

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

(19) Всемирная Организация
Интеллектуальной Собственности
Международное бюро



(10) Номер международной публикации

WO 2018/231091 A 1

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

WIPO

- (51) Международная патентная классификация :
C07C 13/66 (2006.01) C40B 40/12 (2006.01)
C07H 15/236 (2006.01) A 61P 31/04 (2006.01)
C07K 7/62 (2006.01) A 61K 31/7036 (2006.01)
C40B 40/00 (2006.01) A 61K 38/12 (2006.01)
C40B 40/10 (2006.01) A 61K 31/03 (2006.01)
- (21) Номер международной заявки : PCT/RU20 17/000424
- (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 , 24-130А , Москва , 121 15 1, Moscow (RU). ФАРБЕР , Софья Борисовна (FARBER, Sof'ya Borisovna) [RU/RU]; проспект Кутузовский , 24-130А , Москва , 121 15 1, Moscow (RU).
- (74) Изобретатель : МАРТЫНОВ , Артур Викторович (MARTYNOV, Artur Viktorovich); ул. Корчагинцев , 1-18, Харьков , 61171, 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, АM, АO, АТ, АU, АZ, ВА, ВВ, ВG, ВH, ВN, 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.
- (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,

(54) Title: COMBINATORIAL ANTIBIOTIC DERIVATIVES BASED ON SUPRAMOLECULAR STRUCTURES

(54) Название изобретения : КОМБИНАТОРНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ АНТИБИОТИКОВ НА ОСНОВЕ СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫХ СТРУКТУР

(57) Abstract: Field of use: the invention relates to combinatorial chemistry, pharmaceuticals and cosmetology, and allows the synthesis of novel combinatorial libraries of antibiotic derivatives for use in pharmaceuticals and cosmetology. Essence of the invention: novel combinatorial antibiotic derivatives based on supramolecular structures, characterized in that supramolecular structures (B) are produced by combinatorial synthesis from a single parent molecule of a polyfunctional antibiotic (A1) having two or more groups accessible for covalent modification in a reaction with at least two different modifiers (M2 and M3) simultaneously according to the synthesis scheme $m A1+k M2+k M3=m B$, wherein a combinatorial mixture of modified derivatives of the parent molecule is formed having the greatest possible variety of derivatives, and as biologically active substances for creating pharmaceutical compositions, an entire combinatorial mixture is used in the form of a supramolecular structure without being split into individual components, and, in the reaction, a combinatorial mixture B of modified derivatives of the parent molecule of the antibiotic (A1) is formed which has a maximal (m) number of combinations. Technical result: modified combinatorial antibiotic derivatives having antimicrobial and antifungal activity toward multi-resistant and polyresistant strains of microorganisms and fungi. These agents have a broad spectrum of activity, and the supramolecular and combinatorial structure of their tens and hundreds of derivatives prevent microorganisms from becoming habituated.

(57) Реферат : Область применения : Изобретение относится к комбинаторной химии , фармации и косметологии , позволяет синтезировать новые комбинаторные библиотеки производных антибиотиков для применения в фармации , косметологии и фармации . Суть изобретения : новые комбинаторные производные антибиотиков на основе супрамолекулярных структур , отличающиеся тем , что супрамолекулярные структуры (B) получены путем комбинаторного синтеза из одной исходной молекулы полифункционального антибиотика (A 1) с двумя и более доступными для ковалентной модификации группами в реакции , как минимум , с двумя разными модификаторами (M 2 и M 3) одновременно согласно схеме синтеза $m A1+k M2+k M3=t B$, при этом образуется комбинаторная смесь модифицированных производных исходной молекулы , с максимальным разнообразием производных , а в качестве биологически активных веществ для создания фармацевтических композиций используют цельную комбинаторную смесь в виде супрамолекулярной структуры без разделения на индивидуальные компоненты , а в реакции образуется комбинаторная смесь B модифицированных производных исходной молекулы антибиотика (A 1), количество комбинаций которых является максимальным (t). Технический результат : модифицированные комбинаторные производные антибиотиков с антимикробной и антигрибковой активностью в отношении мультирезистентных и полирезистентных штаммов микроорганизмов и грибов . Средства имеют широкий спектр действия , а супрамолекулярная и комбинаторная структура их десятков и сотен производных исключает привыкание микроорганизмов .



