



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **80201**

(13) **U**

(51) МПК

A61P 31/12 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **а 2012 09626**

(22) Дата подання заявки: **08.08.2012**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **27.05.2013**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **27.05.2013, Бюл.№ 10**

(72) Винахідник(и):

Желдак Людмила Дмитрівна (UA)

(73) Власник(и):

Знак Валерій Михайлович,
вул. Ф. Пушиної, 2, кв. 105, м. Київ, 03115
(UA)

(54) ПРОТИВІРУСНИЙ ЗАСІБ "ТРИЛУМІН"

(57) Реферат:

Противірусний засіб, що містить продукт культивування *Bacillus subtilis*, крім того як продукт культивування *Bacillus subtilis* містить екстракт штаму *Bacillus subtilis* IMB B-7321, депонований в Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології НАН України, білковий компонент крові великої рогатої худоби, коней чи кролів, та допоміжні агенти, при наступному співвідношенні складових, мас. %:

екстракт штаму *Bacillus subtilis* 0,1-99,9
IMB B-7321

білковий компоненти крові
великої рогатої худоби, коней чи 0,1-99,9
кролів

ізотонічний агент 0,5-1,5

вода для ін'єкції решта.

UA 80201 U

Корисна модель стосується противірусного засобу для потреб медицини та ветеринарії, який може бути застосований при лікуванні інфекційних захворювань.

Доведено, що штами *Bacillus subtilis* зовсім не шкідливі для людини та тварин.

Відсутність патогенності у штамів *Bacillus subtilis* дало підставу для присвоєння їм
5 Управлінням за контролем якості продовольчих і лікувальних засобів США статусу GRAS (generally regarded as safe) - безпечних організмів (Харвуд К., Бациллы генетика и биотехнология: Пер. с англ / К. Харвуд. М.: Мир, 1992).

Механізми лікувальної дії мікробних культур, що отримані із *Bacillus subtilis* широко вивчалися нами в експериментах на тваринах та *in vitro*.

10 Лікувальний ефект визначається комплексом факторів, до яких відносять: продукування культурами *Bacillus subtilis* бактеріоцинів, що пригнічують ріст патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів; утворення високоактивних ферментів: протеаз, рибонуклеаз, трансаміназ та інших; продукування субстанцій, що нейтралізують бактеріальні токсини (Слабоспицкая А.Т., Крымовская С.С., Резник С.Р. Ферментативная активность бацилл, перспективных для
15 включения в состав биопрепаратов // Микробиологический журнал - 1990. - Т. 52. - № 2. - С. 9-14.; Смирнов В.В., Резник С.Р., Волюнец А.К., Вьюницкая В.А. Влияние перорального введения бактерий рода *Bacillus* на фагоцитарную активность лейкоцитов крови кролика // Микробиологический журнал - 1982 - Т. 44. - № 4. - С. 51-54.; Смирнов В.В., Резник С.Р., Слабоспицкая А.Т. Некоторые биологические свойства бактерий рода *Bacillus*, выделенных из
20 организма людей // Микробиологический журнал - 1985 - Т. 47. - № 3. - С. 53-59; Смирнов В.В., Резник С.Р., Сорокулова И.Б., Петренко В.А., Ильичев А.А., Белявская В.А. и др. Патент РФ 2035185 Профилактический биопрепарат субалин. Заявка 5025233/13/005316 от 6.07.92).

