

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202192958** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2022.05.23**

(22) Дата подачи заявки  
**2020.08.19**

(51) Int. Cl. *A61K 41/00* (2020.01)  
*A61P 31/04* (2006.01)  
*A61P 31/12* (2006.01)  
*C07K 16/28* (2006.01)

---

(54) **ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО И СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**

---

(31) **2019127185; 2019127186**

(32) **2019.08.29**

(33) **RU**

(86) **PCT/RU2020/050193**

(87) **WO 2021/040570 2021.03.04**

(71) Заявитель:  
**ЭПШТЕЙН ОЛЕГ ИЛЬИЧ (RU)**

(72) Изобретатель:  
**Эпштейн Олег Ильич, Пушкарь  
Дмитрий Юрьевич (RU)**

(74) Представитель:  
**Мухина А.К. (RU)**

---

(57) Изобретение относится к медицине, а именно к лекарственному средству для лечения бактериальных инфекций, представляющему собой продукт технологической обработки методом последовательных множественных разведений исходных субстанций антител к HLA-DRB1 и антител к  $\beta$ 2-микроглобулину, а также к комбинации заявленного лекарственного средства с антибиотиком и к способу лечения бактериальных инфекций, к способу снижения резистентности бактерий, к терапии антибиотиком и к способу повышения эффективности антибиотика. Также настоящее изобретение относится к лекарственному средству для лечения инфекционных заболеваний, обладающему антибактериальной и противовирусной активностью, представляющему собой продукт технологической обработки методом последовательных множественных разведений исходных субстанций а) антител к  $\beta$ 1 - домену молекулы главного комплекса гистосовместимости класса 2 (HLA-DRB1), б) антител к  $\beta$ 2-микроглобулину ( $\beta$ 2-МГ), в) антител к интерферону-гамма (IFN- $\gamma$ ), г) антител к CD4. Изобретение обеспечивает эффективное лечение инфекционных заболеваний, снижение резистентности антибиотиков, повышение эффективности терапевтического действия антибиотиков, в том числе в отношении резистентных бактерий, и снижение терапевтической дозы антибиотиков.

**A1**

**202192958**

**202192958**

**A1**

## **Лекарственное средство и способ лечения инфекционных заболеваний.**

[0001] Настоящее изобретение относится к области фармацевтики, а именно к средству для лечения инфекционных заболеваний и способу лечения инфекционных заболеваний. В частном случае настоящее изобретение относится к средствам для лечения бактериальных инфекций, повышения эффективности терапевтического действия антибиотиков, в том числе в отношении резистентных бактерий и снижения терапевтической дозы антибиотиков, а также к способу лечения бактериальных инфекций, способу снижения резистентности бактерий к терапии антибиотиком, способу снижения терапевтической дозы антибиотика и способу повышения терапевтической эффективности антибиотиков в отношении резистентных к ним бактерий. В частном случае настоящее изобретение относится к средствам для лечения вирусных инфекций, а также к способу лечения вирусных инфекций.

[0002] Инфекции можно разделить на простые – вызванные одним возбудителем, и смешанные – вызванные двумя и более возбудителями. От смешанных инфекций следует отличать вторичные инфекции (суперинфекции), возникающие на фоне уже имеющегося заболевания. Реинфекция — это повторное заражение после полного выздоровления тем же видом возбудителя; возникает при отсутствии иммунитета.

[0003] Бактериальные инфекции – это заболевания, спровоцированные бактериями. Особенностью бактериальных инфекций является то, что в процессе жизнедеятельности и после гибели бактерий происходит выделение токсинов, вызывающих воспаление, интоксикацию и повреждение тканей. При диагностировании бактериальной инфекции назначается лечение антибактериальными препаратами. Бактерии, вызывающие те или иные заболевания, рано или поздно вырабатывают

резистентность (устойчивость) к антибиотикам, применяемым в ходе лечения. Это естественный процесс адаптации, который называется антимикробной резистентностью. Возникновение большого количества резистентных бактерий ведет к появлению все большего числа неизлечимых инфекций, в результате чего все больше увеличиваются риски бактериальных инфекций, возрастают медицинские расходы на лечение бактериальных инфекций, становятся более продолжительные госпитализации и увеличивается смертность [ВОЗ. Возрастающая угроза развития антимикробной резистентности: возможные меры. 2013г.].

[0004] В мае 2015 г. Всемирная ассамблея здравоохранения утвердила Глобальный план действий по устойчивости к противомикробным препаратам, включающий и устойчивость к антибиотикам. Глобальный план действий направлен на обеспечение профилактики и лечения инфекционных болезней с помощью безопасных и эффективных лекарств [<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/ru/>].

[0005] Острая респираторная вирусная инфекция (ОРВИ) — самая распространённая в мире группа заболеваний, объединяющая грипп, парагрипп, респираторно-синцитиальную инфекцию, риновирусную и аденовирусную инфекции и другие катаральные воспаления верхних дыхательных путей. Распространение вирусов происходит чаще всего путем самоинокуляции на слизистую оболочку носа или конъюнктиву с рук, загрязненных при контакте с больным или с зараженными вирусом поверхностями. Другой путь – воздушно-капельный – при вдыхании частичек аэрозоля, содержащего вирус, или при попадании более крупных капель на слизистые оболочки при тесном контакте с больным. При отсутствии должного лечения или при неэффективной терапии могут развиваться серьезные осложнения, такие как отит, синусит, ангина, ДВС-синдром и другие.

[0006] Анализ данных официальной статистики Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) показал, что к началу XXI в. смертность

от инфекционных болезней составляла четвертую часть всех смертей в мире, а в развивающихся странах — практически половину. Можно констатировать, что инфекционные болезни по-прежнему занимают значительное место среди причин смертности населения во всем мире. Разработка новых способов лечения данного типа заболеваний – одна из передовых задач в области медицины и фармацевтики.

[0007] Таким образом, лечение вирусных и бактериальных инфекций, а также снижение резистентности бактерий к антибиотикам и повышение чувствительности бактерий к антибиотикам является серьезной проблемой и актуальной задачей в области медицины.

[0008] Из уровня техники известны препараты для лечения инфекционных заболеваний, в частности противовирусные препараты, например «Арбидол», «Амиксин» и другие [[https://www.rlsnet.ru/tn\\_index\\_id\\_4196.htm](https://www.rlsnet.ru/tn_index_id_4196.htm), [https://www.rlsnet.ru/tn\\_index\\_id\\_1526.htm](https://www.rlsnet.ru/tn_index_id_1526.htm)]. Препараты указанного класса могут иметь побочные эффекты и малоэффективны для лечения некоторых вирусных заболеваний [ Leneva I.A. et al. Characteristics of arbidol-resistant mutants of influenza virus: implications for the mechanism of anti-influenza action of arbidol. Antiviral Res 2009 81(2):132-40].

[0009] Также из уровня техники известны препараты для лечения инфекционных заболеваний в частности лекарственные препараты для лечения бактериальных инфекций, например, «Амоксициллин», «Гентамицин», «Тетрациклин», «Левомецитин» и другие [[https://www.rlsnet.ru/tn\\_index\\_id\\_222.htm](https://www.rlsnet.ru/tn_index_id_222.htm) // [https://www.rlsnet.ru/tn\\_index\\_id\\_876.htm](https://www.rlsnet.ru/tn_index_id_876.htm) // [https://www.rlsnet.ru/mnn\\_index\\_id\\_82.htm](https://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_82.htm) // [https://www.rlsnet.ru/tn\\_index\\_id\\_4699.htm](https://www.rlsnet.ru/tn_index_id_4699.htm)]. Препараты класса антибиотиков обладают двумя основными проблемами: увеличивающееся число микроорганизмов, резистентных к антибиотикам и широкий спектр противопоказаний и побочных эффектов при применении антибиотиков

[Белозерцева В.Н. и др. Антибиотики - резистентность и токсичность. Новые Санкт-Петербургские врачебные ведомости. г. 2017.-N 2. -С.59-61].

[0010] Таким образом, неправильный и неконтролируемый прием антибиотиков может серьезно навредить здоровью. Лечение антибиотиками может сопровождаться не только неблагоприятными побочными действиями, такими как, аллергия, токсические осложнения со стороны печени и почек, нарушение сердечно-сосудистой системы и крови, нервной системы, но и привести к образованию антибиотикоустойчивых микробов. Таким образом, комплексная работа по снижению уровня резистентности микроорганизмов к антибиотикам и рационального потребления антибиотиков является актуальной задачей.

[0011] Известен способ преодоления лекарственной устойчивости бактерий, включающий применение антибиотиков в комбинации с ингибиторами бактериальных ферментов. Например, клавулановая кислота (или клавуланат) — ингибитор бета-лактамаз, чья химическая структура напоминает бета-лактамы антибиотики. Подобно другим бета-лактамам, клавулановая кислота способна связываться с пенициллинсвязывающими белками (ПСБ) грамположительных и грамотрицательных бактерий и способствовать лизису бактериальной стенки. Кроме того, клавулановая кислота обладает собственной антибактериальной активностью. На этой основе созданы комбинированные препараты, содержащие аминопенициллиновый антибиотик и один из ингибиторов бета-лактамаз (амоксциллин/клавуланат). Недостатком данного способа является ограниченный спектр антагонистического действия применяемых комбинаций препаратов (активны только в отношении микробов, резистентность которых обусловлена выработкой бета-лактамаз). К побочным действиям клавулановой кислоты относятся: диспепсия, холестатическая желтуха, нарушение функционального состояния печени, гепатит, псевдомембранозный колит, кандидоз, аллергические реакции (многоформная эритема, отек Квинке, эксфолиативный дерматит,

крапивница, анафилактический шок) [<https://www.kakprosto.ru/kak-899440-klavulanovaya-kislota-deystvie-i-svoystva-#ixzz5eejsFIpF>].

[0012] Из уровня техники известен способ преодоления лекарственной устойчивости бактерий и грибов, позволяющий повысить эффективность преодоления лекарственной устойчивости микроорганизмов к антимикробным препаратам с различным механизмом действия, за счет комбинированного действия низких концентраций анилиновых красителей и антимикробных препаратов [патент RU2363470C1, 10.08.2009]. При этом следует учитывать, что анилиновые красители широко используются в гистологической технике, обладают бактерицидным, а некоторые — канцерогенным действием.

[0013] Из уровня техники известна фармацевтическая комбинированная композиция для наружного и местного применения, содержащая активный комплекс бактериолитических и протеолитических ферментов, например, лизоамидазу, основу, и, по меньшей мере, одну целевую добавку, выбранную из ряда: антибиотик, синтетическое антибактериальное средство, в том числе вещество, снижающее резистентность микроорганизмов, антимикотик, анестетик, стимулятор репаративных процессов. Изобретение обеспечивает повышение по сравнению с известными средствами терапевтической активности фармацевтической композиции, в том числе к штаммам, резистентным к отдельным компонентам композиции, улучшение течения раневого процесса, быстрое очищение раны, сокращение времени реконвалесценции [патент RU2655808C2, 29.05.2018]. При этом следует учитывать, что ферменты являются чувствительными к различным внешним факторам (рН среды, температура, давление и прочее) и любое внешнее воздействие может привести к денатурации и необратимым изменениям структуры фермента с утратой его свойств. Например, фермент лизоамидазу рекомендуется хранить в сухом, защищенном от света месте при температуре не выше +10 °С, что вызывает дополнительные сложности при его производстве, транспортировке

и хранении, а также на любом из этих этапов может привести к снижению эффективности препарата.

[0014] Из уровня техники известно лекарственное средство, содержащее активированную форму сверхмалых доз моноклональных, поликлональных иммунных или естественных антител к антигену главного комплекса гистосовместимости (система HLA) или к комплексу антигена системы HLA и ассоциированного с ним пептида [патент RU2205025C1, 26.12.2001]. Полученное в соответствии с изобретением иммуотропное лекарственное средство представляет собой новый фармакологический препарат, который характеризуется наличием иммуотропной активности, отсутствием побочных эффектов, экологической чистотой и низкой себестоимостью. Однако не известно об эффективности данного препарата для лечения бактериальных и/или вирусных инфекций.

[0015] Из уровня техники известно комплексное лекарственное средство для лечения вирусных заболеваний, характеризующееся тем, что содержит в качестве действующих компонентов активированную-потенцированную форму антител к гамма-интерферону человека и активированную-потенцированную форму антител к CD4 рецептору [патент RU 2521392, 06.08.2010]. Однако не известно об эффективности данного препарата для лечения бактериальных или смешанных инфекций.

[0016] Аналогом заявленного средства является лекарственный препарат «Эргоферон» [[https://www.rlsnet.ru/tn\\_index\\_id\\_46844.htm](https://www.rlsnet.ru/tn_index_id_46844.htm)]. Спектр фармакологической активности «Эргоферона» включает в себя противовирусную, иммуномодулирующую активность, а также препарат применяется в комплексной терапии бактериальных инфекций. Препарат «Эргоферон» содержит активированную - потенцированную форму антител к гамма-интерферону человека (IFN- $\gamma$ ), активированную - потенцированную форму антител к CD4 рецептору Т-лимфоцитов (CD4) и активированную - потенцированную форму антител к гистамину (Г).

[0017] Настоящее изобретение направлено на создание нового эффективного комплексного лекарственного средства, обладающего высокой противовирусной, антибактериальной и иммуномодулирующей активностью, а являющегося эффективным против бактерий, устойчивых к одному или нескольким известным антибактериальным препаратам (антибиотикам), при этом не оказывающего токсического или мутагенного действия на организм пациента. Также изобретение направлено на создание лекарственного средства, повышающего эффективность фармакологического действия антибиотика, в том числе в отношении резистентных к нему бактерий, и снижающего терапевтическую дозу антибиотика.

[0018] В одном варианте осуществления настоящего изобретения лекарственное средство представляет собой продукт технологической обработки методом последовательных множественных разведений исходных субстанций антител к  $\beta$ -1-домену молекулы главного комплекса гистосовместимости класса II (HLA-DRB1) и  $\beta$ -2 микроглобулину ( $\beta$ 2-МГ). В другом варианте осуществления лекарственное средство по настоящему изобретению представляет собой продукт технологической обработки методом последовательных множественных разведений исходных субстанций а) антител к  $\beta$ -1-домену молекулы главного комплекса гистосовместимости класса II (HLA-DRB1), б) антител к  $\beta$ -2 микроглобулину ( $\beta$ 2-МГ), в) антител к интерферону-гамма (ИФН- $\gamma$ ) и д) антител к CD4. Оба варианта осуществления эффективны для лечения и профилактики инфекций, вызванных различными типами патогенов.

[0019] Одним из аспектов изобретения является заявленное лекарственное средство для лечения бактериальных инфекций, способствующее повышению эффективности терапевтического действия антибиотиков, снижению резистентности бактерий к терапии антибиотиками, и способствующее снижению терапевтической дозы антибиотиков, представляет собой продукт технологической обработки методом последовательных множественных разведений исходных субстанций антител



к  $\beta 1$  - домену молекулы главного комплекса гистосовместимости класса 2 (HLA-DRB1) и  $\beta 2$ -микροглобулину ( $\beta 2$ -МГ).

[0020] Другим аспектом изобретения является заявленное лекарственное средство для лечения инфекционных заболеваний, обладает антибактериальной и противовирусной активностью, представляет собой продукт технологической обработки методом последовательных множественных разведений исходных субстанций а) антител к  $\beta 1$  - домену молекулы главного комплекса гистосовместимости класса 2 (HLA-DRB1), б) антител к  $\beta 2$ -микροглобулину ( $\beta 2$ -МГ), в) антител к интерферону-гамма (IFN- $\gamma$ ), г) антител к CD4.

[0021] При этом указанные группы бактерий, представляют собой, например: спирохеты (например, *Treponema*, *Borrelia*, *Leptospira*); аэробные и микроаэрофильные, подвижные, спиральные и изогнутые грамотрицательные бактерии (например, *Campylobacter*, *Helicobacter*, *Spirillum*); грамотрицательные аэробные и микроаэрофильные палочки и кокки (например, *Achromobacter*, *Bordetella*, *Kingella*, *Neisseria*); факультативно-анаэробные грамотрицательные палочки (например, *Cedecea*, *Escherihia*, *Klebsiella*, *Plesiomona*, *Haemophilus*, *Streptobacillus* (коли-инфекции)); грамотрицательные анаэробные прямые, изогнутые и спиральные бактерии (например, *Anaerobiospirillum*, *Bacteroides*, *Porphyromonas*); анаэробные грамотрицательные кокки (например, *Veillonella*); риккетсии и хламидии (например, *Ehrlichia*, *Chlamydoiphila*); грамположительные кокки (например, *Aerococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*); грамположительные палочки и кокки, образующие эндоспоры (например, *Bacillus*, *Clostridium*); не образующие спор грамположительные палочки правильной формы (например, *Erysipelothrix*, *Listeria*); не образующие спор грамположительные палочки неправильное формы (например, *Bifidobacterium*, *Corinebacterium*, *Rothia*); микобактерии (например, *Mycobacterium*); актиномицеты (например, *Actinomadura*, *Nocardia*, *Streptomyces*); микоплазмы (например,

Mycoplasma, Ureaplasma) и прочее [И.В. Смирнов. Возбудители бактериальных инфекций человека. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия, №2, Том 2, 2000, с.4-11].

[0022] Заявленное лекарственное средство, представляющее собой продукт технологической обработки методом последовательных множественных разведений исходных субстанций антител к HLA-DRB1 и  $\beta$ 2-МГ, проявляет эффективность также в отношении бактерий, проявляющих резистентность к одному или нескольким антибиотикам.

[0023] Бактериальные инфекции, в отношении которых эффективно заявленное средство, могут быть систематизированы не только по виду бактерии, вызывающей заболевание, но также по механизму передачи:

[0024] Бактериальные инфекции пищеварительной системы/кишечные бактериальные инфекции, могут быть вызваны шигеллами, стафилококками, холерными вибрионами, брюшнотифозной палочкой, сальмонеллёзами – преимущественно фекально-оральный путь передачи (сальмонеллез, брюшной тиф, дизентерии, пищевые токсикоинфекции, кампилобактериоз, дизентерия, энтерит, эширихиоз, кампилобактериоз, колит, пищевое отравление, гастрит, язвенные заболевания, ботулизм, дизентерия).

[0025] Бактериальные инфекции дыхательных путей – аспирационный путь передачи, могут бывать вызваны стафилококками, пневмококками, стрептококками, коклюшной палочкой, менингококками, хламидиями микобактериями, микоплазмами и прочими (синуситы, ринит, ангина, ларингит, трахеит, тонзиллиты, эпиглоттиты, гайморит, пневмонии, бронхиты, туберкулез и пр.).

[0026] Бактериальные инфекции мочеполовой системы - бактериальный вагиноз (гарднереллез), хламидиоз, цистит, дисбактериоз, пиелонефрит, гломерулонефрит, уретрит, бактериальным баланит,

простатит, бактериальный цистит, пиелонефрит, уретрит, бактериальный простатит, везикулит и прочее;

[0027] Бактериальные инфекции кожи и мягких тканей, вызываемые, например, стафилококками, стрептококками – контактный путь передачи (рожа, импетиго, целлюлит, флегмона, фурункулез, гидраденит и т.д.).

[0028] Кровяные бактериальные инфекции, вызываемые, например, риккетсиями, иерсиниями, коккобактериями – трансмиссивный механизм передачи (туляремия, чума, сыпной тиф, окопная лихорадка и др.).

[0029] Инфекции лимфатической системы, например, лимфаденит, лимфангит могут быть вызваны стрептококком, стафилококком;

[0030] Инфекция нервной системы, например, менингиты, энцефалиты, миелиты и прочее вызываемые менингококками, пневмококками, гемофильными палочками тип b, боррелиями, микоплазмами, грибами рода Кандида и др. могут передаваться воздушно капельным путем, а также может быть лимфогенный путь передачи;

[0031] Инфекция костей и суставов может быть вызвана бактериями-возбудителями болезни Лайма, стафилококками, стрептококками, микобактериями, гонококковыми бактериями – механизм передачи через кровоток, через прямое проникновение, например, раны, хирургические вмешательства и т.д., через инфекции в ближайших структурах (инфекционный артрит, остеомиелит, болезни Рейтера и др.);

[0032] Инфекция уха, инфекция сосцевидного отростка и пазух, может быть вызвана стрептококками и стафилококками, грибами рода Кандида, гемофильными палочками и др. – передача инфекции происходит через евстахиеву трубу, со стороны наружного слухового

прохода, или через кровь (лабиринтиты, нейросенсорная тугоухость, мастоидит и прочее).

[0033] Фармацевтическая комбинация по настоящему изобретению, представляет собой набор активных ингредиентов для лечения бактериальных инфекций, то есть, лекарственное средство, представляющее собой продукт технологической обработки методом последовательных множественных разведений исходных субстанций антител к HLA-DRB1 и антител к  $\beta$ 2-МГ и соответствующий антибиотик, при этом оба вводят пациенту путем совместного введения. Совместное применение лекарственного средства и соответствующего антибиотика может осуществляться посредством одновременного приема препаратов независимо друг от друга (в отдельных лекарственных формах) в одно и то же время или последовательно в рамках временных интервалов, особенно когда такие временные интервалы позволяют препаратам в комбинации проявлять улучшенный эффект, оптимальный вариант определяется опытным путем и зависит от заболевания и используемого антибиотика.

[0034] Также заявленное лекарственное средство вместе с известным антибиотиком может составлять фиксированную или нефиксированную фармацевтическую комбинацию, применяемую для лечения бактериальных инфекций. Термин "фиксированная комбинация" обозначает, что активные ингредиенты, заявленное лекарственное средство и партнер по комбинации – антибиотик, оба вводят пациенту одновременно в единой лекарственной форме или дозировке. Термины "нефиксированная комбинация" или "набор" обозначает, что активные ингредиенты, заявленное лекарственное средство и партнер по комбинации – антибиотик, оба вводят пациенту в виде отдельных элементов или одновременно или последовательно без специфических временных рамок, где такое введение обеспечивает терапевтически эффективные уровни двух активных ингредиентов в организме пациента. Заявленная комбинация лекарственного средства и антибиотика может

использоваться для одновременного или последовательно применения для лечения бактериальных инфекций. При этом антибиотик вводится в известной терапевтической дозе.

[0035] Заявленный препарат (антител к HLA-DRB1 и антител к  $\beta$ 2-МГ) применяется в эффективной дозе, определяемой опытным путем, при этом антибиотик следует принимать согласно инструкции или по назначению врача. При этом указанный антибиотик может быть выбран из группы, например: бета-лактамы (пенициллины (амоксциллин, метициллин, оксациллин, бензилпенициллин и др.); цефалоспорины (цефалексин, цефазолин, цефтриаксон, цефепим и др.); карбапенемы (меропенем, дорипенем, биापенем и др.); макролиды (кетолиды, эритромицин, рокситромицин, кларитромицин и др.); тетрациклины (тетрациклин, окситетрациклин, доксициклин, метациклин и др.); аминогликозиды (стрептомицин, канамицин, амикацин, гентамицин и др.); левомицетины; оксазолидиноны; гликопептиды (таргоцид, даптомицин, ванкомицин и др.); линкозамиды (делацин С); фторхинолоны (левофлоксацин, гемифлоксацин, спарфлоксацин и др.); противогрибковые антибиотики (нистатин, амфотерицин В и др.); противотуберкулезные антибиотики (фтивазид, метаизид, салюзид и др.); противолепрозные препараты (солюсульфон, диуцифон и др.); противоопухолевые препараты (доксорубицин, рубомицин, карминомицин и др.); разные антибиотики (фосфомицин, фузидин, рифампицин и др.) [<https://ru.wikipedia.org/wiki/Антибиотики>].

[0036] При этом, под эффективной дозой ( ЭД ) или эффективной концентрацией (ЕС) подразумевается доза или концентрация лекарственного средства, которая производит биологическую реакцию. Термин эффективная доза используется, когда измерения проводятся в естественных условиях, в то время как термин эффективная концентрация используется, когда измерения проводятся в пробирке.

[0037] Также настоящее изобретение направлено на повышение эффективности фармакологического действия антибиотика, в том числе в

отношении резистентных к нему бактерий, путем одновременного или последовательного введения соответствующего антибиотика и заявленного лекарственного средства, представляющего собой продукт технологической обработки методом последовательных множественных разведений исходных субстанций антител к HLA-DRB1 и  $\beta$ 2-МГ. Таким образом, при дополнительном введении заявленного лекарственного средства при приеме антибиотиков происходит снижение терапевтической дозы антибиотика.

[0038] Лекарственное средство по настоящему изобретению, представляющее собой продукт технологической обработки методом последовательных множественных разведений исходных субстанций а) HLA-DRB1, б)  $\beta$ 2-МГ, в) IFN- $\gamma$ , г) CD4, может быть использовано для лечения вирусных инфекций. При этом указанная вирусная инфекция вызвана, например: вирусами, содержащими двуцепочечную ДНК (например, Herpesvirales, Adenoviridae, Papillomavirida, Polyomaviridae.); вирусами, содержащими одноцепочечную ДНК (например, Circoviridae, Parvoviridae); вирусами, в которых РНК способна к репликации (например, Reoviridae, Birnaviridae); вирусами, содержащими одноцепочечную (+)РНК (например, Nidovirales, Picornavirales, Tymovirales, Astroviridae, Caliciviridae, Flaviviridae, Togaviridae, Virgaviridae); вирусами, содержащими одноцепочечную (-)РНК (например, Bunyavirales, Mononegavirales, Arenaviridae, Ophioviridae, Orthomyxoviridae, Deltavirus); вирусами, содержащими одноцепочечную (+)РНК, реплицирующиеся через стадию ДНК (например, Retroviridae); вирусами, содержащими двуцепочечную ДНК, реплицирующие через стадию одноцепочечной РНК (например, Caulimoviridae, Hepadnaviridae) [[https://ru.wikipedia.org/wiki/Классификация\\_вирусов\\_по\\_Балтимору](https://ru.wikipedia.org/wiki/Классификация_вирусов_по_Балтимору)].

[0039] Кроме того, настоящее лекарственное средство, представляющее собой продукт технологической обработки методом последовательных множественных разведений исходных субстанций а) HLA-DRB1, б)  $\beta$ 2-МГ, в) IFN- $\gamma$ , г) CD4, эффективно для лечения смешанных

инфекций – развивающихся в организме при одновременном воздействии двух и более разных возбудителей, как вирусных, так и бактериальных, и вторичных (суперинфекций) – развивающихся в результате заражения организма инфекцией с последующим повторным заражением через какое-то время иной инфекцией.

[0040] Технический результат настоящего изобретения заключается в расширении арсенала лекарственных средств, обладающих комплексным противовирусным и антибактериальным действием, а также в создании антибактериального средства широкого спектра действия, эффективного в отношении, в том числе, резистентных к одному или нескольким антибиотикам бактерий, обладающего низкой токсичностью и мутагенностью, что позволяет снижать нагрузку на организм пациента при антибактериальной терапии; также заявленное средство повышает эффективность фармакологического действия антибиотика, в том числе в отношении резистентных бактерий, и снижает терапевтическую дозу антибиотика, что приводит к снижению побочных эффектов во время их приема и после курса приема антибиотиков.

[0041] Продукты технологической обработки методом последовательных множественных разведений исходных субстанций антител к HLA-DRB1, антител к  $\beta$ 2-МГ, антител к IFN- $\gamma$  и/или антител к CD4 представляют собой водное или водно – спиртовое разведение антител (или сочетание таких разведений), полученное путем последовательного многократного разведения (потенцирования) матричного исходного раствора антител с внешним воздействием – встряхиванием каждого разведения.

[0042] В предшествующих работах [см. RU2205025C1, 26.12.2001; RU2500422C2 06.08.2010 и др.] заявитель для описания продуктов технологической обработки методом последовательных множественных разведений исходных субстанций антител использовал термины «активированная форма антител», «активированная-потенцированная форма

антител», «сверхвысокие разведения», «сверхмалые дозы антител». При этом заявитель обращает внимание на то, что термин «релиз-активная форма» и термин «активированная форма антител», «активированная-потенцированная форма антител», «сверхмалые дозы антител», «сверхвысокие разведения», «активные разведения» полностью взаимозаменяемые [Эпштейн О.И. Релиз-активность (современный взгляд на гомеопатию и негомеопатию). М.:Издательство РАМН, 2017. 48 с. // Эпштейн О.И. Сверхмалые дозы (история одного исследования). М.: Издательство РАМН, 2008. 336 с.]

[0043] При этом, под разведением антител, в настоящем изобретении, следует понимать любые, в том числе десятичные, сотенные, тысячные разведения матричного раствора антител, начиная с C2 (т.е. с разведения матричного раствора в  $100^2$  раз), а также любые их сочетания (например, C2+D34+M45, D20+C4 и др.) и соотношения (например, 1:1:2, 2:3 и др.).

[0044] Для приготовления заявленного лекарственного средства в качестве исходной субстанции антител используют естественные, моноклональные или, преимущественно, поликлональные антитела, которые могут быть получены по известным технологиям – методикам описанным, например, в: Мягкова М.А., Морозова В.С. Иммунохимические свойства естественных антител к физиологически активным соединениям, Фундаментальные исследования № 11, 2014, с.1066-1070 и Иммунологические методы, под ред. Г. Фримеля, М., «Медицина», 1987, с.9-33; или, например, в статье Laffly E., Sodoyer R. Hum. Antibodies. Monoclonal and recombinant antibodies, 30 years after. - 2005 - Vol.14. - N 1-2. P.33-55 и обладающие специфичностью в отношении соответствующих антигенов: HLA-DRB1,  $\beta$ 2-МГ, IFN $\gamma$  и/или CD4.

[0045] Естественные антитела – иммуноглобулины, которые вырабатываются организмом в строго определенных количествах в полном отсутствии какой-либо внешней антигенной стимуляции, поэтому



эти антитела, как правило, циркулируют в кровотоке даже здоровых людей. Естественные аутоантитела как правило полиреактивны и имеют достаточно низкую аффинность к определенному набору аутоантигенов.

[0046] Моноклональные антитела – это гетерогенные антитела к конкретному эпитопу антигена, полученные из одного клона антител-продуцирующих В-клеток [Lipman NS1, Jackson LR, Trudel LJ, Weis-Garcia F. Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. ILAR J. 2005;46(3):258-68. // IHC Staining Methods. Fifth edition. Preface Chapter 1. Thomas Boenisch. Antibodies. p:1-9]. Моноклональные антитела получают, например, с помощью гибридомной технологии. Причем начальная стадия процесса включает иммунизацию, основанную на принципах, уже разработанных при приготовлении поликлональных антисывороток. Дальнейшие этапы работы предусматривают получение гибридных клеток, продуцирующих клоны одинаковых по специфичности антител. Их выделение в индивидуальном виде проводится теми же методами, что и в случае поликлональных антисывороток.

[0047] Поликлональные антитела - это совокупность иммуноглобулинов, реагирующих с различными эпитопами специфического антигена и секретируемые В-клетками различных линий организма [Lipman NS1, Jackson LR, Trudel LJ, Weis-Garcia F. Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. ILAR J. 2005;46(3):258-68. // IHC Staining Methods. Fifth edition. Preface Chapter 1. Thomas Boenisch. Antibodies. p:1-9]. Поликлональные антитела могут быть получены активной иммунизацией животных. Для этого по специально разработанной схеме животным делают серию инъекций требуемым в соответствии с изобретением веществом – антигеном. В результате проведения такой процедуры получают моноспецифические антисыворотки с высоким содержанием антител, которые используют в технологической обработке методом

последовательных множественных разведений для получения конечного продукта. При необходимости проводят очистку антител, присутствующих в антисыворотке, например, методом аффинной хроматографии, путем применения фракционирования солевым осаждением или ионообменной хроматографии.

[0048] Согласно вышесказанному, под термином «антитела» понимают иммуноглобулины любого происхождения (естественные, поликлональные или моноклональные антитела), которые специфически связываются с молекулой-мишенью (антигеном). При этом, способность антител распознавать определенный тип эпитопов молекулы антигена и взаимодействовать с ним – специфичность – ключевое свойство антител, определяющее весь спектр эффектов того или иного антитела [Boyd WC. Fundamentals of immunology. Fundam. Immunol. 1946; Langman RE. The specificity of immunological reactions. Mol. Immunol. 2000; 37: 555–561]. Специфичность не зависит от природы происхождения и способа получения последних: естественные, поликлональные или моноклональные антитела при одной и той же специфичности будут воздействовать на одну и ту же мишень [А. Ройт и др., Иммунология. Пер. с англ. – М.: Мир, 2000, с.149-161, 527-544], а, следовательно, могут применяться для получения заявленного средства.

[0049] Вариантом для приготовления заявленного лекарственного средства является использование поликлональных антител, которые в качестве матричного (первичного) раствора с концентрацией 0,5÷5,0 мг/мл, используют для технологической обработки методом последовательных множественных разведений исходных субстанций антител с получением конечного продукта.

[0050] Технологическая обработка - метод последовательных множественных разведений исходных субстанций антител - представляет собой равномерное уменьшение концентрации в результате последовательного разведения 1 части упомянутого матричного раствора

в 9 частях (для десятичного разведения D) или в 99 частях (для сотенного разведения C) или в 999 частях (для тысячного разведения M) нейтрального растворителя в сочетании с внешним воздействием (например, в виде встряхивания) на каждое полученное разведение и использованием отдельных емкостей для каждого последующего разведения [см. В. Швабе "Гомеопатические лекарственные средства", М., 1967 г., с.14-29].

[0051] Было установлено, что внешне простая процедура последовательного многократного уменьшения концентрации веществ является сложной технологией, продукты которой приобретают уникальные свойства. Исторически продукты технологии потенцирования называют «малыми дозами», «потенцированными препаратами», «высокими разведениями».

[0052] Конечный продукт может быть представлен в различных лекарственных формах [ОФС.1.6.2.001.18 Государственная фармакопея РФ, издание XIV] и содержать фармацевтически приемлемые добавки.

[0053] Так, например, заявленное лекарственное средство может быть выполнено в твердой лекарственной форме и содержать технологически необходимое (эффективное) количество фармацевтически приемлемой добавки, представляющей собой нейтральный носитель (например, лактоза), насыщенный смесью продуктов технологической обработки методом последовательных множественных разведений исходных субстанций антител к HLA-DRB1,  $\beta$ 2-МГ, IFN $\gamma$  и/или CD4, и фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества (эксципиенты), которые включают, например, гипромеллоза, мальтитол, глицерол, сорбат калия, лиманная кислота безводная, изомальт, кремния диоксид, цикламат натрия, сахарин натрия, целлюлозу микрокристаллическую, магния стеарат и другие.

