

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



(19) **RU** (11) **2242238** (13) **C1**  
 (51) МПК<sup>7</sup> **A61K35/56, A61P31/14**

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,  
 ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**

Статус: по данным на 08.09.2014 - действует  
 Пошлина: учтена за 12 год с 03.07.2014 по 02.07.2015

(21), (22) Заявка: **2003120271/15, 02.07.2003**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
**02.07.2003**

(45) Опубликовано: **20.12.2004**

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **КРЫЛОВА Н.В. и др. Сравнительное изучение in vitro эффективности различных иммуномодулирующих препаратов при клещевом энцефалите. Вопросы вирусологии. 2001, т.46, №1, январь-февраль, с.25-28. RU 2110522 C1, 10.05.1998. CN 1136436, 27.11.1996. Реферат из АБД Medline: Maier MS et al. Two new cytotoxic and virucidal trisulfated triterpene glycosides from the Antarctic sea cucumber Staurocucumis liouvillei. J. Nat. Prod. 2001, Jun; 64(6):732-6.**

Адрес для переписки:  
**690022, г.Владивосток, пр-т 100 лет Владивостоку, 159, ТИБОХ ДВО РАН, зав. патентным отделом Н.И. Стадниченко**

(72) Автор(ы):  
**Ковалевская А.М. (RU),  
 Стоник В.А. (RU),  
 Авилов С.А. (RU),  
 Гришин Ю.И. (RU)**

(73) Патентообладатель(и):  
**Тихоокеанский институт биоорганической химии Дальневосточного отделения РАН (RU)**

**(54) СРЕДСТВО, ОБЛАДАЮЩЕЕ ПРОФИЛАКТИЧЕСКИМ И ЛЕЧЕБНЫМ ДЕЙСТВИЕМ ПРИ ЗАРАЖЕНИИ ВИРУСОМ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА**

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, конкретно к фармакологии. Предложено новое профилактическое и лечебное средство, активное против вирусов клещевого энцефалита. Средство представляет собой препарат КД, т.е. смесь тритерпеновых гликозидов из отвара голотурии *Siscumaria japonica*, и ранее было известно в качестве иммуно- и биостимулятора, также эффективного в отношении ряда вирусов. Изобретение расширяет арсенал средств заявленного назначения. 1 табл.

Изобретение относится к области медицины, а именно к экспериментальной вирусологии, и может быть использовано для профилактики и лечения вирусного клещевого энцефалита.

Наиболее известным средством предупреждения заражения клещевым энцефалитом являются вакцины, представляющие собой инактивированные вирусы [1]. Недостатки известного средства заложены уже в самой схеме вакцинации: для впервые вакцинируемых требуется три инъекции, выполняемые с определенным интервалом в первый год, и затем по одной инъекции в последующие два года или раз в два года, в зависимости от вида вакцины. Такие растянутые сроки свидетельствуют о слабом индуцировании иммунитета и иммунологической памяти. Но самый главный недостаток заключается в том, что ни одна вакцина, тем более убитая моноштаммовая, не может обладать надежным защитным эффектом в связи с выраженной гетерогенностью популяции вируса клещевого энцефалита, которая в настоящее время насчитывает около 200 штаммов. Заболевают привитые, когда антигенная характеристика штамма не соответствует таковой у вакцинного штамма.

Известна серопротекция и серотерапия, где в качестве средства против клещевого энцефалита используются иммунные сыворотки. Серотерапия оказывает негативное влияние на активный иммуногенез, выражающееся в депрессии функции В-лимфоцитов, снижении синтеза и накоплении вирус-нейтрализующих антител и антигемагглютининов, персистенции вируса [2]. Серотерапия при очаговых формах клещевого энцефалита показана только в детском и молодом возрасте, у лиц старше 40 лет серопрепараты оказывают негативное действие. При менингеальной форме клещевого энцефалита на фоне специфической иммунотерапии чаще наблюдаются летальные исходы.

Известен специфический человеческий иммуноглобулин для профилактики и лечения клещевого энцефалита, используемый в практическом здравоохранении. Однако препарат имеет недостаточную эффективность, ограниченное производство и характеризуется отсутствием иммуностимулирующего эффекта [3].

Приведенные аналоги не решают проблему борьбы с клещевым энцефалитом, о чем свидетельствуют высокая смертность, стойкие остаточные явления, длительный реабилитационный период и необходимость использования неспецифических лекарственных средств, дополняющих специфическое лечение (противовоспалительные, дезинтоксикационные, дегидратирующие, противогистаминные, десенсибилизирующие, седативные, общеукрепляющие, рассасывающие и другие препараты).

