1; при цьому спосіб включає введення суб'єктові композиції, яка містить терапевтично ефективну кількість виділеного екстракту рослини *Ficus arnottiana*.

Даний винахід також стосується способу лікування у суб'єкта вірусної інфекції, спричинюваної HSV, де HSV являє собою HSV-2; при цьому спосіб включає введення суб'єктові композиції, яка містить терапевтично ефективну кількість виділеного екстракту рослини *Ficus arnottiana*.

Даний винахід також стосується композиції, яка містить терапевтично ефективну кількість виділеного екстракту рослини *Ficus arnottiana* у комбінації з фармацевтично прийнятним носієм, для застосування в попередженні та лікуванні вірусної інфекції, спричинюваної HSV.

Даний винахід додатково стосується композиції, яка містить терапевтично ефективну кількість виділеного екстракту рослини *Ficus arnottiana* у комбінації з фармацевтично прийнятним носієм, для застосування в попередженні та лікуванні вірусної інфекції, спричинюваної HSV, де HSV являє собою HSV-1.

30 Даний винахід, крім того, додатково стосується композиції, яка містить терапевтично ефективну кількість виділеного екстракту рослини *Ficus arnottiana* у комбінації з фармацевтично прийнятним носієм, для застосування в попередженні та лікуванні вірусної інфекції, спричинюваної HSV, де HSV являє собою HSV-2.

Даний винахід також стосується застосування терапевтично ефективної кількості виділеного екстракту рослини *Ficus arnottiana* у комбінації з фармацевтично прийнятним носієм з метою виробництва лікарського препарату для лікування вірусної інфекції.

В одному з аспектів даного винаходу суб'єктом, що підлягає лікуванню, або суб'єктом, на якого спрямоване застосування, є ссавець, зокрема, людина, у якої діагностували інфекцію, спричинювану вірусом. Конкретніше, ссавцем, що підлягає лікуванню, є людина, у якої діагностували інфекцію, спричинювану HSV.

В іншому аспекті даного винаходу суб'єктом, що підлягає лікуванню, є ссавець, зокрема, людина, у якої діагностували інфікування вірусом імунодефіциту людини (ВІЛ), і якій вводять композицію як профілактичний захід проти коінфікування HSV-1.

У ще одному аспекті даного винаходу суб'єктом, що підлягає лікуванню, є ссавець, зокрема, людина, у якої діагностували інфікування вірусом імунодефіциту людини (ВІЛ), і якій вводять композицію як профілактичний захід проти коінфікування HSV-2.

У додатковому аспекті даного винаходу ссавцем, що підлягає лікуванню, є людина, якій вводять композицію як профілактичний захід проти інфекції, що передається статевим шляхом (STI).

50 В іншому аспекті даного винаходу суб'єктом, що підлягає лікуванню, є ссавець, зокрема, людина, у якої діагностували рецидивні інфекції, спричинювані HSV.

Даний винахід також передбачає застосування композиції згідно з даним винаходом в комбінації з іншими противірусними лікарськими засобами, такими як ацикловір, фамцикловір, ганцикловір, імуновір, індинавір або озельтамівір.

55 В одному з аспектів даного винаходу спосіб лікування вірусної інфекції включає введення описаної вище композиції за допомогою відомих способів введення, які, поміж іншого, включають наведені нижче.

Композиція може бути введена перорально, наприклад, у формі пігулок, таблеток, таблеток, вкритих оболонкою, капсул, гранул, розчинів, еліксирів або сиропу.

60 Відповідно до даного винаходу композиція, складена для перорального застосування

(пероральні склади), містить від приблизно 5 % до приблизно 99 % за вагою екстракту рослини *Ficus arnottiana*. Пероральні склади отримують шляхом ретельного змішування екстракту рослини *Ficus arnottiana* зі звичайною основою, такою як цукри, крохмалі або змащувальні речовини.

Композиція може застосовуватися для місцевого або трансдермального застосування. Місцеві композиції згідно з даним винаходом включають склади, придатні для місцевого або трансдермального застосування на шкірі, придатні для нанесення на слизові оболонки або введення разом із презервативом або іншим бар'єрним засобом контрацепції. Композиції можуть бути складені у великій різноманітності типів продуктів, які включають, без обмеження, лосьйони, креми, гелі, палички, пластирі, вагінальні супозиторії або песарії, спреї або мазі.

Відповідно до даного винаходу композиція, складена для місцевого або трансдермального застосування, містить від приблизно 5 % до приблизно 99 %, переважно від 5 до 50 % за вагою екстракту рослини *Ficus arnottiana*. Склад для місцевого або трансдермального застосування отримують шляхом змішування екстракту рослини *Ficus arnottiana* зі звичайною основою, такою як олії, воски або гліколі.

Екстракт рослини *Ficus arnottiana* міститься в композиції згідно з даним винаходом в такій кількості, яка є ефективною для досягнення бажаної терапевтичної відповіді у конкретного пацієнта, не проявляючи при цьому токсичності стосовно пацієнта та не спричиняючи у нього тяжких побічних ефектів. Ефективна кількість буде залежати від багатьох чинників, які включають активність екстракту, використовуюваного в даному винаході, спосіб уведення, час уведення, швидкість екскреції конкретної використовуюваної композиції, тривалість лікування, вік, стать, вагу, стан, загальний стан здоров'я та попередню історію хвороби пацієнта, що підлягає лікуванню, і подібні чинники, добре відомі в галузі медицини.

Ефективність екстракту рослини *Ficus arnottiana* встановлювали за допомогою біологічних аналізів, які докладно описані в наведених нижче прикладах. Ці приклади приведені в даному документі тільки з метою пояснення та не повинні обмежувати обсяг даного винаходу.

#### Приклади

[Примітка: вода, використовувана в протоколах експериментів, є демінералізованою водою.]

#### Приклад 1

Отримання екстракту *Ficus arnottiana* із застосуванням суміші дихлорметану (DCM) і метанолу (1:1)

Свіжозібрані стовбури *Ficus arnottiana* висушували з використанням осушника та подрібнювали на порошок. Грубо подрібнений матеріал (150 г) вимочували в 1500 мл суміші DCM:метанол (1:1) під час постійного перемішування протягом 3 годин у круглодонній колбі, яку поміщали на водяну баню, підтримувану за температури  $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Екстракт фільтрували, а залишок вимочували в 1500 мл суміші DCM:метанол (1:1) протягом 3 годин при  $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$  і фільтрували. Екстракти об'єднували та концентрували з використанням роторного випарника при  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$  в умовах лінійного вакууму (приблизно 500 мм рт. ст.) з отриманням 5,0 г первинного екстракту (позначено як зразок 1).

Екстракти з інших частин рослини, таких як кора стовбура, стовбур без кори та гілки, отримували з використанням суміші DCM:метанол (1:1), дотримуючись того самого способу, який застосовували щодо стовбура. Виходи екстрактів є наступними:

(i) 2,5 г екстракту отримали з 50 г кори (позначено як зразок 2);

(ii) 2,0 г екстракту отримали з 50 г стовбура без кори (позначено як зразок 3);

(iii) 16,3 г екстракту отримали з 300 г гілок (позначено як зразок 4).

#### Приклад 2

Збагачення зразка 1, зразка 2, зразка 3 і зразка 4 з прикладу 1

Етап 1. Зразок 1 (1 г) суспендували в 30 мл суміші вода:метанол (9:1) за кімнатної температури ( $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), обробляли ультразвуком для розчинення та розділяли послідовно 3 рази із застосуванням 30 мл петролейного етеру ( $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ - $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Шар петролейного етеру концентрували на роторному випарнику в умовах лінійного вакууму з отриманням 0,5 г фракції петролейного етеру (позначено як зразок 5).

Етап 2. Водний фільтрат, отриманий на етапі 1, розділяли послідовно 3 рази за допомогою 30 мл хлороформу. Шар хлороформу концентрували на роторному випарнику в умовах лінійного вакууму з отриманням 0,10 г фракції хлороформу (позначено як зразок 6).

Етап 3. Водний шар, отриманий на етапі 2, згодом розділяли послідовно 3 рази за допомогою 30 мл етилацетату. Шар етилацетату концентрували на роторному випарнику в умовах лінійного вакууму з отриманням 0,07 г фракції етилацетату (позначено як зразок 7).

Етап 4. Водний шар, отриманий на етапі 3, згодом концентрували на роторному випарнику в умовах лінійного вакууму для видалення залишкових органічних розчинників і ліофілізували з



отриманням 0,24 г водної фракції (позначено як зразок 8).

Збагачення екстрактів з інших частин рослини, таких як кора стовбура, стовбур без кори та гілки, здійснювали у той же спосіб, що й стосовно екстракту стовбура. Виходи екстрактів є наступними:

5 (i) 1 г зразка 2 збагачували з отриманням 0,06 г фракції петролейного етеру (позначено як зразок 9), 0,16 г фракції хлороформу (позначено як зразок 10), 0,07 г фракції етилацетату (позначено як зразок 11) і 0,24 г водної фракції (позначено як зразок 12);

(ii) 1 г зразка 3 збагачували з отриманням 0,21 г фракції петролейного етеру (позначено як зразок 13), 0,19 г фракції хлороформу (позначено як зразок 14), 0,29 г фракції етилацетату (позначено як зразок 15) і 0,28 г водної фракції (позначено як зразок 16);

(iii) 1 г зразка 4 збагачували з отриманням 0,64 г фракції петролейного етеру (позначено як зразок 17), 0,15 г фракції хлороформу (позначено як зразок 18), 0,03 г фракції етилацетату (позначено як зразок 19) і 0,08 г водної фракції (позначено як зразок 20).

#### Приклад 3

15 Отримання метанольного екстракту рослини *Ficus arnottiana*

Свіжозібраний стовбур *Ficus arnottiana* висушували та подрібнювали на порошок. Грубо подрібнений матеріал (50 г) вимочували в 500 мл метанолу під час перемішування протягом 3 годин у круглодонній колбі, яку поміщали на водяну баню, підтримувану за температури  $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Екстракт фільтрували, а залишок вимочували в 500 мл метанолу протягом 3 годин при  $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$  і фільтрували. Екстракти об'єднували та концентрували із застосуванням роторного випарника в умовах лінійного вакууму з отриманням 2,06 г екстракту (позначено як зразок 21).

Метанольний екстракт з гілок рослини *Ficus arnottiana* отримували, дотримуючись того самого способу, який застосовували щодо стовбура. З 50 г гілок отримали 3,95 г екстракту (позначено як зразок 22).

25 Приклад 4

Отримання екстракту рослини *Ficus arnottiana* із застосуванням суміші метанол:вода (1:1)

Свіжозібраний стовбур *Ficus arnottiana* висушували та подрібнювали на порошок. Грубо подрібнений матеріал (100 г) вимочували в 1 л суміші метанол:вода (1:1) під час постійного перемішування протягом 3 годин у круглодонній колбі, яку поміщали на водяну баню, підтримувану за температури  $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Екстракт фільтрували, а залишок вимочували в 800 мл суміші метанол:вода (1:1) протягом 3 годин при  $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$  і фільтрували. Екстракти об'єднували та концентрували із застосуванням роторного випарника в умовах лінійного вакууму та ліофілізували з отриманням 5,67 г метанол-водного екстракту (позначено як зразок 23).

35 Метанол-водний екстракт з гілок рослини *Ficus arnottiana* отримували, дотримуючись того самого способу, який застосовували щодо стовбура. З 50 г гілок отримали 4,03 г екстракту (позначено як зразок 24).

