

(12) МЕЖДУНАРОДНАЯ ЗАЯВКА, ОПУБЛИКОВАННАЯ В
СООТВЕТСТВИИ С ДОГОВОРом О ПАТЕНТНОЙ КООПЕРАЦИИ (РСТ)

(19) Всемирная Организация
Интеллектуальной Собственности
Международное бюро



(10) Номер международной публикации
WO 2019/216791 A1

(43) Дата международной публикации
14 ноября 2019 (14.11.2019)

WIPO | PCT

(51) Международная патентная классификация :
A 61K 39/12 (2006.01) A 61P 31/14 (2006.01)
A 61K 47/04 (2006.01)

(21) Номер международной заявки : PCT/RU2019/000259

(22) Дата международной подачи :
18 апреля 2019 (18.04.2019)

(25) Язык подачи : Русский

(26) Язык публикации : Русский

(30) Данные о приоритете :
20181 16987 07 мая 2018 (07.05.2018) RU

MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,
OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Указанные государства (если не указано иначе, для
каждого вида региональной охраны) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ,
UG, ZM, ZW), евразийский патент (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU,
TJ, TM), европейский патент (AL, AT, BE, BG, CH, CY,
CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT,
LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE,
SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN,
GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Изобретатель ; и
(71) Заявитель : ЛАСКАВЫЙ , Владислав Николаевич
(LASKAVY, Vladislav Nikolaevich) [RU/RU]; ул. Усть -
Курдюмская , 4, к.в. 174 г. Саратов , 410018, g. Saratov
(RU).

(74) Агент : ГЕМБИЦКАЯ , Елена Ивановна
(GEMBITSKAYA, Elena Ivanovna); ул. Посадского ,
228/244, кв. 59 г. Саратов , 410005, g. Saratov (RU).

Декларации в соответствии с правилом 4.17:
— об авторстве изобретения (правило 4.17 (iv))

Опубликована :
— с отчётом о международном поиске (статья 21.3)

(81) Указанные государства (если не указано иначе, для
каждого вида национальной охраны) : AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN,
HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP,
KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME,

(54) Title: AGENT FOR PREVENTING VIRAL INFECTIONS

(54) Название изобретения : СРЕДСТВО ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

(57) Abstract: The invention relates to medicine and veterinary medicine, and more specifically to pharmacology, and can be used to prevent viral infections caused by RNA viruses that have a lipid envelope, in particular influenza, transmissible gastroenteritis of swine and other viral infections. The invention expands the range of agents for the claimed purpose. The technical problem of the claimed invention is the expansion of the range of antiviral prophylactic preparations and the formation of new approaches to the problem of preventing human viral diseases, particularly influenza, by intracellular suppression of the virus. A means for preventing viral infections comprises viral material from RNA viruses that have a lipid envelope, and stabilized colloidal selenium at a 1:1 ratio of viral material to stabilized colloidal selenium. The viral material from RNA viruses has titers of 6.0-8.0 Ig TCD50_{mi}. To obtain colloidal selenium having particle sizes from 10 to 15 nm, the colloidal selenium is stabilized with polyethylene glycol, and for colloidal selenium having particle sizes from 20 to 40 nm, the colloidal selenium is stabilized with cysteine. The stabilized colloidal selenium has a concentration of 6.0-6.2%.

(57) Реферат : Изобретение относится к медицине и ветеринарии , а более конкретно - к фармакологии и может использоваться для профилактики вирусных инфекций , вызванных РНК -содержащими вирусами , имеющими липидную оболочку , в частности , гриппа , трансмиссивного гастроэнтерита свиней и других вирусных инфекций . Изобретение расширяет арсенал средств заявленного назначения . Технической проблемой заявляемого изобретения является расширение спектра противовирусных профилактических препаратов и формирование новых подходов к проблеме профилактики вирусных заболеваний человека , особенно гриппа , за счет внутриклеточного подавления вируса . Средство для профилактики вирусных инфекций содержит вирусный материал из РНК -содержащих вирусов , имеющих липидную оболочку , и стабилизированный коллоидный селен при соотношении вирусного материала к стабилизированному коллоидному селену 1:1. Вирусный материал из РНК -содержащих вирусов имеет титры 6,0-8,0 Ig ТЦД 5₀/мл. Для получения коллоидного селена с размерами частиц от 10 до 15 нм коллоидный селен стабилизируют полиэтиленгликолем , а коллоидного селена с размерами частиц от 20 до 40 нм - цистеином . Стабилизированный коллоидный селен имеет концентрацию 6,0-6,2%.



WO 2019/216791 A1

СРЕДСТВО ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

5 Изобретение относится к медицине и ветеринарии , а более конкретно
- к фармакологии и может использоваться для профилактики вирусных
инфекций , вызванных РНК -содержащими вирусами , имеющими липидную
оболочку , в частности , гриппа , трансмиссивного гастроэнтерита свиней и
других вирусных инфекций . Изобретение расширяет арсенал средств
10 заявленного назначения .

