

(12) МЕЖДУНАРОДНАЯ ЗАЯВКА , ОПУБЛИКОВАННАЯ В
СООТВЕТСТВИИ С ДОГОВОРОМ О ПАТЕНТНОЙ КООПЕРАЦИИ (PCT)

(19) Всемирная Организация
Интеллектуальной Собственности
Международное бюро



(43) Дата международной публикации
20 декабря 2018 (20.12.2018)

WIPO

(10) Номер международной публикации
WO 2018/231089 A 1

- (51) Международная патентная классификация :
C07H 15/00 (2006.01) A 61K 31/70 (2006.01)
C40B 40/12 (2006.01) A 61P 41/00 (2006.01)
A 61P 31/12 (2006.01)
- (21) Номер международной заявки : PCT/RU20 17/000422
- (22) Дата международной подачи :
16 июня 2017 (16.06.2017)
- (25) Язык подачи : Русский
- (26) Язык публикации : Русский
- (72) Изобретатели ; и
- (71) Заявители : ФАРБЕР , Борис Славинович (FARBER, Boris Slavinovich) [RU/RU]; проспект Кутузовский , 24, кв. 130А Москва , 121 15 1, Moscow (RU). ФАРБЕР , Софья Борисовна (FARBER, Sof'ya Borisovna) [RU/RU]; проспект Кутузовский , 24, кв. 130А Москва , 121 15 1, Moscow (RU).
- (72) Изобретатель : МАРТЫНОВ , Артур Викторович (MARTYNOV, Artur Viktorovich); ул. Корчагинцев , 1, кв. 18 г. Харьков , 61171, g. Har'kov (UA).
- (74) Агент : ВАСИЛЬЕВА , Галина Семеновна (VASYL'EVA, Galina Semenovna); а/я 121, Санкт -Петербург , 193 168, St.Petersburg (RU).
- (81) Указанные государства (если не указано иначе, для каждого вида национальной охраны) : АЕ, АG, АL, АМ, АО, АТ, АU, АZ, ВА, ВВ, ВG, ВН, ВR, ВW, ВY, ВZ, СA, СH, СL, СN, СO, СR, СU, СZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(54) Title: BIOLOGICALLY ACTIVE COMBINATORIAL POLYSACCHARIDE DERIVATIVES

(54) Название изобретения : БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ КОМБИНАТОРНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ПОЛИСАХАРИДОВ

(57) Abstract: Field of use: The invention relates to organic and bio-organic combinatorial chemistry, specifically to new combinatorial libraries of polysaccharide derivatives and to supramolecular structures based thereon, which have high biological activity when they are used without being separated into individual components. The essence of the invention is a new combinatorial library of biologically active polysaccharide derivatives and a supramolecular structure based thereon, as well as pharmaceutical compositions based thereon that have a hemostatic, wound-healing, antiviral, and immunomodulatory effect and that contain, as the principal active substance, a whole unseparated combinatorial mixture of substituted glucopyranose polymer derivatives obtained by the simultaneous combinatorial modification of a polysaccharide by at least two covalent modifiers, and as a result of the synthesis a combinatorial mixture forms that has the maximum number of combinations of modified polysaccharide derivatives, and the biologically active substances used to produce the pharmaceutical composition are a whole combinatorial mixture of polysaccharide derivatives in the form of a supramolecular structure, without separation into individual components. Technical result: modified combinatorial polysaccharide derivatives that have a hemostatic, wound-healing, antiviral, and immunomodulatory effect and other properties and on the basis of which a medicinal, veterinary, agrochemical, or cosmetic product can be obtained that has a broad spectrum of activity. The agent has a broad spectrum of action and low toxicity, and is suitable for industrial production.

(57) Реферат : Область применения : Изобретение относится к органической и биорганической комбинаторной химии , а именно , к новым комбинаторным библиотекам производных полисахаридов и супрамолекулярным структурам на их основе , которые при использовании без разделения на отдельные компоненты обладают высокой биологической активностью . Суть изобретения новая комбинаторная библиотека и супрамолекулярная структура на ее основе из биологически активных производных полисахаридов , а также фармацевтические композиции на их основе с кровоостанавливающим , ранозаживляющим , антивирусным и иммуномодулирующим действием , содержащей в качестве основного действующего вещества неразделенную цельную комбинаторную смесь замещенных производных полимера глюкопиранозы , полученную одновременной комбинаторной модификацией полисахарида как минимум двумя ковалентными модификаторами , в результате синтеза образуется комбинаторная смесь с максимальным количеством комбинаций модифицированных производных полисахарида , а в качестве биологически активных веществ для получения фармацевтической композиции используют цельную комбинаторную смесь производных полисахарида в виде супрамолекулярной структуры без разделения на индивидуальные компоненты . Технический результат : модифицированные комбинаторные производные полисахаридов с кровоостанавливающим , ранозаживляющим , антивирусным и иммуномодулирующим действием и др. свойствами на основе которых может быть получен лекарственный , ветеринарный , агрохимический или косметический препарат с широким спектром активности . Средство имеет широкий спектр действия , мало токсично и доступно для промышленного производства .

WO 2018/231089 A1

(84) Указанные государства (если не указано иначе, для каждого вида региональной охраны) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), евразийский (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), европейский патент (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Опубликована :

- с отчётом о международном поиске (статья 21.3)
- с изменённой формулой изобретения (статья 19(1))

Биологически активные комбинаторные производные полисахаридов

Область техники

5 Изобретение относится к органической и биоорганической комбинаторной химии, а именно, к новым комбинаторным библиотекам производных полисахаридов и супрамолекулярным структурам на их основе, которые при использовании без разделения на отдельные компоненты обладают высокой биологической активностью.

10 Предшествующий уровень техники

Терминология

15 Фармацевтическая композиция с гемостатическим действием — смесь нескольких веществ, в т. ч. нескольких биологических активных кровоостанавливающих и ранозаживляющих, а также нескольких вспомогательных и формообразующих веществ в виде стерильного порошка для местного применения, которая может применяться в том числе для ускорения заживления ран, остановки кровотечений как при капиллярных, венозных так и при артериальных кровотечениях благодаря способности быстро набухать в ране и тампонировать ее. Аналогом предложенного средства является препарат «Целокс» (Celox), способный всасывать кровь из раны и превращаться в гель, тем самым закрывая открытые кровотечения.

25 Карбоксилированное производное полимера глюкопиранозы — $[C_6H_7O_2(OH)_{3-x}(O-R-COOH)_x]_n$, где $x = 0,05-3$, $R = -CH_2-$; $-CO-CH_2-CH_2-$; $-CO-CH=CH-$ и др.) — производное полимера глюкопиранозы (Рис. 1), в котором карбоксилирование остатков глюкозы ведут путем введения карбоксильной группы ($-COOH$) алкилированием или ацилированием гидроксильных остатков глюкозы (глюкопиранозы); мономеры глюкопиранозы соединены между собой 1,4-гликозидными связями. Модификация спиртовых гидроксильных групп глюкопиранозы может быть осуществлена с разной степенью замещения ($x = 0,08-3$) путем карбоксилирования (карбоксицеллюлоза или карбоксикрахмал). Для карбоксилирования полисахаридов могут быть использованы малеиновый, янтарный, фталевый и другие ангидриды ди- и поли-карбоновых кислот, а для

алкилирования такие вещества как монохлоруксусная кислота (образуются при этом карбоксиметилцеллюлоза либо карбоксиметилкрахмал).

5 Целлюлоза - один из самых распространенных природных полимеров полисахаридной природы , главная составная часть клеточных стенок растений , обуславливающая механическую прочность и эластичность растительных тканей . Макромолекулы целлюлозы построены из элементарных звеньев D-глюкозы , соединенных 1,4-бета -гликозидными связями в линейные неразветвленные цепи . Средняя степень полимеризации целлюлозы (число гликозидных остатков) изменяется в широких пределах - от нескольких сотен (для 10 целлюлозы вискозного волокна она составляет 300-500) до 10- 14 тыс . (для целлюлозы хлопкового волокна и лубяных волокон). Целлюлоза имеет сложную надмолекулярную структуру . Первичный элемент - микрофибрилла , состоящая из нескольких сотен макромолекул и имеющая форму спирали (толщина 35-100, длина 500-600 нм и выше).

15 Карбоксиметилцеллюлоза - (КМЦ , целлюлозогликолевая кислота , $[C_6H_7O_2(OH)_3 \cdot x(OCH_2COOH)]_n$, где $x = 0,08-1,5$) — производное целлюлозы , в котором карбоксилирование целлюлозы ведут путем введения карбоксиметильной группы ($-CH_2COOH$) через ковалентную связь с гидроксильными группами глюкозных мономеров . На- карбоксиметилцеллюлоза применяется в качестве пластификатора , загустителя , 20 ресорбента . В качестве загущающего агента входит в состав зубной пасты , пищевых продуктов , косметики , лекарственных препаратов .

Карбоксипропилцеллюлоза - КПЦ , производное целлюлозы , в котором карбоксилирование целлюлозы ведут путем введения карбоксипропильной группы ($-CH_2-CH_2-CH_2-COOH$) 25 через ковалентную связь с гидроксильными группами глюкозных мономеров . Используется в покрытиях таблеток и как пролонгирующее вспомогательное вещество при производстве различных лекарственных форм препаратов .

Карбоксиметилкрахмал - (CMS) представляет собой модифицированный крахмал , 30 простой эфир крахмала , водорастворимый анионный полимер . Не имеет запаха , нетоксичен , имеет линейную форму при степени замещения выше 0,2 или более растворим в воде . Формула : $[C_6H_7O_2(OH)_2OCH_2COONa]$. Может быть использован как эмульгатор , загуститель , диспергирующий агент , стабилизатор , клеящее вещество , пленкообразующий

агент, который широко используются в нефтяной, текстильной, химической, табачной, бумажной, строительной, пищевой, фармацевтической и других отраслях промышленности. Обычно используется его натриевая соль, также известная как (CMS-Na). Представляет собой белый или желтый порошок, без вкуса и запаха, нетоксичен, легко поглощает влагу.

5 Растворим в спирте, эфире, хлороформе и других органических растворителях.

Комбинаторное производное полисахарида (КПП) - полученное согласно примеров данного изобретения производное полисахарида, содержащее неразделяемую супрамолекулярную смесь из разных комбинаторно модифицированных полисахаридов.

10

Препараты, на основе производных целлюлозы

Вследствие наличия в элементарных звеньях макромолекулы гидроксильных групп целлюлоза легко этерифицируется и алкилируется; эти реакции широко используются в промышленности для получения простых и сложных эфиров целлюлозы. Многие производные целлюлозы способны образовывать эластичные пленки, что обуславливает их применение в производстве разнообразных лекарственных средств.

15

Для процессов подготовки методом обратного осмоса воды высокого качества (в том числе и в медицинских целях) выпускают несколько марок ацетилцеллюлозных мембран (серия МГА), которые имеют селективность по хлориду натрия от 70 до 90%.

20

Ультрацеллюлозные мембраны (размер пор от 5 до 50 нм) на основе ацетата целлюлозы применяют для очистки и концентрирования белков, ферментов, антибиотиков. Микрофльтрационные мембраны (размер пор от 100 до 1000 нм) используют в микробиологических, биологических и физико-химических анализах, для очистки растворов лекарственных препаратов от микроорганизмов, стерилизующей фильтрации, электрофоретического разделения белков сыворотки крови и других высокомолекулярных соединений.

25

Перспективным является применение ацетилцеллюлозы (АЦ) для микрокапсулирования низко- и высокомолекулярных лекарственных препаратов. Обычно полимерные микрокапсулы имеют размеры порядка десятков или сотен микрон, а толщина мембраны составляет сотые или десятые доли микрон. Микрокапсулированные лекарственные препараты (размер микрокапсул менее 20 мкм) вводятся в мазевые основы, используются для приготовления сиропов и других жидких лекарственных форм. Микрокапсулирование применяется при приготовлении инъекционных смесей в виде

30

суспензий микрокапсул для внутримышечного и подкожного введения с контролируемым высвобождением .

Использование ацетилцеллюлозы для микрокапсулирования лекарственных препаратов позволило получить микрокапсулы со скоростью высвобождения препарата ,
5 зависящей от размера микрокапсулы .

Ацетаты целлюлозы используются в качестве полимерной проницаемой оболочки при иммобилизации ферментов (глюкооксидазы , инвертазы , эстеразы и др.), а также полиферментных систем (глюкозооксидазы и каталазы , глюкозооксидазы и пероксидазы).
10 С использованием триацетата целлюлозы получены волокнистые иммобилизованные ферменты .

В производстве таблеток АЦ используется для создания пленки , предохраняющей лекарственное вещество от воздействия внешней среды , а также в качестве связывающего и гранулирующего вещества .

Водорастворимая АЦ применяется для покрытия таблеток различных препаратов
15 (глюкозы , терпингидрата , асфена , аскофена , амидопирин и др.) и служит защитной оболочкой , обеспечивая пролонгированное действие лекарственного вещества .
Пленкообразующие свойства метилцеллюлозы (МЦ) позволяют использовать ее в качестве защитной оболочки лекарственных веществ для энтерального или местного применения .
Путем растворения или суспендирования лекарственных веществ различного назначения в
20 растворе МЦ с концентрацией полимера до 60 % получены лекарственные средства однократной дозировки в виде пленок толщиной 0,05-1 мм .

