

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201891262** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2018.10.31

(22) Дата подачи заявки
2014.11.12

(51) Int. Cl. *A61K 31/45* (2006.01)
A61K 31/454 (2006.01)
C07D 211/88 (2006.01)
A61K 47/00 (2006.01)
A61P 37/08 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)

(54) ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ ПРОИЗВОДНЫЕ ГЛУТАРИМИДОВ, ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЭОЗИНОФИЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

(31) **2013150861**

(32) **2013.11.14**

(33) **RU**

(62) **201690798; 2014.11.12**

(71) Заявитель:

**ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
"ФАРМИНТЕРПРАЙСЕЗ" (RU)**

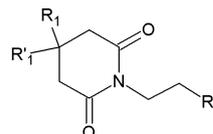
(72) Изобретатель:

**Небольсин Владимир Евгеньевич,
Кромова Татьяна Александровна,
Рыдловская Анастасия
Владимировна, Чучалин Александр
Григорьевич (RU)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к новым биологически активным производным глутаримидов общей формулы (I) или их фармацевтически приемлемым солям, их применению в качестве средств для лечения эозинофильных заболеваний, преимущественно аллергической природы, в частности бронхиальной астмы, аллергического ринита, полипозной риносинусопатии, эозинофильного колита, эозинофильного синдрома, аллергического конъюнктивита, атопического дерматита, синдрома Черджа-Стросса, анафилактического шока, отека Квинке, эозинофильного васкулита, эозинофильного эзофагита, эозинофильного гастроэнтерита, фиброзов, фармацевтическим композициям, содержащим производные глутаримидов общей формулы (I).



A1

201891262

201891262

A1

**ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ ПРОИЗВОДНЫЕ
ГЛУТАРИМИДОВ, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЭОЗИНОФИЛЬНЫХ
ЗАБОЛЕВАНИЙ**

Изобретение относится к применению биологически активных соединений производных глутаримидов или их фармацевтически приемлемых солей в качестве средств для лечения эозинофильных заболеваний.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Эозинофилы – клетки врожденного иммунитета. Они вырабатываются в костном мозге и преимущественно циркулируют в крови. Главная эффекторная функция эозинофилов – немедленное высвобождение цитоплазматических гранул в ответ на активацию различными стимулами. Цитоплазматические гранулы содержат провоспалительные медиаторы: цитокины, хемокины, липид- и нейромедиаторы, факторы роста и катионные белки. Катионные белки эозинофилов включают 4 класса: большой основной белок (МБР), эозинофильная пероксидаза (ЕРО), эозинофильный катионный белок (ЕСР) и эозинофил-зависимый нейротоксин (EDN). В совокупности эти белки оказывают цитотоксическое действие, как по отношению к инфекционным микроорганизмам, так и по отношению к тканям хозяина, вызывая эозинофильное воспаление [Hogan SP, Rosenberg HF, Moqbel R, et al. Eosinophils: biological properties and role in health and disease//Clin Exp Allergy. 2008;38(5):709-50].

В норме количество эозинофилов в крови составляет 0,02–0,3·10⁹/л, или 0,5–5% от всех лейкоцитов. Увеличение числа эозинофилов в крови по сравнению с нормой – эозинофилия. Гиперэозинофилией, или большой эозинофилией, называют состояния, при которых содержание эозинофилов в крови составляет 15% и более, обычно при увеличении общего числа лейкоцитов [Hoffman R, Benz Jr. EJ, Shattil SJ, et al., eds. Hematology: Basic Principles and Practice. 4th ed. Philadelphia, Pa: Churchill Livingstone; 2005:768].

Повышение количества эозинофилов в крови и тканях сопровождается различными по этиологии и патогенезу заболеваниями.

Среди них: паразитарные инвазии, широкий спектр аллергических состояний, включая астму, ринит, носовые полипы, эозинофильный колит, эозинофильные синдромы, аллергический конъюнктивит и атопический дерматит, ревматические болезни (ревматоидный артрит, диффузный эозинофильный фасциит, синдром Черджа-Строса, узелковый периартериит), а также патологии неясной этиологии (эозинофильный эзофагит, эозинофильный гастроэнтерит) [Blanchard C, Rothenberg ME. Biology of the eosinophil// Adv Immunol. 2009; 101:81-121].

Среди аллергических заболеваний наиболее важной с медицинской точки зрения считается бронхиальная астма, хроническое воспалительное заболевание дыхательных путей, характеризующееся эпизодической обструкцией потока воздуха, воспалением дыхательных путей и повышенной бронхиальной реактивностью на неспецифичные аллергены.

Существует большое количество доказательств, что эозинофилы являются ключевым компонентом аллергического ответа при астме. Секретируемые тучными клетками IL-3, IL-5 способствуют аккумуляции эозинофилов в легкие, последующей активации этих клеток с выделением LTC₄, эозинофильного катионного протеина, главного основного протеина, нейротоксина, эозинофильной пероксидазы (EPO), трансформирующего росткового фактора, свободных радикалов [Blanchard C, Rothenberg ME. Biology of the eosinophil// Adv Immunol. 2009; 101:81-121].

Выявляется прямая корреляционная зависимость между активностью воспалительного процесса при бронхиальной астме и содержанием эозинофильного катионного протеина в сыворотке крови [Bjornsson E., Janson C., Hakansson L. et al. Serum eosinophil cationic protein in relation to bronchial asthma in young Swedish population. Allergy 1994; Vol. 49: 400-407]. В лаважной жидкости бронхов у больных бронхиальной астмой выявляется увеличение количества эозинофилов. На поверхности эозинофилов имеются низкоаффинные рецепторы для IgE, в связи с этим эозинофилы могут непосредственно активироваться причиннозначимыми аллергенами. На поверхности эозинофилов выявлены также рецепторы к IL-2, IL-3, IL-5, GM-CSF, PAF,

простагландинам. Через эти рецепторы указанные цитокины и липидные медиаторы способны индуцировать активацию эозинофилов и высвобождение ими медиаторов (LTC₄, PAF) и цитокинов (IL-3, IL-4, IL-5, IL-8, GM-CSF, TGF β). Возникающая под воздействием эозинофильных белков деструкция эпителия дыхательных путей способствует развитию бронхиальной гиперреактивности, снижению барьерной функции слизистой оболочки дыхательных путей.

Большое внимание сейчас уделяется возможной роли эозинофилов в восстановлении и ремоделировании ткани, так как обнаружена четкая связь между эозинофилией в тканях и некоторыми фиброзными заболеваниями (эндомиокардиальным фиброзом печени у больных гиперэозинофильным синдромом, узловым склерозирующим вариантом болезни Ходжкина, фиброзом под базальной мембраной при бронхиальной астме) [Noguchi H. et al. Tissue eosinophilia and eosinophil degranulation in syndromes associated with fibrosis// Am. J. Pathol. 1992, Vol. 140. P. 521-528].

Эозинофилы - источник нескольких фиброгенных и ростовых факторов, среди которых трансформирующий фактор- β (TGF- β), фактор роста фибробластов (FGF)-2, эндотелиальный фактор роста сосудов (VEGF), матриксные металлопротеиназы (MMP)-9, IL-1 β , IL-13 и IL-17. Клинические испытания анти-IL-5 антител также подтвердили роль эозинофилов в событиях, связанных с отложением определенных матриксных белков в ретикулярной базальной мембране [Kay AB, Phipps S, Robinson DS. A role for eosinophils in airway remodeling in asthma//Trends Immunol. 2004, Vol. 25, P. 477-82].

В настоящее время самым распространенным способом лечения астмы является применение кортикостероидов (будесонид, беклометазон дипропионат, флутиказона пропионат, мометазона фураат) путем ингаляции. Однако кортикостероиды функционируют, индуцируя общее иммуносупрессирующее действие, и имеют место неблагоприятные побочные эффекты, связанные с их длительным применением, включая высокое кровяное давление, остеопороз и развитие катаракт [Barnes PJ. New drugs for asthma//Semin Respir Crit Care Med. 2012; 33(6):685-94]. Кортикостероиды необходимо принимать каждый день и поэтому соблюдение этого требования

пациентом является другой проблемой для успешного применения указанных лекарственных средств. Кроме того, существуют пациенты, не восприимчивые к применению кортикостероидов, которым требуется применение альтернативной терапии. Избирательная направленность на мишень – эозинофилы, может преодолеть неблагоприятные эффекты использования общих иммуносупрессорных средств плеiotропного действия.

В настоящее время проводятся клинические испытания препаратов, направленных на снижение эозинофилии за счет ингибирования взаимодействия интерлейкина-5 с рецептором IL-5R α , расположенным на поверхности эозинофила. К таким препаратам относятся гуманизированные моноклональные антитела (мАт) против IL-5 и конкурентные ингибиторы IL-5R α .

Среди нейтрализующих IL-5 моноклональных антител наиболее эффективными можно назвать SB240563 (меполизумаб, Glaxo Smith Kline). По данным [Nair P, Pizzichini MMM, Kjarsgaard M, et al. Mepolizumab for prednisone-dependent asthma with sputum eosinophilia. NEJM. 2009; 360:985-93] терапия меполизумабом преднизолон-зависимых астматиков снизила эозинофилию в крови и мокроте, и, главное, улучшила состояние пациентов, снизив количество эпизодов обострения и дозу преднизолона. В другом исследовании, применение анти-IL-5 антител (меполизумабома) пациентами с кортикостероид-нечувствительной астмой также привело к снижению частоты эпизодов обострения и улучшило самочувствие по опроснику AQLQ. Помимо влияния на астму в этом испытании дополнительно было зарегистрировано терапевтическое действие в отношении полипозной ринусиносопатии [Haldar P, Brightling CE, Hargadon B, et al. Mepolizumab and exacerbations of refractory eosinophilic asthma. NEJM. 2009; 360:973-84].