[0054] Конечный продукт по настоящему изобретению – лекарственное средство, представляющее собой продукт технологической

обработки методом последовательных множественных разведений исходных субстанций а) антител к  $\beta 1$  - домену молекулы главного комплекса гистосовместимости класса 2 (HLA-DRB1), б) антител к  $\beta 2$ -микроглобулину ( $\beta 2$ -МГ), в) антител к интерферону-гамма (IFN- $\gamma$ ), г) антител к CD4 или а) антител к  $\beta 1$  - домену молекулы главного комплекса гистосовместимости класса 2 (HLA-DRB1), б) антител к  $\beta 2$ -микроглобулину ( $\beta 2$ -МГ). При этом используемые разведения исходных субстанций могут варьироваться от десятичных (D) до тысячным (M), а также иметь различные соотношения между собой. Оптимальные разведения и соотношения исходных компонентов определяются согласно известной практике, применяемой в фармакодинамике и фармакокинетики, в частности, кривой доза-эффект.

[0055] Для получения твердой оральной формы заявленного лекарственного средства в установке кипящего слоя (например, типа «Hüttlin Pilotlab» производства компании Hüttlin GmbH) производят орошение до насыщения вводимых в псевдооживленный - кипящий слой гранул нейтрального носителя - лактозы (молочного сахара), предварительно полученным водным или водно-спиртовым раствором (концентрация подбирается экспериментальным путем, ОФС.1.6.2.0010.18 Государственная Фармакопея) продуктов технологической обработки методом последовательных множественных разведений исходных субстанций антител с одновременной сушкой в потоке подаваемого под решетку нагретого воздуха при температуре не выше 40°C. Полученную таблеточную массу равномерно перемешивают и таблетуют прямым сухим прессованием (например, в таблет-прессе Korsch - XL 400) [WO2007105981(A1), 20.09.2007]. После таблетирования получают таблетки массой 300 мг, пропитанные водным или водно-спиртовым раствором продуктов технологической обработки методом последовательных множественных разведений исходных субстанций

антител к HLA-DRB1, антител к  $\beta$ 2-микроглобулину, антител к интерферону-гамма и/или антител к CD4.

[0056] Настоящее изобретение проиллюстрировано нижепредставленными примерами вместе с прилагаемыми чертежами:

[0057] Фиг.1. Вес мочевого пузыря через 7 дней после заражения.

[0058] Фиг.2. Бактериальная плотность в ткани мочевом пузыре у мышей через 7 дней после заражения.

[0059] Фиг.3. Вес почек на 7 дней после заражения.

[0060] Фиг.4. Бактериальная плотность в ткани почек у мышей через 7 дней после заражения.

[0061] Фиг.5. Бактериальная плотность мочи через 1, 3 и 6 дней после заражения.

[0062] Фиг. 6 Выживаемость (%) мышей при инфицировании животных (точка 0 на оси абсцисс) *Escherichia coli* в дозе 2ЛД100. Примечание: \* – отличие от группы контроль статистически значимо,  $p < 0,05$ ; # – отличие от группы энрофлоксацин статистически значимо,  $p < 0,05$ .

[0063] Фиг.7. Масса тела ( $M \pm m$ ) мышей как показатель антибактериальной активности комбинации заявленного препарата с АМС при инфицировании животных (точка 0 на оси абсцисс) *Klebsiella pneumoniae* (штамм ВАА-1705, обладающий резистентностью к АМС, 106 КОЕ/мышь).

[0064] Фиг.8. Выживаемость (%) мышей как показатель антибактериальной активности комбинации заявленного препарата АМС при инфицировании животных (точка 0 на оси абсцисс) *Klebsiella pneumoniae* (штамм ВАА-1705, обладающий резистентностью к АМС, 106 КОЕ/мышь). Примечание: \* – отличие от группы контроль статистически значимо,  $p < 0,05$ ; # – отличие от группы контроль + АМС статистически значимо,  $p < 0,05$ ; \$ – отличие от группы АМС статистически значимо,  $p < 0,05$ .

[0065] Фиг.9. 50% концентрация ингибирования роста ( $IC_{50}$ ,  $M \pm m$ ) *Klebsiella pneumoniae* (штамм ВАА-1705,  $5 \times 10^4$  КОЕ/лунка) АМС и чувствительность (% ингибирования роста) бактерий к 100% концентрации

ингибирования роста бактерий АМС у интактных бактерий и у бактерий, полученных от животных, получавших *in vivo* тестируемые препараты.

Примечание: \* – отличие от значения «интактные бактерии» статистически значимо.

[0066] Фиг.10 Масса ( $M \pm m$ ) отёка как показатель противовоспалительной активности заявленного препарата при моделировании каррагенин индуцированного воспаления задней лапы у крыс. Примечание: \* – отличие от группы контроль статистически значимо,  $p < 0,05$ ; # – отличие от группы индометацин статистически значимо,  $p < 0,05$ .

[0067] Фиг.11. Соотношение количества КОЕ чувствительных к стрептомицину бактерий *Salmonella enteric* (штамм JB270) к резистентным – *Salmonella enterica* (штамм JB271 [Strep<sup>R</sup>]), в 1 г ткани селезёнки мышей на 2-4 дни после инфицирования JB270 + JB271 [Strep<sup>R</sup>] (1:1 в дозе  $5.0 \log_{10}$  КОЕ/животное). Данные представлены в виде  $M \pm SE$ . \*  $p < 0,05$  vs значения в этой же группе на 2 и 3 дни исследования; #  $p < 0,05$  vs значения групп 1 и 3 на 2, 3, 4 и 5 дни исследования (1, 2, 3 и 4 дни после инфицирования, соответственно).

[0068] Фиг.12. Соотношение количества КОЕ чувствительных к налидиксовой кислоте бактерий *Salmonella enterica* (штамм JB270) к резистентным – *Salmonella enterica* (штамм JB285 [Nal<sup>R</sup>]), в 1 г ткани селезёнки мышей на 2-4 дни после инфицирования JB270 + JB285 [Nal<sup>R</sup>] (1:1 в дозе  $5.0 \log_{10}$  КОЕ/животное). Данные представлены в виде  $M \pm SE$ . \*  $p < 0,05$  vs значения в этой же группе на 3 день исследования; #  $p < 0,05$  vs значения групп 4 и 6 на 3, 4 и 5 дни исследования (2, 3 и 4 дни после инфицирования, соответственно), а также группы 4 на 2 день исследования.

[0069] Фиг. 13 Выживаемость (%) мышей как показатель антибактериальной активности заявленного препарата при инфицировании животных (точка 0 на оси абсцисс) *Clostridium perfringens*, штамм ATCC 13124 (интраперитонеально,  $10^{10}$  КОЕ/животное). \*  $p < 0,05$  vs значения

групп 1, 2, 4 и 5; #  $p < 0,05$  vs значения групп 1, 4 и 5; \$  $p < 0,05$  vs значения групп 1 и 5.

[0070] Фиг. 14. Выживаемость (%) мышей как показатель антибактериальной активности заявленного препарата при терапии животных, инфицированных (точка 0 на оси абсцисс) *Chlamydomphila pneumonia*, штамм СМ1 (интратрахеально,  $1,5 \cdot 10^6$  ВОЕ/животное). \*  $p < 0,05$  vs значения групп 1 и 2; #  $p < 0,05$  vs значения группы 1.

[0071] Фиг. 15. Количество клеток Нер2, инфицированных *Chlamydomphila pneumonia* (штамм СМ1) после инкубации в течение 72 часов с гомогенатом ткани лёгких, полученных от мышей на 3, 6 и 12 дни после заражения этими же бактериями (интратрахеально,  $1,5 \cdot 10^6$  ВОЕ/животное) и получавшими терапию в виде плацебо, заявленного препарата или азитромицина. Данные представлены в виде  $M \pm SE$ , в % от контроля – 1 (Плацебо). \*  $p < 0,05$  vs значения в группе 1 (Плацебо) на этот же день исследования; #  $p < 0,05$  vs значения в группе 2 (Препарат) на этот же день исследования.

[0072] Фиг. 16. Концентрация интерлейкина-1 $\beta$  в ткани лёгких мышей как показатель иммуностропной активности заявленного препарата при терапии животных, инфицированных (точка 0 на оси абсцисс) *Chlamydomphila pneumonia*, штамм СМ1 (интратрахеально,  $1,5 \cdot 10^6$  ВОЕ/животное). Данные представлены в виде  $M \pm SE$ . \*  $p < 0,05$  vs значения группы фон (интактные); #  $p < 0,05$  vs значения группы 1 (Плацебо); \$  $p < 0,05$  vs значения группы 2 (Препарат). Сравнения между группами проведены внутри одного срока (дня исследования).

[0073] Фиг. 17. Концентрация интерлейкина-6 в ткани лёгких мышей как показатель иммуностропной активности заявленного препарата при терапии животных, инфицированных (точка 0 на оси абсцисс) *Chlamydomphila pneumonia*, штамм СМ1 (интратрахеально,  $1,5 \cdot 10^6$  ВОЕ/животное). Данные представлены в виде  $M \pm SE$ . \*  $p < 0,05$  vs значения группы фон (интактные); #  $p < 0,05$  vs значения группы 1 (Плацебо); \$  $p < 0,05$  vs значения группы 2 (Препарат).

0,05 vs значения группы 2 (Препарат). Сравнения между группами проведены внутри одного срока (дня исследования).

[0074] Фиг. 18. Концентрация фактора некроза опухоли- $\alpha$  в ткани лёгких мышей при терапии животных, инфицированных (точка 0 на оси абсцисс) *Chlamydophila pneumoniae*, штамм СМ1 (интратрахеально,  $1,5 \cdot 10^6$  ВОЕ/животное). Данные представлены в виде  $M \pm SE$ .

[0075] Фиг. 19. Выживаемость (%) мышей как показатель антибактериальной активности заявленного препарата при терапии животных с нейропенией, инфицированных (точка 0 на оси абсцисс) *Klebsiella pneumoniae*, штамм 8637 (интраназально,  $2 \cdot 10^7$  КОЕ/животное). \*  $p < 0,05$  vs значения в контроле (плацебо).

[0076] Фиг. 20. Бактериальная обсемененность крови и различных органов мышей, инфицированных (точка 0 на оси абсцисс) *Klebsiella pneumoniae*, штамм 8637 (интраназально,  $2 \cdot 10^7$  КОЕ/животное). \*  $p < 0,05$  vs значения в контроле (плацебо).

[0077] Фиг. 21. Влияние Препаратов 1 и 2 на содержание КОЕ *S. pneumoniae* в лёгких мышей после последовательного инфицирования вирусом A/New Jersey/8/76 (H1N1) и *S. pneumoniae*. Примечание: \* – отличие от группы «Контроль модели» статистически значимо,  $p < 0,05$ ; # – отличие от группы «Нелеченый контроль» и «Контроль» статистически значимо,  $p < 0,05$ ; \$ – отличие от группы «Препарат 1» статистически значимо,  $p < 0,05$ .

[0078] Фиг. 22. Выживаемость (%) мышей при инфицировании животных (точка 0 на оси абсцисс) вирусом гриппа H1N1/A California 04/2009 и *Staphylococcus aureus* (штамм 1986). Примечание: \* – отличие от группы контроль статистически значимо,  $p < 0,05$ ; # – отличие от группы отрицательный контроль статистически значимо,  $p < 0,05$ .

[0079] Фиг. 23. Изменения относительной гиперреактивности бронхов у мышей, инфицированных RSV (штамм A2). Примечание: на диаграмме данные гиперреактивности бронхов для каждой группы в точке «0 мг / мл метахолина» (исходный уровень) были приняты за 1. Значения,



полученные в других точках, были нормализованы к исходному уровню соответствующей группы. Данные представлены как нормализованные  $M \pm CI$  95%. \* - отличие от интактной группы (группа 6) статистически значимо,  $p < 0,05$ ; # - отличие от контрольной группы (3-я группа) статистически значимо,  $p < 0,05$ ; & - отличие от группы RSV (группа 4) статистически значимо,  $p < 0,05$ .

[0080] Фиг.24. Количество копий вирусной РНК ( $M \pm m$ ) в легких мышей, инфицированных RSV (A2). Примечание: \* - отличие от контрольной (3-я группа) и RSV (4-я группа) групп статистически значимо,  $p < 0,05$ ; # - отличие от группы 6 статистически значимо,  $p < 0,05$ , \$ - отличие от группы 2 статистически значимо,  $p < 0,05$

[0081] Фиг. 25. Масса тела крыс при экспериментальном интратрахеальном инфицировании *Pseudomonas aeruginosa* (штамм RP73) в дозе  $6,5 \cdot 10^7$  КОЕ/мл и профилактико-лечебного курсе терапии в виде плацебо, заявленного препарата или тобрамицина. Данные представлены в виде  $M \pm SE$ . \*  $p < 0,05$  vs значения в группах 1 (Без терапии) и 2 (Плацебо); #  $p < 0,05$  vs значения группы 4 (Препарат).

[0082] Фиг. 26. Бактериальная обсемененность лёгких крыс на 5 день после интратрахеального инфицирования *Pseudomonas aeruginosa* (штамм RP73) в дозе  $6,5 \cdot 10^7$  КОЕ/мл и профилактико-лечебного курса терапии в виде плацебо, заявленного препарата или тобрамицина. Данные представлены в виде % от значения в группе 1 (Без терапии),  $M \pm SE$ . \*  $p < 0,05$  vs значения в группах 1 (Без терапии) и 2 (Плацебо).

[0083] Фиг. 27. Бактериальная обсемененность бронхоальвеолярного лаважа крыс на 5 день после интратрахеального инфицирования *Pseudomonas aeruginosa* (штамм RP73) в дозе  $6,5 \cdot 10^7$  КОЕ/мл и профилактико-лечебного курса терапии в виде плацебо, заявленного препарата или тобрамицина. Данные представлены в виде % от значения в группе 1 (Без терапии),  $M \pm SE$ . \*  $p < 0,05$  vs значения в группах 1 (Без терапии) и 2 (Плацебо); #  $p < 0,05$  vs значения группы 4 (Препарат).

[0084] Фиг. 28. Обсемененность *Porphyromonas gingivalis* (штамм ATCC 33277) образцов содержимого подкожно имплантированных мышам камер на 4 день после *iv vivo* введения в них бактерий в дозе  $10^8$  КОЕ/животное. Данные представлены в виде  $M \pm SE$ . \*  $p < 0,05$  vs значения групп 1 (Без терапии) и 2 (Плацебо).

[0085] Фиг. 29. Концентрация интерлейкина- $1\beta$  у мышей в подкожно имплантированных камерах на 4 день после *iv vivo* введения в них *Porphyromonas gingivalis* (штамм ATCC 33277) в дозе  $10^8$  КОЕ/животное. Данные представлены в виде  $M \pm SE$ . \*  $p < 0,05$  vs значения групп 1 (Без терапии) и 2 (Плацебо).

[0086] Фиг. 30. Концентрация интерлейкина-6 у мышей в подкожно имплантированных камерах на 4 день после *iv vivo* введения в них *Porphyromonas gingivalis* (штамм ATCC 33277) в дозе  $10^8$  КОЕ/животное. Данные представлены в виде  $M \pm SE$ . \*  $p < 0,05$  vs значения групп 1 (Без терапии) и 2 (Плацебо).

[0087] Фиг. 31. Бактериальная обсемененность легких мышей через 4 недели после инфицирования *Mycobacterium tuberculosis* (штамм H37Rv) в дозе  $5 \cdot 10^6$  КОЕ/животное и терапии в виде плацебо, заявленного препарата или сочетания изониазид + рифампицин + этамбутолазитромицин. Данные представлены в виде  $M \pm SE$ . \*  $p < 0,05$  vs значения в группах 1 (Без терапии) и 2 (Плацебо).

[0088] Фиг. 32. Доля пациентов с разрешением симптомов ОРВИ (клинически диагностированной, в том числе, ПЦР подтвержденной). Данные РР анализа.

Пример 1.

[0089] Противотуберкулезная активность заявленного лекарственного средства в отношении *Mycobacterium tuberculosis* вызванного у морских свинок.

[0090] Цель исследования изучить противотуберкулёзную активность заявленного препарата в отношении *Mycobacterium tuberculosis* на модели экспериментального туберкулеза у морских свинок в сравнении с противотуберкулёзным препаратом Изониазидом. Препарат по настоящему изобретению содержит в соотношении 1:2 по объёму, продукт технологической обработки методом последовательных множественных разведений исходных субстанции антител к HLA-DRB1 (в водно-спиртовом разведении С12С150 в соотношении 2:3, моноклональные антитела к HLA-DRB1) и продукт технологической обработки методом последовательных множественных разведений исходных субстанции антител к  $\beta$ 2-МГ (в водном разведении С12С150 в соотношении 2:3, моноклональные антитела к  $\beta$ 2-МГ):

[0091] А) продукт технологической обработки методом последовательных множественных разведений исходной субстанции моноклональных антител к  $\beta$ 1 - домену молекулы главного комплекса гистосовместимости класса 2 (HLA-DRB1), полученный путем объединения двух различных последовательных разведений исходного (матричного) раствора моноклональных антител к HLA-DRB1 в водно-спиртовом растворителе (концентрация 2,5 мг/мл). В соотношении 2:3 по объёму смешивались следующие разведения:

1) разведение исходного (матричного) раствора в  $100^{12}$  раз, что эквивалентно сотенному разведению С12 в сочетании с внешним механическим воздействием – встряхиванием каждого разведения.

2) разведение исходного (матричного) раствора в  $100^{150}$  раз, что эквивалентно сотенному разведению С150 в сочетании с внешним механическим воздействием – встряхиванием каждого разведения.

[0092] Б) продукт технологической обработки методом последовательных множественных разведений исходной субстанции моноклональных антител к  $\beta$ 2-микροглобулину ( $\beta$ 2-МГ), полученный путем объединения двух различных последовательных разведений исходного (матричного) раствора моноклональных антител к  $\beta$ 2-МГ в водном

растворителе (концентрация 1,0 мг/мл). В соотношении 2:3 по объему смешивались следующие разведения:

1) разведение исходного (матричного) раствора в  $100^{12}$  раз, что эквивалентно сотенному разведению С12 в сочетании с внешним механическим воздействием – встряхиванием каждого разведения.

2) разведение исходного (матричного) раствора в  $100^{150}$  раз, что эквивалентно сотенному разведению С150 в сочетании с внешним механическим воздействием – встряхиванием каждого разведения.

*Экспериментальные группы:*

[0093] Группа 1 – интактный контроль, незараженные животные (n=7);

[0094] Группа 2 – отрицательный контроль (зараженные, нелеченные животные) (n=7);

[0095] Группа 3 – животные, получавшие плацебо (вода очищенная) перорально 2 раза в день в течение 5 суток до заражения и 6 дней в неделю в течение двух месяцев через две недели после заражения в объеме 4 мл/кг (n=14);

[0096] Группа 4 – животные, получавшие плацебо (вода очищенная) перорально 2 раза в день в течение 5 суток до заражения и 6 дней в неделю в течение двух месяцев через две недели после заражения в объеме 4 мл/кг и Изониазид в дозе 10 мг/кг в объеме 0,4 мл 6 дней в неделю в течение двух месяцев через две недели после заражения (n=14);

[0097] Группа 5 – животные, получавшие препарат перорально 2 раза в день в течение 5 суток до заражения и 6 дней в неделю в течение двух месяцев через две недели после заражения в объеме 4 мл/кг (n=14);

*Дизайн исследования:*

[0098] Длительность настоящего исследования составила (196 дней, 6,5 месяцев): сентябрь-декабрь – наблюдение за экспериментальными животными и их лечение; январь-март – изучение отобранного при некропсии диагностического материала микробиологическими и

гистологическими методами. Клинический осмотр, оценку внешнего вида, общего состояния здоровья, выявление смертности проводили ежедневно перед кормлением животных.

[0099] Исследуемые препараты вводили морским свинкам перорально с помощью шприца без иглы в общем объеме 8 мл/кг два раза в день в течение 5 суток до заражения и шесть дней в неделю (ежедневно, кроме воскресенья) в течение 2 месяцев после заражения. Доза препаратов корректировалась один раз в каждую неделю по результатам взвешивания животных. Водно-крахмальная суспензия изониазида вводилась животным в то же время и тем же способом, что и тестируемые образцы. Доза изониазида – 10 мг/кг веса в 0,4 мл водно-крахмальной кашицы.

[00100] В процессе исследования во всех группах морских свинок оценивали выживаемость, вес, интенсивность роста *M.tuberculosis* в посевах, гистологические изменения в органах животных.

*Результаты исследования:*

Таблица 1. Результаты оценки степени пораженности органов морских свинок.

№ п.п.	Наименование критериев	Группа, М±m*				
		интакт.конт роль	отрицат.к онтроль	плацебо	плацебо+и зониазид	препарат
1	Критерий продолжительности жизни, ед.	3,0±0	2,3±0,3	1,9±0,2	2,7±0,09	3±0
2	Разница в весе животных в начале и в конце опыта, г.	153,7±16,7	13,1±2,7	38,0±23,3	180,6±28,4	200,0±11,6
3	Критерий макроскопических поражений легких, ед.	0±0	3,5±0,4	3,6±0,1	0,2±0,1	0,1±0,1
4	Критерий количества МБТ в мазках из легочной ткани, окрашенных по Цилю-Нильсену, ед.	0±0	3,6±0,4	2,8±0,3	0±0	0±0
5	Критерий высеваемости МБТ при посеве гомогенатов легких на плотные питательные среды, ед.	0±0	2,4±0,3	2,3±0,2	0±0	0±0
6	Критерии макроскопических	0±0	1,8±0,4	1,4±0,2	2,07±0,3	1,9±0,07

	изменений лимфоузлов в месте введения, ед.					
7	Критерии макроскопических изменений средостенных лимфоузлов, ед.	0±0	0,5±0,1	0,6±0	0,85±0,09	0,96±0,03
8	Критерии макроскопических изменений в печени, ед.	0±0	3,3±0,1	2,8±0,4	0,03±0,03	0,04±0,02
9	Критерии макроскопических изменений в селезенке, ед.	0±0	3,1±0,5	2,3±0,4	0,12±0,07	0,09±0,06

Примечание:  $M \pm m^*$  - среднее значение критерия с ошибкой среднего по группе

*Вывод:*

[00101] Анализ полученных в ходе исследования данных позволяет заключить, что положительный терапевтический эффект был одинаково отмечен в группе при лечении лабораторных животных Изониозидом и в группе при лечении заявленным Препаратом. Гистологическое исследование органов животных данных двух групп показало наличие признаков терапевтического патоморфоза. Также была продемонстрирована эффективность заявленного лекарственного средства в отношении легочных инфекций.

Пример 2.

[00102] Антибактериальная активность заявленного лекарственного средства в отношении *Streptococcus pyogenes* у мышей в сочетании с антибиотиком и без него.

[00103] Данное исследование является слепым плацебоконтролируемым. Цель исследования оценить эффективность заявленного препарата с линезолидом (синтетический антибиотик) или телитромицином (антибиотик класса кетолидов) или без антибиотиков против *Streptococcus pyogenes* в модели нейтропенической инфекции мягких тканей мыши. Препарат по настоящему изобретению содержит в соотношении 2:3 по объёму, продукт технологической обработки методом

последовательных множественных разведений исходных субстанции антител к HLA-DRB1 (в водно-спиртовом разведении C4D20 в соотношении 3:2; моноклональные антитела (2,5 мг/мл) и продукт технологической обработки методом последовательных множественных разведений исходных субстанции антител к  $\beta$ 2-МГ (в водно-спиртовом разведении C10C150 в соотношении 1:2 (2,5 мг/мл); естественные антитела).

*Экспериментальные группы:*

[00104] Группа 1 – отрицательный контроль, мыши-самки были заражены *S. pyogenes* и не получали введение препарата или антибиотика в течение периода исследования; n = 3;

[00105] Группа 2 – мыши-самки, получали плацебо (глициновый буфер) перорально ежедневно в объеме 20 мл/кг 5 дней до и в день заражения *S. pyogenes*; n = 6;

[00106] Группа 3 – мыши-самки, получали плацебо (глициновый буфер) перорально ежедневно в объеме 20 мл/кг 5 дней до и в день заражения *S. pyogenes*; в сочетании с линезолидом (50 мг/кг) в день заражения через 2 и 14 часов после заражения; n = 6;

[00107] Группа 4 – мыши-самки, получали плацебо (глициновый буфер) перорально ежедневно в объеме 20 мл/кг 5 дней до и в день заражения *S. pyogenes*; в сочетании с телитромицином (10 мг/кг) в день заражения через 2 и 14 часов после заражения; n = 6.

[00108] Группа 5 – мыши-самки, получали препарат перорально ежедневно в объеме 20 мл/кг 5 дней до и в день заражения *S. pyogenes*; n = 6;

[00109] Группа 6 – мыши-самки, получали препарат перорально ежедневно в объеме 20 мл/кг 5 дней до и в день заражения *S. pyogenes*; в сочетании с линезолидом (50 мг/кг) в день заражения через 2 и 14 часов после заражения; n = 6;

[00110] Группа 7 – мыши-самки, получали препарат перорально ежедневно в объеме 20 мл/кг 5 дней до и в день заражения *S. pyogenes*; в

сочетании с телитромицином (10 мг/кг) в день заражения через 2 и 14 часов после заражения; n = 6;

*Дизайн исследования:*

[00111] Продолжительность исследования составила 7 дней. Нейтропения у мышей была вызвана двумя интраперитонеальными дозами циклофосфида (за 4 дня до заражения – 150 мг/кг и за 1 день – 100 мг/кг). Мыши не получали дальнейшую иммуносупрессию на протяжении всего исследования.

[00112] Экспериментальные образцы вводили в течение 5 дней до заражения, а также в день заражения (через 2 и 14 часов) перорально в дозе 20 мл/кг. В день заражения мышам вводили в мышцу бедра штамм *S. pyogenes* (ATCC ВАА-2469) в дозе 5,4 lg КОЕ. Также через 2 и 14 часов после заражения животным вводили антибиотики - линезолид (50 мг/кг), к которому данный штамм *S. pyogenes* чувствителен, и телитромицин (10 мг/кг), к которому штамм резистентен.

[00113] В процессе исследования во всех группах мышей оценивали выживаемость, клинические проявления инфекции, массу тела.

*Результаты исследования:*

[00114] Через 2 часа после заражения у мышей, не получавших лечения (Группа 1), забиралась мышца бедра для оценки бактериальной плотности (КОЕ/г, log<sub>10</sub>). В остальных группах мышца бедра для оценки бактериальной плотности забиралась через 24 часа после заражения. Полученные данные представлены в таблице 2.

Таблица 2. Средняя бактериальная плотность в ткани бедра (КОЕ/г, log<sub>10</sub>)

Группа	2 часа после заражения	24 часа после заражения
1 (контроль)	5,2	-
2 (плацебо)	-	9,1
3 (плацебо + Л)	-	5,5



4 (плацебо + Т)	-	8,4
5 (препарат)	-	6,5
6 (препарат + Л)	-	3,7
7 (препарат + Т)	-	7,1

*Вывод:*

[00115] Через 24 часа после заражения испытуемые группы (Группа 3 и 6) при введении в комбинации с линезолидом продемонстрировали статистически значимое снижение средней бактериальной нагрузки. Таким образом, заявленное лекарственное средство эффективно в отношении инфекций костно-мышечной системы, а также в комбинации с антибиотиками, повышает их эффективность.

Пример 3.

[00116] Эффективность заявленного лекарственного средства отдельно и в комбинации с антибиотиком в отношении *E.coli* на модели инфекции мочевыводящих путей у мышей.

[00117] Цель исследования оценить влияние тестируемого препарата в условиях экспериментальной инфекции у мышей, вызванной *E.coli* в сочетании с антибиотиком Норфлоксацином и без него. Препарат по настоящему изобретению содержит, в соотношении 1:1 по объёму, продукты технологической обработки методом последовательных множественных разведений исходных субстанций антител к HLA-DRB1 (в водном разведении C12C30C50 в соотношении 1:1:1; поликлональные антитела, (2,5 мг/мл) и антител к  $\beta$ 2-МГ (в водном разведении C12C30C50 в соотношении 1:1:1 (2,5 мг/мл); моноклональные антитела).

*Экспериментальные группы:*

[00118] Группа 1 – мыши обоего пола (n=10) получали заявленный препарат (20 мл/кг) ежедневно через пероральный зонд в течение 5 дней до заражения и 7 дней после заражения и через 1 час после заражения внутривбрюшинно (объем 10 мл / кг).

[00119] Группа 2 – мыши обоего пола (n=10) получали заявленный препарат (20 мл/кг) ежедневно через пероральный зонд в течение 5 дней до заражения и 7 дней после заражения. Через 1 час после заражения внутривбрюшинно вводили Норфлоксацин 5 мг/кг (объем 10 мл / кг).

[00120] Группа 3 – контроль, мыши обоего пола (n=10) получали глициновый буфер (20 мл/кг) ежедневно через пероральный зонд в течение 5 дней до заражения и 7 дней после заражения и через 1 час после заражения внутривбрюшинно (объем 10 мл / кг).

[00121] Группа 4 – мыши обоего пола (n=10) получали глициновый буфер (20 мл/кг) ежедневно через пероральный зонд в течение 5 дней до заражения и 7 дней после заражения. Через 1 час после заражения внутривбрюшинно вводили Норфлоксацин 5 мг/кг (объем 10 мл / кг).

*Дизайн исследования:*

[00122] Мышей инфицировали E.coli UTI89 (2,107 КОЕ/мышь) путем интрауретральной инокуляции в мочевого пузыря (день 0).

[00123] Через 1, 3 и 6 дней после заражения мочу собирали для определения КОЕ. Через семь дней после заражения умерщвляли по 10 животных в каждой группе и собирали почки и мочевого пузыря для анализа бактериальной нагрузки. Массу тела регистрировали каждые 2 дня в течение всего эксперимента.

*Результаты исследования:*

[00124] Динамика массы тела во всех группах была положительной, это свидетельствует о хорошей переносимости экспериментальных образцов животными.

[00125] Вес мочевого пузыря был статистически значимо ниже в Группе 2 (препарат+норфлоксацин) по сравнению с Группой 4 (гл.буфер+

норфлоксацин). Это может указывать на то, что заявленный препарат в сочетании с антибиотиками может уменьшить отек мочевого пузыря.

[00126] Заявленный препарат в сочетании с норфлоксацином (Группа 2) статистически значимо уменьшал бактериальную нагрузку в мочевом пузыре. Таким образом, эта комбинация может быть перспективной в качестве терапевтической схемы (Фиг. 1, 2).

[00127] Статистически значимых различий между группами по весу почек не было зарегистрировано.

[00128] Заявленный препарат в сочетании с норфлоксацином (Группа 2) статистически значимо уменьшал бактериальную нагрузку в почках по сравнению с глициновым буфером (Группа 3). Таким образом, эта комбинация может быть перспективной в качестве терапевтической схемы (Фиг. 3, 4).

[00129] Начиная с 3-го дня, образец Группы 2 (препарат+норфлоксацин) имел пониженную бактериальную плотность в моче по сравнению с Группой 4 (гл.буфер+норфлоксацин). Образец Группы 3 (гл.буфер) имел более высокий КОЕ в моче во всех временных точках по сравнению с образцом Группы 1 (препарат) (Фиг. 5).

*Вывод:*

[00130] Таким образом, заявленное лекарственное средство в сочетании с антибиотиком Норфлоксацином проявляет антибактериальную активность в отношении *E.coli* на модели инфекции мочевыводящих путей у мышей.

Пример 4.

[00131] Антибактериальная активность заявленного лекарственного средства в отношении *Salmonella enteritidis rif 92* у цыплят в сочетании с антибиотиком и без него.

[00132] Данное исследование является слепым плацебоконтролируемым. Целью исследования было изучить

антибактериальную активность заявленного препарата в отношении *Salmonella enteritidis rif92* у цыплят. Препарат по настоящему изобретению содержит в одинаковом количестве два продукта технологической обработки методом последовательных множественных разбавлений (разведения С12С30С50) исходных субстанций поликлональных аффинно очищенных: 1) антител к  $\beta 1$ -домену молекулы главного комплекса гистосовместимости II типа, 2) антител к  $\beta 2$ -микроглобулину главного комплекса гистосовместимости I типа:

А) продукт технологической обработки методом последовательных множественных разведений исходной субстанций поликлональных антител к  $\beta 1$  - домену молекулы главного комплекса гистосовместимости класса 2 (HLA-DRB1), полученный путем объединения трёх различных последовательных разведений исходного (матричного) раствора поликлональных антител к HLA-DRB1 в водном растворителе (концентрация 2,5 мг/мл). В соотношении 1:1:1 по объему смешивались следующие разведения:

1) разведение исходного (матричного) раствора в  $100^{12}$  раз, что эквивалентно сотенному разведению С12 в сочетании с внешним механическим воздействием – встряхиванием каждого разведения.

2) разведение исходного (матричного) раствора в  $100^{30}$  раз, что эквивалентно сотенному разведению С30 в сочетании с внешним механическим воздействием – встряхиванием каждого разведения.

3) разведение исходного (матричного) раствора в  $100^{50}$  раз, что эквивалентно сотенному разведению С50 в сочетании с внешним механическим воздействием – встряхиванием каждого разведения.

Б) продукт технологической обработки методом последовательных множественных разведений исходной субстанций поликлональных антител к  $\beta 2$ -микроглобулину ( $\beta 2$ -МГ), полученный путем объединения трёх различных последовательных разведений исходного (матричного) раствора

поликлональных антител к  $\beta$ 2-МГ в водном растворителе (концентрация 2,5 мг/мл). В соотношении 1:1:1 по объему смешивались следующие разведения:

4) разведение исходного (матричного) раствора в  $100^{12}$  раз, что эквивалентно сотенному разведению С12 в сочетании с внешним механическим воздействием – встряхиванием каждого разведения.

5) разведение исходного (матричного) раствора в  $100^{30}$  раз, что эквивалентно сотенному разведению С30 в сочетании с внешним механическим воздействием – встряхиванием каждого разведения.

