

Представлений винахід стосується фармацевтичної антивірусної композиції, що включає гліциризинову кислоту і принаймні один білок, який проявляє антивірусну активність.

Відомо, що вірус Herpes simplex типу 1 є причиною лицьових і ротоглоткових ушкоджень ("Manual of Clinical Microbiology", Murray, Baron, Pfaller, Tenover, Tenover, Yolken, 6-е видання, -С.876-883. American Society for Microbiology, Washington D.C., 1993). У минулому інфекції вірусу Herpes simplex типу 1 лікували відарабіном (Goodman & Gilman, "Le basi farmacologiche della terapia", Zanichelli, Bologna, 7-е видання, -С.1156, 1991), але потім через його токсичність майже повністю перейшли на ацикловір (Goodman & Gilman, "The Pharmacological Basis of Therapeutics", McGraw Hill Companies, 9-е видання, гл. 50, -С.1193, 1996; "Am. J. Med.", 73. Suppl., 186-192. 1982, та "Clin. Pharmacokinet.", 8,187-201, 1983).

Таким чином, в даний час, ацикловір є найбільш використовуваним лікарським засобом при лікуванні ротових та губних ушкоджень (висипання від лихоманки), але його місцеве використання часто заподіює печіння і подразнення слизових оболонок. Крім того, ацикловір є досить ефективним при застосуванні під час першої інфекції, але не дуже ефективний у випадку повторних інфекцій, тобто він не виліковує і не запобігає повторній інфекції вірусом Herpes simplex типу 1.

Крім того, оральне лікування має такі недоліки як виникнення побічних ефектів, таких як нудота, діарея, свербіння, головний біль, ниркова недостатність та нефротоксичність.

Тому залишається реальна потреба в лікарському засобі, що є активним при лікуванні інфекції вірусу Herpes simplex типу 1 навіть у випадку повторних інфекцій і є позбавленим побічних ефектів.

Також було відомо, що гліциризинова кислота має певну антивірусну активність. В антивірусних дозах вона в значній мірі інгібує синтез вірусних глікопротеїнів, і тільки в дуже високих дозах вона також інгібує синтез клітинних глікопротеїнів. Фактично, у той час як вплив гліциризинової кислоти на синтез білків, як у нормальних так і в інфікованих клітинах, є практично непомітним навіть у дозах 4мМ, синтез глікопротеїнів суттєво відрізняється в нормальних і інфікованих клітинах. Фактично, при концентрації 0,5мМ (що інгібує 50% вірусної реплікації) гліциризинова кислота призводить до зменшення включення глюкозаміну-Н<sup>3</sup> більше ніж на 10% в інфікованих клітинах, при цьому у нормальних клітинах ніякого інгібування не спостерігається. Збільшена до 1мМ концентрація гліциризинової кислоти призводить до 80% зменшення кількості вірусу, не спостерігається ніякого інгібування синтезу глікопротеїнів у контрольних зразках і скорочення на 20% синтезу глікопротеїнів в інфікованих клітинах. При 4мМ, синтез глікопротеїнів у нормальних клітинах також трохи порушується, але розмноження вірусу інгібується на 99% ("L'Igiene Moderna", Pompei R. and Marcialis MA, 83, 385-391, 1985).

Крім того, в таблиці А наведено результати досліджень з обробкою клітин, інфікованих HSV1, гліциризиною кислотою в концентрації 8мМ. Інфіковані клітини зберігалися в контакт з гліциризиною кислотою протягом 2 годин при 37°C. Експериментальні результати, наведені в таблиці показують, що існує істотне зменшення інфекції через 12, 17 і 22 години, і що клітини зберігають свою цілісність. Інгібування становить приблизно 2 логарифми через 12 годин після інфікування і 3 логарифми (99.9%) через 22 години після інфікування ("Nature", Pompei R. et al., 281. No. 5733, 689-690, 1979).

Таблиця А

Синтез вірусів (БУО\*/мл) по годинах

Години	12	17	22
Контроль	3x10 <sup>6</sup>	5,4x10 <sup>6</sup>	2,6x10 <sup>7</sup>
Гліциризинова кислота, 8 мМ	4,2x10 <sup>4</sup>	1,2 x10 <sup>4</sup>	1,1x10 <sup>4</sup>

\*БУО = бляшкоутворююча одиниця вірусу.