В независимом испытании на взрослых пациентах с полипозной ринусиносопатией меполизумаб значительно снижал содержание ЕСР и растворимой формы IL-5R α в крови, а также концентрацию IL-5R α , IL-6 и IL-1 β в носу, что коррелировало с облегчением течения заболевания по общей шкале полипов (total polip score) [Gevaert P, Van Bruaene N, Cattaert T, et al. Mepolizumab, a humanized

anti-IL-5 mAb, as a treatment option for severe nasal polyposis. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;128(5):989-995].

Использование анти-IL-5 антител не ограничивается бронхиальной астмой и полипозной риносинусопатией. Данная терапия эффективна и при других эозинофил-опосредованных заболеваниях. Например, у пациентов с гиперэозинофильным синдромом терапия меполизумабом снизила эозинофилию крови и позволила сократить дозу принимаемого преднизолона [Rothenberg ME, Klion AD, Roufosse FE, et al. Treatment of patients with the hypereosinophilic syndrome with mepolizumab. *NEJM.* 2008; 358(12):1215-28]. У пациентов с эозинофильным эзофагитом на фоне терапии анти-IL-5 антителами наблюдалось улучшение клинической картины, связанное со снижением дисфагии, наблюдалось 6-ти кратное снижение уровня эозинофилов в крови и у некоторых пациентов была снижена гиперплазия эпителия пищевода [Stein ML, Collins MH, Villanueva JM, et al. Anti-IL-5 (mepolizumab) therapy for eosinophilic esophagitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;118(6):1312-9]. В клиническом испытании препарата на детях показано, что пациенты, в крови которых не более 20 эозинофилов в одном поле зрения микроскопа, имели улучшение по показателям: покраснение, хрупкость, борозды и вертикальные линии пищевода [Assa'ad AH, Gupta SK, Collins MH, et al. An antibody against IL-5 reduces numbers of esophageal intraepithelial eosinophils in children with eosinophilic esophagitis. *Gastroenterology.* 2011; 141(5):1593-604].

Также меполизумаб успешно применяется в качестве терапии эозинофильного васкулита [Kahn JE, Grandpeix-Guyodo C, Marroun I, et al. Sustained response to mepolizumab in refractory Churg-Strauss syndrome. *J Allergy Clin Immunol.* 2010; 125:267-70]. Ежемесячное введение меполизумаба 28-летней женщине снизило содержание эозинофилов в крови до нормального уровня, предотвратило формирование кортикостероидной астмы и по данным рентгенограммы улучшило состояние легочной паренхимы [Kim S, Marigowda G, Oren E, Israel E, Wechsler M. Mepolizumab as a steroid-sparing treatment option in patients with Churg-Strauss

syndrome. *J Allergy Clin Immunol.* 2010; 125:1336-43]. При проведении клинических испытаний у пациентов с эозинофильным васкулитом и выраженной эозинофилией терапия меполизумабом позволила снизить дозу кортикостероидов. Также была снижена эозинофилия, но после прекращения исследования обострения повторились [Oldhoff JM, Darsow U, Werfel T, et al. Anti-IL-5 recombinant humanized monoclonal antibody (mepolizumab) for the treatment of atopic dermatitis. *Allergy.* 2005; 60(5):693-6].

По данным [Amini-Vaughan ZJ, Martinez-Moczygemba M, Huston DP. Therapeutic strategies for harnessing human eosinophils in allergic inflammation, hypereosinophilic disorders, and cancer // *Curr Allergy Asthma Rep.* 2012, Vol. 12, №5. P. 402-412] меполизумаб находится на второй стадии клинических испытаний для терапии астмы, эозинофильного эзофагита взрослых, эозинофильного эзофагита детей, эозинофильного васкулита и полипозных риносинусопатий и на третьей стадии клинических испытаний в качестве лечения гиперэозинофильного синдрома, эозинофильного эзофагита детей, астмы, индуцированной риновирусом и хронического обструктивного бронхита. Другой препарат, реслизумаб (Cephalon), также являющийся гуманизированными моноклональными антителами SCH55700 к IL-5 проходит вторую стадию клинических испытаний в качестве терапии гиперэозинофильного синдрома и ларингоспазма, и третью стадию - в качестве терапии астмы и эозинофильного эзофагита детей. Все это позволяет заключить, что избирательная терапия, направленная на снижение эозинофилии - перспективное направление в лечении заболеваний, опосредованных данным типом клеток (бронхиальной астмы, аллергического ринита, аллергического конъюнктивита, атопического дерматита, полипозной риносинусопатии, эозинофильного эзофагита, эозинофильного васкулита, гиперэозинофильного синдрома).

Однако терапия с помощью мАТ влечет за собой несколько недостатков. Моноклональные антитела являются дорогими терапевтическими средствами, которые необходимо принимать в течение месяца или двух месяцев. Важным фактором является проблема несоблюдения предписаний пациентами, которая возникает

из-за многократных визитов к врачу для введения инъекционного лекарственного средства. Кроме того, отклонения в аллотипах между пациентом и терапевтическим антителом может привести к тому, что терапия моноклональным антителом в конечном итоге станет неэффективной. Высокая доза мАТ и возможность образования иммунных комплексов также могут снижать эффективность пассивной иммунизации.

Другие способы, обеспечивающие терапевтические средства против патологических состояний, характеризующихся эозинофилией, описаны в WO 97/45448 и WO 03/040164. В заявке WO 97/45448 предложено применение «модифицированных и вариантных форм молекул IL5, способных антагонизировать активность IL5» для улучшения, ослабления или уменьшения другим образом отклоняющихся от нормы эффектов, вызванных нативными и мутантными формами IL5. Сообщается, что антагонизирующее действие является результатом вариантных форм IL5, связывающихся с низкоаффинной цепью IL5R, но не с высокоаффинными рецепторами. Действуя таким образом, варианты конкурируют с IL5 за связывание с его рецепторами, не влияя на физиологические действия IL5.

В заявке WO 03/040164 предложена композиция для вакцинации, направленной на эндогенное формирование антител к IL-5, IL-13 и эотаксину, т.е. к ключевым факторам созревания, активации, локализации и жизнеспособности эозинофилов. Композиция содержит вирусоподобную частицу и по меньшей мере один связанный с ней белок или пептид IL-5, IL-13 или человеческого эотаксина. Согласно изобретению данная композиция применима для получения вакцин, используемых для лечения аллергических заболеваний с эозинофильным компонентом и в качестве фармацевтической вакцины для профилактики или лечения аллергических заболеваний с эозинофильным компонентом.

В заявке № 8501176 предложено использование антител, связывающих IL-5R. Данные антитела включают участок, специфически связывающийся с рецептором IL-5 (IL-5R) и Fc-фрагмент. Изобретенный способ снижает количество эозинофилов в крови, в костном мозге, желудочно-кишечном тракте (например, пищеводе, желудке, тонкой и толстой кишки) или в легких и за

счет этого сокращает клинические проявления астмы и хронического обструктивного бронхита легких у людей (<http://www.patentgenius.com/patent/8501176.html>).

В статье Yong Sup Lee et al., Studies on the site-selective N-acyliminium ion cyclization: synthesis of (±)- glochidine and (±)- glochidicine. Heterocycles. Vol 37. No 1. 1994, раскрыто получение сукцинимид гистамина, сплавлением дигидрохлорида гистамина и янтарного ангидрида при нагревании исходных реагентов до 200–230°C в течение 40 минут.

В публикации международной заявки WO 2007/007054 раскрыты производные сукцинимидов и глутаримидов общей формулы (I), обладающие действием ингибирующим метилирование ДНК в клетках, в частности опухолевых клетках. Раскрыты в данной публикации соединения получают реакцией сочетания аминпроизводного соединения, содержащего углеводородную цепь, с соответствующим ангидридом или кислотой или эфиром, с последующим, если необходимо, закрытием кольца, необязательно в присутствии основания.

Описанные способы синтеза имидов глутаровой кислоты, заключаются в нагревании дикарбоновой кислоты или ее производного, такого как ангидрид, диэфир и др. с первичным амином или его амидом (термическая циклизация) [Вейганд-Хильгетаг. Методы эксперимента в органической химии. Под ред. проф. Н. Н. Суворова. М., Химия, 1968, стр. 446], циклизации моноамидов соответствующих дикарбоновых кислот с использованием водоотнимающего средства в качестве реагента, активирующего карбоксильную группу, такого как уксусный ангидрид [Shimotori et al, Asymmetric synthesis of δ -lactones with lipase catalyst. Flavour and Fragrance Journal, 2007, V. 22, № 6, P. 531-539], ацетилхлорид [Ito et al,; Chemoselective Hydrogenation of Imides Catalyzed by CpRu(PN) Complexes and Its Application to the Asymmetric Synthesis of Paroxetine.//Journal of the American Chemical Society, 2007, V. 129, № 2, P. 290-291], карбонилдиимидазол [Polniaszek, et al; Stereoselective nucleophilic additions to the carbon-nitrogen double bond. 3.

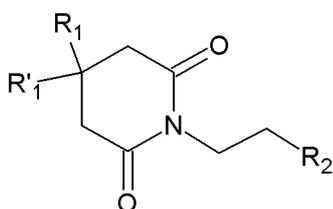
Chiral acyliminium ions.//Journal of Organic Chemistry, 1990, V. 55, № 1, P. 215-223], глутаровый или янтарный ангидриды [Ainhoa Ardeo et al, A practical approach to the fused β -carboline system. Asymmetric synthesis of indolo[2,3- α]indolizidinones via a diastereoselective intramolecular α -amidoalkylation reaction. /Tetrahedron Letters, 2003, 44, 8445-8448].