Из метилгидроксипропилцеллюлозы (МГПЦ) изготавливают пленочные покрытия для желудочнорастворимых твердых лекарственных форм .

Фталил , ацетилфталил , ацетилсущинил — производные целлюлозы (выпускаются японскими фирмами) широко используются в производстве лекарственных средств .
25 Оболочка таблеток из таких полимеров не растворяется в желудке (рН = 1,4) и защищает лекарственное вещество от вредного воздействия содержимого желудка . Попав в кишечник (рН = 6,7-7,4), оболочка таблетки растворяется , что позволяет лекарству быстро всосаться в кровь .

Натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы (Na-КМЦ) может использоваться в качестве защитной оболочки суппозиторий , предназначенных для употребления в местах с жарким климатом . Таблетки с хорошим внешним видом и удовлетворительными характеристиками по прочности и распадаемости в организме обычно получают при

использовании (1-8) % растворов Na-КМЦ .Алюминиевая соль КМЦ в виде 1-5% водного раствора применяется для изготовления быстро распадающихся вагинальных таблеток .

5 Пленки Na-КМЦ обладают выраженным стимулирующим действием на репаративные процессы в инфицированных ранах кожи ,ускоряют образование и созревание грануляционной ткани , активно влияют на процессы фибриллогенеза . Эффективным средством для лечения длительно не заживающих радиационных ожогов является мазь , представляющая собой гель Na-КМЦ , содержащий противовоспалительное вещество — фодомос .Мази на основе Na-КМЦ применяются в качестве светозащитных , покрывающих и охлаждающих паст . Бактерицидные жидкости , содержащие Na-КМЦ , образуют 10 смываемые водой пленки и могут использоваться для обработки наружных ран .

Чистые гидрогели метилцеллюлозы используются как высыхающая мазь или влажная повязка , а также как защитные мази при работе с органическими растворителями и агрессивными средами . Для лечения кожных заболеваний , ожогов и местного обезболивания применяются мази на основе МЦ , содержащие анестетики , антибиотики , 15 соли серебра , ртути , цинка и др .

Для лечения ран и ожогов предложено использование монокарбоксгщеллюлозы (МКЦ) в виде седиментационно устойчивой водной суспензии , которая образует на подсыхающей раневой поверхности пленку .Такая форма МКЦ может рассматриваться как биоматериал , сочетающей в себе свойства раневого покрытия и лечебного средства , 20 стимулирующего заживление .Ускорение заживления ожогов с помощью МКЦ составляет 35 % . Диапазон лечебного действия суспензии может быть значительно расширен за счет введения в ее состав биологически активных веществ .

Поскольку фармакологическое действие многих лекарственных веществ определяется наличием в их составе соответствующих химических групп , реализован 25 новый подход к синтезу лекарственных полимеров с использованием химических свойств производных целлюлозы . Заданный характер фармакологического действия придается полимеру введением в полимерную цепочку соответствующих химических групп .

Пролонгированное действие лекарств может быть достигнуто и путем их присоединения к полимерной матрице относительно лабильной ковалентной связью , в частности 30 сложноэфирной или амидной . Для получения такого рода производных реакцию фиксации лекарственного средства проводят с хлорангидридом карбоксиметилцеллюлозы .

Ранее комбинаторных производных полисахаридов не получали , двойной модификации не проводили и биологические свойства таких соединений не известны .

Некрахмальные полисахариды

С химической точки зрения углеводы разделяют на «сахара» (моно- и дисахариды), олигосахариды и полисахариды. К олиго- и полисахаридам относятся соединения, молекулы которых построены из остатков моносахаридов, соединенных O-гликозидными связями. Разграничение олигосахаридов и полисахаридов не может быть сделано строго, но с методической точки зрения целесообразно считать олигосахаридами соединения, содержащие до 8-10 моносахаридных звеньев, а к полисахаридам относить более высокомолекулярные сахара. Главными компонентами пищевых волокон являются полисахариды, образующие как линейные, так и разветвленные цепи. Важную роль в определении физических свойств и способности полисахаридов образовывать ассоциации с другими полисахаридами и белками играют боковые углеводные цепи и конфигурация их гликозидных связей. Часть полисахаридов, состоящих из остатков D-глюкозы, соединенных 1→4 и 1→6 α-гликозидными связями (крахмалы), гидролизуются амилазами слюнных и панкреатических желез млекопитающих, абсорбируется в тонкой кишке и вместе с моно- и дисахаридами составляет так называемые доступные, или усваиваемые, углеводы. Другая часть полисахаридов (некрахмальные полисахариды) не гидролизуются амилазами, не абсорбируется в кровь и частично или полностью подвергается ферментной деградации микрофлорой толстой кишки. Кроме некрахмальных полисахаридов, ряд олигосахаридов (раффиноза, стахиоза, вербаскоза), фрукто-олигосахариды, высокомолекулярные фруктаны (инулины), полиспирты (сорбит, ксилит, маннит и др.), полидекстроза (синтетический полимер глюкозы), а также резистентный крахмал в большей или меньшей степени не расщепляются в тонкой кишке, ферментируются кишечной микрофлорой и физиологически имеют много общего с пищевыми волокнами. Более того, некоторые авторы к пищевым волокнам относят пентозаны, аминоксахара грибов и членистоногих, неуглеводное соединение лигнин и неперевариваемые белки. Следовательно, термин «пищевые волокна» включает более широкий круг веществ, чем неусваиваемые углеводы и некрахмальные полисахариды. К наиболее изученным некрахмальным полисахаридам можно отнести пектины, альгинаты, каррагинаны, хитозаны и фукоиданы. Пектины входят в состав клеточной стенки высших растений, где они выполняют функции цементирующего материала для волокон целлюлозы. Многие растения содержат пектины в межклеточном слое между первичными клеточными стенками, где они участвуют в регуляции движения воды и клеточных соков. Первичными

блоками полимерной цепи пектинов являются остатки D-галактуроновой кислоты, которые соединены друг с другом $\alpha(1\rightarrow4)$ -связью. Образованные таким образом цепи насчитывают несколько сотен галактуроновых блоков. Между блоками галактуроновой кислоты на разных расстояниях друг от друга располагаются остатки L-рамнозы, соединенные с галактуроновой кислотой $\alpha(1\rightarrow2)$ -связью, вследствие чего цепь пектина в этом месте
5 изгибается примерно на 90° . От основной линейной цепи рамногалактуронана берут начало боковые цепи, состоящие из нейтральных Сахаров, чаще всего арабинозы и галактозы. Арабинановая, галактонановая и арабиногалактонановая боковые цепи соединены с рамнозой $(1\rightarrow4)$ -связью. Остатки арабинозы соединяются между собой $(1\rightarrow5)$ -связью, а галактозные $(1\rightarrow4)$, хотя встречаются $(1\rightarrow3)$ и $(1\rightarrow6)$ -связи. Встречаются также D-галактопираноза, L-арабинофураноза, D-ксилопираноза, D-глюкопираноза и L-фукопираноза и очень редко. D-апиоза, 2-0- метил -D-ксилоза и 2-О-метилфукоза. Обычно боковые цепи из нейтральных Сахаров имеют длину от 8 до 20 молекул, и на их долю приходится 10.15 % массы пектина. Различают высокометоксилированные и
15 низкометоксилированные пектины. Метоксилированным пектин считается в том случае, когда карбоксильные группы остатков галактуроновой кислоты этерифицированы метиловым спиртом. Чем больше таких групп в полимерной цепи пектина, тем выше степень этерификации, или метоксилирования, и наоборот. Высокометоксилированные пектины характеризуются степенью этерификации более 50 % (обычно от 60 до 80 %), а низкометоксилированные менее 50 % (обычно 30-40 %) [6]. Альгиновая кислота и ее соли встречаются главным образом в морских бурых водорослях (Phaeophyta), в которых они составляют основную часть полисахаридов, достигая 40 % сухой массы, а также в красных водорослях семейства Corallinaceae. Сейчас известно, что бактерии, принадлежащие к родам Pseudomonas и Azotobacter, содержат ацетилированные альгинаты. В талломах водорослей фикоколлоиды являются первичными компонентами клеточных стенок и
25 внеклеточного матрикса, играя роль «скелета» и обеспечивая прочность и гибкость ткани. Альгиновая кислота состоит из остатков β -D-маннуровой и α -L-гулуриновой кислот, соединенных $(1\rightarrow4)$ -связями. Полимерная нить альгинатов состоит из гомополимерных полиманнуриновых и полигулуриновых областей, или блоков, между которыми могут находиться чередующиеся остатки обеих кислот. С поливалентными металлами альгиновая кислота образует несколько типов альгинатов. У полных альгинатов все карбоксильные группы связаны с катионами. Такие альгинаты нерастворимы в воде. Неполные альгинаты могут быть растворимы и нерастворимы в воде. В то же время полные альгинаты
30

одновалентных металлов хорошо растворимы в воде и образуют вязкие, клейкие растворы. К растворимым относятся соли калия, натрия, а также магния и аммония. Альгинаты могут быть монокатионными, когда в образовании альгината участвуют катионы одного металла, и поликатионными с катионами нескольких металлов. Источником каррагинана являются

5 красные водоросли, относящиеся к семействам Gigartinaceae, Solieriaceae, Rhabdoniaceae, Hypneaceae, Phyllophoraceae, Petrocelidaceae, Caulacanthaceae, Cystocloniaceae, Rhodophyllidaceae, Furcellariaceae, Tichocarpaceae и Dicranemataceae. Каррагинаны представляют собой сульфатированные галактаны, содержащие D-галактозу и ее производные, остатки которых соединены регулярно чередующимися $\beta(1\rightarrow4)$ - и $\alpha(1\rightarrow3)$ -

10 связями. 4-О-замещенный остаток каррагинанов может быть, как галактозой, так и ее 3,6-ангидропроизводным, а различные гидроксильные группы могут быть сульфатированы. Регулярные полисахариды, молекулы которых построены из дисахаридных повторяющихся звеньев одного типа, получили собственные названия. Так, установлено несколько «предельных», или идеализированных, структур каррагинана, что позволило

15 разделить их на типы, различающиеся содержанием 3,6-ангидро-галактозы, местоположением и количеством сульфатных групп. В соответствии со структурными особенностями повторяющегося звена выделяют 6 главных типов каррагинана: κ , λ , ι , ν , μ и θ . Каррагинаны μ , ν и λ могут быть превращены соответственно в κ -, ι - и θ -каррагинаны щелочной или ферментативной модификацией. Однако реальные природные полисахариды

20 редко соответствуют таким идеализированным структурам; обычно наблюдается комбинация двух или более предельных структур в одной полимерной молекуле. Согласно модифицированной номенклатуре галактанов красных водорослей для обозначения гибридной или «замаскированной» структуры полисахарида используется кодовая система заглавных букв [33]. Предшественником хитозана является полимер N-ацетил-D-

25 глюкозамин (хитин), который синтезируется у животных, главным образом у ракообразных, моллюсков и насекомых, являясь важным компонентом экзоскелета, и у некоторых грибов в качестве основного фибриллярного полимера клеточной стенки. Хитозан как полимер $\beta(1\rightarrow4)$ -2-ацетиамидо-2-дезоксид-D-глюкопиранозы получают путем щелочного деацетилирования хитина. Фукоиданы являются сложными

30 сульфатированными полисахаридами, встречающимися в бурых морских водорослях, в яйцах морских ежей и в стенке тела кукумарий. Стержневая цепь фукоидана состоит из остатков L-фукозы, соединенных $\alpha(1\rightarrow3)$ -связями с сульфатными группами в 4-м положении на некоторых остатках фукозы. К этому полимеру присоединяются другие

остатки фукозы, формирующие точки ветвления через $\alpha(1\rightarrow 2)$ - или $\alpha(1\rightarrow 4)$ -связи. Отмечено также присутствие в фукоидане небольшого количества других Сахаров, таких как ксилоза, галактоза, манноза и глюкуроновая кислота.

- 5 Известна фармацевтическая композиция (US Patent 5773033 "Autologous isolated and purified fibrinogen with biocompatible anionic or cationic chitosan polymer"), представляющая собой хитозан /фибриноген содержащие гемо статические агенты. Запатентованы агенты, содержащие фибриноген и хитозан имеющие сильные гемостатические свойства и применимые в ургентных случаях для остановки кровотечения из поврежденных сосудов.
- 10 Хитозан и фибриноген наносят на тканевую основу и при кровотечениях подобную ткань наносят на рану, останавливая тем самым кровотечение.

Недостатком данного изобретения является наличие дорогостоящего белка фибриногена из донорской крови в лиофилизированном виде. Кроме того, хитозан и его соли имеют очень ограниченную степень набухания и скорость начала действия. Такие композиции не могут применяться для ургентной остановки тяжелых огнестрельных, в т.ч. абдоминальных, кровотечений в связи с началом действия через 15-20 минут. Через этот промежуток времени при артериальных кровотечениях пациент теряет более 50% крови и погибает. Кроме того, эти композиции не способны активировать регенерацию тканей.

