

关于治疗或预防病毒感染的药剂研发

与该药剂相关的技术领域发明

该发明涉及农业，药物，兽医学和生物技术等方面，更具体用于预防和治疗农场牲畜及蜂类病毒引发的疾病。

技术水平

牲畜家禽的养殖集约化向商业化的转移往往伴随着病毒性动物疾病的传播。众所周知，呼吸道病原体主要是流感病毒，副流感病毒，传染性鼻气管炎病毒，腺病毒，肠道病毒及疱疹病毒等，细菌感染次之。呼吸道病毒性疾病对牲畜家禽养殖造成了巨大的经济损失，导致农场的经济效益滑坡不低于30-40%。

在养蜂业中，由病毒性疾病（急性和慢性麻痹，丝虫病，囊状卵，埃及病毒）造成的经济损失达20-80%。

在该情况下，用于预防和治疗病毒及病因的一系列方法非常有限，以至于研发出预防牲畜家禽养殖过程中引发的病毒性疾病的解决方案迫在眉睫。

研发过程

该发明是研发另一种抗病毒的接触作用，可替代类似药物之功效，（参考案例：俄罗斯联邦专利No.No.2423136和2038776），同时，由于自然界中酶的性质不同，其作用可能更具优势，究其来源，例如，消除对已知药剂的过敏反应和干扰反应，对某些类型病毒的活性可能存在着更显著的作用，克服病毒对已知药物的抗性会持续更长时间，若药剂使用，已知药剂的作用会相应增强。