В международной публикации патентной заявки WO2007/000246 описан способ синтеза глутаримидов алкилированием пиперидин-2,6-диона и пирролидин-2,5-диона соответствующими галогенпроизводными в ДМФА, с выделением целевых замещенных имидов методом препаративной хроматографии, что неприменимо для синтеза макроколичеств.

Таким образом, целью настоящего изобретения является применение нетоксичных производных глутаримидов, эффективных для лечения эозинофильных заболеваний, преимущественно аллергической природы, таких как бронхиальная астма, аллергический ринит, полипозные риносинусопатии, эозинофильный колит, эозинофильный синдром, аллергический конъюнктивит, атопический дерматит, синдром Чержа-Строса, анафилактический шок, отек Квинке, эозинофильный васкулит, эозинофильный эзофагит, эозинофильный гастроэнтерит и фиброзы.

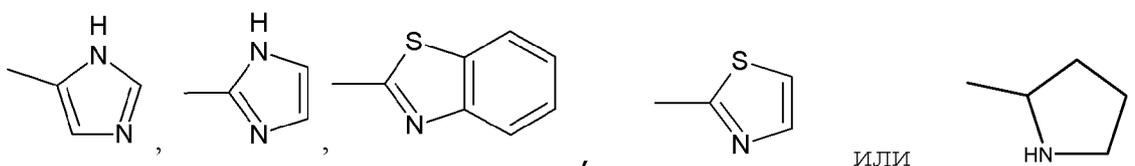
СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к применению производных глутаримидов общей формулы (I):



в котором R_1 и R'_1 независимо представляют собой водород или C_1 - C_6 алкил, например, метил;

R_2 представляет собой



необязательно замещенный С₁-С₆ алкилом, для лечения эозинофильных заболеваний, преимущественно аллергической природы, таких как бронхиальная астма, аллергический ринит, полипозные ринусиносопатии, эозинофильный колит, эозинофильный синдром, аллергический конъюнктивит, атопический дерматит, синдром Чержа-Строса, анафилактический шок, отек Квинке, эозинофильный васкулит, эозинофильный эзофагит, эозинофильный гастроэнтерит и фиброзы, раскрытых в заявке RU 2013116826 от 12.04.2013.

Авторы обнаружили, что производные глутаримидов подавляют эозинофилию на различных моделях воспаления во всех оцениваемых биологических средах (кровь, бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ)) и тканях. В частности, на модели сефадекс-индуцированного воспаления легкого у крыс производные глутаримидов снижали содержание эозинофилов в БАЛ, на модели овальбумин-индуцированной астмы у морских свинок производные глутаримидов снижали эозинофилию в БАЛ и крови.

Таким образом, настоящее изобретение относится к терапевтическому способу лечения эозинофильных заболеваний, преимущественно аллергической природы, предпочтительно бронхиальной астмы, аллергического ринита, полипозных ринусиносопатий, эозинофильного колита, эозинофильного синдрома, аллергического конъюнктивита, атопического дерматита, синдрома Чержа-Строса, анафилактического шока, отека Квинке, эозинофильного васкулита, эозинофильного эзофагита, эозинофильного гастроэнтерита или фиброза, включающему введение пациенту эффективного количества производных глутаримидов общей формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли.

Настоящее изобретение также относится к лекарственному средству для лечения эозинофильных заболеваний, преимущественно аллергической природы, предпочтительно бронхиальной астмы, аллергического ринита, полипозных ринусиносопатий, эозинофильного колита, эозинофильного синдрома, аллергического конъюнктивита, атопического дерматита, синдрома Чержа-Строса, анафилактического шока, отека Квинке, эозинофильного васкулита, эозинофильного эзофагита, эозинофильного гастроэнтерита или фиброза, представляющему собой производные глутаримидов общей

формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль.

Еще одним объектом настоящего изобретения является фармацевтическая композиция для лечения эозинофильных заболеваний, преимущественно аллергической природы, предпочтительно бронхиальной астмы, аллергического ринита, полипозных риносинусопатий, эозинофильного колита, эозинофильного синдрома, аллергического конъюнктивита, атопического дерматита, синдрома Чержа-Строса, анафилактического шока, отека Квинке, эозинофильного васкулита, эозинофильного эзофагита, эозинофильного гастроэнтерита или фиброза, включающая эффективное количество производных глутаримидов общей формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемый носитель.

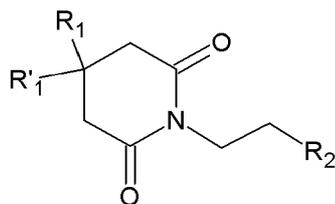
Синтез указанных выше производных глутаримидов общей формулы (I) раскрыт в заявке RU 2013116826 от 12.04.2013.

Применяемые в настоящем изобретении соединения могут быть получены способом, включающим нагревание исходных моноамидов дикарбоновых кислот с водоотнимающим агентом в среде органического растворителя или в среде самого водоотнимающего агента необязательно с добавлением ацетата натрия. В качестве водоотнимающих агентов в данном способе могут быть использованы ангидриды дикарбоновых кислот, хлорангидриды органических кислот и карбонилдидиимдазол.

Исходные моноамиды дикарбоновых кислот, а также способы их получения раскрыты в публикации международной заявки WO 1999/001103.

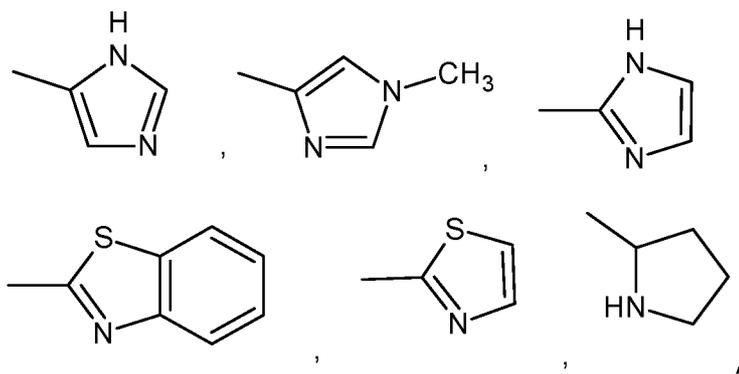
ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Предпочтительными используемыми в настоящем изобретении соединениями являются соединения общей формулы (I),



в которой R_1 и R'_1 независимо представляют собой водород или метил;

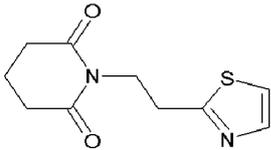
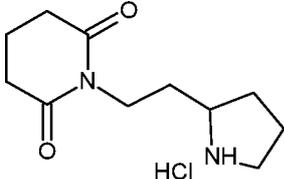
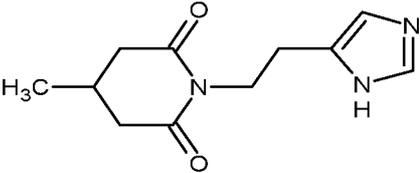
R₂ представляет собой



Наиболее предпочтительными соединениями настоящего изобретения являются соединения, представленные в таблице 1.

Таблица 1

Номер соединения	Структура
1	
2	
3	
4	
5	

6	
7	
8	

В качестве фармацевтически приемлемых солей соединений по настоящему изобретению могут быть использованы аддитивные соли органических кислот (например, формиат, ацетат, малеат, тартрат, метансульфонат, бензолсульфонат, толуолсульфонат и др.), аддитивные соли неорганических кислот (например, гидрохлорид, гидробромид, сульфат, фосфат и др.), соли с аминокислотами (например, соль аспарагиновой кислоты, соль глутаминовой кислоты и т.д.), предпочтительно хлориды и ацетаты.

Производные глутаримидов общей формулы (I) обладают терапевтическим действием в отношении эозинофильных заболеваний.

В частности, соединения настоящего изобретения могут быть использованы для лечения бронхиальной астмы, аллергического ринита, полипозных риносинусопатий, эозинофильного колита, эозинофильного синдрома, аллергического конъюнктивита, атопического дерматита, синдрома Чержа-Строса, анафилактического шока, отека Квинке, эозинофильного васкулита, эозинофильного эзофагита, эозинофильного гастроэнтерита и фиброзов.

Соединения настоящего изобретения вводят в эффективном количестве, которое обеспечивает желаемый терапевтический результат.

Соединения общей формулы (I) могут быть введены перорально, местно, парентерально, интраназально, ингаляционно и ректально в виде стандартных лекарственных форм, содержащих нетоксичные фармацевтически приемлемые носители.

Используемый в настоящем описании термин «парентеральное введение» означает подкожные, внутривенные, внутримышечные инъекции или вливания.

Соединения настоящего изобретения могут быть введены пациенту в дозах, составляющих от 0,1 до 30 мг/кг веса тела в день, предпочтительно в дозах от 0,25 до 10 мг/кг один или более раз в день.

