



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,  
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**(21)(22) Заявка: **2009130819/15, 12.08.2009**(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
**12.08.2009**

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: **12.08.2009**(43) Дата публикации заявки: **20.02.2011** Бюл. № 5(45) Опубликовано: **10.06.2011** Бюл. № 16

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **ГРИБЕНЧА С.В. противовирусная активность РНКазы *Vacillus intermedius* у морских свинок и кроликов, зараженных вирусом бешенства// Вопросы вирусологии, 2006, №5, с.41-43. ИВАНОВ А.В. Диагностика и профилактика бешенства животных. - М, 2007, с.53-55. RU 2007185 С1, 15.02.1994. CN 101307317 А, 19.11.2008.**

Адрес для переписки:

**420075, г.Казань, Научный городок, 2, ФГУ "ФЦТРБ-ВНИВИ", отдел биобезопасности, ученому секретарю В.И. Степанову**

(72) Автор(ы):

**Иванов Аркадий Васильевич (RU),  
Хисматуллина Наиля Анваровна (RU),  
Чернов Альберт Николаевич (RU),  
Юсупов Расых Халиуллович (RU),  
Мионов Александр Николаевич (RU),  
Гулюкин Алексей Михайлович (RU),  
Филимонова Мария Николаевна (RU)**

(73) Патентообладатель(и):

**Федеральное государственное учреждение "Федеральный Центр токсикологической и радиационной безопасности животных (ФГУ "ФЦТРБ-ВНИВИ") (RU),  
Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Казанский государственный университет им. В.И. Ульянова-Ленина" (ГОУВПО "КГУ") (RU)**

**(54) ПРЕПАРАТ ПРОТИВ БЕШЕНСТВА**

(57) Реферат:

Изобретение относится к области ветеринарии. Препарат содержит водно-солевой раствор, включающий 45-50%-ный «Гемодез-Н» и 0,125-1,0%-ный магний сульфат 7-водный, 0,08% эндонуклеаза бактерий *Serratia marcescens* в 1%-ном водном

растворе хлорида натрия, причем «Гемодез-Н», магний сульфат и эндонуклеаза бактериальная взяты в соотношении 1:1:2, соответственно. Заявленный препарат обладает антирабическим действием, нетоксичен и прост в изготовлении. 2 табл.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,  
PATENTS AND TRADEMARKS

**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2009130819/15, 12.08.2009**(24) Effective date for property rights:  
**12.08.2009**

Priority:

(22) Date of filing: **12.08.2009**(43) Application published: **20.02.2011 Bull. 5**(45) Date of publication: **10.06.2011 Bull. 16**

Mail address:

**420075, g.Kazan', Nauchnyj gorodok, 2, FGU  
"FTsTRB-VNIVI", otdel biobezopasnosti,  
uchenomu sekretarju V.I. Stepanovu**

(72) Inventor(s):

**Ivanov Arkadij Vasil'evich (RU),  
Khismatullina Nailja Anvarovna (RU),  
Chernov Al'bert Nikolaevich (RU),  
Jusupov Rasykh Khaliullovič (RU),  
Mironov Aleksandr Nikolaevich (RU),  
Guljukin Aleksej Mikhajlovich (RU),  
Filimonova Marija Nikolaevna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federal'noe gosudarstvennoe uchrezhdenie  
"Federal'nyj Tsentr toksikologicheskoi i  
radiatsionnoj bezopasnosti zhivotnykh (FGU  
"FTsTRB-VNIVI") (RU),  
Gosudarstvennoe obrazovatel'noe uchrezhdenie  
vysshego professional'nogo obrazovanija  
"Kazanskij gosudarstvennyj universitet im. V.I.  
Ul'janova-Lenina" (GOUVPO "KGU") (RU)**

**(54) ANTI-RABIS MEDICATION**

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceuticals.

SUBSTANCE: invention relates to veterinary.  
Medication contains water-salt solution, including 45-  
50%-"Haemodez-N" and 0.125-1.0% magnesium  
sulfate heptahydrate, 0.08% endonuclease of bacteria

Serratia marcescens in 1% water solution of sodium  
chloride, "Haemodez-N", magnesium sulfate and  
bacterial endonuclease being taken in ratio 1:1:2,  
respectively.

EFFECT: easy producing and antitoxic effect.  
2 tbl, 1 ex

RU 2 420 309 C2

RU 2 420 309 C2

Предлагаемое изобретение относится к ветеринарии, сельскому хозяйству, медицине и может быть использовано для проведения экстренной постэкспозиционной лечебно-профилактической защиты от бешенства.

