

Предметом изобретения является композиция, обладающая антивирусной активностью, способ ее получения и фармкомпозиция на ее основе.

Борьба с заболеваниями, вызываемыми ретровирусами, мобилизует усилия многочисленных коллективов ученых во всем мире. В особенности большие усилия направлены на борьбу против эпидемии СПИДа (синдром приобретенного иммунодефицита). Известно, что ответственным за СПИД агентом является ретро-вирус, называемый ВИЧ (вирус иммунодефицита человека), или согласно его сокращенному обозначению на английском языке HIV.

Наиболее используемыми антивирусными лекарственными препаратами являются препараты на основе производных нуклеозидов, из которых зидовудин или AZT является наиболее доступным антивирусным средством. Однако, появление устойчивых мутантов ведет к поискам новых путей лечения.

Исследования, осуществленные изобретателем в отношении смеси природной кислоты с продуктами природного происхождения, привели его к разработке композиций большой эффективности для инактивации инфекционной способности ВИЧ.

Задача изобретения, следовательно, заключается в создании новых эффективных антиретровирусных композиций.

Изобретение касается также способа получения таких композиций.

Композиции согласно изобретению отличаются тем, что они составлены из уксусной кислоты, экстрактов порошка кокосового ореха, из раствора неорганических солей и экстрактов кактусовых, лилейных, анакардиевых и молочайных культур.

Кокосовый орех представляет собой плод кокосовой пальмы. Согласно изобретению, используют предпочтительно протертую белую мякоть.

Кактусовые культуры, особенно пригодные для осуществления изобретения, включают опунцию. Следует напомнить, что опунция - это родовое название опунции Raquette, опунции обыкновенной (poral), опунции вида Figuiet de Barbac и других видов, произрастающих в тропической Америке. Преимущественно используют плоды зеленой опунции Raquette.

Лилейные культуры, входящие в рамки изобретения, включают, например, аралии (сассапариль). Предпочтительно используют корень аралии.

В качестве анакардиевых культур преимущественно используют момбин (мексиканскую сливу), и в частности кору момбина.

Предпочтительным представителем молочайных культур является клещевина. Согласно изобретению, наиболее предпочтительно использовать ее зерна, особенно в поджаренном состоянии и в форме порошка.

Для получения композиции, предпочтительно использовать уксусную кислоту, тертый кокосовый орех, морскую воду, плоды зеленой опунции, корень аралии, кору момбина и порошок поджаренных зерен клещевины.

Эти различные ингредиенты преимущественно используют в следующих пропорциях:

- уксусная кислота 5-10 л, особенно 7-8 л;
- порошок кокосового ореха (предпочтительно тертая белая мякоть) эквивалентно примерно 10 кокосовым орехам (4-5 кг);
- раствор минеральных солей (в частности фосфаты, хлориды, сульфаты, карбонаты и бикарбонаты натрия, калия, магния, кальция), например, находящихся в морской воде: 3-5 л, в частности 4 л;
- опунция Raquette, особенно ее растертые плоды: 10-20 плодов, соответствующих 1-2 кг, в частности примерно 15 плодов, соответствующих примерно 1,5 кг;
- корень аралии от 500 г до 1 кг, в частности около 750 г;
- кора момбина: 500 г-1,5 кг, в частности около 1 кг;
- поджаренные и размолотые зерна клещевины 500 г-1,5 кг, в частности около 1 кг.

Другими словами, объектом изобретения являются композиции, которые получены путем настаивания порошка кокосового ореха в уксусной кислоте в течение примерно 24-х ч, добавления к фильтрату, полученному после настаивания, остальных вышеуказанных ингредиентов, предпочтительно согласно указанным количествам, и доведением до кипения образующейся смеси в течение по крайней мере 1 ч, затем полученный фильтрат рекуперировать.

Изобретение также относится к способу получения вышеуказанных композиций, заключающемуся в том, что настаивают порошок кокосового ореха в уксусной кислоте в течение 24 ч, к полученному фильтрату добавляют перечисленные выше ингредиенты в указанных количествах и доводят полученную смесь до температуры кипения в течение не менее 1 ч и извлекают фильтрат, в качестве целевого продукта.