#### Приклад 5

Отримання водного екстракту рослини *Ficus arnottiana*

40 Свіжозібраний стовбур *Ficus arnottiana* висушували та подрібнювали на порошок. Грубо подрібнений матеріал (50 г) вимочували в 500 мл води під час постійного перемішування протягом 3 годин у круглодонній колбі, яку поміщали на водяну баню, підтримувану за температури  $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Екстракт фільтрували та ліофілізували з отриманням 1,04 г екстракту (позначено як зразок 25).

45 Водний екстракт з гілок рослини *Ficus arnottiana* отримували, дотримуючись того самого способу, який застосовували щодо стовбура. З 50 г гілок отримали 1,11 г екстракту (позначено як зразок 26).

#### Приклад 6

Отримання складу

50 Загальний спосіб отримання крему

Необхідну кількість метилпарабену та пропілпарабену під час слабкого нагрівання розчиняли в пропіленгліколі та воді (див. таблицю 1) у придатній посудині зі скла/нержавіючої сталі. У посудину додавали зразок 23 з прикладу 4 і розчиняли/диспергували із застосуванням механічної мішалки. Температуру підтримували на рівні від  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  до  $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ . До цього розчину під час постійного перемішування додавали гліцерилмоностеарат і пропіленгліколь. Розплавляли бджолиний віск, білий м'який парафін і гліцерилмоностеарат і додавали у вищевказану посудину під час постійного перемішування. Температуру повільно знижували до кімнатної температури.

Таблиця 1

склад ІА, склад ІВ і склад ІС

№	Інгредієнти	Склад ІА	Склад ІВ	Склад ІС
		% вага/вага	% вага/вага	% вага/вага
1	Зразок 23 з прикладу 4	10	20	30
2	Бджолиний віск	2	2	2
3	Білий м'який парафін	76,8	61,8	46,8
4	Гліцерилмоностеарат	3	3	3
5	Пропіленгліколь	3	3	3
6	Метилпарабен	0,18	0,18	0,18
7	Пропілпарабен	0,02	0,02	0,02
8	Вода	5	10	15
	Загалом	100	100	100

## Приклад 7

## Аналітичний аналіз

5 Частина А: оцінка зразка 23 з прикладу 4

Розчиняли 100 мг зразка 23 з прикладу 4 в 1 мл суміші метанол:вода (1:1); обробляли 1 мл 0,04 М КМnO<sub>4</sub> і залишали на 15 хвилин за кімнатної температури. Суміш розводили розріджувачем [метанол:вода (1:1)], фільтрували крізь фільтр з полівініліденфториду (PVDF) з діаметром пор 0,45 мкм, і фільтрат аналізували за допомогою ВЕРХ.

10 Умови аналітичної ВЕРХ:

Колонка: Unisphere aqua C18, 150 × 4,6 мм, 3 мкм

Рухома фаза А: 0,1 % трифтороцтова кислота

Рухома фаза В: ацетонітрил

Градiєнт: час (хвилини)/% А: 0/90, 25/60, 30/20, 35/20, 36/90, 40/90

15 Час прогону: 40 хвилин

Концентрація: 10 мг/мл

Розріджувач: метанол:вода (1:1)

Довжина хвилі: 270 нм

Результат

20 На фігурі 1 зображено аналітичну хроматограму зразка 23 з прикладу 4. На хроматограмі проілюстровано піки двох біологічно активних маркерів, позначених як ВМ 1 (біологічно активний маркер 1) і ВМ 2 (біологічно активний маркер 2), за часу утримання 14,3 і 21,8, відповідно. Біологічно активні маркери проявляли противірусну активність. ВМ 1 і ВМ 2 виділяли та очищали, як описано в частині С.

25 Частина В: оцінка складу ІВ з прикладу 6

Розчиняли 1 г складу ІВ з прикладу 6 в 15 мл суміші метанол:вода (1:1) і нагрівали при 60 °С протягом 20 хвилин. Отриманий у результаті розчин розводили розріджувачем до об'єму 20 мл, фільтрували крізь фільтр з полівініліденфториду (PVDF) з діаметром пор 0,45 мкм, і фільтрат аналізували за допомогою ВЕРХ.

30 Умови аналітичної ВЕРХ:

Колонка: Unisphere aqua C18, 150 × 4,6 мм, 3 мкм

Рухома фаза А: 0,1 % трифтороцтова кислота

Рухома фаза В: ацетонітрил

Градiєнт: час (хвилини)/% А: 0/90, 25/60, 30/20, 35/20, 36/90, 40/90

35 Час прогону: 40 хвилин

Концентрація: 50 мг/мл

Розріджувач: метанол:вода (1:1)

Довжина хвилі: 270 нм

Результат

40 На фігурі 2 зображено аналітичну хроматограму складу ІВ з прикладу 6. На хроматограмі проілюстровано піки двох біологічно активних маркерів, позначених як ВМ 1 і ВМ 2, за часу утримання 14,3 і 21,8, відповідно. Біологічно активні маркери проявляли противірусну активність. ВМ 1 і ВМ 2 виділяли та очищали, як описано в частині С.

Частина С: виділення біологічно активних маркерів

45 В 1,6 л метанолу розчиняли 85,0 г зразка 23 з прикладу 4, обробляли ультразвуком

протягом 10 хвилин і залишали відстоюватися на 30 хвилин. Надосадову рідину зливали та фільтрували з отриманням фільтрату № 1. Нерозчинну частину промивали за допомогою 200 мл метанолу. Надосадову рідину фільтрували з отриманням фільтрату № 2. Фільтрати № 1 і № 2 об'єднували та висушували на роторному випарнику з отриманням 26,18 г зразка. Отриманий у результаті зразок, 13,0 г, розчиняли в 36 мл суміші метанол:вода (75:25, об'єм/об'єм), обробляли ультразвуком, центрифугували. Надосадову рідину завантажували на колонку LH-20 (5 × 80 см), і проводили елювання сумішшю метанол:вода (75:25, об'єм/об'єм). Ще одну порцію з 13,0 г зразка обробляли за допомогою способу, описаного вище. Збирали фракції та аналізували за допомогою ВЕРХ.

Умови аналітичної ВЕРХ:

Колонка: Unisphere C18, 250 × 4,6 мм, 5 мкм

Рухома фаза А: 0,1 % трифтороцтова кислота

Рухома фаза В: ацетонітрил

Гradient: час (хвилини)/% А: 0/90, 30/20, 35/20, 36/90, 40/90

Час прогону: 40 хвилин

Об'єм проби, що вводиться: 10 мкл

Довжина хвилі: 270 нм

Фракції з двох колонок LH-20 об'єднували та концентрували досуха при 40 °С під дією вакууму з отриманням 100 мг біологічно активного маркера 1 і 135 мг біологічно активного маркера 2. Висушені зразки біологічно активних маркерів 1 і 2 окремо піддавали С-18-флеш-хроматографії для додаткового очищення.

Умови хроматографування стосовно флеш-хроматографії:

Колонка: Redisep C18, 14 × 2 см

Рухома фаза А: 0,1 % трифтороцтова кислота

Рухома фаза В: ацетонітрил

Gradient: час (хвилини)/% А: 0/90, 30/20, 35/20, 36/90, 40/90

Потік: 30 мл/хв

Довжина хвилі: 270 нм

Біологічно активний маркер 1

Фракції, отримані за допомогою флеш-хроматографії, перевіряли за допомогою ВЕРХ. Фракції, що містили біологічно активний маркер 1, об'єднували та випарювали при 40 °С під дією вакууму досуха з отриманням 30 мг напівчистого біологічно активного маркера 1, який додатково очищали із застосуванням напівпрепаративної ВЕРХ на кремнієвих колонках з отриманням 5,3 мг біологічно активного маркера 1. Біологічно активний маркер 1 був присутнім у зразку 23 з прикладу 4 у діапазоні від 0,02 до 0,8 %.

Умови хроматографування стосовно напівпрепаративної ВЕРХ на капілярній кварцовій колонці:

Колонка: капілярна кварцова від Grace, 5 мкм (250 × 10 мм)

Рухома фаза: метанол:дихлорметан (10:90); об'єм:об'єм

Потік: 5 мл/хв

Довжина хвилі: 270 нм

Концентрація зразка: 20 мг/мл

На основі даних про масу та ЯМР біологічно активний маркер 1 ідентифікували як флоризин. Молекулярною формулою флоризину є  $C_{21}H_{24}O_{10}$ , а молекулярна маса становить 436,41.

Біологічно активний маркер 2

Фракції, отримані за допомогою флеш-хроматографії, перевіряли за допомогою ВЕРХ. З фракцій отримували кристали біологічно активного маркера 2. Кристали відокремлювали за допомогою декантування та висушували з отриманням 20 мг біологічно активного маркера 2. На основі даних про масу та ЯМР біологічно активний маркер 2 ідентифікували як 5,7,4'-тригідроксифлавіон. Молекулярною формулою 5,7,4'-тригідроксифлавіону є  $C_{15}H_{10}O_5$ , а молекулярна маса становить 270,05. Біологічно активний маркер 2 є присутнім у зразку 23 з прикладу 4 у діапазоні від 0,01 до 0,1 %.

БІОЛОГІЧНА ОЦІНКА

Аналіз протівірусної активності in vitro

Приклад 8

Отримання штаму вірусу

Використовувані матеріали:

Клітинна лінія	: Vero (епітеліальні клітини нирок з клітинної лінії нирок африканської зеленої мавпи під № CCL-81 в Американській колекції типових культур (ATCC))
Вірус	: HSV-1 (штам ATCC VR-1493 та клінічний штам з Національного інституту вірусології, Пуна, Індія) : HSV-2 (штам ATCC VR-734 та клінічний штам з Національного інституту вірусології, Пуна, Індія)
Середовище	: середовище Ігла, модифіковане за способом Дульбекко (DMEM, Gibco, США, № у каталозі: 12430)
Сироватка	: фетальна бичача сироватка (FBS, Gibco, США, № у каталозі: 16000-044)
Розчин трипсин-EDTA	: 0,25 % трипсин-етилендіамінтетраоцтова кислота (трипсин-EDTA, Gibco, США, № у каталозі: 25200)
Стандартна сполука	: ацикловір (Medicorp, Хайдарабад, Індія)
Вироби з пластику	: матраци для культури тканини, 25 см <sup>2</sup> (Nunc, США, № у каталозі: 156367) : матраци для культури тканини, 75 см <sup>2</sup> (Nunc, США, № у каталозі: 156499) : пробірки для центрифуги, 15 мл (Nunc, США, № у каталозі: 366060) : пробірки для центрифуги, 50 мл (Nunc, США, № у каталозі: 373687) : 96-лункові планшети із плоским дном (Nunc, США, № у каталозі: 167008)
Барвник	: кристалічний фіолетовий (Sigma, США, № у каталозі: C3886-25G)
Суміш антибіотик-антимікотик	: (Gibco, США, № у каталозі: 15240)
Реагент бромід 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразолію (MTT)	(Trevigen Inc, Гейтерсбург, штат Меріленд, США, № у каталозі 4890-25-01)
Реагент-детергент	(Trevigen Inc, Гейтерсбург, штат Меріленд, США, № у каталозі 4890-25-02)

## Етап 1

## Підтримання клітинної лінії

- 5 Підтримання клітинної лінії здійснювали, як описано в Antiviral Research, 2005, 67, 24-30, який включений у даний документ за допомогою посилання на описуваний у ньому спосіб.
- 10 Клітинну лінію Vero, отриману від ATCC, культивували в повному живильному середовищі, тобто в середовищі Ігла, модифікованому за способом Дульбекко (DMEM), доповненому 10 % фетальної бичачої сироватки (FBS) і суміші антибіотик-антимікотик (1x). Для субкультивування обрали матрац для культури тканини T-25 з моношаром клітин. З матраца видаляли DMEM і
- 15 недовго промивали DMEM без сироватки, щоб видалити всі сліди сироватки, яка містить інгібітор трипсину. У матрац додавали 1 мл розчину трипсин-EDTA і спостерігали під інвертованим мікроскопом до диспергування моношару клітин (як правило, протягом 3-5 хвилин). Негайно додавали 14 мл повного живильного середовища, та клітини обережно відсмоктували піпеткою. Співвідношення для субкультивування 1:3 отримували шляхом
- 15 додавання по 5 мл клітинної суспензії в 3 різні матраци для культури тканини T-25. Матраци підтримували за температури 37 °C і 5 % CO<sub>2</sub>.