Бешенство - это особо опасная инфекция с летальным исходом, поражающая центральную нервную систему, вызываемая РНК-содержащими вирусами. Ведущим признаком инфекции является поражение центральной нервной системы. Лечебные препараты от бешенства животных отсутствуют. Клинически больных животных уничтожают.

В борьбе с заболеванием людей после контакта с возбудителем инфекции во всем мире существует единая тактика, которая заключается в немедленной местной обработке раны с последующей постэкспозиционной антирабической лечебно-профилактической вакцинацией, основанной на комбинированном применении антирабической вакцины и антирабического иммуноглобулина (АИГ). Основная функция АИГ, гомологичного или гетерологичного, состоит в создании пассивного иммунитета с целью предупреждения развития болезни с коротким инкубационным периодом (Селимов, М.А. Современная эпизоотическая ситуация и перспективы ликвидации бешенства / М.А.Селимов // Вопросы вирусологии. - 1998, с.196-198). Однако гетерологичный АИГ, поступающий в Россию с Украины, где налажено его производство, может вызывать аллергические реакции, включая сывороточную болезнь и анафилактический шок. А гомологичный иммуноглобулин является дорогостоящим. К тому же при нарушении технологии его производства его применение связано с потенциальным риском заражения ВИЧ, вирусным гепатитом и другими вирусными агентами. Более того, на основании современных данных о патогенезе заболевания, можно заключить, что лечение, основанное на комбинированном применении антирабической вакцины и антирабического иммуноглобулина, будет успешным только при применении его вначале, до проникновения вируса в клетки центральной нервной системы.

Однако, после проникновения вируса бешенства в клетки центральной нервной системы специфические антитела не способны влиять на течение и исход инфекционного процесса, так как вирус, попавший в клетки нервной системы, становится фактически недоступным действию иммунокомпетентных клеток, вырабатывающих антитела.

При экспериментальной рабической инфекции установлено выраженное антирабическое действие антибиотика «Рифампицин» (Зубович, И.К. Защитное действие рифампицина при экспериментальной рабической инфекции белых мышей / И.К.Зубович, В.И.Вотяков, Н.П.Мишаева и др. // Антибиотики и химиотерапия. - 1989, т.34, №2, с.123-125), обусловленное подавлением синтеза РНК за счет связывания с ДНК-зависимой РНК-полимеразой (Wehril, W. The rifamycins-relation of chemical structure and action on RNA polymerase / W.Wehril, M.Starhelin // Biochim. biophys. Acta. - 1969, v.182, P.24-29). Есть сведения о антирабическом эффекте и ряда других химиотерапевтических препаратов - алкиламиноалкиловых эфиров флуоренондикарбоновой кислоты, алкокси - и алкилтиопроизводных флуорена и флуоренона (Fleming, R.W.Treating viral infections with bis-basic ethers and thioethers of fluorenon and fluorene and pharmaceutical compositions of the same / R.W.Fleming, D.L.Wenstrup, E.R.Andrews // US 3692907 (1970); Brit. 1274479; Chem. Abstr., 73, 66340 z(1970)), резерпина (Вотяков В.И., Мишаков Н.П., Самойлова Т.И. А.с. СССР №1678369 за 1991 г.), кетамина (Lockhart B.P. Inhibition of rabies virus transcription in rat cortical neurons with the dissociative anesthetic ketamine / B.P.Lockhart, N.Tordo, H.Tsiang

// Antimicrob. Agents Chemother. - 1992, 36, P.1750-1755), тиоцинат 4-(1-адамантил) фениламмония, 1-фенил-3-аминоадамантиана, 1-(4-тиотил)-3-аминоадамантиана, 1-фенил-3-(1-аминоэтил) адамантиана гидрохлорида, 4-(1-адамантил)-1-(1-аминоэтил)бензол гидрохлорида, 4-(1-адамантил)-1-(1-аминопропил) бензола гидрохлорида, 4-(1-адамантил)-1-(1-аминобутил) бензолагидрохлорида, 1-(4-(1-адамантил)фенокси)-2-аминоэтана (Даниленко Г.И. Синтез и защитное действие производных фениладамантана в отношении вируса бешенства / Г.И.Даниленко, Е.А.Шабловская, Л.А.Антонова и др. // Химико-фармацевтический журнал. - 1998, №2, т.32, с.28-30).