6) разведение исходного (матричного) раствора в  $100^{50}$  раз, что эквивалентно сотенному разведению С50 в сочетании с внешним механическим воздействием – встряхиванием каждого разведения.

*Экспериментальные группы:*

[00133] Группа 1 – цыплята обоего пола (n=15), зараженные *Salmonella enteritidis*, которые получали препарат по настоящему изобретению внутрижелудочно с 4-го по 9-й дни жизни в дозе 0,2 мл/особь/сутки.

[00134] Группа 2 – цыплята обоего пола (n=15), зараженные *Salmonella enteritidis*, которые получали препарат по настоящему изобретению внутрижелудочно с 4-го по 9-й дни жизни в дозе 0,2 мл/особь/сутки и ципрофлоксацин (Ципровет, ООО «Научно-внедренческий центр Агроветзащита», антибиотик) в период с 5-9 дни жизни внутрижелудочно в дозе 0,5 мг/кг массы тела (ЭД50). Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению и антибиотик вводили с интервалом 1 час. Поскольку масса цыплят во время исследования ежедневно увеличивалась, объем антибиотика рассчитывали ежедневно перед введением.

[00135] Группа 3 – цыплята обоего пола (n=15), зараженные *Salmonella enteritidis*, которые получали плацебо (вода очищенная) внутрижелудочно с 4-го по 9-й дни жизни в дозе 0,2 мл/особь/сутки.

[00136] Группа 4 – цыплята обоего пола (n=15), зараженные *Salmonella enteritidis*, которые получали плацебо (вода очищенная) внутрижелудочно с 4-го по 9-й дни жизни в дозе 0,2 мл/особь/сутки и ципрофлоксацин в период с 5-9 дни жизни внутрижелудочно в дозе 0,5 мг/кг массы тела (ЭД50). Образец и антибиотик вводили с интервалом 1 час.

[00137] Группа 5 – контроль интактный – цыплята обоего пола (n=15), которые не подвергались заражению и введению лекарственных средств.

*Дизайн исследования:*

[00138] Длительность исследования составила 12 дней (с 1 по 12 дни жизни цыплят). Первые два дня цыплята находились в карантине. На 3-й день птиц, за исключением Группы 5, внутрибрюшинно инфицировали двойной летальной дозой *Salmonella enteritidis* (серовар *rif92*,  $2,5 \times 10^9$  КОЕ/г в объеме 0,5 мл/голове). С 4-го по 9-й дни жизни цыплятам вводили заявленный препарат или воду очищенную. С 5-го по 9-й дни вводили антибиотик Ципровет (группа 2 и 4).

[00139] В течение эксперимента изучали следующие показатели: выживаемость; массу тела; массу потребленного корма на момент окончания опыта, нормированную на изменение массы тела (конверсию корма); наличие и концентрацию *S. enteritidis rif92* в желудочно-кишечном тракте печени цыплят.

*Анализ данных:*

[00140] Статистический анализ результатов проводили с применением двухфакторных обобщенных линейных моделей (в случае процентных показателей использовалось гамма-распределение с нормированием данных на 100, для всех остальных – лог-трансформация) с пост-хок критерием Тьюки, а также теста Краскела-Уоллиса с пост-хок критерием Вилкоксона. Отличия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

*Результаты исследования:*

[00141] Согласно полученным результатам, сохранность во всех экспериментальных группах составила 100%. Живая масса цыплят в конце исследования была максимальной у бройлеров, получавших заявленный препарат (Группа 1), на 33,9 г и 38,7 г превышая показатели плацебо (Группа 3) и интактной группы (Группа 5), соответственно. Конверсия корма не отличалась между группами. Гематологические исследования по основным показателям не выявили разницы между группами.

[00142] Обобщенные данные по обсемененности печени сальмонеллами и наличие в кишечном содержимом по группам на момент окончания опытов представлены в таблице 3.

Табл. 3. Показатели присутствия сальмонелл после убоя птицы и индекс антимикробной активности (ИАА)

Номер группы	Наличие сальмонелл в печени		Наличие сальмонелл в содержимом кишечника		ИАА
	% «не вылеченных» цыплят от общего количества цыплят в группе	Значение КОЕ/г у зараженных (медиана)	% «не вылеченных» цыплят от общего количества цыплят в группе	Значение КОЕ/г у зараженных (медиана)	
1 (Препарат)	13.3	18.5	13.3	$5.5 \times 10^3$	10.6
2 (Препарата +ЦФ)	6.7	56	26.7	$5 \times 10^2$	3.5
3 (Плацебо)	20	195.7	46.7	$2.3 \times 10^3$	-
4 (Плацебо+ЦФ)	6.7	200	33.3	$3.8 \times 10^3$	-
5 (Интактный контроль)	-	-	-	-	-

[00143] ИАА рассчитывали по формуле:

$$ИАА = \frac{Вк}{Во},$$
 где  $Вк$  – содержание микробных клеток в гомогенате органов в контрольной группе к окончанию срока наблюдения;

$Во$  – содержание микробных клеток в гомогенате органов в опытной группе к окончанию срока наблюдения [Охапкина В.Ю., Пяткова Н.В., Федотов А.К. Метод ускоренной оценки эффективности антибактериальных препаратов при экспериментальном бруцеллезе // Пробл. особо опасных инф. 2016; 2:79–82.].

[00144] Как следует из данных таблицы 1, наименьшая обсемененность сальмонеллами печени зафиксирована во второй и четвертой группах, наибольшая – в третьей группе. В тоже время для препарата по настоящему изобретению (Группа 1) ИАА (10,6) значительно превосходит показатель для его комбинации с антибиотиком (3,6). Концентрация возбудителя в печени в группах 1 и 2 была соответственно в 10,6 и 3,5 раз ниже, чем в группах 3 и 4, что говорит о протективном действии препарата на печень в отношении обсеменения сальмонеллой.

[00145] *Вывод:*

1. Заявленное лекарственное средство показало эффективность (антибактериальное действие), которая выражалась снижением заболевших цыплят на 33,4 % по сравнению с группой плацебо, а также снижением концентрации возбудителя в печени в 10,6 раз в группе препарата по сравнению с группой плацебо, что говорит о протективном действии препарата на печень в отношении обсеменения сальмонеллой. Заявленное лекарственное средство также эффективно в отношении кишечных инфекций.

2. Совместное применение препарата с антибиотиком в половине эффективной дозе (ЭД 50) повышало эффективность последнего, что проявлялось на убое в снижении концентрации возбудителя в желудочно-кишечном тракте цыплят на один порядок по отношению к группам препарата и плацебо. Таким образом, было показано снижение



терапевтической дозы антибиотика при совместном применении с заявленным препаратом.

Пример 5.

[00146] Антибактериальная активность заявленного лекарственного средства в отношении *Escherichia coli* CN 160 у мышей в сочетании с антибиотиком и без него.

[00147] Данное исследование является слепым сравнительным плацебоконтролируемым. Цель исследования – оценить фармакологическую активность тестируемого препарата в условиях экспериментальной инфекции у мышей, вызванной *E.coli* CN 160 в сочетании с антибиотикотерапией энрофлоксацином (Байтрил, Баер). Препарат по настоящему изобретению содержит в одинаковом количестве два продукта технологической обработки методом последовательных множественных разбавлений (разведения C12C30C50) исходных субстанций поликлональных аффинно очищенных: 1) антител к  $\beta$ 1-домену молекулы главного комплекса гистосовместимости II типа (концентрация 2,5 мг/мл), 2) антител к  $\beta$ 2-микροглобулину главного комплекса гистосовместимости I типа (концентрация 2,5 мг/мл).

*Экспериментальные группы:*

[00148] Группа 1 – мыши обоего пола (n=10) получали заявленный препарат перорально, 1 раз в день 5 дней до заражения, через 1 час после заражения, а затем на протяжении 14 дней в дозе 10 мл/кг/сутки.

[00149] Группа 2 – контроль, мыши обоего пола (n=10) получали плацебо (вода очищенная) перорально, 1 раз в день 5 дней до заражения, через 1 час после заражения, а затем на протяжении 14 дней в дозе 10 мл/кг/сутки.

[00150] Группа 3 – мыши обоего пола (n=10) получали антибактериальный препарат Байтрил внутримышечно в дозе 1,38 мг/кг 3 дня до заражения и 3 дня после заражения.

[00151] Группа 4 – мыши обоего пола (n=10) получали заявленный препарат перорально, 1 раз в день 5 дней до заражения, через 1 час после заражения, а затем на протяжении 14 дней в дозе 10 мл/кг/сутки. Также мышам вводили антибактериальный препарат Байтрил внутримышечно в дозе 1,38 мг/кг 3 дня до заражения и 3 дня после заражения (совместно с заявленным препаратом).

*Дизайн исследования:*

[00152] Тестируемые образцы вводили перорально 1 раз в день 5 дней до заражения *E.coli*, через 1 час после заражения на 6-й день, а затем 14 дней во время периода наблюдения (всего 20 дней). Заражение мышей проводили внутрибрюшинно однократно на 6-й день исследования в дозе 2 ЛД<sub>100</sub>, установленной в предварительном исследовании (ЛД<sub>100</sub>=7,3×10<sup>8</sup> КОЕ/мышь). Антибактериальный препарат Байтрил вводили внутримышечно 3 дня до заражения и 3 дня после заражения (всего 6 дней) в установленной в предварительном исследовании дозе ЭД<sub>50</sub>, которая составила 1,38 мг/кг.

[00153] В процессе исследования во всех группах мышей оценивали динамику падежа мышей.

*Анализ данных:*

[00154] Статистический анализ результатов проводили с применением кривых Каплана-Мейера и последующим попарным сравнением по логранговому критерию. Отличия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

*Результаты исследования:*

[00155] Во всех группах животных, за исключением мышей, получавших комбинацию заявленного препарата с Байтрил (Группа 4), все животные пали в течение четырех суток после инфицирования летальной дозой *Escherichia coli* (Фиг.6). Основной падеж мышей (70-80 %) происходил в течение первых двух суток после инфицирования.

*Вывод:*

[00156] Применение заявленного лекарственного средства совместно с Байтрилом в дозировке ЭД50 при заражении мышей *E.coli CN 160* в концентрации 2ЛД100 позволило обеспечить защиту от гибели 50 % животных, что показывает значимое антибактериальное действие комбинации заявленного препарата с антибиотиком по отношению к двойной летальной дозе *E.coli CN-160*. Таким образом, данное исследование показывает повышение эффективности фармакологического действия антибиотика при совместном введении его и препарата по настоящему изобретению. Кроме того, показывает снижение терапевтической дозы антибиотика при совместном применении заявленного лекарственного средства и антибиотика.

[00157] Также была продемонстрирована эффективность заявленного лекарственного средства в отношении системных инфекций, сепсиса.

Пример 6.

[00158] Эффективность лекарственного средства при инфицировании мышей резистентным к амоксициллину+клавулановой кислоте штаммом *Klebsiella pneumoniae BAA-1705*.

[00159] Цель исследования изучить антибактериальное действие заявленного препарата совместно с амоксициллином+ клавулановой кислоте (АМС) по отношению к резистентному к АМС штамму *Klebsiella pneumoniae*. Препарат по настоящему изобретению содержит в одинаковом количестве два продукта технологической обработки методом последовательных множественных разбавлений (разведения С12С30С50) исходных субстанций поликлональных аффинно очищенных: 1) антител к  $\beta$ 1-домену молекулы главного комплекса гистосовместимости II типа (концентрация 2,5 мг/мл), 2) антител к  $\beta$ 2-микроглобулину главного комплекса гистосовместимости I типа (концентрация 2,5 мг/мл).

[00160] Исследование №1.

*Экспериментальные группы:*

[00161] Группа 1 – мыши-самцы, получали комбинацию заявленного препарата и АМС в дозе 25 мг/кг в 10 мл/кг 0.9% NaCl внутривентрально в течение пяти дней до и через час после инфицирования в дозе 10 мл/кг/сутки (n=15);

[00162] Группа 2 – контроль, мыши-самцы, получали очищенную воду внутривентрально в течение пяти дней до и через час после инфицирования в дозе 10 мл/кг/сутки (n=15);

[00163] Группа 3 – мыши-самцы, получали комбинацию очищенной воды и АМС в дозе 25 мг/кг в 10 мл/кг 0.9% NaCl внутривентрально в течение пяти дней до и через час после инфицирования в дозе 10 мл/кг/сутки (n=15);

[00164] Группа 4 – мыши-самцы, получали препарат АМС интрабрюшинно через час после инфицирования в дозе 25 мг/кг в 10 мл/кг 0.9% NaCl (n=15);

[00165] Группа 5 – положительный контроль, мыши-самцы, получали интрабрюшинно Гентамицин (Sigma) в дозе 15 мг/кг в 10 мл/кг 0.9% NaCl (n=15).

*Дизайн исследования:*

[00166] У животных моделировали бактериальную пневмонию с нейтропенией. Пневмонию вызывали с помощью интраназального введения *Klebsiella pneumoniae* (штамм ВАА-1705, обладающий резистентностью к АМС, 10<sup>6</sup> КОЕ/мышь). Для индукции нейтропении мышам за 4 дня и за сутки до инфицирования интраперитонеально вводили циклофосфамид в дозах 150 мг/кг и 100 мг/кг, соответственно.

[00167] Оценивали плотность бактерий в легких, массу тела как показатель, отражающий общее состояние, а также дважды в день фиксировали количество живых особей (выживаемость).

[00168] Данные анализировали с помощью критерия Краскела-Уоллиса с пост-хок критерием Тьюки и кривых Каплана-Мейера и

последующим попарным сравнением по логранговому критерию. Отличия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

*Результаты исследования:*

[00169] Ни один из тестируемых препаратов не повлиял на массу легких зараженных животных и концентрацию КОЕ. При этом во всех исследуемых группах наблюдалось снижение массы тела мышей, вызванное инфекционным воспалением (Фиг.7). В группах 5 (гентамицин) и 1 (препарат+АМС) с 54 часа периода наблюдения наблюдалось начало восстановления массы тела.

[00170] Смертность животных во всех группах начинала регистрироваться с 48 по 54 часы периода наблюдения (Фиг.8). В группах «контроль» и «контроль+АМС» погибли все животные, что подтвердило наличие у *Klebsiella pneumoniae* (штамм ВАА-1705) резистентности к антибиотику. Лечение гентамицином и комбинацией «Препарат + АМС» увеличивало выживаемость мышей до 70% и 50%, соответственно.

*Вывод:*

[00171] Таким образом, в исследовании показано значимое антибактериальное действие заявленного лекарственного средства в комбинации с АМС по отношению к резистентному к АМС штамму *Klebsiella pneumoniae*. Данный эффект был сравним с препаратом сравнения гентамицином, к которому штамм имеет чувствительность.

*Исследование №2.*

*Экспериментальные группы:*

[00172] Группа 1 – мыши-самцы, получали заявленный препарат внутрижелудочно в течение пяти дней до и двух дней после инфицирования в дозе 20 мл/кг/сутки ( $n=5$ ). Этой же группе мышей через час после инфицирования внутрибрюшинно вводили АМС в дозе 25 мг/кг в 10 мл/кг 0.9% NaCl.;

[00173] Группа 2 – контроль, мыши-самцы, получали очищенную воду внутрижелудочно в течение пяти дней до и двух дней после

инфицирования в дозе 20 мл/кг/сутки (n=5). Этой же группе мышей через час после инфицирования внутривенно вводили АМС в дозе 25 мг/кг в 10 мл/кг 0.9% NaCl.

*Дизайн исследования:*

[00174] У животных моделировали бактериальную пневмонию помощью введения *Klebsiella pneumoniae* (штамм ВАА-1705, обладающий резистентностью к АМС,  $10^7$  КОЕ/мышь). Через 48 часов после заражения получали гомогенат тканей легких мышей обеих групп, который использовали для получения  $1 \times 10^4$  КОЕ/мл *Klebsiella pneumoniae*. Далее бактерии ( $5 \times 10^4$  КОЕ/лунка) инкубировали 24 часа при  $37^\circ\text{C}$  с 2,5-1080 мкг/мл АМС. По окончании эксперимента спектрофотометрически оценивали 50% концентрацию ингибирования роста бактерий (IC50) АМС в каждой из групп, а также значение полного ингибирования роста бактерий под действием АМС в концентрации 1080 мкг/мл. Эксперимент проводили в двух повторах. Дополнительно провели эксперимент, в котором IC50 АМС оценили у интактных бактерий (см. Фиг.9).

[00175] Статистический анализ полученных данных проводили с применением однофакторного и двухфакторного дисперсионного анализа с последующим попарным сравнением по логранговому критерию. Отличия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

*Результаты исследования:*

[00176] Концентрация полного ингибирования роста бактерий АМС составила 1080 мкг/мл, что подтверждает наличие у *Klebsiella pneumoniae* (штамм ВАА-1705) резистентности к АМС. Введение заявленного препарата в сочетании с введением АМС, уменьшило в *in vitro* эксперименте значение IC50 АМС на 27% (то есть применённая терапия позволила уменьшить концентрацию АМС, оказывающую 50% ингибирующий антибактериальный эффект). Аналогичный результат был получен и при изучении влияния тестируемой лекарственной комбинации на активность АМС при применении в фиксированной концентрации– 1080

мкг/мл (100% концентрация ингибирования роста бактерий): максимальный ингибирующий эффект АМС повысился на 26% (Фиг.9).

*Вывод:*

[00177] Таким образом, в исследовании показано значимое антибактериальное действие заявленного лекарственного средства с АМС по отношению к резистентному к АМС штамму *Klebsiella pneumoniae*, заключающееся в снижении резистентности бактерий к АМС. Показана эффективность заявленного препарата в отношении легочной инфекции.

Пример 7.

[00178] Противовоспалительная активность заявленного лекарственного средства на модели каррагенин-индуцированного воспаления у крыс.

[00179] Цель исследования изучить противовоспалительную активность заявленного препарата на модели каррагенин-индуцированного воспаления у крыс в сравнении с противовоспалительным препаратом Индометацином (Sigma). Препарат по настоящему изобретению содержит в одинаковом количестве два продукта технологической обработки методом последовательных множественных разбавлений (разведения С12С30С50) исходных субстанций поликлональных аффинно очищенных: 1) антител к  $\beta$ 1-домену молекулы главного комплекса гистосовместимости II типа (концентрация 2,5 мг/мл), 2) антител к  $\beta$ 2-микроглобулину главного комплекса гистосовместимости I типа (концентрация 2,5 мг/мл).

*Экспериментальные группы:*

[00180] Группа 1 – крысы-самцы, получали заявленный препарат внутривентрикулярно в течение пяти дней до индукции воспаления (последнее введение – за 1 ч до индукции) в дозе 7,5 мл/кг/сутки (n=10);

[00181] Группа 2 – контроль, крысы-самцы, получали очищенную воду внутривентрально в течение пяти дней до индукции воспаления (последнее введение – за 1 ч до индукции) в дозе 7,5 мл/кг/сутки (n=10);

[00182] Группа 3 – положительный контроль, крысы-самцы, получали индометацин внутривентрально в дозе 10 мг/кг (в 7,5 мл/кг/сутки очищенной воды).

*Дизайн исследования:*

[00183] У животных моделировали воспалительную реакцию путём субплантарного (под подошвенный или плантарный апоневроз задней левой лапы) введения 0,1 мл 1% раствора каррагинина.

[00184] О выраженности воспалительной реакции судили по изменению прироста отека в мг, рассчитанного как разница масс лапы с отёком и лапы без отёка.

[00185] Статистический анализ результатов проводили с применением критерия Краскела-Уоллиса с пост-хок критерием Тьюки. Отличия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

*Результаты исследования:*

[00186] Заявленный препарат уменьшил массу отёка на 39,1% по сравнению с контролем, индометацин – на 57,9% (Фиг.10).

*Вывод:*

[00187] Таким образом, заявленное лекарственное средство, представляющее собой продукт технологической обработки методом последовательных множественных разведений исходных субстанции антител к HLA-DRB1 и продукт технологической обработки методом последовательных множественных разведений исходных субстанции антител к  $\beta$ 2-МГ, проявил выраженную противовоспалительную активность при моделировании каррагинин-индуцированного воспаления у крыс, уменьшая массу отёка лапы.

Пример 8.



[00188] Антибактериальная активность заявленного лекарственного средства в отношении резистентного к стрептомицину или налидиксовой кислоте *Salmonella enterica* (штаммы JB271 и JB285, соответственно).

[00189] Данное исследование является слепым плацебоконтролируемым. Цель исследования – оценка влияния заявленного препарата на соотношение чувствительные/резистентные к антибиотику бактерии в условиях экспериментального перитонита (сепсиса) у мышей, вызванного *Salmonella enterica* серовар Typhimurium LT-2. Препарат по настоящему изобретению содержит в соотношении 1:1 по объёму, продукты технологической обработки методом последовательных множественных разведений исходных субстанций антител к HLA-DRB1 (в разведении C12C30C50 в соотношении 2:1:3; поликлональные антитела, концентрация 2 мг/мл) и антитела к  $\beta$ 2-МГ (в разведении C12C30C50 в соотношении 2:1:3; поликлональные антитела, концентрация 2 мг/мл).

*Экспериментальные группы:*

[00190] Группа 1 – мыши-самки линии BALB/c (n=12) получали перорально плацебо (очищенная вода) через 1, 4 и 8 часов после инфицирования *Salmonella enterica* (1:1 комбинация чувствительных *Salmonella enterica* Typhimurium LT-2 (штамм JB270) и резистентных *Salmonella enterica* Typhimurium LT-2 (штамм JB271) к стрептомицину, интраперитонеально 5.0 log<sub>10</sub> КОЕ/животное). Объем введения – 10 мл/кг.

[00191] Группа 2 – мыши-самки линии BALB/c (n=12) получали перорально заявленный препарат через 1, 4 и 8 часов после инфицирования *Salmonella enterica* (1:1 комбинация чувствительных *Salmonella enterica* Typhimurium LT-2 (штамм JB270) и резистентных *Salmonella enterica* Typhimurium LT-2 (штамм JB271) к стрептомицину, интраперитонеально 5.0 log<sub>10</sub> КОЕ/животное). Объем введения – 10 мл/кг.

[00192] Группа 3 – мыши-самки линии BALB/c (n=12), инфицированные *Salmonella enterica* (1:1 комбинация чувствительных *Salmonella enterica* Typhimurium LT-2 (штамм JB270) и резистентных

*Salmonella enterica* Typhimurium LT-2 (штамм JB271) к стрептомицину, интраперитонеально 5.0 log<sub>10</sub> КОЕ/животное) одновременно с мышами из групп 1 и 2, но не получавшие какие-либо препараты (без терапии).

[00193] Группа 4 – мыши-самки линии BALB/c (n=12) получали перорально плацебо (очищенная вода) через 1, 4 и 8 часов после инфицирования *Salmonella enterica* (1:1 комбинация чувствительных *Salmonella enterica* Typhimurium LT-2 (штамм JB270) и резистентных *Salmonella enterica* Typhimurium LT-2 (штамм JB285) к налидиксовой кислоте, интраперитонеально 5.0 log<sub>10</sub> КОЕ/животное). Объем введения – 10 мл/кг.

[00194] Группа 5 – мыши-самки линии BALB/c (n=12) получали перорально заявленный препарат через 1, 4 и 8 часов после инфицирования *Salmonella enterica* (1:1 комбинация чувствительных *Salmonella enterica* Typhimurium LT-2 (штамм JB270) и резистентных *Salmonella enterica* Typhimurium LT-2 (штамм JB285) к налидиксовой кислоте, интраперитонеально 5.0 log<sub>10</sub> КОЕ/животное). Объем введения – 10 мл/кг.

[00195] Группа 6 – мыши-самки линии BALB/c (n=12), инфицированные *Salmonella enterica* (1:1 комбинация чувствительных *Salmonella enterica* Typhimurium LT-2 (штамм JB270) и резистентных *Salmonella enterica* Typhimurium LT-2 (штамм JB285) к налидиксовой кислоте, интраперитонеально 5.0 log<sub>10</sub> КОЕ/животное) одновременно с мышами из групп 4 и 5, но не получавшие какие-либо препараты (без терапии).

*Дизайн исследования:*

[00196] Продолжительность исследования составила 5 дней. Перитонит (сепсис) у мышей был вызван интраперитонеальным введением в дозе 5.0 log<sub>10</sub> КОЕ/животное чувствительных и резистентных к стрептомицину или налидиксовой кислоте *Salmonella enterica* в соотношении 1:1 (т.е. штамм JB270 + штамм JB271 [Strep<sup>R</sup>] в соотношении 1:1 или штамм JB270 + штамм JB285 [Nal<sup>R</sup>] в соотношении 1:1, соответственно).

[00197] Экспериментальные образцы вводили перорально в дозе 10 мл/кг через 1, 4 и 8 часов после инфицирования.

[00198] На 2, 3 и 4 дни после заражения по 4 мыши из каждой группы умерщвляли путем цервикальной дислокации и выделяли селезенку. Из полученных органов готовили гомогенат, серийные десятикратные разведения которого в триплетах по 20 мкл переносили в чашки Петри с агаром LB и одним из антибиотиков – стрептомицином в дозе 50 мкг/мл или налидиксовой кислотой в дозе 30 мкг/мл.

[00199] Через 24 часа подсчитывали количество колониеобразующих единиц (КОЕ) в каждом разведении рассчитывали соотношение чувствительных и резистентных бактерий – штамм JB270 / штамм JB271 [Strep<sup>R</sup>] или штамм JB270 / штамм JB285 [Nal<sup>R</sup>] – на грамм ткани селезенки для каждой мыши.

[00200] Статистический анализ результатов проводили с применением двухфакторного дисперсионного анализа для повторных измерений с апостериорным критерием Тьюки. Отличия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

*Результаты исследования:*

[00201] В эксперименте с применением резистентных к стрептомицину бактерий *Salmonella enterica* (штамм JB271 [Strep<sup>R</sup>]) в соотношении 1:1 с чувствительным – штамм JB270, показано, что в отсутствии терапии (группа 3) на всём протяжении эксперимента количество КОЕ каждого из штаммов сохраняется неизменным. Такие же результаты получены и при введении животным плацебо (очищенная вода, группа 1). При этом в группе 2 – у мышей, получавших тестируемый препарат, с каждым последующим днём исследования наблюдалось всё меньшее количество КОЕ резистентного к стрептомицину штамма. На 4 и 5 дни соотношение JB270 к JB271 [Strep<sup>R</sup>] превысило как исходные значения в этой группе (на 66,7% и 63,6%, соответственно), так значения в обеих контрольных группах: увеличение по отношению к показателю группы 1

(плацебо) составило 75% и 72,7% на 2 день, 75% и 72,7% на 3 день, 66,7% и 63,6% на 4 день и 58,3% и 54,5% на 5 день исследования; увеличение по отношению к показателю группы 3 (без лечения) составило 75% и 72,7% на 2 день, 83,3% и 81,8% на 3 день и 58,3% и 54,5% на 4, а также на 5 дни исследования (Фиг. 11).

[00202] В эксперименте с применением резистентных к налидиксовой кислоте бактерий *Salmonella enterica* (штамм JB285 [Nal<sup>R</sup>]) в соотношении 1:1 с чувствительным – штамм JB270, показано, что в отсутствии терапии (группа 6) на всём протяжении эксперимента количество КОЕ каждого из штаммов статистически значимо не изменяется. Такие же результаты получены и при введении животным плацебо (очищенная вода, группа 4). При этом в группе 5 – у мышей, получавших тестируемый препарат, начиная со второго дня после инфицирования (третий день исследования) наблюдалось прогрессирующее уменьшение количества КОЕ резистентного к налидиксовой кислоте штамма. К концу исследования выраженность эффекта достигла статистической значимости: соотношение JB270 к JB285 [Nal<sup>R</sup>] превысило значения в этой группе на 3 день исследования на 50%. При этом полученный результат в группе 5 на 5 день исследования также статистически значимо отличался от обеих контрольных групп на все сроки исследования. Увеличение по отношению к показателю группы 4 (плацебо) составило 70-90%, тогда как различие с группой 6 (без лечения) варьировало от 30 до 80% (Фиг. 12)

*Вывод:*

[00203] Таким образом, в исследовании показано значимое антибактериальное действие заявленного лекарственного средства в отношении *Salmonella enterica*, которое выражалось в значимом уменьшении защитного действия бактерий по отношению к протестированным антибиотикам: стрептомицину и налидиксовой кислоте (т.е. уменьшению количества КОЕ штаммов JB271 [Strep<sup>R</sup>] и JB285 [Nal<sup>R</sup>]).

## Пример 9

[00204] Эффективность лекарственного средства при инфицировании мышей *Clostridium perfringens*, штамм ATCC 13124.

[00205] Данное исследование является слепым сравнительным плацебоконтролируемым. Цель исследования – изучить антибактериальное действие заявленного препарата в условиях экспериментального инфицирования мышей возбудителем газовой гангрены – *Clostridium perfringens*. Препарат по настоящему изобретению содержит в соотношении 2:1 по объёму, продукты технологической обработки методом последовательных множественных разведений исходных субстанций антител к HLA-DRB1 (в разведении C12D50D200 в соотношении 1:2:3; поликлональные антитела, концентрация 1,5 мг/мл) и антитела к  $\beta$ 2-МГ (в разведении C10D30D150 в соотношении 2:1:3; поликлональные антитела, концентрация 1,5 мг/мл).

### Экспериментальные группы:

[00206] Группа 1 – аутбредные мыши-самки Swiss Webster (n=20) получали перорально плацебо (очищенная вода) в течение 5 дней до инфицирования, а также через 2 и 8 часов после инфицирования *Clostridium perfringens*, штамм ATCC 13124 (интраперитонеально,  $10^{10}$  КОЕ/животное). Объем введения – 10 мл/кг.

[00207] Группа 2 – аутбредные мыши-самки Swiss Webster (n=20) получали перорально заявленный препарат в течение 5 дней до инфицирования, а также через 2 и 8 часов после инфицирования *Clostridium perfringens*, штамм ATCC 13124 (интраперитонеально,  $10^{10}$  КОЕ/животное). Объем введения – 10 мл/кг.

[00208] Группа 3 – аутбредные мыши-самки Swiss Webster (n=20) получали интраперитонеально тетрациклин в дозе 21 мг/кг через 30 минут, а также через 4 и 8 часов после инфицирования *Clostridium perfringens*, штамм ATCC 13124 (интраперитонеально,  $10^{10}$  КОЕ/животное).

[00209] Группа 4 – аутбредные мыши-самки Swiss Webster (n=20) получали интраперитонеально цефокситин в дозе 160 мг/кг через 30 минут, а также через 4 и 8 часов после инфицирования *Clostridium perfringens*, штамм ATCC 13124 (интраперитонеально,  $10^{10}$  КОЕ/животное).

[00210] Группа 5 – аутбредные мыши-самки Swiss Webster (n=20) получали интраперитонеально деионизированную воду в объеме 0,1 мл/кг через 30 минут, а также через 4 и 8 часов после инфицирования *Clostridium perfringens*, штамм ATCC 13124 (интраперитонеально,  $10^{10}$  КОЕ/животное).

*Дизайн исследования:*

[00211] Продолжительность исследования составила 8 дней. Экспериментальное инфицирование у мышей было вызвано интраперитонеальным введением *Clostridium perfringens* (штамм ATCC 13124) в дозе  $10^{10}$  КОЕ/животное.

[00212] Тестируемые образцы вводили перорально в дозе 10 мл/кг в течение 5 дней до инфицирования, а также через 2 и 8 часов после инфицирования. Препараты сравнения – цефокситин в дозе 21 мг/кг и тетрациклин в дозе 160 мг/кг, а также контроль для них (деионизированная вода, 0,1 мл/кг) вводили интраперитонеально через 30 минут после инфицирования, а также через 4 и 8 часов.

[00213] Через 12, 24, 48 и 72 часа после заражения оценивали выживаемость животных в каждой из групп.

[00214] Статистический анализ результатов проводили с применением кривых Каплана-Мейера и последующим попарным сравнением по логранговому критерию. Отличия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

*Результаты исследования:*

[00215] Наибольший процент гибели инфицированных мышей наблюдался в обеих контрольных группах: через 24 часа с момента введения животным бактерий в группе 1 (очищенная вода) живыми оставались только 5 % животных; в группе 5 (деионизированная вода) к этому сроку погибли

все 100% особей. Лечебно-профилактическое введение заявленного препарата – в течение 5 дней до инфицирования, а также через 2 и 8 часов после инфицирования, позволило значительно увеличить выживаемость мышей. Так, через 12 часов после заражения в данной группе живыми оставались 85% особей; через 24 часа – 55%, через 48 часов и далее – 40%. При этом в группах, получавших препараты сравнения – антибиотики тетрациклин и цефокситин, на 12, 24, 48 и 72 часа после инфицирования количество живых мышей составило 95%, 85%, 80%, 80% (при последнем измерении смертность отсутствовала) и 65%, 55%, 15%, 15% (при последнем измерении смертность отсутствовала), соответственно. Важно отметить, что по выраженности антибактериального эффекта заявленный образец статистически значимо превышал показатели группы цефокситина. Одновременно, оба препарата проявили меньшую активность по сравнению с тетрациклином (Фиг. 13).

*Вывод:*

[00216] Таким образом, в исследовании показано значимое антибактериальное действие заявленного лекарственного средства в отношении *Clostridium perfringens* (штамм ATCC 13124), которое выражалось в значимом увеличении количества выживших животных как по отношению к двум контрольным группам (1 и 5), так и по отношению к препарату сравнения – цефокситину.

Пример 10.

[00217] Антибактериальная активность заявленного лекарственного средства в отношении *Chlamydomphila pneumonia*, штамм СМ1.

[00218] Данное исследование является слепым сравнительным плацебоконтролируемым. Цель исследования – оценка иммунотропного и антибактериального действия заявленного препарата в условиях экспериментального инфицирования мышей *Chlamydomphila pneumonia*, штамм СМ1 (на модели воспаления лёгких). Препарат по настоящему

изобретению содержит в соотношении 1:2 по объёму, продукты технологической обработки методом последовательных множественных разведений исходных субстанций антител к HLA-DRB1 (в разведении C20C50C200 в соотношении 2:1:3; поликлональные антитела, концентрация 1,5 мг/мл) и антитела к  $\beta$ 2-МГ (в разведении C20C50C200 в соотношении 2:1:3; поликлональные антитела, концентрация 3,0 мг/мл).

