

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **041522**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

- | | |
|---|--|
| <p>(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.11.01</p> <p>(21) Номер заявки
202000317</p> <p>(22) Дата подачи заявки
2020.10.07</p> | <p>(51) Int. Cl. <i>A61K 31/195</i> (2006.01)
<i>A61K 33/18</i> (2006.01)
<i>A61K 47/36</i> (2006.01)
<i>A61K 47/02</i> (2006.01)
<i>A61K 9/08</i> (2006.01)
<i>A61P 31/00</i> (2006.01)
<i>A61P 31/04</i> (2006.01)
<i>A61P 31/12</i> (2006.01)</p> |
|---|--|

(54) **ВЕТЕРИНАРНЫЙ ПРЕПАРАТ И СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ**

- | | |
|--|--|
| <p>(31) AM20190131</p> <p>(32) 2019.11.05</p> <p>(33) AM</p> <p>(43) 2021.05.31</p> <p>(96) EA/AM2020/000004 (AM) 2020.10.07</p> <p>(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ИЛЬИН АЛЕКСАНДР ИВАНОВИЧ (KZ); АГАДЖАНЯН ТИГРАН (AM)</p> <p>(72) Изобретатель:
Ильин Александр Иванович (KZ), Агаджанян Тигран (AM), Измайлов Тимур Хусанович (KZ)</p> <p>(74) Представитель:
Петросян А. (AM)</p> | <p>(56) KZ-A-15116
EA-B1-024595
БЕКЕШЕВА К.Б. Разработка и исследование новых лекарственных средств на основе аддукта йода, Дис. на соиск. ст. доктора философии, Республика Казахстан, Алматы, 2017, С. 151- особенно, описание, с. 41, табл. 1 абзацы 1-2, с. 49, рис. 7, абзацы 1-5, с. 88-96 главы: 4.3. Исследование противовирусной активности и 4.4. Исследование эффективности "in vitro" и "in vivo". Найдено из Интернет [он-лайн] на сайте 18.03.2021 URL: https://kaznmu.kz/rus/wp-content/uploads/2017/10/БЕКЕШЕВА-КУРАЛАЙ-БАКЫТНУРКЫЗЫ-1.pdf
EP-B1-1492821
ВЕРЕЩАК Н.А. и др. Коррекция йоддефицитного состояния у высокопродуктивных коров с применением кормовой добавки "Йоддар", Аграрный вестник Урала, 2012, № 10-1 (102), с. 13, 14</p> |
|--|--|

- (57) Изобретение относится к ветеринарии и может быть использовано для лечения и профилактики вирусных, бактериальных и микст-инфекций сельскохозяйственных и домашних животных, птиц и аквакультур. Ветеринарный препарат содержит активную фармацевтическую субстанцию, носитель, вспомогательные вещества и воду. В качестве активной фармацевтической субстанции содержит комплексное соединение глицина и йода (аддукт) - йод трийодоводород гексааминоуксусной кислоты $6C_2H_5NO_2 \cdot I_2 \cdot 3NH_3$, который интеркалирован в носителе. В качестве вспомогательных веществ препарат содержит хлорид лития, и/или йодид натрия, и/или йодид калия, и/или хлорид магния, и/или хлорид кальция, а в качестве носителя - водорастворимый полимер. Способ проводят следующим образом: посредством реакции комплексообразования в системе вода - аминокислота - йод - йодид калия или натрия синтезируют комплексное соединение - фармацевтическую активную субстанцию, затем ее интеркалируют в носитель. Реакцию комплексообразования осуществляют приготовлением водного раствора йода, глицина, хлорида лития, йодидов натрия и/или калия - с формированием йод трийодоводорода гексааминоуксусной кислоты ($6Gly \cdot I_2 \cdot 3NH_3$), а фармацевтическую активную субстанцию вводят в носитель реакцией интеркалирования в присутствии вспомогательных веществ. При этом повышается эффективность препарата.

B1**041522****041522 B1**

Область техники

Изобретение относится к ветеринарии и может быть использовано для лечения и профилактики вирусных, бактериальных и микст-инфекций сельскохозяйственных и домашних животных, птиц и аквакультур.

Уровень техники

Проблема терапии и профилактики опасных для животных инфекционных заболеваний не только сохраняет свое значение, но в последние годы становится все более актуальной.

Острой проблемой ветеринарии и медицины является возрастающее распространение атипичных штаммов микроорганизмов, в том числе высоковирулентных и резистентных к различным лекарственным препаратам и антибиотикам. На фоне этих заболеваний развиваются различного рода иммунные дефициты, снижается адаптационный потенциал организма животных и птиц. Ветеринарные препараты для лечения смешанных вирусно-бактериальных инфекций на рынке практически не представлены. Поэтому разработка противоинфекционных ветеринарных препаратов, способов их получения и применения является актуальной и важнейшей задачей.

В настоящее время существует значительный арсенал средств и способов профилактики инфекционных заболеваний, как специфических, так и общеукрепляющих. Однако по разным причинам лишь немногие из них имеют широкое практическое применение.

В патентной и научной литературе имеются сведения о специфических бактериальных средствах для лечения и профилактики инфекционных заболеваний сельскохозяйственных животных и птиц и коррекции иммунной недостаточности.

Например, известна комбинированная вакцина против сибирской язвы животных, содержащая протективный антиген вакцинного штамма 55 ВНИИВВиМ и живые споры вакцинного штамма СТИ-1 (патент РФ № 2220742, МПК А61К 39/07, опубл. 10.01.2004).

Известна ассоциированная вакцина против сальмонеллеза, пастереллеза и энтерококковой инфекции поросят. Вакцина содержит штаммы сальмонелл *S. cholerae suis* 370, пастерелл и стрептококков. Способ ее получения включает засев и раздельное управляемое культивирование вакцинных штаммов сальмонелл, инактивацию культур формальдегидом в течение 6-8 суток, адсорбцию и смешивание адсорбированных культур, причем конечная концентрация формальдегида в культуре составляет 0,02-0,08% (патент РФ № 2220743, МПК А61К 39/116, опубл. 10.01.2004).

Известна инактивированная вакцина против ящура типа Азия-1, которая содержит авирулентный и очищенный антигенный материал в виде иммуногенных компонентов вируса ящура типа Азия-1 и штамма 1737/Грузия/2000, адъювант и поддерживающую среду в эффективных соотношениях. Вирус репродуцируют в суспензионной культуре клеток ВНК-21. В качестве инактиванта используют аминоксилы в концентрации 0,025-0,05%. Для очистки суспензии антигена от балластных примесей применяют полигексаметиленгуанидин в концентрации 0,005-0,007%. Для изготовления адсорбированной вакцины из адъювантов используют гель гидрооксида алюминия и дополнительно сапонин, а эмульсионной вакцины - масляный адъювант (патент РФ № 2220744, МПК А61К 39/135, опубл. 10.01.2004).

Известна вакцина против вирусной геморрагической болезни кроликов, для приготовления которой используют вирулентный штамм вируса вирусной геморрагической болезни. Выращивание его проводят путем заражения непривитых против вирусной геморрагической болезни. От павших кроликов готовят суспензию печени, инактивируют сырье теотропином из расчета 1 г препарата на 1000 мл, выдерживают в течение 48 ч при 37°C, вносят 1-2% алюмокалиевых квасцов, фасуют и укупоривают (патент РФ № 2231365, МПК А61К 39/125, опубл. 27.06.2004).

Известен штамм вируса *Pestis suum*, используемый для изготовления биопрепаратов для специфической профилактики и диагностики классической чумы свиней (КЧС). Штамм получен прямым пассажем на подсвинках вирулентного вируса КЧС. Штамм обладает стабильной инфекционной, антигенной и иммуногенной активностью. Штамм используется для изготовления высокоиммуногенной вакцины против КЧС, получения гипериммунных сывороток для профилактики КЧС и позволяет использовать антиген и полученную на него сыворотку в серологических реакциях для диагностики КЧС (патент РФ № 2237713, МПК А61К 39/187, опубл. 10.10.2004).

Известны композиции и способ иммунизации птицы. Вакцинные препараты содержат инактивированные бактерии, которые вводят птице перорально через воду для питья (патент США № 6517844, МПК А61К 39/02, опубл. 11.02.2003).