Антагоністична дія вищеназваних бацилл здійснюється за рахунок продукування різних по походженню біологічно-активних речовин: поліпептидних антибіотиків, лізоциму, літичних і
25 протеолітичних ферментів (Слабоспицкая А.Т., Крымовская С.С., Резник С.Р. Ферментативная активность бацилл, перспективных для включения в состав биопрепаратов // Микробиологический журнал - 1990 - Т. 52 - № 2. - С. 9-14.; Смирнов В.В., Резник С.Р., Вьюницкая В.Н., Сорокулова И.Б. Современные представления о механизме лечебно-профилактического действия пробиотиков из бактерий рода *Bacillus* II Микробиол. Журнал -
30 1993. - т. 55. - № 4-С. 91-111.; Смирнов В.В., Резник С.Р., Волюнец А.К., Вьюницкая В.А. Влияние перорального введения бактерий рода *Bacillus* на фагоцитарную активность лейкоцитов крови кролика // Микробиологический журнал - 1982. - Т. 44. - № 4. - с. 51-54.; Смирнов В.В., Резник С.Р., Слабоспицкая А.Т. Некоторые биологические свойства бактерий рода *Bacillus*, выделенных из организма людей // Микробиологический журнал - 1985 - Т.47. - №
35 3. - С. 53-59.; Смирнов В.В., Резник С.Р., Сорокулова И.Б., Петренко В.А., Ильичев А.А., Белявская В.А. и др. Патент РФ 2035185 Профилактический биопрепарат субалин. Заявка 5025233/13/005316 от 6.07.92.)

Найкраще вивченим антибіотиком із *Bacillus subtilis* є субтілін з м.в. 3,2 кД. Він складається із трьох поліпептидів - субтілінів А, В і С. Субтілін пригнічує ріст грампозитивних бактерій -
40 стафілококів, стрептококів, туберкульозних паличок та низку інших бактерій, а також патогенних грибів, дріжджів, амєб (Слабоспицкая А.Т., Крымовская С.С., Резник С.Р. Ферментативная активность бацилл, перспективных для включения в состав биопрепаратов // Микробиологический журнал - 1990. - Т. 52. - № 2 - с. 9-14.; Смирнов В.В., Резник С.Р., Волюнец А.К., Вьюницкая В.А. Влияние перорального введения бактерий рода *Bacillus* на фагоцитарную
45 активность лейкоцитов крови кролика // Микробиологический журнал - 1982. - Т. 44. - № 4. - С. 51-54.; Смирнов В.В., Резник С.Р., Слабоспицкая А.Т. Некоторые биологические свойства бактерий рода *Bacillus*, выделенных из организма людей // Микробиологический журнал - 1985 - Т. 47. - № 3. - С. 53-59.; Смирнов В.В., Резник С.Р., Сорокулова И.Б., Петренко В.А., Ильичев А.А., Белявская В.А. и др. Патент РФ 2035185 Профилактический биопрепарат субалин. Заявка
50 5025233/13/005316 от 6.07.92.)

Більшість антибіотиків, що утворюються бактеріями роду *Bacillus*, такі як: субтілізин, бацилін, субтенолін, бациліпіни, глобіцин та ін. - активні проти всіх груп мікроорганізмів. Антибіотики, що утворюються *Bacillus* і є пептидами, мають значно меншу масу, ніж білки - від
55 270 Д (бацилізин) до 4500 Д (ліхеніформін). У більшості випадків штами-продуценти утворюють одночасно декілька антибіотичних речовин, які відрізняються одне від одного невеликою кількістю амінокислотних залишків.

Розмножуючись, бактерії роду *Bacillus subtilis* виробляють ферменти протеази, які активно лізують усі непритаманні організму ссавців білки, денатуровані білки і нуклеопротеїди. При
60 цьому знищуються бактерійні токсини, елементи пухлинних утворень та інші дефектні клітини.

Наприклад, відомий лікарський засіб "Спорофтивин", одержаний на основі *Bacillus subtilis* "МЖ-6", що використовується для лікування туберкульозу (заявка РФ RU2008146415, опуб. 27.05.2010, А61К 39/07).

Недоліком запропонованого препарату є його нестійкість, слабка дія і обмежений спектр застосування.

Відомий лікарський засіб для лікування хворих, уражених гепатитом С, що містить як активну речовину позаклітинний сіалоспецифічний лектин сапрофітного штаму *Bacillus subtilis* В-7014 в концентрації 10,0-125,0 мкг/мл (патент України UA83305, опуб. 25.06.2008, С12Р 19/04).