*Экспериментальные группы:*

[00219] Группа 1 – мыши-самцы линии C57BL/6J (n=21) получали перорально плацебо (очищенная вода) в течение 3 дней до инфицирования, а также через 2, 24, 48 и 72 часа после введения *Chlamydomphila pneumoniae*, штамм CM1 (интратрахеально,  $1,5 \cdot 10^6$  ВОЕ/животное (ВОЕ – включение-образующие единицы)). Объем введения – 10 мл/кг.

[00220] Группа 2 – мыши-самцы линии C57BL/6J (n=21) получали перорально заявленный препарат (очищенная вода) в течение 3 дней до инфицирования, а также через 2, 24, 48 и 72 часа после введения *Chlamydomphila pneumoniae*, штамм CM1 (интратрахеально,  $1,5 \cdot 10^6$  ВОЕ/животное). Объем введения – 10 мл/кг.

[00221] Группа 3 – мыши-самцы линии C57BL/6J (n=21) получали подкожно азитромицин в дозе 10 мг/кг через 30 минут и далее через каждые 24 часа (т.е. 2, 3 и 4 дни) после введения *Chlamydomphila pneumoniae*, штамм CM1 (интратрахеально,  $1,5 \cdot 10^6$  ВОЕ/животное).

[00222] Группа 4 – интактные мыши-самцы линии C57BL/6J (n=5) [фоновый контроль в эксперименте по оценке уровня цитокинов].

*Дизайн исследования:*

[00223] Продолжительность исследования составила 15 дней. Модель воспаления лёгких у мышей была создана путём интратрахеального введения животным *Chlamydomphila pneumoniae* (штамм CM1) в дозе  $1,5 \cdot 10^6$  ВОЕ/мышь.

[00224] Тестируемые образцы в группах 1 и 2 вводили перорально в дозе 10 мл/кг в течение 3 дней до инфицирования, а также через 2, 24, 48 и 72



часа после введения бактерий. Препарат сравнения – азитромицин (группа 3), вводили подкожно в дозе 10 мг/кг через 30 минут после инфицирования и далее через каждые 24 часа (т.е. 2, 3 и 4 дни).

[00225] На 3, 6 и 12 дни после заражения оценивали выживаемость животных. В эти же дни по 4 мыши из групп 1-3 умерщвляли путем цервикальной дислокации и выделяли лёгкие. Из полученных органов готовили гомогенат, который использовали для определения уровня бактериальной нагрузки *Chlamydoiphila pneumonia* (штамм СМ1) и концентрации цитокинов интерлейкина-1 $\beta$ , интерлейкина-6 и фактора некроза опухоли- $\alpha$ .

[00226] Интактные животные, биологический материал которых – гомогенат ткани лёгких, был использован в эксперименте по определению уровня цитокинов для установления фоновых значений, были умерщвлены на 3 день после инфицирования мышей из групп 1-3.

[00227] Для оценки бактериальной нагрузки образцы гомогената лёгких в триплетах по 20 мкл переносили в чашки Петри со средой RPMI1640, 1 мг/мл циклогексимида и клетками HEp2 на 72 часа. Затем клетки отмывали ФСБ, фиксировали метанолом и окрашивали моноклональными антителами против родоспецифического антигена хламидий (Pathfinder Chlamydia Culture Confirmation System; BIO-RAD, Hercules, США), конъюгированными с ФИТЦ. Препараты просматривали в люминесцентном микроскопе, подсчитывая инфицированные клетки.

[00228] Уровень цитокинов определяли иммуноферментным методом с использованием тест-систем фирмы Bender MedSystems (США) согласно инструкции производителя.

[00229] Статистический анализ результатов проводили с применением критерия Краскела-Уоллиса с пост-хок критерием Тьюки и кривых Каплана-Мейера и последующим попарным сравнением по логранговому критерию. Отличия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

*Результаты исследования:*

[00230] Сохранность поголовья в группе интактных мышей составила 100%.

[00231] Наибольший процент гибели инфицированных мышей наблюдался в контрольной группе: на третий день исследования с момента введения животным бактерий в группе 1 (очищенная вода, примененная в качестве плацебо) живыми оставались 53% мышей, на 6 и далее – 24%. Лечебно-профилактическое введение заявленного препарата (группа 2) – в течение трёх дней до инфицирования, а также через 2, 24, 48 и 72 часа после введения бактерий, позволило значительно увеличить выживаемость мышей. Так, на третий день после заражения в данной группе живыми оставались 72% особей, на шестой и далее – 62%. При этом среди животных, получавших препарат сравнения – антибиотик азитромицин (группа 3), наблюдалась максимальная сохранность поголовья (81%): гибель была зафиксирована только на третий день после заражения и составила 19% (Фиг.14).

[00232] При оценке бактериальной нагрузки, определённой по количеству клеток НEr2, инфицированных при взаимодействии с гомогенатом ткани лёгких заражённых *Chlamydomphila pneumonia* (штамм СМ1) мышей, было показано, что в ответ на терапию заявленным препаратом наблюдается линейное уменьшение исследованного показателя по отношению к плацебо: на 3, 6 и 12 дни после заражения количество инфицированных клеток для группы 2 (Препарат) составило 67%, 58% и 21%, соответственно. Для препарата сравнения – группа 3 (Азитромицин), было характерно ещё большее уменьшение бактериальной нагрузки: до 15%, 17% и 5% на 3, 6 и 12 день после инфицирования, соответственно (Фиг. 15).

[00233] Исследование иммуотропной активности заявленного препарата показало, что в ответ на лечебно-профилактическое применение лекарственного средства (группа 2) происходит статистически значимое по сравнению с контролем линейное уменьшение уровня обоих измеренных

интерлейкинов – 1 $\beta$  и 6. На 3, 6 и 12 дни после заражения концентрация интерлейкина-1 $\beta$  составила 55%, 21% и 20% от уровня в контроле (группа 1, очищенная вода); интерлейкина-6 – 57%, 34% и 27%. При этом для препарата сравнения – группа 3 (Азитромицин), как и в случае с бактериальной нагрузкой, было характерно ещё более выраженное линейное уменьшение уровня обоих интерлейкинов (интерлейкин-1 $\beta$ : до 17%, 7% и 6% от уровня в контроле на 3, 6 и 12 дни после заражения, соответственно; интерлейкин-6: до 15%, 8% и 5%) (Фиг. 16, Фиг. 17).

[00234] Концентрация фактора некроза опухоли- $\alpha$  в ткани лёгких мышей сохранилась неизменной во всех группах, что свидетельствует об отсутствии изменения уровня данного цитокина в условиях полученной экспериментальной модели воспаления лёгких, а следовательно, отсутствии биологической значимости (Фиг. 18).

*Вывод:*

[00235] Таким образом, в проведенном исследовании на модели воспаления лёгких, вызванного *Chlamydomytila pneumonia*, штамм СМ1, показано выраженное антибактериальное и, одновременно, иммуностропное действие заявленного препарата. Выявленные активности выражались в увеличении более чем в 2,5 раза выживаемости животных к концу исследования, уменьшении на 79% бактериальной нагрузки, а также и уровня провоспалительных цитокинов (интерлейкина-1 $\beta$  на 80% и интерлейкина-6 на 73%) в лёгких.

Пример 11.

[00236] Антибактериальная активность заявленного лекарственного средства в отношении *Klebsiella pneumoniae*, штамм 8637.

[00237] Данное исследование является слепым сравнительным плацебоконтролируемым. Цель исследования – оценка антибактериального действия заявленного препарата в условиях экспериментального инфицирования мышей с предварительной иммуносупрессией бактериями

*Klebsiella pneumoniae*, штамм 8637 (на модели воспаления лёгких с нейтропенией). Препарат по настоящему изобретению содержит в соотношении 1:1 по объёму, продукты технологической обработки методом последовательных множественных разведений исходных субстанций антител к HLA-DRB1 (3 мг/мл) (в разведении С30С200 в соотношении 2:3) и антитела к  $\beta$ 2-МГ (3 мг/мл) (в разведении С30С200 в соотношении 3:1).

*Экспериментальные группы:*

[00238] Группа 1 – мыши-самки линии ICR (n=20) получали перорально плацебо (очищенная вода) через 4, 6, 8, 24 и 48 часов после введения *Klebsiella pneumoniae*, штамм 8637 (интраназально,  $2 \cdot 10^7$  КОЕ/животное). Объем введения – 10 мл/кг.

[00239] Группа 2 – мыши-самки линии ICR (n=20) получали перорально заявленный образец через 4, 6, 8, 24 и 48 часов после введения *Klebsiella pneumoniae*, штамм 8637 (интраназально,  $2 \cdot 10^7$  КОЕ/животное). Объем введения – 10 мл/кг.

[00240] Группа 3 – мыши-самки линии ICR (n=20) получали интраперитонеально препарат сравнения – имипенем, в дозе 2 мг/кг через 4, 24 и 48 часов после введения *Klebsiella pneumoniae*, штамм 8637 (интраназально,  $2 \cdot 10^7$  КОЕ/животное).

*Дизайн исследования:*

[00241] Продолжительность исследования составила 9 дней. Модель воспаления лёгких с предварительной иммуносупрессией у мышей была создана путём интраназального введения животным *Klebsiella pneumoniae* (штамм 8637) в дозе  $2 \cdot 10^7$  КОЕ/животное. Для индукции нейтропении (иммуносупрессии) животным за 4 дня до инфицирования интраперитонеально вводили циклофосфамид в дозе 200 мг/кг.

[00242] Тестируемые образцы в группах 1 и 2 вводили перорально в дозе 10 мл/кг лечебным курсом – через 4, 6, 8, 24 и 48 часов после введения бактерий. Препарат сравнения – имипенем (группа 3), вводили интраперитонеально в дозе 2 мг/ через 4, 24 и 48 часов после инфицирования.

[00243] На протяжении 5 дней после введения мышам *Klebsiella pneumoniae* (штамм 8637) оценивали выживаемость животных. По окончании эксперимента – на 5 день после инфицирования, по 5 мышей из каждой групп умерщвляли и в крови, лёгких, печени, селезенке и почках оценивали количество КОЕ. Для этого из выделенных органов готовили гомогенат. Серийные десятикратные разведения всех полученных образцов ткани в триплетах по 200 мкл переносили в чашки Петри с агаром Мюллера-Хинтон на 24 часа.

[00244] Статистический анализ результатов проводили с применением однофакторного дисперсионного анализа с пост-хок критерием Тьюки, а также сравнением кривых выживаемости с использованием логрангового критерия с поправкой Бенджамини-Хохберга на множественные сравнения. Отличия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

*Результаты исследования:*

[00245] Наибольший процент гибели инфицированных мышей наблюдался в контрольной группе: на первый день исследования с момента введения животным бактерий в группе 1 (очищенная вода, примененная в качестве плацебо) живыми оставались 55% мышей, на второй – 45%, на третий – 20%, на четвертый и далее – 15%. Терапия с применением заявленного препарата (группа 2) – через 4, 6, 8, 24 и 48 часов после введения бактерий, позволила значительно увеличить выживаемость мышей. Так, на первый день после заражения в данной группе живыми оставались 85% особей, на второй – 70%, на третий – 60%, на четвертый и далее – 45%. При этом среди животных, получавших препарат сравнения – антибиотик имипенем (группа 3), наблюдалась максимальная сохранность поголовья: на первый день после заражения – 85%, на второй – 70%, на третий и далее – 50% (Фиг. 19).

[00246] При оценке бактериальной нагрузки в крови, лёгких, печени, селезенке и почках иммуносупрессированных мышей,

инфицированных *Klebsiella pneumoniae* (штамм 8637), было показано, что в ответ на терапию заявленным препаратом во всех тканях наблюдается уменьшение по отношению к контролю (плацебо) количества КОЕ: в крови – на 68%, в лёгких – на 56%, в печени – на 36%, в селезенке – на 33%, в почках – на 44%. Для препарата сравнения – группа 3 (Имипенем), была характерна сходная активность: уменьшение бактериальной нагрузки в крови, лёгких, печени, селезенке и почках составило 67%, 48%, 40%, 45% и 61%, соответственно (Фиг. 20).

*Вывод:*

[00247] Таким образом, в проведенном исследовании на модели воспаления лёгких у мышей с предварительной иммуносупрессией, созданной путем введения животным циклофосфида и *Klebsiella pneumoniae* (штамм 8637), показано выраженное антибактериальное действие заявленного препарата. Выявленная активность выражалась в увеличении по сравнению с плацебо на 30% выживаемости животных к концу исследования с одновременным уменьшением не менее чем на треть бактериальной нагрузки в крови, лёгких, печени, селезенке и почках.

Пример 12.

[00248] Противовирусное действие заявленного лекарственного средства на модели летальной гриппозной инфекции, вызванной штаммом вируса гриппа A/California/07/09(H1N1)pdm09 у белых мышей.

[00249] Данное исследование является слепым плацебоконтролируемым. Целью исследования является изучение противовирусной эффективности заявленного препарата в сравнении с препаратом Тамифлю™ (Осельтамивир) в его эффективной дозе на штамме вируса гриппа A/ California/07/09 (H1N1) pdm09 *in vivo*. Препарат по настоящему изобретению содержит в соотношении 1:1:1:1 по объёму, продукты технологической обработки методом последовательных множественных разведений исходных субстанций а) антител к HLA-DRB1 (в

разведении С12С30С50 в соотношении 1:3:1), б) антител к  $\beta$ 2-микроглобулину (в разведении С12С30С50 в соотношении 1:3:1), в) антител к интерферону-гамма (в разведении С12С30С50 в соотношении 1:3:1), г) антител к CD4 (в разведении С12С30С50 в соотношении 1:3:1):

А) продукт технологической обработки методом последовательных множественных разведений исходных субстанций поликлональных антител к  $\beta$ 1 - домену молекулы главного комплекса гистосовместимости класса 2 (HLA-DRB1), получают путем объединения трёх различных последовательных разведений исходного (матричного) раствора поликлональных антител к HLA-DRB1 в водном растворителе (концентрация 2,5 мг/мл). В соотношении 1:3:1 по объему смешивались следующие разведения:

1) разведение исходного (матричного) раствора в  $100^{12}$  раз, что эквивалентно сотенному разведению С12 в сочетании с внешним механическим воздействием – встряхиванием каждого разведения.

2) разведение исходного (матричного) раствора в  $100^{30}$  раз, что эквивалентно сотенному разведению С30 в сочетании с внешним механическим воздействием – встряхиванием каждого разведения.

3) разведение исходного (матричного) раствора в  $100^{50}$  раз, что эквивалентно сотенному разведению С50 в сочетании с внешним механическим воздействием – встряхиванием каждого разведения.

Б) продукт технологической обработки методом последовательных множественных разведений исходных субстанций поликлональных антител к  $\beta$ 2-микроглобулину ( $\beta$ 2-МГ), получают путем объединения трёх различных последовательных разведений исходного (матричного) раствора поликлональных антител к  $\beta$ 2-МГ в водном растворителе (концентрация 1,0 мг/мл). В соотношении 1:3:1 по объему смешивались следующие разведения:

4) разведение исходного (матричного) раствора в  $100^{12}$  раз, что эквивалентно сотенному разведению С12 в сочетании с внешним механическим воздействием – встряхиванием каждого разведения.

5) разведение исходного (матричного) раствора в  $100^{30}$  раз, что эквивалентно сотенному разведению С30 в сочетании с внешним механическим воздействием – встряхиванием каждого разведения.

6) разведение исходного (матричного) раствора в  $100^{50}$  раз, что эквивалентно сотенному разведению С50 в сочетании с внешним механическим воздействием – встряхиванием каждого разведения.

В) продукт технологической обработки методом последовательных множественных разведений исходных субстанций поликлональных антител к гамма интерферону (IFN- $\gamma$ ), получают путем объединения трёх различных последовательных разведений исходного (матричного) раствора поликлональных антител к IFN- $\gamma$  в водном растворителе (концентрация 2,5 мг/мл). В соотношении 1:3:1 по объему смешивались следующие разведения:

7) разведение исходного (матричного) раствора в  $100^{12}$  раз, что эквивалентно сотенному разведению С12 в сочетании с внешним механическим воздействием – встряхиванием каждого разведения.

8) разведение исходного (матричного) раствора в  $100^{30}$  раз, что эквивалентно сотенному разведению С30 в сочетании с внешним механическим воздействием – встряхиванием каждого разведения.

9) разведение исходного (матричного) раствора в  $100^{50}$  раз, что эквивалентно сотенному разведению С50 в сочетании с внешним механическим воздействием – встряхиванием каждого разведения.

Г) продукт технологической обработки методом последовательных множественных разведений исходных субстанций поликлональных антител к CD4, получают путем объединения трёх различных последовательных разведений исходного (матричного) раствора поликлональных антител к CD4 в водном растворителе (концентрация 1,0 мг/мл). В соотношении 1:3:1 по объему смешивались следующие разведения:

10) разведение исходного (матричного) раствора в  $100^{12}$  раз, что эквивалентно сотенному разведению С12 в сочетании с внешним механическим воздействием – встряхиванием каждого разведения.



11) разведение исходного (матричного) раствора в  $100^{30}$  раз, что эквивалентно сотенному разведению С30 в сочетании с внешним механическим воздействием – встряхиванием каждого разведения.

12) разведение исходного (матричного) раствора в  $100^{50}$  раз, что эквивалентно сотенному разведению С50 в сочетании с внешним механическим воздействием – встряхиванием каждого разведения.

*Экспериментальные группы:*

[00250] Группа 1 – группа животных, которым вводили плацебо в течение всего эксперимента (n=30) (отрицательный контроль («вирусный контроль»));

[00251] Группа 2 – группа мышей, которым вводился препарат сравнения Тамифлю<sup>TM</sup> (Осельтамивир) в течение 5 дней после заражения, а в остальное время вводилось открытое плацебо (n=30) (положительный контроль-препарат сравнения).

[00252] Группа 3 – мыши, получавшие заявленный препарат в течение всего эксперимента (n=30).

[00253] Группа 4 – мыши, получавшие активированную-потенцированную форму антител к интерферону-гамма в течение всего эксперимента (n=30).

[00254] Группа 5 – мыши, получавшие активированную-потенцированную форму антител к CD4 в течение всего эксперимента (n=30).

[00255] Группа 6 – мыши, получавшие активированную-потенцированную форму антител к HLA-DRB1 в течение всего эксперимента (n=30).

[00256] Группа 7 – мыши, получавшие активированную-потенцированную форму антител к  $\beta$ 2-микроглобулину в течение всего эксперимента (n=30).

*Дизайн исследования:*

[00257] Животные получали заявленный препарат перорально ежесуточно в объеме 0,4 мл/мышь 2 раза в день, утром и вечером в 10.00 и 17.00 (0,8 мл/мышь/сут.) курсом в течение 5 дней до заражения, в день инфицирования за 4 часа до и после заражения и 14 дней после заражения вирусом, до окончания эксперимента (общий курс введения тестируемых образцов – 20 дней) [«Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств» под ред. Миронова А.Н. (Москва, 2012)].

[00258] Вирус вводили животным интраназально в объеме 0,05 мл/мышь ( $2.5 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub>, 5 LD<sub>50</sub>) [He B, Fu Y, Xia S, et al. Intranasal application of polyethyleneimine suppresses influenza virus infection in mice. *Emerging Microbes & Infections*. 2016;5(4):e41-. doi:10.1038/emi.2016.64.].

[00259] Препарат сравнения Тамифлю<sup>TM</sup> (Осельтамивир) вводили перорально с помощью желудочного зонда в дозе 15 мг/кг в объеме 0,4 мл/мышь 2 раза в день в 10.00 и 17.00 (30 мг/мышь/сут.) в течение 5 суток после заражения вирусом (начиная введение за 1 час до инфицирования) [Осельтамивир при свином гриппе // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2005, 55, p.5-21]. В течение 5 суток до и, начиная с 6 суток по 14 сутки после заражения (до окончания наблюдения за животными), мышам этой группы вводили дистиллированную воду в объеме 0,4 мл/мышь, дважды в сутки (0,8 мл/мышь/сут). Группе отрицательного контроля также вводили плацебо в дозе 0,4 мл/мышь, дважды в сутки (0,8 мл/мышь/сут) в течение всего периода наблюдения.

[00260] У всех мышей изучали зоотехнические показатели (живую массу, сохранность, среднюю продолжительность жизни животных (СПЖ), индекс защиты), проводили вирусологические исследования.

*Результаты исследования:*

[00261] Первичные данные об активности заявленного препарата с указанием смертности, средней продолжительности жизни (СПЖ) животных и индекс защиты приведены таблице 1. Наблюдение животными

осуществляли в течение 14 дней после инфицирования. Ежедневно фиксировали смертность животных в контрольных и опытных группах. На основании полученных данных в каждой группе рассчитывали:

[00262] процент смертности – отношение числа павших за 14 дней животных к общему числу зараженных животных в группе:  $M$  (%смертности) =  $M / N_t$ ;

[00263] индекс защиты – отношение разницы процентов смертности в контрольной и опытной группах к проценту смертности в контрольной группе:  $IP = ((M_c - M_e) / M_c) \times 100\%$ ;

[00264] среднюю продолжительность жизни животных из расчета 14 дней наблюдения:  $MDD = (\sum N \times D) / N_t$ ;

где  $M$  – число павших за 14 дней животных в группе;  $M_c$  и  $M_e$  – смертность в процентах в контрольной («контроль вируса») и опытной группах, соответственно;  $N$  – количество животных, проживших  $D$  дней;  $N_t$  – общее число животных в группе.

Таблица 4.

Группа	Гибель, %	Индекс защиты, %	СПЖ, сут.	Увеличение СПЖ, сут.
1 (отриц. контроль)	70	0,0	8,3	0
2 (Тамифлю)	30	57,1	8,6	0,2
3 (Препарат)	25	64,2	8,9	0,5
4	50	28,5	8,4	0,1
5	60	14,2	7,9	-0,4
6	65	7,1	7,4	-0,9
7	65	7,1	7,5	-0,8

[00265] Как следует из приведенных данных инфицирование мышей вирусом гриппа A/California/097/09 (H1N1)pdm09 приводило к развитию патологического процесса и гибели 75% животных в среднем через 8,5 суток после инфицирования. Применение заявленного препарата снижало

показатель гибели до 25% (индекс защиты 64,2%). Показатель СПЖ составил в этой группе 8,9 суток.

[00266] При анализе изменения массы животных учитывались данные только тех особей, на которых проводился анализ смертности в течение 14 дней после инфицирования.

Таблица 5. Масса экспериментальных животных, выраженная как  $M \pm SD$ .

Группа	День					
	-15	-5	0	5	9	12
1 (отриц. контроль)	16.4±0.8 (N=20)	17.9±0.9 (N=20)	17.4±0.1 (N=20)	15.8±0.4 (N=19)	13.4±0.9 (N=12)	11.9±0.1 (N=6)
2 (Тамифлю)	16.1±1.0 (N=20)	17.8±1.2 (N=20)	16.7±1.2 (N=20)	15.5±1.4 (N=20)	13.6±1.7 (N=13)	14.9±2.2 (N=14)
3 (Препарат)	16.3±1.0 (N=20)	17.7±1.2 (N=20)	17.2±1.2 (N=20)	16.1±1.3 (N=18)	14.6±2.1 (N=15)	15.2±2.8 (N=15)
4	16.3±1.0 (N=20)	17.7±1.2 (N=20)	16.7±1.3 (N=20)	15.2±1.4 (N=18)	13.4±2.3 (N=9)	14.3±2.2 (N=7)
5	16.4±1.0 (N=20)	17.8±1.1 (N=20)	16.9±1.0 (N=20)	15.3±1.1 (N=19)	13.3±1.7 (N=11)	13.3±2.7 (N=8)
6	16.2±0.9 (N=20)	18.1±1.0 (N=20)	17.1±1.2 (N=20)	15.8±1.1 (N=19)	13.9±0.8 (N=8)	12.2±1.5 (N=7)
7	16.3±1.0 (N=20)	17.5±0.9 (N=20)	16.7±1.3 (N=20)	15.4±1.1 (N=20)	13.7±2.3 (N=12)	12.7±2.8 (N=7)

[00267] В ткани легких на 5 сутки после инфицирования животных (n=10) определялся титр вируса. Усредненные значения инфекционной активности вируса гриппа в легких животных для каждой группы приведены в таблице 6.

Таблица 6.

№ животного	Титр вируса (lg TCID <sub>50</sub> /0.2 мл) в группе препарата						
	1	2	3	4	5	6	7
1	5,5	5,5	4,0	5,5	5,0	4,5	5,0
2	6,5	6,0	5,5	6,5	6,0	5,5	5,5
3	6,0	4,5	2,0	5,0	5,0	6,0	6,0
4	6,0	4,5	1,5	5,0	4,5	6,0	5,5
5	6,5	4,5	5,0	6,0	5,5	5,5	6,0
6	6,0	4,5	4,5	4,5	6,0	5,0	5,5
7	6,5	5,0	5,0	5,0	6,0	5,5	5,5
8	5,5	4,5	4,5	5,5	4,5	6,0	5,5
9	6,5	4,0	3,5	4,5	5,5	5,5	5,5
10	7,0	5,0	4,5	4,5	5,5	6,5	6,0
Среднее	<b>6,2</b>	<b>4,8</b>	<b>3,8</b>	<b>5,2</b>	<b>5,4</b>	<b>5,6</b>	<b>5,6</b>
SD	0,5	0,6	1,5	0,7	0,6	0,6	0,3
p	0,0562	0,0647	0,0072	0,4250	0,6743	0,7778	0,7564

[00268] В соответствии с Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств [Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / Под ред. А.Н.Миронова. - М.: ЗАО «Гриф и К». - 2012. - Часть первая. – 944 с.], снижение титра вируса на 1,75 lg и более в группе леченых животных свидетельствует об угнетении его репродукции. Заявленный препарат в данном исследовании снижал титр вируса на 2,4 lgTCID<sub>50</sub>.

*Вывод:*

[00269] Наибольшую активность в отношении снижения смертности проявило заявленное лекарственное средство (ИЗ=64,2), при этом эффективность средства выше эффективности, проявляемой его отдельными компонентами. Кроме того, препарат по настоящему изобретению проявлял выраженное противовирусное действие, снижал титр вируса на 2,4 lgTCID<sub>50</sub>.

Пример 13.

[00270] Изучение противомикробной активности препаратов 1 и 2 после последовательного *in vivo* заражения животных вирусом гриппа A/New Jersey/8/76 (H1N1) и *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*).

[00271] Целью исследования является сравнительная оценка противомикробного действия препаратов 1 и 2 по отношению к пневмококковой инфекции, вызванной *S. pneumoniae*, через 7 дней после заражения животных вирусом гриппа A/New Jersey/8/76 (H1N1). Препарат 1 – смесь трех активных водно-спиртовых разведений  $100^{12}$ ,  $100^{30}$ ,  $100^{50}$  антител к  $\gamma$ -интерферону человека, антител к гистамину и антител к CD4 (препарат «Эргоферон»). Препарат 2 по настоящему изобретению содержит в соотношении 1:1:1:1 по объёму, продукты технологической обработки методом последовательных множественных разведений исходных субстанций а) антител к HLA-DRB1 (в разведении C12C30C50 в соотношении 1:1:1, (2 мг/мл)), б) антител к  $\beta$ 2-микроглобулину (2 мг/мл) (в разведении C12C30C50 в соотношении 1:1:1), в) антител к интерферону-гамма (в разведении C12C30C50 в соотношении 1:1:1) (3 мг/мл), г) антител к CD4 (в разведении C12C30C50 в соотношении 1:1:1), (3 мг/мл).

*Экспериментальные группы:*

[00272] Группа 1 – мыши-самки, получали Препарат 1 каждый день внутрижелудочно в суммарной дозе 20 мл/кг/сут (2 раза в сутки примерно по 0,2 мл/мышь с интервалом 2 ч) в течение 5 дней до инфицирования вирусом и в день инфицирования за 2 ч. до заражения (n=15);

[00273] Группа 2 – мыши-самки, получали заявленный Препарат 2 каждый день внутрижелудочно в суммарной дозе 20 мл/кг/сут (2 раза в сутки примерно по 0,2 мл/мышь с интервалом 2 ч) в течение 5 дней до инфицирования вирусом и в день инфицирования за 2 ч. до заражения (n=15);

[00274] Группа 3 – контроль, мыши-самки, получали очищенную воду каждый день внутрижелудочно в суммарной дозе 20 мл/кг/сут (2 раза в сутки примерно по 0,2 мл/мышь с интервалом 2 ч) в течение 5 дней до инфицирования и в день инфицирования за 2 ч. до инфекции вирусом (n=15);

[00275] Группа 4 – нелеченый контроль, мыши-самки, которые были заражены вирусом A/New Jersey/8/76 (H1N1) и спустя 7 дней – *S.*

*pneumoniae*. Такой контроль позволяет выделить эффект плацебо группы 2 (n=15);

[00276] Группа 5 – контроль модели, мыши-самки, которые были заражены только *S. pneumoniae*. Такой контроль позволяет выделить эффект предварительного вирусного заражения на итоговое количество КОЕ (n=15).

*Дизайн исследования:*

[00277] Животных интраназально инфицировали вирусом A/New Jersey/8/76 (H1N1) в дозе  $1 \times 10^6$  ЦПД<sub>50</sub>/мышь и на 7 день после инфицирования вирусом интратрахеально заражали  $1 \times 10^6$  КОЕ *S. pneumoniae*. Через 24, 48 и 120 часов после введения *S. pneumoniae* по 5 мышей из каждой группы умерщвляли, выделяли лёгкие и оценивали их бактериальную обсемененность. Для этого лёгкие гомогенизировали в стерильном фосфатном буфере и готовили серийные разведения, и делали посев на плотную питательную среду в чашки Петри с дальнейшим подсчетом выросших колоний. Полученные результаты выражали в КОЕ/г лёгких.

*Результаты исследования:*

[00278] В ходе исследования изучали противомикробное действие препаратов 1 и 2 по отношению пневмококковой инфекции, вызванной *S. pneumoniae*, через 7 дней после заражения животных вирусом гриппа A/New Jersey/8/76 (H1N1). А также сравнивали эффективность препаратов 1 и 2 в отношении смоделированной патологии.

[00279] Через 24 часа после инфицирования мышей *S. pneumoniae* самое значительное количество КОЕ *S. pneumoniae* наблюдалось в группах нелеченого контроля (мыши, последовательно зараженные вирусом гриппа A/New Jersey/8/76 (H1N1) и *S. pneumoniae*, без лечения) и контроля (мыши, последовательно зараженные вирусом гриппа A/New Jersey/8/76 (H1N1) и *S. pneumoniae*, леченные очищенной водой) (фиг.21). К этому сроку препарат 1 и препарат 2 статистически значительно уменьшили бактериальную обсемененность лёгких инфицированных вирусом и бактериями мышей в 2 и

6 раз по сравнению с контролем (группа 3), соответственно. При этом по выраженности эффекта препарат 2 был в 3 раза активнее Препарата 1.

[00280] Через 48 часов после инфицирования мышей *S. pneumoniae* самое значительное количество КОЕ *S. pneumoniae* всё еще наблюдалось в группах нелеченого контроля и контроля. Однако в абсолютных значениях количество КОЕ в этих группах уменьшилось более чем в 5 раз. Выраженность противомикробного эффекта Препарата 1 к этому сроку, по-прежнему, в 2 раза превосходила контрольные значения (группы 3 и 4), тогда как в лёгких мышей, получавших Препарат 2 (группа 2), бактериальная обсемененность составила 24.4% от контроля (группа 3) и 26.7% от нелеченого контроля (группа 4). Статистически значимые отличия между значениями групп Препарат 1 и Препарат 2 отсутствовали.

[00281] Через 120 часов после инфицирования мышей *S. pneumoniae* во всех группах наблюдались только единичные случаи появления КОЕ *S. pneumoniae*.

*Вывод:*

[00282] В результате исследования противомикробной активности Препаратов 1 и 2 было показано, что каждый из указанных препаратов обладает выраженным антибактериальным действием. Сравнительный анализ специфической активности Препаратов 1 и 2 показал более выраженный эффект заявленного по настоящему изобретению лекарственного средства (Препарата 2) по отношению к Препарату 1.

Пример 14.

[00283] Эффективность заявленного лекарственного средства при экспериментальной вирусно-бактериальной пневмонии, вызванной вирусом гриппа H1N1/A California 04/2009 и *Staphylococcus aureus* (штамм 1986).

[00284] Целью исследования является изучение терапевтической активности заявленного препарата при экспериментальной вирусно-бактериальной пневмонии, вызванной вирусом гриппа H1N1/A California



04/2009 и *Staphylococcus aureus* (штамм 1986). Препарат по настоящему изобретению содержит в одинаковом количестве четыре продукта технологической обработки методом последовательных множественных разбавлений (разведения C12C30C50) исходных субстанций поликлональных аффинно очищенных: 1) антител к  $\beta$ 1-домену молекулы главного комплекса гистосовместимости II типа (HLA-DRB1) (2,5 мг/мл), 2) антител к  $\beta$ 2-микроглобулину главного комплекса гистосовместимости I типа (2,5 мг/мл), 3) антител к гамма интерферону человека (2,5 мг/мл), 4) антител к CD4 (2,5 мг/мл).

*Экспериментальные группы:*

[00285] Группа 1 – мыши, получали заявленный препарат внутривенно в течение 3 дней до и 5 дней после вирусного инфицирования в дозе 20 мл/кг/сутки (n=10);

[00286] Группа 2 – контроль, мыши, получали очищенную воду внутривенно в течение 3 дней до и 5 дней после вирусного инфицирования (20 мл/кг/сутки, n=10);

[00287] Группа 3 – положительный контроль 1, мыши, получали внутривенно за 4 часа до вирусного инфицирования, далее через 4 часа, а затем ежедневно на протяжении 5 дней двукратно осельтамивир (Тамифлю®, Hoffmann-La Roche, 10 мг/кг/сутки) (n=10);

[00288] Группа 4 – положительный контроль 2, мыши, получали подкожно на протяжении 3 дней после бактериального инфицирования (или, соответственно, через 4 дня после вирусного) цефуроксим (Зинацеф®, GlaxoSmithKline) в дозе 20 мг/кг (n=10);

[00289] Группа 5 – отрицательный контроль, мыши, которых инфицировали вирусом гриппа и бактериями в аналогичные другим группам сроки, без введения препаратов (n=10).