К недостаткам практически всех биопрепаратов можно отнести их ориентированность на моноинфекции, необходимость ревакцинации, неблагоприятные поствакцинальные реакции и побочные явления, токсичность вследствие применения инактивирующих агентов, таких как формальдегид и т.п. Производство указанных средств сопряжено с риском инфицирования персонала, необходимостью принятия специальных мер безопасности и весьма трудоемко. Кроме того, вакцинацию заболевших животных и птиц не проводят.

В числе традиционных лечебно-профилактических средств противоинфекционного назначения широко известны препараты, содержащие различные антибиотики и/или синтетические антимикробные препараты избирательного действия.

Например, известно средство для профилактики и лечения инфекционных заболеваний животных и птиц бактериальной этиологии содержащее клиндамицин, спектиномицин или аминогликозидный антибиотик, растворители или наполнители, стабилизаторы и консерванты (патент РФ № 2227741, МПК А61К 31/00, опубл. 27.04.2004).

Известно антимикробное лечебное средство широкого спектра действия, содержащее в качестве активного агента антибиотика, по крайней мере один из них, отличающееся тем, что оно дополнительно содержит еще один активный агент - йод (патент Чешской Республики № 5434, МПК А61К 33/18, опубл. 12.02.1997).

Однако применение антибиотиков существенно ограничивается как недостаточно широким спектром активности каждого из них и, соответственно, необходимостью тщательного подбора при терапии конкретного заболевания, так и многочисленными побочными эффектами и лекарственной устойчивостью микроорганизмов. Кроме того, применение антибиотиков совершенно не эффективно при вирусных инфекциях.

Противовирусная терапия, обладает значительно меньшим арсеналом лечебных препаратов. Эффективность многих противовирусных химических соединений и препаратов установлена в экспериментальных исследованиях и в результате многочисленных клинических испытаний. Однако лишь немногие из них разрешены для широкого практического применения.

Одним из возможных путей повышения активности традиционных противоинфекционных средств является их сочетание с известными неспецифическими антимикробными препаратами различного происхождения, а также изыскание новых антибактериальных и противовирусных соединений. При использовании этих средств достигается подавление жизнеспособности бактериальной и вирусной популяций, снижение возможности развития лекарственной устойчивости возбудителей.

Использование неспецифических антимикробных и противовирусных препаратов с целью повышения их эффективности при микст-инфекциях еще мало изучено.

В последние годы предложены препараты, принципиально отличающиеся характером действующих агентов и универсальным спектром терапевтической активности.

Известен лечебный препарат "Йодомидол", обладающий бактерицидным и вирулицидным действием (патент Республики Казахстан № 6730, МПК А61К 33/00, опубл. 16.11.1998).

Известен фармацевтический препарат, обладающий противовирусным действием (европейский патент № 0978289 А1, МПК А61К 31/70, опубл. 09.02.2000).

Наиболее близким по назначению и составу компонентов к предложенному препарату является фармацевтическое средство для профилактики и лечения бактериальных, вирусных и микст-инфекций (патент Республики Казахстан № 15116 А, МПК А61К 31/70, опубл. 15.12.2004). Способ получения этого фармацевтического средства, который основан на реакциях комплексообразования йода с полифункциональными низко- и высокомолекулярными лигандами, является прототипом предлагаемого способа получения препарата.

Это средство содержит пул белков и/или галогенированные белки, карбогидраты и/или галогенированные карбогидраты, синтетический водорастворимый полимер, лития хлорид, калия или натрия йодид, йод, воду или физиологический раствор.

Все указанные препараты представляют собой композиции, содержащие йод, неорганические соли йода, хлорид натрия, хлорид лития, синтетический водорастворимый полимер, моно-, олиго- и полисахариды, галогенпроизводные природных соединений и воду. Кроме того, они могут содержать пул белков и/или галогенированных белков, карбогидраты и/или галогенированные карбогидраты. Концентрации и соотношения ингредиентов этих композиций различны.

Антимикробные препараты, содержащие в качестве действующего начала йод, в отличие от антибиотиков не вызывают привыкания к ним патогенных микроорганизмов.

Эти препараты могут быть использованы для лечения животных, однако обладают относительно высокой токсичностью.

Сущность изобретения

Задачей изобретения является разработка ветеринарного препарата для лечения и профилактики инфекционных заболеваний вирусной и бактериальной этиологии, в том числе вызываемых антибиотикоустойчивыми микроорганизмами и воздействующего на иммунную систему сельскохозяйственных и домашних животных, птиц и аквакультур.

Поставленная задача решается тем, что предложен ветеринарный препарат для лечения и профилактики вирусных и бактериальных инфекций сельскохозяйственных и домашних животных, птиц и аквакультур, содержащий активную фармацевтическую субстанцию, носитель и воду, который, согласно изобретению дополнительно содержит вспомогательные вещества, а в качестве активной фармацевтической субстанции содержит комплексное соединение глицина и йода (аддукт) - йод трийодоводород гексааминоуксусной кислоты $6C_2H_5NO_2 \cdot I_2 \cdot 3NH_3$, который интеркалирован в носитель, причем в качестве вспомогательных веществ препарат содержит хлорид лития, и/или йодид натрия, и/или йодид калия, и/или хлорид магния, и/или хлорид кальция, а в качестве носителя - водорастворимый полимер в следующем соотношении компонентов, г/л (мас. %):

активная субстанция	13,0 (1,15) – 14,6 (1,32)
носитель – карбогидрат	105 (9,8) – 135 (12,21)
хлорид лития	1,5 (0,14) – 2,5 (0,23)
иодид натрия	7,0 (0,65) – 8,0 (0,72)
иодид калия	3,5 (0,33) – 4,5 (0,41)
хлорид магния	2,5 (0,23) – 3,5 (0,32)
хлорид кальция	1,5 (0,14) – 2,5 (0,23)
вода	остальное

Поставленная задача решается также тем, что в качестве носителя активной фармацевтической субстанции использованы водорастворимые карбогидраты, такие, как крахмал, амилоза, амилопектин, декстран и декстрин.

Поставленная задача решается также тем, что в качестве носителя использован декстрин, полученный кислотным гидролизом крахмала.

Поставленная задача решается также тем, что декстрин имеет молекулярную массу от 1,0 до 50,0 кДа.

Предлагаемый ветеринарный препарат может быть представлен лекарственными формами в виде инъекционных растворов, растворов для орального применения и в виде мази.

Поставленная задача решается тем, что предложен способ получения ветеринарного препарата, согласно которому посредством реакции комплексообразования в системе вода - аминокислота - йод - йодид калия или натрия синтезируют комплексное соединение - фармацевтическую активную субстанцию, затем ее интеркалируют в носитель, в котором согласно изобретению реакцию комплексообразования активной фармацевтической субстанции осуществляют в водном растворе глицина, хлорида лития, йодидов натрия и/или калия и йода с формированием йод трийодводорода гексааминоуксусной кислоты ($6\text{Gly}\cdot\text{I}_2\cdot 3\text{NH}_3$), а внедрение активной фармацевтической субстанции в носитель осуществляют реакцией интеркалирования в присутствии вспомогательных веществ.

Поставленная задача решается также тем, что активную фармацевтическую субстанцию выделяют в виде монокристаллов путем кристаллизации из реакционной системы.

Поставленная задача решается также тем, что активную фармацевтическую субстанцию вводят в состав ветеринарного препарата в виде раствора.

Поставленная задача решается также тем, что осуществляют интеркаляцию активной фармацевтической субстанции в декстрин в одну стадию в присутствии вспомогательных веществ - лития хлорида, и/или натрия йодида, и/или калия йодида, и/или магния хлорида, и/или кальция хлорида в водном растворе.