При этом следует отметить, что конкретная доза для каждого конкретного пациента будет зависеть от многих факторов, включая активность данного используемого соединения, возраст, вес тела, пол, общее состояние здоровья и режим питания пациента, время и способ введения лекарственного средства, скорость его выведения из организма, конкретно используемую комбинацию лекарственных средств, а также тяжесть заболевания у данного индивида, подвергаемого лечению.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению содержат соединение общей формулы (I) в количестве, эффективном для достижения желаемого результата, и могут быть введены в виде стандартных лекарственных форм (например, в твердой, полутвердой или жидкой формах), содержащих соединения настоящего изобретения в качестве активного ингредиента в смеси с носителем или наполнителем, пригодным для внутримышечного, внутривенного, перорального, сублингвального, ингаляционного, интраназального и интравектального введения. Активный ингредиент может быть включен в композицию вместе с обычно используемыми нетоксичными фармацевтически приемлемыми носителями, пригодными для изготовления растворов, таблеток, пилюль, капсул, драже, суппозиторий, эмульсий, суспензий, мазей, гелей и любых других лекарственных форм.

В качестве наполнителей могут быть использованы различные вещества, такие как сахараиды, например глюкоза, лактоза или сахароза, манит или сорбит, производные целлюлозы и/или фосфаты кальция, например, трикальций фосфат или кислый фосфат кальция. В качестве связующего компонента могут быть использованы, такие вещества как крахмальная паста, например, кукурузный, пшеничный, рисовый, картофельный крахмал, желатин, трагакант,

метилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, карбоксиметилцеллюлоза и/или поливинилпирролидон. При необходимости могут быть использованы разрыхляющие агенты, такие как вышеупомянутые крахмалы и карбоксиметилкрахмал, поперечно сшитый поливинилпирролидон, агар или альгиновая кислота или ее соль, такая как альгинат натрия.

Могут быть использованы необязательные добавки, такие как агенты, регулирующие текучесть и смазывающие агенты, такие как диоксид кремния, тальк, стеариновая кислота и ее соли, такие как стеарат магния или стеарат кальция, и/или пропиленгликоль.

Ядро драже обычно покрывают слоем, который устойчив к действию желудочного сока. Для этой цели могут быть использованы концентрированные растворы сахаридов, которые могут необязательно содержать аравийскую камедь, тальк, поливинилпирролидон, полиэтиленгликоль и/или диоксид титана, и подходящие органические растворители или их смеси.

В качестве добавок могут быть также использованы стабилизаторы, загустители, красители и отдушки.

В качестве мазевой основы могут быть использованы углеводородные мазевые основы, такие как вазелин белый и желтый (*Vaselinum album*, *Vaselinum flavum*), вазелиновое масло (*Oleum Vaselini*), мазь белая и жидкая (*Unguentum album*, *Unguentum flavum*), а в качестве добавок для придания более плотной консистенции, такие как твердый парафин и воск; абсорбтивные мазевые основы, такие как гидрофильный вазелин (*Vaselinum hydrophylicum*), ланолин (*Lanolinum*), кольдкрем (*Unguentum leniens*); мазевые основы, смываемые водой, такие как гидрофильная мазь (*Unguentum hydrophylum*); водорастворимые мазевые основы, такие как полиэтиленгликолевая мазь (*Unguentum Glycolis Polyethyleni*), бентонитовые основы и другие.

В качестве основы для гелей могут быть использованы метилцеллюлоза, натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы, оксипропилцеллюлоза, полиэтиленгликоль, полиэтиленоксид или карбопол.

В качестве основы для суппозитория могут быть использованы основы, не растворимые в воде, такие как масло какао; основы,

растворимые в воде или смешиваемые с водой, такие как желатино-глицериновые или полиэтиленоксидные; комбинированные основы - мыльно-глицериновые.

При приготовлении стандартной лекарственной формы количество активного ингредиента, используемого в комбинации с носителем, может варьироваться в зависимости от реципиента, подвергающегося лечению, от конкретного способа введения лекарственного средства.

Так, например, при использовании соединений настоящего изобретения в виде растворов для инъекций, содержание активного агента в них составляет до 5% по массе. В качестве разбавителей могут быть использованы 0,9% раствор хлорида натрия, дистиллированная вода, раствор новокаина для инъекций, раствор Рингера, раствор глюкозы, специфические добавки для растворения. При введении в организм соединений настоящего изобретения в виде таблеток и суппозиториев их количество составляет до 200 мг на стандартную лекарственную форму.

Лекарственные формы настоящего изобретения получают по стандартным методикам, таким как, например, процессы смешивания, гранулирования, формирование драже, растворение и лиофилизация.

Следует отметить, что для соединений настоящего изобретения не выявлено отрицательных побочных действий и не обнаружено противопоказаний к применению. При этом при исследовании токсичности соединений настоящего изобретения в дозе 1500 мг/кг, перорально, не зарегистрировали гибели экспериментальных животных.

Детальное описание соединений настоящего изобретения, исследования фармакологической активности представлено в нижеследующих примерах, предназначенных для иллюстрации предпочтительных вариантов осуществления изобретения, и не ограничивающими его объем.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез указанных выше производных глутаримидов общей формулы (I) раскрыт в заявке RU 2013116826 от 12.04.2013.

Примеры синтеза производных глутаримидов общей формулы (I)

Средства и методы

Индивидуальность полученных соединений проверяют методом ТСХ на пластинках "Kieselgel 60 F254" (фирмы "Merck", Германия) в системе растворителей: хлороформ-метанол (9:1) (1), хлороформ-метанол (1:1) (2).

Хроматограммы и электрофореграммы проявляют хлор-тетраметилбензидиновым реактивом и реактивом Паули.

ЖХ МС-система анализа многокомпонентных смесей Shimadzu Analytical HPLC SCL10Avp, масс-спектрометр PE SCIEX API 165 (150) (Канада). Условия: колонка Waters ACQUITY UPLC BEH C18 1.7 μ m 2.1 \times 50mm, градиент элюирования в системе вода с 0,1% HCOOH - ацетонитрил с 0,1% HCOOH.

Аналитическую обращенно-фазовую ВЭЖХ проводили на приборе: хроматограф HPLC Shimadzu в условиях: колонка Luna C18 (2) 100A 250 \times 4,6 мм (сер. 599779-23), градиент элюирования в системе фосфатный буферный раствор pH 3,0: метанол (условия А); колонка Merk.LiChroCART 250 \times 4 мм 5 мкм. LiChrospher 100RP-8E 5 мкм.C8. Serial number 1.50837.0001, градиент элюирования в системе ацетатно-аммиачный буферный раствор pH 7,5:ацетонитрил (условия В); градиент элюирования в системе буфер с 1-гексилсульфонатом натрия 0,0025M pH=3: ацетонитрил (условия В); колонка Symmetry C18 150 \times 4,6 мм, градиент элюирования в системе буферный раствор с 1-гексилсульфонатом натрия 0,0025M pH=3: ацетонитрил (условия С).

¹H-ЯМР спектры регистрируют на приборе Bruker DPX-400 (Германия).

Масс-спектры высокого разрешения получают на времяпролетном масс-спектрометре методом матричной лазерно-десорбционной ионизации с использованием в качестве матрицы 2,5-дигидроксibenзойной кислоты, на приборе Ultraflex ("Bruker", Германия).

Пример 1

1-(2-(1H-имидазол-4-ил) этил) пиперидин-2,6-дион (соединение 1)

В плоскодонную колбу (250 мл) загружают 60 мл N,N'-диметилформамида и 20 г 2-(имидазол-4-ил)-этанамида пентандиовой-

1,5 кислоты. При интенсивном перемешивании прибавляют 17,3 г (1,2 экв.) карбонилдиимидазола. Реакционную массу нагревают при перемешивании до 90°C в течение 2 часов, контроль реакции методом ^1H NMR (пробу, 0,5 мл, разбавляют серным эфиром, выпавший осадок растворяют в ДМСО d_6). При отсутствии исходной 2-(имидазол-4-ил)-этанамид пентандиовой-1,5 кислоты в реакционной массе, ее охлаждают и выливают в трехкратный объем метил-трет-бутилового эфира (180 мл). Оставляют при перемешивании на 1 час, выпавший осадок отфильтровывают, промывают 60 мл метил-трет-бутилового эфира, сушат. Выход технического 1-(2-(1H-имидазол-4-ил)этил)пиперидин-2,6-диона составляет 12,4 г (67%).

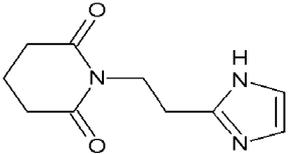
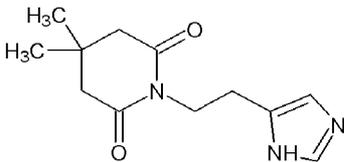
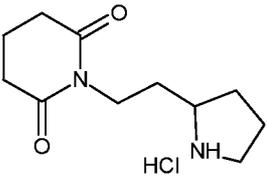
В плоскодонную колбу на 100 мл загружают 12 г технического 1-(2-(1H-имидазол-4-ил)этил)пиперидин-2,6-диона и 36 мл изопропанола. Смесь нагревают до полного растворения осадка, затем прибавляют 1,2 г активированного угля и выдерживают при кипячении в течение часа. Раствор еще горячим быстро отфильтровывают через предварительно нагретый керамический фильтр. Осадок на фильтре промывают 6 мл горячего изопропанола. Горячий маточный раствор охлаждают до комнатной температуры и оставляют на ночь при перемешивании для кристаллизации. Выпавшие кристаллы отфильтровывают, промывают 6 мл холодного изопропанола, сушат. Выход 1-(2-(1H-имидазол-4-ил)этил)пиперидин-2,6-диона после перекристаллизации составляет 10,1 г (84%). Rf 0,43 (1). Продукт анализировали методом ЖХ МС, индивидуальный пик, время удерживания 1,57 мин, $[M+N]=208$. ВЭЖХ в условиях А: индивидуальный пик, время удерживания 15,5 мин. Спектр ЯМР ^1H (400,13 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д., J/Гц): 1,81 (пент. 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, J=6,5 Гц); 2,58 (м, 6H, CH_2C , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 3,82 (т, 2H, CH_2N , J=7,8 Гц); 6,77 (уш.с, 1H, CCH); 7,49 (с, 1H, NCHN); 11,81 (уш.с, 1H, NH).