*Дизайн исследования:*

[00290] У животных моделировали вторичную вирусно-бактериальную пневмонию путем интраназального введения вируса гриппа

H1N1/A California 04/2009 в дозе  $10^{4/5}$  ТЦИД<sub>50</sub>/0,1мл и интраназального введения *Staphylococcus aureus* (штамм 1986) в дозе  $2 \times 10^7$  КОЕ/мл. *Staphylococcus aureus* (штамм 1986) во всех экспериментальных группах вводили на 5 день после инфицирования вирусом гриппа. Затем через два дня готовили гомогенат легких животных (n=3 из каждой группы), в котором определяли бактериальную плотность и титр вируса. У оставшихся мышей ежедневно оценивали массу тела как показатель, отражающей общее состояние, а также фиксировали количество живых особей (выживаемость).

*Анализ данных:*

[00291] Статистический анализ полученных результатов проводили с применением метода смешанных линейных моделей, где группа выступала как фактор, время в днях – как ковариата с использованием кубического сплайна, id субъекта как случайный эффект (апостериорные сравнения по критерию Тьюки проводились между группами в каждый день); метода кривых Каплана-Мейера с последующим сравнением по лог-ранговому критерию с поправкой на множественность сравнений Бенджамини-Хохберга; критерия Краскела-Уоллиса с апостериорным критерием Данна с поправкой Бенджамини-Хохберга. Отличия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

*Результаты исследования:*

[00292] Применение заявленного препарата снижало смертность животных с экспериментальной вторичной (вирусно-бактериальной) пневмонией на 40% (vs контроль (Группа 2)), что соответствовало эффекту препарата сравнения – цефуроксима (Группа 4) (Фиг.22).

[00293] Применение препарата по настоящему изобретению в одинаковой степени с препаратом сравнения – осельтамивиром, снижало (более чем на 15%) титр вируса в легких по сравнению с группой отрицательного контроля.

[00294] Статистически значимые различия в плотности бактерий и массе тела экспериментальных мышей отсутствовали.

*Вывод:*

[00295] Таким образом, заявленное лекарственное средство проявило терапевтическую активность при экспериментальной вторичной вирусно-бактериальной пневмонии, увеличивая выживаемость инфицированных животных и уменьшая размножение вируса в легких.

Пример 15.

[00296] Оценка активности против респираторно-синцитиального вируса *in vivo*.

[00297] Целью исследования является изучение противовирусного действия заявленного препарата по отношению к респираторно-синцитиальному вирусу (штамм А2, РСВ). Препарат по настоящему изобретению содержит в одинаковом количестве четыре продукта технологической обработки методом последовательных множественных разбавлений (разведения С12С30С50) исходных субстанций поликлональных аффинно очищенных: 1) антител к  $\beta$ 1-домену молекулы главного комплекса гистосовместимости II типа (2,5 мг/мл), 2) антител к  $\beta$ 2-микροглобулину главного комплекса гистосовместимости I типа, (2,5 мг/мл) 3) антител к гамма интерферону человека (2,5 мг/мл), 4) антител к CD4 (2,5 мг/мл).

*Экспериментальные группы:*

[00298] Группа 1 – мыши, получали заявленный препарат внутривентрикулярно в течение пяти дней до инфицирования, в т.ч. за два часа до инфицирования, и далее в течение последующих 4 дней в дозе 20 мл/кг/сутки (2 раза в сутки, примерно по 0,2 мл/мышь с интервалом 2 ч, n=10);

[00299] Группа 2 – мыши, получали монокомпонент заявленного препарата (Анаферон, детский) – разведения антител к интерферону-гамма, внутривентрикулярно в течение пяти дней до инфицирования, в т.ч. за два часа до инфицирования, и далее в течение последующих 4 дней в дозе 20

мл/кг/сутки (2 раза в сутки, примерно по 0,2 мл/мышь с интервалом 2 ч, n=10);

[00300] Группа 3 – контроль, получали очищенную воду внутрижелудочно в течение пяти дней до инфицирования, в т.ч. за два часа до инфицирования, и далее в течение последующих 4 дней в дозе 20 мл/кг/сутки (2 раза в сутки, примерно по 0,2 мл/мышь с интервалом 2 ч, n=10);

[00301] Группа 4 – контроль модели РСВ (n=10) – мыши, зараженные вирусом РСВ А2 одновременно с мышами из Группы 1, Группы 2 и Группы 3.

[00302] Группа 5 – контроль модели РСВ+УФ (n=10) – мыши, зараженные одновременно с мышами из Группы 1, Группы 2 и Группы 3, предварительно обработанным УФ-лучами в течение 20 мин вирусом РСВ А2. Такой инактивированный вирус является адекватным отрицательным контролем, поскольку он не вызывает инфекции дыхательных путей, но при этом компоненты вирионов, присутствующие в интактированном вирусном материале, могут оказывать влияние на показатели иммунной системы животных. Такой контроль позволяет выделить эффект вируса на респираторный тракт животных, обеспечивающийся именно за счет его репродукции;

[00303] Группа 6 – интактный контроль, мыши, которые не были заражены вирусом, а также не получали терапию (n=10).

*Дизайн исследования:*

[00304] Животных пяти групп внутрибрюшинно инфицировали РСВ, штамм А2 (РСВ А2) в дозе  $5 \times 10^6$  ТЦИД<sub>50</sub>/мышь. На 5 день эксперимента у животных измеряли гиперреактивность бронхов (поскольку РСВ А2 поражает дыхательные пути и вызывает их воспаление) методом неинвазивной плетизмографии с использованием оборудования (VuxcoElectronics, Wilmington, NC). После настройки прибора и калибровки, мышей разных групп помещали в плетизмографы (пластиковые камеры),

имеющие назальную и торакальную части, разделенные между собой перегородкой, в качестве которой применяется специальный воротник, фиксирующий животных в плетизмографе (камере), куда с трёхминутным интервалом вносили по 10 мкл раствора метахолина в концентрациях 0, 6.25, 12.5 и 25 мг/мл.

[00305] На 6 день после инфицирования у всех животных методом ПЦР РТ измеряли вирусную нагрузку в тканях легких. Для этого ткани гомогенизировали в буфере RLT (Qiagen) и выделяли общую РНК с использованием коммерческого комплекта реагентов RNasy mini kit (Qiagen) в соответствии с рекомендациями производителя. Далее общую РНК использовали в качестве матрицы для синтеза кДНК с применением набора ОТ-1 (Синтол) в соответствии с рекомендациями производителя. кДНК была использована в реакции ПЦР РТ для определения количества вирусной РНК. Реакция ПЦР РТ проведена с использованием коммерческого набора производства Синтол в соответствии с рекомендациями производителя, набора необходимых специфических праймеров и амплификатора IQ5 (BioRad).

*Анализ данных:*

[00306] Статистический анализ полученных результатов проводили с применением двухфакторного дисперсионного анализа, попарные сравнения – по методу наименьших квадратов, поправка на множественность – метод симулирования (в рамках процедуры SAS PROC MIXED). Для данных по РНК поправка на множественность выполнена с применением критерия Даннета (значения были предварительно логарифмированы). Отличия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

*Результаты исследования:*

[00307] Самый значительный прирост гиперреактивности бронхов происходил у мышей контрольной группы, получавших очищенную воду (Группа 3). У животных, получавших монокомпонент заявленного препарата (Группа 2), прирост сопротивляемости бронхов имел среднюю степень

выраженности при наличии статистически значимой разницы по сравнению с контролем. Самый низкий прирост сопротивляемости бронхов отмечался после курсового введения заявленного препарата (Фиг.23).

[00308] Максимальное количество вирусной РНК было обнаружено в образцах мышей из РСВ группы (Группа 4). Инактивация вируса с помощью УФ привела к существенному снижению вирусной РНК (до 10 раз), но РНК вируса еще продолжала детектироваться. Это связано с тем, что в образцах инактивированного ультрафиолетом вируса присутствует значительное количество геномной РНК, которая детектируется методом количественной ПЦР. Выраженное различие в количестве вирусной РНК в легких мышей из групп РСВ (Группа 4) и РСВ + УФ (Группа 5) свидетельствует о том, что неинактивированный вирус способен к репликации в дыхательных путях. Отмеченный факт указывает на адекватность выбранной экспериментальной модели.

[00309] В образцах, полученных от животных Группы 1 (заявленный препарат) и Группы 2 (монокомпонент заявленного препарата), зафиксировано статистически значимое снижение количества вирусной РНК по отношению как к контрольной группе (Группа 3), так и к РСВ группе (Группа 4) (Фиг.24). При этом количество вирусной РНК в группе заявленного препарата было в 4 раза меньше, чем в группе его монокомпонента.

*Вывод:*

[00310] В результате исследования противовирусной активности заявленного лекарственного средства на мышинной модели РСВ-инфекции *in vivo* показано, что средство по настоящему изобретению способствует снижению гиперреактивности бронхов и вирусной РНК в легких. Таким образом, в исследовании показано значимое противовирусное действие заявленного лекарственного средства по отношению к РСВ (штамм А2).

Пример 16.

[00311] Эффективность лекарственного средства при инфицировании мышей *Pseudomonas aeruginosa* (штамм RP73).

[00312] Данное исследование является слепым сравнительным плацебоконтролируемым. Цель исследования – изучить антибактериальное действие заявленного препарата в условиях экспериментального инфицирования крыс *Pseudomonas aeruginosa* (штамм RP73) – бактериями, вызывающими длительно протекающие инфекции легких (с необратимым повреждением) примерно у 80% взрослых пациентов. Препарат по настоящему изобретению содержит в соотношении 1:1:1:1 по объёму, четыре продукта технологической обработки методом последовательных множественных разведений исходных субстанций поликлональных аффинно очищенных 1) антител к HLA-DRB1 (в разведении C10D40C150 в соотношении 2:3:1) (3 мг/мл), 2) антител к  $\beta$ 2-микроглобулину (в разведении C10C150 в соотношении 3:1) (3 мг/мл), 3) антител к интерферону-гамма (в разведении C10D40C150 в соотношении 2:3:1) (3 мг/мл), 4) антител к CD4 (в разведении C10C30C200 в соотношении 2:3:1) (3 мг/мл).

*Экспериментальные группы:*

[00313] Группа 1 – крысы-самцы линии Sprague-Dawley (n=10), инфицированные *Pseudomonas aeruginosa*, штамм RP73 (интратрахеально,  $6,5 \cdot 10^7$  КОЕ/мл), но не получавшие какие-либо препараты (без терапии).

[00314] Группа 2 – крысы-самцы линии Sprague-Dawley (n=10) получали перорально плацебо (очищенная вода) за 24 часа до инфицирования, а также через 24, 48, 72 и 96 часов после введения *Pseudomonas aeruginosa*, штамм RP73 (интратрахеально,  $6,5 \cdot 10^7$  КОЕ/мл). Объем введения – 7,5 мл/кг.

[00315] Группа 3 – крысы-самцы линии Sprague-Dawley (n=10) получали орофарингеально препарат сравнения – тобрамицин, в дозе 3 мг/кг за 24 часа до инфицирования, а также через 24, 48, 72 и 96 часов после введения *Pseudomonas aeruginosa*, штамм RP73 (интратрахеально,  $6,5 \cdot 10^7$  КОЕ/мл). Объем введения – 7,5 мл/кг.

[00316] Группа 4 – крысы-самцы линии Sprague-Dawley (n=10) получали перорально заявленный образец за 24 часа до инфицирования, а также через 24, 48, 72 и 96 часов после введения *Pseudomonas aeruginosa*, штамм RP73 (интратрахеально,  $6,5 \cdot 10^7$  КОЕ/мл). Объем введения – 7,5 мл/кг.

*Дизайн исследования:*

[00317] Продолжительность исследования составила 7 дней. Крыс интратрахеально инфицировали *Pseudomonas aeruginosa* (штамм RP73)  $6,5 \cdot 10^7$  КОЕ/мл. Плацебо (очищенная вода) и заявленный образец образцы вводили перорально в дозе 7,5 мл/кг за 24 часа до инфицирования, а также через 24, 48, 72 и 96 часов после инокуляции бактерий. Препарат сравнения – тобрамицин, вводили животным на те же сроки орофарингеально в дозе 3 мг/кг.

[00318] В течение всего эксперимента оценивали вес тела животных.

[00319] На 5 день после заражения крыс умерщвляли и собирали образцы бронхоальвеолярного лаважа и лёгких для оценки бактериальной обсемененности. Лёгкие гомогенизировали и из всех полученных образцов готовили серийные разведения, которые затем в триплетах по 40 мкл переносили в чашки Петри с модифицированной средой Дригальского-Конради для грамотрицательных видов бактерий. Через 24 часа подсчитывали в приготовленных образцах бронхоальвеолярного лаважа и лёгких подсчитывали количество КОЕ.

[00320] Статистический анализ результатов проводили с применением двухфакторного дисперсионного анализа для повторных измерений с апостериорным критерием Тьюки. Отличия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

*Результаты исследования:*

[00321] Интратрахеальное инфицирование крыс *Pseudomonas aeruginosa* (штамм RP73) – наиболее распространенными бактериями, вызывающими длительно протекающие инфекции легких с сопутствующим



необратимым повреждением, привело к ухудшению общего состояния животных, что отразилось линейным уменьшением массы тела. Так, в группе 1 (Без терапии) к концу эксперимента данный показатель снизился на 27% по сравнению с исходным уровнем. Аналогичная динамика наблюдалась и в группе 2 (Плацебо) – итоговое снижение на 28%.

[00322] Применение заявленного образца (группа 4) позволило улучшить общее состояние инфицированных крыс: снижение массы тела животных было менее выражено по отношению к группам 1 и 2 – итоговое снижение составило 15%. При этом препарат сравнения оказал максимальный защитный эффект: в группе 3 (Тобрамицин) среднее значение массы тела к концу исследования уменьшилось только на 4% (Фиг. 25).

[00323] При оценке бактериальной обсемененности лёгких и пробах бронхоальвеолярного лаважа крыс на 5 день после интратрахеального инфицирования *Pseudomonas aeruginosa* (штамм RP73) было выявлено значимое антибактериальное действие заявленного образца, примененного лечебно-профилактическим курсом – за 24 часа до инфицирования, а также через 24, 48, 72 и 96 часов после интратрахеальной инокуляции бактерий. В отличие от плацебо (группа 2), в ответ на введение которого количество КОЕ статистически значимо не отличалось от показателя в группе 1 (Без терапии), заявленный образец снизил количество КОЕ в лёгких на 29% по отношению к нелеченым животным и на 19% – по отношению к плацебо (Фиг. 26); в бронхоальвеолярном лаваже – на 33% и 34%, соответственно (Фиг. 27). Эффективность препарата сравнения по отношению к бактериальной обсемененности лёгкой бала сходной с показателем заваленного образца: уменьшение количества КОЕ в лёгких в ответ на применение тобрамицина составило 29% по отношению к нелеченым животным и 19% – по отношению к плацебо. В образцах бронхоальвеолярного лаважа значения антибактериальной активности тобрамицина были более выражены: 88% по отношению к обеим контрольным группам (нелеченым животным и плацебо).

*Вывод:*

[00324] Таким образом, в проведенном исследовании в условиях экспериментального инфицирования крыс *Pseudomonas aeruginosa* (штамм RP73) – бактериями, вызывающими длительно протекающие инфекции легких (с необратимым повреждением) примерно у 80% взрослых пациентов, показано выраженное антибактериальное действие заявленного препарата. Выявленная активность выражалась в менее выраженной потере массы тела, являющейся интегральным показателем общего состояния животных, а также уменьшении бактериальной нагрузки лёгких в 1,2-1,4 раза и образцов бронхоальвеолярного лаважа в 1,5 раза.

Пример 17.

[00325] Эффективность лекарственного средства при инфицировании мышей *Porphyromonas gingivalis*, штамм ATCC 33277.

[00326] Данное исследование является слепым плацебоконтролируемым. Цель исследования – изучить антибактериальное и иммуностропное (противовоспалительное) действие заявленного препарата в условиях экспериментального инфицирования мышей одним из главных возбудителей заболеваний пародонта – *Porphyromonas gingivalis*. Препарат по настоящему изобретению содержит в соотношении 2:3:2:1 по объёму, продукт технологической обработки методом последовательных множественных разведений исходных субстанций поликлональных аффинно очищенных 1) антител к HLA-DRB1(в разведении С50С200 в соотношении 2:3) (1,5 мг/мл), 2) антител к  $\beta$ 2-микроглобулину (в разведении С50С200 в соотношении 1:2) (1,5 мг/мл), 3) антител к интерферону-гамма (в разведении С50С200 в соотношении 1:3) (1,5 мг/мл), 4) антител к CD4 (в разведении С50С200 в соотношении 3:2) (1,5 мг/мл).

*Экспериментальные группы:*

[00327] Группа 1 – самцы мышей линии C57B6/Ntac (n=10), инфицированные *Porphyromonas gingivalis*, штамм ATCC 33277 (подкожно,  $10^8$  КОЕ/животное), но не получавшие какие-либо препараты (без терапии).

[00328] Группа 2 – самцы мышей линии C57B6/Ntac (n=10) получали перорально плацебо (очищенная вода) через 2, 24, 48 и 72 часа после инфицирования *Porphyromonas gingivalis*, штамм ATCC 33277 (подкожно,  $10^8$  КОЕ/животное). Объем введения – 10 мл/кг.

[00329] Группа 3 – самцы мышей линии C57B6/Ntac (n=10) получали перорально заявленный препарат через 2, 24, 48 и 72 часа после инфицирования *Porphyromonas gingivalis*, штамм ATCC 33277 (подкожно,  $10^8$  КОЕ/животное). Объем введения – 10 мл/кг.

*Дизайн исследования:*

[00330] Продолжительность исследования составила 25 дней. Экспериментальное инфицирование у мышей было вызвано подкожным введением в предварительно имплантированную камеру [Infect Immun. 1991 Apr;59(4):1255-63] *Porphyromonas gingivalis* (штамм ATCC 33277) в дозе  $10^8$  КОЕ/животное.

[00331] Тестируемые образцы вводили перорально в дозе 10 мл/кг через 2, 24, 48 и 72 часа после заражения.

[00332] На 4 день после введения бактерий ранее подкожно имплантированные камеры извлекали и оценивали в них уровень бактериальной обсемененности и концентрацию провоспалительных цитокинов (интерлейкина-1 $\beta$ , интерлейкина-6).

[00333] Для оценки бактериальной нагрузки серийные разведения образцов содержимого камер в триплетах по 20 мкл переносили в чашки Петри с кровавым агаром на основе бруцелла агара и выдерживали в анаэробных условиях в течение 96 часов.

[00334] Уровень цитокинов определяли иммуноферментным методом с использованием тест-систем фирмы R&D Systems (США) согласно инструкции производителя.

[00335] Статистический анализ результатов проводили с применением критерия Краскела-Уоллиса с пост-хок критерием Тьюки и кривых Каплана-Мейера и последующим попарным сравнением по логранговому критерию. Отличия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

*Результаты исследования:*

[00336] При оценке бактериальной нагрузки (количества КОЕ *Porphyromonas gingivalis*, штамм ATCC 33277) у мышей в подкожно имплантированных камерах на 4 день после *iv vivo* введения в них бактерий в дозе  $10^8$  КОЕ/животное, было показано значимое антибактериальное действие заявленного образца, примененного курсом (через 2, 24, 48 и 72 часа после заражения). В отличие от плацебо (группа 2), в ответ на введение которого количество КОЕ было равным значению в группе 1 (Без терапии), заявленный образец снизил количество КОЕ на 41% по отношению к нелеченым животным и на 34% – по отношению к плацебо (Фиг. 28).

[00337] Исследование иммуотропной активности заявленного препарата, оцененного по влиянию на уровень провоспалительных цитокинов – интерлейкина- $1\beta$  и интерлейкина-6 – у мышей в подкожно имплантированных камерах на 4 день после *iv vivo* введения в них *Porphyromonas gingivalis* (штамм ATCC 33277) в дозе  $10^8$  КОЕ/животное, выявило значимый эффект препарата. Так, в ответ на его применение зафиксировано статистически значимое по сравнению с контролем и группой 1 (без терапии) уменьшение концентрации обозначенных цитокинов: интерлейкина- $1\beta$  – на 49% vs показатель группы 1 и на 41% vs показатель группы 2 (плацебо); интерлейкина-6 – на 60% vs показатель группы 1 и на 63% vs показатель группы 2 (Фиг. 29, Фиг. 30).

*Вывод:*

[00338] Таким образом, в проведенном исследовании по оценке антибактериального и иммуотропного (противовоспалительного) действия заявленного препарата в условиях экспериментального инфицирования

мышей одним из главных возбудителей заболеваний пародонта – *Porphyromonas gingivalis*, показана выраженная эффективность протестированного образца, которая выражалась в уменьшении по сравнению с плацебо бактериальной обсемененности ( $\approx$  в 3 раза) и уровня провоспалительных цитокинов (интерлейкина-1 $\beta$  – 1,7 раза и интерлейкина-6 в 2,7 раза).

#### Пример 18.

[00339] Антибактериальная активность заявленного лекарственного средства в отношении *Mycobacterium tuberculosis*, штамм H37Rv.

[00340] Данное исследование является слепым сравнительным плацебоконтролируемым. Цель исследования – оценка антибактериального действия заявленного препарата в условиях экспериментального инфицирования мышей бактериями *Mycobacterium tuberculosis*, штамм H37Rv. Препарат по настоящему изобретению содержит в соотношении 2:2:1:2 по объёму, продукт технологической обработки методом последовательных множественных разведений исходных субстанций поликлональных аффинно очищенных 1) антител к HLA-DRB1 (в разведении C12C30C50 в соотношении 3:2:1) (2 мг/мл), 2) антител к  $\beta$ 2-микроглобулину (в разведении C12C30C50 в соотношении 3:2:1) (2 мг/мл), 3) антител к интерферону-гамма (в разведении C12C30C50 в соотношении 3:2:1) (2 мг/мл), 4) антител к CD4 (в разведении C12C30C50 в соотношении 3:2:1) (2 мг/мл).

#### Экспериментальные группы:

[00341] Группа 1 – мыши-самки линии C57BL/6 (n=15), инфицированные *Mycobacterium tuberculosis*, штамм H37Rv (внутривенно,  $5 \cdot 10^4$  КОЕ/животное), но не получавшие какие-либо препараты (без терапии).

[00342] Группа 2 – мыши-самки линии C57BL/6 (n=15) получали перорально плацебо (очищенная вода) в течение 4 недель, начиная на 22 день

после введения *Mycobacterium tuberculosis*, штамм H37Rv (внутривенно,  $5 \cdot 10^4$  КОЕ/животное). Объем введения – 10 мл/кг.

[00343] Группа 3 – мыши-самки линии C57BL/6 (n=15) получали перорально препарат сравнения – комбинацию «изониазид (25 мг/кг) + рифампицин (20 мг/кг) + этамбутол (100 мг/кг)», в течение 4 недель, начиная на 22 день после введения *Mycobacterium tuberculosis*, штамм H37Rv (внутривенно,  $5 \cdot 10^4$  КОЕ/животное).

[00344] Группа 4 – мыши-самки линии C57BL/6 (n=15) получали перорально заявленный препарат в течение 4 недель, начиная на 22 день после введения *Mycobacterium tuberculosis*, штамм H37Rv (внутривенно,  $5 \cdot 10^4$  КОЕ/животное). Объем введения – 10 мл/кг.

*Дизайн исследования:*

[00345] Продолжительность исследования составила 50 дней. Экспериментальное инфицирование у мышей было вызвано внутривенным введением *Mycobacterium tuberculosis*, штамм H37Rv в дозе  $5 \cdot 10^4$  КОЕ/животное.

[00346] Тестируемые образцы в группах 2 и 4 вводили перорально в дозе 10 мл/кг лечебным курсом – в течение 28 дней, начиная на 22 день после инфицирования. Препарат сравнения – комбинацию «изониазид (25 мг/кг) + рифампицин (20 мг/кг) + этамбутол (100 мг/кг)» (группа 3), вводили по аналогичной схеме.

[00347] По окончании эксперимента – на 50 день после инфицирования, мышей умерщвляли и в лёгких оценивали количество КОЕ *Mycobacterium tuberculosis*, штамм H37Rv. Для этого из выделенных органов готовили гомогенат, серийные десятикратные разведения которого в триплетах по 20 мкл переносили в чашки Петри с агаром 7H11 на 24 часа.

[00348] Статистический анализ результатов проводили с применением двухфакторного дисперсионного анализа с пост-хок критерием Тьюки. Отличия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

*Результаты исследования:*

[00349] При оценке бактериальной нагрузки в лёгких мышей, инфицированных *Mycobacterium tuberculosis* (штамм H37Rv), было показано, что в ответ на терапию заявленным препаратом наблюдается уменьшение количество КОЕ как по сравнению с нелечеными животными (группа 1), так и по сравнению с плацебо (группа 2): на 43% и 37%, соответственно. Препарат сравнения – комбинация «изониазид (25 мг/кг) + рифампицин (20 мг/кг) + этамбутол (100 мг/кг)» обладал сходной активностью, уменьшая бактериальную нагрузку на 54% по сравнению с нелечеными животными и на 49% по сравнению с показателем в группе плацебо (Фиг. 31).

*Вывод:*

[00350] Таким образом, в проведенном исследовании в условиях инфицирования мышей *Mycobacterium tuberculosis* (штамм H37Rv), показано выраженное антибактериальное действие заявленного препарата, которое заключалось в двукратном уменьшении бактериальной обсемененности лёгких.

Пример 19.

[00351] Изучение потенциальной мутагенной активности заявленного лекарственного средства в тесте на мутагенность *Salmonella typhimurium*.

[00352] Цель исследования оценить влияние заявленного препарата в тесте на индукцию генных мутаций на *Salmonella typhimurium* (тест Эймса). Препарат 1 по настоящему изобретению содержит, в соотношении 1:1 по объёму, продукты технологической обработки методом последовательных множественных разведений исходных субстанций антител к HLA-DRB1(в водном разведении C12C30C50 в соотношении 1:1:1; поликлональные антитела) и РА форму  $\beta$ 2-МГ (в водном разведении C12C30C50 в соотношении 1:1:1; поликлональные антитела). Препарат 2 по настоящему изобретению содержит в соотношении 1:1:1:1 по объёму, продукты технологической обработки методом последовательных множественных

разведений исходных субстанций а) антител к HLA-DRB1(в разведении C12C30C50 в соотношении 1:1:1) (2,5 мг/мл), б) антител к  $\beta$ 2-микроглобулину (в разведении C12C30C50 в соотношении 1:1:1) (2,5 мг/мл), в) антител к интерферону-гамма (в разведении C12C30C50 в соотношении 1:1:1) (2,5 мг/мл), г) антител к CD4 (в разведении C12C30C50 в соотношении 1:1:1) (2,5 мг/мл).

*Дизайн исследования:*

[00353] При постановке теста Эймса использовали индикаторные штаммы *Salmonella typhimurium* TA97a, TA98, TA100, TA102 и TA1535. Эксперименты проводили как с метаболической активацией химических веществ, так и без нее. В первом случае для осуществления биотрансформации испытуемого вещества использовали содержащую ферменты микросомального окисления фракцию S9, которую получали путем центрифугирования при 9000g гомогената печени белых беспородных крыс. В качестве индуктора ферментов применяли совол, который вводили крысам внутрибрюшинно в дозе 300 мг/кг.

[00354] Исследуемые препараты и очищенная вода (контроль) были протестированы в стандартном для теста диапазоне 0,1-1000 мкл на чашку с фактором разведения 10. В вариантах опытов без метаболической активации оценивали прямое мутагенное действие заявленного препарата. При этом микросомальная активирующая смесь в пробы не вносилась, а на чашки были нанесены 100 мкл препарата и 100 мкл бактериальной культуры. Для постановки позитивных контролей были применены стандартные мутагены: азид натрия для штамма TA100 (концентрация 5 мкг на чашку), 9-аминоакридин (10 мкг на чашку) для штамма TA97, 2,7-диамино-4,9-диокси-5,10-диоксо-4,5,9,10-тетрагидро-4,9-диазопирен (ДДДТДП; 100 мкг на чашку) для штамма TA98, и в опытах с метаболической активацией промутаген циклофосфан (концентрация 500 мкг на чашку). После высева бактерий с исследуемыми веществами на чашки с минимальной средой и инкубации посевов в течение двух суток при 37°C проводился учет



количества выросших колоний гистидиновых ревертантов. На каждую тестируемую концентрацию были использованы по три чашки.

[00355] Определяли среднее геометрическое число ревертантов на чашку из трех в каждом из вариантов опыта. Статистическое отклонение находили как максимальное отклонение числа ревертантов на одной из трех чашек от среднего геометрического. Для оценки значимости превышения среднегеометрического числа ревертантов в вариантах с испытуемым соединением над контролем использовали метод множественных сравнений Даннета в модификации. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

*Результаты исследования:*

[00356] Во всех вариантах опытов с заявленными препаратами число ревертантов не отличалось от уровня в контроле.

*Вывод:*

[00357] Поскольку для метаболической активации заявленных препаратов в качестве индуктора ферментов биотрансформации был использован совол, который усиливает активность многих классов цитохром-Р-450-зависимых монооксигеназ, можно сделать заключение и об отсутствии мутагенной активности у возможных метаболитов препаратов по настоящему изобретению. Таким образом, заявленные лекарственные средства не обладают мутагенной активностью.

Пример 20.

[00358] Изучение токсичности заявленных лекарственных препаратов.

[00359] Токсикологические исследования были проведены в соответствии с принципами надлежащей лабораторной практики (ГОСТ 33044-2014) и «Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [Миронов АН, Бунатян НД. Руководство по

проведению доклинических исследований лекарственных средств. М Гриф и К. 2012;944 с.].

[00360] В связи с тем, что привычные параллели фармакокинетики и фармакодинамики (связь доза – концентрация – эффект), принятые для большинства лекарственных средств, к заявленному лекарственному средству (продукт технологической обработки методом последовательных множественных разведений исходных субстанций антител к HLA-DRB1 и  $\beta$ 2-МГ) не применимы (существующие физико-химические и иммунологические методы не позволяют регистрировать концентрации препарата в биологических средах организма) при подборе доз для токсикологических исследований ориентировались на физиологически приемлемые объемы носителя (в экспериментальных исследованиях – очищенной воды), в которых вносится лекарственный препарат.

*Токсичность при остром введении:*

[00361] Исследование выполнено на нелинейных половозрелых белых мышах обоего пола (масса 22-26 г, возраст 2,5 мес.) и половозрелых крысах линии Вистар обоего пола (масса 225-250 г, возраст 4 мес.) при внутрижелудочном введении. Исследуемый препарат (n=18) или очищенную воду (контроль, n=18) вводили дважды с интервалом в 2 часа в максимально допустимых объемах: внутрижелудочно – 25 мл/кг мышам и 20 мл/кг крысам. Интактная группа не получала никаких веществ (n=18). После введения веществ наблюдение за животными вели в течение 2 недель.

[00362] Полученные данные анализировали с помощью многофакторного дисперсионного анализа (two-way ANOVA) с последующим сравнением всех групп друг с другом пост-хок критерием Тьюки. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

[00363] Введение заявленного препарата, содержащего продукт технологической обработки методом последовательных множественных разведений исходных субстанций антител к HLA-DRB1 (в водном разведении С12С30С50 в соотношении 2:1:3, 2,5 мг/мл; поликлональные

антитела) и антител к  $\beta$ 2-МГ (в водном разведении С12С30С50 в соотношении 2:1:3, 2,5 мг/мл; поликлональные антитела) внутрижелудочно в максимально допустимых объемах половозрелым мышам и крысам не меняло общего состояния животных (отсутствовали признаки беспокойства, изменения аппетита, выделений, состояния слизистых, шерсти, кожи и др.) и не влияло на прирост общей массы крыс и мышей (как самок, так и самцов).

[00364] Такой же результат, в тех же условиях как описано выше, показал препарат, по настоящему изобретению, содержащий продукты технологической обработки методом последовательных множественных разведений исходных субстанций а) антител к HLA-DRB1 (в разведении С12С30С50 в соотношении 1:3:1) (2,5 мг/мл), б) антител к  $\beta$ 2-МГ (в разведении С12С30С50 в соотношении 1:3:1) (2,5 мг/мл), в) антител к IFN- $\gamma$  (в разведении С12С30С50 в соотношении 1:3:1) (2,5 мг/мл), г) антител к CD4 (в разведении С12С30С50 в соотношении 1:3:1) (2,5 мг/мл).

[00365] Отсутствие летальности у животных, получавших препараты, не позволило определить показатель ЛД50. Условно за ЛД50 приняли дозу, превышающую максимальный введённый животным объём препарата.

[00366] Учитывая, что двукратное внутрижелудочное введение заявленных препаратов в максимально допустимых объемах не оказало токсического действия на организм животных, можно сделать вывод о безвредности заявленных препаратов и основание отнести к классу малотоксичных или к 5 категории по классификации GHS.

*Токсичность при введении повторных доз:*

[00367] Исследование проведено на 200 половозрелых белых конвенциональных крысах обоего пола (масса 180-242 г, возраст 3,5-4 мес.) и 24 половозрелых кролика породы «Шиншилла» обоего пола (масса 1,9 кг, возраст 2,5-3 мес.). Поскольку не удалось определить величину ЛД50 для препаратов, в исследовании хронической токсичности на крысах препараты или очищенную воду вводили внутрижелудочно в максимально допустимом

объеме для внутрижелудочного введения и в 1/4 максимально допустимого объема. Кролики получали препарат в объеме, приближенном к ежесуточной норме потребления воды.

[00368] Продолжительность введения составляла 6 месяцев, состояние крыс и кроликов оценивали через 3 и 6 месяцев после начала введения препаратов, а также спустя месяц отмены.

[00369] Хроническое внутрижелудочное введение препаратов по настоящему изобретению взрослым крысам обоего пола в дозах, превышающих более чем в 100 раз рекомендованные суточные дозы для человека, не вызывало гибели животных в течение 6 месяцев введения, значимых изменений по сравнению с контрольной группой в поведенческой активности, морфологических и функциональных показателей периферической крови – через 3 и 6 месяцев введения, а также через 1 месяц после отмены препарата

[00370] Хроническое введение препаратов в указанных дозах также не сопровождалось значимыми изменениями в макро- и микроморфологическом состоянии и гистологической архитектоники внутренних органов крыс.