据此，在该发明的第一方面便提供了保藏在全俄微生物保藏中心，其编号为VKM B-2931D的细菌菌株*Serratiamarcescens* M-10中。

在发明的第二方面提供了从上述细菌菌株中分离的酶。

上述提到的酶包括：

- 内切核酸酶和/或
- 核糖核酸酶和/或
- 脱氧核糖核酸酶和/或
- 脂肪酶和/或

- 蛋白酶。

上述提到的酶可以各种方式从培养液或细胞匀浆中分离，特别是通过尺寸排阻色谱。

在发明的第三方面提供了一种用于治疗或预防病毒感染的合剂，其特征在于，它含有条款三中大量有效的内切核酸酶或具有与其同源的氨基酸残基序列至少95%的内切核酸酶。

此外，通过一系列特别优选的实施形式的实例，说明了以一般类别为特征的上述合剂保证了额外的益处。

以及在个别形式中，上述有效量是10-300mg内切核酸酶，活性为150-40万单位活性（e.a.）/ 1g

在另一个别形式中，还包含活性为500-4500e.a.的核糖核酸酶（核糖核酸酶），从上述细菌菌株中优选分离，其量为每1g 中2-4mg。

在另一个别形式中，合剂还包含活性为1000-8100e.a.的脱氧核糖核酸酶（DNase）。从上述细菌菌株中优选分离，每1g中2-5mg。

在某种个别形式中还存在含有药剂包含活性为0.01-0.06 e.a.的蛋白酶，从上述细菌菌株中优选分离，其量为每1g中 0.1-0.3mg。

在该药剂的另一种特定形式中，该药剂还包括活性为0.5-4.0mE e.a.的脂肪酶，从上述细菌菌株中优选分离，每1g中0.05-0.2mg。

在该药剂的另一种特定形式中，该药剂还包含 1g中300mg-620mg的硫酸镁。

在该药剂的一种特定形式中，该药剂还包含约100-500mg葡聚糖，优选约180mg / g。

在该药剂的另一种特定形式中，包含2-7条中10-350mg / g的酶，同样硫酸镁数量为0.1-0.62g及任选的辅助剂，包括如旋糖酐等。

在另一种特定形式中药剂含有以下成分，按1g计算：

核酸内切酶细菌活性15-40万e.a. 10-350mg，

活性核糖核酸酶500-4500 e.a. 2-4mg，

活性脱氧核糖核酸酶1000-8100 e. a. 2-5mg,

蛋白酶活性为0.01-0.06 e.0.1-0.3mg,

脂肪酶活性为0.5-4 me 0.05-0.2 mg,

硫酸镁100-620mg,

右旋糖酐及其它。

在某种形式中, 通过干燥冷冻缓冲的溶液获得药剂。

在该特定形式中, 在冷冻干燥之前, 向其加入选自葡萄糖, 山梨糖醇, 甘露糖醇, 甘露糖, 蔗糖及其混合物的冷冻保护剂。

在发明的第四方面提供了以预防或治疗动物病毒性疾病的溶液形式, 其使用参考条款9-20中任一项。

在上述特定用途中指出, 通过将不含硫酸镁的干燥混合物溶解在含有硫酸镁的溶液中, 或者将硫酸镁加入到不含硫酸镁的上述溶液中来制备上述药剂。

在另一特定形式中, 将所述药物溶液作为饲料添加剂加到动物饲料中。

在另一特定使用形式中, 所述溶液用于局部, 鼻内或以喷雾形式用作气溶胶。

在特定形式中, 病毒性疾病由支气管肺炎和病毒病原体结合, 优选于鼻气管炎, 呼吸道合胞病毒感染, 副流感病毒-

3, 病毒感染1类及2类腺病毒感染的结合。

在该特定形式对药剂的应用中, 病毒性疾病是禽类病毒疾病, 优选于禽传染性喉气管炎, 新城疾病及肠道病毒感染。

在某种特定形式下使用, 将预防并减少幼鸡的病毒压力。

在特定形式下使用, 病毒性疾病是蜜蜂引起的病毒性疾病, 优选包括急性和慢性麻痹, 丝状体病, 囊状扩散和埃及性病。

在该形式下使用药剂, 并进行预防, 有助于春夏季刺激蜂群的发育。

在以下部分和具体实例中解释该发明的实用性, 不应将其理解为限制法律保护的范围。

研发实施

针对所选药剂进行的试验，每1g干物质含有从保藏在All-Russian Collection of Microorganisms No.VKM B-2931D中的*Serratiamarcescens* M-10菌株分离的酶复合物，包括内切核酸酶，核糖核酸酶，脱氧核糖核酸酶，蛋白酶和脂肪酶，共含10-350mg的量，其中硫酸镁的量为0.1-0.62g，以及辅助剂 - 葡聚糖的量为180mg。

药剂中最活跃的抗病毒成分是内切核酸酶，而其余的酶会增强其作用，特别是通过参与破坏病毒或衣壳蛋白的脂质包膜，同时加速核酸的进一步降解。

通过其特性，该内切核酸酶是非特异性酶细胞外的DNA / RNA，因此对含有DNA和RNA的病毒具有反抗性。

用于制备药剂的酶复合物通过培养上述*Serratiamarcescens* M-10菌株，然后从培养液中通过沉淀并干燥酶获得。

该核酸内切酶的特征在于相对DNA和RNA，其更具有极高水解活性的类似酶的顺序。核酸内切酶在Mg²⁺ +离子存在糖的5'-磷酸和3'-氧之间催化，其DNA和RNA的将进行水解切割。该酶能够以相同的效率裂解单链和双链底物，其抗病毒活性与细菌核酸内切酶通过核酸内切酶机制将核酸水解为单核苷酸，二核苷酸，三核苷酸，四核苷酸和寡核苷酸的情况有关。经受酶作用的病毒RNA和DNA失去了作为核酸和蛋白质合成基质的能力。

所述内切核酸酶被合成为具有266个氨基酸残基长度的前体蛋白和由前21个氨基酸残基组成的信号肽。该项已鉴定了具有相似生物学特性的两种主要酶同种型Sm1和Sm2。

Sm1缺少前三个N-末端氨基酸残基。Sm2（分子量26,7kiloDalton）由245个氨基酸残基组成，这是加工切割信号肽的结果。

测序后，确定上述内切核酸酶含有与下列*Serratiamarcescens* subsp基因座序列同源的序列。marcescens Db11及其部件：SMDB11_RS07495，SMDB11_RS05280，SMDB11_RS07940，SMDB11_RS07935，SMDB11_RS11830（Gene database, <http://ncbi.nlm.nih.gov>）。