Наиболее распространенными вирусными инфекциями у людей
являются грипп и простуда . Каждый год приблизительно 10-20%
населения земного шара заболевают гриппом , а простуда - наиболее часто
возникающая инфекция у людей .

15 Существует множество неспецифических препаратов для
профилактики вирусных инфекций , например , гриппферон , арбидол ,
ацикловир . Наряду с широко применяемыми неспецифическими
профилактическими препаратами разрабатываются и новые - на основе
растений (патенты РФ N22505306, 2393871), мицелия грибов (патент РФ
20 N°2522880), дипептида (патент РФ N22429875) и пр.

В частности , известно средство для профилактики вирусных
инфекций , (см. патент РФ N2 2505306 по кл. МГЖ А 61К 36/185, опуб .
27.01.2014), содержащее водный экстракт листьев и ветвей растений рода
Ribes. Средство предназначено для использования при вирусных
25 инфекциях , включая простуду с первичной инфекцией , вызываемой
риновирусами , аденовирусами и/или коронавирусами , грипп , вирусную
инфекцию , вызванную ретровирусами .

Поскольку средство представляет собой растительный экстракт , то
оно является многокомпонентной системой , которая может проявлять не

только положительные действия на вирусы , но и изменять резистентность организма человека и животных .

Другую группу профилактических препаратов составляют специфические средства (вакцины) .

5 Общим свойством всех существующих вакцин является то, что они действуют в отношении конкретного серотипа возбудителя и его антигенного состава .

В частности , известно средство для профилактики вирусных инфекций на основе холодаадаптированного штамма вируса гриппа
10 А/Краснодар /101/59/35 (H2N2) (см. Патент РФ № 2354695 по кл. МПК C12N7/00, опуб . 10.05.2009), содержащее данный штамм в десятикратном разведении , 1% раствор глютамата хитозония и 0,9% раствор хлорида натрия .

Однако , средство действует только в отношении определённого вида
15 вируса (H2N2). Причём , действие данной живой вакцины направлено не на сам вирус , а на усиление иммунного ответа организма .

Наиболее близким к заявляемому является средство для профилактики вирусных инфекций , в частности трансмиссивного гастроэнтерита свиней (см. патент РФ № 2463073 по кл. МПКА 61K 39/225
20 опуб . 10.10.2012), содержащее вирусный материал из штамма «ВН-96» вируса трансмиссивного гастроэнтерита свиней в титре $7,0-7,2 \lg_{\text{тцд}} 50_{\text{мл}}$ и физиологический раствор в определённых процентных соотношениях .

Однако , данное средство направлено на профилактику трансмиссивного гастроэнтерита только определённого серотипа
25 возбудителя и неэффективно при иммунодефицитных состояниях животных .

Таким образом , приведенные аналоги не решают проблему внутриклеточного подавления вируса , они только способствуют коррекции иммунитета . Создание противовирусных средств является далеко не

решенной задачей. Поэтому поиск новых средств защиты от вирусных инфекций весьма актуален.

Технической проблемой заявляемого изобретения является расширение спектра противовирусных профилактических препаратов и формирование новых подходов к проблеме профилактики вирусных заболеваний человека, особенно гриппа, за счёт внутриклеточного подавления вируса.

Достижимый при этом технический результат заключается в создании простого и недорогого средства для профилактики вирусных заболеваний человека и животных, вызываемых РНК-содержащими вирусами с липидной оболочкой, позволяющего быстро и с минимальными затратами (путём однократного или двукратного введения) проводить профилактику вирусных заболеваний независимо от серотипов вируса (разновидности возбудителя) и его антигенного состава за счёт активизации завершённого фагоцитоза вирусов без повышения титра специфических вируснейтрализующих антител.

Для достижения заявляемого результата предложено средство для профилактики вирусных инфекций, содержащее вирусный материал из РНК-содержащих вирусов, имеющих липидную оболочку, и стабилизированный коллоидный селен.

Соотношение весовых частей вирусного материала к стабилизированному коллоидному селену составляет 1:1.

Вирусный материал из РНК-содержащих вирусов имеет титры $6,0 \cdot 10^8$ ТЦД₅₀/мл.

Для получения коллоидного селена с размерами частиц от 10 до 15 нм коллоидный селен стабилизируют полиэтиленгликолем, а коллоидного селена с размерами частиц от 20 до 40 нм — цистеином.

Стабилизированный коллоидный селен имеет концентрацию $6,0 \cdot 10^6$ 2%

В известных авторам источниках патентной и научно-технической документации не описано средства для профилактики вирусных инфекций на основе вирусного материала и стабилизированного коллоидного селена, взятых в равных частях, позволяющего проводить профилактику вирусных заболеваний независимо от разновидности возбудителя и его антигенного состава за счёт активизации завершённого фагоцитоза и, как следствие, внутриклеточного подавления вируса.