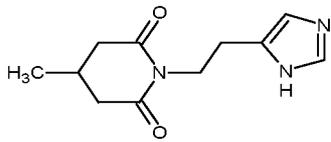
При необходимости для синтеза соединений по настоящему изобретению применяют защиту атома азота в гетероциклах, например, защитную группу карбаматного типа, такую как трет-бутоксикарбонильная (Boc).

По аналогичным вышеуказанной методикам получены следующие

соединения, представленные в таблице 2:

Таблица 2

Номер соединения	Структурная формула	Физико-химические данные
2		<p>ЖХ МС, индивидуальный пик, время удерживания 0,41 мин, $[M+H]^+=208$. ВЭЖХ в условиях Б, индивидуальный пик, время удерживания 16,72 мин. Спектр ЯМР 1H (400,13 МГц, ДМСО-d_6, δ, м.д., J/Гц): 1,82 (пент. 2Н. $CH_2CH_2CH_2$, J=6,5 Гц); 2,57 (т, 4Н, $CH_2CH_2CH_2$, J=6,5 Гц); 2,72 (т, 2Н, CH_2C, J=7,5 Гц); 3,90 (т, 2Н, CH_2N, J=7,5 Гц); 6,86 (с, 2Н, CHN); 11,72 (уш.с, 1Н, NH)</p>
3		<p>ЖХ МС, индивидуальный пик, время удерживания 0,41 мин, $[M+H]^+=236$. ВЭЖХ в условиях А, индивидуальный пик, время удерживания 22,16 мин. Спектр ЯМР 1H (400,13 МГц, ДМСО-d_6, δ, м.д., J/Гц): 0,91 (с, 6Н, CH_3); 2,58 (м, 6Н, CH_2C, CH_2CCH_2); 3,86 (т, 2Н, CH_2N, J=7,3 Гц); 6,60, 6,85 (уш.с, 1Н, CHN); 7,50 (уш.с, 1Н, $NCHN$); 11,8 (уш.с, 1Н, NH)</p>
7		<p>ЖХ/МС, индивидуальный пик, время удерживания 0,74 мин, $[M+H]^+=211$. ВЭЖХ в условиях С, индивидуальный пик, время удерживания 10,8 мин. Спектр ЯМР 1H (400.13МГц, ДМСО-d_6, δ, м.д., J/Гц) 1.52 (м, 1Н, пирролидин), 1.72 (м, 1Н, пирролидин), 1.86 (м, 5Н,</p>

		пирролидин+СН ₂ СН+СОСН ₂ СН ₂ СН ₂ СО), 2.10 (m, 1H, пирролидин), 2.61 (t, 4H, СОСН ₂ СН ₂ СН ₂ СО, J=6.4 Hz), 3.10 (m, 2H, пирролидин), 3.30 (m, 1H, пирролидин), 3.68 (m, 2H, СН ₂ Н), 8.93 (s, 1H, NH)
8		ЖХ/МС, индивидуальный пик, время удерживания 1,9 мин, [М+Н] ⁺ =222. ВЭЖХ в условиях С, индивидуальный пик, время удерживания 13,8 мин. Спектр ЯМР ¹ Н (400.13МГц, ДМСО-d ₆ , δ, м.д., J/Гц): 0.95 (d, 3H, СН ₃ , J=6.5 Hz), 2.15 (m, 1H, СОСН ₂ СНСН ₂ СО); 2.35 (m, 2H, СН ₂ С); 2.62 (m, 4H, СОСН ₂ СНСН ₂ СО), 3.82 (t, 2H, СН ₂ Н, J=7.8 Hz), 6.80 (s, 1H, ССН), 7.56 (s, 1H, NСНН)

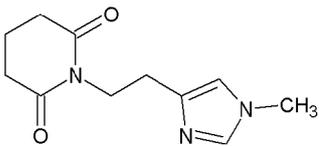
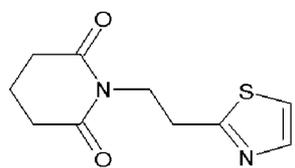
Пример 2

1-(2-(1,3-бензотиазол-2-ил)этил)пиперидин-2,6-дион
(соединение 4)

Смесь 22 г (0,075 моль) 2-(1,3-бензотиазол-2-ил)-этанамид пентандиовой-1,5 кислоты и 23 г (0,225 моль) уксусного ангидрида кипятят в 150 мл диоксана 3 часа. Диоксан удаляют в вакууме, добавляют 200 мл воды, нейтрализуют 30% гидроксидом натрия до нейтральной среды. Выпавшее масло затирают в кристаллы. Осадок очищают колоночной хроматографией (SiO₂ 60-100 мкм, элюент: этилацетат-гексан (1:1)). Получают 16.5 г (79.9%). ЖХ/МС, индивидуальный пик, время удерживания 2,26 мин, [М+Н]⁺=275. ВЭЖХ в условиях А, индивидуальный пик, время удерживания 9,3 мин. Спектр ЯМР ¹Н (400.13МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д., J/Гц): 1.85 (pent. 2H. СН₂СН₂СН₂, J= 6.8 Hz); 2.59 (t, 4H, СН₂СН₂СН₂, J= 6.8 Hz); 3.24 (t, 2H, СН₂С, J= 7.3 Hz); 4.08 (t, 2H, СН₂Н, J= 7.3 Hz); 7.43, 7.49 (t, 1H, Ar, J= 7,6 Hz); 7.96, 8.04 (d, 1H, Ar, J= 7,6 Hz).

В соответствии с вышеуказанной методикой получены следующие соединения, представленные в таблице 3:

Таблица 3

Номер соединения	Структурная формула	Физико-химические данные
5		ЖХ/МС, индивидуальный пик, время удерживания 0,21 мин, $[M+H]^+=222$. ВЭЖХ в условиях Б, индивидуальный пик, время удерживания 20,7 мин. Спектр ^1H -ЯМР (400,13 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д., J/Гц): 1,82 (пент. 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, J=6,4 Гц), 2,53 (м, 2H, CH_2C), 2,58 (т, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, J=6,4 Гц), 3,57 (с, 3H, NMe), 3,80 (т, 2H, CH_2N , J=7,8 Гц), 6,85 (с, 1H, CSH), 7,42 (с, 1H, NCHN)
6		ЖХ/МС, индивидуальный пик, время удерживания 1,43 мин, $[M+H]^+=225$. ВЭЖХ в условиях А, индивидуальный пик, время удерживания 31,28 мин. Спектр ^1H -ЯМР (400,13 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д., J/Гц): 1,82 (пент. 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, J=6,5 Гц), 2,58 (т, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, J=6,5 Гц), 3,12 (т, 2H, CH_2C , J=7,4 Гц), 3,97 (т, 2H, CH_2N , J=7,4 Гц), 7,58 (д, 1H, SCH, J=3,2 Гц), 7,70 (д, 1H, NCH, J=3,2 Гц)

Пример 3

Таблетки, покрытые оболочкой, 2 мг, 10 мг и 100 мг

Состав на одну таблетку, покрытую оболочкой.

Дозировка	2 мг	10 мг	100 мг
Активное вещество:			
соединение общей формулы I	2,00 мг	10 мг	100 мг
Вспомогательные вещества:			
микrokристаллическая целлюлоза	47,70 мг	70,55 мг	95,90 мг

лактоза моногидрат	49,00 мг	67,50 мг	99,00 мг
натрия гликолят крахмал	0,50 мг	0,75 мг	1,50 мг
тальк	0,40 мг	0,60 мг	1,20 мг
магния стеарат	0,40 мг	0,60 мг	2,40 мг
Масса ядра таблетки	100,00 мг	150,00 мг	300,00 мг
Пленочное покрытие	3,00 мг	4,50 мг	9,00 мг
Масса таблетки	103,00 мг	154,50 мг	309,00 мг

Тесты на биологическую активность

Средства и методы

Морфологическое исследование гистологических препаратов проводили при помощи светооптического микроскопа Leica DM LS (Leica Microsystems, Германия). Микроморфометрическое исследование выполняли с помощью окуляр-микрометра микроскопа Leica DM LS. Микрофотографирование проводили при помощи цифровой фотокамеры Leica DC320 (Leica Microsystems, Германия).

Математическую обработку полученных результатов проводили методами вариационной статистики при помощи программы Statistica 6.0. Для анализа данных применяли описательную статистику: данные проверяли на нормальность распределения с помощью критерия Шапиро-Уилка. Поскольку данные принадлежали к нормальному распределению, межгрупповые различия анализировали параметрическими методами с помощью критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Далее приведен неограничивающий перечень примеров, иллюстрирующих биологическую активность заявленных соединений общей формулы (I).

Пример 4

Оценка эффективности соединений общей формулы (I) на модели астмы у морских свинок

Индукцию бронхиальной астмы у морских свинок осуществляли по стандартной методике [Ricciardolo FL, Nijkamp F, De Rose V, Folkerts G. The guinea pig as an animal model for asthma// Current Drug Targets. 2008 Jun; 9(6):452-65]. Животных иммунизировали однократным внутрибрюшинным введением 0,5 мл

раствора, содержащего 100 мкг/мл овальбумина (Sigma) и 100 мг/мл гидрокси алюминия. Интактным животным внутрибрюшинно вводили физ. раствор в объеме 0,5 мл.