Изучение свойств композиций согласно изобретению выявило ингибирующий эффект на активность обратной транскриптазы ВИЧ-1, который может превышать 90% по отношению к активности, измеряемой в контрольном опыте. Также было обнаружено уменьшение цитопатогенного эффекта ВИЧ-1 на клетки, инфицированные этим вирусом и обработанные композициями согласно изобретению.

Отсутствие токсичности этих композиций подтверждается при испытании на мышах путем интраперитонеальной инъекции при физиологическом значении pH.

Изобретение относится также к фармацевтическим композициям, использующим указан-

ную выше композицию, и обладающим антивирусной активностью.

Фармацевтические композиции согласно изобретению отличаются тем, что они включают эффективное количество, по крайней мере, одной композиции, указанной выше, в сочетании с фармацевтически инертным эксципиентом.

Эти композиции могут использоваться, в частности, для профилактики и лечения СПИДа, при необходимости в сочетании с другими лекарственными средствами.

Фармацевтические композиции предпочтительно вводят путем инъекции в виде растворов или суспензий для инъекций, изотонических по отношению к плазме крови. Количество действующего начала изменяется в зависимости от состояния пациента, причем дозировка для человека чаще всего составляет порядка 1-500 мг в день действующего начала (в расчете на сухой экстракт).

Ниже изобретение иллюстрируется примером приготовления композиции с высокой эффективностью по отношению к вирусу ВИЧ-1 и результатами испытаний *in vitro* и *in vivo*.

Пример 1: Приготовление композиции согласно изобретению.

В течение, по крайней мере, 24 ч высушенную протертую белую мякоть 10 кокосовых орехов (~4,5 кг) замачивают в 7-8 л белого уксуса или уксусной кислоты. Смесь затем фильтруют. К рекуперированному фильтрату добавляют следующие ингредиенты:

- обогащенный минеральными элементами раствор, как например морская вода, 4 л;
- протертая зеленая опунция *Raque*tte (около 15 плодов) 1,5 кг;
- корень аралии 750 г;
- кора момбина 1 кг;
- порошок поджаренных зерен клещевины 1 кг.

Таким образом, полученную смесь доводят до кипения в течение примерно 1 ч, затем фильтруют.

Пример 2: Изучение инактивации ВИЧ-1 с помощью композиции примера 1.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ ПРОТОКОЛ.

Инактивация вируса.

Суспензию вирусных частиц А в культуральной среде RPMI 1640 (ВИЧ-1 III В, активность обратной транскриптазы $3,8 \times 10^6$ срп/мл (срп = число импульсов в минуту)) инкубируют вместе с композицией примера 1, ниже называемой "композиция" (объем/объем) в течение 20 мин при 4°C, затем в течение 1 ч при комнатной температуре, наконец, в течение 2 ч при 37°C. По окончании инкубации смесь разбавляют в 10, 20, 40, 100, 200 раз в культуральной среде RPMI 1640 плюс 10% плодной телячьей

сыворотки (SVF), предварительно нагреваемой в течение 30 мин при 56°C.

Инфицирование.

Осадки 5×10^5 клеток MT4 (человеческие клетки лимфоидного происхождения, трансформируемые HTLV-1 (= вирус человеческого Т-клеточного лейкоза)) суспендируют в 250 мкл различных разбавленных растворов смеси вирус-композиция.

После адсорбции в течение 1 ч при комнатной температуре, с суспендированием всех клеток в течение 15 мин, не адсорбированный вирус удаляют путем центрифугирования клеток. Их промывают два раза с помощью RPMI, затем снова суспендируют в среде RPMI с 10% SVF, при концентрации 2×10^5 /мл. Инфицированные клетки культивируют на пластинках для микротитрования (планшет с 96 ячейками) по 200 мкл на ячейку.

Все культивирования осуществляют, по крайней мере, два раза. Культуры разбавляют идентичным объемом среды спустя 5 и 8 дней после инфицирования.

Ряд контрольных культур инфицируют параллельно с помощью суспензии вируса А, смешанной (объем/объем) со средой RPMI. Инкубирования и разбавления осуществляют строго в тех же самых условиях, что и для вируса, обработанного композицией.