[00371] В исследовании на кроликах весь период исследования также не было отмечено гибели животных. Хроническое введение препарата не оказывало значимого влияния на общее состояние, поведение, массу тела животных, а также на показатели периферической крови и костномозгового кроветворения. По результатам биохимических исследований плазмы крови у кроликов существенных изменений не обнаружено. Не выявлено также изменений при обследовании мочи у кроликов, получавших препарат в течение 6-ти месяцев. При макроскопическом обзоре внутренних органов кроликов, получавших препарат в течение 6-ти месяцев, патологических изменений не выявлено. При гистологическом исследовании тканей органов также не зафиксировано патологических изменений.

*Вывод:*

[00372] Таким образом, на основании проведенных исследований можно заключить, что заявленные препараты при шестимесячном внутрижелудочном введении половозрелым крысам в дозе 10 мл/кг и кроликам в дозе 50 мл/кг (более чем в 100 раз превышающих средние суточные дозы для человека) не оказывает существенного влияния на общее состояние и поведение животных; не вызывает патологических и морфофункциональных изменений со стороны сердечно-сосудистой, пищеварительной и выделительной систем.

#### Пример 21

[00373] Многоцентровое двойное слепое плацебо-контролируемое рандомизированное клиническое исследование заявленного препарата в лечении острой респираторной вирусной инфекции.

[00374] Целью исследования было оценить эффективность и безопасность заявленного лекарственного средства при лечении острой респираторной вирусной инфекции (ОРВИ). Препарат согласно настоящему изобретению в форме таблетки для рассасывания содержит в том же количестве четыре технологически обработанных продукта, полученных в результате серийных разведений (разведения C12C30C50) исходных веществ очищенных с поликлональной аффинностью: а) антитела к HLA -DRB1, б) антитела к  $\beta$ 2-микроглобулину, в) антитела к интерферону гамма и г) антитела к CD4, нанесенные к моногидрату лактозы в виде водно-спиртовой смеси.

#### *Дизайн исследования:*

[00375] В исследование включались амбулаторные пациенты мужского и женского пола в возрасте от 18 до 70 лет (240 пациентов) с клиническими проявлениями ОРВИ в течение первых суток от начала заболевания (аксиллярная температура не менее 38,0°C на момент осмотра + суммарная выраженность общих симптомов  $\geq 4$  баллов, симптомов со

стороны носа/горла/грудной клетки  $\geq 2$  баллов). Набор пациентов проводился в период сезонной заболеваемости ОРВИ.

[00376] После прохождения процедур скрининга 240 пациентов были рандомизированы в две группы, в том числе, 118 в группу Препарат (принимали заявленный препарат по схеме в течение 5 дней) и 122 в группу Плацебо (принимали плацебо по схеме приема препарата в течение 5 дней). Результаты лечения и наблюдения этих пациентов (n=240) использовали для оценки безопасности исследуемой терапии и ИТТ (Intention-to-treat) анализа эффективности, в том числе, среди пациентов с ОРВИ, подтвержденной методом ПЦР (n=78, группа ММН-407 и n=73, группа Плацебо). Данные 6 пациентов (3 пациентов группы Препарат и 3 пациентов группы Плацебо) не вошли в РР (Protocol set) анализ эффективности в связи с отклонениями от протокола (назначение запрещенной терапии). Количество пациентов, получивших терапию в полном объеме, прошедших все предусмотренные визиты и не имевших значительных отклонений от протокола, составило 234, в том числе 115 – группы Препарат и 119 – группы Плацебо. Данные этих пациентов использовались для РР анализа эффективности, в том числе, среди пациентов с ОРВИ, подтвержденной методом ПЦР (n=76, группа Препарат и n=72, группа Плацебо).

[00377] Пациент наблюдался в течение 14 суток (скрининг, рандомизация – до 1 суток, лечение – 5 суток, последующее наблюдение – до 2 суток; отсроченный телефонный «визит» – 14 сутки). В процессе лечения и наблюдения пациенты наносили врачу/врач пациенту 3 визита, дополнительно был предусмотрен четвертый телефонный «визит». В ходе Визитов 2 и 3 врач проводил объективный осмотр, регистрировал динамику симптомов заболевания, сопутствующую терапию, контролировал заполнение дневника. На Визите 3 оценивалась комплаентность, проводились лабораторные исследования. Также в исследовании использовался электронный дневник пациента (ЭДП), в котором ежедневно

утром и вечером отмечались значения аксиллярной температуры тела и симптомы заболевания.

*Схема лечения:*

[00378] Схема приема заявленного препарата: По 1 таблетке на прием. В первые сутки лечения: первые 2 часа по 1 таблетке каждые 30 минут, затем, в течение первых суток, еще 3 раза через равные промежутки. Со 2-х по 5-е сутки: по 1 таблетке 3 раза в день. Препарат принимается вне приема пищи (в промежутке между приемами пищи либо за 15-30 минут до еды), таблетки держать во рту, не проглатывая, до полного растворения. Длительность приема – 5 дней.

[00379] Терапия сравнения: Плацебо, таблетки для рассасывания, по схеме приема заявленного препарата в течение 5 дней.

[00380] Базовая и сопутствующая терапия: В течение исследования пациенты могли получать препараты для симптоматической терапии ОРВИ: жаропонижающий/нестероидный противовоспалительный препарат (парацетамол/ ибупрофен) и/или сосудосуживающий назальный препарат – оксиметазолин/нафазолин и/или противокашлевый/отхаркивающий препарат – бутамират/амброксол, бромгексин, гвайфенезин, ацетилцистеин.

*Выборки:*

[00381] *Total set* – это все включенные в исследование пациенты, которые подписали информационный листок пациента и форму информированного согласия. В этой выборке учитываются все нежелательные явления (НЯ), зарегистрированные в ходе исследования, в том числе до начала приема исследуемой терапии.

[00382] *Safety population* – все рандомизированные пациенты, получившие хотя бы одну дозу исследуемого препарата. Эта выборка использовалась для анализа безопасности исследуемой терапии, так как регистрировались все НЯ, выявленные у пациента после применения лекарственного препарата. НЯ, зарегистрированные у пациентов выборки *Total set* с момента подписания информированного согласия, но до приема

исследуемого препарата, не учитываются при анализе безопасности исследуемой терапии.

[00383] *Full Analysis Set (ITT population)*. Это все включенные и рандомизированные пациенты за исключением тех, у которых имело место хотя бы одно из перечисленных событий:

- 1) несоответствие критериям включения/невключения;
- 2) пациент не принял ни одной дозы исследуемого препарата;
- 3) отсутствие каких-либо данных о пациенте после рандомизации и приема исследуемого препарата.

[00384] Эта выборка, наиболее соответствующая «*Intention-to-treat*» принципу, использовалась для *Intention-to-treat анализа (ITT-анализа) эффективности исследуемой терапии*.

[00385] Для заполнения отсутствующих/пропущенных данных (показателей/вариантов) использовался метод переноса данных последнего наблюдения вперед “*LOCF*” (*Last Observation Carried Forward*).

[00386] *Per Protocol set*. Выборка включает в себя всех пациентов, получивших предусмотренную протоколом терапию в полном объеме, прошедших все запланированные визиты и не имевших значительных отклонений от протокола. Эта выборка использовалась для *Per Protocol анализа (PP анализа) эффективности исследуемой терапии*.

[00387] В выборку *Per Protocol set* не включались пациенты, данные которых полностью или частично непригодны для анализа в результате выявленного отклонения от протокола.

*Статистические методы:*

[00388] Для сравнения результатов в двух группах для непрерывных переменных использовали двухвыборочный t-критерий Стьюдента или непараметрический критерий Вилкоксона в зависимости от результата проверки на нормальность критерием Шапиро-Уилка. Для сравнения изменений показателей в двух группах применяли дисперсионный анализ (*Mixed Procedure* в *SAS*). Витальные показатели пациентов



анализировались с помощью критерия Краскела-Уоллиса. Для сравнения долей (процентов) в двух группах использовали точный критерий Фишера или критерий Кохрана-Мантеля-Хензеля с проверкой на применимость последнего тестом Бреслоу-Дей.

*Оценка эффективности:*

[00389] Анализ эффективности терапии по первичной конечной точке

Время до разрешения симптомов ОРВИ (ПЦР подтвержденной).

Время до разрешения всех симптомов заболевания у пациентов с ОРВИ, подтвержденной методом ПЦР (с выявленным вирусом в назофарингеальных образцах), на фоне лечения препаратом ММН-407 составило  $4.1 \pm 1.9$  [ $4.0 \pm 1.9$ ] суток (против  $5.0 \pm 2.5$  [ $5.0 \pm 2.5$ ] суток на фоне плацебо-терапии (табл. 7).

Табл.7. Время до разрешения симптомов ОРВИ (ПЦР подтвержденной)

	ITT анализ		PP анализ	
	Препарат N=78	Плацебо N=73	Препарат N=78	Плацебо N=73
Длительность ОРВИ, сутки				
Среднее $\pm$ Стд. Откл.	$4.1 \pm 1.9$	$5.0 \pm 2.5$	$4.0 \pm 1.9$	$5.0 \pm 2.5$
Медиана	3.5	4.5	3.5	4.5
Нижний и верхний квартили	3.0 – 5.0	3.0 – 6.0	2.8 – 5.0	3.0 – 6.3
95% ДИ	3.6 – 4.5	4.4 – 5.5	3.6 – 4.5	4.4 – 5.6
$\Delta$ (между группами Препарат и Плацебо)				
Среднее $\pm$ Стд. Откл.	$-0.89 \pm 2.23$		$-0.93 \pm 2.25$	
95% ДИ	-1.6 – -0.17		-1.66 – -0.20	

[00390] В группе Препарат у 25% пациентов заболевание продолжалось менее 3.0 [2.8] суток, а у 50% – от 3.0 [2.8] до 5.0 [5.0] суток (границы нижнего и верхнего квартилей). В группе Плацебо у 25% пациентов симптомы заболевания сохранялись более 6.0 [6.3] суток (граница верхнего квартиля).

[00391] Среди пациентов группы Препарат, включенных в ИТТ анализ, длительность течения ОРВИ в среднем была на  $-0.89 \pm 2.23$  суток короче, по сравнению с группой Плацебо (дельта между двумя группами). У пациентов группы Препарат, завершивших лечение и наблюдение в соответствии с протоколом, продолжительность ОРВИ была короче примерно на 1 сутки ( $[-0.93 \pm 2.25]$ , данные РР анализа).

[00392] Анализ эффективности терапии по дополнительным конечным точкам

[00393] Доля пациентов с разрешением симптомов ОРВИ (клинически диагностированной и/или ПЦР подтвержденной).

Доля пациентов с разрешением симптомов ОРВИ (клинически диагностированной, в том числе, ПЦР подтвержденной) прогрессивно увеличивалась, начиная с 3 дня лечения. В группе Препарат на 5 день терапии более половины пациентов (62.7 [64.4] %) были здоровы, фиг. 32). По окончании 5 дней лечения 72.9 [73.0] % пациентов, получавших заявленный препарат, выздоровели от ОРВИ.

[00394] Статистический анализ показал, что суммарно за весь период лечения процент пациентов с выздоровлением, завершивших участие в исследовании в соответствии с протоколом, в группе Препарат был больше, по сравнению с группой Плацебо (тест Кохрана-Мантеля-Хензел; данные РР анализа: [p=0.0201]).

[00395] Время до разрешения симптомов ОРВИ (клинически диагностированной, в том числе, ПЦР подтвержденной).

[00396] Анализ данных по дополнительной конечной точке, оценивающей время до разрешения симптомов ОРВИ (клинически диагностированной, в том числе, ПЦР подтвержденной) среди всех рандомизированных участников, также демонстрирует преимущество применения препарата ММН-407 в дополнение к симптоматической терапии ОРВИ (табл. 8).

Табл.8 Время до разрешения симптомов ОРВИ (клинически диагностированной, в том числе, ПЦР подтвержденной).

	ITT анализ		PP анализ	
	Препарат N=118	Плацебо N=122	Препарат N=115	Плацебо N=119
Длительность ОРВИ, сутки				
Среднее ± Стд. Откл.	4.4 ± 2.2	4.8 ± 2.4	4.3 ± 2.3	4.8 ± 2.5
Медиана	3.8	4.0	3.5	4.0
Нижний и верхний квартили	3 – 5.5	3 – 6	3 – 5.5	3 – 6
95% ДИ	4 – 4.8	4.3 – 5.2	3.9 – 4.8	4.4 – 5.3
Δ (между группами Препарат и Плацебо)				
Среднее ± Стд. Откл.		-0.41 ± 2.34		-0.47 ± 2.36
95% ДИ		-1.00 – 0.19		-1.08 – -0.14

[00397] В группе Препарат у 25% пациентов заболевание продолжалось менее 3.0 суток, а у 50% – от 3.0 до 5.5 суток (границы нижнего и верхнего квартилей). В группе Плацебо у 25% пациентов симптомы заболевания сохранялись более 6.0 суток (граница верхнего квартиля).

[00398] Среди пациентов группы Препарат, включенных в ITT анализ, длительность течения ОРВИ, клинически диагностированной, в том числе, ПЦР подтвержденной, в среднем была на  $-0.41 \pm 2.34$  суток короче, по сравнению с группой Плацебо (дельта между двумя группами). У пациентов группы Препарат, завершивших лечение и наблюдение в соответствии с протоколом, продолжительность ОРВИ, клинически диагностированной, в том числе, ПЦР подтвержденной, была короче на  $[-0.47 \pm 2.36]$  суток, данные PP анализа).

[00399] Таким образом, время до разрешения симптомов заболевания у всех пациентов с ОРВИ, клинически диагностированной, в том числе, ПЦР подтвержденной, в группе Препарат было меньше, по сравнению с группой Плацебо.

[00400] Число приемов жаропонижающих препаратов по показаниям на 1-3 дни лечения.

[00401] В ходе исследования, в соответствии с медицинскими показаниями, разрешался прием жаропонижающих препаратов (парацетамола или ибупрофена, которые выдавал врач-исследователь на Визите 1).

[00402] Антипиретики были назначены в первый, второй и третий дни болезни в среднем по  $0.30 \pm 0.68$  [ $0.28 \pm 0.67$ ],  $0.19 \pm 0.48$  [ $0.20 \pm 0.48$ ] и  $0.03 \pm 0.22$  [ $0.02 \pm 0.13$ ] раза в группе Препарат и по  $0.38 \pm 0.67$  [ $0.36 \pm 0.64$ ],  $0.24 \pm 0.53$  [ $0.23 \pm 0.53$ ] и  $0.04 \pm 0.20$  [ $0.04 \pm 0.20$ ] раза в группе Плацебо.

[00403] Статистический анализ не выявил различий между группами в числе приемов жаропонижающих препаратов в течение 1-3 дней наблюдения.

[00404] Таким образом, показана эффективность заявленного препарата в лечении пациентов с ОРВИ при отсутствии различий в применении препаратов симптоматической терапии, в том числе, антипиретиков.

[00405] Доля пациентов, у которых отмечено ухудшение течения заболевания (развитие осложнений, требующих назначения антибиотиков или госпитализации) с 4 по 14 день от начала наблюдения.

[00406] В группе Препарата (N=118) среди всех рандомизированных пациентов с ОРВИ (клинически диагностированной, в том числе, ПЦР подтвержденной) у 1 (0.8%) диагностирован острый бронхит, по поводу которого был назначен антибактериальный препарат. В группе Плацебо (N=122) 3 (2.5%) пациентам назначены антибактериальные препараты в связи с бактериальными осложнениями, включая пневмонию (n=1, по поводу которой пациент был госпитализирован), острый гнойный бронхит (n=1), гайморит (n=1).

[00407] Таким образом, включение заявленного препарата в комплекс лечения ОРВИ способствовало предупреждению ухудшения течения заболевания, предотвращало развитие бактериальных осложнений, требующих антибактериальной терапии и госпитализации пациентов.

*Оценка безопасности:*

[00408] Оценка безопасности и переносимости терапии проводилась на основании данных всех включенных и рандомизированных пациентов, получивших хотя бы одну дозу исследуемого препарата/плацебо (выборка *Safety population*; n=240). Оценивались жизненно важные показатели участников исследования, регистрировались нежелательные явления (НЯ), их связь с приемом препарата, степень тяжести, исход; изучалась динамика лабораторных показателей (клинического анализа крови, общего анализа мочи, биохимических маркеров).

[00409] Динамика жизненно важных показателей.

[00410] Заявленный препарат не оказывал отрицательного влияния на жизненно важные функции участников исследования, в том числе, систолическое (САД), диастолическое (ДАД) артериальное давление, частоту сердечных сокращений (ЧСС) и частоту дыхания (ЧД).

[00411] Средние значения САД и ДАД на протяжении всего исследования соответствовали нормальным и хорошо контролируемым показателям. Статистический анализ не показал различий значений САД, ДАД, ЧСС и ЧД на визитах 1-3 в группах Препарат и Плацебо.

[00412] Нежелательные явления.

Всего в течение периода лечения и наблюдения было зарегистрировано 9 НЯ у 9 (7.6%) пациентов группы Препарат и 11 НЯ у 9 (7.4%) участников группы Плацебо. Из всех НЯ наиболее частыми были боль в эпигастрии (n=2, группа Препарат, n=0, группа Плацебо), инфекции и инвазии (в том числе, внебольничная пневмония, n=1, группа Плацебо; гайморит, n=1, группа Плацебо; острый бронхит, n=1, группа Препарат и n=1, группа Плацебо; острый назофарингит, n=1, группа Препарат; острый тубоотит, n=1, группа Препарат; простой герпес, n=1, группа Препарат и n=1, группа Плацебо), а также, общие нарушения и реакции в месте введения (n=2, группа Плацебо в виде отека губ, n=1, ухудшения заболевания, n=1).

[00413] В группе Препарат 9 (100.0%) НЯ были легкой степени; в группе Плацебо – 11 (100.0%) соответственно. Причинно-следственная связь НЯ с исследуемым заявленным препаратом по мнению врачей-исследователей, отсутствовала.

[00414] Динамика лабораторных показателей.

С целью оценки безопасности терапии исследовались биохимические, а также общеклинические показатели крови и мочи. Средние значения этих лабораторных параметров как исходно, так и по окончании курса лечения не выходили за рамки референтных значений, соответствующих нормальным показателям для данного возраста и пола.

[00415] Таким образом, анализ параметров безопасности показал, что препарат безопасен в лечении пациентов с ОРВИ.

*Заключение:*

[00416] Проведенное исследование показывает, что лечение заявленным препаратом в течение 5 дней эффективно и безопасно у пациентов с ОРВИ. Применение препарата по настоящему изобретению приводит к более быстрому разрешению симптомов ОРВИ (выздоровлению), что свидетельствует о преимуществах включения препарата в комплекс терапии ОРВИ.

## Формула изобретения

1. Лекарственное средство, представляющее собой продукт технологической обработки методом последовательных множественных разведений исходных субстанций антител к  $\beta 1$  - домену молекулы главного комплекса гистосовместимости класса 2 (HLA-DRB1) и  $\beta 2$ -микροглобулину ( $\beta 2$ -МГ).
2. Лекарственное средство по п.1 для лечения бактериальных инфекций.
3. Лекарственное средство по п.2, где бактериальная инфекция представляет собой инфекцию мочеполовой системы.
4. Лекарственное средство по п.3, где инфекция мочеполовой системы представляет собой цистит.
5. Лекарственное средство по п.3, где инфекция мочеполовой системы представляет собой простатит.
6. Лекарственное средство по п.2, где бактериальная инфекция представляет собой инфекцию пищеварительной системы.
7. Лекарственное средство по п.6, где бактериальная инфекция пищеварительной системы является кишечной бактериальной инфекцией.
8. Лекарственное средство по п.2, где бактериальная инфекция представляет собой бактериальную инфекцию кожи.
9. Лекарственное средство по п.2, где бактериальная инфекция представляет собой инфекцию дыхательных путей.
10. Лекарственное средство по п.9, где бактериальная инфекция дыхательных путей представляет собой туберкулез.
11. Лекарственное средство по п.2, где бактериальная инфекция представляет собой сальмонеллез.
12. Лекарственное средство по п.2, где бактериальная инфекция представляет собой коли-инфекцию.

13. Лекарственное средство по п.2, где бактериальная инфекция представляет собой стрептококковую инфекцию.

14. Лекарственное средство по п.2, где бактериальная инфекция представляет собой инфекцию вызванную *Klebsiella pneumoniae*.

15. Лекарственное средство по п.2, где бактериальная инфекция вызвана бактериями, резистентными к одному или нескольким известным антибиотикам.

16. Лекарственное средство по п.1, где продукт технологической обработки методом последовательных множественных разведений исходной субстанции антител к HLA-DRB1 представляет собой водный или водно - спиртовой раствор, полученный путем многократного последовательного разведения в сочетании с внешним механическим воздействием – многократным встряхиванием каждого разведения матричного раствора антител к HLA-DRB1.

17. Лекарственное средство по п.16, где матричный раствор антител используется в концентрации  $0,5 \div 5,0$  мг/мл.

18. Лекарственное средство по п.1, где антитело представляет собой моноклональное, поликлональное или естественное антитело к HLA-DRB1.

19. Лекарственное средство по п.1, где продукт технологической обработки методом последовательных множественных разведений исходной субстанции антител к  $\beta 2$ -микроглобулину представляет собой водный или водно - спиртовой раствор, полученный путем многократного последовательного разведения в сочетании с внешним механическим воздействием – многократным встряхиванием каждого разведения матричного раствора антител к  $\beta 2$ -микроглобулину.

20. Лекарственное средство по п.19, где матричный раствор антител используется в концентрации  $0,5 \div 5,0$  мг/мл.

21. Лекарственное средство по п.1, где антитело представляет собой моноклональное, поликлональное или естественное антитело к  $\beta 2$ -микроглобулину.



22. Лекарственное средство по п.1, дополнительно включающее фармацевтически приемлемые добавки.

23. Лекарственное средство по п.1, выполненное в твердой лекарственной форме и содержащее эффективное количество гранул нейтрального носителя, насыщенного продуктом технологической обработки методом последовательных множественных разведений исходных субстанций антител к HLA-DRB1 и антител к  $\beta$ 2-микроглобулину, и фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества.

24. Комбинация антибиотика и лекарственного средства по п.1 для одновременного или последовательного применения для лечения бактериальных инфекций.

25. Комбинация по п.24, где бактериальная инфекция вызвана бактериями, резистентными к одному или нескольким известным антибиотикам.

26. Комбинация по п.24, где бактериальная инфекция представляет собой инфекцию мочеполовой системы.

27. Комбинация по п.26, где инфекция мочеполовой системы представляет собой цистит.

28. Комбинация по п.26, где инфекция мочеполовой системы представляет собой простатит.

29. Комбинация по п.24, где бактериальная инфекция представляет собой инфекцию пищеварительной системы.

30. Комбинация по п.29, где бактериальная инфекция пищеварительной системы является кишечной бактериальной инфекцией.

31. Комбинация по п.24, где бактериальная инфекция представляет собой бактериальную инфекцию кожи.

32. Комбинация по п.24, где бактериальная инфекция представляет собой инфекцию дыхательных путей.

33. Комбинация по п.32, где бактериальная инфекция дыхательных путей представляет собой туберкулез.
34. Комбинация по п.24, где бактериальная инфекция представляет собой сальмонеллез.
35. Комбинация по п.24, где бактериальная инфекция представляет собой коли-инфекцию.
36. Комбинация по п.24, где бактериальная инфекция представляет собой стрептококковую инфекцию.
37. Комбинация по п.24, где бактериальная инфекция представляет собой инфекцию, вызванную *Klebsiella pneumoniae*.
38. Комбинация по п.24, где антибиотик выбран из антибиотиков класса пенициллинов.
39. Комбинация по п.24, где антибиотик выбран из антибиотиков класса аминогликозидов.
40. Комбинация по п.24, где антибиотик выбран из антибиотиков класса макролидов.
41. Комбинация по п.24, где антибиотик выбран из антибиотиков класса оксазолидинонов.
42. Способ лечения бактериальной инфекции, включающий введение лекарственного средства по п.1.
43. Способ по п.42, где бактериальная инфекция представляет собой инфекцию мочеполовой системы.
44. Способ по п.43, где инфекция мочеполовой системы представляет собой цистит.
45. Способ по п.43, где инфекция мочеполовой системы представляет собой простатит.
46. Способ по п.42, где бактериальная инфекция представляет собой инфекцию пищеварительной системы.
47. Способ по п.46, где бактериальная инфекция пищеварительной системы является кишечной бактериальной инфекцией.

48. Способ по п.42, где бактериальная инфекция представляет собой бактериальную инфекцию кожи.
49. Способ по п.42, где бактериальная инфекция представляет собой инфекцию дыхательных путей.
50. Способ по п.49, где бактериальная инфекция дыхательных путей представляет собой туберкулез.
51. Способ по п.42, где бактериальная инфекция представляет собой сальмонеллез.
52. Способ по п.42, где бактериальная инфекция представляет собой коли-инфекцию.
53. Способ по п.42, где бактериальная инфекция представляет собой стрептококковую инфекцию.
54. Способ по п.42, где бактериальная инфекция представляет собой инфекцию, вызванную *Klebsiella pneumoniae*.
55. Способ по п.42, включающий дополнительное введение антибиотика.
56. Способ по п.42, где бактериальная инфекция вызвана бактериями, резистентными к одному или нескольким известным антибиотикам.
57. Способ по п.55, где введение антибиотика осуществляется в известной терапевтической дозе.
58. Способ по п.55, где введение антибиотика осуществляется одновременно или последовательно с лекарственным средством по п.29.
59. Способ по п.55, где антибиотик выбран из антибиотиков класса пенициллинов.
60. Способ по п.55, где антибиотик выбран из антибиотиков класса аминогликозидов.
61. Способ по п.55, где антибиотик выбран из антибиотиков класса макролидов.

62. Способ по п.55, где антибиотик выбран из антибиотиков класса оксазолидинонов.

63. Способ снижения резистентности бактерий к терапии антибиотиком, включающий введение антибиотика и лекарственного средства по п.1.

64. Способ по п.63, где введение лекарственного средства по п.29 осуществляется одновременно или последовательно с антибиотиком.

65. Способ по п. 63, где введение антибиотика осуществляется в известной терапевтической дозе.

66. Способ по п.63, где антибиотик выбран из антибиотиков класса пенициллинов.

67. Способ по п.63, где антибиотик выбран из антибиотиков класса аминогликозидов.

68. Способ по п.63, где антибиотик выбран из антибиотиков класса макролидов.

69. Способ по п.63, где антибиотик выбран из антибиотиков класса оксазолидинонов.

70. Способ повышения эффективности антибиотика, включающий дополнительное введение лекарственного средства по п.1.

71. Способ по п.70, где введение лекарственного средства по п.1 осуществляется одновременно или последовательно с антибиотиком.

72. Способ по п.70, где антибиотик выбран из антибиотиков класса пенициллинов.

73. Способ по п.70, где антибиотик выбран из антибиотиков класса аминогликозидов.

74. Способ по п.70, где антибиотик выбран из антибиотиков класса макролидов.

75. Способ по п.70, где антибиотик выбран из антибиотиков класса оксазолидинонов.

76. Способ по п.70, где введение антибиотика осуществляется в дозе составляющей половину терапевтической дозы антибиотика (ЭД50).

77. Лекарственное средство, представляющее собой продукт технологической обработки методом последовательных множественных разведений исходных субстанций а) антител к  $\beta 1$  - домену молекулы главного комплекса гистосовместимости класса 2 (HLA-DRB1), б) антител к  $\beta 2$ -микροглобулину ( $\beta 2$ -МГ), в) антител к интерферону-гамма (IFN- $\gamma$ ), г) антител к CD4.

78. Лекарственное средство по п.77 для лечения инфекционных заболеваний.

79. Лекарственное средство по п.78, где инфекционное заболевание представляет собой вирусную инфекцию.

80. Лекарственное средство по п.79, где вирусная инфекция является ОРВИ.

81. Лекарственное средство по п.79, где вирусная инфекция является гриппом.

82. Лекарственное средство по п.78, где инфекционное заболевание представляет собой бактериальную инфекцию.

83. Лекарственное средство по п.78, где инфекционное заболевание представляет собой смешанную инфекцию.

84. Лекарственное средство по п.78, где инфекционное заболевание представляет собой вторичную инфекцию.

85. Лекарственное средство по п.84, где вторичная инфекция является вирусно-бактериальной пневмонией.

86. Лекарственное средство по п.77, где продукт технологической обработки методом последовательных множественных разведений исходной субстанции антител к HLA-DRB1 представляет собой водный или водно - спиртовой раствор, полученный путем многократного последовательного разведения в сочетании с внешним механическим воздействием –

многократным встряхиванием каждого разведения матричного раствора антител к HLA-DRB1.

87. Лекарственное средство по п.77, где продукт технологической обработки методом последовательных множественных разведений исходной субстанции антител к  $\beta$ 2-микроглобулину представляет собой водный или водно - спиртовой раствор, полученный путем многократного последовательного разведения в сочетании с внешним механическим воздействием – многократным встряхиванием каждого разведения матричного раствора антител к  $\beta$ 2-микроглобулину.

88. Лекарственное средство по п.77, где продукт технологической обработки методом последовательных множественных разведений исходной субстанции антител к интерферону-гамма представляет собой водный или водно - спиртовой раствор, полученный путем многократного последовательного разведения в сочетании с внешним механическим воздействием – многократным встряхиванием каждого разведения матричного раствора антител к интерферону-гамма.

89. Лекарственное средство по п.77, где продукт технологической обработки методом последовательных множественных разведений исходной субстанции антител к CD4 представляет собой водный или водно - спиртовой раствор, полученный путем многократного последовательного разведения в сочетании с внешним механическим воздействием – многократным встряхиванием каждого разведения матричного раствора антител к CD4.

90. Лекарственное средство по п.86, 87, 88, 89, где матричный раствор антител используется в концентрации  $0,5 \div 5,0$  мг/мл.

91. Лекарственное средство по п. 86, где антитело представляет собой моноклональное, поликлональное или естественное антитело к HLA-DRB1.

92. Лекарственное средство по п.87, где антитело представляет собой моноклональное, поликлональное или естественное антитело к  $\beta$ 2-микроглобулину.

93. Лекарственное средство по п.88, где антитело представляет собой моноклональное, поликлональное или естественное антитело к интерферону-гамма.

94. Лекарственное средство по п.89, где антитело представляет собой моноклональное, поликлональное или естественное антитело к CD4.

95. Лекарственное средство по п. 77, дополнительно включающее фармацевтически приемлемые добавки.

96. Лекарственное средство по п.77, выполненное в твердой лекарственной форме и содержащее эффективное количество гранул нейтрального носителя, насыщенного продуктом технологической обработки методом последовательных множественных разведений исходных субстанций антител к HLA DRB1, антител к  $\beta$ 2-МГ, антител к IFN- $\gamma$  и антител к CD4 и фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества.

97. Способ лечения инфекционных заболеваний, включающий введение лекарственного средства по п.77

98. Способ лечения по п.97. где инфекционное заболевание представляет собой вирусную инфекцию.

99. Способ лечения по п.98, где вирусная инфекция представляет собой ОРВИ.

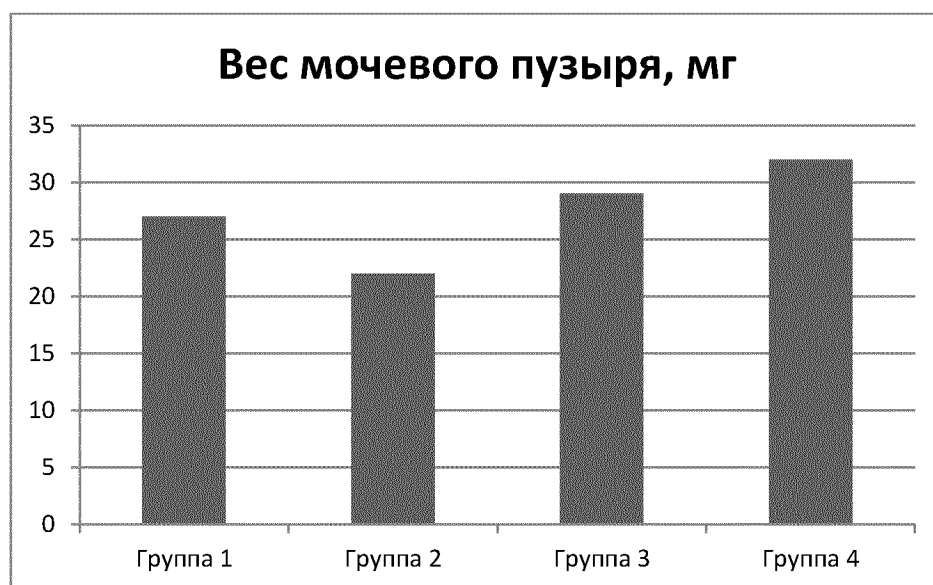
100. Способ лечения по п.99, где вирусная инфекция представляет собой грипп.

101. Способ лечения по п.98, где инфекционное заболевание представляет собой бактериальную инфекцию.

102. Способ лечения по п.98, где инфекционное заболевание представляет собой смешанную инфекцию.

103. Способ лечения по п.98, где инфекционное заболевание представляет собой вторичную инфекцию.

104. Способ лечения по п. 103, где вторичная инфекция представляет собой вирусно-бактериальную пневмонию.

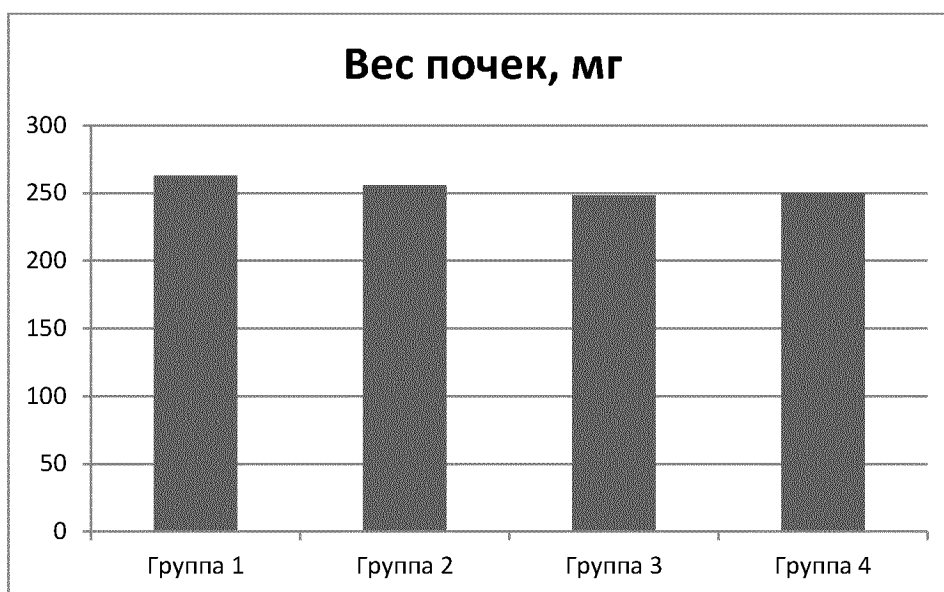


Фиг. 1.