Недоліком запропонованого лікарського препарату є його недостатня активність та обмежений спектр застосування.

Також відомий комплексний лікувально-профілактичний препарат для тваринництва на основі гідролізату білків крові, що містить живу біомасу *Bacillus subtilis* та гідролізат крові великої рогатої худоби (заявка РФ RU2006119375, опуб. 27.12.2007, А61К 35/14).

Недоліком запропонованого комплексного лікувально-профілактичного препарату є недостатнє вивчення лікувальних властивостей щодо людей і обмежений спектр застосування.

Тому в основу корисної моделі було поставлено задачу одержати малотоксичний препарат на основі *Bacillus subtilis* з високою противірусною активністю широкого спектру дії та з імуностимулюючими властивостями, що не втрачав би своєї активності тривалий час та знайшов би застосування як в медицині, так і ветеринарії. З метою підвищення ефективності ферментних і антибіотичних властивостей активних речовин з культур *Bacillus subtilis* за рахунок виключно високої активності, було запропоновано стабілізувати актині речовини шляхом іммобілізації біологічно активних пептидів і протеїнів *Bacillus subtilis* на білкових носіях - інактивованих білкових компонентах спеціально обробленої крові великої рогатої худоби, коней чи кролів.

Поставлена задача була вирішена за рахунок використання в препараті екстракту спеціально обробленої культури *Bacillus subtilis*, штам ІМВ В-7321, що депонований в Депозитарій Інституту мікробіології і вірусології НАН України та інактивованого білкового компоненту спеціально обробленої крові великої рогатої худоби (ВРХ), коней чи кролів, що забезпечує підсилення активності активних речовин екстракту культури *Bacillus subtilis*, штам ІМВ В-7321, та збільшує термін дії цього засобу.

Розроблений препарат отримав назву "Трилумін".

Тому, об'єктом корисної моделі є противірусний засіб "Трилумін", що містить продукт культивування *Bacillus subtilis*, який як продукт культивування *Bacillus subtilis* містить екстракт штаму *Bacillus subtilis* ІМВ В-7321, депонований в Депозитарій Інституту мікробіології і вірусології НАН України, білковий компонент крові великої рогатої худоби, коней чи кролів, та допоміжні агенти, при наступному співвідношенні складових, мас. %:

екстракт штаму <i>Bacillus subtilis</i> ІМВ В-7321	0,1-99,9
білковий компоненти крові великої рогатої худоби, коней чи кролів	0,1-99,9
ізотонічний агент	0,5-1,5
вода для ін'єкції	решта.

В переважному втіленні корисної моделі противірусний засіб "Трилумін" як ізотонічний агент містить хлорид натрію.

В найбільш переважному втіленні противірусний засіб "Трилумін" має наступне співвідношення складових, мас. %:

екстракт штаму <i>Bacillus subtilis</i> ІМВ В-7321	1
білковий компоненти крові великої рогатої худоби, коней чи кролів	5
хлорид натрію	0,9
вода для ін'єкції	решта.

Для іммобілізації терапевтичних ферментів, пептидних антибіотиків та інших біологічно активних протеїнів (БАП), що отримані із *Bacillus subtilis*, вперше нами була застосована інактивована спеціально оброблена кров великої рогатої худоби.

В світовій практиці використовують різні носії для транспортування активних лікарських засобів до місця локалізації вражених органів чи тканин.