酶的活性中心包括四个氨基酸残基，即Arg57，His89，Asn119和Glu127，它们彼此非常接近。

His89参与底物结合，因为它是去质子化形式，它作为碱基。

Arg57和Arg87参与催化。

Arg57参与磷酸盐切割及磷酸二酯键的定位和极化，从而稳定过渡。

Asn119参与金属离子的结合。

Glu127参与水解。镁离子结合位点位于螺旋（氨基酸残基116-135）和50-114个残基的环之间。根据任何氨基酸残基的突变，尤其是His89中的突变，导致酶活性的急剧下降。氨基酸Asn119和Arg57的置换也降低了酶的活性。

His89参与底物结合，因为它作为碱基，属于去质子化形式。

Arg57和Arg87也参与催化。

Arg57参与磷酸盐切割磷酸二酯键的定位和极化以稳定过渡态。

Asn119参与金属离子的结合，

Glu127则参与水解。镁离子结合点位于螺旋（氨基酸残基116-135）和50-114个残基两环之间。根据任何氨基酸残基的突变，尤其是His89中的突变，都会导致酶活性的急剧下降，同时，氨基酸Asn119和Arg57的置换也降低了酶的活性。

所述核糖核酸酶（核糖核酸酶）是催化RNA降解的N核酸酶。核糖核酸酶H是非特异性内切核酸酶，并且在结合二价金属离子的存在下通过水解机制催化RNA的裂解。作为核糖核酸酶H的结果，将形成5'-磷酸化产物。

上述提及的脱氧核糖核酸酶（DNase）是一种核酸酶，将催化多核苷酸单链或双链DNA的水解切割，因而形成单个核苷酸，以及在3'末端具有末端5'-磷酸和游离羟基的寡核苷酸。

再者，所提及的蛋白酶是来自水解酶类的酶，将切割氨基酸之间的肽键。其中，所研究的药剂样品中的中性蛋白酶的含量为0.01-0.06 e. a. /G，碱性-0.015-0.04 e. a. /

G. 当总蛋白水解活性单位达到1分钟的酶量在30°C时，蛋白质将形成三氯乙酸的沉淀状态，其量相当于1微摩尔酪氨酸。中性蛋白酶的蛋白水解活性的测定在7.0的反应混合物的pH下进行，碱性蛋白酶 - 9.0。

上述菌株的脂肪酶会催化不溶性脂质底物的水解。

1g研究的药剂中脂肪酶的含量为0.5-4m. e,

一个脂肪酶活性单位是在37°C下用标准TNB缓冲液处理样品1分钟后产生的酶量。

样品药剂中的硫酸镁增加了切割磷酸二酯键的酶的活性。

葡聚糖具有稳定剂和填充剂的功能，其在药剂中的量可以广泛变化。优选药剂中使用分子量为40-80千道尔顿的葡聚糖。

该药剂还含有冷冻保护剂和缓冲剂。

用于实施案例1-7中的试验的样品的特定药剂每1g干重具有以下定量：

核酸内切酶细菌活性15-40万e. a. 10-350mg,

核糖核酸酶活性500-4500 e. a 2-4mg,

DNA酶活性1000-8100 e. a 2-5mg,

蛋白酶活性为0.01-0.06 E. 0.1-0.3mg,

脂肪酶活性0.5-4 mE 0.05-0.2 mg,

硫酸镁100-620mg,

其余的是右旋糖酐。

在外观上，样品是白色至浅棕色的粉末，易溶于水，几乎不溶于有机溶剂。

在本文中，内切核酸酶的每单位活性（例如，A。）采用酶的量，使得在260°C的波长下每个光学单元的RNA或DNA水解的酸溶性产物的光密度在37°C下耗时20分钟。

已经确定该药剂显示出抗病毒活性在体内，特别是抑制鸡成纤维细胞培养物中水泡性口炎和痘苗病毒的繁殖。

该药剂在对人，动物和植物在正常分量中，对周围环境没有伤害。

例1

新城疫病毒繁殖受到影响

在药剂样品存在下培养的新城疫病毒的感染活性，浓度为50ea。浓度为100 e. a时，其浓度为9.0 lg LD50 / cm³。 - 9.5 lg LD50 / cm³。