Кроме этого хороший антирабический эффект при экспериментальном заражении бешенством обеспечивает РНКазы *Bacillus intermedius* - бактериальный фермент, гидролизующий РНК. Известно, что введение РНКазы *Bacillus intermedius* внутримышечно в место заражения в дозе 5 мг/кг через 2 ч после введения вируса приводит к 40-70%-ной защите (Грибенча С.В. Противовирусная активность РНКазы *Bacillus intermedius* в экспериментах на мышах линии СВА, предварительно зараженных уличным вирусом бешенства / С.В.Грибенча, Л.А.Поцелуева, И.Ф.Баринский, Т.Г.Баландин, С.М.Деев, И.Б.Лещинская // Вопросы вирусологии, 2004, №6, с.38-41; Грибенча С.В. Противовирусная активность РНКазы *Bacillus intermedius* у морских свинок и кроликов, зараженных уличным вирусом бешенства / С.В.Грибенча, Л.А.Поцелуева, И.Ф.Баринский // Вопросы вирусологии, 2006, №5, с.41-43). Хотя антирабический эффект РНКазы прежде всего, вероятно, связан с ферментативной активностью, по имеющимся сведениям, антирабическая активность РНКазы зависит от ее дозы, выраженной в мг/кг. Об РНКазе также известно, что ее можно использовать в качестве ингибитора РНК-геномных бактериофагов. В условиях Советского Союза опытные партии РНКазы *Bacillus intermedius* выпускали в Латвии на экспериментальном заводе Института органического синтеза. В настоящее время возможно получение препарата в лабораторных условиях. Основными недостатком РНКазы является ее токсичность, которая проявляется при введении препарата в мозг в дозах, превышающих 5 мг/кг, и кроме того, в случае ослабленной иммунной системы организма может вызвать аллергические реакции и при внутримышечном введении.

На сегодняшний день известны не только технологические аспекты получения секретлируемого фермента - эндонуклеазы *Serratia marcescens*, но и результаты применения препаратов эндонуклеазы в пчеловодстве для профилактики вирусных болезней и стимуляции развития пчелосемей, в животноводстве - против респираторных болезней телят, в растениеводстве - для получения безвирусных сортов с/х-ных растений. Однако ее полный и точный механизм действия еще до конца не расшифрован, а познание этих механизмов ведет к дальнейшим исследованиям и расширению сферы ее применения (Аликин Ю.С. Развитие технологии получения и перспективы использования эндонуклеазы *Serratia marcescens* / Ю.С.Аликин, Л.П.Сенженко, В.П.Клименко // Ферменты микроорганизмов: Сб. Докладов XI Всероссийской конференции, Казань, 1998, с.152-163).

Эндонуклеаза бактериальная, продуцируемая бактериями *Serratia marcescens*, является ферментом. По внешнему виду это порошок белого или слегка желтоватого цвета, без запаха, хорошо растворимый в воде, нерастворим в органических растворителях, неустойчив в кислой среде (теряет активность).

Эндонуклеаза бактериальная обладает выраженным противовирусным действием - тормозит развитие различных РНК и ДНК-содержащих вирусов животных путем

5 гидролиза вирусных нуклеиновых кислот. Относится к малотоксичным соединениям, не раздражает кожу и слизистые оболочки глаза. Эндонуклеаза бактериальная - это природный биологический катализатор белковой природы, она нетоксична благодаря способности и самопроизвольной инактивации и безвредна для человека, животных и растений.

10 Известно, что лиофильно высушенный препарат эндонуклеазы можно хранить при температуре (-20°C) в течение продолжительного периода времени. Период хранения раствора эндонуклеазы при температуре (-20°C) без изменения ферментативной активности короче.

15 Заявителем было установлено, что внутримышечное или интрацеребральное введение препарата эндонуклеазы, представляющего собой водный раствор данного фермента с активностью 330000 ед./мл, содержащий 0,85% NaCl, не оказывало влияние на жизнеспособность как инфицированных вирусом бешенства, так и интактных мышей. Полученный результат свидетельствовал об отсутствии токсичности препарата эндонуклеазы, а также об отсутствии проявления антирабической активности эндонуклеазы в указанной композиции.

20 Заявителю известно, что эндонуклеаза относится к ферментам, активность которых сильно зависит от присутствия в среде катионов Mg (Лещинская И.Б. Получение и характеристика высокоочищенного препарата нуклеазы *Serratia marcescens* / И.Б.Лещинская, Н.П.Балабан, Г.С.Егорова, В.И.Таняшин, Т.М.Третьяк // Биохимия. 1974. - 39, с.116-122; М.Д.Машковский, Лекарственные средства, Харьков, Торсинг, 1998. - т.1, с.142-143, 340), а стабилизации ферментативной активности способствует присутствие в среде стабилизаторов, одним из которых является поливинилпирролидон (Филимонова М.Н. Антимикробный препарат / М.Н.Филимонова, Е.В.Ершова, Ю.И.Сафин и соавт. // Патент РФ №2337139), входящий в состав дезинтоксикационного водно-солевого раствора «Гемодез-Н» или средства «Энтеродез».