## Етап 2

## Розмноження вірусів (HSV-1 і HSV-2)

- 20 Розмноження вірусів здійснювали, як описано в Antiviral Research, 2005, 67, 24-30, який включений у даний документ за допомогою посилання на описуваний у ньому спосіб.
- HSV-1 і HSV-2 розмножували в клітинах Vero. Коротко, клітини Vero вирощували в DMEM, доповненому 10 % FBS, пеніциліном та стрептоміцином (повне середовище) за 37°C і 5 % CO<sub>2</sub>. Коли клітини досягали 80-90 % конфлюентності, отриманий моношар промивали простим DMEM та інфікували вірусом за відповідного розведення. Вірусу дозволяли адсорбуватися до
- 25 моношару протягом 1 години за 37°C і 5 % CO<sub>2</sub>. Через одну годину вірусний інокулят видаляли та додавали 10 мл DMEM, доповнене 2 % FBS, після чого матрац інкубували протягом ще 48 годин до повного руйнування моношару клітин. Матрац досліджували під мікроскопом два рази на день на цитопатичний ефект (CPE). До CPE належать зміни в клітинній морфології, такі як

округлення та розширення клітин, утворення синцитіїв і включень, спричинюваних вірусом. Після 48 годин інкубування матрац піддавали 2-3 циклам заморожування-відтавання для повного лізису клітин і вивільнення вірусу в культуральне середовище. Клітинний дебрис видаляли шляхом центрифугування за 1000 обертів на хвилину протягом 10 хвилин за 4 °C.

5 Отриману надосадову рідину зберігали у формі аліквот за -80 °C. Титр вірусного штаму визначали із застосуванням наступних способів.

#### Етап 3 (А)

Визначення титру вірусу із застосуванням аналізу цитопатичного ефекту (CPE)

10 Аналіз проводили, як описано в World J. Gastroenterol., 2006, 12: 4078-4081, який включений у даний документ за допомогою посилання на описуваний у ньому спосіб.

Титр вірусу визначали за допомогою аналізу цитопатичного ефекту (CPE) і виражали як дозу, що інфікує 50 % культури тканини (TCID<sub>50</sub>). Клітини Vero (отримані на етапі 1) висівали в 96-лунковий планшет за густини  $2 \times 10^4$  клітин/100 мкл/лунка, а згодом інкубували при 37 °C і 5 % CO<sub>2</sub> протягом 24 годин для досягнення 80-90 % конфлюентності. Серійне розведення вірусного штаму (отриманого на етапі 2) проводили (від  $10^{-1}$  до  $10^{-8}$ ) у підтримувальному середовищі (DMEM з 2 % FBS). Живильне середовище з культуральних планшетів видаляли, та для інфікування клітин Vero застосовували 100 мкл кожного розведеного розчину вірусу. Клітини Vero слугували як контроль тільки в підтримувальному середовищі. Після інфікування культуральний планшет інкубували за 37 °C у CO<sub>2</sub>-інкубаторі протягом 48 годин. Після 48 годин інкубування CPE оцінювали під інвертованим мікроскопом у лунках, інокульованих вірусом за різних розведень. Коли вірусні контрольні зразки показували максимальний CPE, середовище видаляли, а інфікований моношар фіксували та забарвлювали протягом 30 хвилин із застосуванням розчину, що містив формалін (10 %) і кристалічний фіолетовий (1 %). Після закінчення 30 хвилин барвник відсмоктували, та планшет обполіскували дистильованою водою до змивання всіх надлишків барвника. Планшет залишали висихати протягом ночі. Титр вірусу (TCID<sub>50</sub>) розраховували, як описано в Am. J. Hyg., 1938, 27, 493-497. TCID<sub>50</sub> означає дозу, яка спричиняє CPE у 50 % інокульованих культур.

Результат: титр вірусу HSV-1, визначений шляхом аналізу цитопатичного ефекту (CPE), становив  $5,88 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/мл;

30 титр вірусу HSV-2, визначений шляхом аналізу цитопатичного ефекту (CPE), становив  $1,58 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub>/мл.

#### Етап 3 (В)

Визначення титру вірусу із застосуванням аналізу бляшкоутворення

35 Аналіз проводили, як описано в Antiviral Res., 2005, 67(1): 24-30, який включений у даний документ за допомогою посилання на описуваний у ньому спосіб.

Титр вірусу також визначали шляхом аналізу бляшкоутворення та виражали як кількість бляшкоутворювальних одиниць на мл (БУО/мл). Клітини Vero (отримані на етапі 1) обробляли трипсином, підраховували та висівали в 24-лунковий планшет за густини  $2 \times 10^5$  клітин/мл/лунка, після чого інкубували при 37 °C і 5 % CO<sub>2</sub> протягом 24 годин для досягнення 80-90 % конфлюентності. Серійні розведення вірусу (вірусного штаму, отриманого на етапі 2) готували в діапазоні від  $10^{-2}$  до  $10^{-7}$  із застосуванням підтримувального середовища (DMEM з 2 % FBS). 3 планшета видаляли живильне середовище, та в кожен лунку додавали по 0,2 мл кожного розведеного розчину вірусу, намагаючись при цьому не порушити клітини. Інфіковані моношари інкубували при 37 °C і 5 % CO<sub>2</sub> протягом 1 години, струшуючи кожні 15 хвилин. Після інкубаційного періоду в кожен лунку додавали 1 % СМС об'ємом 1 мл та інкубували планшет протягом 48 годин, після чого клітини фіксували та забарвлювали протягом 30 хвилин розчином, що містив формалін (10 %) і кристалічний фіолетовий (1 %). Після закінчення 30 хвилин барвник відсмоктували, та планшет обполіскували із застосуванням дистильованої води до змивання всіх надлишків барвника. Планшет залишали висихати протягом ночі.

50 Підраховували бляшки, щоб оцінити титр вірусу, який виражали як кількість бляшкоутворювальних одиниць на мл (БУО/мл).

Титр вірусу = (число утворених бляшок x розведення вірусу x об'єм інокуляту).

Результат: титр вірусу HSV-1, визначений шляхом аналізу бляшкоутворення, становив  $2,1 \times 10^8$  БУО/мл;

55 титр вірусу HSV-2, визначений шляхом аналізу бляшкоутворення, становив  $1,65 \times 10^7$  БУО/мл.

#### Приклад 9

Первинний скринінговий тест на противірусну активність здійснювали із застосуванням аналізу інгібування CPE (спосіб забарвлення кристалічним фіолетовим)

60 Аналіз був призначений для виявлення засобів (у даному випадку екстрактів), що

проявляють активність на будь-якій стадії репродуктивного циклу вірусу. Аналіз проводили, як описано в Indian J. Med. Res., 2004, 120:24-29, який включений у даний документ за допомогою посилання на описуваний у ньому спосіб.

Клітини Vero (отримані на етапі 1 із прикладу 8) розмножували за густини  $1 \times 10^4$  клітин/лунка в 96-лунковому планшеті та інкубували за 37 °C у CO<sub>2</sub>-інкубаторі протягом 24 годин для утворення моношару. Зразки 1-26 тестували за допомогою додавання розчину з концентрацією 50 мкг/мл і 100 мкг/мл (вихідний розчин DMSO з концентрацією екстракту 20 мг/мл розводили до 50 мкг/мл і 100 мкг/мл середовищем DMEM, що містило 2 % FBS) до кінцевого об'єму культури 200 мкл/лунка. Включали відповідні контрольні групи, такі як клітини Vero самі по собі (клітинна контрольна група), клітини Vero з вірусом (вірусна контрольна група) і клітини Vero з вірусом і стандартною сполукою, ацикловіром (наявний у продажу протівірусний лікарський засіб). Ацикловір тестували за наступних концентрацій (вихідний розчин DMSO з концентрацією ацикловіру 20 мг/мл розводили до 100 мкг/мл за допомогою DMEM, що містило 2 % FBS): 12,5 мкг/мл, 6,25 мкг/мл, 3,125 мкг/мл, 1,5 мкг/мл і 0,78 мкг/мл стосовно HSV-1 і 25 мкг/мл, 12,5 мкг/мл, 6,25 мкг/мл і 3,125 мкг/мл стосовно HSV-2. Екстракти, які підлягали аналізу, додавали за 1 годину до інфікування, щоб забезпечити максимальну чутливість і дати попереднє уявлення про потенційних інгібіторів ранніх етапів реплікації, таких як адсорбція або проникнення. Через одну годину клітини інфікували 100 мкл відповідної дози вірусу на лунку [HSV-1 за множинності інфекції (MOI)  $10^4$  TCID<sub>50</sub> або HSV-2 за MOI  $10^3$  TCID<sub>50</sub>] із застосуванням вірусного штаму, отриманого на етапі 2 з прикладу 8. Інфіковані клітини інкубували в підтримувальному середовищі (DMEM з 2 % FBS) протягом ще 48-50 годин. Коли вірусні контрольні зразки показували максимальний CPE, середовище відсмоктували, а клітини промивали 0,85 % фізіологічним розчином, після чого забарвлювали 0,1 % розчином кристалічного фіолетового протягом 30 хвилин. Відсмоктували забарвлювальний розчин, і планшети обполіскували із застосуванням дистильованої води до змивання всіх надлишків барвника. Планшети залишали висихати протягом 24 годин. Після забарвлення бляшок візуально та мікроскопічно оцінювали CPE та класифікували відповідно до відсотка інгібування CPE порівняно з контрольними зразками. Отримані результати представлено в таблиці 2.

Таблица 2

Зразок	Інгібування CPE, % (HSV-1)		Інгібування CPE, % (HSV-2)	
	50 мкг/мл	100 мкг/мл	50 мкг/мл	100 мкг/мл
Зразок 1	-	-	+	-
Зразок 2	-	++++	++++	++++
Зразок 3	-	-	-	-
Зразок 4	+	++	+	++++
Зразок 5	-	-	-	-
Зразок 6	+	-	+++	+
Зразок 7	-	-	-	-
Зразок 8	++++	++++	++++	++++
Зразок 9	-	-	-	-
Зразок 10	++	-	+	-
Зразок 11	++++	+	+++	+
Зразок 12	-	-	+	-
Зразок 13	-	-	-	-
Зразок 14	-	-	-	-
Зразок 15	-	-	-	-
Зразок 16	++	-	+	-
Зразок 17	-	-	-	-
Зразок 18	+	++	++	+++
Зразок 19	-	-	-	++
Зразок 20	++++	+	++++	++++
Зразок 21	-	+	++++	+++
Зразок 22	+++	++++	++++	++++
Зразок 23	++++	++++	++++	++++
Зразок 24	+++	-	+++	++++
Зразок 25	-	++	++++	++++
Зразок 26	-	-	-	+++

Результати, отримані з ацикловіром, показано в таблиці 3.

Таблиця 3

Концентрація ацикловіру, мкг/мл	Інгібування CPE, % (HSV-1)	Інгібування CPE, % (HSV-2)
0,78	+	nd
1,5	++	nd
3,125	+++	+
6,25	+++	++
12,5	++++	+++
25	nd	++++

5 Символи, використовувані в наведених вище таблицях 2 і 3, мають наступне значення.