Дополнительный контроль осуществляют при использовании вируса, предварительно инкубированного с 0,15 М раствором NaCl.

Продуцирование вируса измеряют путем количественного анализа активности обратной транскриптазы, связанной с вирусными частицами, высвобождаемыми из клеток в культуральную среду. Обратную транскриптазу также называют реверсивной транскриптазой или сокращенно RT.

Тест RT осуществляют на 65 мкл среды согласно протоколу, описанному Moog и др., в *Antiviral Research*. 24 (1994), 275-288. Результаты выражают в срп/опыт (таблица, нижняя часть).

Жизнеспособность клеток определяют по тесту МТТ, описанному Moog и сотр., в вышеуказанной ссылке (таблица, верхняя часть). Интенсивность окрашивания выражают в милли DO.

ЭКСПЕРИМЕНТ А.

Оценивают продуцирование ВИЧ после инфицирования клеток MT4 с помощью вируса, предварительно инкубированного с композицией. Спустя 5 или 7 дней после инфицирования значения RT составляют 699 - 1538 срп/опыт, тогда как для неинфицированных культуральных надосадочных жидкостей эти значения составляют 1400-2100 срп/опыт. Все культуры, инфицированные необработанным вирусом, продуцируют вирус в дни с 5 по 11.

ЭКСПЕРИМЕНТ Б.

Оценивают продуцирование ВИЧ после инфицирования клеток СЕМ-SS с помощью ВИЧ-1 LAi.

Суспензию вируса Б (ВИЧ-1 LAi, активность обратной транскриптазы 3×10^6 смр/мл) инкубируют (объем/объем) с композицией. Все другие стадии являются такими же, что описанные для эксперимента с клетками МТ4.

В этих условиях инфицированные контрольным вирусом (т.е. не инкубированным с композицией) культуры продуцируют вирус, измеряемый по показателю RT спустя 11 дней после инфицирования.

В случае клеток, инфицированных вирусом, который предварительно инкубирован с композицией, значения RT подобны таковым, которые определяют в случае неинфицированных культуральных надосадочных жидкостей (1707-2564 смр/опыт) спустя 11 дней после инфицирования.

ЭКСПЕРИМЕНТ В.

Нижеследующий экспериментальный протокол идентичен таковому эксперимента А. Измерения, проведенные на 5-й и 7-й день после инфицирования показывают, что репликация вируса не определяема или очень мала, когда его прединкубируют с композицией (RT контрольных, неинфицированных клеток составляет 972-12192 смр/опыт).

ЭКСПЕРИМЕНТ Г.

Для того, чтобы можно было определить продуцирование вируса на более ранних стадиях, чем в эксперименте Б, используют повышенную в 10 раз концентрацию вируса.

Продуцирование вируса спустя 5 и 8 дней очень сильно ингибируется благодаря предварительной инкубации вируса с композицией.

Отсутствие же наблюдаемого эффекта при использовании 0,15 М раствора хлорида натрия показывает, что ингибирование вируса является специфическим свойством композиции.

Эти результаты, следовательно, показывают, что предварительная инкубация вируса ВИЧ-1 с композицией согласно изобретению имеет следствием инактивацию инфекционной способности вирусных частиц.

Пример 3. Изучение воздействия композиции примера 1 на активность обратной транскриптазы ВИЧ-1.

Суспензию вируса ВИЧ-1 смешивают (объем/объем) с различными разбавленными композициями. Определение активности обратной транскриптазы (RT), ассоциированной с вирусными частицами, осуществляют согласно методике Моог и др., описанной в цитированной выше ссылке.

Измерения осуществляют, по крайней мере, на двух образцах. Полученные результаты представлены в табл.1.

Констатируют, что использование композиции при наиболее высоких концентрациях ингибирует активность RT до свыше 90%.

Другой ряд экспериментов, результаты которых приводятся в табл.2, подтверждает вышеуказанные данные.

Эти эксперименты, следовательно, демонстрируют, что композиции согласно изобретению способны ингибировать активность обратной транскриптазы, измеряемую *ин vitro*.