30 Водно-солевой раствор «Гемодез-Н» содержит 6% поливинилпирролидона низкомолекулярного медицинского, а также 0,55% натрия хлорида, 0,042% калия хлорида, 0,05% кальция хлорида 6-водного, 0,0005% магния хлорида 6-водного, 0,023% натрия гидрокарбоната (см. Мельникова Е.П., Карапутадзе М.М. и др. «Гемодез-Н - новое дезинтоксикационное средство», ЭИ, Новые лекарственные препараты, 1988, №9, с.1-8; М.Д.Машковский, Лекарственные средства, Харьков, Торсинг, 1998, т.2, с.140-141).

40 Заявителю известно, что оптимальной для проявления нуклеодеполимеразной активности эндонуклеазы является среда с рН 7,0-8,5 (см. Лещинская И.Б. Получение и характеристика высокоочищенного препарата нуклеазы *Serratia marcescens* /И.Б.Лещинская, Н.П.Балабан, Г.С.Егорова, В.И.Таняшин, Т.М.Третьяк // Биохимия. - 1974. - 39, с.116-122) и что 0,3 М водный раствор трисамина применяют в медицине как средство для понижения ацидоза (см. М.Д.Машковский, Лекарственные средства, Харьков, Торсинг, 1998, т.2).

45 При создании изобретения ставилась задача создания препарата, обладающего антирабическим действием, кроме того, расширения спектра действия эндонуклеазы бактериальной.

50 Указанная задача решается применением эндонуклеазы бактериальной в комбинации с водно-солевым раствором, содержащим 45-50%-ный «Гемодез-Н» и 0,125-1,0%-ный магний сульфат 7-водный, а в качестве эндонуклеазы бактериальной использована 0,08%-ной эндонуклеазы бактерий *Serratia marcescens* в 1%-ном водном

растворе хлорида натрия, причем «Гемодез-Н», магний сульфат и эндонуклеаза бактериальная взяты в соотношении 1:1:2 соответственно.

В результате введения водно-солевого раствора, включающего 45-50%-ный «Гемодез-Н» и 0,125-1,0%-ный магний сульфат, и использования 0,08%-ной эндонуклеазы бактериальной *Serratia marcescens* в 1%-ном водном растворе поваренной соли, взятых в соотношении 1:1:2 соответственно, создан препарат против бешенства с 31%-ной защитой, нетоксичный, с малой дозой введения препарата - 0,8 мг/кг и, кроме того, расширился спектр действия эндонуклеазы бактериальной.

Препарат против бешенства получают следующим образом:

1 мл 45,0%-ного водно-солевого раствора «Гемодез-Н» смешивают с 1 мл 0,125%-ного водного раствора магния сульфата 7-водного. Затем полученную смесь смешивают при комнатной температуре с 2 мл 0,08%-ной эндонуклеазой бактерий *Serratia marcescens* в 1%-ном водном растворе хлорида натрия с активностью не менее 248000 ед/мл. Защитный эффект препарата составляет 31,0%.

Аналогичную защищенность от бешенства получали и при использовании 45,0-50,0%-ных водно-солевых растворов «Гемодез-Н» с 0,125-1,0%-ными растворами магния сульфата 7-водного и 0,08%-ной эндонуклеазой бактерий *Serratia marcescens* в 1%-ном водном растворе хлорида натрия.

Предварительно изучали влияние растворов магния сульфата 7-водного и «Гемодеза-Н» на жизнеспособность белых мышей при внутримышечном и интрацеребральном их введении в различных концентрациях. Данные приведены в таблице 1.

Зависимость токсического эффекта  $MgSO_4 \times 7H_2O$  и «Гемодеза-Н» от их концентраций при интрацеребральном введении белым мышам представлена в таблице 1.

Таблица 1		
Препарат	Концентрация, %	Выживаемость, %
MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	25	0
	15	0
	5	60
	2,5	80
	2,0	90
	1	100
	0,5	100
	0,25	100
	0,125	100
Гемодез-Н	100	60
	50	100
	45	100

Из данных таблицы 1 видно, что магния сульфат 7-водный в концентрации 2-25 весовых %, что соответствует 200-80 ммоль/л, а также 100%-ный «Гемодез-Н» вызывали снижение жизнеспособности мышей, а в концентрациях 0,125-1% (5-40 ммоль/л) магния сульфата 7-водного и 45-50% «Гемодез-Н» не оказывали влияния на жизнеспособность животных при их внутримышечном или интрацеребральном введении, следовательно, эти концентрации растворов не токсичны и могут быть использованы для инъекции.