Символи	Інгібування CPE, %	Символи	Інгібування CPE, %
nd	не проводили;	-	0-10 % інгібування CPE;
+	11-25 % інгібування CPE;	++	26-50 % інгібування CPE;
+++	51-75 % інгібування CPE;	++++	76-100 % інгібування CPE.

#### Приклад 10

Аналіз інгібування CPE – спосіб із застосуванням МТТ

10  $IC_{50}$  визначали для екстрактів, які демонстрували гарний дозозалежний ефект стосовно HSV-1 і HSV-2.  $IC_{50}$  оцінювали шляхом аналізу інгібування CPE (спосіб із застосуванням МТТ).

Аналіз був призначений для виявлення засобів (у даному випадку екстрактів), що діють на будь-якій стадії репродуктивного циклу вірусу. Аналіз проводили, як описано в World J. Gastroenterol., 2006, 12:4078-4081, який включений у даний документ за допомогою посилання на описуваний у ньому спосіб.

15 Аналіз проводили відповідно до описуваного в прикладі 9 способу аналізу інгібування CPE із забарвленням, за винятком того, що аналіз із застосуванням броміду 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразолію (МТТ) здійснювали без забарвлення клітин барвником кристалічним фіолетовим. Клітини Vero (отримані на етапі 1 з прикладу 8) в 96-лункових планшетах із плоским дном обробляли підтримувальним середовищем (DMEM з 2 % FBS), що містило зразок 20 1 із прикладу 1 або ацикловір, протягом 1 години. Згодом клітини інфікували вірусом (із застосуванням штаму вірусу, отриманого на етапі 2 із прикладу 8) за MOI, що становила 100 TCID<sub>50</sub>. Через 48 годин інкубування при 37 °C кількість життєздатних клітин визначали (поглинання за 570 нм вимірювали із застосуванням рідера для ELISA для 96-лункових 25 планшетів) за допомогою аналізу із застосуванням МТТ. Дані аналізували шляхом побудови графіка залежності між концентрацією зразка (мкг/мл) і розрахунковим % життєздатності клітин Vero (оброблених вірусом і контрольних), який дозволяє кількісно оцінити зміни в проліферації клітин. Протівірусну активність визначали згідно з наступною формулою:

$$30 \quad \text{Протівірусна активність} = \frac{(OD_T)_{HSV} - (ODC)_{HSV}}{(ODC)_{\text{mock}} - (ODC)_{HSV}} \times 100,$$

де:

(ODT)<sub>HSV</sub>: поглинання, виміряне за певної концентрації екстракту в клітинах, інфікованих HSV;

35 (ODC)<sub>HSV</sub>: стосується поглинання, виміряного стосовно контрольних необроблених клітин, інфікованих HSV; і

(ODC)<sub>mock</sub>: стосується поглинання, виміряного стосовно контрольних необроблених клітин з імітацією інфікування.

40 На основі цих даних було розраховано значення  $IC_{50}$  як концентрація, необхідна для інгібування половини максимального цитопатичного ефекту HSV-1 і HSV-2.

Результат: значення  $IC_{50}$  зразка 1 з прикладу 1 стосовно HSV-1 становило 15,48 мкг/мл; значення  $IC_{50}$  зразка 1 з прикладу 1 стосовно HSV-2 становило 17 мкг/мл.

#### Приклад 11

Аналіз цитотоксичності

Аналіз проводили, як описано в World J. Gastroenterol., 2006, 12:4078-4081, який включений у даний документ за допомогою посилання на описуваний у ньому спосіб.

Аналіз токсичності проводили для того, щоб оцінити, чи був який-небудь зі спостережуваних протівірусних ефектів результатом загального впливу на життєздатність клітин. Клітини Vero (отримані на етапі 1 з прикладу 8) для аналізів токсичності культивували в 96-лункових планшетах і обробляли екстрактами за тією ж схемою, яку застосовували для оцінок протівірусної активності без додавання вірусу. Життєздатні клітини аналізували із застосуванням барвника МТТ. Токсичні ефекти зразка 1 з прикладу 1 розраховували як відсоток зменшення числа життєздатних клітин за присутності екстракту рослини порівняно з числом життєздатних клітин, спостережуваним за відсутності екстракту рослини.

Застосовували наступну формулу:

$$\text{Цитотоксичність} = \frac{\{A(\text{екстракт}) - A(\text{контрольний розчин})\}}{\{A(\text{клітинний контроль}) - A(\text{контрольний розчин})\}} \times 100,$$

де А являє собою поглинання, виміряне на рідері для ELISA.

На основі цих даних розраховували концентрацію, за якої чинився цитотоксичний вплив на 50 % клітин (CC<sub>50</sub>).

Індекс селективності (SI), який також має назву терапевтичного індексу, оцінювали як співвідношення CC<sub>50</sub> і IC<sub>50</sub>, і отримані результати наведено в таблиці 5. Для того щоб визначити, чи має зразок 1 з прикладу 1 достатню протівірусну активність, яка перевищує його рівень токсичності, розраховували SI згідно з CC<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub>.

Для даного дослідження значення індексу SI >5 вважали ефективним для екстрактів. Отримані результати представлено в таблиці 4.

Таблиця 4

Зразок	*IC <sub>50</sub> (мкг/мл)	CC <sub>50</sub> (мкг/мл)	SI (CC <sub>50</sub> /IC <sub>50</sub> )
Зразок 1 з прикладу 1 (стосовно HSV-1)	15,48	483,33	31,2
Зразок 1 з прикладу 1 (стосовно HSV-2)	17	483,33	28,4

\* Значення IC<sub>50</sub> отримане з прикладу 10

#### Приклад 12

Оцінка ефекту зразка 23 з прикладу 4 стосовно реплікації HSV-1 і HSV-2 у різні моменти часу після інфікування

Метою даного дослідження було визначення стадії реплікації HSV-1/HSV-2, яка могла б блокуватися зразком 23 з прикладу 4. Потенційний протівірусний лікарський засіб може специфічно інгібувати та проявляти спрямовану дію стосовно цього вірусу на будь-якій стадії його реплікативного циклу, такий як адсорбція, злиття, скидання оболонки, зворотна транскрипція, інтеграція, синтез нуклеїнових кислот і дозрівання (Methods in Molecular Medicine, 1998, vol 10, 387-405). Ці стадії мали місце в різні моменти часу життєвого циклу вірусу, що охоплює період від 1 години - початок адсорбції - до 24 годин - завершення одного реплікативного циклу HSV. Стадія адсорбції в життєвому циклі вірусу являє собою початкове прикріплення вірусу герпесу до клітин-хазяїнів, що включає взаємодію gC і gD (консервативних глікопротеїнів), розташованих на поверхні вірусу, з рецепторами поверхні клітини, такими як гепаринсульфат. Стадія прикріплення в життєвому циклі вірусу являє собою стабільне прикріплення, що забезпечує тісний зв'язок вірусу із клітиною. Стадія життєвого циклу вірусу, що йде за стадіями адсорбції та прикріплення, відома як постінфекційна стадія.

Клітини Vero висівали на 96-лункові планшети із плоским дном за густини  $2,2 \times 10^4$  клітин/лунка в живильному середовищі DMEM з 10 % FBS. Через 20-24 години конфлюентні моношари інфікували з додаванням 100 мкл/лунка вірусу в розведенні  $1:10^4$  (клінічний штам HSV-1) (TCID<sub>50</sub>  $5,88 \times 10^6$ /мл) або HSV-2 у розведенні  $1:10^3$  (TCID<sub>50</sub>  $2,43 \times 10^6$ /мл), і планшети інкубували протягом 1 години за 37 °C і 5 % CO<sub>2</sub>. Готували двократні серійні розведення зразка 23 з прикладу 4 і ацикловіру в підтримувальному середовищі DMEM з 2 % FBS для отримання восьми концентрацій 3,125, 6,25, 12,5, 25, 50, 100, 200 і 400 мкг/мл, і по 100 мкл кожного розведеного розчину додавали в лунки в трьох повторностях через 0, 1, 3, 5, 7, 16 і 24 години після інфікування. В 0 годин зразок 23 з прикладу 4 і розведені розчини ацикловіру додавали одночасно з вірусом. Підтримувальне середовище додавали в лунки для вірусного контролю



(розведений розчин вірусу + підтримувальне середовище) і клітинного контролю (тільки підтримувальне середовище). Планшети додатково інкубували протягом 48-50 годин за 37°C. Після інкубування вміст планшета видаляли, а планшет промивали один раз за допомогою DMEM. У планшет додавали 100 мкл/лунка реактиву МТТ, розведеного в співвідношенні 1:10 у підтримувальному середовищі DMEM з 2 % FBS, та інкубували протягом 4 годин, допоки не ставав помітним пурпурний відтінок. Потім додавали по 100 мкл детергенту на лунку. Планшет залишали в інкубаторі на ніч за 37°C і 5 % CO<sub>2</sub>. Після закінчення інкубування кришку планшета знімали, та в кожній лунці вимірювали поглинання за 570 нм на планшет-рідері (BIO-TEK, Synergy HT).

Результати, отримані в дослідженнях, у які було залучено вірус простого герпесу HSV-1

- У момент часу 0 годин, який відповідає стадії адсорбції, за 50 мкг/мл спостерігали 52 % противірусну активність, за 100 мкг/мл - 77 %, а за 200 мкг/мл - 64 %.

- Через 1 годину після інфікування (p.i.), що відповідає стадії прикріплення, за 100 мкг/мл спостерігали 80 % противірусний ефект, а за 200 мкг/мл - 64 %.

- Через 3 години p.i., що відповідає початку реплікації, за 100 мкг/мл спостерігали 90 % противірусний ефект, а за 200 мкг/мл - 70 %.

- Через 5 годин p.i., що відповідає стадії синтезу ДНК вірусу HSV, за 100 мкг/мл спостерігали 83 % противірусний ефект, а за 200 мкг/мл - 68 %.

- Через 7 годин p.i., що відповідає пізнішим стадіям синтезу ДНК вірусу HSV, за 100 мкг/мл спостерігали 77 % противірусний ефект, а за 200 мкг/мл - 73 %.

- Через 16 годин p.i., що відповідає максимальній ефективності реплікації, при 100 мкг/мл спостерігали 75 % противірусний ефект і при 200 мкг/мл - 71 %.

- Через 24 години p.i., що відповідає стадії виходу віріона HSV (вивільнення зрілих віріонів з клітини-хазяїна після реплікації), за 100 мкг/мл спостерігали 36 % противірусний ефект, а за 200 мкг/мл - 37 %.

Ацикловір демонстрував сильний противірусний ефект стосовно HSV-1 за всіх концентрацій від 3,125 до 200 мкг/мл протягом 0-7 годин. Ця активність різко знижувалася до приблизно 17 % через 16-24 години, що відповідає пізнішим стадіям реплікації та виходу віріона. Таким чином, результати цього дослідження вказують на те, що ацикловір був неефективним на пізніших стадіях реплікації HSV-1.

Висновок: противірусна активність зразка 23 з прикладу 4 стосовно HSV-1, таким чином, досягала максимального значення через 3 години p.i. Ця активність була сильною від 0 до 16 годин p.i. та суттєво зменшувалася через 24 години p.i.

Результати, отримані в дослідженнях, у які було залучено вірус простого герпесу HSV-2

- У момент часу 0 годин, який відповідає стадії адсорбції, за 50 мкг/мл спостерігали 77 % противірусну активність, за 100 мкг/мл - 76 %, а за 200 мкг/мл - 51 %.