20 Данные недостатки устраняются путем применения комбинаторных смесей бинарно модифицированных производных полисахаридов, в том числе в виде солей. Невысокая себестоимость этих продуктов, образование солей между ними и карбокси-полисахаридным носителем при набухании, высокая скорость набухания и высокий процент захвата жидкости обуславливает возможность применения данной композиции в виде порошка при внесении в рану для остановки ургентных, в т.ч. артериальных кровотечений. Суперэффектом предлагаемых производных полисахаридов является практически мгновенное набухание (5 секунд для поглощения 10 объемов жидкости).

Раскрытие изобретения

30 Целью изобретения является создание комбинаторной смеси биологически активных производных полисахаридов и фармацевтических композиций на их основе с гемостатическим, ранозаживляющим, антивирусным, иммуномодулирующим действием, способной проявлять быстрый эффект в экстренных случаях при разрывах сосудов, в т.ч.

огнестрельных и в т.ч. при артериальных кровотечениях при местном применении в виде стерильного порошка .

Поставленная цель достигается путем создания неразделяемой комбинаторной смеси биологически активного производного полисахарида (полисахаридов) и фармацевтических композиций на их основе с кровоостанавливающим , ранозаживляющим , 5 противовирусным и иммуномодулирующим действием , содержащей в качестве основного действующего вещества неразделяемую супрамолекулярную комбинаторную смесь замещенных производных полимера глюкопиранозы , полученную одновременной комбинаторной модификацией полисахарида как минимум двумя ковалентными 10 модификаторами , в результате синтеза образуется комбинаторная смесь с максимальным количеством комбинаций модифицированных производных полисахарида , а в качестве биологически активных веществ для получения фармацевтической композиции используют цельную комбинаторную смесь производных полисахарида в виде супрамолекулярной структуры без разделения на индивидуальные компоненты .

15

Дополнительными отличиями предлагаемого изобретения является то, что - мольное соотношение полисахарида и ковалентных модификаторов в реакции комбинаторного синтеза рассчитывают по формулам :

$$O) \quad k = n \times (2^n - 1)$$

$$20 \quad (2) \quad m = 4 \times (3 \times 2^{n^2} - 1),$$

где

n = количество доступных для замещения групп в полисахариде (в пересчете на мономер - производное глюкопиранозы);

t = количество молей исходного полисахарида и количество разных молекул

25 комбинаторных производных после синтеза (в пересчете на производное глюкопиранозы);

k = количество молей каждого из двух модификаторов в реакции комбинаторного синтеза для получения максимального количества разных производных ;

- в качестве исходного полимера для последующего комбинаторного бинарного синтеза 30 используют целлюлозу , карбоксиметилцеллюлозу , карбоксиметилпропилцеллюлозу , гепарин , хитозан , сукцинилхитозан , карбоксиметилхитозан , крахмал , карбоксиметилкрахмал , метилкрахмал , гепарин ;

- дополнительно содержит основание аминокислоты лизина ;

- фармацевтические композиции на основе полученных комбинаторных производных обладают иммуномодулирующим , противовирусным , ранозаживляющим и кровоостанавливающим действием .

5 Краткое описание чертежей

Фиг .1. Химическая структура гепарина (CAS 9041-08-1, Mr= 1134.899 g/mol, n=6), содержит 6 доступных для модификации равноценных гидроксильных групп в структуре глюкопиранозы .

10

Варианты осуществления изобретения

Пример 1. Получение комбинаторной смеси К 1 на основе производных крахмала

15

В смеситель добавляют 0,1-90 кг крахмала , добавляют 1-900 л горячей воды , перемешивают раствор до полного растворения полисахарида , раствор охлаждают до комнатной температуры , всыпают 0,02-10 кг янтарного ангидрида и 0,02-10 кг малеинового ангидрида , раствор перемешивают до полного растворения ангидридов . К раствору приливают 1-500 л 96% этанола (или метанола) , оставляют на сутки , осадок отделяют фильтрованием и высушивают , далее используют как вариант К 1 в фармацевтических композициях .

20

Вместо крахмала могут быть использованы другие незамещенные или монозамещенные производные крахмала : карбоксикрахмала , сукцинилкрахмал , малеинилкрахмал , карбоксиметилкрахмал и их смесь . Также на основе полученной комбинаторной смеси крахмала могут быть получены соли с металлами либо аминами стандартными методами , известными ординарному специалисту в своей области .

25

Пример 2. Получение комбинаторной смеси К 2 на основе производных целлюлозы

30

В смеситель добавляют m моль кароксиметилцеллюлозы (в пересчете на мономер - монокарбоксиметил глюкозу) , добавляют 5т моль горячей воды и 5т моль этанола , перемешивают раствор до полного растворения полисахарида , раствор охлаждают до комнатной температуры , всыпают k моль янтарного ангидрида и вливают k моль

метилхлорида, раствор перемешивают до полного растворения модификаторов. К раствору приливают 5т моль этанола 96% этанола (или метанола), оставляют на сутки, осадок отделяют фильтрованием и высушивают, далее используют как вариант К2 в фармацевтических композициях.

5 Расчет мольного соотношения модификаторов и полисахарида ведут по формулам:

$$(1) \quad k = n \times (2^n - 1)$$

$$(2) \quad m = 4 \times (3 \times 2^{n^2} - 1),$$

где

п=количество доступных для замещения групп в полисахариде (в пересчете на мономер -

10 производное глюкопиранозы, п=4 для глюкопиранозы, средняя длина цепи 10 звеньев, соответственно для КМЦ п=40);

т = количество молей исходного полисахарида и количество разных молекул

комбинаторных производных после синтеза (в пересчете на производное глюкопиранозы)

$$t = 3298534883324 \quad (3,3 \times 10^{12})$$

15 k- количество молей каждого из двух модификаторов в реакции комбинаторного синтеза для получения максимального количества разных производных (для КМЦ = 43980465111000 или $4,4 \times 10^{13}$ моль каждого модификатора)

Это означает, что для получения комбинаторной смеси с максимальным количеством разных производных, которых к смеси будет 3298534883324 молекул (или моль), нужно

20 взять 3298534883324 (или $3,3 \times 10^{12}$) моль полисахарида (со средним количеством звеньев цепи = 10 по 4 доступных гидроксильных групп в каждом) и по 43980465111000 моль каждого из модификатора ($4,4 \times 10^{13}$ моль). Таким образом, мольное соотношение полисахарид : модификатор №1: модификатор №2 составляет 1:13:13. При этом образуется комбинаторная смесь из $3,3 \times 10^{12}$ разных молекул производных полисахарида с разным

25 положением заместителей и разной степенью замещения молекул. Такая смесь физически не может быть разделена на отдельные компоненты и в водных растворах образует сложную супрамолекулярную структуру через водородные и ионные связи. Биологическая активность производных обусловлена именно супрамолекулярной структурой, а не индивидуальным компонентом. Такая структура из множества похожих, но отличающихся

30 полисахаридов напоминает смесь иммуноглобулинов и гликопротеидных адгезинов с иммуномодулирующим эффектом. Существующие в настоящее время методы физико-химического анализа не в состоянии идентифицировать $3,3 \times 10^{12}$ разных молекул в одной смеси. Отличительным признаком данной структуры является только наличие необычных

биологических (фармакологических) свойств в отличие от исходных полисахаридов. Применение классических физико-химических методов через определение мономерной последовательности, мест замещения не актуальны, т.к. структура полисахарида изначально нами была известна и доказана, а определять места замещения не имеет смысла, т.к. замещение идет по принципу комбинаторики в случайном порядке, а производные по количеству распределены согласно нормальному распределению. Медианы нормального распределения могут быть смещены вправо либо влево в зависимости от степени доступности той или иной группы, но физико-химические анализы подобных структур пока не разработаны. При изменении мольного соотношения полисахарид : модификаторы в сторону увеличения количества модификаторов, более чем по 13 моль на 1 моль полисахарида вместо разных комбинаторных производных синтезируются полностью замещенные производные в значительно меньшем количестве. Аналогичная картина наблюдается при уменьшении количества модификаторов менее 13 моль на 1 моль полисахарида. В этом случае также наблюдается значительное уменьшение количества разнообразных производных за счет наличия незамещенных производных. Максимальной активностью обладают не индивидуальные производные, а супрамолекулярная структура из них. Эта структура стабилизируется только на пике синтеза максимального разнообразия производных, то есть при соотношении полисахарид : модификаторы как 1:13:13.

Вместо карбоксиметилцеллюлозы могут быть использованы другие незамещенные или монозамещенные производные целлюлозы : карбоксикрахмала, сукцинилкрахмал, малеинилкрахмал, карбоксиметилкрахмал или их смесь : сукцинилцеллюлоза, малеинилцеллюлоза, карбоксиметилцеллюлоза, пропилцеллюлоза, фталилцеллюлоза и их смесь.

Также на основе полученной комбинаторной смеси целлюлозы могут быть получены соли с металлами либо аминами стандартными методами, известными ординарному специалисту в своей области.

Пример 3. Получение комбинаторной смеси К 3 на основе производных гепарина

В смеситель добавляют m моль (CAS 9041-08-1, $M_r = 1134.899$ g/mol, $n=6$) гепарина (Фиг. 1.), добавляют 5т моль горячей воды и 5т моль этанола, перемешивают раствор до полного растворения полисахарида, раствор охлаждают до комнатной температуры, всыпают k моль

янтарного ангидрида и вливают к моль малеинового ангидрида, раствор перемешивают до полного растворения модификаторов. К раствору приливают 5т моль этанола 96% этанола (или метанола), оставляют на сутки, осадок отделяют фильтрованием и высушивают, далее используют как вариант К 2 в фармацевтических композициях.

5 Расчет мольного соотношения модификаторов и полисахарида ведут по формулам:

$$O) \quad k = n \times (2^n - 1)$$

$$(2) \quad m = 4 \times (3 \times 2^{n-2} - 1),$$

где

п=количество доступных для замещения групп в полисахариде (для данного полисахарида

10 гепарина п=6);

т = количество молей исходного полисахарида и количество разных молекул

комбинаторных производных после синтеза (для гепарина) m= 188

к=количество молей каждого из двух модификаторов в реакции комбинаторного синтеза для получения максимального количества разных производных (для гепарина = 378 моль

15 каждого модификатора)

Это означает, что для получения комбинаторной смеси с максимальным количеством разных производных, которых к смеси будет 188 производных гепарина, нужно взять 188 моля гепарина (с 6-ю доступными для модификации группами) и по 378 моль каждого из модификатора. Таким образом, мольное соотношение полисахарид : модификатор №1 :

20 модификатор №2 составляет 1 : 2 : 2. При этом образуется комбинаторная смесь из 188 разных молекул производных гепарина с разным положением заместителей и разной

степенью замещения молекул. Такая смесь в водных растворах образует сложную супрамолекулярную структуру через водородные и ионные связи. Биологическая

активность производных обусловлена именно супрамолекулярной структурой, а не

25 индивидуальным компонентом. Такая структура из множества похожих, но отличающихся

полисахаридов напоминает смесь иммуноглобулинов и гликопротеидных адгезинов с иммуномодулирующим

эффектов. В дальнейшем образцы К 1, К 2, К 3 были изучены на несколько видов биологической активности. Существующие в настоящее время методы

30 физико-химического анализа не в состоянии идентифицировать множество разных молекул

данной структуры является только наличие необычных биологических

(фармакологических) свойств в отличии от исходных полисахаридов. Также на основе

полученной комбинаторной смеси гепарина могут быть получены соли с металлами либо

аминами стандартными методами , известными ординарному специалисту в своей области .

Вместо гепарина могут быть использованы такие природные полисахариды : инулин , пектины , камеди , слизи , альгиновая кислота , хитозан .

5 ЯМР С 13: СН : s: 106,1; 105,8; 104,3; 95,4; 78,5; 77,0; 75,6; 79,5; 78,8; 86,8; 80,1; 77,5; 78,2; 71,8; 73,8; 69,2; 66,1; 58,1; 56,1; С : m 166,5 - 174,7; СН2: 62,2; 68,2; 29,5; 29,1; 23,6; СН: 134,9; 136,1

10 Исходя их ЯМР спектра можно с уверенностью сказать о наличии остатков янтарной и малеиновой кислот в комбинаторно смеси , а образование сложной супрамолекулярной структуры подтверждается наличием сплошного мультиплета полос в области 166,5-174,7. Аналогичная картина характерна для сложных супрамолекулярных структур катенанов и ротаксанов .

15 Для проверки противовирусной активности синтезированных производных гепарина с другими соотношениями компонентов в реакции комбинаторного синтеза изучали противовирусную активность производных скрининговым методом на моделях вируса гриппа H1N1 (Inf), референтного штамма вируса везикулярного стоматита (Vesic- VVS) и вируса герпеса 1 типа (Herp . - штам Л-2) в планшетах на культуре куриных фибробластов по степени деградации (цитопатический эффект, открепление от дна лунки). Степень «слущивания » клеток определяли по окраске культуры витальным красителем ,
20 концентрацию которого определяли спектрофотометрически относительно здорового монослоя и пустой лунки . Результаты исследований in vitro приведены в таблице 1.