Таблица 1. Активность обратной транскриптазы RT (смр/опыт)

Конечное разбавление растворов	Композиция / вирус	
	1 / 2	1.164 783
1/6	759 688	724 (94%)
1/8	2.453 2.875	2664 (80%)
1/54	6.875 5.949	6.412 (50%)
1/162	10.035 8.220	9.128 (29%)
1/486	11.747 12.981	12.364
Контрольный вирус	14.318 10.743 11.764	Среднее 12.794
	12.687 12.218 15.036	

* Цифры в скобках указывают процент ингибирования активности RT.

Таблица 2. Активность обратной транскриптазы RT (смр/опыт)

Конечное разбавление растворов	Композиция / вирус	
	1/2	550 783
1/4	925 524	724 (100%)
1/8	572 442	507 (100%)
1/16	910 797	854 (100%)
1/32	27.045 30.535	28.790 (82%)
1/64	55.180 71.351	63.265 (60%)

1/128	108.652 103.673	106.163 (32%)
1/256	129.555 107.540	118.548 (24%)
1/512	81.234 149.698	115.466 (26%)
1/1024	167.936 144.598	156.267
Контрольный вирус	157.233 155.059	среднее 156.146

* Цифры в скобках указывают процент ингибирования активности RT (обратной транскриптазы).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция на основе продуктов природного происхождения, обладающая антивирусной активностью, отличающаяся тем, что она содержит настой порошка кокосового ореха в уксусной кислоте, водный раствор минеральных солей и фармацевтически приемлемые экстракты кактусовых, лилейных, анакардиевых и молочайных культур.

2. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что она содержит настой порошка кокосового ореха в уксусной кислоте, водный раствор минеральных солей и фармацевтически приемлемые экстракты опунции, аралии, момбина и клещевины.

3. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что она содержит настой тертой белой мякоти кокосового ореха.

4. Композиция по пп.1-3, отличающаяся тем, что она содержит в качестве экстракта опунции экстракт опунции Raquette, предпочтительно экстракт плодов зеленой опунции Raquette.

5. Композиция по пп.1-4, отличающаяся тем, что она содержит в качестве экстракта аралии экстракт корня аралии.

6. Композиция по пп.1-5, отличающаяся тем, что она содержит в качестве экстракта момбина экстракт коры момбина.

7. Композиция по пп.1-6, отличающаяся тем, что в качестве экстракта зерен клещевины

она содержит экстракт порошка поджаренных зерен клещевины.

8. Композиция по пп.1-7, отличающаяся тем, что она содержит настой тертого кокосового ореха в уксусной кислоте, морскую воду, уксуснокислые экстракты плодов опунции, такой как Raquette зеленая, корня аралии, коры момбина и измельченных и поджаренных зерен клещевины.

9. Композиция по п.8, отличающаяся тем, что она содержит настой 4-5 кг мякоти кокосового ореха в 5-10 л уксусной кислоты, морскую воду 3-5 л, уксуснокислый экстракт плодов зеленой опунции Raquette, взятых в количестве 1-2 кг; уксуснокислый экстракт корня аралии, взятого в количестве 0,5-1 кг, уксуснокислый экстракт коры момбина, взятой в количестве 0,5-1,5 кг, уксуснокислый экстракт поджаренных и измельченных зерен клещевины, взятых в количестве 0,5-1,5 кг.

10. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что она получена путем настаивания мякоти кокосового ореха в уксусной кислоте в течение примерно 24 ч, добавления к отфильтрованному настою водного раствора минеральных солей, измельченных кактусовых, лилейных, анакардиевых и молочайных культур и доведения полученной смеси до кипения в течение не менее 1 ч.

11. Способ получения композиции по любому из пп.1-9, заключающийся в том, что порошок кокосового ореха настаивают в уксусной кислоте в течение примерно 24 ч, полученный настой фильтруют, к фильтрату добавляют водный раствор минеральных солей, измельченные растительные культуры, доводят полученную смесь до кипения в течение, по меньшей мере, 1 ч и отделяют фильтрат.

12. Фармацевтическая композиция, обладающая антивирусной активностью, содержащая активное начало и фармацевтически приемлемые носители, отличающаяся тем, что в качестве активного начала она содержит композицию по любому из пп.1-9 в эффективном количестве.