Також з літератури відомо про антивірусну активність, зокрема, антигерпетичну (HSV1) активність різних типів лізоцимів, таких як лізоцим індики, лізоцим людини, лізоцим курчати, денатурований (дезактивований нагріванням) лізоцим курчати і лізоцим курчати, перетравлений трипсином ("Current Microbiology", Cisani et al., 10. 35-40, 1984).

Лізоцими фактично є ферментами, що широко поширені в природі і допомагають захисту організму проти деяких інфекційних чинників, призводячи або допомагаючи їхньому розщепленню (тобто лізису) ("Mol. Cell. Biochem.", Jolles et al., 63. 165-189, 1984; "Anticancer Res.", Save et al., 9, 583-592. 1989).

Крім того, у літературі описано антивірусну активність і, зокрема, антигерпетичну (HSV1) активність лактоферину (Fujihara T. and Hayashi H. "Лактоферин inhibits herpes simplex virus type 1 (HSV1) infection to mouse cornea", "Arch. Virol.", 140. 1469-1472, 1995; Hamnsen MC. et al. "Antiviral effects of plasma and milk protein: лактоферин shows potent activity against both human immunodeficiency virus and human cytomegalovirus replication in vitro", "J. int. Dis.", 172.380-388, 1994).

Тепер несподівано з'ясували, що гліциризинова кислота має синергічний ефект на білки, які проявляють антивірусну активність.

Тому, першим об'єктом представленого винаходу є розкриття фармацевтичної композиції, яка відрізняється тим, що вона включає гліциризинову кислоту і принаймні один білок, що має антивірусну активність.

Переважно, білок обирають з групи, що включає лізоцими і лактоферини.

Типовими прикладами лізоцимів є лізоцим індики, лізоцим людини, лізоцим курчати, дезактивований нагріванням лізоцим курчати і лізоцим курчати, перетравлений трипсином. Переважно лізоцим є лізоцимом курчати або лізоцимом людини.

Типовими прикладами лактоферинів є бичачий і людський лактоферини.

Як правило, фармацевтична композиція згідно з даним винаходом використовується у лікуванні місцевих

вірусних інфекцій. Переважно, вірус є герпетичного типу. Навіть більш переважно, він є вірусом Herpes simplex типу 1 (HSV1).

Переважно, фармацевтичні композиції згідно з даним винаходом виготовляють у вигляді прийнятних дозованих форм. Прикладами прийнятних дозованих форм є креми, мазі і лікувальні пластири для місцевого застосування.

Дозовані форми можуть також містити інші звичайні компоненти, такі як консерванти, стабілізатори, сурфактанти, буфери, солі для регулювання осмотичного тиску, емульгатори, смакові добавки, барвники, ароматизатори і т. і.

Кількість активних компонентів у фармацевтичній композиції згідно з даним винаходом може змінюватися в широкому діапазоні в залежності від відомих чинників таких як, наприклад, стадія і тяжкість інфекції, вага тіла пацієнта, тип дозованої форми, спосіб введення, кількість дозованих форм, що вводять щоденно, і ефективність активних компонентів. Однак, оптимальна кількість буде звичайно визначатися на місці фахівцем у даній галузі.

Переважно, кількість гліциризинової кислоти, лізоциму та/або лактоферину у дозованій формі згідно з цим винаходом буде такою, щоб забезпечити щоденне введення 0,25-8мг/мл гліциризинової кислоти, 0,5-10мг/мл лізоциму та/або 0,1-4мг/мл лактоферину. Навіть більш переважно, вона буде такою, щоб забезпечити щоденне введення 0,5-2мг/мл гліциризинової кислоти, 0,5-4мг/мл лізоциму та/або 0,25-1мг/мл лактоферину. Дозовані форми фармацевтичної композиції згідно з цим винаходом можуть бути виготовлені відповідно до способів, відомих хіміку-фармацевту, що включають змішування, грануляцію, пресування, розчинення, т. і.