WO 2018/231091 A1

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)

Комбинаторные производные антибиотиков на основе супрамолекулярных структур

Область техники

Изобретение относится к комбинаторной химии, фармации и косметологии, позволяет
5 синтезировать новые комбинаторные библиотеки производных антибиотиков для применения в фармации, косметологии и фармации.

Предшествующий уровень техники

Комбинаторная химия, методология органического химического синтеза,
10 представляющая собой совокупность приёмов и методов комбинирования многообразных исходных химических реагентов для получения как можно более разнообразных массивов химических продуктов путём проведения десятков, сотен, а иногда и тысяч параллельных химических превращений с образованием огромного числа конечных продуктов.
Комбинаторная химия решает задачи, редко возникавшие в классическом химическом
15 синтезе, а именно - быстро синтезировать много веществ, как правило, сложных по структуре и достаточно чистых. Разработка новых экономичных и скоростных технологий параллельного синтеза и параллельной очистки веществ достигается разнообразными путями. Вместо стандартного жидкофазного синтеза (одно вещество в одном сосуде за один приём) ставится множество синтезов (например, в пластиковой плашке с
20 множеством ячеек, куда вещества вносят многоканальными пипетками). Вместо кипячения с обратным холодильником используют нагревание множества герметичных капсул (в ячеистом термостате или СВЧ-печи). Для фильтрования множества веществ используют «сосуды-фильтры» (например, плашки с пористым дном). Упаривание осуществляют вакуумным вымораживанием растворителя из центрифугируемых (для
25 предотвращения вспенивания) плашек. Для очистки используют методы параллельной хроматографии, объединяя в блоки множество хроматографических колонок. В методах жидкофазной комбинаторной химии стараются использовать лишь те реакции, которые протекают с высокими выходами и требуют минимальных усилий по очистке веществ.
Для достижения большего разнообразия продуктов обычные двухкомпонентные реакции
30 заменяют на многокомпонентные. Мощной технологией комбинаторной химии является

твердофазный синтез - проведение реакций на модифицированной полимерной подложке . В этом случае сложная молекула (например , полипептид требуемой последовательности или сложное гетероциклическое соединение) иммобилизуется («наращивается ») на поверхность полимера в ходе последовательности реакций , а затем , на заключительном этапе , отщепляется с твёрдой подложки вследствие каких -либо химических превращений . Поэтому реакции можно проводить при большом избытке реагента , отмывая последний от полимера с целевым веществом и сводя синтез к принципу «чайного пакетика » (пористые пакеты с гранулами полимера последовательно помещают в стаканчики с реагентами). Новой технологией является замена твёрдых полимеров на перфторированные жидкости (не смешивающиеся с водой и стандартными растворителями) . Для иммобилизации (перевода вещества в перфторированную фазу) к молекуле исходного реагента присоединяют протяжённый перфторалкильный фрагмент . Это позволяет проводить синтез в эмульсиях с последующим разделением жидких фаз. Комбинированным методом комбинаторной химии является использование твердофазных реагентов (окислитель , кислота , основание иммобилизованы на полимере) . Избыток твёрдого реагента вносят в растворы веществ , а затем отделяют фильтрованием . Другим приёмом является использование так называемых скавенджеров (от английского scavenger - мусорщик) - в раствор вносят модифицированный полимер , который селективно удаляет из реакционной смеси ненужный реагент , взятый в избытке . Всё шире используются программируемые промышленные роботы , выполняющие последовательность рутинных однообразных процедур по выделению и очистке веществ (автоматические синтезаторы) . Эффективность использования комбинаторной химии доказана на примерах обнаружения новых лекарственных препаратов и катализаторов [1, 2, 3, 4].

Предложенная нами схема синтеза комбинаторных производных на основе одной полифункциональной исходной молекулы (например , полимиксина) путем реакции с двумя и более исходными модификаторами без последующего разделения и выщеления каждого отдельного производного является уникальной и показала увеличение биологической активности от двух до 300 раз для разных исходных молекул : полимиксина , гентамицина , стрептомицина , отдельных олигомерных РНК и ДНК , полисахаридов , белков , кверцетина и многих других веществ . Важным новшеством в данном подходе является правильный расчет мольного соотношения количества реагентов : как исходного полифункционального соединения (в данном случае -

антибиотиков) так и модификаторов . При корректном соотношении компонентов образуется максимально возможная комбинация производных . Эта смесь не является классическим раствором или смесью после синтеза , а в водных растворах образует супрамолекулярные структуры друг с другом в произвольных положениях и ведет себя как исходный антибиотик , но с более выраженной биологической активностью и пролонгированным действием . Образование супрамолекулярных структур можно проследить по отсутствию разделения полосы комбинаторного производного на хроматографическом пике : любые изменения условий разделения не смогли привести к разделению смеси , при этом на ЯМР НІ спектре наблюдался явный хаос из полос поглощения водородов как металльных групп остатка уксусной кислоты , так и этильных групп остатка янтарной кислоты так и водородов не замещенных фенильных гидроксиллов .