На 29, 30 и 31 день эксперимента проводили провокацию гиперреактивности дыхательных путей путем ингаляционного введения овальбумина в возрастающих концентрациях - 0,1, 0,3 и 0,5 мг/мл в 1, 2 и 3 день провокации, соответственно. Ингаляцию осуществляли в течение 5 минут или до появления выраженных признаков асфиксии (падение на бок). На 32-ой день животным вводили разрешающую дозу овальбумина - 1 мг/мл в течение 5 минут с оценкой бронхоспастической реакции.

Исследуемые соединения вводили животным внутривенно ежедневно один раз в день в течение 6 или 10 суток, заканчивая за 2 суток до введения разрешающей дозы антигена.

Оценку бронхоспастической реакции проводили по изменению частоты и глубины дыхательных движений, а также по такому признаку асфиксии, как падение животного на бок. Спирограмму регистрировали с помощью оборудования для лабораторных исследований ADInstruments (Австралия) с использованием базовой регистрирующей станции PowerLab 8sp. и программы LabCart. Для регистрации использовали датчик воздушного потока для лабораторных животных и спирограф со встроенным усилителем (ADInstruments).

Через 24 часа после введения разрешающей дозы овальбумина у животных отбирали бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ) и кровь из полостей сердца. Взятие БАЛ проводили под наркозом путем промывания легких 5-ю мл подогретого до 37°C физиологического раствора через трахею при помощи шприцевого дозатора.

В жидкости бронхоальвеолярного смыва с помощью камеры Горяева подсчитывали абсолютное количество клеточных элементов в 1 мкл смыва (цитоз). Затем БАЛ центрифугировали при 200 g в течение 10 минут. Из осадка клеток готовили мазки, которые в дальнейшем фиксировали в метаноле и окрашивали по Романовскому-Гимзе для подсчета эндопульмональной цитогаммы.

Кровь анализировали на гемоцитометре с целью определения

лейкоформулы.

Исследование включало 3 эксперимента, в первом производилась оценка влияния исследуемых соединений № 1-6 на клеточный состав БАЛ, во втором и третьем - оценка влияния соединений № 1 и № 2 на клеточный состав БАЛ, клеточный состав крови и на выраженность бронхоспазма.

10-кратное введение соединений № 1-6 морским свинкам в дозе 14 мг/кг снизило увеличенное на фоне развития патологии количество клеточных элементов в БАЛ с $17,3 \times 10^9$ кл/л до $2,5-6,3 \times 10^9$ кл/л (таблица 4). Преимущественно исследуемые соединения снизили количество эозинофилов: в контрольной группе количество эозинофилов в БАЛ составило $7,05 \times 10^9$ кл/л, в группах, получавших лечение - $0,60-1,61 \times 10^9$ кл/л, т.е. на 91-77% меньше.

Таблица 4

Количество клеточных элементов в БАЛ на модели бронхиальной астмы у морских свинок

(M±m, n=9)

Группа	Доза соединения, мг/кг	Количество введений	Цитоз, 10 ⁹ /л	Эозинофилы, 10 ⁹ /л	Нейтрофилы, 10 ⁹ /л	Моноциты, 10 ⁹ /л	Лимфоциты, 10 ⁹ /л
Интактные	-		1,0±0,1	0,07 ±0,01	0,16±0,03	0,30±0,05	0,38±0,04
Контроль	-		17,3±1,9*	7,05±0,68*	1,78±0,46	2,70±0,59*	4,92±1,02*
Соединение 1	14	10	2,5±0,5&	0,89±0,23*&	0,36±0,09	0,35±0,09*	0,70±0,13*
Соединение 2			6,3±1,1*&	1,30±0,29*&	1,05±0,16*&	0,60±0,14*	1,53±0,50*
Соединение 3			2,9±0,4*&	0,93±0,31*&	0,36±0,08	0,71±0,18&	0,72±0,08*
Соединение 4			3,5±1,1*&	1,25±0,34*&	0,43±0,12	0,85±0,19&	0,81±0,11*
Соединение 5			5,9±1,5*&	1,61±0,86*&	1,05±0,33	0,84±0,23*	1,35±0,34*
Соединение 6			4,9±1,2*&	0,60±0,21*&	0,97±0,28*	0,83±0,18*	1,03±0,24*

Примечания:

* - отличие от группы интактных по t-критерию Стьюдента при p<0,05

& - отличие от группы контроля по t-критерию Стьюдента при p<0,05

Введение исследуемых соединений в более низких дозах (0,045, 0,14 и 1,4 мг/кг) и в двух режимах (10-ти и 6-ти кратно) показало, что соединения снижают эозинофилию в БАЛ в широком диапазоне доз (0,045-14 мг/кг) и при разных схемах лечения (таблица 5). Помимо этого во всех тестируемых дозах исследуемые соединения снизили количество лимфоцитов и в некоторых дозах количество моноцитов в БАЛ, что свидетельствует о подавлении местной воспалительной реакции в легком.

Таблица 5

Количество клеточных элементов в БАЛ на модели бронхиальной астмы у морских свинок ($M \pm m$, $n=8$)

Группа	Доза соединения, мг/кг	Количество введений	Цитоз, 10^9 /л	Эозинофилы, 10^9 /л	Нейтрофилы, 10^9 /л	Моноциты, 10^9 /л	Лимфоциты, 10^9 /л
Эксперимент №1							
Интактные	-		$0,22 \pm 0,01$	$0,02 \pm 0,002$	$0,06 \pm 0,003$	$0,06 \pm 0,006$	$0,075 \pm 0,008$
Контроль	-		$19,3 \pm 0,2^*$	$0,96 \pm 0,17^*$	$0,18 \pm 0,047^*$	$0,54 \pm 0,06^*$	$0,24 \pm 0,03^*$
Соединение 1	0,045	10	$12,8 \pm 0,2^*$	$0,45 \pm 0,07^* \&$	$0,19 \pm 0,08$	$0,52 \pm 0,092^*$	$0,10 \pm 0,04 \&$
	0,14		$10,5 \pm 0,2^* \&$	$0,41 \pm 0,10^* \&$	$0,07 \pm 0,01$	$0,43 \pm 0,076^*$	$0,13 \pm 0,04 \&$
	14		$14,6 \pm 0,3^*$	$0,45 \pm 0,12^* \&$	$0,15 \pm 0,03^*$	$0,7 \pm 0,16^*$	$0,15 \pm 0,026^* \&$
Эксперимент №2							
Интактные	-		$0,02 \pm 0,003$	$0,02 \pm 0,003$	$0,05 \pm 0,007$	$0,05 \pm 0,001$	$0,07 \pm 0,01$
Контроль	-		$0,14 \pm 0,02^*$	$0,67 \pm 0,07^*$	$0,11 \pm 0,003$	$0,49 \pm 0,09^*$	$0,16 \pm 0,02^*$
Соединение 2	0,14	6	$0,55 \pm 0,09^* \&$	$0,20 \pm 0,03^* \&$	$0,03 \pm 0,008^* \&$	$0,24 \pm 0,06^* \&$	$0,07 \pm 0,02 \&$

	1,4		0,63±0,09*&	0,18±0,02*&	0,09±0,002	0,29±0,07*	0,06±0,01 &
	14		0,56±0,008* &	0,21±0,06*&	0,07±0,002	0,22±0,05*&	0,07±0,00 9&

Примечания:

* - отличие от группы интактных по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$

& - отличие от группы контроля по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$

Исследуемые соединения снизили эозинофилию крови. В группе контроля количество эозинофилов в крови в 6-8 раз превышало данный показатель интактных животных. Введение исследуемых соединений позволило сохранить его на уровне интактных животных (таблица 6).

1. Таблица 6

Количество клеточных элементов в крови на модели бронхиальной астмы у морских свинок (M±m, n=8)

Группа	Доза соеди- нения , мг/кг	Коли- чество введений	Цитоз, 10 ⁹ /л	Палочко- ядерные нейтрофил ы 10 ⁹ /л	Сегменто- ядерные нейтрофилы , 10 ⁹ /л	Эозинофил ы 10 ⁹ /л	Базофилы , 10 ⁹ /л	Моноциты 10 ⁹ /л	Лимфоциты , 10 ⁹ /л
Эксперимент №1									
Интактные	-		6,09±0,68	0,08±0,02	2,29±0,35	0,08±0,04	0±0	0,10± 0,04	2,66±0,49
Контроль	-		12,51±0,68 *	0,37±0,11	3,92±0,43	0,46±0,06 *	0±0	0,58±0,1 6*	7,45±0,62 *
Соединени е 1	0,045	10	9,03±1,40&	0,31±0,10	2,92±0,65	0,19±0,04 &	0±0	0,29±0,0 8	4,80±0,84 *
	0,14		9,11±1,07* &	0,19±0,05 &	2,23±0,58&	0,09±0,03 &	0±0	0,33±0,0 6*	5,25±0,89 *
	14		8,90±0,25* &	0,27±0,06 *	3,66±0,22*	0,13±0,04 &	0±0	0,33±0,0 6*	4,45±0,25 *
Эксперимент №2									
Интактные			5,89±0,31	0,14±0,04	2,15±0,26	0,05±0,03	0±0	0,15±0,0 5	3,41±0,32
Контроль			13,26±0,55 *	0,33±0,11	5,34±0,71*	0,39±0,07 *	0±0	0,38±0,0 9*	6,81±0,49 *

Соединение 2	0,14	6	7,80±0,77* &	0,18±0,04	3,41±0,41*&	0,09±0,03 &	0±0	0,18±0,0 6	3,95±0,54 &
	1,4		7,70±0,40* &	0,21±0,03	3,53±0,37*&	0,1±0,03 &	0±0	0,18±0,0 6	3,68±0,25 &
	14		6,93±0,77 &	0,17±0,04	2,9±0,38&	0,1±0,04 &	0±0	0,24±0,0 8	3,51±0,41 &

Примечания:

* - отличие от группы интактных по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$

& - отличие от группы контроля по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$

Определение выраженности бронхоспазма у морских свинок в ответ на ингалирование им провокационной дозы овальбумина позволило установить, что на модели бронхиальной астмы исследуемые соединения снижают не только эозинофилию, но и клинические проявления заболевания. В частности, если в группе контроля, получавших плацебо, из 8-ми животных 5 имели выраженный бронхоспазм с острой и подострой фазой, то в группах животных, получавших исследуемые соединения, такие животные либо отсутствовали, либо их количество не превышало 2 шт. В свою очередь количество животных с нормальной глубиной и частотой дыхания (без бронхоспазма) возрастало с 0-1 шт. в группе контроля до 4-7 шт. в группах, получавших лечение (таблица 7).