Состав ветеринарного препарата, г/л по примеру

№	Субстанция, средняя молекулярная масса, кДа	Примеры составов											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	$6C_2H_5NO_2 \cdot I_2 \cdot 3NH_3$	13,6	13,6	13,6	13,6	13,6	13,6	13,6	13,6	13,6	14,6	13,6	13,6
2	Декстрин, 1-3	60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	Декстрин, 20-40	-	60	-	120	120	130	120	120	-	-	-	-
4	Декстрин, 40-60	-	-	60	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	Крахмал водорастворимый	-	-	-	-	-	-	30	-	30	-	-	-
6	Амилоза, 20-40	-	-	-	-	-	-	-	30	-	30	-	-
7	Амилопектин, 20-40	-	-	-	-	-	-	-	-	30	-	30	-
8	Декстран, 20-40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30	-	30
9	Лития хлорид	1,5	1,5	1,5	2,0	2,5	2,0	2,5	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
10	Натрия иодид	7,0	7,0	7,0	8,0	9,0	8,0	9,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0
11	Калия иодид	3,5	3,5	3,5	4,0	4,5	4,0	4,5	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
12	Магния хлорид	2,5	2,5	2,5	3,0	3,5	4,0	3,5	4,0	3,0	3,0	3,0	3,0
13	Кальция хлорид	1,5	1,5	1,5	2,0	2,5	2,0	2,5	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
14	Иод*	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0
15	Глицин*	3,2	3,2	3,2	4,0	4,8	4,0	-	-	-	-	-	-
16	Аденин *	-	-	-	-	-	-	4,0	-	-	-	-	-
17	Цистин*	-	-	-	-	-	-	-	4,0	-	-	-	-

Примечание. *Аналитическая концентрация йода в ветеринарном препарате.

Техническим результатом изобретения является создание препарата широкого спектра антивирусного и антимикробного действия, малотоксичного, препятствующего образованию устойчивости патогенных микроорганизмов и снижающего минимальную ингибирующую концентрация антибиотика.

Предложенный ветеринарный препарат активен в отношении ДНК- и РНК-содержащих вирусов, грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов - стафилококков, сальмонелл, пастерелл, бруцелл, обладает микробицидным действием по отношению к антибиотикоустойчивым штаммам микроорганизмов. Предложенный препарат эффективен при микст-инфекциях. Препарат обладает иммуностимулирующими свойствами и индуцирует образование эндогенных интерферонов.

Технический результат обусловлен уникальной структурой активной субстанции препарата.

Состав вспомогательных ингредиентов обеспечивает стабильность активной субстанции препарата в течение длительного времени за счет квазиравновесного состояния, в котором находятся все компоненты ветеринарного препарата.

Препарат оказывает быстрое воздействие и эффективен в отношении вирусных и микробных инфекций и различных микст-инфекций. В организме достаточно длительное время сохраняется терапевтическая концентрация препарата. Препарат не вызывает привыкания к нему микроорганизмов, обладает низкой токсичностью и цитотоксичностью.

В отличие от препаратов молекулярного йода препарат не оказывает общетоксического действия. Его антимикробная активность связана с присутствием комплекса $6Gly \cdot I_2 \cdot 3NH_3$, интеркалированного в декстрин в качестве носителя фармацевтической субстанции. Наличие декстрина в качестве носителя активной фармацевтической субстанции пролонгирует антимикробное действие.

Одним из важнейших свойств предложенного препарата является его высокая противовирусная активность, которая подтверждена в лабораторных исследованиях *in vitro* и *in vivo* и в производственных испытаниях.

Качественный состав ингредиентов достаточно хорошо известен, однако использование аддукта $6Gly \cdot I_2 \cdot 3NH_3$ в ветеринарном препарате применяется впервые в настоящем изобретении.

Способ получения заявляемого ветеринарного препарата основан на реакциях комплексообразования йода с глицином и интеркаляции получаемого аддукта в декстрин, который используется в качестве носителя для активной фармацевтической субстанции.

Ниже приводится поэтапно способ получения ветеринарного препарата и химизм процесса.

Раствор 1.

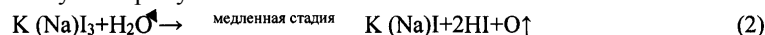
Растворяют в воде рассчитанное количество калия и натрия йодида. К полученному раствору добавляют необходимое количество йода. При этом при обычных условиях происходит реакция образования трийодидов натрия (калия):



Раствор 2.

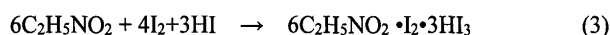
В воде при нагревании до 45°C растворяют рассчитанное количество глицина. Раствор 1 при перемешивании добавляют к раствору 2 глицина в воде (раствор 3).

В растворе 3 трийодиды натрия (калия) в присутствии глицина гидролизуются водой, при этом рН среды смещается в кислую сторону:



Вследствие протекания химической реакции гидролиза йода система является неравновесной. Реакция гидролиза йода останавливается, когда рН достигает значения 1-3 за счет образования йодоводородной кислоты.

Образующаяся при гидролизе йодоводородная кислота вступает в донорно-акцепторное взаимодействие с йодом и глицином, при этом происходит образование аддукта - активной фармацевтической субстанции:



После окончания реакции синтеза субстанции из раствора проводят кристаллизацию (выделение) аддукта общеизвестными способами.

Раствор 4.

Растворяют в воде необходимое количество носителя активной фармацевтической субстанции карбогидрата, например декстрина, в этот же раствор вносят навески вспомогательных субстанций лития хлорида, и/или натрия йодида, и/или калия йодида, и/или магния хлорида, и/или кальция хлорида.

При постоянном перемешивании к раствору 4 медленно добавляют раствор активной фармацевтической субстанции для ее интеркаляции в носитель.

Поскольку исходные количества калия и натрия йодидов при гидролизе йода, приводящем к образованию йодоводородной кислоты, которая и вступает в реакцию комплексообразования, в растворе остаются неизменными, а вместе с тем они являются вспомогательными субстанциями, то после интеркаляции активную фармацевтическую субстанцию можно не выделять после добавления раствора 3 к раствору 4. Процесс синтеза ветеринарного препарата считается законченным, когда рН остается неизменным.

Осуществление изобретения

Для получения ветеринарного препарата использовали реактивы производства фирм "Penta" (СК), "Merk" (BRD), "Sigma" и "Aldrich" (USA), соответствующие требованиям Европейской Фармакопеи.

Бактериологические, вирусологические и биомедицинские эксперименты проводились в лабораториях, аккредитованных по GLP Федеральным GLP-бюро Германии.

Методы анализа соответствовали требованиям Европейской Фармакопеи (ЕФ).

Биомедицинские эксперименты на лабораторных, сельскохозяйственных животных и птицах проводились в соответствии с требованиями Good Laboratory Practice (GLP), "Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных", National Academic Press, Washington и "Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Agricultural Research and Teaching", 3rd edition, Federation of Animal Science Societies, 2010.

Определение основных физико-химических свойств ветеринарного препарата и контроль качества осуществляли по методам и требованиям ЕФ.

В том числе определяли растворимость, прозрачность и цветность раствора, рН, подлинность (идентификация), наличие механических включений, вязкость, оптическую активность в УФ-области, температуру затвердевания и содержание активных ингредиентов: йода, калия, натрия, лития, декстрина и глицина.

Определение примесей тяжелых металлов осуществляли по ЕФ.

Атомно-абсорбционная спектрометрия, метод I - определение ртути, метод II - определение кадмия и свинца.

Определение микробиологических показателей по ЕФ.

Определение цвета и консистенции проводили визуально при дневном, естественном освещении и комнатной температуре.

Определение запаха проводили органолептическим методом.

Токсикологические исследования.

Изучение острой токсичности проводили на крысах (Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Под ред. член-корр. РАМН Р.У. Хабриева. - М.: Медицина, 2005. - 832 с).

Исследование субхронической токсичности препарата при оральном способе введения проводили

на молодых крысах массой $150 \text{ г} \pm 10\%$, на самцах и самках по методике тестирования № 407 OECD Test (Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents).

В исследовании мутагенного потенциала препарата *in vivo* использовался метод подсчета хромосомных аберраций в препаратах костного мозга мышей (OECD Test No. 475: Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test). Препарат вводили однократно, внутривенно мышам CD-1 массой $20 \text{ г} \pm 10\%$. В качестве контроля использовалась стерильная вода.

В исследовании алергизирующего действия препарата животным опытной группы проводили базовую сенсibilизацию раствором препарат объемом $0,5 \text{ мл}$ внутривенно, в качестве растворителя использовали $0,9\%$ физраствора NaCl. Животным контрольной группы внутривенно вводили физраствор в объеме $0,5 \text{ мл}$. Периодичность введения препарата составляла три введения с интервалом через день. Для получения образцов перитонеальных гранулоцитов животных выводили из эксперимента путем декапитации, получали взвесь перитонеальных гранулоцитов (смывы из брюшной полости) и гранулоциты, фиксированные на брыжейке (Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Под ред. член-корр. РАМН Р.У. Хабриева. - М.: Медицина, 2005. - 832 с.).