По мнению авторов, селен с размерами частиц 10-40 нм способен поглощаться фагоцитирующими клетками. Коллоидные частицы селена защищают липидную оболочку вируса от воздействия ферментов клеток макроорганизма. Фагоцит захватывает образованные комплексы селен-вирус и подвергает их «перевариванию» благодаря создавшемуся объёму для захвата (фагоцитирования) частиц вирусов, ставших соизмеримыми с бактериями. Это позволяет доставить все структурные элементы вируса (липиды, белки, РНК) в фагоцитирующие клетки, что способствует полному иммунному ответу и развитию «памяти» фагоцитов для дальнейшей защиты макроорганизма от вирусных инфекций.

Известно, что селен – это естественный метаболит (см., например; <http://ru.wikipedia.org/wiki/>; ; <http://www.zdorove-plus.ru/page315.html>; ; <http://www.eliform.com/minerals-selenium.html>), участвующий в биохимических процессах организма. Как естественный метаболит он не накапливается в клетках, а используется как активизатор обменных процессов в фагоцитах.

Именно коллоидный селен с размерами частиц 10-40 нм в комплексе с вирусными частицами является уникальным стимулятором иммунной защиты макроорганизма на уровне специфического завершённого фагоцитоза.

Таким образом, авторами впервые установлено неочевидное свойство, заключающееся в участии фагоцитов в иммунной защите от

вирусных инфекций. Заявляемое изобретение основано на новом механизме иммунной защиты, обусловленном участием фагоцитов в иммунном процессе при вирусных инфекциях, отсутствием увеличения количества антител к возбудителям и наличием «памяти» в фагоцитирующих клетках. То есть защита есть, а антител нет или они образуются в минимальных количествах.

Сказанное позволяет сделать вывод о наличии в заявляемом решении критерия «изобретательский уровень».

Коллоидный селен представляет собой наноразмерные частички селена в растворе (см., например, <http://testvich.ru/entsiklopediya/kolloidnyiy-selen-zoloto>). Коллоидный селен получают восстановлением разбавленных водных растворов растворимого селена оксидом серы (IV), гидразингидратом, декстрозой, трихлоридом титана или пропусканием электрического тока через раствор селенистой кислоты (анод — платиновый, катод — покрыт селеном), а также другими способами. Цвет коллоидного селена зависит от условий осаждения и изменяется от фиолетового до красного; плотность такая же, как и порошкообразного селена (см., например, <http://ibrain.kz/himiya-svoystva-elementov/selen>).

Хорошо известно (см., например, http://texnosila.narod.ru/Foton/nanoteh/Examp1_KOAKR3.html), что коллоидные растворы обладают нестабильными свойствами. Нестабильные свойства определяются многими факторами — температурой, плотностью раствора, материалом, количеством и размером частиц, наличием таких внешних воздействий, как вибрация основания, присутствие электромагнитных полей, излучений. Все эти факторы существенно влияют на равновесное состояние коллоидной среды,

В заявляемом изобретении использовали в качестве стабилизирующих факторов добавление к коллоидному раствору селена либо полиэтиленгликоля (при размере частиц селена в растворе 10-15 нм)

либо цистеина (при размере частиц селена 20-40 нм), либо белка сыворотки молока (при размере частиц 100 нм и выше). При этом, выбор того или иного стабилизатора был осуществлён экспериментальным путём, зависел от технологии приготовления препарата.

5 Вирусный материал был получен при культивировании штаммов: вируса трансмиссивного гастроэнтерита и гриппа.

Штамм вируса трансмиссивного гастроэнтерита «ВН-9б» - депонирован во Всероссийском государственном научно-исследовательском институте контроля, стандартизации и сертификации
10 ветеринарных препаратов и кормов (ВГНКИ) (справка о депонировании № 1103/19 от 27 мая 2009). Выделен в 1988 году из вакцинного штамма «РИМС» на перевиваемой культуре СПЭВ (крупнобляшечный вариант), авирулентный для свиней, титр вируса 7,0 lg тцд 50/мл.

Штамм вируса гриппа А/Краснодар /101/35/59 (H2N2)
15 зарегистрирован в коллекции депозитария НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского (№ 2439 от 09.06.2008). Предназначен в качестве штамма-донора аттенуации для получения реассортантных живых гриппозных вакцин (см. патент РФ № 2354695). Штамм получен методом серийных пассажей в куриных эмбрионах и культуре клеток MDCK при пониженной
20 температуре с последующим 3-х кратным клонированием методом бляшек в культуре клеток MDCK, что обеспечивает генетическую гомогенность штамма.

Средство для профилактики вирусных инфекций представляет собой раствор красно-коричневого цвета, без запаха.

25 Для получения вирусного материала берут исходный штамм вируса (в частности, штамм вируса трансмиссивного гастроэнтерита «ВН-9б», штамм вируса гриппа А/Краснодар /101/35/59 (H2N2)), с определённым титром и доводят его до титра (6,0-8,0) lg ТЦД 50_{мл}.