Таблица 7

Выраженность бронхоспазма у морских свинок на модели бронхиальной астмы

Группа	Доза соединения, мг/кг	Количество введений	Количество животных (n=8)			
			Без бронхоспазма	с умеренно выраженным бронхоспазмом (без острой, с подострой фазой, с восстановлением дыхания)	с умеренно выраженным бронхоспазмом (без острой, с подострой фазой, без восстановления дыхания)	с выраженным бронхоспазмом (с острой и подострой фазой)
Эксперимент №1						
Интактные	-		8	0	0	0
Контроль	-		0	0	3	5
Соединение 1	0,045	10	5	1	2	0
	0,14		7	1	0	0
	14		5	0	2	1
Эксперимент №2						
Интактные	-		8	0	0	0
Контроль	-		1	1	1	5
Соединение 2	0,14	6	4	1	1	2
	1,4		4	0	3	1
	14		5	1	0	2

Полученные результаты дают убедительные доказательства того, что на экспериментальных моделях эозинофилии, в частности бронхиальной астмы и др., исследуемые соединения подавляют эозинофилию и снижают клинические проявления заболевания.

Пример 5

Оценка эффективности соединений общей формулы (I) на модели сефадекс-индуцированного эозинофильного воспаления легких у крыс

Модель сефадекс-индуцированного эозинофильного воспаления легких у крыс реализовали по стандартной методике [Evaldsson C, Rydén I, Uppugunduri S. Isomaltitol exacerbates neutrophilia but reduces eosinophilia: new insights into the sephadex model of lung inflammation//Int Arch Allergy Immunol. 2011; 154(4):286-94]. Крысам-самцам линии Вистар однократно ингаляционно вводили Сефадекс G-200 (Pharmacia, Sweden) в дозе 5 мг/кг. Исследуемые соединения вводили животным внутривентриально четырехкратно: за 24 и 1 ч до, а также 24 и 45 ч после введения сефадекса. Препарат сравнения будесонид вводили по той же схеме ингаляционно в дозе 0,5 мг/кг. Через 48 ч после ингаляции сефадекса производили забор бронхоальвеолярного лаважа. В лаваже оценивали суммарное количество лейкоцитов и определяли лейкоцитарную формулу. Количество крыс в группе - 7-10 шт.

Анализ БАЛ показал, что однократное ингаляционное введение сефадекса G-200 крысам вызывает выраженный приток лейкоцитов в легкое. Количество всех клеточных типов было увеличено в группе контроля по сравнению с интактными, однако максимальное увеличение было отмечено в отношении эозинофилов (таблицы 8-9).

Внутрижелудочное введение соединений общей формулы (I) крысам снизило содержание эозинофилов в БАЛ в несколько раз. Заявляемые соединения проявляют активность в широком диапазоне тестируемых доз.

Таблица 8

Количество клеточных элементов в БАЛ на модели сефадекс-индуцированного
эозинофильного воспаления легких у крыс (M±m, n=10)

Группа	Количество клеточных элементов в 1 мкл БАЛ				
	Лейкоциты	Нейтрофилы	Эозинофилы	Макрофаги	Лимфоциты
Интактные	865±78	35±9	13±4	770±66	46±12
Контроль	2785±152*	711±158*	444±45*	1469±197*	161±44*
Соединение 1 (0,06 мг/кг)	2500±307*	837±231*	118±27*&	1417±131*	128±48
Соединение 1 (0,18 мг/кг)	2665±455*	597±168*	174±64*&	1661±260*	143±54
Соединение 1 (0,54 мг/кг)	2120±218*&	352±135*	126±43*&	1446±113*	196±63*
Соединение 1 (1,8 мг/кг)	1915±250*&	451±149*	129±44*&	1214±130*	122±49
Соединение 1 (5,4 мг/кг)	2340±322*	492±129*	152±56*&	1525±199*	170±45*
Соединение 1 (18 мг/кг)	2135±205*&	297±89*&	69±22*&	1601±134*	168±44*
Будесонид (0,5 мг/кг)	1805±318*&	334±119*	204±84*&	1230±205	37±10&

Примечания:

* - отличие от группы интактных по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$

& - отличие от группы контроля по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

2. Таблица 9

Количество клеточных элементов в БАЛ на модели сефадекс-индуцированного
эозинофильного воспаления легких у крыс ($M \pm m$, $n=7$)

Группа	Количество клеточных элементов в 1 мкл БАЛ				
	Лейкоциты	Нейтрофилы	Эозинофилы	Макрофаги	Лимфоциты
Интактные	2471±611	150±63	39±31	1532±225	31±26
Контроль	5207±814*	785±163*	630±104*	3471±412*	275±103
Соединение 5 (1,8 мг/кг)	2064±257&	385±57*	147±44&	1576±93&	66±26
Соединение 5 (18 мг/кг)	2189±222&	605±124	34±15&	1331±66 &	121±48
Соединение 7 (1,8 мг/кг)	2242±289&	389±188	28±16&	913±235&	16±10
Соединение 7 (18 мг/кг)	1725±345&	136±50&	164±62 &	909±299&	29±17
Соединение 8 (1,8 мг/кг)	2796±333 &	303±104&	202±53*&	1860±204&	82±44
Соединение 8 (18 мг/кг)	4250±576	583±180	318±65*&	2050±462&	64±45

Примечания:

* - отличие от группы интактных по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$

& - отличие от группы контроля по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

Пример 6

Оценка эффективности соединений общей формулы (I) на модели лейкотриен-индуцированного эозинофильного воспаления легких у морских свинок

Модель лейкотриен-индуцированного эозинофильного воспаления легких у морских свинок реализовали по стандартной методике [Underwood DC1, Osborn RR, Newsholme SJ, Torphy TJ, Hay DW. Persistent airway eosinophilia after leukotriene (LT) D4 administration in the guinea pig: modulation by the LTD4 receptor antagonist, pranlukast, or an interleukin-5 monoclonal antibody// Am J Respir Crit Care Med. 1996 Oct;154(4 Pt 1):850-7.]. Самцам морских свинок (250-300 гр) в условиях двухкамерного плетизмографа (Emka Technologies, France) в течение 1 минуты ингалировали раствор лейкотриена D4 (LTD4, Cayman Chemical, USA) концентрацией 10 мкг/мл (скорость потока - 250 мл/мин). Исследуемое соединение вводили животным внутривентриально четырехкратно: за 24 и 1 ч до, а также 24 и 45 ч после ингаляции LTD4. Препарат сравнения монтелукаст (0.8 мг/кг) вводили внутривентриально однократно за 1 час до ингаляции LTD4. Через 48 ч после ингаляции LTD4 производили забор бронхоальвеолярного лаважа. В лаваже оценивали суммарное количество лейкоцитов и определяли лейкоцитарную формулу. Количество морских свинок в группе - 8 шт.

Анализ БАЛ показал, что однократное ингаляционное введение лейкотриена D4 морским свинкам вызывает выраженный приток нейтрофилов, эозинофилов и моноцитов/макрофагов в легкое. Наиболее выраженное увеличение количества клеток (в 25 раз) наблюдалось в отношении эозинофилов (таблица 10).

Внутривентриальное введение исследуемого соединения морским свинкам снизило содержание эозинофилов в БАЛ в 2.1-3.4 раза. Соединение оказало эффект в широком диапазоне доз (0.14-14 мг/кг). Сравнительный анализ эффективности исследуемого соединения и монтелукаста показал, что по выраженности действия исследуемое соединение не уступает антагонисту лейкотриеновых рецепторов.

Таблица 10

Количество клеточных элементов в БАЛ на модели лейкотриен-индуцированного эозинофильного воспаления легких у крыс ($M \pm m$, $n=8$)

Группа	Количество клеточных элементов в 1 мкл БАЛ				
	Лейкоциты	Нейтрофилы	Эозинофилы	Макрофаги	Лимфоциты
Интактные	556±83	21±4	79±26	357±55	100±32
Контроль	5788±1269*	303±66*	1966±391*	3392±895*	126±35
Соединение 1 (0,14 мг/кг)	2638±463*&	249±50	916±144*&	1360±323*	112±27
Соединение 1 (1,4 мг/кг)	3413±1022*	279±97*	856±288*&	2134±705*	144±89
Соединение 1 (14 мг/кг)	2250±373*&	155±36*	580±124*&	1444±258*	71±28
Монтелукаст (0,8 мг/кг)	24065±415*&	173±41*	618±116*&	1519±263*	96±39

Примечания:

* - отличие от группы интактных по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$

& - отличие от группы контроля по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

Пример 7

Оценка эффективности соединений общей формулы (I) на модели аллергического ринита у морских свинок

Модель аллергического ринита реализовали по стандартной методике [Vishnu N. Thakare, M.M. Osama, Suresh R. Naik. Therapeutic potential of curcumin in experimentally induced allergic rhinitis in guinea pigs // Int Immunopharmacol. 2013 Sep;17(1):18-25].