Фиг. 2.



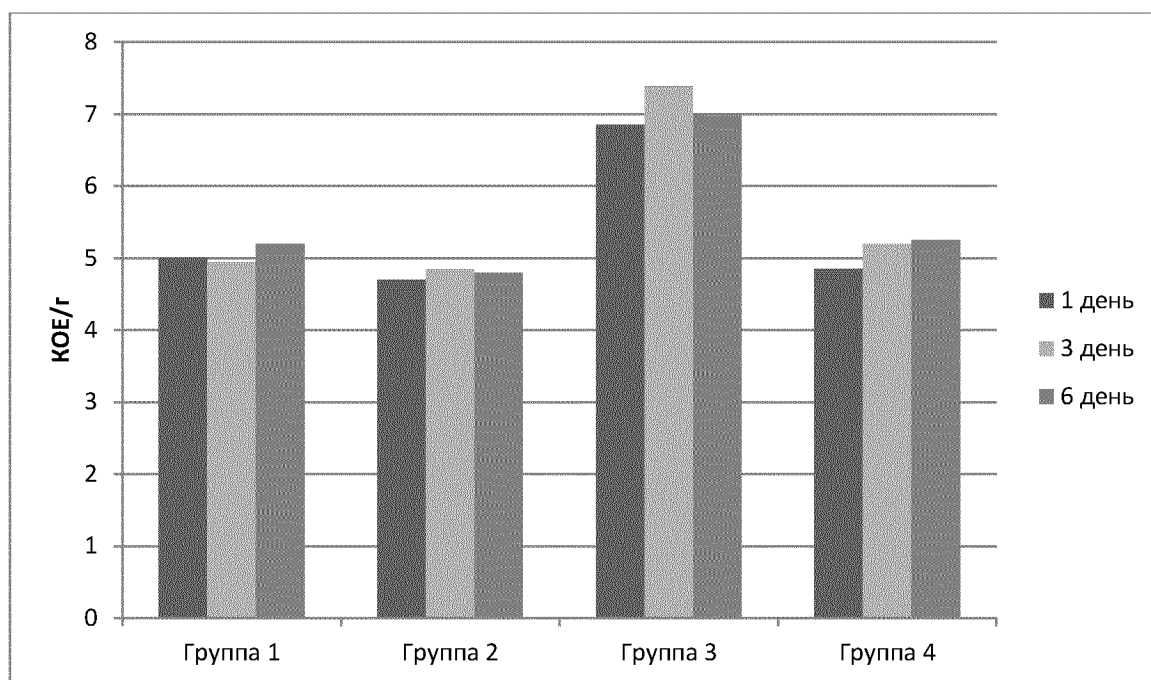


Фиг.3.



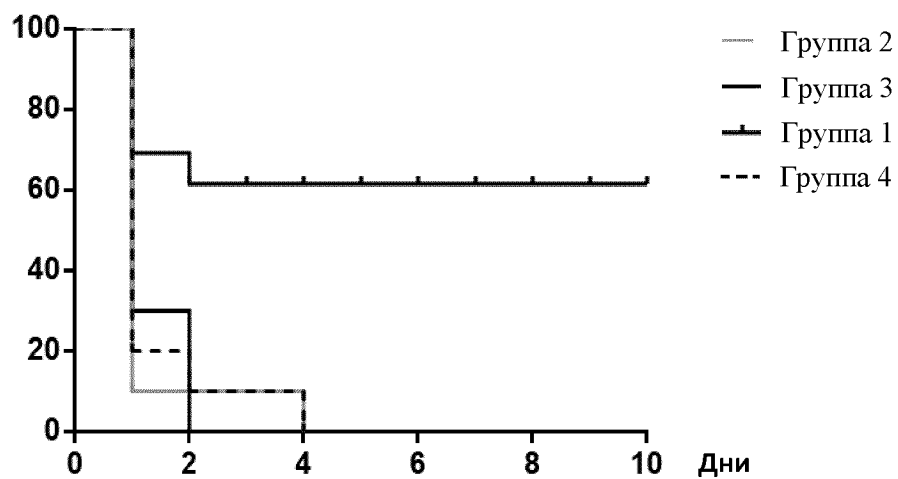
Фиг.4.

## Лекарственное средство и способ лечения инфекционных заболеваний

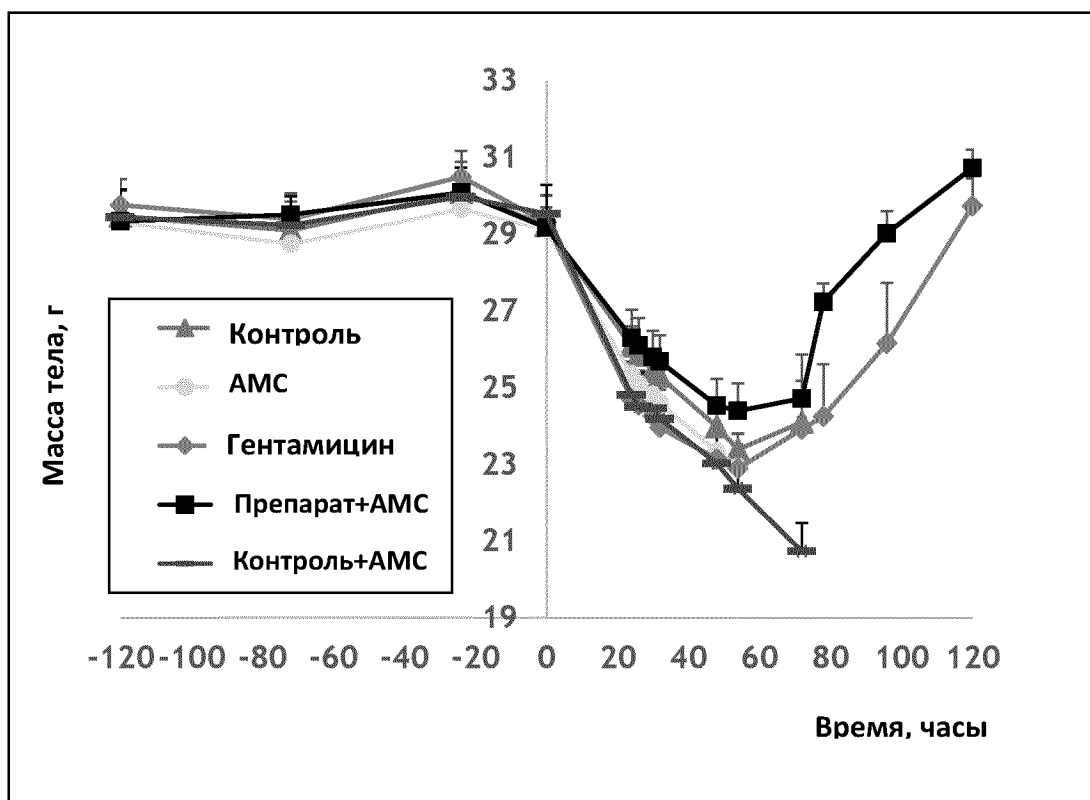


Фиг. 5.

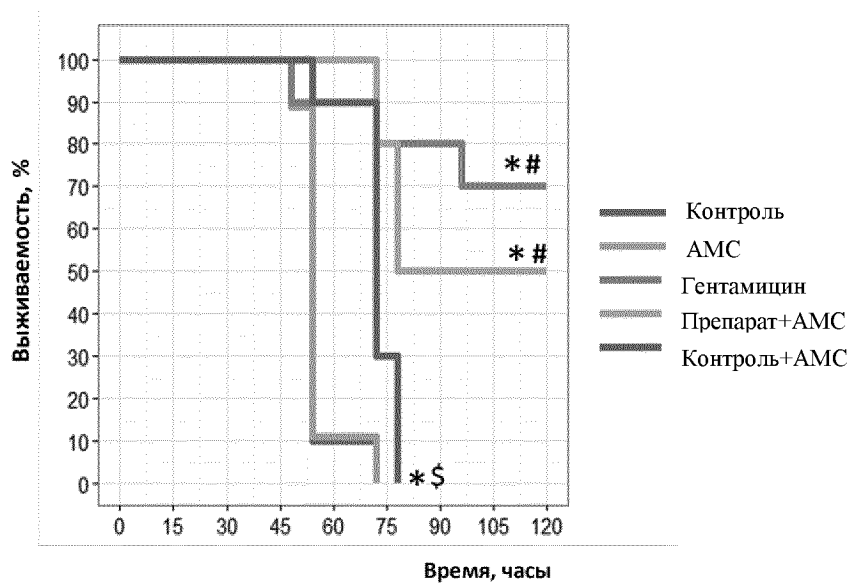
Выживаемость %



Фиг. 6.

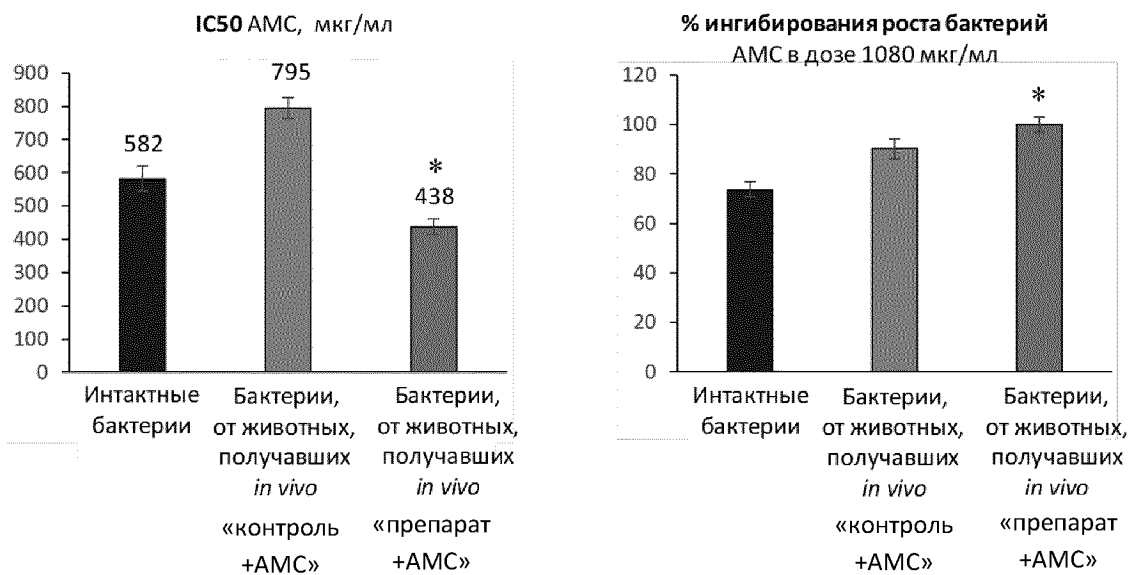


Фиг.7.

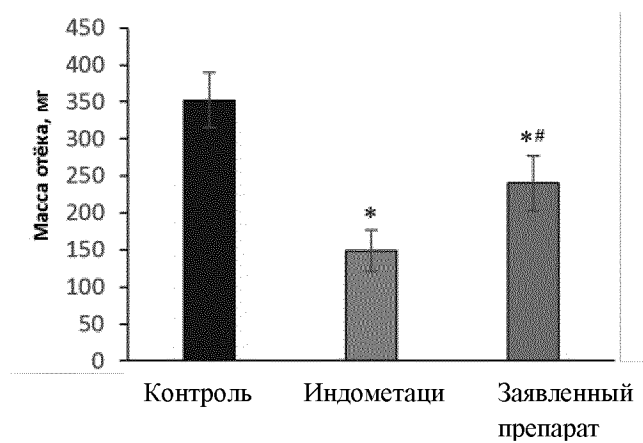


Фиг.8.

## Лекарственное средство и способ лечения инфекционных заболеваний

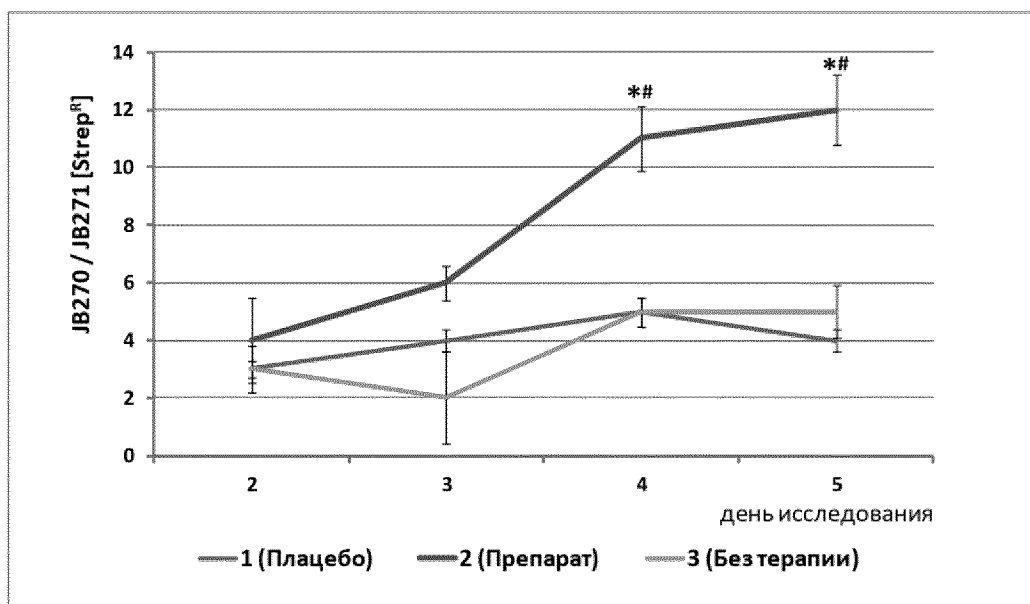


Фиг.9.

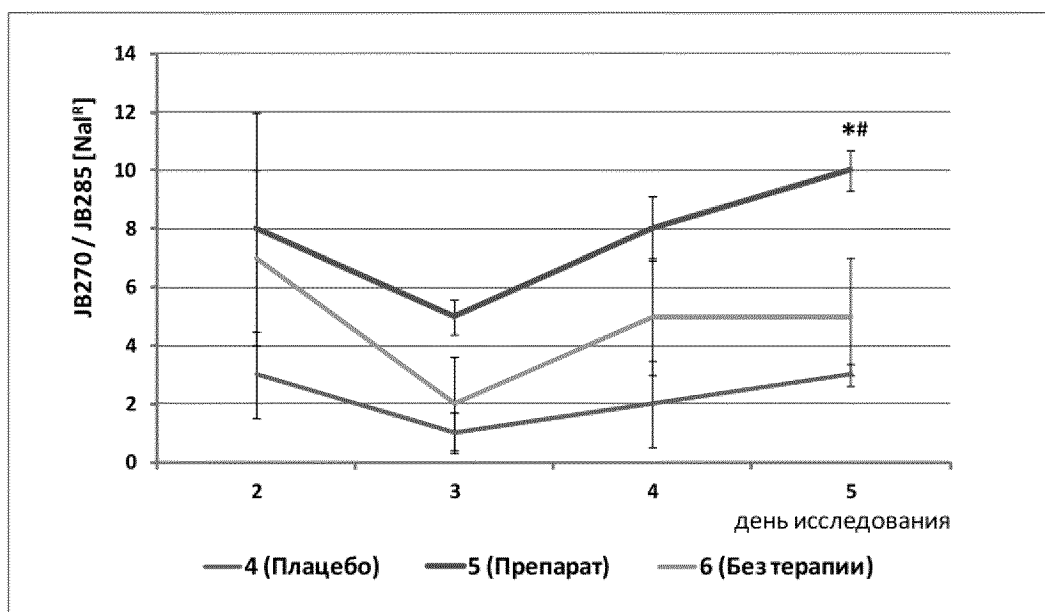


Фиг.10

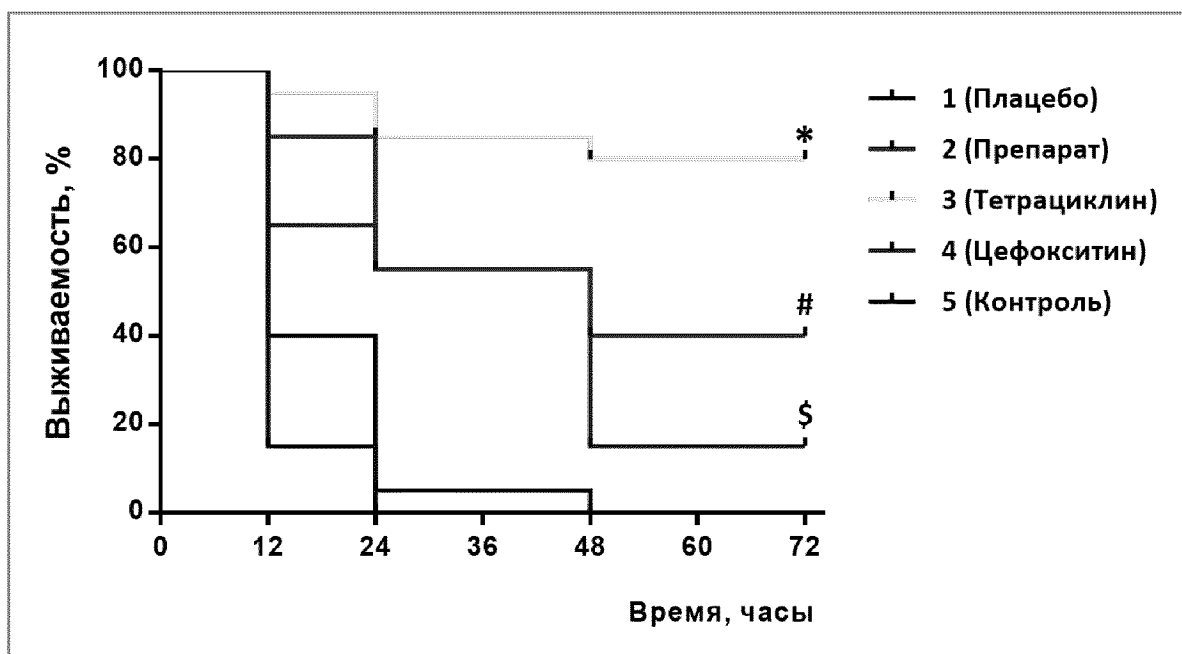
Лекарственное средство и способ лечения инфекционных заболеваний



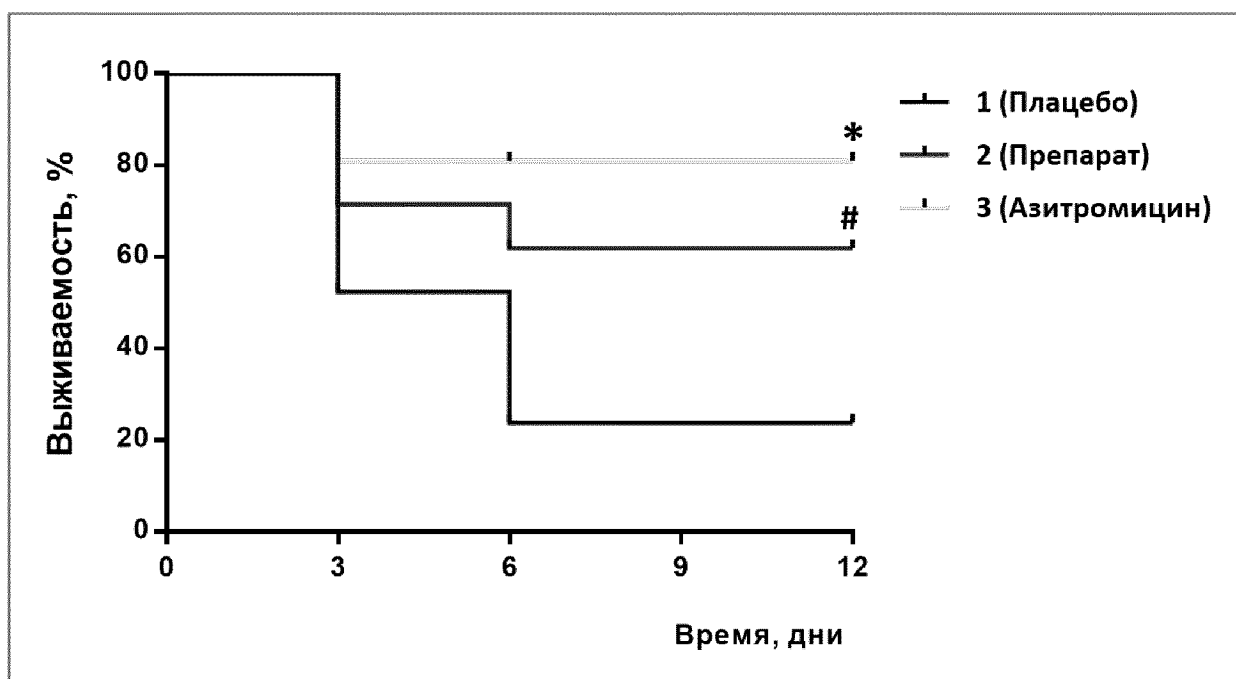
Фиг. 11.



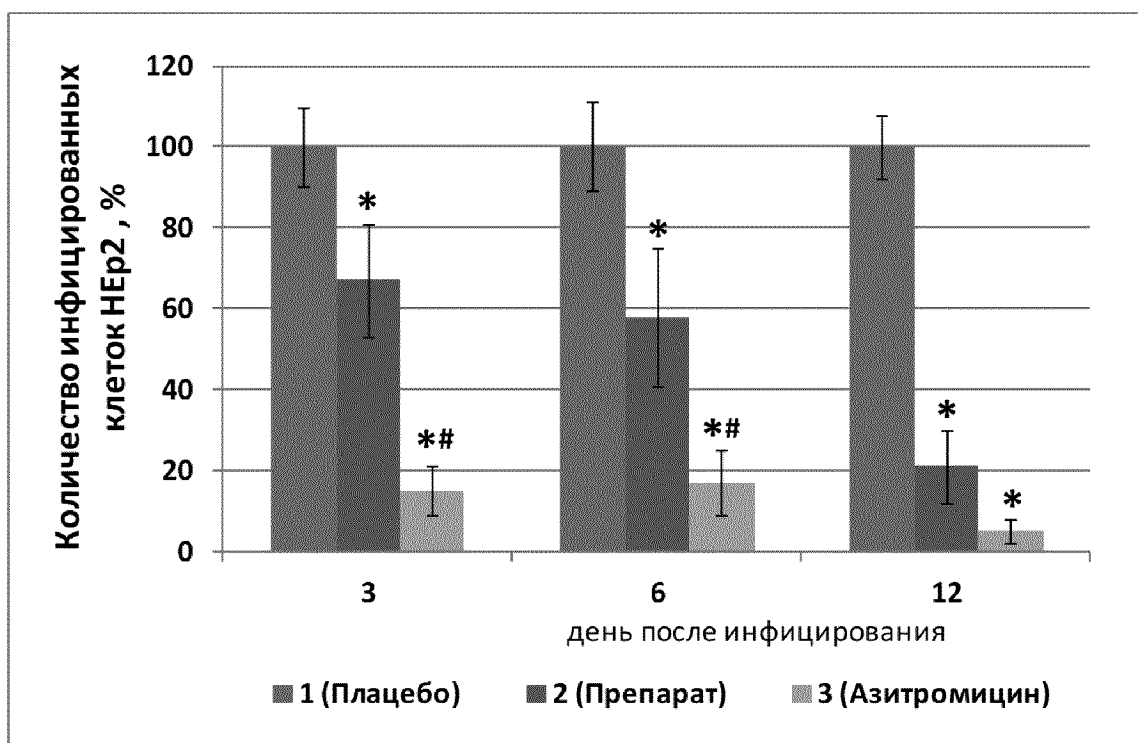
Фиг. 12.



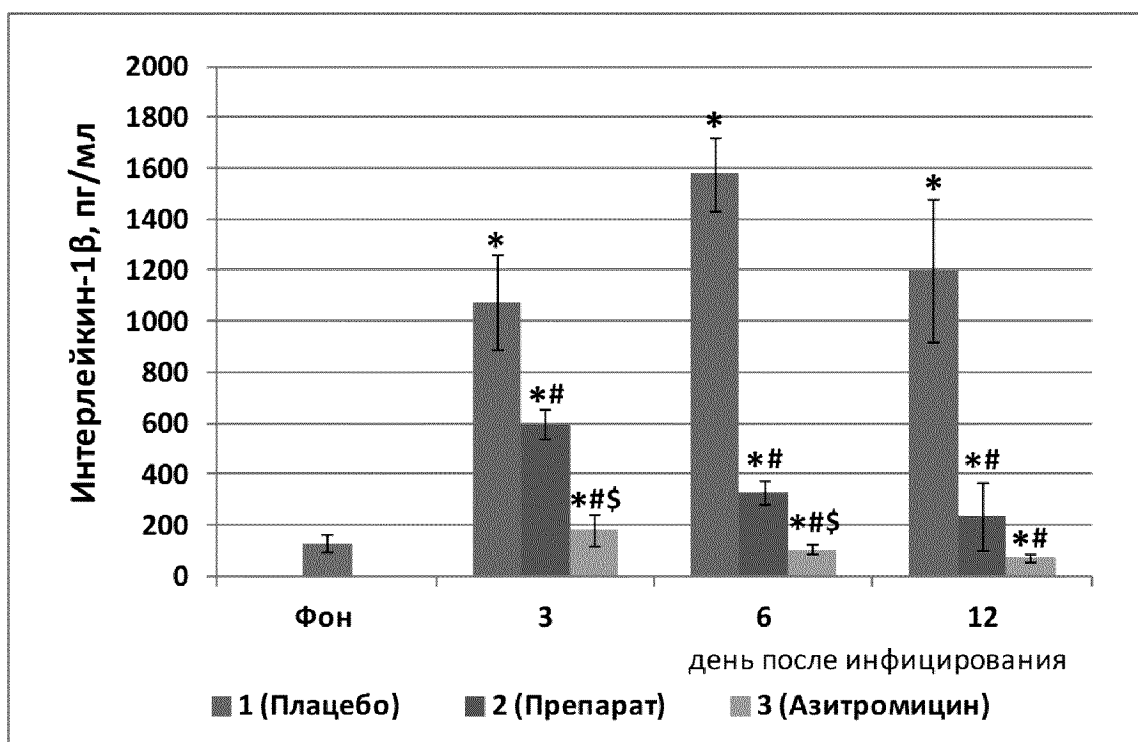
Фиг. 13



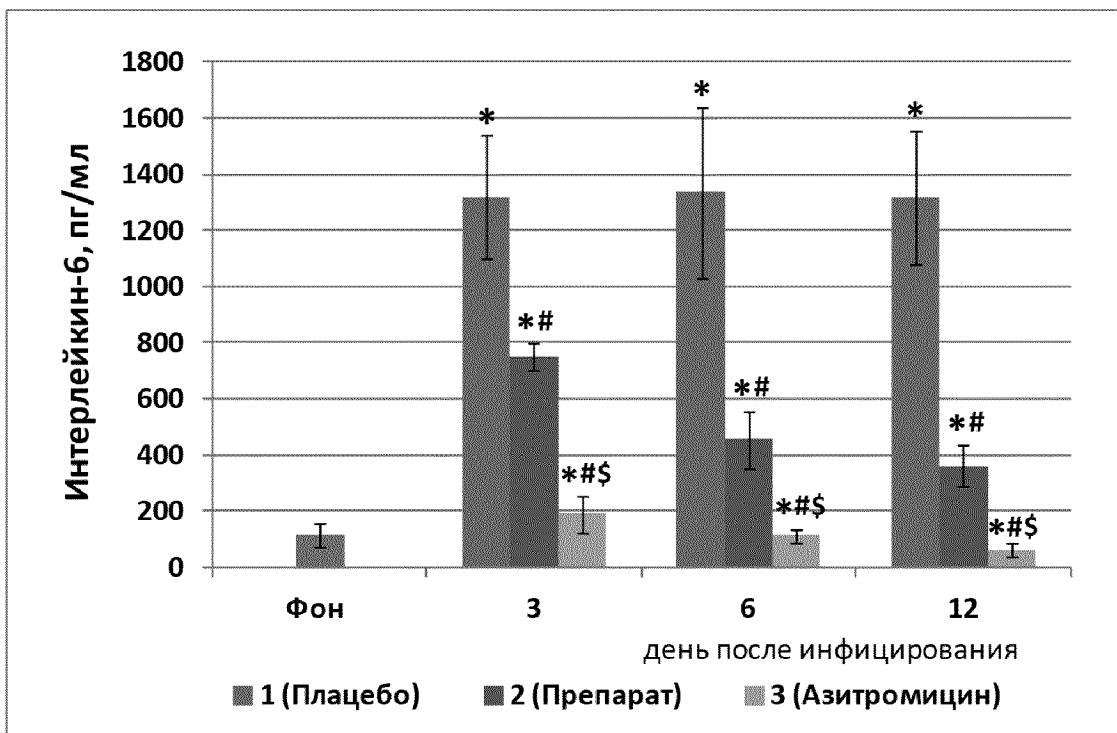
Фиг. 14.



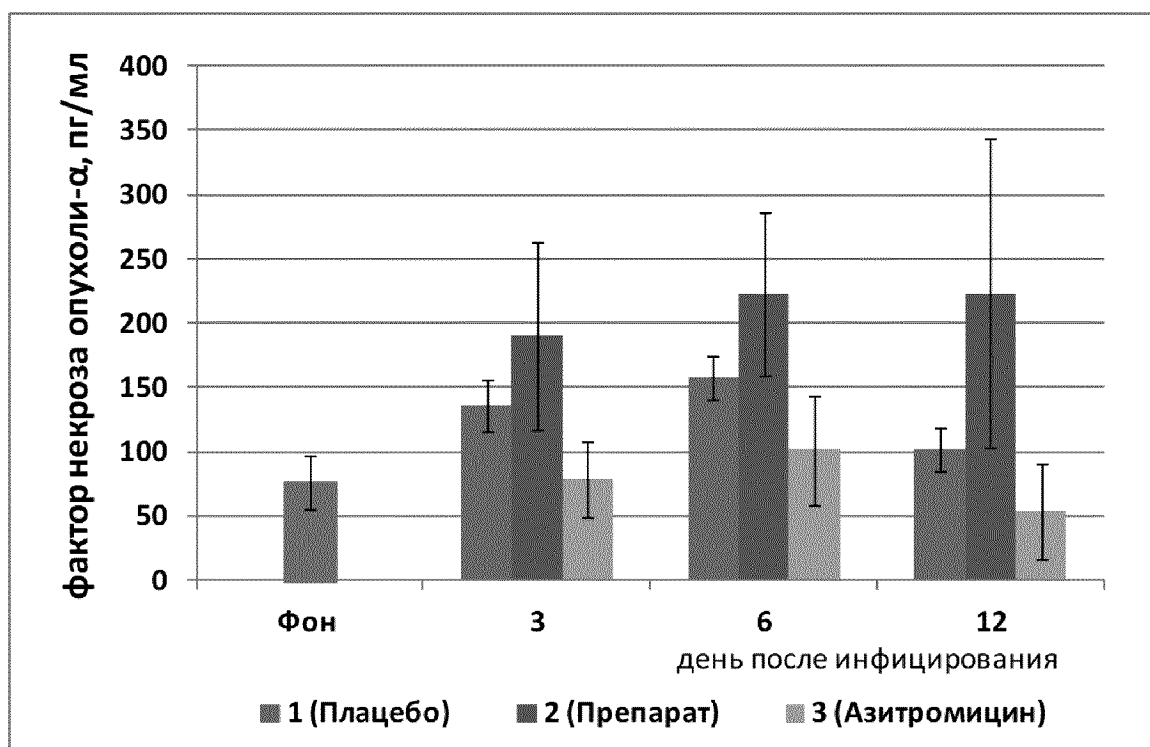
Фиг. 15.



Фиг. 16

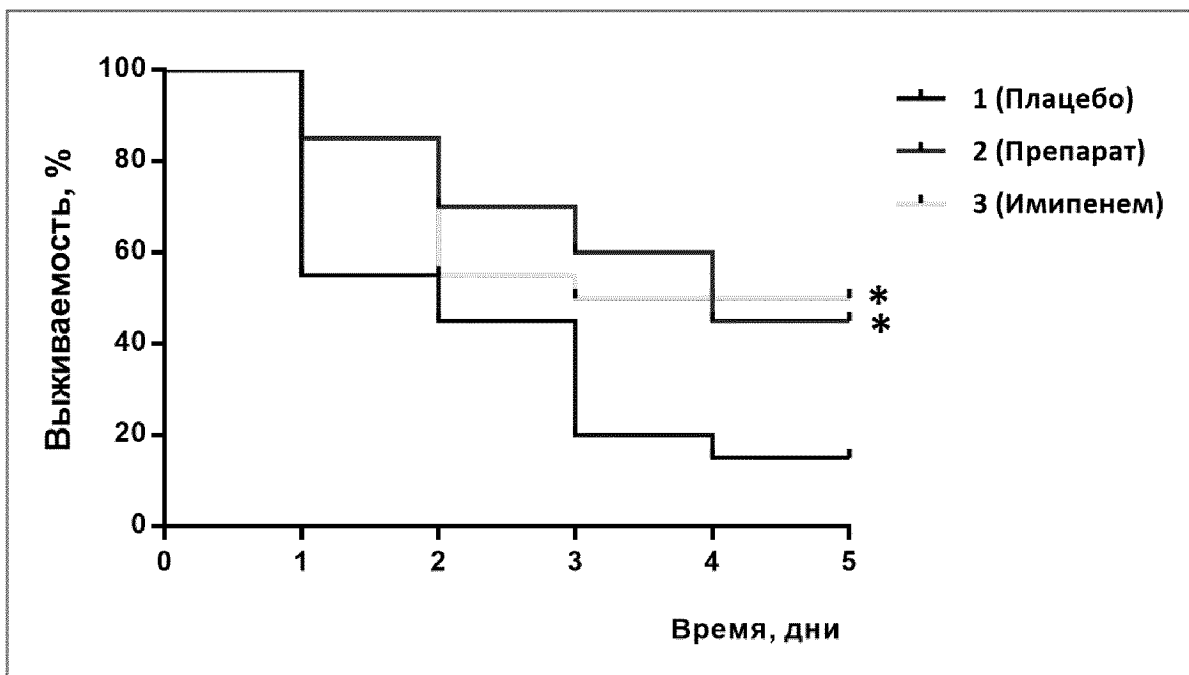


Фиг. 17.