对照病毒的感染活性为9.9 lg LD50 / cm³。

因此，浓度为100Ea的药剂，病毒的感染活性降低2.5倍。

在50e. a浓度下则降低8倍。

例2

评估鸡对传染性喉气管炎病毒（ILT）禽类的抗病毒活性

根据研发的干燥样品不含硫酸镁，其量为50,000ea。在室温下溶于300ml白开水中，向该溶液中加入0.62g硫酸镁。

根据以下方案，在体积为2立方米的气溶胶室中进行鸡的处理：

- 感染前用药物治疗1小时，
- 感染后1小时，
- 感染后24小时，
- 感染后48小时。

喷过的鸡需曝光20分钟。

家禽疾病和死亡率的动态情况见表1。

获得的结果表明，使用基于推荐剂量的酶复合物的制剂并且根据所提出的方案对鸡进行气溶胶处理可以防止感染ILT病毒，其量为10个感染剂量/ cm³（ID / cm³）。结果，服用药剂的未发现病毒感染，未服用药剂的发病率为20%。当鸡以100 ID /

cm³的剂量感染ILT病毒时，与对照亚组相比，用该制剂处理的禽类的发病率分别低了2倍——分别为40%和80%。

用药物治疗保护鸟类免于死亡：在用根据本发明的药剂治疗的亚组中，没有观察到病例，在未治疗的亚组中存在25%的病例。

例3

预防ILT禽类

在1650m

²的面积上进行针对引起ILT的病毒的药物工业测试，结果显示在表2中。

以每1m

²禽舍的15ml的比例制备工作溶液。该药剂使用冷雾发生器并以细气雾剂的形式使用。喷涂层的高度距地面至少40厘米，颗粒尺寸为5-15微米。

当在禽舍中使用该药物用于预防时，观察到死亡率降低了2.2倍，牲畜安全性增加2.95%。此外，也观察到可销售产品的平均日增重和产量的增加。

例4

针对传染性牛鼻气管炎（RTI-cattle）（属于疱疹病毒家族）的活性

在制剂存在下以50e浓度培养的IRT-牛病毒的感染活性达到6.25 lgTCD₅₀ / cm³，浓度为100 e. a. - 6.0 lgTCD₅₀ / cm³。

对照病毒的感染活性为6.75 lgTCD₅₀ / cm³。

因此，药物浓度为100e。在50e的浓度下，IRT-牛病毒的感染活性降低5-6倍。

- 3次。

例5

针对И P T-K P C in vivo的活动

在该实验中，0.5-2个月龄的小牛在7-10天内鼻内处理2次。

该药物在鼻腔中引入其溶液，在疾病的急性病程中具有预防和治疗功效。在实验组中，未观察到死亡动物（在对照组中，死亡小牛的数量平均为5%），回收

的小牛的数量为98%，对照组为12%。
因此，已经显示了药物相对于ITT-牛病毒的高效力。

例6

预防和治疗马驹呼吸道病毒病的可行性研究

在20-60天生长期的“苏联重型卡车”品种的马驹中，对JSC Plemzavod“Uchkhoz Tulinskoe”的小母牛生长的工业综合体进行了研究，并在49只驹中研究了该药物的预防效果。

其中，25只以2000ea的剂量鼻内施用药物一次，引入此剂量的药物后，动物的一般状况没有改变：体温，脉搏，呼吸率均保持在正常范围内。

动物监测小组（23只驹）的动物未接受该药物，小马驹在2个月内也未用药。

在此期间，在用核酸内切酶处理的49只驹中，7只动物中发生呼吸系统疾病（14.3%）。这些动物的疾病以相对温和的形式进行，在通常的处理后，所有的动物都恢复了。在对照组中，23只马驹中有17只从支气管肺炎中恢复（74%）。