Наиболее близким по назначению и достигаемому эффекту к заявляемому средству является химиотерапевтический препарат 4-йодантипирин [4]. В экспериментальном клещевом энцефалите при дозе препарата 50 мг/кг живого веса и двукратном введении его за 24 и за 1 час до заражения профилактический эффект достигает 47%. В лечебной схеме при введении 50 мг/кг йодантипирина в течение 11 дней ежедневно защитный эффект составляет 60% при введении через рот и 53,4% при парэнтеральном способе применения. ЛД<sub>50</sub> (доза, вызывающая гибель 50% животных) и максимально переносимая доза (МПД) этого препарата составляют 1000 мг/кг и 500 мг/кг, соответственно. Следует заметить, что вирусный штамм Абсеттаров, с которым работали при исследовании известного средства, характеризуется пониженной патогенностью.

Недостатками известного средства являются непродолжительность профилактического эффекта и высокая токсичность препарата, которая вообще характерна для большинства химических препаратов. Так, действующая доза 50 мг/кг в 20 раз отличается от летальной, а максимально переносимая - 500 мг/кг - только в 2 раза. Кроме того, доза 50 мг/кг сама по себе является очень большой. В расчете на человека среднего веса (60 кг) на один прием требуется 3 г лекарства. Использование таких больших доз увеличивает вероятность нежелательных побочных эффектов и идет вразрез с тенденциями современной фармакологии, стремящейся к максимальному снижению доз препаратов за счет их высокой эффективности.

Поэтому поиск эффективных и малотоксичных средств для профилактики и лечения вирусного клещевого энцефалита является в настоящее время актуальной задачей.

Указанная задача решена применением препарата КД в качестве средства, обладающего профилактическим и лечебным действием при заражении вирусом клещевого энцефалита.

Препарат КД или кукумариозид представляет собой сумму тритерпеновых гликозидов и

получен из доступного природного сырья, а именно из отвара голотурии *Cucumaria japonica* [5]. Известно применение препарата КД в ветеринарии в качестве иммуномодулирующего и биостимулирующего средства [6], в качестве средства для профилактики и лечения алеутской болезни норки [7] и в качестве средства для лечения лучевой болезни [8]. Известно также применение кукумариозида в качестве средства, обладающего активностью против вирусов везикулярного стоматита, полиомиелита, энцефаломиокардита мышей, Коксаки А 7 и В7, герпеса, болезни Нью-Кастла и аденовируса [9].

Применение препарата КД (кукумариозида) в качестве средства для профилактики и лечения клещевого энцефалита обнаружено авторами впервые.

Новая функция кукумариозида не вытекает с очевидностью из его известных свойств и состава. Активность кукумариозида в опытах *in vitro* против нескольких вышеперечисленных вирусов не означает то, что препарат непременно будет обладать и активностью против вируса клещевого энцефалита. Отсутствие подобной зависимости подтверждается литературными данными [10] и нашими собственными экспериментами.

Технический результат достигается за счет пролонгированного действия препарата КД при профилактическом применении и чрезвычайно низких доз препарата, требуемых для достижения сопоставимых с прототипом эффектов, что обусловлено его исключительно высокой активностью. Так в экспериментах на мышах при введении кукумариозида в дозе  $3,5 \times 10^{-3}$  мкг/кг за 7 дней до заражения индекс защиты составляет 57%, при введении через 24 и 48 часов после заражения в той же дозе индекс защиты равняется 44%.

ЛД<sub>50</sub> для мышей при внутрибрюшинном введении составляет 29 мг/кг. Цитогенетическая оценка мутагенного действия показала, что в микроядерном тесте в полихроматофильных эритроцитах костного мозга мышей среднее число микроядер не отличается от контроля; при учете структурных нарушений хромосом в клетках костного мозга метафазы со структурными aberrациями хромосом не отличаются от контроля. Следует заметить, что все работы проводились со штаммом Николаенко, изолированным в 1978 г. из мозга умершего от клещевого энцефалита и обладающим высокой церебральной и периферической активностями при заражении мышей. Поэтому работа с высоковирулентным штаммом Николаенко, выделенным в Приморском крае, имеет большое значение в связи с особенностями клинических проявлений клещевого энцефалита в этом регионе: тяжелым течением инфекции и высокой летальностью, достигающей в отдельные годы 25-30%.

Изобретение расширяет арсенал средств заявленного назначения.

Пример. Определение противовирусной активности препарата КД проводили на нелинейных белых мышах массой 14 г по общепринятой методике [11]. Мышей инфицировали путем внутрибрюшинного введения вируса клещевого энцефалита (штамм Николаенко) в количестве 10 ЛД<sub>50</sub> в объеме 0,2 мл физиологического раствора. Титр вируса был равен 2 lg ЛД<sub>50</sub>/0,2 мл.