Изучение местно-раздражающего действия препарата проводили на кроликах по методу, описанному в OECD Test No. 404: Acute Dermal Irritation/Corrosion. Исследуемый препарат в количестве $0,5 \text{ мл}$ наносили на участок для аппликации размером $2,5 \times 2,5 \text{ см}$. Контрольные участки обрабатывали только водой для инъекций (приблизительно $0,5 \text{ мл}$), размер аппликации также составил $2,5 \times 2,5 \text{ см}$. Период экспозиции составил 4 ч, после чего препарат смывали дистиллированной водой. Визуальное состояние каждого участка воздействия препаратом оценивали через 60 мин, 24, 48 и 72 ч после экспозиции.

Исследование фармакокинетики и абсолютной биодоступности проводили на крысах линии Sprague-Dawle, массой $200 \text{ г} \pm 10\%$, самцах. Йод в плазме крови определяли методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ICP-MS). Была использована методика "Определение следовых элементов. Метод определения йода методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ICP-MS)", стандарт DIN EN 15111:2007. Препарат вводили внутривенно и внутривенно в одной дозе из расчета $5,4 \text{ мг/кг}$ йода. По истечении $0,25, 0,5, 1, 3, 6, 12$ и 24 ч животных декапитировали, кровь собирали в пробирки с антикоагулянтом калия-ЭДТА. Расчет основных фармакокинетических параметров проводили внемоделным методом: AUC - методом трапеции, C_{max} - наивысшая концентрация препарата в крови и t_{max} - время достижения максимальной концентрации препарата находили визуально. Период полувыведения ($t_{1/2}$) определен полулогарифмическим способом из угла наклона кривой в фазе элиминации препарата. Рассчитаны системный клиренс (Cl_s), объем распределения в бета-фазе (V_β) и константу элиминации (k_{el}). Абсолютную биодоступность (F_{abs}) находили по соотношению $AUC_{\text{po}}/AUC_{\text{iv}}$.

Определение антимикробной активности.

Процедуру определения антимикробной активности проводили методом двукратных серийных разведений в жидкой питательной среде (CLSI M100, 2016). Для метода двукратных серийных разведений использовался инокулом тест-штамма микроорганизма в концентрации $1,5 \times 10^6 \text{ КОЕ/мл}$. Первичная суспензия тест-штамма готовилась на физиологическом растворе ($0,9\% \text{ NaCl}$). Стерильной петлей отобрали аликвот суточно-культивированного тест-штамма, после чего внесли его в стерильную пробирку с 5 мл $0,9\%$ -ного NaCl. Контроль мутности полученного инокулома осуществлялся путем замера оптической плотности (ОП) на денситометре DEN-1 (Biosan, Латвия). Плотность первичной суспензии составила $0,5 \text{ ед. по МакФарланду}$, что соответствует $1,5 \times 10^8 \text{ КОЕ/мл}$. Далее первичную суспензию в количестве $0,1 \text{ мл}$ вносили в пробирку с $9,9 \text{ мл}$ изотонического раствора для достижения рабочей концентрации, равной $1,5 \times 10^6 \text{ КОЕ/мл}$.

Используемые в исследовании тест-штаммы были получены из Американской коллекции типовых культур (ATCC - American Type Culture Collection). В эксперименте использовались музейные чувствительные, музейные мультирезистентные и один клинический тест-штаммы:

- 1) Staphylococcus aureus ATCC 6538-P (музейный чувствительный штамм);
- 2) Staphylococcus aureus ATCC BAA-33591 (музейный мультирезистентный штамм);
- 3) Escherichia coli ATCC 8739 (музейный чувствительный штамм);
- 4) Escherichia coli ATCC BAA-2523 (музейный мультирезистентный штамм);
- 5) Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027 (музейный чувствительный штамм);
- 6) Pseudomonas aeruginosa TA2 (клинический мультирезистентный штамм);
- 7) Salmonella enterica ATCC 14028 (музейный чувствительный штамм);
- 8) Salmonella enterica ATCC 35988 (музейный мультирезистентный штамм);
- 9) Acinetobacter baumannii ATCC BAA-1790 (музейный мультирезистентный штамм).

Процедура тестирования методом серийных разведений.

Тестирование проводили в жидкой питательной среде, используя бульон Мюллера-Хинтона (богатая белковая среда), а также на физиологическом растворе.

Для определения антимикробной активности использовали 48-луночный планшет (BIOLOGIX, Китай).

Во все лунки, за исключением первой (со 2 по 16), разливали питательную среду в количестве 0,5 мл. Рабочий раствор препарата вносили в объеме 0,5 мл в первую пробирку, в которой отсутствовала питательная среда и во вторую с уже имеющейся в ней питательной средой (0,5 мл). Далее, производили серийные разведения, переносили из второй пробирки 0,5 мл в третью пробирку, уже содержащую 0,5 мл питательной среды и т.д. Из последней пробирки 0,5 мл смеси удаляли. Таким образом, были получены следующие разведения: 1:0; 1:1; 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64; 1:128; 1:256; 1:512; 1:1024; 1:2048; 1:4096; 1:8192; 1:16384, что соответствует пробиркам от 1 по 16. 17 по счету пробирка являлась контролем роста культуры.

После проведения серии разведений во все пробирки добавили по 0,05 мл тест-штамма микроорганизмов в концентрации $1,5 \times 10^6$ КОЕ/мл. Процедуру повторили для всех испытуемых культур.

Образцы, протитрованные в бульоне Мюллера-Хинтона, инкубировали в течение 18-24 ч при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. Образцы, протитрованные в физрастворе, инкубировали в течение 30 мин при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. По истечении времени инкубации проводили высеивание на плотную питательную среду - агар Мюллера-Хинтона (HiMedia, Индия) для определения жизнеспособных клеток. После засева чашки помещали в термостат на 18-24 ч, культивирование проводили при температуре, равной $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

Учет результатов проводили по наличию/отсутствию видимого роста микроорганизмов на поверхности плотной питательной среды. Минимальной бактерицидной концентрацией (МБК) считали наименьшую концентрацию в лунке, которая полностью подавляла рост микроорганизмов.

Все эксперименты проводили в трех повторях.

Изучение цитотоксичности и антивирусной активности.

Оценку цитотоксичности ветеринарного препарата *in vitro* проводили в МТТ-тесте (Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays // J. Immunol. Methods. - 1983. - Vol. 65. - P. 55.). Клетки рассеивали в 96-луночные планшеты в концентрации $2,5 \times 10^5$ клеток в 1,0 мл. Планшеты инкубировали в термостате при 37°C и 5,0% CO_2 . Из лунок планшета через 24 ч инкубации удаляли ростовую среду и вносили по 200,0 мкл среды DMEM, содержащей вещества в исследуемых концентрациях. В лунки с отрицательным контролем вносили по 200,0 мкл неполной питательной среды DMEM. Через 72 ч среду с веществом удаляли из лунок и добавляли 200,0 мкл свежей питательной среды и 50,0 мкл рабочего раствора МТТ, планшет инкубировали 4 ч при 37°C .

После окончания срока инкубации удаляли надосадочную жидкость. В каждую лунку вносили по 100,0 мкл DMSO. Оптическую плотность в лунках измеряли на микропланшетном ридере Tecan Sunrise RC.4 (Австрия) при длине волны основного фильтра 540 нм и референс-фильтра - 620 нм и рассчитывали среднее арифметическое значение. Долю выживших клеток для каждой повторности каждой концентрации исследуемого вещества по формуле (4):

$$\text{Процент жизнеспособности клеток} = \frac{Y_i}{Y_{MC}} \times 100 \%, \quad (4)$$

где Y_i - результат измерения ОП для каждой группы;

Y_{MC} - средняя арифметическая величина ОП (\bar{Y}) для отрицательного контроля;

ЦТК₅₀ (концентрация веществ, при которой происходит гибель 50% клеток) для каждого исследуемого вещества вычисляли по Риду и Менчу.