Антибиотики

Антибиотики (от греч . and—приставка , означающая противодействие , и bios- жизнь) , вещества , синтезируемые микроорганизмами , и продукты химической модификации этих веществ , избирательно подавляющие рост патогенных микроорганизмов , низших грибов , а также некоторых вирусов и клеток раковых опухолей . Описано более 6 тыс . природных антибиотиков , однако широко применяются только около 50. При определении эффективности антибиотиков учитывают их антимикробную активность в организме , скорость развития устойчивости у микроорганизмов в ходе лечения , степень проникновения в очаги поражения , возможность создания терапевтических концентраций в тканях и жидкостях больного и продолжительность их поддержания , сохранение действия в различных условиях . Большинство антибиотиков получают в промышленности микробиологическим синтезом - в ферментерах на специальных питательных средах . Синтезированные микроорганизмами антибиотики извлекают и подвергают химической очистке с использованием различных методов . Основные продуценты антибиотиков представляют собой почвенные микроорганизмы - лучистые грибы (актиномицеты) , плесневые грибы и бактерии . Молекулы природных антибиотиков не всегда обладают удовлетворительными химиотерапевтическими и фармакологическими свойствами . Кроме того , широкое распространение получили резистентные формы микроорганизмов , обладающие способностью разрушать антибиотики , главным образом путем воздействия на них своими ферментами . Поэтому основное направление создания новых антибиотиков

- химические и микробиологические модификации природных антибиотиков и получение полусинтетических антибиотиков . Описано около 100 тысяч полусинтетических антибиотиков , однако лишь некоторые обладают ценными для медицины свойствами . Ряд природных антибиотиков , особенно бензилпенициллин , цефалоспорины , сифамицин ,
5 используют главным образом для получения полусинтетических производных . Для ряда антибиотиков разработаны методы полного химического синтеза , которые , однако , сложны и экономически не обоснованы . Лишь левомецетин , хлорамфеникол и циклосерин получают синтетически . Антибиотики принадлежат к самым различным классам химических соединений - аminosахарам , антрахинонам , гликозидам , лактонам ,
10 феназинам , пиперазинам , пиридинам , хинонам , терпеноидам и другим . Наибольшее значение имеют лактамные антибиотики (пенициллины и цефалоспорины) , макролидные антибиотики , анзамицины , аминогликозидные антибиотики , тетрациклины , пептидные антибиотики , антрациклины . По молекулярному механизму действия различают следующие группы антибиотиков : 1) ингибиторы синтеза клеточной стенки
15 микроорганизмов (пенициллины , циклосерин и другие); 2) ингибиторы функций мембран и обладающие детергентными свойствами (полиены , новобиоцин); 3) ингибиторы синтеза белка и функций рибосом (тетрациклины , макролидные антибиотики); 4) ингибиторы метаболизма РНК (например , актиномицины , антрациклины) и ДНК (митомицин С , стрептонигрин) . Знание механизма действия антибиотика позволяет судить не только о
20 направленности химиотерапевтического эффекта ("мишень " антибиотика) , но и о степени его специфичности . Так , лактамные антибиотики воздействуют на пептидогликан - опорный полимер клеточной стенки бактерий , отсутствующий у животных и человека , что определяет высокую избирательность этих антибиотиков .

По направленности (спектру) действия различают следующие антибиотики : 1)
25 активные в отношении грамположительных микроорганизмов - макролидные антибиотики , линкомицин , фузидин и другие ; 2) широкого спектра действия , то есть активные в отношении как грамположительных , так и грамотрицательных микроорганизмов , - тетрациклины , аминогликозиды и другие .; 3) противотуберкулезные - стрептомицин , канамицин , рифампицин , циклосерин и другие ; 4) противогрибковые -
30 главным образом полиены , например нистатин , леворин , гризеофульвин ; все они действуют на цитоплазматическую мембрану патогенных грибов ; эффективны при микозах различной этиологии ; 5) активные в отношении простейших - трихомицин ,

паромомицин ; б) противоопухолевые - актиномицины , антрациклины , блеомицины ; ингибируют синтез нуклеиновых кислот ; как правило , применяются в комплексе с другими препаратами (в т.ч. гормональными) наряду с лучевой терапией и оперативным лечением . Ряд антибиотиков , в частности производные рифамицина , обладают
5 противовирусной активностью , но не используются при лечении заболеваний вирусной этиологии .