- Через 1 годину p.i., що відповідає стадії прикріплення, за 100 мкг/мл спостерігали 66 % противірусний ефект, а за 200 мкг/мл - 52 %.

- Через 3 години p.i., що відповідає початку реплікації, за 100 мкг/мл спостерігали 74 % противірусний ефект, а за 200 мкг/мл - 55 %.

- Через 5 годин p.i., що відповідає стадії синтезу ДНК вірусу HSV, за 100 мкг/мл спостерігали 79 % противірусний ефект, а за 200 мкг/мл - 63 %.

- Через 7 годин p.i., що відповідає пізнішим стадіям синтезу ДНК вірусу HSV, за 100 мкг/мл спостерігали 83 % противірусний ефект, а за 200 мкг/мл - 67 %.

- Через 16 годин p.i., що відповідає максимальній ефективності реплікації та початку вивільнення віріона, за 100 мкг/мл спостерігали 83 % противірусний ефект, а за 200 мкг/мл - 67 %.

- Через 24 години p.i. не спостерігали ніякого противірусного ефекту.

Ацикловір демонстрував сильний противірусний ефект стосовно HSV-2 за всіх концентрацій від 3,125 до 200 мкг/мл протягом 0-7 годин. Через 16-24 години p.i., що відповідає пізнішим стадіям реплікації та виходу віріона, ця активність була відсутня. Таким чином, результати цього дослідження вказують на те, що ацикловір був неефективним на пізніших стадіях реплікації HSV-2.

Висновок: противірусна активність зразка 23 з прикладу 4 стосовно HSV-2 досягала максимального значення через 7-16 годин p.i. Ця активність була сильною протягом 0-16 годин p.i.

Приклад 13

Оцінка противірусної активності зразка 23 з прикладу 4 стосовно вірусів простого герпесу, HSV-1 і HSV-2, до інфікування

Для того щоб віруси герпесу потрапили до клітини-мішені, повинно відбутися злиття ліпідної

мембрани оболонки вірусу з ліпідною мембраною клітини. Цей складний механізм проникнення вірусу відбувається за участю щонайменше трьох консервативних глікопротеїнів (gC, gB і gD) і опосередкований їхньою здатністю зв'язувати рецептори на поверхні клітин, такі як нектини та медіатор проникнення вірусу герпесу (HVEM) (Cell.Mol.Life Sci, 2008, 65, 1653-1668). Метою цього дослідження попередньої обробки було встановлення того, чи може зразок 23 з прикладу 4 викликати інгібування вірусу за рахунок взаємодії зі структурами оболонки віріона, такими як глікопротеїни, або рецепторами на поверхні клітини, наприклад, гепарансульфат (HS), які необхідні для адсорбції або проникнення в клітини Vero.

Клітини Vero висівали на 24-лункові планшети за густини  $1,8 \times 10^5$  клітин/лунка. Планшети інкубували протягом 20-24 годин за  $37^\circ\text{C}$  і 5 %  $\text{CO}_2$ . Серійні двократні розведення зразка 23 із прикладу 4 і ацикловіру, обидва в діапазоні концентрацій 3,125-400 мкг/мл, додавали у відповідні лунки (200 мкл/лунка) у двох повторностях та інкубували за  $37^\circ\text{C}$  і 5 %  $\text{CO}_2$  протягом 1 години. Через 1 годину ці розведення розчини відсмоктували, а клітини Vero один раз промивали PBS і потім інфікували з додаванням 200 мкл/лунка суспензії вірусу HSV-1 з титром  $2,1 \times 10^8$  БУО/мл або суспензії вірусу HSV-2 з титром  $1,65 \times 10^7$  БУО/мл. Планшети залишали для адсорбції вірусу на 1 годину за  $37^\circ\text{C}$  і 5 %  $\text{CO}_2$ , після чого їх промивали PBS. Потім у кожному лунку додавали по 1 мл покривного живильного середовища (1 % карбоксиметилцелюлоза + DMEM з 2 % FBS), і планшети додатково інкубували за  $37^\circ\text{C}$  і 5 %  $\text{CO}_2$  протягом 49 годин. Після закінчення інкубування планшети промивали 0,85 % фізіологічним розчином і забарвлювали 0,13 % розчином кристалічного фіолетового. Підраховували число вірусних бляшок, і розраховували значення  $\text{IC}_{50}$  для екстракту зразка 23 з прикладу 4.

#### Результат

На фігурі 3 проілюстровано значну інгібувальну активність зразка 23 з прикладу 4 за концентрації 200-400 мкг/мл, на що вказує 63-88 % інгібування HSV-1. Розрахункове значення  $\text{IC}_{50}$  для зразка 23 з прикладу 4 стосовно HSV-1 становило 171,25 мкг/мл. Спостережуваний інгібувальний ефект зразка 23 з прикладу 4 стосовно HSV-1 був сильним порівняно зі слабким інгібувальним ефектом, 10-40 %, який проявляв ацикловір у діапазоні концентрацій 3,125-400 мкг/мл.

На фігурі 4 проілюстровано 60-86 % інгібування HSV-2 зразком 23 з прикладу 4 за концентрації 200-400 мкг/мл. Розрахункове значення  $\text{IC}_{50}$  для зразка 23 з прикладу 4 стосовно HSV-2 становило 202,5 мкг/мл. Ацикловір у діапазоні концентрацій 3,125-400 мкг/мл проявляв слабкий інгібувальний ефект стосовно HSV-2, 10-20 %.

#### Висновок

Попередня обробка зразком 23 з прикладу 4 зумовила значне інгібування проникнення HSV-1 і HSV-2 до клітин Vero (інгібування адсорбції та прикріплення) відразу ж після контакту з вірусом, що вказує на профілактичний ефект. Цей інгібувальний ефект був значно сильнішим, ніж в ацикловіру.

#### Приклад 14

##### Аналіз адсорбції вірусу

Потенційні противірусні лікарські засоби-кандидати можуть націлюватися на різні етапи життєвого циклу вірусу, такі як адсорбція, злиття, скидання оболонки, зворотна транскрипція, інтеграція, синтез нуклеїнових кислот і дозрівання. Результати аналізу адсорбції, таким чином, зможуть допомогти у визначенні надійності зразка 23 з прикладу 4 щодо інгібування HSV-1 або HSV-2 на стадії адсорбції їх циклу інфікування, де глікопротеїн C (gC) і глікопротеїн D (gD), розташовані на поверхні вірусу, взаємодіють із рецепторами-глікозаміногліканами (GAG) на поверхні клітини, такими як гепарансульфат (HS).

Клітини Vero висівали на 24-лункові планшети із плоским дном за концентрації  $1,8 \times 10^5$  клітин/лунка. Планшети інкубували протягом 20-24 годин за  $37^\circ\text{C}$  і 5 %  $\text{CO}_2$  до утворення конфлюентних моношарів. Двократні серійні розведення зразка 23 з прикладу 4 та ацикловіру готували для отримання концентрацій у діапазоні від 3,125 до 400 мкг/мл. Готували суспензію вірусу HSV-1 з концентрацією  $2,1 \times 10^8$  БУО/мл або HSV-2 з концентрацією  $1,65 \times 10^7$  БУО/мл. Рівні об'єми кожного розведеного розчину зразка 23 із прикладу 4/ацикловіру та суспензії вірусу HSV-1/HSV-2 поміщали в стерильні пробірки типу "Епендорф", та інкубували склади за  $37^\circ\text{C}$  протягом 1 години. Згодом до моношарів клітин Vero додавали 200 мкл цих сумішей, щоб забезпечити адсорбцію вірусу за присутності екстракту протягом 1 години за  $37^\circ\text{C}$  і 5 %  $\text{CO}_2$ . Після цього планшети один раз промивали PBS для видалення неприкріплених вірусів, і в кожному лунку додавали 1 мл покривного живильного середовища (1 % карбоксиметилцелюлоза; СМС), приготовленого в підтримувальному середовищі DMEM з 2 % FBS. Після додаткового інкубування протягом 49 годин за  $37^\circ\text{C}$  і 5 %  $\text{CO}_2$  за постійного спостереження планшети промивали 0,85 % фізіологічним розчином і забарвлювали 0,13 % розчином кристалічного

фіолетового. Підраховували число вірусних бляшок, і розраховували значення  $IC_{50}$ .

#### Результат

На фігурі 5 показано, що зразок 23 з прикладу 4 міг викликати 100 % інгібування адсорбції вірусу HSV-1 за концентрації 100-400 мкг/мл, яке зменшується до 65 % за концентрації 50 мкг/мл. Значення  $IC_{50}$  для зразка 23 з прикладу 4 стосовно HSV-1 становило 44 мкг/мл.

На фігурі 6 показано 100 % інгібування адсорбції вірусу HSV-2 зразком 23 з прикладу 4 за концентрації 50-400 мкг/мл, яке зменшується до 92 % за концентрації 25 мкг/мл.

Значення  $IC_{50}$  для зразка 23 із прикладу 4 стосовно HSV-2 становило 15 мкг/мл.

Активність зразка 23 з прикладу 4 стосовно HSV-1 і HSV-2 була дещо кращою за активність ацикловіру. Зразок 23 з прикладу 4 був ефективним, коли був присутнім як до, так і під час фази адсорбції вірусної інфекції HSV-1 і HSV-2 у діапазоні концентрацій 50-400 мкг/мл, і не проявляв за цих концентрацій цитотоксичної дії, оцінюваної за допомогою мікроскопії.

#### Приклад 15

##### Аналіз проникнення вірусу

Проникнення HSV до клітин-хазяїнів може бути визначено як етап, який іде за початковим зв'язуванням з поверхнею клітини-хазяїна, що запускає злиття оболонки віріона з плазматичною мембраною. Це вимагає багаторазових взаємодій, які відбуваються подібно до каскаду, за участю різних глікопротеїнів (gB, gD і gH/gL) і компонентів поверхні клітин (Cell.Mol.Life Sci, 2008, 65, 1653-1668). Метою аналізу проникнення вірусу було встановлення в умовах *in vitro* того, чи буде зразок 23 із прикладу 4 інгібувати проникнення вірусів HSV-1 і HSV-2 у клітини Vero.

Клітини Vero висівали на 24-лункові планшети за густини  $1,8 \times 10^5$  клітин/лунка. Планшети інкубували протягом 20-24 годин за  $37^{\circ}C$  і 5 %  $CO_2$ . Планшети з конфлюентним моношаром приблизно за півгодини до початку експерименту поміщали в умови з температурою  $4^{\circ}C$ , щоб дозволити клітинам Vero акліматизуватися до умов низької температури, оскільки наступні етапи проводили за  $4^{\circ}C$ . Готували суспензію вірусу HSV-1 з титром  $2,1 \times 10^8$  БУО/мл або вірусу HSV-2 з титром  $1,65 \times 10^7$  БУО/мл і додавали 200 мкл до конфлюентних моношарів. Клітини інкубували за  $4^{\circ}C$  протягом 2 годин, щоб забезпечити прикріплення вірусу. Серійні дворазові розведення зразка 23 з прикладу 4 та ацикловіру, обидва в діапазоні концентрацій від 3,125 до 400 мкг/мл, додавали у відповідні лунки за кімнатної температури, та планшети інкубували за  $37^{\circ}C$  і 5 %  $CO_2$  протягом 10 хвилин. Розведені розчини зразка 23 з прикладу 4 та ацикловіру потім відсмоктували, а моношар клітин швидко промивали PBS (pH 3,75), щоб інактивувати віріони, які не проникли до клітин. Після цього клітини промивали PBS (pH 11,0), щоб нейтралізувати оточення з кислим pH. Потім у кожну лунку додавали 1 мл покривного живильного середовища (1 % СМС у підтримувальному середовищі DMEM з 2 % FBS), та планшети інкубували за  $37^{\circ}C$  протягом 48-50 годин. Після цього планшети промивали 0,85 % фізіологічним розчином і забарвлювали 0,13 % розчином кристалічного фіолетового. Підраховували число бляшок, і розраховували значення  $IC_{50}$  для зразка 23 з прикладу 4.