При этом, для профилактики гриппа предпочтителен вирусный материал с титром $8,0 \text{ Ig}$; ТЦД $50/\text{мл}$ профилактики трансмиссивного гастроэнтерита — с титром $7,0 \text{ Ig}$; ТЦД $50/\text{мл}$.

Вирусный материал хранят при температуре минус $18-20^\circ\text{C}$.

5 Изобретение иллюстрируется следующими примерами.

Пример 1. Пример приготовления коллоидного селена с размером частиц $10-15 \text{ нм}$.

Берут 100 мг селенита натрия, содержащего 40 мг селена и растворяют его в 10 мл дистиллированной воды.

10 Берут $0,52 \text{ г}$ солянокислого гидрозина и растворяют в 5 мл дистиллированной воды.

В коническую колбу вносят 10 мл селенита натрия и сразу же приливают 5 мл гидрозина.

15 Раствор перемешивают на магнитной мешалке при 450 об/мин без нагревания до появления интенсивного окрашивания кирпично-красного цвета (выпадение в осадок аморфного селена) в течение 10 минут .

В колбу приливают 10 мл полиэтиленгликоля (ПЭГ-200) и смесь нагревают до 150°C при интенсивном перемешивании до полного испарения воды (наблюдается прекращение кипения).

20 После испарения воды на колбу ставят дефлегматор и поднимают температуру до 220°C на $15-30 \text{ минут}$. Смесь охлаждают до комнатной температуры.

Центрифугируют при 4200 об/мин в течение 20 минут .

Надосадок ставят на диализ против фосфатносолевого буфера $\text{pH } 7,2$.

25 Полученную смесь концентрируют на роторном испарителе с вакуумом при 70°C и скорости вращения 50 об./мин . (25 мл смеси концентрируют до 15 мл). Затем к полученному осадку добавляют физиологический раствор до получения концентрации коллоидного селена $0,062 \text{ мг/мл}$ ($6,2\%$).

Размер частиц селена, определённый с использованием электронного микроскопа LIBRA 120 (Carl Zeiss, Германия), составил 10-15 нм.

Пример № 2. Пример приготовления коллоидного селена с размером частиц 20-40 нм.

5 К раствору 0,01M L - цистеина при постоянном перемешивании при комнатной температуре добавляют по каплям раствор 0,001M селенистой кислоты (H_2SeO_3) в отношении объемов 1:1.

Затем к полученному осадку добавляют физиологический раствор до получения концентрации коллоидного селена 0,061 мг/мл (6,1%).

10 Размер частиц селена, определённый с использованием электронного микроскопа LIBRA 120 (Carl Zeiss, Германия), составил 20-40 нм.

Пример № 3. Пример приготовления коллоидного селена с размером частиц 100-140 нм. Этот коллоидный селен был использован в дальнейших экспериментах также для получения профилактического средства для
15 доказательства эффективности достигаемого результата.

К 2 мл дистиллированной воды добавляют 0,5 мл 1M раствора солянокислого гидразина и 0,125 мл 1M селенита натрия (бурно развивается желто-оранжевая окраска). В течение 30 секунд данный раствор вносят в белок сыворотки молока.

20 Смесь перемешивают в течение 1 часа. После появления оранжевого окрашивания реакцию останавливают 1M раствором гидроксида натрия доведением pH до 7,62. Полученный раствор диализуют против 0,01 M фосфатно-солевого буфера, затем смесь концентрируют.

К полученному осадку добавляют физиологический раствор до
25 получения концентрации коллоидного селена 0,060 мг/мл (6,0%).

Размер частиц селена, определённый с использованием электронного микроскопа LIBRA 120 (Carl Zeiss, Германия), составил 100-140 нм.

Полученная в примерах 1-3 концентрация коллоидного селена (6,0-6,2%) обеспечивает стабильное состояние субстанции селена с размерами

частиц 110-140 нм. Экспериментально было показано, что концентрация селена менее 6,0% и более 6,2% приводит к нарушению требуемых размеров частиц селена или коагуляции селена.

5 Пример № 4

Средство для профилактики вирусных инфекций готовят следующим образом.

Берут 1 мл вирусного материала из штамма «ВН-96» вируса трансмиссивного гастроэнтерита свиней в титре $7,0 \text{ Ig TCD}_{50/\text{мл}}$, добавляют к нему 1 мл стабилизированного коллоидного селена с размером частиц **20-40 нм**, полученную смесь перемешивают.

Готовое средство для профилактики вирусных инфекций представляет собой жидкость красно-коричневого цвета.

Аналогично описанному в примере 4 готовят вирусный материал из штаммов вируса гриппа А/Краснодар /101/35/59 (H2N2).

15 Пример № 5.

Обоснование профилактических свойств заявляемого препарата против гриппа.

В эксперименте было использовано 70 белых мышей, распределённых по 7 группам (по 10 голов в каждой), из которых 2 были контрольными и 5 - опытными группами.

В первой контрольной группе мышей ничем не иммунизировали.