25 Таблица 1. - Антивирусная активность супрамолекулярных комбинаторных производных гепарина К 3, полученных в реакции с разным мольным соотношением модификаторов

№ п/п	Мольные соотношения реагентов *			% цитопротекторного антивирусного действия **		
	m	k1	k2	Inf	Herp	Vesic
1	188	1512***	1512***	0	0	0
2	-II-	756	756	50	45	45
3	-II-	378	378	100	90	100
4	-II-	94	94	59	30	45
5	-II-	47	47	0	0	0

6	-II-	23	23	0	0	0
7	-II-	12	12	0	0	0
8	-II-	6	6	0	0	0
9	-II-	3	3	0	0	0
10	-II-	1	1	0	0	0
11	-II-	0	0	0	0	0
12	-II-	1512***	0	0	0	0
13	-II-	756	0	0	0	0
14	-II-	378	0	0	0	0
16	-II-	94	0	0	0	0
17	-II-	47	0	0	0	0
18	-II-	23	0	0	0	0
19	-II-	12	0	0	0	0
20	-II-	6	0	0	0	0
21	-II-	3	0	0	0	0
22	-II-	1	0	0	0	0
23	-II-	0	1512***	0	0	0
24	-II-	0	756	0	0	0
25	-II-	0	378	0	0	0
26	-II-	0	94	0	0	0
27	-II-	0	47	0	0	0
28	-II-	0	23	0	0	0
29	-II-	0	12	0	0	0
30	-II-	0	6	0	0	0
31	-II-	0	3	0	0	0
32	-II-	0	1	0	0	0
33	-II-	3024***	0	0	0	0
34	-II-	1512	1	0	0	0
35	-II-	756	3	0	0	0
36	-II-	378	6	0	0	0
37	-II-	94	12	0	0	0
38	-II-	47	23	40	35	30

39	-II-	23	47	0	0	0
40	-II-	12	94	0	0	0
41	-II-	6	378	0	0	0
42	-II-	3	756	0	0	0
43	-II-	1	1512	0	0	0
44	-II-	0	3024***	0	0	0

* m - количество молей гепарина в реакции комбинаторного синтеза ; к1 - количество молей янтарного ангидрида в реакции ; к2 - количество молей малеинового ангидрида в реакции ;

** % оставшегося монослоя клеток после инфицирования вирусами и замены культуры на исследуемый препарат в культуре после 48 часов инкубации в присутствии исследуемого

5 вещества , добавленного в предварительно подобранной концентрации ($ED_{90}=0,075$

мкг /мл);

*** максимальное мольное соотношение , при котором замещаются все группы в полисахариде , превышение этого соотношения приводит к тому , что в реакционной среде остаются непрореагировавшие модификаторы - янтарный ангидрид и малеиновый

10 ангидрид .

Как видно из таблицы 1, только при рассчитанном соотношении компонентов , когда образуется максимальное количество разных производных гепарина , образуется биологическая активная и эффективная супрамолекулярная структура (производное 3 или

15 К3), способная в дозе 0,075 мкг /мл полностью защищать монослой клеток (ED_{100}) от деградирующего цитопатического действия вирусов .

Пример 4. Получение фармацевтической композиции «К 1К»

20 В смеситель добавляют 0,1-90 кг комбинаторную смесь модифицированного крахмала (или его солей), добавляют 0,1-30 кг основания аминокислоты L-лизина , перемешивают до полной однородности , фасуют по 1-30 г в алюминиевые пакеты или стеклянные флаконы . Флаконы закупоривают резиновыми пробками и вальцуют алюминиевыми крышками , а

25 алюминиевые пакеты запаковывают на упаковочной машине . Флаконы и пакеты стерилизуют в автоклаве при стандартных условиях стерилизации ($120^{\circ}C$, 30 мин).

Соли комбинаторных производных получают известными способами , которые , как правило , включают смешивание К1 либо с фармацевтически приемлемой кислотой с

образованием соли присоединения кислоты, либо с фармацевтически приемлемым основанием с образованием соли присоединения основания. Является ли кислота или основание фармацевтически приемлемыми, может быть легко решено специалистом, квалифицированным в данной области техники, после принятия во внимание

5 определенного предполагаемого использования соединения. Например, не все кислоты и основания, которые являются приемлемыми для *ex vivo* применений, могут быть использованы для фармацевтических композиций, и не все кислоты, и основания, которые являются подходящими для локального использования, могут быть применены парентерально. В зависимости от предполагаемого использования, фармацевтически

10 приемлемые кислоты включают органические и неорганические кислоты, такие как муравьиная кислота, уксусная кислота, пропионовая кислота, молочная кислота, гликолевая кислота, щавелевая кислота, пировиноградная кислота, янтарная кислота, малеиновая кислота, малоновая кислота, коричневая кислота, серная кислота, соляная кислота, бромистоводородная кислота, азотная кислота, хлорная кислота, фосфорная кислота и

15 тиоциановая кислота, которые образуют соли аммония со свободными аминогруппами пептидов и конъюгатов. Особенно предпочтительной является, таким образом, пальмитиновая кислота для производства солей K1 изобретения. Фармацевтически приемлемые основания, которые образуют соли карбоксилатов со свободными карбоксильными группами K1 и функциональными эквивалентами, включают этиламин,

20 метиламин, диметиламин, триэтиламин, изопропиламин, диизопропиламин и другие моно-, ди- и триалкиламины, так же как ариламины. Кроме того, также включены фармацевтически приемлемые сольваты.

Фармацевтически приемлемые соли могут быть использованы в изобретении, например, соли неорганических кислот, такие как гидрохлориды, гидробромиды, фосфаты, сульфаты

25 и т.п.; и соли органических кислот, такие как ацетаты, пропионаты, малонаты, бензоаты и т.п. Полное обсуждение фармацевтически приемлемых наполнителей доступно в Фармацевтических Науках Ремингтона (Mack Pub. Co., N. J. 1991). Фармацевтически приемлемые носители в фармацевтических композициях могут содержать жидкости, такие как воду, соляной раствор, глицерин и этанол. Кроме того, вспомогательные вещества, такие

30 как увлажнитель или эмульгирующие вещества, вещества, создающие pH, и т.п., могут присутствовать в таких средах для лекарства. Как правило, парентеральные фармацевтические композиции готовят в качестве инъекций, или в качестве жидких растворов или суспензий; твердые формы, подходящие для растворения или образования

суспензии в жидких средах для лекарства, могут также быть приготовлены до инъекции. Липосомы включены в определение фармацевтически приемлемого носителя. Для терапевтического воздействия К 1 может быть получен как описано выше и применены к объекту, который нуждается в этом. К 1 могут быть введены в объект любым подходящим способом, предпочтительно в форме фармацевтической композиции, приспособленной к такому способу и в дозировке, которая является эффективной для предполагаемого лечения.

Пример 5. Получение фармацевтической композиции «К 2К»

10 В смеситель добавляют 0,1-90 кг комбинаторную смесь модифицированной целлюлозы (или ее солей), добавляют 0,1-30 кг основания аминокислоты L-лизина, перемешивают до полной однородности, фасуют по 1-30 г в алюминиевые пакеты или стеклянные флаконы. Флаконы закупоривают резиновыми пробками и вальцуют алюминиевыми крышками, а алюминиевые пакеты запаковывают на упаковочной машине. Флаконы и пакеты
15 стерилизуют в автоклаве при стандартных условиях стерилизации (120 °С, 30 мин).

Соли комбинаторных производных получают известными способами, которые, как правило, включают смешивание К 2 либо с фармацевтически приемлемой кислотой с образованием соли присоединения кислоты, либо с фармацевтически приемлемым основанием с образованием соли присоединения основания. Является ли кислота или
20 основание фармацевтически приемлемыми, может быть легко решено специалистом, квалифицированным в данной области техники, после принятия во внимание определенного предполагаемого использования соединения. Например, не все кислоты и основания, которые являются приемлемыми для *ex vivo* применений, могут быть использованы для фармацевтических композиций, и не все кислоты, и основания, которые
25 являются подходящими для локального использования, могут быть применены парентерально. В зависимости от предполагаемого использования, фармацевтически приемлемые кислоты включают органические и неорганические кислоты, такие как муравьиная кислота, уксусная кислота, пропионовая кислота, молочная кислота, гликолевая кислота, щавелевая кислота, пировиноградная кислота, янтарная кислота, малеиновая
30 кислота, малоновая кислота, коричневая кислота, серная кислота, соляная кислота, бромистоводородная кислота, азотная кислота, хлорная кислота, фосфорная кислота и тиоциановая кислота, которые образуют соли аммония со свободными аминокруппами пептидов и конъюгатов. Особенно предпочтительной является, таким образом,

пальмитиновая кислота для производства солей К₂ изобретения . Фармацевтически приемлемые основания , которые образуют соли карбоксилатов со свободными карбоксильными группами К₂ и функциональными эквивалентами , включают этиламин , метиламин , диметиламин , триэтиламин , изопропиламин , диизопропиламин и другие моно -,
5 ди- и триалкиламины , так же как ариламины . Кроме того , также включены фармацевтически приемлемые сольваты .

Фармацевтически приемлемые соли могут быть использованы в изобретении , например , соли неорганических кислот , такие как гидрохлориды , гидробромиды , фосфаты , сульфаты и т.п.; и соли органических кислот , такие как ацетаты , пропионаты , малонаты , бензоаты и
10 т.п. Полное обсуждение фармацевтически приемлемых наполнителей доступно в Фармацевтических Науках Ремингтона (Mask Pub. Co., N. J. 1991). Фармацевтически приемлемые носители в фармацевтических композициях могут содержать жидкости , такие как воду, соляной раствор , глицерин и этанол . Кроме того , вспомогательные вещества , такие как увлажнитель или эмульгирующие вещества , вещества создающие рН, и т.п., могут
15 присутствовать в таких средах для лекарства . Как правило , парентеральные фармацевтические композиции готовят в качестве инъекций , или в качестве жидких растворов или суспензий ; твердые формы , подходящие для растворения или образования суспензии в жидких средах для лекарства , могут также быть приготовлены до инъекции . Липосомы включены в определение фармацевтически приемлемого носителя . Для
20 терапевтического воздействия К₂ может быть получен как описано выше и применены к объекту , который нуждается в этом . К₂ могут быть введены в объект любым подходящим способом , предпочтительно в форме фармацевтической композиции , приспособленной к такому способу и в дозировке , которая является эффективной для предполагаемого лечения .

25

Пример 6. Получение фармацевтической композиции «КЗК »

В смеситель добавляют 0,1-90 кг комбинаторную смесь модифицированного гепарина (или его солей), добавляют 0,1-30 кг основания аминокислоты L-лизина , перемешивают до
30 полной однородности , фасуют по 0,05-0,1 г в стеклянные флаконы . Флаконы укупоривают резиновыми пробками и вальцуют алюминиевыми крышками . Флаконы стерилизуют в автоклаве при стандартных условиях стерилизации (120 ° С, 30 мин). Также можно изготовить стерильный 0,1-5% раствор на дистиллированной воде либо 0,9% растворе

хлорида натрия, расфасовать в ампулы или шприцы и простерилизовать автоклавированием (120 °С, 30 мин).

Соли комбинаторных производных получают известными способами, которые, как правило, включают смешивание КЗ либо с фармацевтически приемлемой кислотой с образованием соли присоединения кислоты, либо с фармацевтически приемлемым основанием с образованием соли присоединения основания. Является ли кислота или основание фармацевтически приемлемыми, может быть легко решено специалистом, квалифицированным в данной области техники, после принятия во внимание определенного предполагаемого использования соединения. Например, не все кислоты и основания, которые являются приемлемыми для *ex vivo* применений, могут быть использованы для фармацевтических композиций, и не все кислоты, и основания, которые являются подходящими для локального использования, могут быть применены парентерально. В зависимости от предполагаемого использования, фармацевтически приемлемые кислоты включают органические и неорганические кислоты, такие как муравьиная кислота, уксусная кислота, пропионовая кислота, молочная кислота, гликолевая кислота, щавелевая кислота, пировиноградная кислота, янтарная кислота, малеиновая кислота, малоновая кислота, коричневая кислота, серная кислота, соляная кислота, бромистоводородная кислота, азотная кислота, хлорная кислота, фосфорная кислота и тиоциановая кислота, которые образуют соли аммония со свободными аминогруппами пептидов и конъюгатов. Особенно предпочтительной является, таким образом, пальмитиновая кислота для производства солей КЗ изобретения. Фармацевтически приемлемые основания, которые образуют соли карбоксилатов со свободными карбоксильными группами КЗ и функциональными эквивалентами, включают этиламин, метиламин, диметиламин, триэтиламин, изопропиламин, диизопропиламин и другие моно-, ди- и триалкиламины, так же как ариламины. Кроме того, также включены фармацевтически приемлемые сольваты.