При длительном применении некоторые антибиотики могут оказывать токсическое действие на центр , нервную систему , слуховой нерв и т.п., подавлять иммунобиологические реакции организма , вызывать аллергические реакции . По
10 выраженности побочных явлений антибиотики не превосходят другие группы лекарственных средств . Антибиотики применяются для лечения болезней человека и животных , защиты растений , в животноводстве для улучшения роста и развития молодняка (добавки антибиотиков к кормам), в пищевой промышленности при консервировании продуктов . Однако их бесконтрольное применение может привести к
15 нежелательным последствиям , прежде всего к распространению устойчивых к антибиотикам возбудителей внехромосомной природы , которые вызывают тяжелые болезни человека , а также к аллергическим реакциям вследствие остаточных количеств антибиотиков в пищевых продуктах . Законодательством ряда стран запрещено или ограничено применение одних и тех же антибиотиков в медицине , животноводстве и
20 пищевой промышленности . Некоторые антибиотики широко используют при биохимических и молекулярно -биологических исследованиях как специфические ингибиторы определенных метаболических процессов в клетках живых организмов .

Определения

Антимикробная активность . Термин «антимикробная активность » определен здесь
25 как способность уничтожать микробные клетки или ингибировать их рост . Подразумевают , что в контексте настоящего изобретения термин «антимикробный » означает наличие бактерицидного , и/или бактериостатического , и/или фунгицидного , и/или фунгистатического эффекта и/или вирулицидного эффекта , где термин «бактерицидный » следует понимать как способный уничтожать бактериальные
30 клетки . Термин «бактериостатический » следует понимать как способный ингибировать бактериальный рост , то есть ингибировать рост бактериальных клеток . Термин «фунгицидный » следует понимать как способный уничтожать грибковые

клетки . Термин «фунгистатический » следует понимать как способный ингибировать грибковый рост , то есть ингибировать рост грибковых клеток . Термин «вирулицидный » следует понимать как способный инактивировать вирус . Термин «микробные клетки » обозначает бактериальные или грибковые клетки (включая дрожжи) .

Подразумевают , что в контексте настоящего изобретения термин «ингибирование роста микробных клеток » означает , что эти клетки не находятся в состоянии роста , то есть что они не способны к размножению .

В предпочтительном воплощении термин «антимикробная активность » определен как бактерицидная и/или бактериостатическая активность . Более предпочтительно , «антимикробная активность » определена как бактерицидная и/или бактериостатическая активность против *Escherichia*, предпочтительно *Escherichia coli*.

Для задач настоящего изобретения антимикробная активность может быть определена способом , описанным Lehrer et al, *Journal of Immunological Methods*, Vol.137 (2) pp. 167- 174 (1991). Альтернативно , антимикробная активность может быть определена в соответствии с руководствами Национального комитета по клиническим и лабораторным стандартам (National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS) от CLSI (Института клинических и лабораторных стандартов (Clinical and Laboratory Standards Institute), ранее известного как Национальный комитет по клиническим и лабораторным стандартам) .

Супрамолекулярные комбинаторные антибиотики (СКА), обладающие антимикробной активностью , могут быть способны уменьшать число жизнеспособных клеток *Escherichia coli* (DSM 1576) до 1/100 через 8 часов (предпочтительно через 4 часа , более предпочтительно через 2 часа , наиболее предпочтительно через 1 час и , в частности , через 30 минут) инкубации при 37°C в соответствующем субстрате для микробного роста при концентрации СКА , обладающих антимикробной активностью , 500 мкг /мл, предпочтительно 250 мкг /мл, более предпочтительно 100 мкг /мл, еще более предпочтительно 50 мкг /мл, наиболее предпочтительно 25 мкг /мл и , в частности , 10 мкг /мл .