Во второй контрольной группе мышей иммунизировали подкожно препаратом, содержащим 0,1 мл физиологического раствора и 0,1 мл штамма вируса гриппа А/Краснодар /101/35/59 (H2N2) — с титром $8,0 \text{ Ig TCD}_{50/\text{мл}}$. Препарат вводили дважды с интервалом 14 дней.

Во всех опытных группах препарат вводили также подкожно дважды с интервалом между введениями 14 дней.

При этом, в первой опытной группе мышей иммунизировали препаратом, содержащим 0,1 мл коллоидного селена с размером частиц **10-15** нм, стабилизированного полиэтиленгликолем (ПЭГ), и 0,1 мл вирусного материала из штамма вируса гриппа А/Краснодар /101/35/59 (H2N2) – с титром $8,0 \text{ Ig тцд}_{50/\text{мл}}$.

Во второй опытной группе мышей иммунизировали препаратом, содержащим 0,1 мл стабилизированного цистеином коллоидного селена с размером частиц **20-40** нм и 0,1 мл вирусного материала из штамма вируса гриппа А/Краснодар /101/35/59 (H2N2) – с титром $8,0 \text{ Ig тцд}_{50/\text{мл}}$.

В третьей опытной группе мышей иммунизировали препаратом, содержащим 0,1 мл стабилизированного белком сыворотки молока коллоидного селена с размером частиц **100-140** нм и 0,1 мл вирусного материала из штамма вируса гриппа А/Краснодар /101/35/59 (H2N2) – с титром $8,0 \text{ Ig тцд}_{50/\text{мл}}$.

В четвертой и пятой опытных группах мышей иммунизировали препаратом, содержащим 0,1 мл стабилизированного цистеином коллоидного селена с размером частиц **20-40** нм и 0,1 мл вирусного материала из штамма вируса гриппа А/Краснодар /101/35/59 (H2N2) – с титром $7,0 \text{ Ig тцд}_{50/\text{мл}}$ (четвертая группа) и с титром $6,0 \text{ Ig тцд}_{50/\text{мл}}$ (пятая группа).

Через 28 дней после первого введения препарата все группы мышей были инфицированы интраназально вирулентным штаммом А/Брисбейн /59/07 (H1N1) в дозе $2,0 \text{ Ig тцд}_{50/0,05\text{мл}}$.

Через 72 часа после инфицирования вирулентным штаммом мышей были умерщвлены с соблюдением этических принципов обращения с лабораторными животными. У мышей были извлечены легкие и из легких была приготовлена 10% суспензия в ступках с тертым стеклом. 10-кратные разведения данной суспензии были внесены в куриные 9-дневные эмбрионы.

Через 48 часов инкубации инфицированных куриных эмбрионов при 37° С в термостате, эмбрионы помещались в холодильник при 4° С на 18-24 часа.

Затем эмбрионы вскрывались, отсасывалась аллантоисная жидкость и определялся титр вирусов в легких у каждой из групп мышей с помощью реакции гемагглютинации. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1

10

Наименование групп мышей	Состав препарата		Инфекционный титр штамма А/Брисбейн/59/07 (H1N1) в легких иммунизированных мышей	Титр антител к штамму А/Краснодар/101/35/59 в ИФА
	Вирусный материал из штамма А/Краснодар/101/35/59 (H2N2)	Стабилизированный коллоидный селен		
1 контроль	Не иммунизированные мыши		4,5 lg ТЦД ₅₀ /0,2мл	-
2 контроль	с титром 8,0 lg ТЦД ₅₀ /мл. в количестве - 0,1 мл	физраствор в количестве 0,1 мл	5,0 lg ТЦД ₅₀ /0,2мл	640
1 опытная	с титром 8,0 lg ТЦД ₅₀ /мл. в количестве - 0,1 мл	С размером частиц 10-15 нм в количестве 0,1 мл	3,0 lg ТЦД ₅₀ /0,2мл	1280
2 опытная	с титром 8,0 lg ТЦД ₅₀ /мл. в количестве - 0,1 мл	С размером частиц 20-40 нм в количестве 0,1 мл	1,0 lg ТЦД ₅₀ /0,2мл	160
3 опытная	с титром 8,0 lg ТЦД ₅₀ /мл. в количестве - 0,1 мл	С размером частиц 100-140 нм в количестве 0,1 мл	4,5 lg ТЦД ₅₀ /0,2мл	640
4 опытная	с титром 7,0 lg ТЦД ₅₀ /мл. в количестве - 0,1 мл	С размером частиц 20-40 нм в количестве 0,1 мл	1,0 lg ТЦД ₅₀ /0,2мл	80

5 опытная	с титром 6,0 lg ТЦД _{50/мл} . в количестве - 0,1 мл	С размером частиц 20-40 нм в количестве 0,1 мл	1,0 lg ТЦД _{50/0,2мл}	80
-----------	---	--	-----------------------------------	----

Из таблицы 1 следует, что титр вирулентного штамма А/Брисбейн /59/07 (H1N1) в легких неиммунных мышей (контроль 1) равнялся 4,5 lg ТЦД_{50/0,2мл}.