Наступні приклади наведено, щоб проілюструвати представлений винахід, але вони ніяким чином не обмежують його.

В експериментах використовувалися такі сполуки:

- Гліциризинова кислота (у формі солі амонію), надана FLUKA AG;
- Вірус Herpes simplex типу 1, наданий NIH, Rockville, Maryland;
- Лізоцим курчати, наданий SIGMA;
- Лактоферин, наданий SIGMA;
- Клітини VERO з нирки африканської зеленої мавпи від ICN FLOW, Costa Mesa, CA;
- Середовище Ігла (Eagle), модифіковане Dulbecco (DMEM), з доданою ембріональною телячою сироваткою, інактивоване протягом 30 хвилин при 56°C, надане ICN FLOW, Costa Mesa, CA.

#### Приклад 1

Моношари клітин VERO були посіяні на 24-лункові планшети та інфіковані у кількості приблизно 1 інфікуюча вірусна одиниця HSV1 на 100 клітин протягом однієї години при кімнатній температурі. Потім різні кількості від 0 до 8мг/мл лізоцимів курчати, індика і людини були додані в термостаті при 37°C і в присутності CO<sub>2</sub> (5%).

Через 48 годин, коли цитопатичний ефект був повним у контрольному зразку, клітини були заморожені і розморожені двічі, щоб заподіяти у такий спосіб розрив і вихід вірусу.

Концентрацію інфікуючих вірусних часток, синтезованих для кожного розведення лізоциму, встановлювали титруванням після центрифугування. Титрування виконували, розводячи вміст кожної лунки від 10<sup>-1</sup> до 10<sup>-7</sup> та вносячи розчини для контакту з моношаром клітин в планшетах по 6 лунок для кожного протягом 1 години при кімнатній температурі.

Як тільки відбулося інфікування, клітини були накріті шаром поживного агару, і після 48 годин інкубації вони були забарвлені нейтральним червоним. Підраховували макроскопічні видимі вірусні бляшки. У такий спосіб встановлювали відсоток інгібування лізоцимом, отриманий для вірусних бляшок у порівнянні з контрольним зразком.

Отримані в такий спосіб експериментальні дані наведено в таблиці 1.

Таблиця 1

Інгібування (%) вірусних бляшок різними лізоцимами

Доза (мг/мл)*	0	8	6	4	2	1	0,5
Курчати	0	93±3	82±4	71±6	60±6	49±5	20±4
Індика	0	89±5	80±4	68±5	55±6	45±5	10±3
Людини	0	90±5	79±6	70±4	59±4	45±3	18±3

\*Відсоток від контрольного зразка ± стандартне відхилення.

З таблиці 1 видно, що:

1) лізоцим курчати

а) значно інгібує формування герпетичних вірусних бляшок на клітинах VERO;

б) вплив є дозо-залежним;

в) у дозі 8мг/мл інгібує HSV1 приблизно на 92%;

iv) 50% інгібуюча концентрація (ID50) становить приблизно 1мг/мл;

2) лізоцими індика і людини виявляють антигерпетичну активність, подібну до лізоциму курчати.

#### Приклад 2

Був виконаний як Приклад 1 за винятком того, що до моношарів клітин VERO, інфікованих HSV1, додавали різні кількості від 0 до 1мг/мл гліциризинової кислоти окремо. Експериментальні результати наведено в таблиці 2.

Таблиця 2

Гліциризинова кислота - інгібування (%) вірусних бляшок

Доза (мг/мл)	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Інгібування (%)	0	10±4	27±7	50±8	75±12

#### Приклад 3

Був здійснений як Приклад 1 за винятком того, що до моношарів клітин VERO, інфікованих HSV1, додавали гліциризинову кислоту у кількості 0,5мг/мл разом з різними кількостями лізоциму курчати від 0 до 1мг/мл. Експериментальні результати наведено в таблиці 3.