Противовирусную активность препарата в опытах *in vitro* определяли по терапевтической схеме в отношении вируса гриппа штамм a/fpv/waybrige/78 (H7N7) и вируса простого герпеса 1-го типа штамм "Victory" (Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Под ред. член-корр. РАМН Р.У. Хабриева. - М.: Медицина, 2005. - 832 с.). Суспензию клеток рассеивали в 96-луночные планшеты в концентрации $2,5 \times 10^5$ клеток/мл по 100,0 мкл в лунку.

Планшеты с культурой клеток инкубировали при 37°C и 5,0% CO_2 до образования полного монослоя. Для заражения культуры клеток использовали вирус в дозе 100 ИД/0,2 мл. Для определения терапевтической активности использовали шесть концентраций препарата с кратностью разведения два раза, начиная со значения 1/2 ЦТК₅₀. В соответствующие лунки планшета вносили по 200,0 мкл рабочего разведения вируса. В лунки с контролем исследуемого вещества, отрицательным и положительным контролями вносили по 200,0 мкл питательной среды DMEM. Для адсорбции вируса планшеты инкубировали 1 ч при 37°C .

По окончании инкубации содержимое лунок удаляли и вносили по 200,0 мкл конечных разведений исследуемого вещества. В лунки с отрицательным контролем вносили по 200,0 мкл среды DMEM. В лунки с положительным контролем вносили по 200,0 мкл рабочего разведения вируса. Планшеты инкубировали в течение 72 ч в CO_2 -инкубаторе при 37°C и 5,0% CO_2 . Все исследования проводились в пяти повторях.

Терапевтическую активность препарата в отношении вируса гриппа выявляли в результате снижения титра инфекционности остаточного вируса в реакции гемагглютинации (Spalatin J., Hanson R.P., Beard P.D. The haemagglutination-elution pattern as a marker in characterizing Newcastle disease virus // Avian Dis. - 1970. - Vol. 14. - P. 542-549.). Наличие или отсутствие ЦПД вируса (цитопатическое действие вируса) простого герпеса в культуре клеток выявляли визуально при просмотре планшета под инвертирован-

ным микроскопом. Дополнительно % жизнеспособности клеток рассчитывали при помощи МТТ-теста.

Для определения вирусингибирующей активности использовали семь концентраций препарата с кратностью разведения два раза, начиная от значения $1/2$ ЦТК₅₀. В отдельных пробирках готовили растворы вируса с исследуемым веществом в соотношении 1:1. Для положительного контроля готовили раствор вируса с неполной питательной средой в соотношении 1:1. Пробирки инкубировали 60 мин при 37°C, регулярно и аккуратно встряхивая. По окончании инкубации готовили серийные десятикратные разведения вируса и положительного контроля (от 100 до 10⁻²).

Из лунок планшета с культурой клеток аккуратно удаляли ростовую среду и в соответствующие лунки планшета вносили по 200,0 мкл приготовленных разведений, начиная с исходного. В лунки с отрицательным контролем вносили по 200,0 мкл неполной питательной среды DMEM. Планшеты инкубировали в течение 72 ч в CO₂-инкубаторе при 37°C и 5% CO₂. Все исследования проводились в трех повторях.

Учет результатов вирусингибирующей активности проводили через 72 ч. Наличие или отсутствие вируса гриппа А в культуре клеток выявляли по результатам реакции гемагглютинации. Для вируса простого герпеса наличие или отсутствие ЦПД вируса в культуре клеток выявляли визуально при просмотре планшета под инвертированным микроскопом. Титр инфекционности вирусов высчитывали по методу Рида и Менча.

Эффективность препарата оценивали по коэффициенту ингибирования (Ки) (Ершов Ф.И. Методические рекомендации по доклиническому изучению специфической противовирусной активности лекарственных средств. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / Ф.И. Ершов, Э.Б. Тазулахова, А.Н. Наровлянский, А.Н. Миронов, В.А. Меркулов, И.А. Ленева, Т.П. Оспельникова, А.Н. Васильев; под общей ред. А.Н. Миронова / Министерство здравоохранения РФ. - М.: Гриф и К, 2012. - С. 525-549. Логинова С.Я., Борисевич С.В., Семенова И.В., Максимов В.А., Бондарев В.П., Небольсин В.Е. Изучение противовирусной активности ингавирина в отношении возбудителя гриппа А (H3N2) *in vitro* // Антибиотики и химиотерапия. - 2009. № 54. С. 9-10), который рассчитывали по формуле (5)

$$Ки = \frac{A_k - A_0}{A_k} \times 100 \%, \quad (5)$$

где A_к - уровень накопления вируса при культивировании без внесения в питательную среду изучаемого ИВ (Ig ТЦД₅₀/0,2 мл);

A₀ - уровень накопления вируса при культивировании с внесением в питательную среду изучаемого ИВ (Ig ТЦД₅₀/0,2 мл) (ТЦД - тканевые цитопатогенные дозы, ИВ-исследуемое вещество).

Для определения профилактической активности в соответствующие лунки планшета вносили по 200,0 мкл конечных разведений ветеринарного препарата. В лунки с контролем препарата, отрицательным и положительным контролями, вносили по 200,0 мкл питательной среды DMEM. Планшеты инкубировали 1 ч при 37°C. По окончании инкубации содержимое лунок удаляли и вносили по 200,0 мкл рабочего разведения вируса. В лунки с положительным контролем вносили по 200,0 мкл рабочего разведения вируса. В лунки с отрицательным контролем вносили по 200,0 мкл среды DMEM. Планшеты инкубировали в течение 72 ч в CO₂-инкубаторе при 37°C и 5,0% CO₂. Все исследования проводились в пяти повторях. Профилактическую активность веществ в отношении вируса гриппа выявляли в результате снижения титра инфекционности остаточного вируса в реакции гемагглютинации.

Изучение интерферогенной активности.

Для определения продукции ИФН-α и ИФН-γ суспензию МНК (мононуклеары) рассеивали в 96-луночные планшеты (BD Falcon, США) в концентрации 10⁵ кл/яч. и инкубировали в CO₂-инкубаторе в течение 24 и 48 ч в полной культуральной среде, содержащей различные концентрации препарата. Культуральной средой являлась 10% RPMI-1640. Негативным контролем во всех экспериментах использовали раствор Хенкса (Sigma, США). По окончании времени инкубации из лунок забирали культуральный супернатант, замораживали и хранили при температуре -80°C. Измерение оптической плотности (ОП) и расчет концентрации цитокинов производили на микропланшетном ридере Sunrise RC.4 (Tecan, Австрия) с использованием программного обеспечения Magelan 2.0 (Tecan, Австрия) при длине волны 540 нм с референсным фильтром на 620 нм.

Статистическую обработку результатов физико-химических экспериментов и биологических испытаний проводили в компьютерной программе GraphPad Prism, 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Уровень достоверности был принят при p<0,05.

Токсикологические исследования ветеринарного препарата.

Однократное оральное введение крысам массой 200 г ± 10% максимально допустимого объема препарата в дозе 25 мл/кг из расчета 2,5 мл на 100 г массы животного не приводило к развитию каких-либо симптомов отравления. За животными вели наблюдение в течение 14 дней.

Полученные результаты показывают низкую токсичность препарата при приеме внутрь. Максимально-переносимая доза препарата (МПД) составила 25 мл/кг. Соответственно средняя смертельная доза (ЛД₅₀) будет выше 25 мл/кг.

Исследование острой токсичности при внутривенном введении крысам позволило определить МПД и рассчитать смертельные дозы (ЛД) (табл. 2). Смертельные дозы препарата рассчитывали пробит-анализом. Половой специфичности в чувствительности к препарату не выявлено.

Таблица 2

Основные параметры острой токсичности препарата по примерам 1-12 при внутривенном введении

Параметры острой токсичности (ЛД), мл/кг			
ЛД ₁₆	ЛД ₅₀	ЛД ₈₄	ЛД ₁₀₀
1,2 – 1,8	2,3 – 2,9	3,5 – 4,0	4,2 – 4,9

После введения препарата у животных наблюдались судороги клонического характера. Гибель отмечалась через 1-3 ч после введения препарата. Для всех животных было характерно учащение дыхания, повышение двигательной активности и выраженная пилоэрекция. Эти признаки исчезали на 4-6 сутки у выживших экспериментальных животных. Средняя смертельная доза (ЛД₅₀) при внутривенном введении составляет 2,3-2,9 мл.