Титр вирулентного штамма А/Брисбейн /59/07 (H1N1) в легких мышей, иммунизированных подкожно дозой штамма вируса гриппа А/Краснодар /101/35/59 (H2N2) с титром 8,0 lg ТЦД_{50/мл} ненамного отличался от титра в первом контроле - 5 lg ТЦД_{50/0,2мл}.

Однако, наблюдалось заметное снижение титра вирулентного штамма А/Брисбейн /59/07 (H1N1) в легких мышей, иммунизированных подкожно той же дозой штамма А/Краснодар /101/35/59 (H2N2) в комбинации с коллоидным селеном. При этом, при иммунизации препаратом с размером частиц 10-15 нм титр составил 3 lg ТЦД_{50/0,2мл}, а при иммунизации препаратом с размером частиц 20-40 нм наблюдалось тысячекратное снижение титра.

Не наблюдалось снижения инфекционного титра вирулентного штамма А/Брисбейн /59/07 (H1N1) в легких мышей, иммунизированных подкожно препаратом с размером частиц стабилизированного коллоидного селена 100 нм - 140 нм.

Исследования по использованию вирусного материала из штамма А/Краснодар /101/35/59 (H2N2) с титрами 7,0 lg ТЦД_{50/мл} и 6,0 lg ТЦД_{50/мл} в сочетании со стабилизированным коллоидным селеном с размерами частиц 20-40 нм показали (см. таблицу 1), что препарат с таким содержанием компонентов не даёт значительного повышения титров

специфических вируснейтрализующих антител (титр равен 80), что обеспечивает эффективную защиту от заражения.

Представленные в примере N 5 результаты исследований по определению эффективности защиты при заражении мышей вирулентным штаммом гриппа доказывают, что наилучшая эффективность защиты обеспечивается при введении препарата, содержащего стабилизированный коллоидный селен с размерами частиц 20-40 нм и вирусный материал с титром 6,0-8,0 Ig ТЦД₅₀/мл.

Дальнейшие исследования по обоснованию эффективной защиты от трансмиссивного гастроэнтерита проводили с использованием препарата, содержащего стабилизированный коллоидный селен с размерами частиц 20-40 нм и вирусный материал против вируса трансмиссивного гастроэнтерита – с титром 8,0 Ig ТЦД₅₀/мл.

Поскольку в примере 5 (см. таблицу 1) было показано, что эффективность защиты при гриппе коррелирует с пониженным, а не с повышенным содержанием специфических вируснейтрализующих антител к вирусу гриппа, то оценку эффективности защиты против трансмиссивного гастроэнтерита осуществляли по наличию специфических вируснейтрализующих антител к вирусу трансмиссивного гастроэнтерита на лабораторных животных, соответственно – на мышах и морских свинках, а не путём прямого заражения.

Пример №6.

Обоснование защитных свойств заявляемого препарата против трансмиссивного гастроэнтерита.

Для доказательства эффективности защиты было сформировано 3 группы морских свинок (по 5 животных в каждой группе).

Одна группа животных была контрольной, им вводили только физиологический раствор в дозе 0,5 мл.

Первой опытной группе животных вводили вирусный материал из штамма вируса трансмиссивного гастроэнтерита «ВН-96» с титром 7,0 lg ТЦД 50/мл в сочетании с физиологическим раствором (0,25 мл вирусного материала и 0,25 мл физиологического раствора).

Второй опытной группе вводили вирусный материал из штамма вируса трансмиссивного гастроэнтерита «ВН-96» с титром 7,0 lg ТЦД 50/мл в сочетании со стабилизированным коллоидным селеном (0,25 мл вирусного материала и 0,25 мл коллоидного селена) с размером частиц 20-40 нм, взятые в соотношении 1:1.

Через 28 дней после введения препаратов определяли титр специфических вируснейтрализующих антител в реакции нейтрализации. Результат представлен в таблице JV02.

15

Таблица 2

Наименование групп животных	Характеристика вводимого препарата	Титр специфических вируснейтрализующих антител
Контрольная	Физиологический раствор	0
1 опытная	Вирусный материал из штамма «ВН-96» с титром 7,0 lg ТЦД50/мл	1:128
2 опытная	Вирусный материал из штамма «ВН-96» с титром 7,0 lg ТЦД50/мл + стабилизированный коллоидный селен с размерами частиц 20-40 нм	1:8

Из таблицы 2 следует, что введение препарата, содержащего вирусный материал из штамма «ВН-96» с титром 7,0 lg ТЦД 50/мл в сочетании со стабилизированным коллоидным селеном с размерами

частиц 20-40 нм обеспечивает снижение титра специфических вируснейтрализующих антител с 1:128 до 1:8, т.е в 16 раз.