Фармацевтически приемлемые соли могут быть использованы в изобретении, например, соли неорганических кислот, такие как гидрохлориды, гидробромиды, фосфаты, сульфаты и т.п.; и соли органических кислот, такие как ацетаты, пропионаты, малонаты, бензоаты и т.п. Полное обсуждение фармацевтически приемлемых наполнителей доступно в Фармацевтических Науках Ремингтона (Mack Pub. Co., N. J. 1991). Фармацевтически приемлемые носители в фармацевтических композициях могут содержать жидкости, такие как воду, соляной раствор, глицерин и этанол. Кроме того, вспомогательные вещества, такие

как увлажнитель или эмульгирующие вещества, вещества создающие рН, и т.п., могут присутствовать в таких средах для лекарства. Как правило, парентеральные фармацевтические композиции готовят в качестве инъекций, или в качестве жидких растворов или суспензий; твердые формы, подходящие для растворения или образования суспензии в жидких средах для лекарства, могут также быть приготовлены до инъекции. Липосомы включены в определение фармацевтически приемлемого носителя. Для терапевтического воздействия КЗ может быть получен как описано выше и применены к объекту, который нуждается в этом. КЗ могут быть введены в объект любым подходящим способом, предпочтительно в форме фармацевтической композиции, приспособленной к такому способу и в дозировке, которая является эффективной для предполагаемого лечения.

Пример 7. Влияние препарата «К 1К» и «К 2К» на время свертывания крови

Наиболее тяжелым видом хирургической патологии являются ранения и травмы живота, сопровождающиеся обильным кровотечением. В связи с этим обеспечение надежного гемостаза является одной из самых актуальных проблем современной хирургии.

В результате исследований было установлено время кровотечения в условиях применения современных гемостопов. В качестве материалов для экспериментальных исследований были использованы следующие аппликационные препараты: губка гемостатическая коллагеновая (ГГК), «Гемостоп», «Целокс», и экспериментальные препараты «К 1К» и «К 2К». Эксперимент проводили на 60-х крысах -самцах линии Вистар. В остром эксперименте под наркозом производили срединную лапаротомию, моделировали стандартную травму печени и селезенки. На область раны всыпали гемостатическое средство, сопоставимое с её размерами. Одновременно с моделированием раны с использованием секундомера начинали отсчет времени кровотечения. Таким образом, было установлено, что все подопытные материалы обладают гемостатической активностью, значительно укорачивая время кровотечения, за исключением эксперимента с материалом «Гемостоп», показатели которого приближаются к контролю. Время кровотечения из травмы печени в условиях применения материалов «К 1К» и «К 2К» сократилось на 89,5-93,5 % относительно контроля и на 42,1-44,9% относительно ГГК. Укорочение времени остановки кровотечения из стандартной травмы селезенки было максимальным при тестировании материалов «К 1К», «К 2К» и было в 3,43-3,55 раз ($p < 0,001$) меньше относительно контроля и в 2,80-2,89 раз ($p < 0,05$) - относительно ГГК. Показатели времени

кровотечения материала ГГК, способствовало снижению времени остановки кровотечения из травмы печени на 37,0-42,4% и из травмы селезенки на 22,3-27,4% относительно контроля.

5 Пример 8. Скорость резорбции «К 1К» и «К 2К»

Одним из наиболее важных показателей кровоостанавливающих препаратов является их биологическая инертность и полная контролируемая биodeградация. Соответственно в результате исследований *in vitro* была установлена скорость резорбции современных гемостатических материалов «К 1К» и «К 2К». Материалами для исследования являлись гемостатические аппликационные средства: губка гемостатическая коллагеновая (ГГС), «Целлокс», «Гемостоп», а также новые материалы на «К 1К» и «К 2К». Исследование проводили в экспериментальных условиях *in vitro*: в мерную пробирку, содержащую 5 мл дистиллированной воды, помещали образец гемостатического материала весом 1 г.

15 Пробирку помещали в термостат с постоянной температурой 37°. Результаты скорости биологической деградации каждого гемостатического материала оценивали на 1, 3, 7 и 14-е сутки. Пробирку с исследуемым гемостопом извлекали из термостата и производили визуальную описательную оценку гемостатического средства. Исследуемый гемостоп изымали из экспериментальной среды и высушивали. В дальнейшем производили

20 повторное взвешивание изучаемого гемостопа. Разница в массе гемостопа до экспериментального исследования и после его осуществления выраженная в процентах отражала темпы резорбции изучаемого средства. Изучение в эксперименте *in vitro* скорости деградации гемостатических средств показало, что все изучаемые образцы материалов подвергались резорбции. Высокая резорбтивная активность наблюдалась у

25 гемостатической композиции «К 2К» - 100% ($P < 0,001$), показатель резорбции - 98,73% ($P < 0,001$), максимальная резорбтивная активность наблюдалась у препаратов ГГС и К 1К. Минимальные темпы деградации отмечены при изучении материала «Гемостоп», резорбция которого в 10 раз меньше относительно материалов «Целлокс» (42,3% ($P < 0,05$)) составила 10,34% ($P < 0,05$).

30

Пример 9. Изучение сорбционной активности «К 1К» и «К 2К»

В результате исследования были оценены сорбционные свойства современных

аппликационных гемостопов «К 1К» и «К 2К». Изучению были подвергнуты образцы следующих гемостопов губка гемостатическая коллагеновая, «Целокс», «Гемостоп», «К 1К» и «К 2К». В ходе эксперимента определяли массу дистиллированной воды, которую способен поглотить опытный образец исследуемых материалов стандартной одинаковой массы (1 г). Степень полного насыщения изучаемого средства определяли визуально по изменению пространственных свойств материала - набуханию. Время полного насыщения аппликационных препаратов фиксировали с использованием секундомера. Для оценки сорбционной активности исследуемых образцов материалов определяли их гигроскопичность по представленной ниже формуле: $\text{гигроскопичность (мл/г)} = \frac{m_1}{t_2}$, где: m_1 — объем (масса) воды, поглощенной материалом (мл); t_2 - масса (г) материала. Для комплексной оценки сорбционных свойств аппликационных материалов нами использовался сорбционный показатель (СП), который представляет собой объем жидкости, которую способен поглотить 1 г образца материала на протяжении 1 с: $\text{СП (млхс/г)} = \text{гигроскопичность} / t$, где: t - время полного насыщения материала (с). Полученные данные были обработаны статистически с вычислением средних величин, средних ошибок средних и достоверности различий с использованием критериев Стьюдента и Манна-Уитни (по отношению к губке гемостатической коллагеновой). Ошибка статистической гипотезы составляла $p < 0,05$. Таким образом, относительно высокую сорбционную активность продемонстрировала губка гемостатическая коллагеновая, имеющая гигроскопичность $69,41 \pm 1,65$ мл/г и сорбционный показатель $15,1 \pm 0,95$ млхс/г. Результаты гигроскопичности материалов «К 1К» и «К 2К» составили — $78,62 \pm 2,18$ мл/г ($p < 0,05$) и $88,3 \pm 2,11$ мл/г ($p < 0,05$), а сорбционный показатель - $23,8 \pm 1,24$ млхс/г ($p < 0,05$) и $25,5 \pm 1,41$ млхс/г ($p < 0,05$) соответственно. Минимальные сорбционные свойства отмечены у гемостопов «Целокс» и «Гемостоп», гигроскопичность которых составила $5,63 \pm 1,21$ мл/г и $6,11 \pm 1,16$ мл/г, а сорбционный показатель $1,23 \pm 0,11$ млхс/г и $1,10 \pm 0,04$ млхс/г соответственно.

Пример 10. Определение влияния композиций «К 1К» и «К 2К» на регенерацию тканей

Изучение ранозаживляющих свойств композиций проводили на самцах белых крыс Vistar. У 38 животных, которых предварительно анестезировали, на дорсальном боку тела, сзади правой лопатки выстригали область кожи размером 2 на 2 см. Кожу брали пинцетом, оттягивали ее, срезали фрагмент кожи размером 2 см, глубина раны 2 мм, средняя площадь

раны составила $4 \pm 1,0$ см². Полученную раны многоугольной формы интенсивно кровоточили . Затем животным первой и второй групп (по 10 в каждой) на рану наносили «К 1К» и «К 2К». Раны крыс 3-й группы обрабатывали «целоксом », 4-ю группу из 8 животных составляла контрольная группа , раны этих животных не обрабатывали .

5 Препараты наносили таким образом , чтобы образовавшиеся гели покрывали всю поверхность раны и захватывали небольшой фрагмент вокруг раны . Сверху на гель наносили клей БФ -б, высушивали и животных отпускали в клетки . Через 3, 6, 9, И и 13 дней от начала эксперимента (до заживления ран у животных всех групп) проводилось планиметрическое исследование , которое позволило судить об особенностях репаративных

10 процессов . Измерение площади ран проводилось таким образом : на целлюлодную пленку , которая прикладывалась к ране , наносили ее контуры , после чего с помощью миллиметровой бумаги определяли площадь раневой поверхности . Результаты первой серии опытов (Табл. 2) показали , что под влиянием композиций К 1К и К 2К значительно ускорилось заживление ран на всех стадиях исследования . Эффективность композиции К 2К

15 была статистически выше , чем у композиции К 1К и Целокс .

Таблица 2. Показатели заживления кожных ран у крыс под влиянием композиций К 1К и К 2К .

20

Препарат	Основа	n	Площадь раны* (S) за время наблюдений, см ² (M±m)				
			1-3 сутки	3-6 сутки	6-9 сутки	9-11 сутки	11-13 сутки
К2К	Комбинаторное бинарное производное целлюлозы	10	4,2±0,6	1,2±0,2	0,2±0,1	-	-
К1К	Комбинаторное бинарное производное крахмала	10	4,2±0,6	1,8±0,2	0,6±0,2	0,4±0,1	-
Целокс	Хитозан	10	4,0±1,1	3,5±0,3	2,6±0,4	1,2±0,3	0,3±0,1
Контроль	-	8	4,0±0,6	3,6±0,6	2,6±0,6	1,5±0,5	0,5±0,2

* P<0,05

Как видно из таблицы 2, фактически в 2 раза быстрее заживали раны у животных , раны

которых , были обработаны композицией К 2К (с 13 до 6 суток), тогда как эффективность контрольного образца Целокс не отличалась от контроля . Эпитализация ран инициировалась уже на второй день после нанесения композиции .

5 Пример 11. Изучение противовирусного действия препаратов К 1К , К 2К и КЗК на вирус гриппа А (Н 3 N2)

10 Водные растворы К 2К в различных дозах (десятикратные разведения) вводили 15 куриным эмбрионам в аллантоисную полость в объеме 0,2 мл через 12 часов после внесения вируса в рабочей дозе (100 ТЦД₅₀/0,2 мл). Каждый опыт сопровождался контролем тест -вируса в рабочей дозе . Зараженные и незараженные (контроль) эмбрионы инкубировали при 36°C в течение 48 часов . Затем производили вскрытие эмбрионов , из которых отсасывали аллантоисную жидкость . Титрование вируса в аллантоисной жидкости проводили по общепринятой методике с 1% эритроцитами 0(1) группы крови человека . Определили коэффициент защиты (КЗ). Титр вируса в опытной и контрольной группах куриных эмбрионов представлен в таблицах 3-5.

Таблица 3. Эффективная концентрация К 1К на модели гриппозной инфекции *in ovo*

Группа	Концентрация препарата (мг/мл)	Титр вируса (lg ТЦД ₅₀ /мл)		Минимальная эффективная концентрация (МЭК мг/мл)
		опыт	контроль	
Контрольная (вводили 0,9 % раствор натрия хлорида)	-	12	12	-
Опытная	50±5	0	12	0,5
	5±1	2	12	
	0,5 ± 0,05	4	12	
	0,05±0,005	8	12	5
	0,005±0,0005	10	12	

Таблица 4. Эффективная концентрация К 2К на модели гриппозной инфекции *in ovo*

Группа	Концентрация препарата (мг/мл)	Титр вируса (lg T ЦД ₅₀ /мл)		Минимальная эффективная концентрация (МЭК мг/мл)
		опыт	контроль	
Контрольная (вводили 0,9 % раствор натрия хлорида)	-	12	12	-
Опытная	50±5	0	12	0,5
	5±1	2	12	
	0,5 ± 0,05	4	12	
	0,05+0,005	8	12	5
	0,005+0,0005	8	12	

Таблица 5. Эффективная концентрация КЗК на модели гриппозной инфекции **in ovo**

Группа	Концентрация препарата (мг/мл)	Титр вируса (lg T ЦД ₅₀ /мл)		Минимальная эффективная концентрация (МЭК мг/мл)
		опыт	контроль	
Контрольная (вводили 0,9 % раствор натрия хлорида)	-	12	12	-
Опытная	50±5	0	12	0,05
	5±1	0	12	
	0,5 ± 0,05	1	12	
	0,05±0,005	3	12	5
	0,005±0,0005	6	12	

Как видно из таблиц 3-5, наиболее эффективной оказалась композиция КЗК на основе гепарина, минимальная эффективная концентрация КЗК в отношении вируса гриппа, которая полностью тормозит синтез вируса, равна 50 мкг /мл. При увеличении разведения препарата, эффективность КЗК падает и имеет дозозависимый характер. Данный факт свидетельствует о наличии прямого противовирусного эффекта у препарата КЗК в

отношении вируса гриппа H3N2. Другие комбинаторные производные также обладали антивирусной активностью, но в более высоких дозах.