Суть корисної моделі пояснюється тим, що при проведенні порівняльного аналізу дії нативних БАП *Bacillus subtilis* і БАП *Bacillus subtilis* імобілізованих на білкових носіях - інактивованих компонентах спеціально обробленої крові великої рогатої худоби, коней чи кролів було доведено, що лікувальний ефект відбувається принаймні вдвічі швидше з використанням

БАП з такими білковими носіями в експериментах на тваринах та *in vitro*.
Вдосконалено і запропоновано методику кон'югації молекул лікарських препаратів, які забезпечують одну або декілька необхідних лікувальних властивостей. Препарати, що отримані шляхом зв'язування ферменту - протеаза, пептидних антибіотиків - субтілінів та деяких інших біологічно активних речовин із *Bacillus subtilis* з білковим носієм - інактивованими компонентами спеціально обробленої крові великої рогатої худоби, мають значно довший час напівжиття *in vivo* і *in vitro*, ніж без такого, а також мають ще більш покращені властивості відносно здатності до утворення гомогенних молекул, мають покращену стійкість до протеолізу та підвищену біологічну доступність.

Таким чином, кон'югати даної корисної моделі являють низку переваг, а саме: довший проміжок часу між ін'єкціями або іншими формами введення та слабшу побічну дію.

Імобілізація біологічно активних протеїнів стерильної культуральної рідини *Bacillus subtilis* на білкових компонентах (носіях) - інактивованої спеціально обробленої крові великої рогатої худоби дозволяє отримувати більш стабільні, активні і безпечні терапевтичні препарати.

Оригінальні методи, що відпрацьовані нами при імобілізації біологічно активних протеїнів з екстракту стерильної культуральної рідини *Bacillus subtilis* з білковими носіями із спеціально обробленої крові великої рогатої худоби, використані при розробці і виробництві нового оригінального ефективного противірусного препарату "Трилумін" для потреб медицини та ветеринарії і можуть бути застосовані для лікування і профілактики інфекційних хвороб та захворювань, що пов'язані з імунодефіцитним станом.

Суть корисної моделі пояснюється наступними прикладами:

Спосіб отримання препарату "Трилумін" включає наступні технологічні стадії:

Стадія 1. Одержання екстракту *Bacillus subtilis* IMB B-7321

- культивування штаму *Bacillus subtilis* IMB B-7321 на поживному середовищі, що включає в своєму складі моногідрат глюкози, дріжджовий екстракт, сухе поживне середовища "Tryptone water" та воду для ін'єкцій у відповідному співвідношенні;

- температурно-проточно-ультразвукова обробка бактеріальної культури, з отриманням унікальних за складом біологічно активних сполук, що мають максимально ефективні лікувальні властивості;

- тангенційна (розділова на фракції ультрафільтраційна обробка та фінішна стерилізуюча фільтрація (0,22 нм) бактеріальної культури *Bacillus Subtilis*.

Стадія 2. Одержання стерильного фільтрату білкового компонента спеціально обробленої крові великої рогатої худоби, коней чи кролів.

З цією метою проводять осадження еритроцитарної маси (відокремлення плазми з лейкоцитарним шаром); позбавлення специфічних властивостей альбуміну і деяких інших білків крові за допомогою температурного впливу (50 °C протягом 30 хвилин у водяній бані) на плазму з подальшою її інактивацією УФ-випромінюванням; виділення лейкоцитарних клітин та їх дезінтеграція ультразвуком і поєднання отриманих білкових сполук у відповідному співвідношенні.

Стадія 3. Одержання препарату "Трилумін"

Проводять одержання препарату "Трилумін" шляхом об'єднання композиційних компонентів - екстракту спеціально обробленої культури *Bacillus Subtilis* та білковими компонентами спеціально обробленої крові великої рогатої худоби, коней чи кролів

Вплив препарату Трилумін на вірус гепатиту С (ВГС) з використанням моделі продукуючої культури MT-4 кДНК. Результати впливу показані в таблиці 1.

Таблиця 1

Вплив препарату Трилумін на експресію ВГС

Вплив препаратів	РНК коп/мл	% інгібування
Трилумін	1041	73,5
Контроль вірусу	4058	-

Аналізуючи приведені дані, слід відмітити, що при вивченні інгібувальної дії препарату Трилумін на моделях продукуючої ВГС культури МТ-4 кДНК виявило його інгібувальну активність на експресію РНК ВГС при внесенні препарату на 73,5 %.