5 Таким образом, заявляемое средство для профилактики вирусных заболеваний человека и животных, вызываемых РНК-содержащими вирусами с липидной оболочкой, позволяет быстро и с минимальными затратами (путём однократного или двукратного введения) проводить профилактику вирусных заболеваний независимо от серотипов вируса (разновидности возбудителя) и его антигенного состава за счёт активизации завершённого фагоцитоза вирусов без повышения титра специфических вируснейтрализующих антител.

15 Заявляемое средство расширяет спектр противовирусных профилактических препаратов и позволяет решить проблему профилактики вирусных заболеваний человека, особенно гриппа, за счёт внутриклеточного подавления вируса.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Средство для профилактики вирусных инфекций, содержащее вирусный материал из РНК-содержащих вирусов, имеющих липидную оболочку, характеризующееся тем, что оно содержит стабилизированный коллоидный селен.

2. Средство для профилактики вирусных инфекций по п. 1, характеризующееся тем, что соотношение весовых частей вирусного материала к стабилизированному коллоидному селену составляет 1:1.

3. Средство для профилактики вирусных инфекций по п. 1, характеризующееся тем, что вирусный материал из РНК-содержащих вирусов имеет титры **6,0-8,0** Ig ТЦД 5^0 /мл.

4. Средство для профилактики вирусных инфекций по п. 1, характеризующееся тем, что стабилизированный коллоидный селен имеет размеры частиц 10-40 нм.

5. Средство для профилактики вирусных инфекций по п.1 и п. 4, характеризующееся тем, что оно содержит стабилизированный полиэтиленгликолем коллоидный селен с размерами частиц от 10 до 15 нм.

6. Средство для профилактики вирусных инфекций по п.1 и п. 4, характеризующееся тем, что оно содержит стабилизированный цистеином коллоидный селен с размерами частиц от 20 до 40 нм.

7. Средство для профилактики вирусных инфекций по п. 1, характеризующееся тем, что оно содержит стабилизированный коллоидный селен в концентрации 6,0-6,2 %.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/RU 2019/000259

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K 39/12 (2006.01); A61K 47/04 (2006.01); A61P 31/14 (2006.01) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K A61P Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatSearch (RUPTO internal), USPTO, PAJ, K-PION, Esp@cenet, Information Retrieval System of FIPS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	RU 2463073 C1 (GOSUDARSTVENNOE NAUCHNOE UCHREZHDENIE SARATOVSKII NAUCHNO-ISSLEDOVATELSKY VETERINARNY INSTITUT ROSSIISKOI AKADEMII SELSKOKHOZIAISTVENNYKH NAUK (GNU SARATOVSKII NIVI ROSSELKHOZAKADEMII) 10.10.2012, the abstract, p.3, lines 3-4, p.4, lines 6-13, p.5, lines 32-38, item 1 of the claims	1-7
A	Staroverov S.A. et al. Study of transmissible-gastroenteritis-virus-antigen-conjugated immunogenic properties of selenium nanoparticles and gold / Life Science Journal [online], 2014, 11(11), pp.456-460 [retrieved on 2019-08-20]. Found on http://www.lifesciencesite.com/ljsj/life1111/078_25876life111114_456_460.pdf , the abstract, p.457, the left column, para. 2, 3, 5	1-7
A	RU 2549495 C1 (OBSHESTVO S OGRANICHENNOI OTVETSTVENNOSTIU "NANOFARM-PRO") 27.04.2015, the abstract, p.3, lines 1-4, p.6, lines 24-26, p.8, lines 4-6	1-7
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 20 August 2019 (20.08.2019)		Date of mailing of the international search report 22 August 2019 (22.08.2019)
Name and mailing address of the ISA/ RU		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ

Номер международной заявки

PCT/RU 2019/000259

<p>A. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ <i>A61K 39/12 (2006.01)</i> <i>A61K 47/04 (2006.01)</i> <i>A61P 31/14 (2006.01)</i></p> <p>Согласно Международной патентной классификации МПК</p>													
<p>B. ОБЛАСТЬ ПОИСКА Проверенный минимум документации (система классификации с индексами классификации) А61К А61Р</p> <p>Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в поисковые подборки</p> <p>Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины) PatSearch (RUPTO internal), USPTO, PAJ, K-PION, Esp@cenet, Information Retrieval System of FIPS</p>													
<p>C. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ:</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Категория*</th> <th>Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей</th> <th>Относится к пункту №</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>RU 2463073 C1 (ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ САРАТОВСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ВЕТЕРИНАРНЫЙ ИНСТИТУТ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК (ГНУ САРАТОВСКИЙ НИВИ РОССЕЛЬХОЗАКАДЕМИИ) 10.10.2012, реферат, с.3, строки 3-4, с.4, строки 6-13, с.5, строки 32-38, п.1 формулы</td> <td>1-7</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>Staroverov S.A. et al. Study of transmissible-gastroenteritis-virus-antigen-conjugated immunogenic properties of selenium nanoparticles and gold / Life Science Journal [онлайн], 2014, 11(11), pp.456-460 [найдено 2019-08-20]. Найдено < http://www.lifesciencesite.com/lj/life1111/078_25876life111114_456_460.pdf>, реферат, с.457, левая колонка, абзацы 2, 3, 5</td> <td>1-7</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>RU 2549495 C1 (ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "НАНОФАРМ-ПРО") 27.04.2015, реферат, с.3, строки 1-4, с.6, строки 24-26, с.8, строки 4-6</td> <td>1-7</td> </tr> </tbody> </table>		Категория*	Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №	A	RU 2463073 C1 (ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ САРАТОВСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ВЕТЕРИНАРНЫЙ ИНСТИТУТ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК (ГНУ САРАТОВСКИЙ НИВИ РОССЕЛЬХОЗАКАДЕМИИ) 10.10.2012, реферат, с.3, строки 3-4, с.4, строки 6-13, с.5, строки 32-38, п.1 формулы	1-7	A	Staroverov S.A. et al. Study of transmissible-gastroenteritis-virus-antigen-conjugated immunogenic properties of selenium nanoparticles and gold / Life Science Journal [онлайн], 2014, 11(11), pp.456-460 [найдено 2019-08-20]. Найдено < http://www.lifesciencesite.com/lj/life1111/078_25876life111114_456_460.pdf >, реферат, с.457, левая колонка, абзацы 2, 3, 5	1-7	A	RU 2549495 C1 (ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "НАНОФАРМ-ПРО") 27.04.2015, реферат, с.3, строки 1-4, с.6, строки 24-26, с.8, строки 4-6	1-7
Категория*	Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №											
A	RU 2463073 C1 (ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ САРАТОВСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ВЕТЕРИНАРНЫЙ ИНСТИТУТ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК (ГНУ САРАТОВСКИЙ НИВИ РОССЕЛЬХОЗАКАДЕМИИ) 10.10.2012, реферат, с.3, строки 3-4, с.4, строки 6-13, с.5, строки 32-38, п.1 формулы	1-7											
A	Staroverov S.A. et al. Study of transmissible-gastroenteritis-virus-antigen-conjugated immunogenic properties of selenium nanoparticles and gold / Life Science Journal [онлайн], 2014, 11(11), pp.456-460 [найдено 2019-08-20]. Найдено < http://www.lifesciencesite.com/lj/life1111/078_25876life111114_456_460.pdf >, реферат, с.457, левая колонка, абзацы 2, 3, 5	1-7											
A	RU 2549495 C1 (ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "НАНОФАРМ-ПРО") 27.04.2015, реферат, с.3, строки 1-4, с.6, строки 24-26, с.8, строки 4-6	1-7											
<p><input type="checkbox"/> последующие документы указаны в продолжении графы C. <input type="checkbox"/> данные о патентах-аналогах указаны в приложении</p>													
<table border="0"> <tr> <td>* Особые категории ссылочных документов:</td> <td>“Г” более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение</td> </tr> <tr> <td>“А” документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным</td> <td>“Х” документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности</td> </tr> <tr> <td>“Е” более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее</td> <td>“У” документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда документ взят в сочетании с одним или несколькими документами той же категории, такая комбинация документов очевидна для специалиста</td> </tr> <tr> <td>“L” документ, подвергающий сомнению притязание(я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано)</td> <td>“&” документ, являющийся патентом-аналогом</td> </tr> <tr> <td>“O” документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию и т.д.</td> <td></td> </tr> <tr> <td>“P” документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета</td> <td></td> </tr> </table>		* Особые категории ссылочных документов:	“Г” более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение	“А” документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным	“Х” документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности	“Е” более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее	“У” документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда документ взят в сочетании с одним или несколькими документами той же категории, такая комбинация документов очевидна для специалиста	“L” документ, подвергающий сомнению притязание(я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано)	“&” документ, являющийся патентом-аналогом	“O” документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию и т.д.		“P” документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета	
* Особые категории ссылочных документов:	“Г” более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение												
“А” документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным	“Х” документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности												
“Е” более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее	“У” документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда документ взят в сочетании с одним или несколькими документами той же категории, такая комбинация документов очевидна для специалиста												
“L” документ, подвергающий сомнению притязание(я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано)	“&” документ, являющийся патентом-аналогом												
“O” документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию и т.д.													
“P” документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета													
<p>Дата действительного завершения международного поиска</p> <p>20 августа 2019 (20.08.2019)</p>	<p>Дата отправки настоящего отчета о международном поиске</p> <p>22 августа 2019 (22.08.2019)</p>												
<p>Наименование и адрес ISA/RU: Федеральный институт промышленной собственности, Бережковская наб., 30-1, Москва, Г-59, ГСП-3, Россия, 125993 Факс: (8-495) 531-63-18, (8-499) 243-33-37</p>	<p>Уполномоченное лицо: Милушкова Е.В. Телефон № (495) 531-65-15</p>												