Кукумариозид вводили подкожно 1 раз в сутки в дозах  $3,5 \times 10^{-4}$ ,  $3,5 \times 10^{-3}$ ,  $3,5 \times 10^{-2}$  и  $3,5 \times 10^{-1}$  мкг/кг в 0,2 мл физиологического раствора. На каждое определение брали по 20 мышей.

Проведено 3 серии испытаний противовирусной активности: в первой серии исследовали профилактическое применение заявляемого средства - кукумариозид вводили однократно за 7 дней до заражения мышей вирусом клещевого энцефалита. Во второй серии проводили одновременное введение кукумариозида и вируса. В третьей серии проводили исследование лечебного эффекта кукумариозида, осуществляя однократное введение кукумариозида через 24 часа после заражения и двукратное введение препарата через 24 и 48 часов после заражения.

Все серии опытов сопровождалась контролем (группы неинфицированных мышей, которым вводили кукумариозид, а также группы инфицированных вирусом клещевого энцефалита мышей, не подвергавшихся лечебному или профилактическому воздействию испытуемого препарата).

Срок наблюдения за всеми животными 21 день.

Эффективность действия препарата КД характеризовали индексом защиты (ИЗ), который рассчитывали по формуле:

$$K_3 = \frac{(K_2 - 1)100}{K_2} \%,$$

где

$K_3$  - коэффициент защиты, вычисленный по формуле:

$$K_2 = \frac{\% \text{ мышей, павших в контроле}}{\% \text{ мышей, павших в опыте}}$$

Результаты испытаний приведены в таблице.

Исследование профилактического и лечебного действия препарата КД

Доза препарата КД, мкг/кг	Индекс защиты, %		
	Профилактическая схема	Лечебная дву- кратная схема	Одновременная схема
$3,5 \times 10^{-4}$	25±1	25±1	22±1
$3,5 \times 10^{-3}$	57±3	44±2	7±1
$3,5 \times 10^{-2}$	24±1	10±1	0
$3,5 \times 10^{-1}$	0	0	0

В результате экспериментов подобрана наиболее эффективная доза препарата КД -  $3,5 \times 10^{-3}$  мкг/кг. Выявлено значительное снижение летальности мышей, зараженных высоковирулентным штаммом Николаенко, при применении кукумариозида по профилактической и лечебной двукратной схемам. Так при введении за 7 дней до заражения в дозе  $3,5 \times 10^{-3}$  мг/кг кукумариозид дает индекс защиты 57%. При введении кукумариозида дважды через 24 и 48 часов после заражения в той же дозе индекс защиты составляет 44%. Одновременное с заражением применение кукумариозида не дает заметного защитного эффекта (не более 20%), к тому же реализация такой схемы практически невозможна в реальных условиях.

Таким образом, заявляемое средство в профилактической схеме превосходит прототип как по длительности эффекта, так и по величине (57% за 7 суток до заражения для заявляемого средства и 47% за сутки до заражения для прототипа), и достаточно активно в лечебной схеме. Большим преимуществом препарата КД является его чрезвычайно низкая токсичность в применяемых дозах (отличается от ЛД<sub>50</sub> в  $10^6$  раз), а также пролонгированное профилактическое действие против вируса клещевого энцефалита, что избавляет от необходимости ежедневного приема противовирусного препарата.

#### Источники информации

1. Леонова Г.Н. Клещевой энцефалит в Приморском крае. - Владивосток - 1997. - С.165-179.
2. Переходова С.К., Дуринова В.П., Шматко В.Г. и др. в кн. Природно-очаговые болезни (вопросы лабораторной диагностики, эпидемиологии и профилактики). - Омск, 1982. - С.56-62.
3. RU 2158606 C1, A 61 K 39/395, A 61 P 31/0027, 10.11.2000.
4. RU 2025126 C1, A 61 K 31/41, 30.12.1994.
5. RU 2110522 C1, C 07 H 3/06, 10.05.1998.
6. ТУ 9388-018-02698170-94 на препарат КД (кукумариозид). Зарегистрированы Приморским центром стандартизации и метрологии №035/001357 от 05.05.1994.
7. RU 2036654 C1, A 61 K 35/78, 09.06.1990.
8. RU 2141833 C1, A 61 K 35/56, 27.11.1999.
9. RU 2184556 C1, A 61 K 35/56, A 61 P 31/12, 10.07.2002.
10. R.Pompei, O.Flore, M.A.Marccialis, A.Pani, B.Loddo.//Nature/ - 1979 - Vol.281. - P.689
11. Оценка специфического действия антивирусных веществ при экспериментальных вирусных энцефалитах. - Бел. НИИ эпидемиологии и микробиологии Минздрава БССР. - 1986.

#### Формула изобретения

Применение препарата КД в качестве средства, обладающего профилактическим и лечебным действием при заражении вирусом клещевого энцефалита.