5 Дослідження впливу препарату Трилумін на мітотичний режим клітин, продукуючих вірус папіломи людини (ВПЛ-16)

Основними маркерами репродукції вірусу папіломи є вірусне навантаження в полімеразній ланцюговій реакції (ПЛР) та проліферативна активність вірусу, яка визначається за мітотичним індексом.

10 Дослідження по визначенню проліферативної активності препарату Трилумін проводили в культурі ВНК (перещеплювані клітини нирки хом'яка), яка продукує вірус папіломи людини-16. Клітини оброблювали препаратом Трилумін в розведенні 1:10. Контролями слугували: інтактні клітини; клітини, продукуючі ВПЛ-16; клітини, оброблені лише Трилуміном.

15 Клітини ВНК, які були вирощені на покривних скельцях, були оброблені за вищенаведеною схемою. Через 24 години готували цитологічні препарати. Аналіз пошкоджень проводили за класифікацією В.Н. Блюмкіна.

Дослідження цитологічних препаратів проводили при об'єктивах x40 і x100, окулярі x10 в мікроскопі Standard 20, Zeiss.

Результати проведеного дослідження наведені в Табл. 2.

Таблиця 2

Вивчення впливу препарату Трилумін на мітотичний режим клітин ВНК, продукуючих вірус папіломи людини (ВПЛ-16)

Вплив на клітини	Мітотична активність, (%)	Патологічні мітози (%)
Трилумін	8,5±0,5	10,0±3,0
Вірус папіломи людини	13,5±0,6	26,5±4,3
Інтактні клітини	7,9±0,4	8,9±2,8
Вірус папіломи людини + Трилумін	8,9±0,5	10,4±3,1

20

В культурі ВНК, що продукує вірус папіломи людини показник мітотичного індексу достовірно (у порівнянні з інтактними та обробленими Трилуміном клітинами) підвищився до 13,5±0,6 % (t=5,5). Відсоток аномальних мітозів перевищив майже вдвічі показники вищенаведених контрольних груп і складав 26,5±4,3 %, вони були представлені багатополіусними мітозами; тригруповими метафазами; асиметричними мітозами; порожніми метафазами, також зустрічалися пошкодження хромосом (відставання хромосом при розходженні до полюсів).

25

При обробці клітин, продукуючих ВПЛ-16 Трилуміном, були встановлені такі показники: мітотична активність - 8,9±0,5 % - що відповідало показникам у інтактних клітин та клітин, оброблених лише Трилуміном. Кількість патологічних форм мітозів реєструвалася на рівні показників контрольних груп.

30

Таким чином, встановлено, що препарат Трилумін не має проліферативної здатності і пригнічує цей показник клітин, продукуючих ВПЛ-16.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

35

1. Протівірусний засіб, що містить продукт культивування *Bacillus subtilis*, який **відрізняється** тим, що як продукт культивування *Bacillus subtilis* містить екстракт штаму *Bacillus subtilis* IMB B-7321, депонований в Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології НАН України, білковий компонент крові великої рогатої худоби, коней чи кролів, та допоміжні агенти, при наступному співвідношенні складових, мас. %:

40

екстракт штаму *Bacillus subtilis* 0,1-99,9
IMB B-7321

білковий компоненти крові
великої рогатої худоби, коней чи
кролів 0,1-99,9

ізотонічний агент 0,5-1,5

вода для ін'єкції решта.

2. Протівірусний засіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що як ізотонічний агент містить хлорид натрію.

3. Противірусний засіб за п. 1, 2, який **відрізняється** тим, що має наступне співвідношення складових, мас. %:

екстракт штаму <i>Bacillus subtilis</i> , IMB B-7321	1
білковий компоненти крові великої рогатої худоби, коней чи кролів	5
хлорид натрію	0,9
вода для ін'єкції	решта.

Комп'ютерна верстка І. Скворцова

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601