#### Результат

На фігурі 7 продемонстровано 80-95 % інгібування вірусу HSV-1 зразком 23 з прикладу 4 за концентрацій від 50 до 400 мкг/мл, яке зменшується за нижчих концентрацій (3,125-25 мкг/мл). Розрахункове значення  $IC_{50}$  для зразка 23 з прикладу 4 стосовно вірусу HSV-1 становить 30 мкг/мл.

На фігурі 8 продемонстровано 100 % інгібування вірусу HSV-2 зразком 23 з прикладу 4 за концентрацій від 200 до 400 мкг/мл, яке зменшується до 90 % за концентрації 100 мкг/мл і до 71 % за концентрації 50 мкг/мл. Розрахункове значення  $IC_{50}$  для зразка 23 з прикладу 4 стосовно вірусу HSV-2 становить 36,1 мкг/мл.

Ацикловір порівняно зі зразком 23 з прикладу 4 показав інгібувальну активність стосовно HSV-1 і HSV-2 від слабкої до середньої.

#### Висновок

Результати вказують на те, що зразок 23 з прикладу 4 міг суттєво інгібувати проникнення вірусу HSV-1 і HSV-2 до клітин Vero порівняно з ацикловіром, який несилю інгібував етап проникнення вірусу HSV-1 і HSV-2 до клітин-хазяїнів Vero.

#### Приклад 16

##### Оцінка віруліцидної активності зразка 23 з прикладу 4 стосовно HSV-1 і HSV-2

В аналізі віруліцидної активності часто потрібною є тривала присутність протівірусного лікарського засобу для блокування інфекційності вірусної частинки стосовно культивованих клітин, при цьому розведений розчин комплексів вірус-екстракт може дисоціювати, вивільняючи вірус, який має здатність до інфікування (Antiviral research, 2010, 86, 196-203). Якщо зразок не може знизити інфекційність вірусу за  $IC_{50}$  або за інших ефективних концентрацій, тоді протівірусна активність не пов'язана з його віруліцидною здатністю. Метою даного дослідження

було оцінювання в умовах *in vitro* того, чи пов'язана інгібувальна активність зразка 23 з прикладу 4 стосовно HSV-1 і HSV-2 з його противірусним ефектом або з віруліцидним ефектом.

Клітини Vero висівали на 24-лункові планшети із плоским дном за концентрації  $1,8 \times 10^5$  клітин/лунка. Планшети інкубували протягом 20-24 годин за 37 °C і 5 % CO<sub>2</sub>. Двократні серійні розведення зразка 23 з прикладу 4 і ацикловіру готували для отримання концентрацій у діапазоні від 25 до 400 мкг/мл. Готували суспензію вірусу HSV-1 з концентрацією приблизно  $10^{10}$  БУО/мл і HSV-2 з концентрацією  $10^9$  БУО/мл. Рівні об'єми кожного розведеного розчину зразка 23 з прикладу 4/ацикловіру та суспензії вірусу HSV-1/HSV-2 поміщали в стерильні пробірки типу "Епендорф", та суміші інкубували за 37 °C протягом 1 години. Ці суміші згодом розводили вдсятеро (1:100) з отриманням кінцевої концентрації в діапазоні від 0,25 до 4 мкг/мл, що відповідає 25-400 мкг/мл. Після цього до моношарів клітин Vero додавали по 200 мкл цих сумішей, щоб забезпечити абсорбцію вірусу протягом 1 години за 37 °C і 5 % CO<sub>2</sub>. Планшети згодом промивали один раз PBS для видалення незв'язаних вірусів, і в кожну лунку додавали по 1 мл покривного живильного середовища (1 % карбоксиметилцелюлоза, СМС), приготованого в підтримувальному середовищі DMEM з 2 % FBS. Після додаткового інкубування протягом 48-50 годин за 37 °C і 5 % CO<sub>2</sub> планшети промивали 0,85 % фізіологічним розчином і забарвлювали 0,13 % розчином кристалічного фіолетового. Згодом підраховували число вірусних бляшок.

#### Результат

На фігурі 9 показано 100 % віруліцидний ефект зразка 23 з прикладу 4 стосовно HSV-1 за концентрацій від 200 до 400 мкг/мл та 94 % інгібування за концентрації 100 мкг/мл. Ацикловір стосовно HSV-1 у діапазоні концентрацій від 25 до 400 мкг/мл показав слабкий віруліцидний ефект у межах 0-32 %.

На фігурі 10 показано 100 % віруліцидний ефект зразка 23 з прикладу 4 стосовно HSV-2 за концентрації 400 мкг/мл та 92-97 % інгібування за концентрації 50-200 мкг/мл. Ацикловір стосовно HSV-2 у діапазоні концентрацій від 25 до 400 мкг/мл показав слабкий віруліцидний ефект у межах 11-38 %.

#### Висновок

Зразок 23 з прикладу 4 порівняно з ацикловіром проявляв сильний віруліцидний ефект стосовно вірусів HSV-1 і HSV-2.

#### Аналіз противірусної активності *in vivo*

Утримання тварин, яких використовували в експериментах, і догляд за ними проводили відповідно до чинних норм, опублікованих CPCSEA (Комітет з контролю та нагляду за експериментами на тваринах), Таміл Наду, Індія. Способи із застосуванням лабораторних тварин були затверджені ICAE (Комітет з формування етики стосовно тварин) з Piramal Healthcare Limited, Горегаон, Мумбай, Індія.

#### Приклад 17

Модель герпетичного поширення інфекції, спричинюваної HSV-1, у мишей

Аналіз проводили, як описано в Antimicrobial Agents and Chemotherapy, червень 2002 р., стор. 1766-1772, який включений у даний документ за допомогою посилання на описуваний у ньому спосіб.

Для дослідження використовували самиць мишей лінії Balb/c у віці від 6 до 8 тижнів, не вагітних та які раніше не народжували. Усім тваринам голили праву середню частину спини за допомогою електричної машинки для стрижки волосся, після чого безпосередньо перед контрольним зараженням вірусом на виголеній ділянці робили декілька горизонтальних скарифікацій стерильною голкою з розміром 26.

Перед контрольним зараженням вірусом скарифіковану ділянку шкіри кожної миші протирали ватним тампоном, змоченим у 70 % спирті, а згодом ділянку обробляли ватним тампоном, змоченим у стерильному DMEM. Потім мишей інфікували крізь скарифіковану ділянку вірусом HSV-1 з титром  $8,27 \times 10^3$  БУО/тварина. Тварини отримували склад ІА, склад ІВ, склад ІС/ацикловір/плацебо шляхом місцевого застосування до вогнища інфекції через 1 годину після інфікування. Тварин обробляли тричі на день з інтервалом обробки 4 години. Усіх тварин в усіх групах обробляли протягом 5 днів. Тварини, що отримували плацебо (кремова основа) та ацикловір (225 мг/кг/день), слугували як контрольні, а тварин з групи вірусного контролю не обробляли.

Оцінювали наступні склади, які описані в прикладі 6:

(а) склад ІА;

(b) склад ІВ;

(c) склад ІС.

Склад ІА, склад ІВ і склад ІС застосовували місцево тричі на день протягом 5-денного

періоду. Дозі 225 мг/кг відповідає 15 мг складу ІА; дозі 450 мг/кг відповідає 15 мг складу ІВ; дозі 675 мг/кг відповідає 15 мг складу ІС, і дозі 750 мг/кг відповідає 25 мг складу ІВ, що оцінювали на тваринах.

5 Тварин щодня, протягом періоду 21 днів після інфікування, оглядали щодо захворюваності, смертності та зовнішнього вигляду вогнища інфекції.

Тяжкість вірусного захворювання (екстравагінальні ознаки захворювання) визначали кількісно із застосуванням загальноприйнятої шкали оцінки ураження наступним чином:

0: відсутність явних ознак інфекції;

1: утворення пухирців;

10 2: утворення великих ділянок оперізувального лишая;

3: злиті сегменти оперізувального лишая;

4: параліч задніх кінцівок.

Герпетиформні ураження належать до стрічкоподібних однобічних уражень шкіри, локалізованих уздовж хребта або гілок трійчастих нервів.

15 Спостереження

У тварин з усіх груп, що отримували різні дози, ранні ознаки герпетиформних уражень з'являлися до дня 2 після інфікування.

1 Група, яку обробляли плацебо:

(а) тяжкі прояви інфекції починалися у тварин до дня 6 після інфікування;

20 (b) усі миші загинули до дня 8 після інфікування.

2 Група, яку обробляли ацикловіром:

(а) усі миші видужали від герпетиформних уражень до дня 7 після інфікування;

(b) під час експерименту не загинула жодна миша.

3 Група, яку залишили без обробки (інфекційний контроль):

25 (а) тяжкі прояви інфекції починалися у тварин до дня 6 після інфікування;

(b) усі миші загинули до дня 10 після інфікування.

4 Група, яку обробляли складом ІВ (750 мг/кг/день):

(а) миші, яких обробляли складом ІВ (750 мг/кг/день), показали виживаність 90 %;

30 (b) тварини, що вижили, видужали від герпетиформних уражень до дня 9 після інфікування.

5 Група, яку обробляли складом ІС (675 мг/кг/день):

(а) миші, яких обробляли складом ІС за дози 675 мг/кг/день, показали виживаність 80 %;

(b) тварини, що вижили, видужали від герпетиформних уражень до дня 10 після інфікування.

6 Група, яку обробляли складом ІВ (450 мг/кг/день):

35 (а) миші, яких обробляли складом ІВ за дози 450 мг/кг/день, показали виживаність 60 %;

(b) тварини, що вижили, видужали від герпетиформних уражень до дня 10 після інфікування.

7 Група, яку обробляли складом ІА (225 мг/кг/день):

(а) миші, яких обробляли складом ІА за дози 225 мг/кг/день, показали виживаність 20 %, при цьому більшість випадків летального кінця припала на день 8 після інфікування;

(b) тварини, що вижили, видужали від герпетиформних уражень до дня 9 після інфікування.

40 Результат: склад ІВ і склад ІС проявляли добру противірусну активність за вищих концентрацій, 750 і 675 мг/кг/день, у моделі герпетиформного поширення інфекції, спричинюваної HSV-1, у мишей.

Приклад 18

Модель вагінального поширення інфекції, спричинюваної HSV-2, у мишей

45 Аналіз проводили, як описано в Antiviral Research, 2006, 69:77-85, який включений у даний документ за допомогою посилання на описуваний у ньому спосіб.

Для дослідження використовували самиць мишей лінії Balb/c у віці від 6 до 8 тижнів, не вагітних та які раніше не народжували. Самиць мишей лінії Balb/c використовували для вагінального зараження HSV-2. За п'ять днів до інтравагінального (IVAG) контрольного зараження мишам у верхню частину спини підшкірно ін'єктували 2 мг прогестерону (Деро-Провера®; Pfizer, Бельгія), застосовуючи голку з розміром 29. У день контрольного зараження мишей інтравагінально заражали вірусом HSV-2 з титром  $1,14 \times 10^5$  БУО. IVAG-уведення вірусу робили за допомогою мікропіпетки із загальним об'ємом DMEM 20 мкл. Через 30 хвилин після зараження тварини інтравагінально отримували склад ІА, склад ІВ, склад ІС/ацикловір/плацебо шляхом місцевого застосування. Тварин обробляли тричі на день з інтервалом обробки 4 години. Усіх тварин у всіх групах обробляли протягом 5 днів. Обробку ацикловіром (225 мг/кг/день) проводили як позитивний контроль. Плацебо-контроль включав тварин, які отримували основу для крему (плацебо) у ті самі моменти часу, а тварини з групи вірусного контролю не отримували ніякої обробки.