其中，在2只小马驹中，疾病严重，它们被宰杀并送到肉类加工厂（表3）。

因此，以2000e. a的剂量单次鼻内给予20-

60天的制剂马驹，将驹呼吸道疾病的发生频率降低5倍以上，降低疾病的严重程度，从而消除强迫屠宰。

例7

预防和治疗蜜蜂病毒性疾病的可行性研究

蜜蜂群落保存在16个Dadan-

Blat框架木板床中。在实验中，使用了4组蜜蜂家族，类似于每组10个家庭：

第1组 - 用药剂气溶胶处理，每条蜂路，3次，间隔7天；

第2组 - 将药物溶于糖浆中，一天内喂食蜜蜂，3次，间隔7天；

第3组 - 用水气溶胶处理3次，间隔7天；

第4组 - 监控，无需试验。

该药物的预防和治疗效果的试验结果列于表2中。

基于酶复合物的所提出的药物在蜂群的病毒性疾病中具有预防和治疗功效。

该药物在春季使用气溶胶和糖浆来预防和治疗蜂群的病毒性疾病并刺激蜂群的发育，有助于更快地增加家庭力量和更多的育雏，这最终有助于更多的蜂蜜和蜂蜡。

表1。

感染强毒性TTI病毒后鸡的疾病和死亡动态

组，感染用	小组	感染后的天数
-------	----	--------

		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
1 10 ИД/см ³	1	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	2	0/10	0/10	0/10	0/10	26/10	26/10	26/10	26/10	26/10	26/10	26/10
2 100 ИД/см ³	1	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	46/10	46/10	46/10	46/10	46/10
	2	0/10	0/10	0/10	0/10	66/10	86/10	86/10	86/10	86/10	86/10	2π/56/ 10
3 监督	无感染	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10

备注：在分子中：n - 死亡，b - 生病；分母：10（每组鸡总数）；ID - 感染剂量。

表2。
生长肉鸡时对照和实验禽舍的结果对照表

指数	监测	经验
养殖(只)	34455	35620
每轮死亡(只)	1837	857
保存(%)	94,64	97,57
增重天数	39,4	40,5
总量(公斤)	71695	83197
日均增重 (г)	54,91	59,34
屠宰数量	32608	34757
屠宰时活量(公斤)	70547	83534,7

屠宰量 (公斤)	51693	63013,5
月出货量 (%)	73,27	75,43
副产品出货量 (%)	11,26	10,05
产品总计 (公斤)	59636	71405,4
出货量 (%)	84,5	85,48
欧洲肉鸡指标	324	362,55

表3。

该试验结果表明，该药物基于幼马呼吸道疾病中的复合酶进行预防作用

组	驹的数量	生病的驹		已淘汰	
		只	%	只	%
经验	49	7	14,28	-	-
监测	23	17	74	2	8,7

表4。

基于针对蜜蜂病毒性疾病的酶复合物和刺激蜂群的药物使用结果

药物使用图表	获得的结果
用于预防和治疗目的	1组-所有蜂群都是健康的

	在监测方案（组4）中，在5个蜂群中观察到病毒性疾病（囊状育雏）的迹象。
用于预防和治疗目的，糖浆	2组 - 所有蜂群都是健康的
用糖浆刺激蜜蜂家族的发展	在试验期间两组蜜蜂家庭的家庭成员超过对照组蜜蜂家庭的结果，按家庭数量计算增加了20.2%，育雏数量增加了58.8%，数量为30.3%蜂蜜，50%的重建蜂窝数量。
用气溶胶处理刺激蜜蜂家族的发展	.在试验期间，第1组的蜜蜂家族的结果超过对照组蜜蜂家族的指标，家庭强度为26.2%，育雏数为64.2%，蜂蜜含量为35.6%。