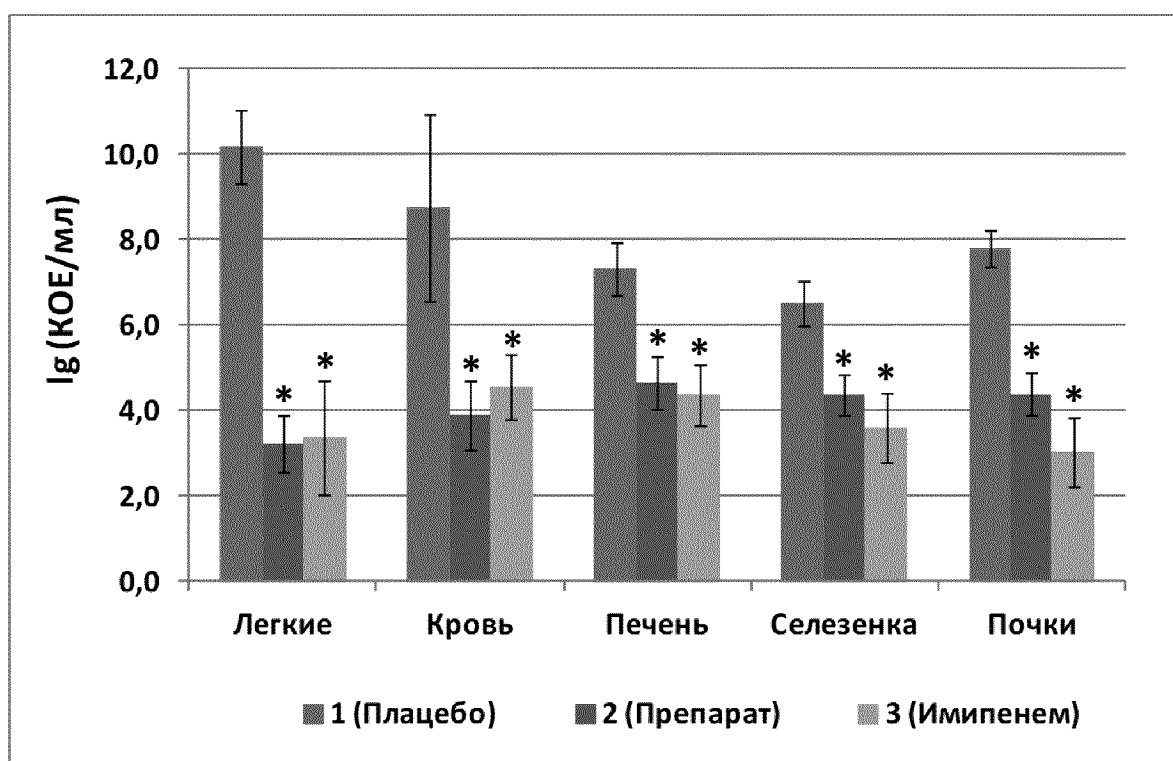


Фиг. 18.

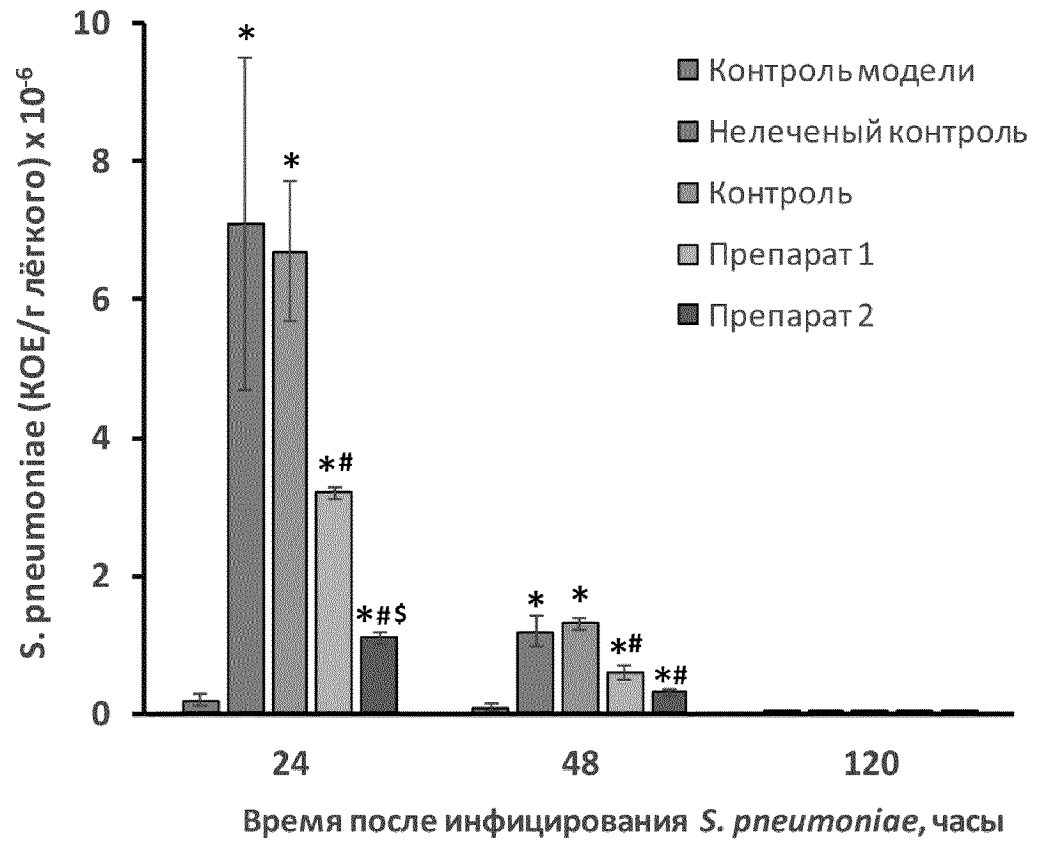




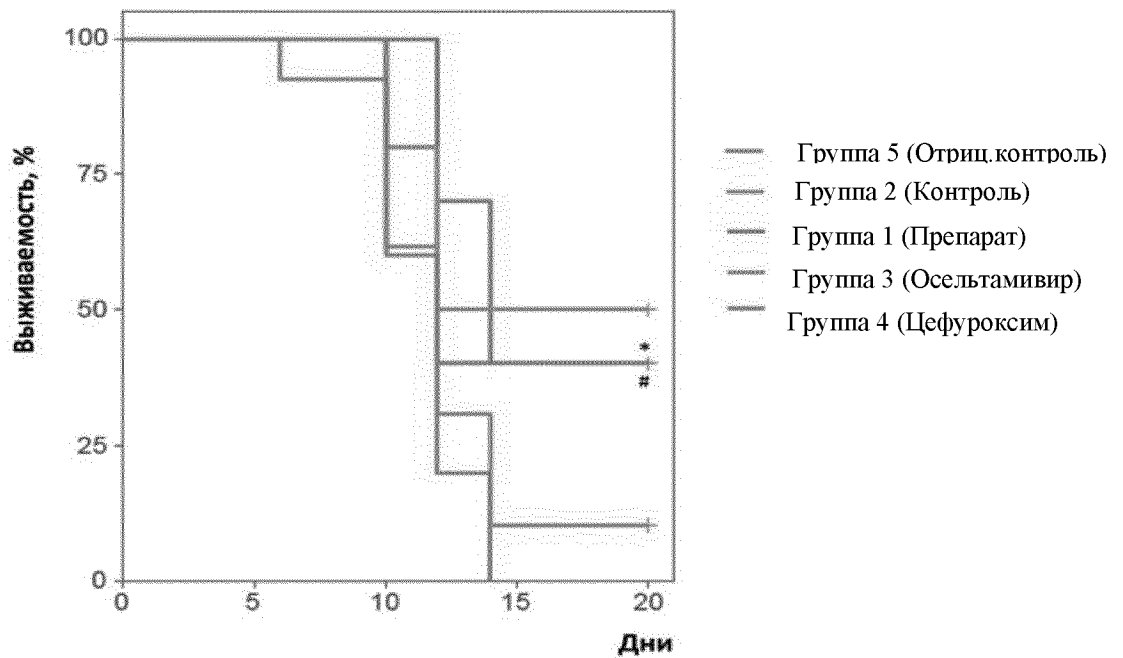
Фиг. 19.



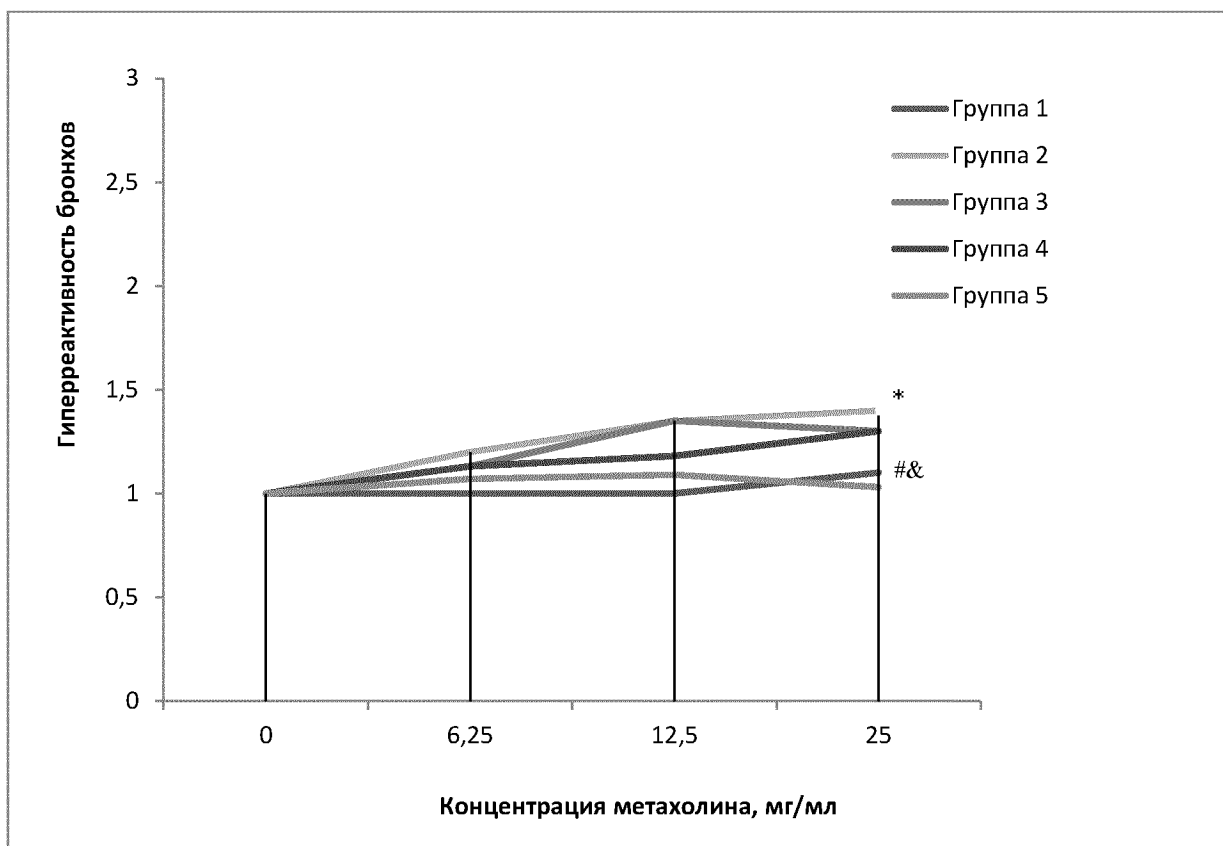
Фиг. 20.



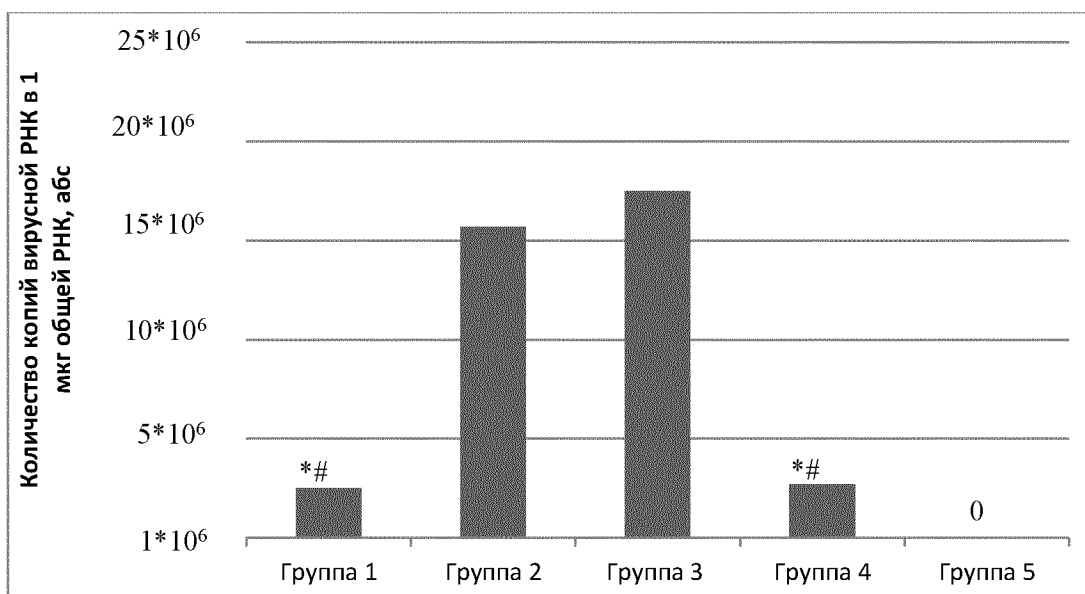
Фиг. 21.



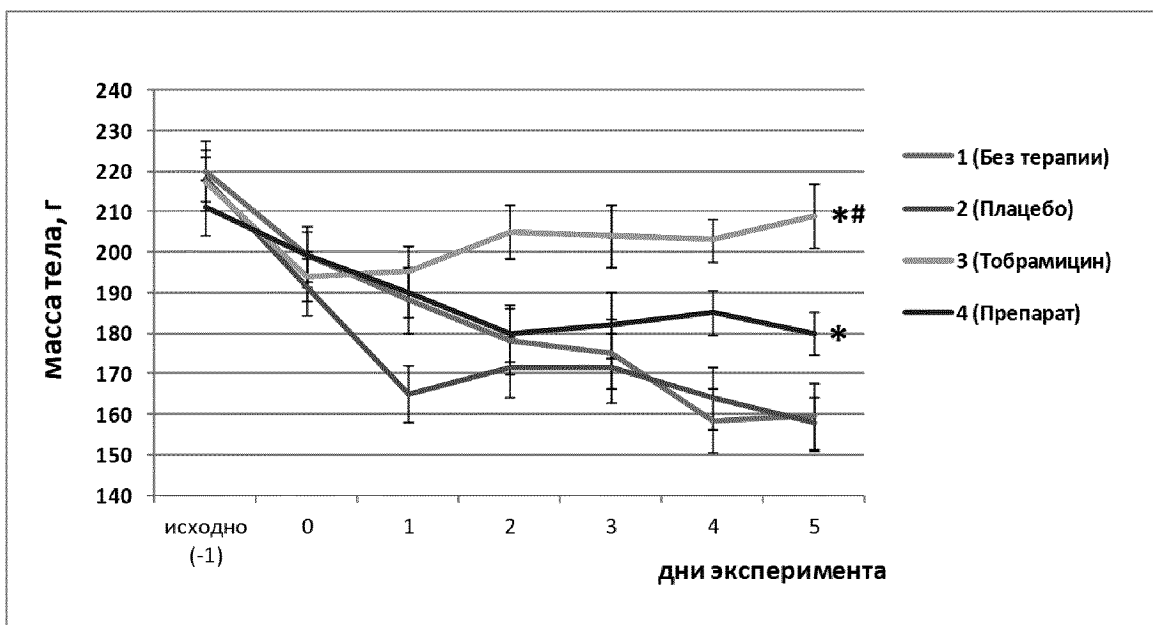
Фиг.22



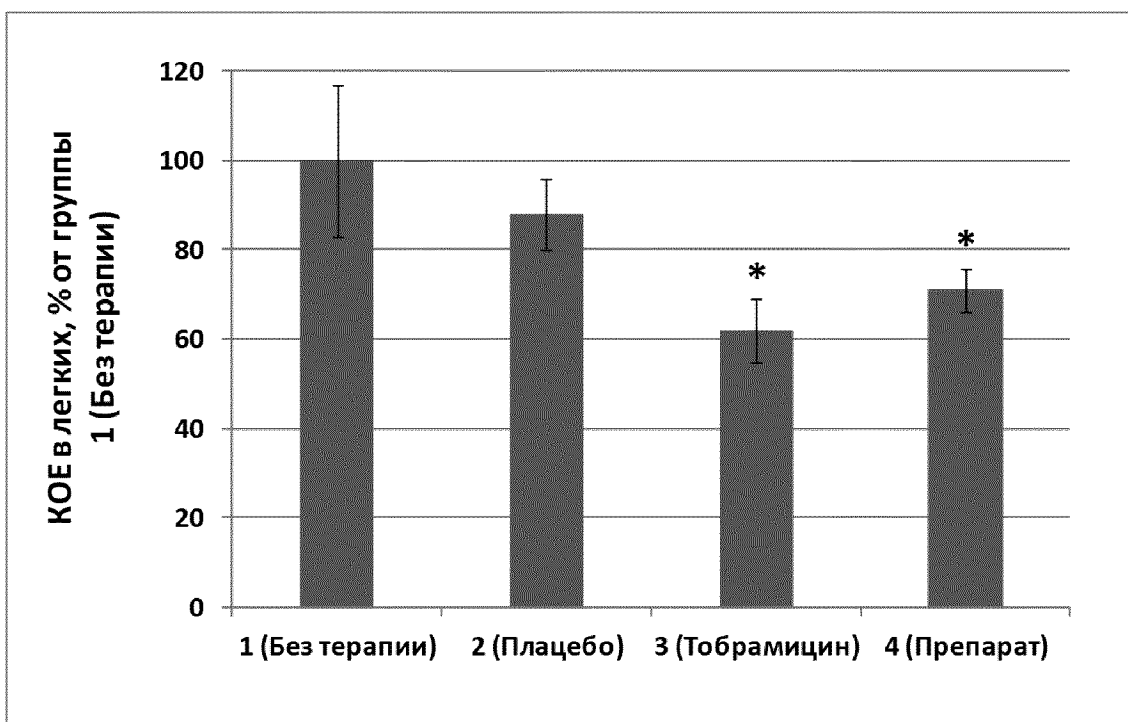
Фиг.23.



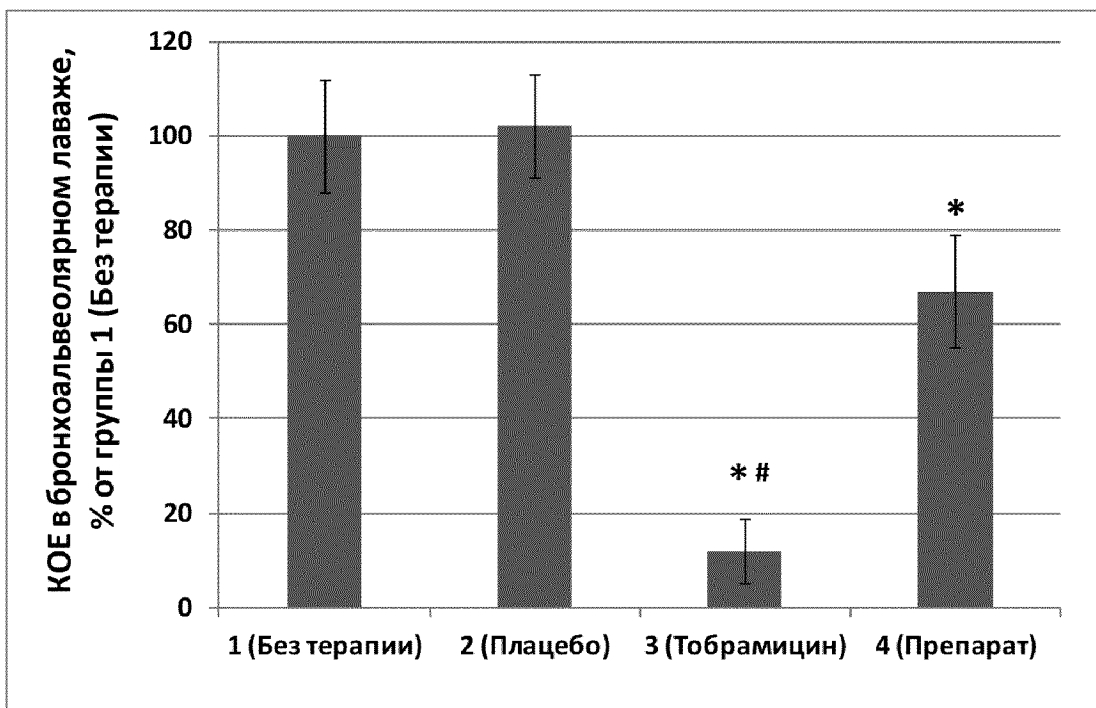
Фиг.24.



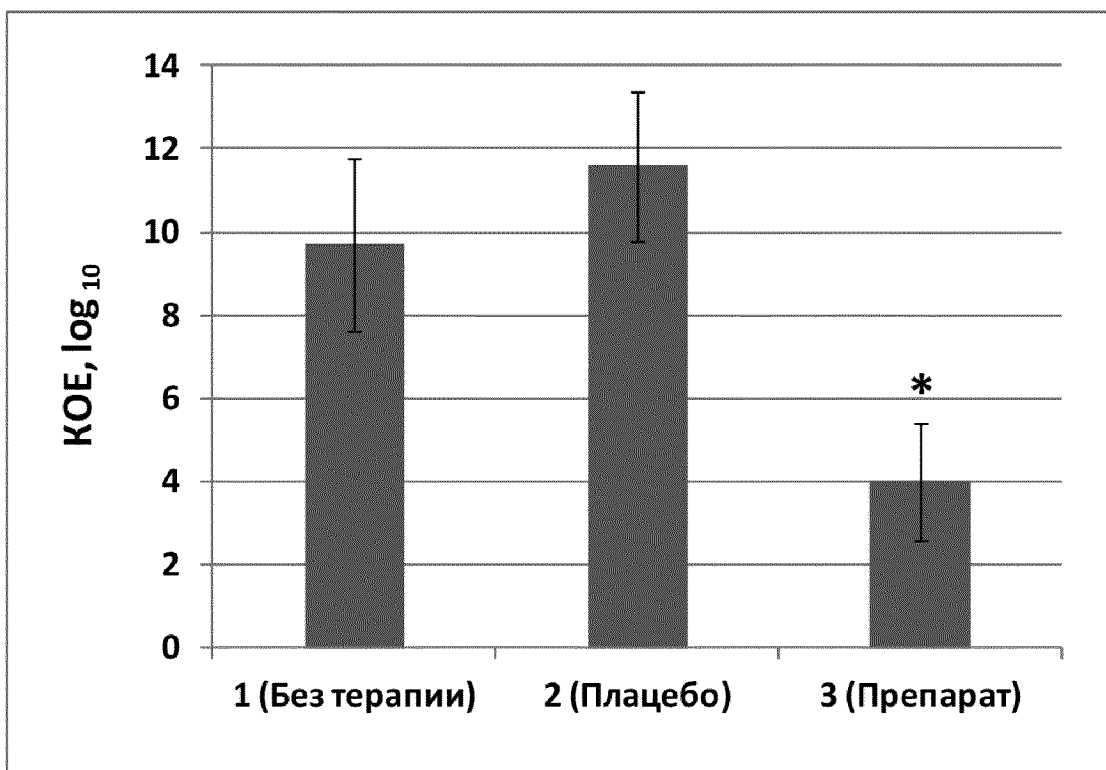
Фиг. 25.



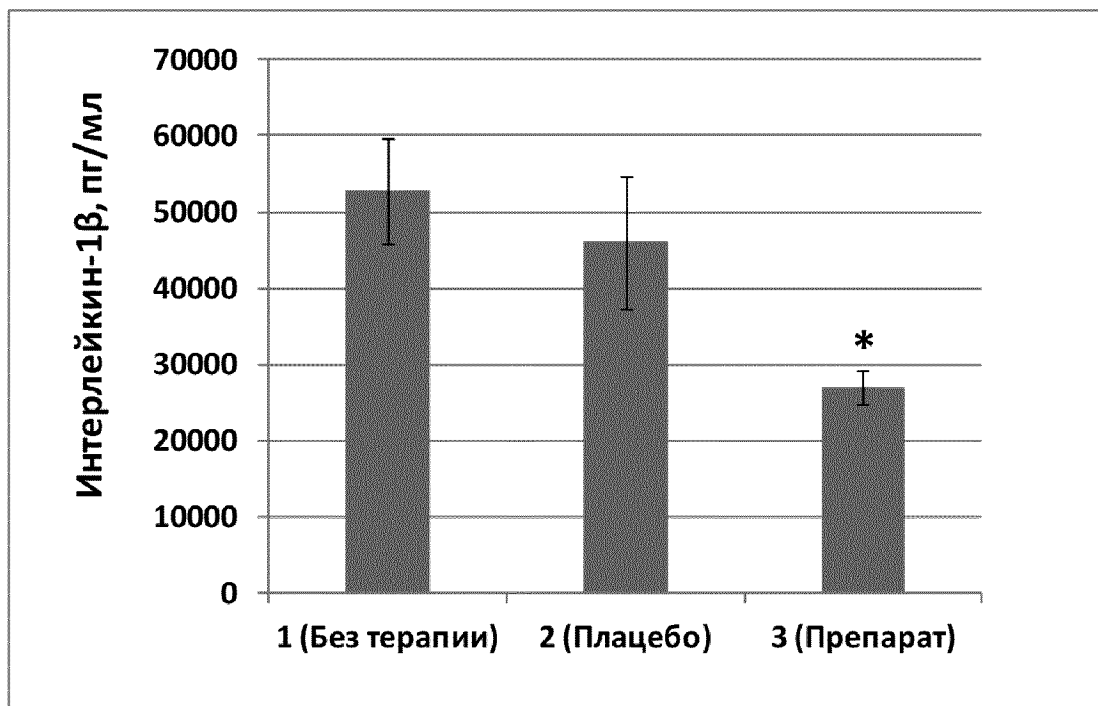
Фиг. 26.



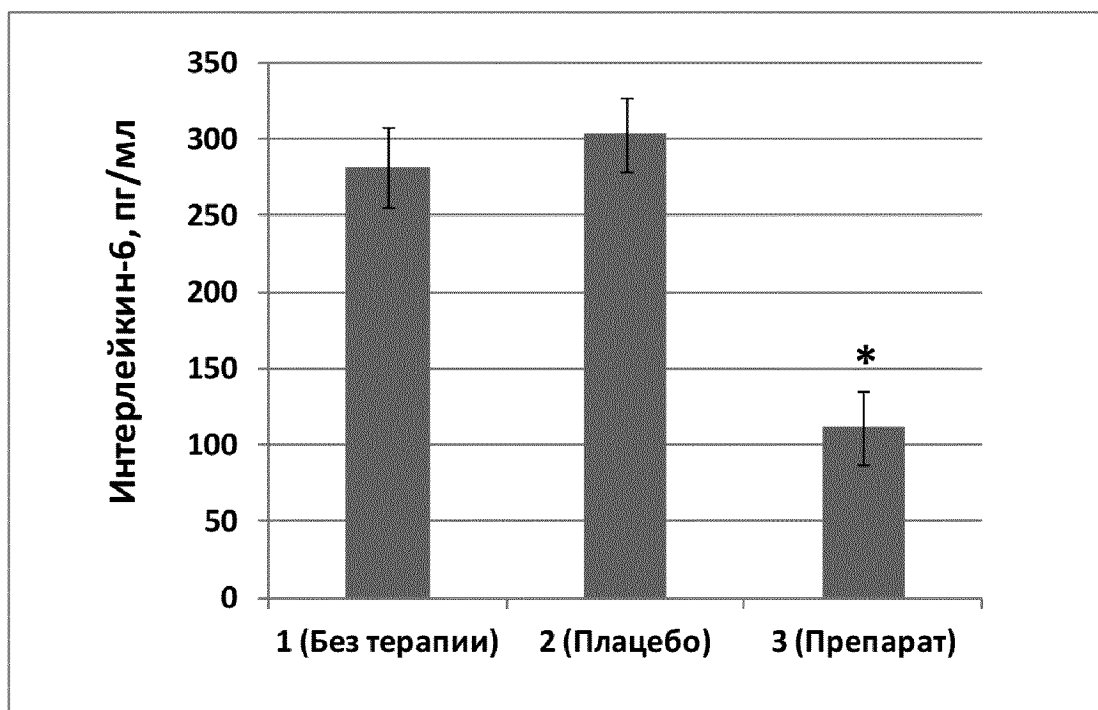
Фиг. 27.



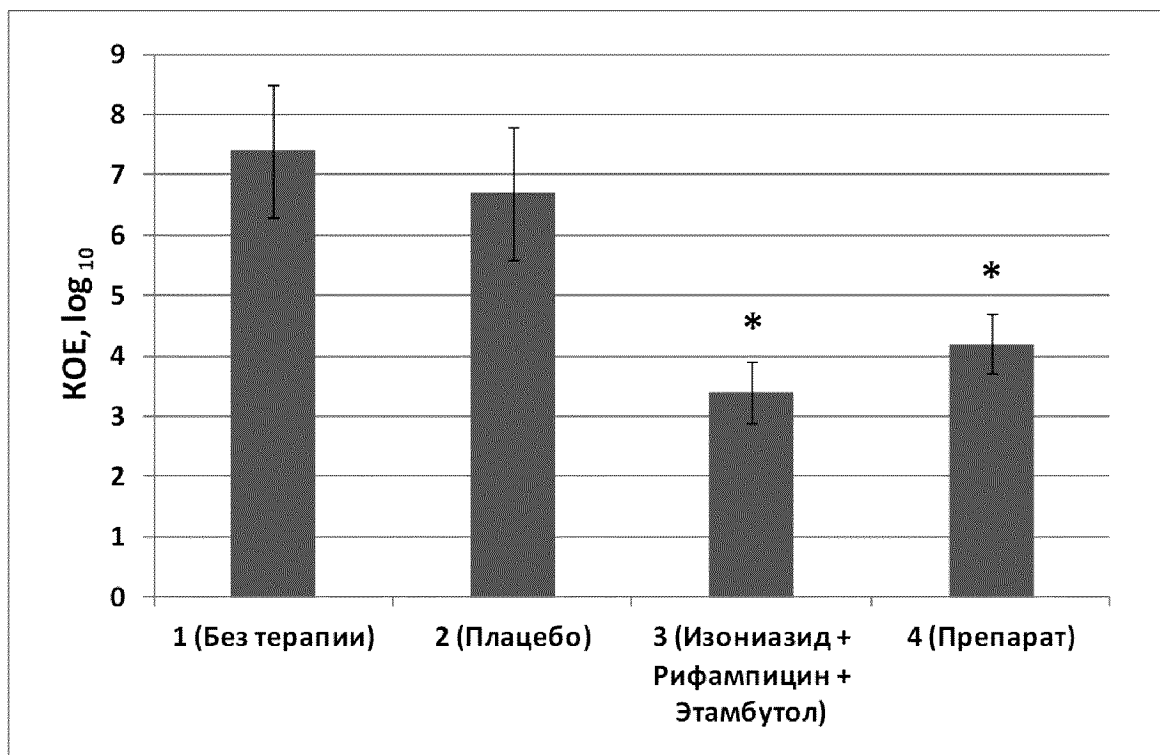
Фиг. 28.



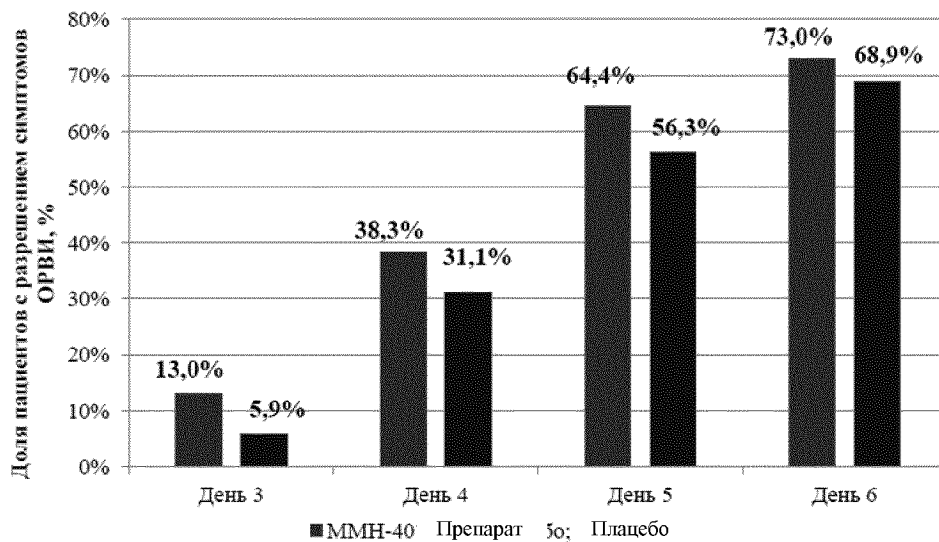
Фиг. 29.



Фиг. 30.



Фиг. 31.



Фиг. 32