Исследование субхронической токсичности препарата по примерам 1-12 при оральном способе введения проводили на молодых крысах массой 150 г ± 10%, на самцах и самках по методике тестирования № 407 OECD Test (Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents). Препарат вводили ежедневно, в течение 28 дней. Исследование включало восстановительный период - 28 дней. Исследовались три дозы: терапевтическая 0,3 - мл, средняя - 5 мл и МПД - 25 мл, определенная из эксперимента по изучению острой токсичности.

В условиях 28-дневного введения препарата гибели крыс не отмечено. При наблюдении за животными выявлено удовлетворительное состояние животных, получавших вещество в дозах 25 и 5 мл/кг. После отмены препарата внешний вид экспериментальных животных соответствовал контрольным животным. В группе, где животные получали препарат в дозе 0,3 мл/кг, внешнее состояние животных не отличалось от группы крыс, находящихся в контроле. У животных после эвтаназии на 29 и 56 дни от начала эксперимента проводился отбор крови для дальнейших гематологических, биохимических и иммуноферментных исследований.

Гематологические показатели у контрольной группы крыс не выходили за пределы условной физиологической нормы для этого типа животных. По результатам исследований периферической крови, отчетливо прослеживается отсутствие существенного влияния на периферическую кровь крыс, получавших препарат в дозе 0,3 мг/кг. Таким образом, терапевтическая доза не вызывает изменения в изучаемых параметрах крови. Субхроническое воздействие 5 и 25 мл/кг препарата на организм крыс в течение 28 дней вызывает дозозависимые токсические эффекты. При этом наблюдаемые повреждения имели обратимый характер. Терапевтическая доза препарата не вызывала никаких повреждающих эффектов.

Исследование специфической токсичности препарата проводили в следующих направлениях: генотоксичность и мутагенность, алергизирующее и местно-раздражающее действие.

Препарат не вызывает структурных нарушений в хромосомах мышей и не обладает генотоксическими свойствами даже в высоких дозах.

Исследования алергизирующей активности препарата проводили в тесте непрямой реакции деагрануляции тучных клеток. Препарат не вызывает развитие алергических реакций I типа (не образует реагиновых антител и не оказывает прямого влияния на тучные клетки).

Исследуемый препарат после аппликации не оказывает местно-раздражающего действия на кожу кроликов. Индекс первичного раздражения равен 0, в связи с этим его можно отнести к 1 категории, которая классифицируется как пренебрежимо малая. При ежедневном клиническом наблюдении за общим состоянием здоровья всех испытуемых животных не обнаружено никаких патологических отклонений. Эритем, отеков, изъязвлений не отмечалось. Результаты проведенных испытаний позволяют заключить, что исследуемое вещество не вызывает патологических изменений кожного покрова кроликов. Индекс первичного раздражения равен 0. Категория реакции классифицируется как пренебрежимо малая (Test for irritation and skin sensitization ISO 10993-10).

Препарат после орального введения быстро всасывается в кровотоки и достигает максимальной концентрации через 60 мин. Средний объем распределения в бета-фазе указывает на то, что препарат хорошо проникает в ткани организма. Это также подтверждается средним клиренсом и высоким уровнем связывания препарата с белками крови. Абсолютная биодоступность препарата высокая и составляет около 100%.

Бактерицидное действие препарата по примерам 1-12 на безусловно-патогенных грамотрицательных и грамположительных микроорганизмах *in vitro*

Результаты антимикробной активности ветеринарного препарата, а также в комбинации с антибиотиками представлены в табл. 3.

Таблица 3

МБК ветеринарного препарата и антибиотиков при совместном действии
на антибиотикоустойчивые штаммы микроорганизмов

Микроорганизм (штамм)	МБК, мкг/мл	
	Ветеринарный препарат	Антибиотик
Грамположительные штаммы 1. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591		Цефтриаксон
	225 – 275*	900 – 1100*
	110 – 150**	225 – 275**
		Цефазолин
	225 – 275*	110 – 125*
	110 – 150**	25 – 35**
		Цефепим
	225 – 275*	15 – 17*
	110 – 150**	2 – 6**
		Стрептомицин
	225 – 275*	1800 – 2200*
	110 – 150**	900 – 1100**
		Меропенем
	225 – 275*	25 – 35*
	60 – 70**	15 – 17**
		Оксациллин
	225 – 275*	450 – 550*
	60 – 70**	110 – 125**
		Гентамицин
	225 – 275*	2 - 6*
60 – 70**	0,25 - 275**	
	Бициллин	
225 – 275*	60 - 70*	
60 – 70**	25 - 35**	
	Левифлоксацин	
225 – 275*	0,110 - 175*	
60 – 70**	0,060 – 0,070**	
	Ванкомицин	
225 – 275*	0,125 – 0,175*	
60 – 70**	0,110 – 0,150**	
Грамотрицательные штаммы 1. <i>Escherichia coli</i> ATCC ВАА-2523		Цефтриаксон
	225 – 275*	110 – 125*
	60 – 70**	60 - 70**
		Цефазолин
	225 – 275*	450 - 500*
	60 – 70**	110 – 125**
		Цефепим
	225 – 275*	2 - 6*
60 – 70**	0,5 – 1,5**	

		Стрептомицин
	225 – 275*	25 - 35*
	60 – 70**	6 - 10**
		Меропенем
	225 – 275*	0,9 – 1,1*
	60 – 70**	0,25 – 0,75**
		Оксациллин
	225 – 275*	1800 - 2200*
	60 – 70**	900 - 1100**
		Гентамицин
	225 – 275*	110 - 175*
	60 – 70**	60 - 70**
		Бициллин
	225 – 275*	1800 - 2200*
	60 – 70**	900 - 1100**
		Левифлоксацин
	225 – 275*	0,200 – 0,300*
	60 – 70**	0,110 – 0,175**
		Ванкомицин
	225 – 275*	110 – 125*
	60 – 70**	60 - 70**
2. <i>Salmonella enterica</i> ATCC 35988		Цефтриаксон
	225 – 275*	1,8 – 2,2*
	60 – 70**	0,9 - 1,1**
		Цефазолин
	225 – 275*	3,4 – 4,6*
	25 – 35**	0,9 - 1,1**
		Цефепим
	225 – 275*	0,110 – 0,175*
	60 – 70**	0,03 – 0,09**
		Стрептомицин
	225 – 275*	25 - 35*
	60 – 70**	7,2 – 8,8**
		Меропенем
	225 – 275*	0,110 – 0,175*
	60 – 70**	0,03 – 0,09**
		Оксациллин
	225 – 275*	110 – 125*
	60 – 70**	60 - 70**
		Гентамицин
	225 – 275*	1,8 - 2,2*
	60 – 70**	0,250 - 0,275**
		Бициллин
	225 – 275*	7,2 – 8,8*
	60 – 70**	3,6 – 4,4**
		Левифлоксацин
	225 – 275*	1800 - 2200*
	60 – 70**	900 - 1100**
		Ванкомицин
	225 – 275*	60 - 70*

3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> TA2	60 – 70**	25 - 35**
		Цефтриаксон
	450 – 550*	1800 - 2200*
	110 – 150**	900 - 1100**
		Цефазолин
	450 – 550*	1800 - 2200*
	110 – 150**	900 - 1100**
		Цефепим
	450 – 550*	225 - 275*
	60 – 70**	110 - 175**
		Стрептомицин
	450 – 550*	450 - 550*
	60 – 70**	225 - 275**
		Меропенем
	450 – 550*	60 - 70*
	60 – 70**	15 - 17**
		Оксациллин
	450 – 550*	1800 - 2200*
	110 – 150**	900 - 1100**
		Гентамицин
	450 – 550*	110 - 175*
	110 – 150**	60 - 70**
		Бициллин
450 – 550*	0,115 – 0,150*	
110 – 150**	0,05 – 0,07 **	
	Левифлоксацин	
450 – 550*	0,110 - 0,150*	
60 – 70**	0,02 – 0,04**	
	Ванкомицин	
450 – 550*	450 - 550*	
110 – 150**	125 - 175**	

Примечание: «*» - при раздельном тестировании, «**» - при совместном тестировании

Диапазон МБК препаратов по примерам 1-12 для всех девяти штаммов составил 225-550 мкг/мл. При этом наблюдался синергетический эффект в комбинации с антибиотиками разных классов, включая карбапенемы, аминогликозиды, фторхинолоны и цефалоспорины в отношении мультирезистентных штаммов бактерий *P.aeruginosa*, *E.coli*, *S.aureus*, *Sal.enterica*. Снижение значений минимальных бактерицидных концентраций антибиотиков происходит от 2 до 8 раз в зависимости от комбинации и тест-штамма.