Пример 12. Исследование антивирусного действия композиций К 1К, К 2К, КЗК на цитопатические вирусы (вирус везикулярного стоматита, коронавируса, вирус простого герпеса 1 типа)

Противовирусную активность в отношении этой группы вирусов определяли в культуре вышеуказанных клеток. Постановку реакции осуществляли следующим способом: 0,2 мл соответствующего вируса в рабочей дозе (100 ТЦД₅₀/0,2 мл) вносили в объеме 0,2 мл в 2-х суточную отмытую культуру клеток. Добавляли 0,8 мл поддерживающей среды. При появлении в культуре ЦПД вносили препараты в различных дозах. В качестве контроля выполняли то же самое с тест-вирусами без препарата. Клетки инкубировали при 37 °С в термостате. Учет опыта производили на 3,5,7 день. Снижение титра вируса под влиянием испытуемого препарата на 2 lg и более в сравнении с контролем оценивали, как проявление антивирусной активности. Результаты изучения противовирусной активности препаратов представлены в таблице 6

Таблица 6. Изучение противовирусного действия препарата KR в отношении вирусов: везикулярного стоматита, коронавируса, вируса простого герпеса 1 типа)

Препарат	Вирус	МЭК, мкг /мл	Максимальное падение титра вируса, lg Т ЦД ₅₀ /мл
К 1К	ВВС	5000	4,3
	КВ	5000	3,9
	впп	5000	4,9
К 2К	ВВС	500	4,4
	КВ	500	3,8
	впп	500	4,8
КЗК	ВВС	50	4,6
	КВ	50	4,4
	впп	50	4,6

Как видно из таблицы 6, все комбинаторные производные полисахаридов обладает
антивирусной активностью и способностью подавлять репродукцию всех изученных нами
вирусов в концентрациях от 50 до 5000 мкг /мл 0,05 мг/мл. Наиболее интересным для
внедрения является композиция КЗК , ХТИ которой составляет 1000. Кроме того , все
5 композиции были активны в отношении всех изученных вирусов , тогда как не один
препарат сравнения не проявлял подобной активности . Таким образом , препарат не связан
с конкретными особенностями вируса или клеточной культуры , а влияет на общие для всех
клеток механизмы .

10 **Пример 13.** Изучение антивирусного действия фармацевтических композиций К 1К ,
К 2К , КЗК **in vitro** на моделях вирусов сельскохозяйственных животных

Испытания проводили в 96-ти луночных пластиковых панелях с вирусом
трансмиссивного гастроэнтерита свиней (ТГС) штамм «Д -52» с исходным титром $10^{4.0}$
ТЦД₅₀/мл (тканевых цитопатических доз) в перевиваемой культуре клеток тестикул
15 поросенка (ПТП) и вирусом диареи крупного рогатого скота штамм «Орегон » с исходным
титром $10^{7.0}$ ТЦЦ₅₀/мл в перевиваемой культуре клеток почки сайги (П С). При испытании
вирустатического (ингибирующего) действия культуры клеток инфицировали вирусами в
дозах 100 и 10 ТЦДед /мл и инкубировали в термостате при 37° С. KR2 в различных дозах
вносили в культуры клеток (К К) через 1-1,5 часов после заражения (после периода
20 адсорбции). На каждое разведение брали по 8 лунок . После внесения соединения культуры
клеток инкубировали при 37 С в течение 72-144 часов до четкого проявления ЦПД
(цитопатогенного действия) в контроле вирусов . Контролями служили культуры клеток ,
инфицированные вирусом , инактные К К и К К, куда вносили только различные
концентрации опытных композиций . Вирустатическое действие определяли по разнице
25 титров вирусов в опыте и контроле . При определении вирулицидного (инактивирующего)
действия разные дозы композиций смешивали в равных объемах с вирусосодержащим
материалом и инкубировали в термостате при 37 °С в течение 24 часов . Контролем служили
вирусосодержащий материал , к которому вместо раствора соединения добавляли плацебо
(0,9% раствор натрия хлорида) и интактные культуры клеток . Смеси после контакта
30 титровали параллельно с контролем . Результаты учитывали через 72-144 часа после
инкубирования при 37° С, после четкого проявления ЦПД в контролях вирусов .
Вирулицидное действие определяли по разнице титров вирусов в опыте и контроле и
выражали в lg ТЦД 50. В результате проведенных исследований установлено , что

композиция КЗК в концентрации 50 мкг /мл подавляла репродукцию вируса ТГС на 2,90 lg ТЦД 50/мл, при заражающей дозе 100 ТЦД 50/мл и в той же дозе на 4,15 lg ТЦДед /мл, при заражающей дозе 10 ТЦД 50/мл. В дозе 50 мкг /мл КЗК инактивировал вирус ТГС на 4,0 lg ТЦД 50/мл. Композиция КЗК в дозе 50 мкг /мл инактивировала вирус диареи КРС на 4,4 lg ТЦД 50/мл.

Таким образом, соединение КЗР обладает наиболее выраженным вирусстатическим (ингибирующим) и вирулицидным (инактивирующим) действием на вирусы ТГС и диареи КРС, на его основе возможно создание химиопрепаратов для лечения и профилактики инфекционных болезней вирусной этиологии. Производные из композиций К1К и К2К обладали слабой активностью и проявляли ее только в дозах 500-5000 мкг /мл

Пример 14. Изучение противовирусной активности КЗК в эксперименте на животных (Герпесвирусный керато-конъюнктивит /энцефалит у кролей)

Особенности экспериментальной системы и уровень ее адекватности естественному заболеванию человека несомненно играют решающую роль в оценке влияния антивирусного вещества на течение инфекции. Герпетическая экспериментальная инфекция представляет собой интерес в связи с тем, что заболевания герпетической природы широко распространены и чрезвычайно вариабельны по клиническим проявлениям. Модели экспериментального герпеса на животных находят все более широкое применение в изучении новых противовирусных веществ. Как известно, одной из клинических форм системного герпеса является герпетический энцефалит, который воспроизводится у морских свинок, хомяков, крыс, мышей, кроликов, собак, обезьян. Герпетический кератоконъюнктивит у кроликов среднего веса 3,5 кг был получен путем нанесения инфекционного материала (вирус герпеса 1 типа, штамм Л-2) на скарифицированную роговицу. Животного фиксировали, анестезию глаза проводили лидокаином (закапывали в глаз). Раздвигали веки глаза, наносили несколько царапин на роговицу при помощи иглы шприца. Затем вводили вирусосодержащий материал и, смыкая веки, круговыми движениями втирали его в роговицу. Доза вируса: 0,05 мл. В опыте использовали 16 кролей, из них десятерым вводили КЗК (ежедневно со второго дня инфицирования -14 дней в дозе 10 мг/кг, а шестерым - плацебо (0,9 % натрия хлорида). После заражения кролей ВПГ 1 ежедневно контролировали состояние роговицы, наличие кератоконъюнктивита, энцефальных нарушений и наличие в лимфоцитах периферической крови антигенов ВПГ 1 методом real-time PLR до и после инфицирования. До инфицирования у всех животных в крови

отсутствовала ДНК вируса , что свидетельствовало об отсутствии в периферической крови вируса герпеса 1 типа . На 3 день после инфицирования у всех животных в крови определялась количественно ДНК ВПГ 1, которая составила $5,7 \cdot 10^6$ копий геномов /мл . Кроме того , у трех кролей (двух - из опытной группы до начала лечения и у одного из контрольной группы) появились энцефальные проявления - судорожный синдром , отсутствие аппетита . У всех животных развился кератоконъюнктивит . На 4 день после инфицирования опытной группе кролей ввели в ушную вену KR в дозе 10 мг/кг веса тела , а контрольной группе ввели 0,9% раствор натрия хлорида . Каждый день в течение двух недель повторяли эту процедуру один раз в день . В опытной группе все животные выжили , а ДНК ВПГ 1 в крови не определялась на 13-14 день . Кроме того , в опытной группе энцефальные проявления исчезли к 7 дню применения препарата , тогда как в контроле погибло 2 животных . К 14 дню лечения в опытной группе погибло одно животное , тогда как в контроле - 6. Соответственно индекс эффективности был равен 83,3 % , что свидетельствует о высокой лечебной эффективности КЗК на модели герпетического кератоконъюнктивита / энцефалита у кролей . Кроме того , кроли в опытной группе набрали в весе и у всех животных отсутствовали признаки кератоконъюнктивита . Химиотерапевтический индекс для кролей по препарату КЗК составил 1000, что свидетельствует о перспективности КЗК как высокоэффективного противовирусного препарата с широким спектром действия и низкой токсичностью .

20

Пример 15. Действие КЗК на гуморальный иммунный ответ на Т-зависимый антиген на мышах .

Композиция КЗК представлена как пример биологической активности для группы родственных производных , предусмотренных текущей заявкой .

25

Чтобы исследовать влияние КЗК , инбредные SPF мыши (Balb/cAcoNCr1, 7-8 недельного возраста , Charles River Laboratories GmbH, Германия) были иммунизированы с KLH, Т-клеточным зависимым антигеном . 3 мышам из группы были введены подкожно в присутствии полного адъюванта Фрейнда (50/50 v/v). Смесь антигена (20 мг в 100 мл) с адъювантом (Sigma, #F-5881) была эмульгированна и введена в область шеи . В тот же день 20 мг иммуномодулятора КЗК в 200 мл PBS было введено внутривенно . Образцы крови (50-70 мл) были отобраны у мышей на 7, 14, 21, и 28 день из вены ноги . Сыворотка была приготовлена коагуляцией крови в течение 2 часов при 37°C, с последующими 18 часами при 8°C, и центрифугированием при 10 000 оборотов в минуту в Эппендорф -подобной

30

центрифуге . Сыворотки хранили растворенными со стабилизатором антитела (SkyTec ABB 500) при 4°C, и в то же время анализировали твердофазным иммуноферментным анализом ELISA. Для второго образца , в 96-луночные плашки для иммуноферментного анализа ELISA (Greiner, #656061) были нанесены KLH (растворимое вещество , Sigma H 7017) в фосфатном буферном растворе (PBS), 0,2 мг на лунку на ночь при 4°C.

5 Растворенные сыворотки были инкубированы с антигеном (200 мг на лунку) в течение 1 часа при комнатной температуре , с последующей отмывкой клеток с PBS/0,1% Tween-20. Связывание антител мыши с KLH было определено , используя изотоп -специфические антимышинные иммуноглобулины , конъюгированные с HRP (Southern Biotechnology Ltd.,

10 антимышинный IgM #1021-05, антимышинный IgG1 #1070-05, антимышинный IgG2a #1080-05, антимышинный IgG2b #1090-05) согласно протоколу изготовителя . TMB был использован в качестве субстрата . Результаты были проанализированы на Фотометре Bio-Rad для микропланшет модель 550, оптическая плотность была измерена при 595 нм. Титры используемых сывороток находятся от 1/300 до 1/20,000 с шагом 1/2 (обозначены на оси X

15 как от 1 до 6 соответственно). Реактивность сыворотки представлена как O.D., показанная образцом в ELISA. Точки представляют среднюю реактивность образцов из 3 сывороток (из 3 мышей при условии). Разброс фактора представляет 95%-ный доверительный интервал . После единичной инъекции титр специфического антитела на 28 день существенно отличается между мышами , иммунизированными с и без иммуномодулятора . Таким

20 образом , титр специфического IgG1 в сыворотках мышей , иммунизированных в присутствии КЗК , был приблизительно в 16 раз выше , а титр IgG2a и IgG2b в 4 раза выше , чем в мышах контроля , иммунизированных одним антигеном .

Пример 16. Влияние КЗК на экспрессию гена в спленоцитах мыши , определенное с

25 помощью ПЦР матрицы .

Инбредным SPF Balb/c мышам (женские особи , 12 недельного возраста) были введены или антиген , или КЗК , или комбинация их обоих . Для инъекций 25 мг КЗК было растворено в 250 мл стерильного PBS. Инъекции были выполнены подкожно , в области

30 шеи , с иглой инсулина . Контрольным мышам был введен только PBS. Для инъекции антигена : 250 мл суспензии стерильного бараньего эритроцита (SRBC из Quad Five inc., Cat# 643-100) было введено внутривенно через бок . Суспензия была приготовлена как 2 мл первоначальной суспензии , отмытой 2 раза (1500 оборотов в минуту , 5 мин) с PBS и повторно суспендированной в 2 мл. 10 мл 50%-ной суспензии было растворено в 250 мл

PBS и введено . 48 ч спустя мыши были забиты , их селезенка выделена и помещена в RNALater (Ambion Inc, Cat# 7021) сразу после выделения . Образцы в RNALater немедленно были заморожены при -70°C и выдержаны при этой температуре до выделения РНК . Выделение РНК и анализ ПЦР матрицы было выполнено как обслуживание с помощью SuperArray Inc согласно их установленному протоколу (www.superarray.com). РЕЗУЛЬТАТЫ . Было найдено , что изменения в экспрессии мРНК , основанные на данных ПЦР , являются статистически значимыми , если различие с контрольным уровнем экспрессии было выше 3-кратного (или увеличения или уменьшения) . Из анализа экспрессии для 84 генов , уровень 75-85% генов во всех образцах не был статистически отличным от контрольного образца (селезенка мыши , введенная с PBS вместо и антигена и иммуномодулятора (не показано) . Ясно , что статистически значимое различие было замечено для ряда цитокиновых и хемокиновых генов и соответствующих рецепторов IL-4, IL-11, Sppl, IL-10RA и в меньшей степени IL-1f6, IL-13, IL-17b, IL-20, IL-6 и IL-1R1).