60 Оцінювали наступні склади, які описані в прикладі 6:

- (a) склад IA;
- (b) склад IB;
- (c) склад IC.

Склад IA, склад IB і склад IC наносили місцево три рази на день протягом 5-денного періоду. Дозі 225 мг/кг відповідає 15 мг складу IA; дозі 450 мг/кг відповідає 15 мг складу IB, і дозі 675 мг/кг відповідає 15 мг складу IC, що оцінювали на тваринах.

Тварин щодня, протягом періоду 21 днів після інфікування, оглядали щодо екстравагінальних ознак захворювання, та оцінювали їх виживаність.

Тяжкість вірусного захворювання (екстравагінальні ознаки захворювання) оцінювали кількісно із застосуванням загальноприйнятої шкали оцінки ураження таким чином:

0: відсутність явних ознак інфекції;

1: невелика кількість окремих пухирців і легке почервоніння тканини в екстравагінальній зоні;

2: невелика кількість окремих пухирців, виразок та/або струпів та/або припухлість і почервоніння тканини в екстравагінальній зоні;

3: численні виразки/струпи, що злилися, середній ступінь припухлості та почервоніння тканини в екстравагінальній зоні з поширенням на прилеглі тканини;

4: виразкування із сильним почервонінням і припухлістю тканини в екстравагінальній зоні з поширенням на прилеглі тканини, параліч задніх лап.

Спостереження

1 Група, яку обробляли плацебо:

(a) найраніші ознаки екстравагінальної інфекції проявлялися на день 7;

(b) 90 % мишей загинули до дня 14.

2 Група, яку обробляли ацикловіром:

(a) в жодній миші не спостерігали ознаки екстравагінального захворювання;

(b) під час експерименту не загинула жодна миша.

3 Група, яку обробляли складом IA (225 мг/кг/день):

(a) миші, яких обробляли складом IA за дози 225 мг/кг/день, показали виживаність 90 %;

(b) в однієї з десяти мишей виявили прояви клінічних уражень до дня 8 після інфікування, при цьому пізніше ця тварина загинула; усі інші тварини в ході експерименту не проявляли ніяких характерних ознак індукованого вірусом екстравагінального захворювання в будь-який момент часу.

4 Група, яку обробляли складом IB (450 мг/кг/день):

(a) миші, яких обробляли екстрактом складу IB за дози 450 мг/кг/день, показали виживаність 90 %;

(b) у двох з десяти мишей виявили прояви клінічних уражень до дня 14 після інфікування, при цьому одна з цих тварин пізніше загинула; усі інші тварини в ході експерименту не проявляли ніяких характерних ознак індукованого вірусом екстравагінального захворювання в будь-який момент часу.

5 Група, яку обробляли складом IC (675 мг/кг/день):

(a) в жодній з мишей не виявили ознак екстравагінального захворювання;

(b) під час експерименту жодна миша не загинула.

Результат: склад IA, склад IB і склад IC проявляли противірусну активність за концентрацій 225, 450 і 675 мг/кг/день у вагінальній моделі інфекції, спричинюваної HSV-2, у мишей.

#### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Виділений екстракт із стовбура або кори, або гілок, або стовбура з корою рослини *Ficus arnottiana*, отриманий шляхом перемішування стовбура або кори, або гілок, або стовбура з корою рослини з розчинником, що вибраний із метанолу, етанолу, н-пропанолу, ізопропанолу, н-бутанолу, ацетону, дихлорметану або води, або їх суміші, у співвідношенні від 1:8 до 1:10 вага/об'єм протягом 3-12 годин при 30-50 °C з наступним концентруванням екстракту та додатковим збагаченням екстракту шляхом розділення розчинником, для попередження або лікування вірусної інфекції, спричинюваної вірусом простого герпесу.

2. Композиція, яка містить терапевтично ефективну кількість отриманого за п. 1 виділеного екстракту стовбура або кори, або гілок, або стовбура з корою рослини *Ficus arnottiana* і фармацевтично прийнятний носій, для попередження або лікування вірусної інфекції, спричинюваної вірусом простого герпесу.

3. Композиція за п. 2, де екстракт рослини *Ficus arnottiana* отриманий зі стовбура рослини.

4. Композиція за п. 2, де екстракт рослини *Ficus arnottiana* отриманий з кори рослини.

5. Композиція за п. 2, де екстракт рослини *Ficus arnottiana* отриманий з гілок рослини.

6. Композиція за п. 2, де екстракт рослини *Ficus arnottiana* містить флоридин та 5,7,4'-тригідроксифлавіон як біологічно активні маркери.

7. Композиція за п. 2, де композиція складена для перорального або місцевого застосування.

8. Композиція за п. 7, де композиція містить від 5 % до 50 % (вага/вага) екстракту рослини *Ficus arnottiana*.

9. Спосіб отримання композиції за п. 2, що включає етапи, на яких:

(а) отримують екстракт із стовбура або кори, або гілок, або стовбура з корою рослини *Ficus arnottiana* шляхом перемішування з розчинником, що вибраний із метанолу, етанолу, н-пропанолу, ізопропанолу, н-бутанолу, ацетону, дихлорметану або води, або їх суміші у співвідношенні від 1:8 до 1:10 вага/об'єм протягом 3-12 годин при 30-50 °С,

(b) концентрують екстракт, отриманий на етапі (а);

(с) додатково висушують екстракт, отриманий на етапі (b), під дією високого вакууму (0,01-5 мм рт. ст.),

(d) додатково збагачують екстракт, отриманий на етапі (b) або етапі (с), шляхом розділення розчинником, і

(е) змішують екстракти, отримані на етапі (b), етапі (с) або етапі (d), з фармацевтично прийнятним носієм та складають у терапевтичні лікарські форми.

10. Спосіб за п. 9, де розчинник, застосовуваний на етапі (а), вибирають з метанолу, етанолу, н-пропанолу, ізопропанолу, н-бутанолу, ацетону, дихлорметану, або води, або їх суміші.

11. Спосіб за п. 10, де розчинником є суміш метанолу та води.

12. Спосіб за п. 9, де на етапі (d) розчинник, застосовуваний для розділення, вибирають з води, дихлорметану, метанолу, ацетону, ацетонітрилу, н-пропанолу, ізопропанолу, або бутанолу, або їх суміші.

13. Застосування композиції, яка містить терапевтично ефективну кількість виділеного екстракту стовбура або кори, або гілок, або стовбура з корою рослини *Ficus arnottiana* за п. 1, для попередження або лікування вірусної інфекції, спричинюваної вірусом простого герпесу (HSV).

14. Застосування за п. 13, де HSV являє собою HSV-1.

15. Застосування за п. 13, де HSV являє собою HSV-2.

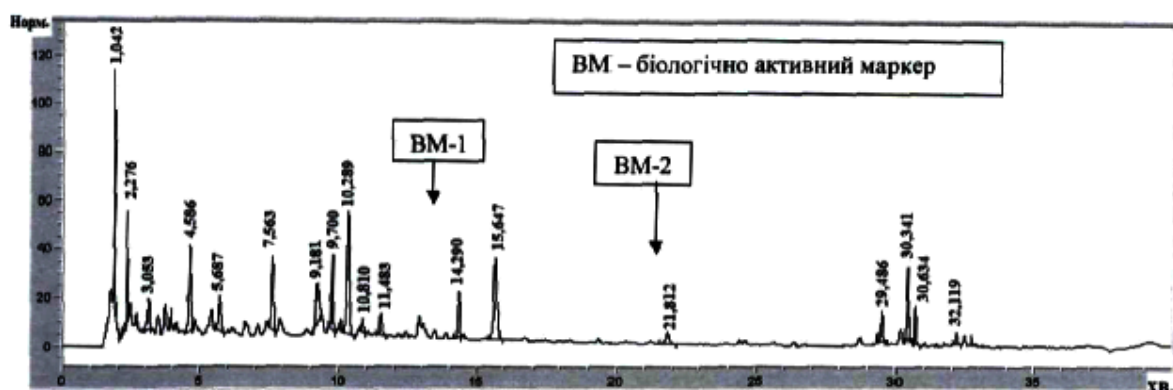
16. Застосування виділеного екстракту стовбура або кори, або гілок, або стовбура з корою рослини *Ficus amottiana* за п. 1 і фармацевтично прийнятного носія для виробництва лікарського препарату для попередження або лікування вірусної інфекції, спричинюваної вірусом простого герпесу (HSV).

17. Застосування за п. 16, де екстракт рослини *Ficus amottiana* містить флоридин та 5,7,4'-тригідроксифлавіон як біологічно активні маркери.

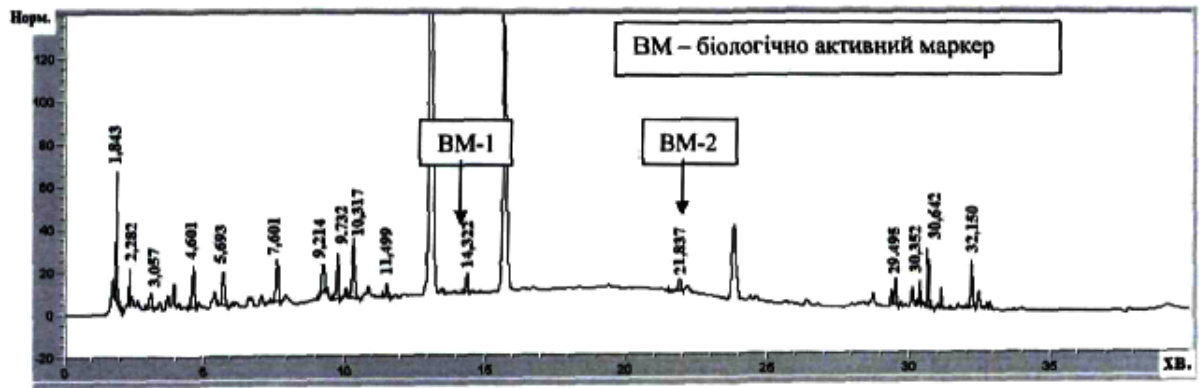
18. Застосування за п. 16, де лікарський препарат містить від 5 % до 50 % (вага/вага) екстракту рослини *Ficus amottiana*.

19. Застосування за п. 16, де HSV являє собою HSV-1.

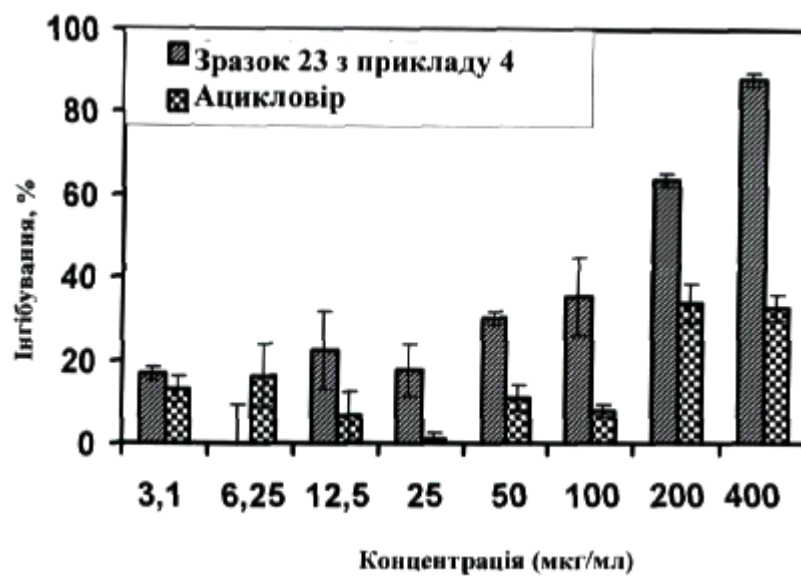
20. Застосування за п. 16, де HSV являє собою HSV-2.