Препарат даже в малых дозах обладает исключительно высокой бактерицидной активностью в отношении патогенных чувствительных и резистентных бактерий.

Определение цитотоксичности препарата.

Результаты изучения цитотоксического действия ветеринарного препарата представлены в табл. 4.

Таблица 4

ЦТК₅₀ препарата по примерам 1-6 в культурах клеток MDCK и RD

Клеточная линия	ЦТК ₅₀ , %
MDCK	3,53
RD	1,87

Определение противовирусного действия исследуемых веществ *in vitro*.

Антивирусную активность препарата в опытах *in vitro* определяли по терапевтической и вирусингибирующей схемам в отношении вируса гриппа A/FPV/Waybrige/78 (H7N7) и ВПГ-1 штамма "Victory" (ВПГ - вирус простого герпеса). Для заражения культуры клеток использовали вирус в дозе 100 ИД/0,2 мл. Результаты представлены в табл. 5.

Таблица 5

Антивирусное действие ветеринарного препарата по примеру 4 на ДНК и РНК-содержащие вирусы

Вирусы	Эффективная концентрация (%)
ВПГ-1 штамм «Victory»	1,78
РНК-содержащие	
A/FPV/Waybrige/78 (H7N7)	1,78

Ветеринарный препарат в концентрации 1,78% подавляет репликацию вирусов гриппа A/FPV/Waybrige/78 (H7N7) и ВПГ-1 штамм "Victory" по терапевтической схеме и обладает выраженной вирусингибирующей активностью в отношении вируса гриппа A/FPV/Waybrige/78 (H7N7).

Определение профилактической активности ветеринарного препарата проводили в отношении вирусов гриппа штамм A/FPV/Waybrige/78 (H7N7) и штамм A/Swine/Iowa/30/H1N1. Результаты изучения

противовирусной профилактической активности представлены в табл. 6 и 7.

Таблица 6

Профилактическая активность ветеринарного препарата по примеру 4 на вирусе гриппа A/FPV/Waybrige/78 (H7N7)

Концентрация, мг/мл	Титр в ГАЕ*
3,70	0
1,85	0
0,93	0
0,46	4,2 ± 0,4
0,23	4,0 ± 0
0,12	6,0 ± 0

Примечание. *Титр гемагглютинирующих единиц приведен в двоичном логарифме со среднеарифметическим стандартным отклонением ($\log_2 \pm \text{StD}$).

Таблица 7

Профилактическая активность ветеринарного препарата по примеру 4 на вирусе гриппа A/Swine/Iowa/30/H1N1

Концентрация, мг/мл	Титр в ГАЕ*
3,70	0
1,85	0
0,93	0
0,46	2,0 ± 0
0,23	5,0 ± 0
0,12	7,0 ± 0

Примечание. *Титр гемагглютинирующих единиц приведен в двоичном логарифме со среднеарифметическим стандартным отклонением ($\log_2 \pm \text{StD}$).

Показано, что ветеринарный препарат в исследуемых концентрациях проявляет профилактическую активности в отношении как вируса A/FPV/Waybrige/78 (H7N7), так и вируса A/Swine/Iowa/30/H1N1.

Исследование интерферон-продуцирующей активности препарата *in vitro*.

Результаты определения продукции цитокинов ИФН- α и ИФН- γ в супернатанте мононуклеарной фракции крови крыс как без стимуляции, так и со стимуляцией универсальным Т-клеточным индуктором конА при воздействии препаратом по примеру 4 в течение 24 ч представлены в табл. 8.

Таблица 8

Продукция цитокинов под воздействием препарата на МНК в течение 24 ч

Концентрация, мг/мл	Концентрация цитокинов, пг/мл			
	ИФН- α		ИФН- γ	
	конА «-»	конА «+»	конА «-»	конА «+»
НК	0,92±0,12	1,02±0,87	689,7±98,9	1158,3±105,9
0,01	1,23±0,32	1,44±0,94	1047,5±178,5*	1811,3±234,1*
0,005	0,90±0,10	1,07±0,74	987,1±196,0*	1570,596±287,3*
0,001	0,82±0,82	0,98±0,57	814,8±38,8	987,0±27,5
0,0005	0,97±0,23	1,03±0,57	536,6±19,3	787,8±147,5

*Достоверность различий по отношению к НК ($p < 0,05$).

При увеличении времени воздействия препаратом на МНК крыс до 48 ч как без стимуляции, так и со стимуляцией конА продукция ИФН- α не изменялась, тогда как концентрация ИФН- γ увеличивалась (табл. 9).

Таблица 9

Продукция цитокинов под воздействием препарата на МНК в течение 48 ч

мг/мл	Концентрация цитокинов, пг/мл			
	ИФН- α		ИФН- γ	
	конА «-»	конА «+»	конА «-»	конА «+»
НК	1,01±0,25	1,54±0,38	745,7±25,3	1278,3±234,6
0,01	0,98±0,54	1,23±0,58	1190,3±21,8*	1879,5±358,7*
0,005	1,08±0,78	1,10±0,67	1217,5±43,4*	1723,9±487,3*
0,001	0,97±0,65	1,09±0,55	1186,4±34,9*	1698,2±312,5*
0,0005	0,95±0,47	1,45±0,97	902,8±54,0	1205,9±487,7

*Достоверность различий по отношению к НК ($p < 0,05$).

Препарат усиливает продукцию ИФН- γ МНК крыс, что можно интерпретировать в первую очередь как проявление иммуномодулирующей активности.

Изучение эффективности ветеринарного препарата на целевых видах животных.

Применение препарата для лечения колибактериоза поросят.

Опыты по изучению эффективности применения препарата для лечения колибактериоза у поросят проведены на животных 7-10-дневного возраста породы Крупная белая в хозяйстве, стационарно-неблагополучном по заболеванию колибактериозом. Установлено, что ветеринарный препарат эффективен для лечения колибактериоза у поросят. Терапевтическая эффективность препарата при колибакте-

риозе составила 93,5%. При использовании препарата выздоровление у поросят наступает в 2,0 раза быстрее по сравнению с лечением байтрилом (энрофлоксацин).

Применение препарата для лечения сальмонеллеза у поросят.

Опыты по изучению эффективности применения препарата для лечения сальмонеллеза у поросят проведены на животных 40-60-дневного возраста породы Крупная белая в хозяйстве, стационарно-неблагополучном по заболеванию сальмонеллезом.

Показано, что ветеринарный препарат эффективен при лечении сальмонеллеза у поросят. Терапевтическая эффективность препарата составила при сальмонеллезе 91,0%, лечебная эффективность байтрила при этом составила 82,4%. Сроки выздоровления у поросят при лечении препаратом сокращаются по сравнению с лечением байтрилом с 7 до 4 дней, т.е. в 1,9 раза. Падеж поросят при применении препарата по сравнению с байтрилом снижался с в 2,1 раза.

Применение препарата для лечения вирусной бронхопневмонии у поросят.

Опыты по изучению эффективности применения препарата для лечения вирусной бронхопневмонии у поросят проведены на животных 2-4-месячного возраста породы Крупная белая в хозяйстве, стационарно-неблагополучном по заболеванию вирусной бронхопневмонией.

В опыте установлено, что ветеринарный препарат является эффективным для лечения бронхопневмонии у поросят. Лечебная эффективность препарата составила при бронхопневмонии 90,3%, лечебная эффективность байтрила при этом составила 83,3%. При использовании препарата выздоровление у поросят наступает в 2,3 раза быстрее по сравнению с лечением байтрилом, причем падеж животных в 1,9 раза меньше.

Применение препарата для лечения колибактериоза у телят.

Опыты по изучению эффективности ветеринарного применения препарата для лечения колибактериоза у телят проведены на животных 1-10-дневного возраста породы Симментальская в хозяйстве, стационарно-неблагополучном по заболеванию колибактериозом.

В опыте установлено, что препарат является эффективным для лечения колибактериоза у телят. Лечебная эффективность препарата при колибактериозе составила 93,0%, лечебная эффективность байтрила при этом составила 79,6%. Сроки выздоровления при лечении препаратом сокращаются по сравнению с лечением байтрилом в 2,3 раза. Падеж телят при лечении препаратом ниже в 3,4 раза по сравнению с лечением байтрилом.