Таким образом , комбинаторные композиции на основе КЗ обладают активирующим влиянием как на гуморальный , так и на клеточный иммунитет и могут использоваться как иммуномодуляторы при различных иммунодефицитах состояниях .

Пример 17. Разные фармацевтические композиции

Могут быть использованы различные способы введения супрамолекулярных комбинаторных производных полисахаридов (КПП) . КПП композицию можно давать перорально или можно вводить внутрисосудистой , подкожной , внутрибрюшинной инъекцией , в форме аэрозоля , глазным способом введения , в мочевого пузыря , местно и так далее . Например , способы ингаляционного введения хорошо известны в данной области техники . Доза терапевтической композиции будет варьировать в широких пределах в зависимости от конкретного вводимого КПП , природы заболевания , частоты введения , способа введения , клиренса используемого агента из организма хозяина и тому подобного . Начальная доза может быть более высокой с последующими более низкими поддерживающими дозами . Дозу можно вводить с частотой один раз в неделю или один раз в две недели , или делить на меньшие дозы и вводить их один или несколько раз в сутки , два раза в неделю и так далее для поддержания эффективного уровня дозы . Во многих случаях для перорального введения будет необходима более высокая доза , чем для внутривенного введения . Соединения по данному изобретению могут быть включены во множество композиций для терапевтического введения . Более конкретно , соединения по настоящему

изобретению могут быть включены в фармацевтические композиции в сочетании с подходящими фармацевтически приемлемыми носителями или разбавителями и могут быть включены в препараты в твердой, полутвердой, жидкой или газообразной формах, таких как капсулы, порошки, гранулы, мази, кремы, пены, растворы, суппозитории, инъекции, формы для ингаляционного применения, гели, микросферы, лосьоны и аэрозоли. Как таковое, введение соединений может быть осуществлено различными способами, включая пероральное, трансбуккальное, ректальное, парентеральное, внутривенное, внутрикожное, чрескожное, интратрахеальное введение и так далее. КПП по изобретению могут распределяться системно после введения или могут быть локализованы с использованием имплантата или другой композиции, удерживающей активную дозу в месте имплантации. Соединения по настоящему изобретению могут быть введены сами по себе, в комбинации друг с другом, или они могут быть использованы в комбинации с другими известными соединениями (например, перфорином, противовоспалительными агентами, и так далее). В фармацевтических лекарственных формах соединения могут быть введены в форме их фармацевтически приемлемых солей. Следующие способы и эксципиенты приведены лишь в качестве примеров и никоим образом не являются ограничивающими. Для препаратов для перорального введения соединения могут быть использованы сами по себе или в комбинации с подходящими добавками для изготовления таблеток, порошков, гранул или капсул, например, с обычными добавками, такими как лактоза, маннит, кукурузный крахмал или картофельный крахмал; со связывающими агентами, такими как кристаллическая целлюлоза, производные целлюлозы, аравийская камедь, кукурузный крахмал или желатины; с разрыхлителями, такими как кукурузный крахмал, картофельный крахмал или карбоксиметилцеллюлоза натрия; со смазывающими агентами, такими как тальк или стеарат магния; и, если желательно, с разбавителями, буферными агентами, увлажняющими агентами, консервантами и корригентами. Соединения могут быть включены в композиции для инъекций путем их растворения, суспендирования или эмульгирования в водном или неводном растворителе, таком как растительные или другие подобные масла, синтетические глицериды алифатических кислот, эфиры высших алифатических кислот или пропиленгликоля; и, если желательно, с обычными добавками, такими как солибулизаторы, изотонические агенты, суспендирующие агенты, эмульгаторы, стабилизаторы и консерванты. Соединения могут быть использованы в аэрозольной композиции для ингаляционного введения. Соединения по настоящему изобретению могут быть включены в приемлемые пропелленты под давлением, такие как дихлордифторметан,

пропан , азот и тому подобное . Кроме того , соединения могут быть включены в суппозитории смешиванием с множеством основ , таких как эмульгирующие основы или водорастворимые основы . Соединения по настоящему изобретению могут быть введены ректально с использованием суппозитория . Суппозиторий может содержать наполнители ,
5 такие как масло какао , карбоваксы и полиэтиленгликоли , расплавляющиеся при температуре тела , но твердые при комнатной температуре . Могут быть изготовлены стандартные лекарственные формы для перорального или ректального введения , такие как сиропы , эликсиры и суспензии , где каждая единица дозы , например , чайная ложка , столовая ложка , таблетка или суппозиторий , содержит predetermined количество композиции ,
10 содержащей одно или более соединений по настоящему изобретению . Сходным образом , стандартные лекарственные формы для инъекции или внутривенного введения могут содержать соединение по настоящему изобретению в композиции в форме раствора в стерильной воде , нормальном физиологическом растворе или другом фармацевтически приемлемом носителе . Имплантаты для длительного высвобождения композиций хорошо
15 известны в данной области техники . Имплантаты изготавливают в форме микросфер , пластинок и так далее с биodeградируемыми или не являющимися биodeградируемыми полимерами . Например , полимеры молочной и/или гликолевой кислот образуют деградируемый полимер , хорошо переносимый хозяином . Имплантат , содержащий КПП по изобретению , располагают близко к очагу инфекции , так чтобы локальная концентрация
20 активного агента была повышенной по сравнению с остальными областями тела . При использовании здесь термин «стандартная лекарственная форма» относится к физически дискретным единицам , подходящим для использования в качестве однократных доз для субъектов людей и животных , при этом каждая единица содержит predetermined количество соединений по настоящему изобретению , которого , согласно вычислениям ,
25 достаточно для оказания желаемого эффекта , совместно с фармацевтически приемлемым разбавителем , носителем или наполнителем . Описания стандартных лекарственных форм по настоящему изобретению зависят от конкретного используемого соединения , и эффекта , который должен быть достигнут , и фармакодинамики используемого соединения у хозяина . Фармацевтически приемлемые эксципиенты , такие как наполнители , адъюванты , носители
30 или разбавители , общедоступны . Кроме того , общедоступны фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества , такие как агенты для регулирования pH и буферные агенты , агенты для регулирования тоничности , стабилизаторы , смачивающие агенты и тому подобное . Типичные дозы для системного введения варьируют от 0,1 мг до 100 миллиграмм

на кг массы тела субъекта на одно введение . Типичная доза может представлять собой одну таблетку для приема от двух до шести раз в сутки или одну капсулу , или таблетку с длительным высвобождением для приема один раз в сутки с пропорционально более высоким содержанием активного ингредиента . Эффект длительного высвобождения может

5 быть обусловлен материалами , из которых изготовлена капсула , растворяющимися при различных значениях рН , капсулами , обеспечивающими медленное высвобождение под воздействием осмотического давления или любым другим известным способом контролируемого высвобождения . Специалистам в данной области техники будет ясно , что уровни доз могут варьировать в зависимости от конкретного соединения , тяжести

10 симптомов и предрасположенности субъекта к побочным эффектам . Некоторые из конкретных соединений обладают большей активностью , чем другие . Предпочтительные дозы данного соединения могут быть легко определены специалистами в данной области техники множеством способов . Предпочтительным способом является измерение физиологической активности данного соединения . Один из интересующих способов

15 представляет собой применение липосом в качестве наполнителя для доставки . Липосомы сливаются с клетками целевой области и обеспечивают доставку содержимого липосом внутрь клеток . Контакт липосом с клетками поддерживают в течение времени , достаточного для слияния , с использованием различных способов поддержания контакта , таких как выделение , связывающие агенты и тому подобное . В одном аспекте изобретения липосомы

20 разработаны для получения аэрозоля для легочного введения . Липосомы могут быть изготовлены с очищенными белками или пептидами , опосредующими слияние мембран , такими как вирус Сендай или вирус гриппа и так далее . Липиды могут представлять собой любую полезную комбинацию известных липидов , образующих липосомы , включая катионные или цвиттерионные липиды , такие как фосфатидилхолин . Остальные липиды

25 будут обычно нейтральными или кислыми липидами , такими как холестерин , фосфатидилсерин , фосфатидилглицерин и тому подобное . Для получения липосом может быть использован способ , описанный Kato et al.(1991) J. Biol. Chem. 266:3361. Кратко , липиды и композицию для включения в липосомы , содержащую КПП , смешивают в подходящей водной среде , подходящим образом в солевой среде , где общее содержание

30 твердых веществ будет находиться в диапазоне приблизительно П О масс .%. После интенсивного перемешивания в течение коротких периодов времени , приблизительно 5-60 сек , пробирку помещают в теплую водяную баню при приблизительно 25-40° С и этот цикл повторяют приблизительно 5-10 раз . Затем композицию обрабатывают ультразвуком на

протяжении подходящего периода времени, обычно приблизительно 1-10 сек, и, возможно, дополнительно перемешивают на вихревой мешалке. Затем объем увеличивают добавлением водной среды, обычно увеличивая объем в приблизительно 1-2 раза, с последующим взбалтыванием и охлаждением. Способ позволяет включать в липосомы

5 супрамолекулярные структуры с высокой суммарной молекулярной массой.

Композиции с другими активными агентами

Для применения в рассматриваемых способах КПП по изобретению могут быть включены в композиции с другими фармацевтически активными агентами, в частности другими антимикробными, противовирусными, кровеостанавливающими, активирующими

10 регенерацию агентами, в том числе пантотеновую кислоту, цианокобаламин, холекальциферол. Другие интересующие агенты также включают широкий спектр антибиотиков, известных в данной области техники. Классы антибиотиков включают пенициллины, например, пенициллин G, пенициллин V, метициллин, оксациллин, карбенициллин, нафциллин, ампициллин и так далее; пенициллины в комбинации с

15 ингибиторами бета-лактамазы; цефалоспорины, например, цефаклор, цефазолин, цефуроксим, моксалактам и так далее; карбапенемы; монобактамы; аминогликозиды; тетрациклины; макролиды; линкомицины; полимиксины; сульфонамиды; хинолоны; хлорамфеникол; метронидазол; спектиномицин; триметоприм; ванкомицин; и так далее. Также полезны противогрибковые агенты, включая полиены, например, амфотерицин В,

20 нистатин, флукозин; и азолы, например, миконазол, кетоконазол, итраконазол и флуконазол. Противотуберкулезные лекарственные средства включают изониазид, этамбутол, стрептомицин и рифампин. Другие интересующие агенты включают широкий спектр противовирусных производных мононуклеотидов и других средств-ингибиторов РНК-полимераз, известных в данной области техники. Классы противовирусных средств включают

25 интерфероны, ламивудин, рибавирин и так далее; амантадин; ремантадин, например, зинамивир, озельтавими́р и так далее; ацикловир, валацикловир, валганцикловир; и так далее. Другие группы противовирусных средств включают адефовир, вбакавир, диданозин, эмтрицитабин, ламивудин, ставудин, тенофовир, эфавиренз, невирапин, индинавир, лопинавир и ритонавир, нельфинавир, ритонавир, сакинавир, даклатасвир, софовбувир. В

30 композицию КПП по изобретению могут также быть включены цитокины, например, интерферон гамма, фактор некроза опухоли альфа, интерлейкин 12 и так далее. Выше настоящее изобретение описано примерами, которые не следует толковать как ограничивающие объем изобретения.