Таблиця 3

Інгібування (%) вірусних бляшок (Гліциризинова кислота 0,5мг/мл + різні кількості лізоциму курчати)

Лізоцим курчати/ дози (мг/мл)	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Інгібування (%)	72±6	83±8	85±8	87±9	88±8

Як можна побачити з таблиці 3, комплекси гліциризинової кислоти і лізоцимів характеризуються значним синергічним ефектом. Наприклад, з погляду на суму дій, виміряних окремо (таблиці 1 і 2), інгібування (%), очікуване для комплексу, що включає 0,5мг/мл лізоциму курчати і 0,5мг/мл гліциризинової кислоти, становить приблизно 35-40%. Напроти, результати, наведені в таблиці 3 доводять, що інгібування (%) цього комплексу становить приблизно 84%.

Синергічний ефект підтверджується індексом FIC, який у випадку випробування дорівнює 0,125.

Як відомо, індекс FIC (фракційні концентрації інгібування) отримують діленням 50% інгібуючої вірусної концентрацією суміші з цих двох компонентів на 50% інгібуючу вірусну концентрацію кожного компоненту окремо. Індекс FIC  $\square$  0,5 означає присутність істотного синергічного ефекту між цими двома компонентами.

#### Приклад 4

Був здійснений як Приклад 1 за винятком того, що до моношарів клітин VERO, інфікованих HSV1, додавали різні кількості лактоферину людини та бика.

Експериментальні дані, отримані в такий спосіб, наведені в таблиці 4.

Таблиця 4

	MTD <sub>50</sub> (мг/мл)*	MDI <sub>50</sub> (мг/мл)**
Лактоферин бика	2	0,25
Лактоферин людини	3	0,25

\*Токсичність, виражена як мінімальна токсична доза на 50% клітин.

\*\*Доза, що інгібує 50 % вірусних бляшок на клітинах VERO.

Таблиця 4 показує, що лактоферини не дуже токсичні, і що їхній вплив на віруси виявляється при концентраціях, значно менших, ніж токсичні.

#### Приклад 5

Був здійснений як Приклад 1 за винятком того, що до моношарів клітин VERO, інфікованих HSV1, додавали 0,5мг/мл гліциризинової кислоти та різні кількості від 0 до 1мг/мл лактоферину людини. Експериментальні результати наведено в таблиці 5.

Таблиця 5

Інгібування (%) вірусних бляшок (Гліциризинова кислота 0,5мг/мл + різні дози лактоферину людини)

Лактоферин людини, дози мг/мл	0	0,0075	0,015	0,031	0,062	0,125	0,250	0,5	1
Інгібування (%)	30±2	30±4	50±6	50±5	60±10	80±15	100	100	100

Як видно з таблиці 5, комплекси гліциризинової кислоти і лактоферину характеризуються значним синергічним ефектом. Наприклад, з погляду на суму активностей, виміряних окремо (таблиці 2 і 4), очікуване інгібування (%) комплексу, що включає 0,25мг/мл лактоферину і 0,5мг/мл гліциризинової кислоти, становить приблизно 65-75%. Напроти, результати, наведені в таблиці 5 доводять, що інгібування (%) цього комплексу становить приблизно 100%.

Синергічний ефект підтверджується індексом FIC, що становить 0,06.

#### Приклад 6

Був здійснений як Приклад 1 за винятком того, що до моношарів клітин VERO, інфікованих HSV1 додавали 0,5мг/мл гліциризинової кислоти, 0,1мг/мл лактоферину людини і різні кількості від 0 до 1мг/мл лізоциму курчати.

Експериментальні результати наведено в таблиці 6.

Таблиця 6

Інгібування (%) вірусних бляшок (Гліциризинова кислота 0,5мг/мл і лактоферин людини 0,1мг/мг +різні дози лізоциму курчати)

Лізоцим курчати/ دوزи (мг/мл)	0	0,25	0,5	0,75	1
Інгібування (%)	48±2	95±5	98±2	99±1	100

Як видно з таблиці 6, комплекси гліциризинової кислоти, лактоферину і лізоцимів характеризуються значним синергічним ефектом. Наприклад, з погляду суми активностей, виміряних окремо, очікуване інгібування (%) комплексу, що включає 0,1мг/мл лактоферину, 0,5мг/мл гліциризинової кислоти і 0,5мг/мл лізоциму становить приблизно 65%. Напроти, результати, наведені в таблиці 6 показують, що інгібування (%) цього комплексу становить приблизно 98%.