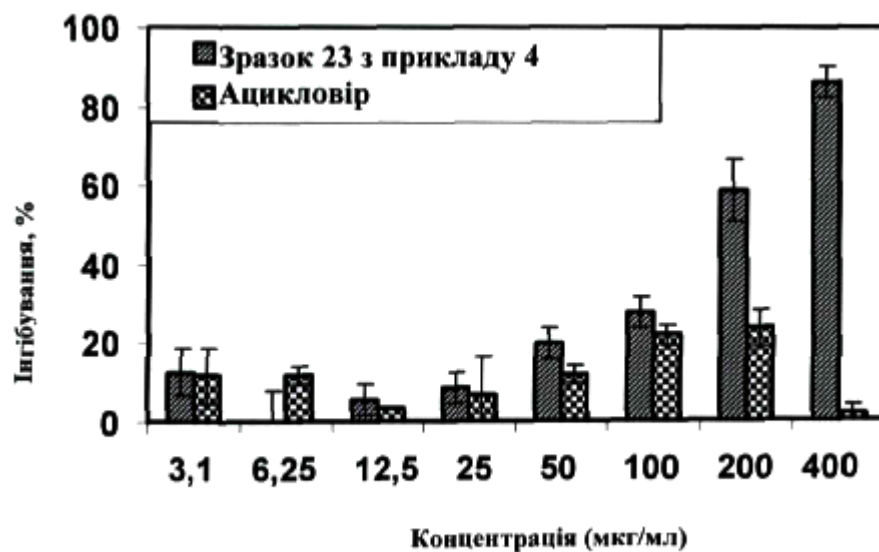
Фігура 1



Фігура 2

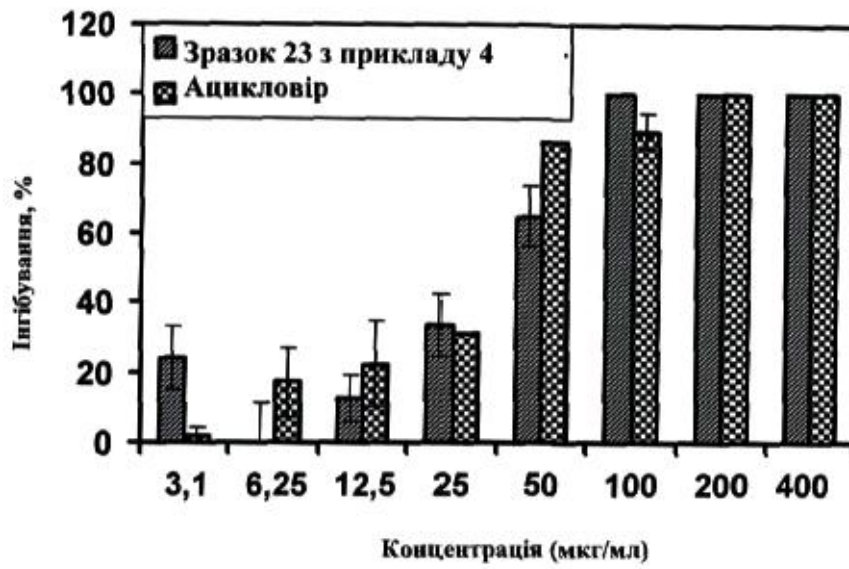


Фігура 3

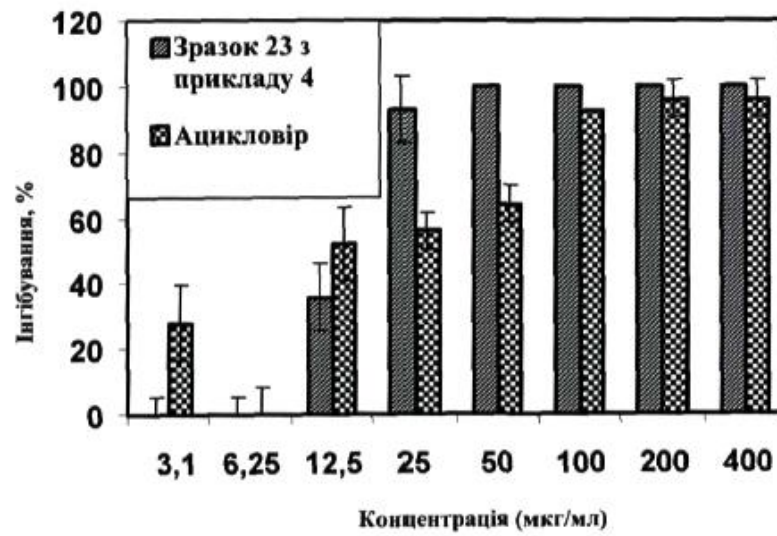


Фігура 4

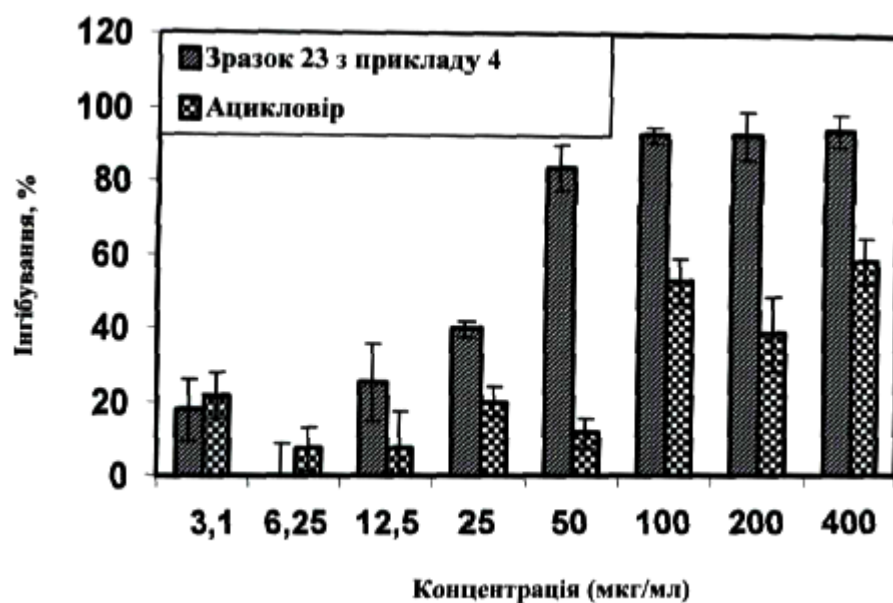




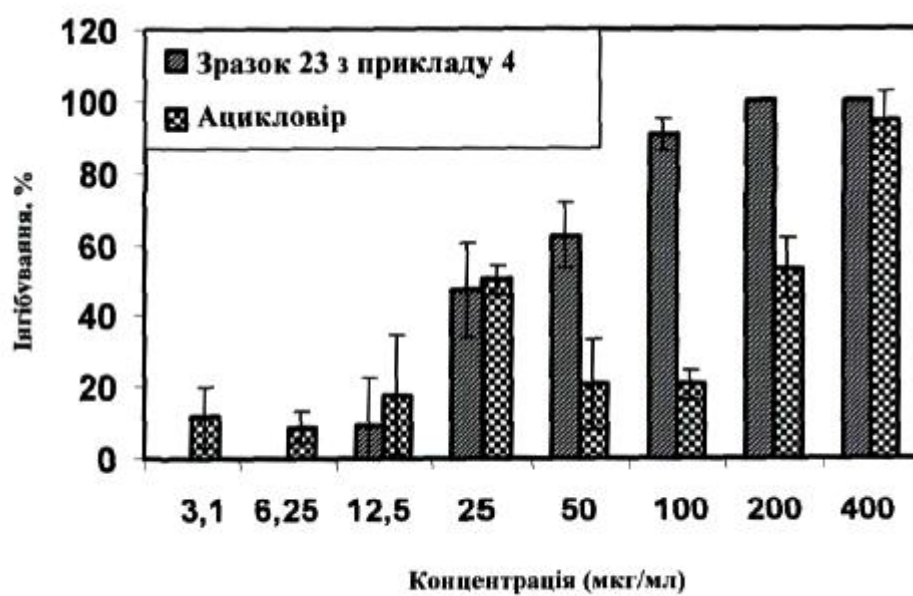
Фігура 5



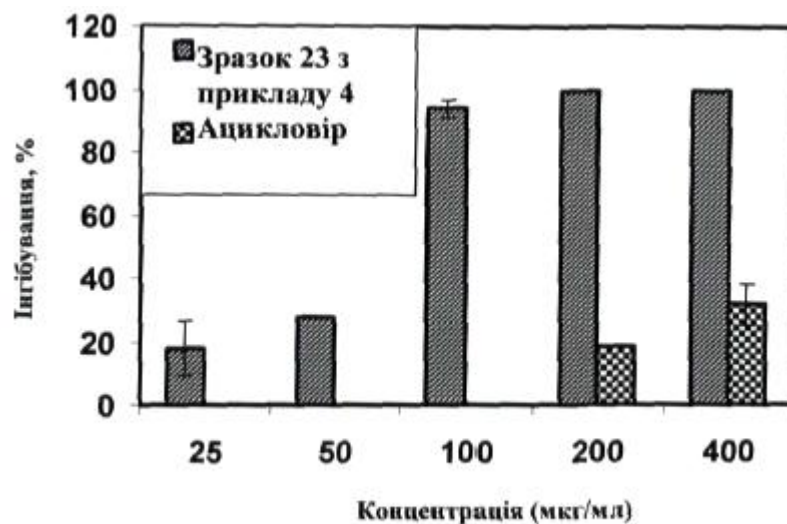
Фігура 6



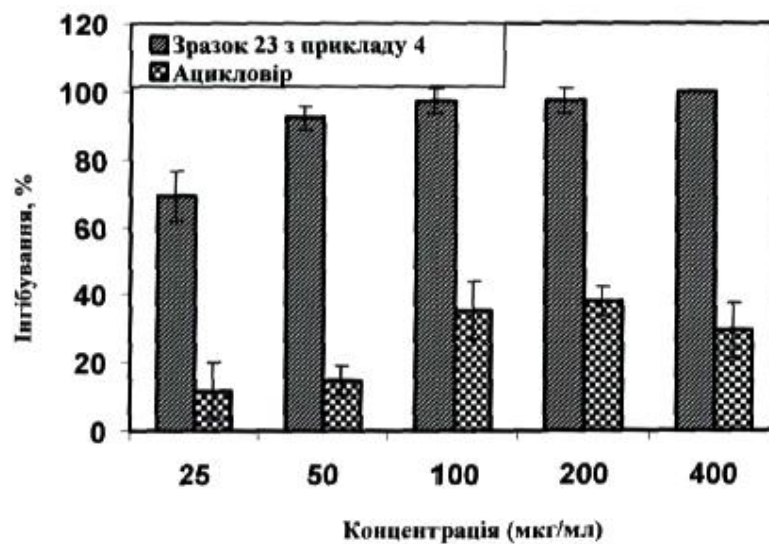
Фігура 7



Фігура 8



Фігура 9



Фігура 10

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601