Формула изобретения

1. Биологически активные комбинаторные производные полисахаридов , отличающиеся тем , что в качестве комбинаторных производных полисахаридов используют
 5 супрамолекулярную неразделенную комбинаторную смесь замещенных производных полисахарида с максимальным количеством комбинаций , полученную одновременной комбинаторной модификацией полисахарида как минимум двумя ковалентными модификаторами .
2. Биологически активные комбинаторные производные полисахаридов по п. 1,
 10 отличающиеся тем , что мольное соотношение полисахарида и ковалентных модификаторов в реакции комбинаторного синтеза рассчитывают по формулам :
- О) $k = n \times (2^n - 1)$
 (2) $m = 4 \times (3 \times 2^{n-2} - 1)$,
- где
 15 p = количество доступных для замещения групп в полисахариде (в пересчете на мономер - производное глюкопиранозы);
 t = количество молей исходного полисахарида и количество разных молекул комбинаторных производных после синтеза (в пересчете на производное глюкопиранозы);
 k = количество молей каждого из двух модификаторов в реакции комбинаторного синтеза
 20 для получения максимального количества разных производных .
3. Биологически активные комбинаторные производные полисахаридов по п. 1., отличающиеся тем , что в качестве исходного полисахарида используют целлюлозу .
4. Биологически активные комбинаторные производные полисахаридов по п. 1.,
 25 отличающиеся тем , что в качестве исходного полисахарида используют карбоксиметилцеллюлозу .
5. Биологически активные комбинаторные производные полисахаридов по п. 1., отличающиеся тем , что в качестве исходного полисахарида используют карбоксиметилпропилцеллюлозу .
6. Биологически активные комбинаторные производные полисахаридов по п. 1.,
 30 отличающиеся тем , что в качестве исходного полисахарида используют гепарин .
7. Биологически активные комбинаторные производные полисахаридов по п. 1., отличающиеся тем , что в качестве исходного полисахарида используют хитозан .
8. Биологически активные комбинаторные производные полисахаридов по п. 1.,

- отличающиеся тем , что в качестве исходного полисахарида используют сукцинилхитозан .
9. Биологически активные комбинаторные производные полисахаридов по п. 1., отличающиеся тем , что в качестве исходного полисахарида используют карбоксиметилхитозан .
- 5 10. Биологически активные комбинаторные производные полисахаридов по п. 1., отличающиеся тем , что в качестве исходного полисахарида используют крахмал .
11. Биологически активные комбинаторные производные полисахаридов по п. 1., отличающиеся тем , что в качестве исходного полисахарида используют карбоксиметилкрахмал .
- 10 12. Биологически активные комбинаторные производные полисахаридов по п. 1., отличающиеся тем , что в качестве исходного полисахарида используют метилкрахмал .
13. Фармацевтическая композиция , содержащая биологически активные комбинаторные производные полисахаридов по любому из п.п.1-12, отличающаяся тем , что
- 15 дополнительно содержит основание аминокислоты лизина .
14. Фармацевтическая композиция по п.14, отличающаяся тем , что приготовлена в виде порошка и используется как средство для остановки кровотечений
15. Фармацевтическая композиция , содержащая биологически активные комбинаторные производные полисахаридов по п.п.1-12, отличающаяся тем , что используется как
- 20 иммуномодулирующее средство .
16. Фармацевтическая композиция , содержащая биологически активные комбинаторные производные полисахаридов по п.п.1-12, отличающаяся тем , что используется как противовирусное средство .
17. Фармацевтическая композиция , содержащая биологически активные комбинаторные
- 25 производные полисахаридов по п.п.1-12, отличающаяся тем , что используется как ранозаживляющее средство .

ИЗМЕНЁННАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ
получена Международным бюро 17 апреля 2018 (17.04.2018)

1. Биологически активные комбинаторные производные полисахаридов, отличающиеся тем, что в качестве комбинаторных производных полисахаридов используют соль аминокислоты лизина с супрамолекулярной неразделенной комбинаторной смесью замещенных производных полисахарида с максимальным количеством комбинаций, полученную одновременной комбинаторной модификацией полисахарида как минимум двумя ковалентными модификаторами, а мольное соотношение полисахарида и ковалентных модификаторов в реакции комбинаторного синтеза рассчитывают по формулам:

$$O) \quad k = n \times (2^n - 1)$$

$$(2) \quad t = 4 \times (3 \times 2^{n-2} - 1),$$

где

n=количество доступных для замещения групп в полисахариде;

t=количество молей исходного полисахарида и количество разных молекул комбинаторных производных после синтеза;

k=количество молей каждого из двух модификаторов в реакции комбинаторного синтеза для получения максимального количества разных производных.

2.Удален

3. Биологически активные комбинаторные производные полисахаридов по п. 1., отличающиеся тем, что в качестве исходного полисахарида используют целлюлозу.

4. Биологически активные комбинаторные производные полисахаридов по п. 1., отличающиеся тем, что в качестве исходного полисахарида используют карбоксиметилцеллюлозу.

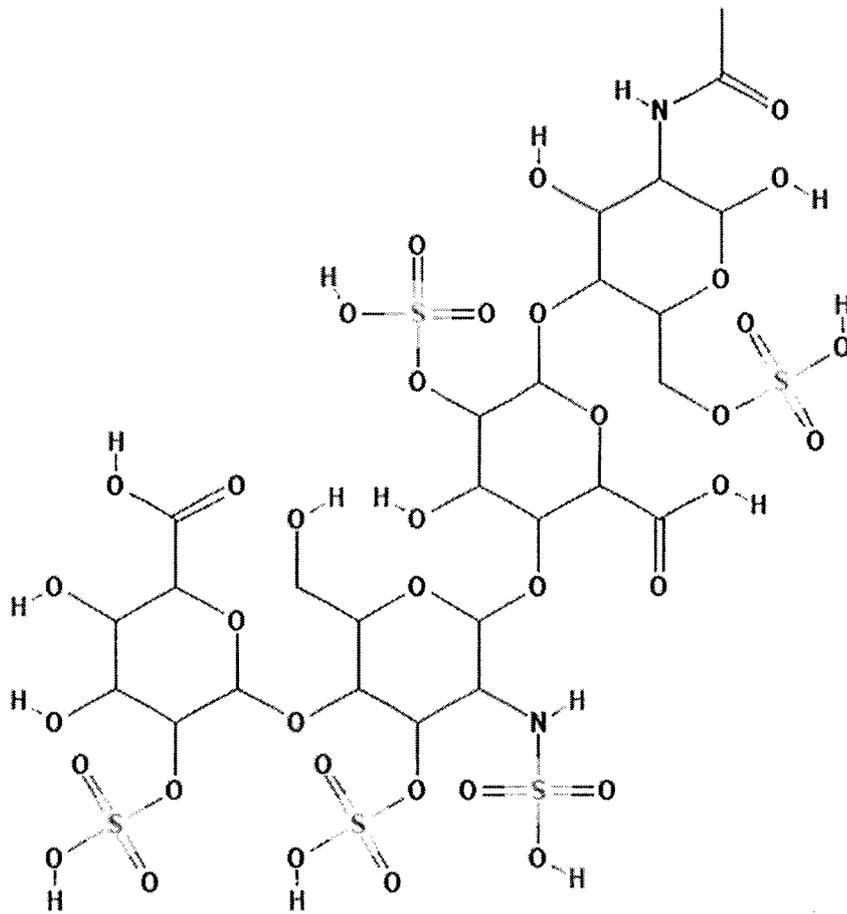
5. Биологически активные комбинаторные производные полисахаридов по п. 1., отличающиеся тем, что в качестве исходного полисахарида используют карбоксиметилпропилцеллюлозу.

6. Биологически активные комбинаторные производные полисахаридов по п. 1., отличающиеся тем, что в качестве исходного полисахарида используют гепарин.

7. Биологически активные комбинаторные производные полисахаридов по п. 1., отличающиеся тем, что в качестве исходного полисахарида используют хитозан.

8. Биологически активные комбинаторные производные полисахаридов по п. 1., отличающиеся тем, что в качестве исходного полисахарида используют сукцинилхитозан.

9. Биологически активные комбинаторные производные полисахаридов по п. 1., отличающиеся тем, что в качестве исходного полисахарида используют карбоксиметилхитозан .
10. Биологически активные комбинаторные производные полисахаридов по п. 1., отличающиеся тем, что в качестве исходного полисахарида используют крахмал .
11. Биологически активные комбинаторные производные полисахаридов по п. 1., отличающиеся тем, что в качестве исходного полисахарида используют карбоксиметилкрахмал .
12. Биологически активные комбинаторные производные полисахаридов по п. 1., отличающиеся тем, что в качестве исходного полисахарида используют метилкрахмал .
13. Удален .
14. Фармацевтическая композиция , содержащая биологически активные комбинаторные производные полисахаридов по п.п. 1-1 1, отличающаяся тем, что приготовлена в виде порошка и используется как средство для остановки кровотечений .
15. Фармацевтическая композиция , содержащая биологически активные комбинаторные производные полисахаридов по п.п.1-1 1, отличающаяся тем, что используется как иммуномодулирующее средство .
16. Фармацевтическая композиция , содержащая биологически активные комбинаторные производные полисахаридов по п.п.1-1 1, отличающаяся тем, что используется как противовирусное средство .
17. Фармацевтическая композиция , содержащая биологически активные комбинаторные производные полисахаридов по п.п.1-1 1, отличающаяся тем, что используется как ранозаживляющее средство .



Фиг.1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/RU 2017/000422

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07H 15/00 (2006.01) ; C40B 40/12 (2006.01); A61 P 31/12 (2006.01); A61 K 31/70 (2006.01); A61P 41/00 (2006.01) 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) C07H 15/00, 15/236, C40B 40/00, 40/12, A61 K 31/70, A61 P 31/12, 41/00 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) STN, RUPAT, EAPO, Esp@senet, PAJ, USPTO, CIPO, DEPATIS, PCT Online, PATSEARCH		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2006/0240473 A 1 (THE UNIVERSITY OF LIVERPOOL) 26.10.2006, examples, fig. 1-7, the claims	1, 6
X Y	US 2006/051812 A 1 (GLYKOS FINLAND OY) 09.03.2006, par. [0047], [0102]- [0103], [0107], [0112]-[0121], [0180], [0215], [0287], [0293], examples, fig. 1-14, the claims	1-3,6,7,10,15-17 4-5, 8-9, 11-14
Y	EP 1917355 B 1 (THE ROCKEFELLER UNIVERSITY) 08.12.2010, part « Administration of compositions comprising lysins»	13-14
Y	US 5773033 A (THE REAGENTS OF UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 30.06.1998, the claims	13-14
Y	RU 2264230 C2 (KHERAEUS KULTSER GMBKH UND KO.KG) 20.11.2005, the claims	4, 9, 11, 12
<input checked="" 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 01 March 2018 (01.03.2018)		Date of mailing of the international search report 15 March 2018 (15.03.2018)
Name and mailing address of the ISA/ RU		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/RU 2017/000422

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 201 0/084038 A 1 (AZIENDE CHIMICHE RIUNITE ANGELINI FRANCESCO A.C.R.A.F. S.P.A. et al.) 29.07.201 0, part «POLYMERS»	5
Y	RU 20001 16358 A (GGOREAL) 27.06.2002, the abstract	8

A. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ
(см. дополнительный лист)

Согласно Международной патентной классификации МПК

B. ОБЛАСТЬ ПОИСКА

Проверенный минимум документации (система классификации с индексами классификации)

C 07H 15/00, 15/236, C 40B 40/00, 40/12, A 61K 31/70, A 61P 31/12, 41/00

Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в поисковые подборки

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если возможно, используемые поисковые термины)

STN, RUPAT, EAPO, Esp@senet, PAJ, USPTO, CIPO, DEPATIS, PCT Online, PATSEARCH

C. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ:

Категория *	Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
X	US 2006/0240473 A1 (THE UNIVERSITY OF LIVERPOOL) 26.10.2006, примеры, фиг. 1-7, формула	1, 6
X Y	US 2006/05 18 12 A1 (GLYKOS FINLAND OY) 09.03.2006, параграфы [0047], [0102]- [0103], [0107], [01 12]-[0121], [0180], [0215], [0287], [0293], примеры, фиг. 1-14, формула	1-3, 6, 7, 10, 15-17 4-5, 8-9, 11-14
Y	EP 1917355 B1 (THE ROCKEFELLER UNIVERSITY) 08.12.2010, раздел «Administration of compositions comprising lysins»	13-14
Y	US 5773033 A (THE REAGENTS OF UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 30.06.1998, формула	13-14
Y	RU 2264230 C2 (ХЕРАЕУС КУЛЬЦЕР ГМБХ УНД К О .К Г) 20.11.2005, формула	4, 9, 11, 12

последующие документы указаны в продолжении графы C.

данные о патентах -аналогах указаны в приложении

* Особые категории ссылочных документов :	"Т" более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение
"А" документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным	"Х" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности
"Е" более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее	"У" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда документ взят в сочетании с одним или несколькими документами той же категории, такая комбинация документов очевидна для специалиста
"L" документ, подвергающий сомнению притязание (я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано)	"&" документ, являющийся патенте м-аналогом
"O" документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию и т.д.	
"P" документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета	

Дата действительного завершения международного поиска

01 марта 2018 (01.03.2018)

Дата отправки настоящего отчета о международном поиске

15 марта 2018 (15.03.2018)

Наименование и адрес ISA/RU:
Федеральный институт промышленной собственности,
Бережковская наб., 30-1, Москва, Г-59,
ГСП -3, Россия, 125993
Факс: (8-495) 531-63-18, (8-499) 243-33-37

Уполномоченное лицо:

E.Guseva

Телефон № 495 531 65 15

С. (Продолжение). ДОКУМЕНТЫ СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕВАЛЕНТНЫМИ		
Категория *	Цитируемые документы с указанием , где это возможно , релевантных частей	Относится к пункту №
Y	WO 2010/084038 A1 (AZIENDE CHIMICHE RIUNITE ANGELINI FRANCESCO A.C.R.A.F. S.P.A. et al.) 29.07.2010, раздел «POLYMERS»	5
Y	RU 20001 16358 A (ГОРЕАЛЬ) 27.06.2002, реферат	8

C 07H 15/00 (2006.01)
C 40B 40/12 (2006.01)
A 61P 31/12 (2006.01)
A 61K 31/70 (2006.01)
A 61P 41/00 (2006.01)