Применение препарата для лечения сальмонеллеза у телят.

Опыты по изучению эффективности применения препарата для лечения сальмонеллеза у телят проведены на животных 30-40-дневного возраста симментальской породы в хозяйстве, стационарно-неблагополучном по заболеванию сальмонеллезом.

В опыте установлено, что ветеринарный препарат является эффективным для лечения сальмонеллеза у телят. Лечебная эффективность препарата составила при сальмонеллезе 94,3%, лечебная эффективность байтрила при этом составила 82,9%. Сроки выздоровления при лечении препаратом сокращаются в 1,8 раз по сравнению с лечением байтрилом. При этом падеж телят снижается в 3,5 раза.

Применение препарата для лечения вирусной бронхопневмонии у телят.

Опыт проведен на телятах симментальской породы 2,0-2,5-месячного возраста в хозяйстве, стационарно-неблагополучном по заболеванию вирусной бронхопневмонией. В опыте установлено, что препарат является эффективным для лечения бронхопневмонии у телят. Эффективность препарата составила при бронхопневмонии 91,8%, а лечебная эффективность байтрила при этом составила 84,2%. При использовании препарата выздоровление у телят наступает в 2,3 раза быстрее по сравнению с лечением байтрилом, а падеж в 2,2 раза меньше.

Применение ветеринарного препарата при нодулярном дерматите крупного рогатого скота (КРС)

Нодулярный дерматит, вызываемый ДНК-содержащим вирусом рода *Carpinivirus* семейства *Roviviridae*, относится к особо опасным болезням животных, способным вызывать эпизоотии и наносить большой экономический ущерб. Эксперимент по оценке эффективности действия ветеринарного препарата проводили на КРС разного возраста, разных пород и на разных стадиях заболевания.

Диагноз устанавливали на основании клинического обследования животных и лабораторных исследований.

Ветеринарный препарат вводили животным внутривенно капельно. Дозу препарата из расчета 0,1 мл/кг растворяли в 0,25-0,5 л физиологического раствора. В зависимости от тяжести и стадии заболевания препарат вводили 1 раз в сутки в течение 1-3 дней. Результаты лечения представлены в табл. 10.

Эффективность применения препарата для лечения
нодулярного дерматита КРС

Показатели	Телята	Взрослые животные
Количество животных, голов	5	25
Доза препарата, мл/кг	0,1	0,1
Продолжительность лечения, дни	1-3	1-3
Смертность, голов	0	1
Осталось больных, голов	0	0
Выздоровело, %	100	96,7

Как видно из данных табл. 10, эффективность препарата, оцененная по смертности животных, составляет 96,7%. После введения препарата у животных спадает температура, через несколько часов животные начинают пить и принимать корм. На начальной стадии заболевания достаточно однократного введения препарата. После клинических проявлений в виде везикул, пустул необходимо 2-3 введения ветеринарного препарата.

Для предотвращения вторичных инфекций папулы и пустулы смазывали мазевой формой ветеринарного препарата, что ускорило заживление язв.

Эффективность действия препарата при вирусных и бактериальных заболеваниях сельскохозяйственных животных и птицы.

Изучение бактерицидных и вирулицидных свойств ветеринарного препарата проводили в промышленных условиях на овцах, свиньях, кроликах, крупном рогатом скоте и птице. В экспериментах использовали уток обоих полов (1:1) породы Медео возрастом 3-4 месяца; кур обоих полов (1:1) породы Флэкс возрастом 4-5 месяцев; кроликов обоих полов (1:1) породы Шиншилла возрастом 3-4 месяца; свиней обоих полов (1:1) породы Крупная белая возрастом 8-9 месяцев; овец обоих полов (1:1) породы Грубшерстная возрастом 1,0-1,5 года; коров и бычков (1:1) породы Алатауская возрастом 1,5-2,0 года; поросят обоего пола (1:1) породы Крупная белая 1-2 месячного возраста; ягнят обоих полов (1:1) породы Грубшерстная, 2-3 месячного возраста.

При применении препарата для лечения мелких сельскохозяйственных и домашних животных, молодняка и птицы его разбавляли физиологическим раствором, а для крупных сельскохозяйственных животных, наоборот, препарат использовали без разбавления. В случае изучения действия препарата в отношении бактериальных инфекций его водимая доза составляла 0,1 мл на 1 кг живой массы. Количество введений в сутки зависело от степени течения заболевания, хотя оно не превышало 2 раз в сутки. Ветеринарный препарат обладает высокой терапевтической эффективностью против вирусных заболеваний. Кроме этого, обращает на себя внимание небольшой срок использования препарата и низкий процент падежа животных независимо от вида животного. Ветеринарный препарат действует одинаково эффективно при заболеваниях, вызванных как ДНК-содержащими, так и РНК-содержащими вирусами, при его использовании в дозе 0,1 мл/кг массы животного.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Ветеринарный препарат для лечения и профилактики вирусных и бактериальных инфекций сельскохозяйственных и домашних животных, птиц и аквакультур, содержащий активную фармацевтическую субстанцию, носитель и воду, отличающийся тем, что он дополнительно содержит вспомогательные вещества, а в качестве активной фармацевтической субстанции содержит комплексное соединение глицина и йода (аддукт) - йод трийодоводород гексааминоуксусной кислоты $6C_2H_5NO_2 \cdot I_2 \cdot 3NH_3$, который интеркалирован в носитель, причем в качестве вспомогательных веществ препарат содержит хлорид лития, йодид натрия, йодид калия, хлорид магния, хлорид кальция, а в качестве носителя - водорастворимый полимер, в следующем соотношении компонентов, г/л (мас.%):

активная субстанция: 13,0 (1,15) - 14,6 (1,32);
 носитель - карбогидрат: 105 (9,8) - 135 (12,21);
 хлорид лития: 1,5 (0,14) - 2,5 (0,23);
 йодид натрия: 7,0 (0,65) - 8,0 (0,72);
 йодид калия: 3,5 (0,33) - 4,5 (0,41);
 хлорид магния: 2,5 (0,23) - 3,5 (0,32);
 хлорид кальция: 1,5 (0,14) - 2,5 (0,23);
 вода: остальное.

2. Ветеринарный препарат по п.1, отличающийся тем, что в качестве носителя активной фармацевтической субстанции использованы водорастворимые карбогидраты, такие как крахмал, амилоза, амилопектин, декстран и декстрин.

3. Ветеринарный препарат по любому из пп.1, 2, отличающийся тем, что в качестве носителя использован декстрин, полученный кислотным гидролизом крахмала.

4. Ветеринарный препарат по любому из пп.2, 3, отличающийся тем, что декстрин имеет молекулярную массу от 1,0 до 50,0 кДа.

5. Ветеринарный препарат по любому из пп.1-4, отличающийся тем, что представлен лекарственными формами в виде инъекционных растворов, растворов для орального применения и в виде мази.

6. Способ получения ветеринарного препарата по п.1, согласно которому посредством реакции комплексообразования в системе вода - аминокислота - йод - йодид калия и натрия синтезируют комплексное соединение - фармацевтическую активную субстанцию, затем ее интеркалируют в носитель, отличающийся тем, что реакцию комплексообразования активной фармацевтической субстанции осуществляют в водном растворе глицина, хлорида лития, йодидов натрия и калия и йода - с формированием йод трийодводорода гексааминоуксусной кислоты ($6\text{Gly}\cdot\text{I}_2\cdot 3\text{HI}_3$), а внедрение активной фармацевтической субстанции в носитель осуществляют реакцией интеркалирования в присутствии вспомогательных веществ.

7. Способ по п.6, отличающийся тем, что его активную фармацевтическую субстанцию выделяют в виде монокристаллов путем кристаллизации из реакционной системы.

8. Способ по п.6, отличающийся тем, что активную фармацевтическую субстанцию вводят в состав ветеринарного препарата в виде раствора.

9. Способ по любому из пп.6-8, отличающийся тем, что осуществляют интеркаляцию активной фармацевтической субстанции в декстрин в одну стадию в присутствии вспомогательных веществ - лития хлорида, натрия йодида, калия йодида, магния хлорида, кальция хлорида в водном растворе.