Пример. Сформировали 10 групп белых мышей по 20 голов в каждой. Антирабический эффект препарата анализировали, предварительно инфицируя мышей эпизоотическим вирусом бешенства, штамм «Соб-2580». Мышам вводили

внутримышечно по 0,1 мл вирусной суспензии, в дозе 4 LD<sub>50</sub>/ 0,1 мл. Затем через 2 часа в место заражения вводили однократно по 0,1 мл испытуемого препарата. Дозу LD<sub>50</sub> эпизоотического вируса бешенства подбирали эмпирически. Препарат, содержащий эндонуклеазу с активностью не менее 248000 ед/мл, в концентрации 0,8 мг/кг живой массы животного, 5 ммоль/л (0,125-1%-ный) магния сульфата 7-водного и 45-50%-ного водно-солевого раствора «Гемодез-Н» готовили непосредственно перед испытанием, смешивали сначала водно-солевой раствор «Гемодез-Н» с 0,125-1,0%-ным водным раствором магния сульфата 7-водного в объемном соотношении 1:1. Затем полученную смесь смешивали в равных объемных долях с водным раствором эндонуклеазы, содержащей 1% NaCl. Зависимость антирабического эффекта препарата, от различных концентраций его составляющих, представлена в таблице 2.

Как видно из таблицы 2, отдельно взятые препараты и введенные внутримышечно инфицированным животным не оказывали антирабического эффекта (группы II и III).

Группа животных	Состав препарата	Концентрация, %	Смертность, % от инфицированных животных	Повышение жизнеспособности, % от инфицированных животных
I	Вирус бешенства (контроль)		55,0±0,51	0
II	Эндонуклеаза Гемодез-Н MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	0 45,0-50,0 0,125-1,0	55,0±0,51	0
III	Эндонуклеаза Гемодез-Н MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	0,08 0 0	55,0±0,51	0
IV	Эндонуклеаза Гемодез-Н MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	0,033 45,0-50,0 0,125-1,0	50,0±0,5	5,0±0,5
V	Эндонуклеаза Гемодез-Н MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	0,066 45,0-50,0 0,125-1,0	35,0±0,3	20,0±1,0
VI	Эндонуклеаза Гемодез-Н MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	0,08 45,0-50,0 0,125-1,0	24,0±0,2,2	31,0±0,30
VII	Эндонуклеаза Гемодез-Н MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	0,08 45,0-50,0 0,01	35,0±0,2	20,0±0,21
VIII	Эндонуклеаза Гемодез-Н MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	0,08 45,0-50,0 0,001	50,0±0,5	5,0±0,5
IX	Эндонуклеаза Гемодез-Н MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	0,08 35,0 0,125-1,0	29,0±0,2	26,0±0,3
X	Эндонуклеаза Гемодез-Н MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	0,08 25,0 0,125-1,0	36,0±0,4	19,0±0,1

В то же время одноразовое введение его в малых дозах 0,8 мг эндонуклеазы на кг веса животного в комплексе с 45-50%-ным «Гемодез-Н» и 0,125-1,0%-ного сульфата магния 7-водного обеспечивает 31%-ную защиту животных от бешенства (группа VI), а уменьшение содержания магния сульфата 7-водного - менее 0,125%, «Гемодез-Н» - менее 45% и эндонуклеазы - менее 0,08% снижает результат заявленного технического решения (группы IV, V, VII и VIII).

Таким образом, полученный препарат обладает антирабическим действием, нетоксичен и прост в изготовлении.

В настоящее время намечены клинические испытания препарата против бешенства

на собаках и кошках на III и IV кварталы 2010 г.

#### Формула изобретения

5 Препарат против бешенства, включающий эндонуклеазу бактериальную, отличающийся тем, что он дополнительно содержит водно-солевой раствор, включающий 45-50%-ный «Гемодез-Н» и 0,125-1,0%-ный магний сульфат 7-водный, а в качестве эндонуклеазы бактериальной используют 0,08% эндонуклеаза бактерий *Serratia marcescens* в 1%-ном водном растворе хлорида натрия, причем  
10 «Гемодез-Н», магний сульфат и эндонуклеаза бактериальная взяты в соотношении 1:1:2, соответственно.

15

20

25

30

35

40

45

50