Морских свинок (250-300 гр) иммунизировали 4х кратным (на 0, 7, 14 и 21 сутки) внутрибрюшинным введением смеси овальбумина (100 мкг/свинка) и гидроксида алюминия (5 мг/свинка), разведенных и суспендированных в физиологическом растворе. На 28-е сутки исследования раствор овальбумина (60 мг/мл) животным вводили интраназально по 20 мкл в каждую ноздрю. На 35-е сутки животным вводили раствор ОВА (200 мкг/мл, 25 мкл) внутрикожно, предварительно выбрив участок кожи на спине. Подтверждением наличия сенсibilизации было формирование отека и покраснения в месте инъекции. На 42-е сутки исследования проводили интраназальное введение раствора ОВА (60 мг/мл, 20 мкл/ноздря). С целью контроля формирования именно аллергического воспаления была сформирована группа ложноиммунизированных животных: на 0, 7, 14 и 21 сутки свинки получали раствор гидроксида алюминия (5 мг/свинка), на 28-е и 35-е сутки - физ. раствор, на 42-е ОВА (60 мг/мл, 20 мкл/ноздря).

Исследуемые соединения (14 мг/кг) вводили животным внутривентрикулярно 3хкратно: за 48, 24 и 1 ч до последнего интраназального введения ОВА. Препарат сравнения дексаметазон вводили внутривентрикулярно однократно - за 3 ч до последнего интраназального введения ОВА.

В течение 2 ч после последнего введения ОВА проводили оценку клинических проявлений ринита: подсчитывали количество чихов, почесываний носа. Через 24 часа после последнего введения овальбумина производили забор назального смыва. В назальном смыве оценивали суммарное количество лейкоцитов и определяли лейкоцитарную формулу. Количество морских свинок в группе - 8 шт.

Анализ назального смыва показал, что аллергический ринит сопровождается выраженным притоком лейкоцитов в полость носа. Максимальное увеличение было отмечено в отношении количества эозинофилов (таблица 11).

Трехкратное внутрижелудочное введение соединений общей формулы (I) морским свинкам снизило содержание эозинофилов в назальном смыве до уровня ложноиммунизированных животных. По выраженности действия исследуемые соединения не уступали дексаметазону.

3. Таблица 11

Количество клеточных элементов в назальном смыве морских свинок на модели аллергического ринита ($M \pm m$, $n=8$)

Группа	Количество клеточных элементов в 1 мкл назального смыва				
	Лейкоциты	Нейтрофилы	Эозинофилы	Макрофаги	Лимфоциты
Ложная иммунизация	1371±181	424±30	267±38	712±125	8±6
Контроль	3029±286*	753±121*	1265±226*	439±132	8±8
Соединение 1 (14 мг/кг)	1300±254&	243±58*&	521±129&	405±130	6±6
Соединение 5 (14 мг/кг)	1071±233&	344±50&	575±143&	198±54*	9±7
Дексаметазон (5 мг/кг)	1186±142&	328±47&	365±90&	296±71*	5±3

Примечания:

* - отличие от группы интактных по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$

& - отличие от группы контроля по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$

Учет клинических проявлений аллергического ринита в течение 2х часов после последнего интраназального введения ОВА животным показал выраженное увеличение у экспериментальных животных количества чихов и почесываний носа, что свидетельствует о корректности реализованной модели аллергического ринита. Терапия соединениями общей формулы (I) снизила клинические проявления ринита до уровня ложноиммунизированных животных. Препарат сравнения дексаметазон оказал сходное действие (таблица 12).

Таблица 12

Клинические проявления аллергического ринита у морских свинок на экспериментальной модели ($M \pm m$, $n=8$)

Группа	Количество чихов/2часа	Количество почесываний носа/2 часа
Ложная иммунизация	5,3±1,2	9,7±1,3
Контроль	16,3±2,6*	45,3±5,2*
Соединение 1 (14 мг/кг)	5,9±1,1 &	13,9±2,6 &
Соединение 5 (14 мг/кг)	7,1±1,3 &	19,1±4,9 &
Дексаметазон (5 мг/кг)	7,9±0,8 &	16,7±1,8*&

Примечания:

* - отличие от группы интактных по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$

& - отличие от группы контроля по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$

Пример 8

Оценка эффективности соединений общей формулы (I) на модели atopического дерматита у мышей

Модель atopического дерматита реализовали по стандартной методике [Mechanism of dinitrochlorobenzene-induced dermatitis in mice: role of specific antibodies in pathogenesis//PLoS One. 2009;4(11).].

На 0 и 12 сутки исследования самцам мышей линии Balb/c на выбритые участки спины наносили 100 мкл 2% раствора 1-хлор-2,4-динитробензола (ДНХБ, Sigma-Aldrich, США), приготовленного на 95% растворе этанола. На 17 сутки исследования на правое «опытное» ухо животным наносили 20 мкл 2% спиртового раствора ДНХБ дважды с интервалом 1 час. Исследуемое соединение и препарат сравнения дексаметазон вводили животным внутривентриально один раз в сутки на 8-17е сутки исследования.

На 18 сутки эксперимента животных эвтаназировали в CO₂-камере. Определяли массу «опытного» и «контрольного» уха. Вычисляли индекс реакции (ИР), выраженный в процентах разницы в массах «опытного» и «контрольного» уха.

Проведенное исследование показало, что соединения общей формулы (I) снижают индекс реакции на экспериментальной модели атопического дерматита. По выраженности действия заявляемые соединения не уступают стероидному препарату дексаметазону (таблица 13).

Таблица 13

Индекс реакции атопического дерматита у мышей ($M \pm m$, n=12)

Группа	Индекс реакции (%)
Интактные	-0,49±0,68
Контроль	93,8±5,4*
Соединение 1 (0,3 мг/кг)	74,4±7,3*&
Соединение 1 (3 мг/кг)	69,5±8,2*&
Соединение 1 (30 мг/кг)	69,1±8*&
Дексаметазон (10 мг/кг)	65,6±8*&

Примечания:

* - отличие от группы интактных по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$

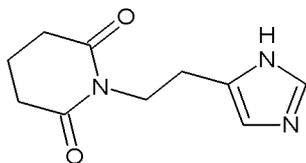
& - отличие от группы контроля по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$

Полученные результаты дают основание заключить, что на экспериментальных моделях эозинофилии, в частности, сефадекс-индуцированного эозинофильного воспаления легких у крыс,

лейкотриен-индуцированного эозинофильного воспаления легких у морских свинок, аллергического ринита и астмы у морских свинок, атопического дерматита у мышей и др., соединения общей формулы (I) существенно снижают эозинофилию.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

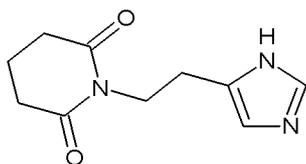
1. Способ лечения эозинофильных заболеваний, включающий введение пациенту эффективного количества соединения



или его фармацевтически приемлемой соли,

где эозинофильное заболевание представляет собой бронхиальную астму, аллергический ринит, полипозные риносинусопатии, эозинофильный колит, эозинофильный синдром, аллергический конъюнктивит, атопический дерматит, синдром Чержа-Строса, анафилактический шок, отек Квинке, эозинофильный васкулит, эозинофильный эзофагит, эозинофильный гастроэнтерит или фиброзы.

2. Применение соединения



или его фармацевтически приемлемой соли для получения лекарственного средства для лечения эозинофильных заболеваний,

где эозинофильное заболевание представляет собой бронхиальную астму, аллергический ринит, полипозные риносинусопатии, эозинофильный колит, эозинофильный синдром, аллергический конъюнктивит, атопический дерматит, синдром Чержа-Строса, анафилактический шок, отек Квинке, эозинофильный васкулит, эозинофильный эзофагит, эозинофильный гастроэнтерит или фиброзы.

По доверенности

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/RU 2014/000855

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (see additional page)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K 31/45-31/454, C07D 211/88, A61K 47/00, A61P 11/00, 1/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatSearch (RUPTO internal), Espacenet, Patentscope, DWPI, EAPATIS, USPTO, PAJ, PubMed		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 1994/024133 A1 (CELL THERAPEUTICS, INC.) 27.10.1994, the abstract, p. 28-31, items 1, 22, 23, 30 of the claims	1-16
A	WO 2007/000246 A1 (SANOFI-AVENTIS DEUTSCHLAND GMBH et al.) 04.01.2007, the abstract, example 5, the claims	1-16
A	RU 2406727 C2 (OBSHESTVO S OGRANICHENNOI OTVETSTVENNOSTJU "FARMINTERPRAISEZ") 20.12.2010, the abstract, the claims	1-16
A	RU 2378284 C2 (OBSHESTVO S OGRANICHENNOI OTVETSTVENNOSTJU "FARMINTERPRAISEZ") 10.01.2010, the abstract, the claims	1-16
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 20 March 2015 (20.03.2015)		Date of mailing of the international search report 26 March 2015 (26.03.2015)
Name and mailing address of the ISA/		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.