СКА , обладающие антимикробной активностью , могут также быть способны ингибировать рост *Escherichia coli* (DSM 1576) в течение 8 часов при 37°C в соответствующем субстрате для микробного роста при их добавлении в концентрации 500 мкг /мл, предпочтительно при их добавлении в концентрации 250

мкг /мл, более предпочтительно при их добавлении в концентрации 100 мкг /мл, еще более предпочтительно при их добавлении в концентрации 50 мкг /мл, наиболее предпочтительно при их добавлении в концентрации 10 мкг /мл и, в частности, при их добавлении в концентрации 5 мкг /мл.

5

Известны антимикробные комбинаторные библиотеки синтетических пептидов [5]. Речь идет о различных синтетических пептидах и их аминокислотной последовательности. Вещества проявили активность относительно широкого спектра микроорганизмов. Авторы показали, что указанные производные активны *in vitro*.

10 Прототип имеет ряд недостатков: запатентованные пептиды не обладают активностью в отношении полирезистентных и мультирезистентных штаммов и относятся только к одной группе антибиотиков - пептидным антибиотикам, применяются исключительно индивидуально, а не в виде супрамолекулярных смесей, специально разделяются на отдельные пептиды для применения. Также пептиды из

15 прототипа обладают такими недостатками, как чувствительность к дигестивным ферментам кишечника и тканей, узкий спектр биологической активности, невозможность перорального использования.

Предложенные нами комбинаторные супрамолекулярные антибиотики нечувствительны к дигестивным ферментам, имеют широкий спектр

20 противомикробной активности, могут быть использованы для создания пероральных препаратов, эффективны в терапии инфекционных заболеваний, вызванных мультирезистентными штаммами микроорганизмов.

Раскрытие изобретения

25 В основу изобретения поставленная задача синтезировать новые комбинаторные библиотеки производных антибиотиков на основе супрамолекулярных структур и разработать способ их получения, использование которых позволит преодолеть систему резистентности микроорганизмов к антибиотикам.

Поставленная задача решается синтеза новых комбинаторных библиотек производных

30 антибиотиков на основе супрамолекулярных структур и способ их получения, отличающаяся тем, что супрамолекулярные структуры (B) получены путем

комбинаторного синтеза из одной исходной молекулы полифункционального антибиотика (Ai) с двумя и более доступными для ковалентной модификации группами в реакции, как минимум, с двумя разными модификаторами (M₂ и M₃) одновременно согласно схеме синтеза



при этом образуется комбинаторная смесь модифицированных производных исходной молекулы, с максимальным разнообразием производных, а в качестве биологически активных веществ для создания фармацевтических композиций используют цельную комбинаторную смесь в виде супрамолекулярной структуры без разделения на

10 индивидуальные компоненты. Мольное соотношение компонентов реакции может быть рассчитано на основе формул: (1) $k = \eta \times (2^n - 1)$ и (2) $t = 4 * (3 * 2^{n-2} - 1)$, где n = количество доступных для замещения групп в полифункциональной молекуле антибиотика (Ai); t = количество молей исходной полифункциональной молекулы (A₁) и количество разных молекул комбинаторных производных (B) после синтеза; k = количество молей каждого

15 из двух модификаторов (M₂ и M₃) в реакции комбинаторного синтеза для получения максимального количества разных производных, а в реакции образуется комбинаторная смесь B модифицированных производных исходной молекулы антибиотика (Ai), количество комбинаций которых является максимальным (t). При этом исходная молекула (Ai) может представлять собой полимиксин, аминогликозидный антибиотик,

20 полиеновый антибиотик, тетрациклин, макролидный антибиотик, линкозамин, грамицидин, гликопептидный антибиотик, а модификаторы M₂ и M₃ могут быть представлены ацилирующими агентами группы ангидридов органических моно- и поликарбоновых кислот, галогенангидридами карбоновых кислот, алкилирующими агентами - галоген производными углеводородов, модификатор M₂ может представлять

25 собой ацилирующий агент — ангидрид моно- или поликарбоновой кислоты либо галогенангидрид карбоновой кислоты, а M₃ - алкилирующий агент - галогенпроизводное углеводородов. Представленные супрамолекулярные комбинаторные производные антибиотиков проявили антимикробные свойства в отношении мультирезистентных штаммов микроорганизмов и грибов.

30

Краткое описание чертежей

Фиг. 1. Схема комбинаторного синтеза производных полимиксина с образованием супрамолекулярного комбинаторного производного (IVa-d): полимиксин вступает в реакцию взаимодействия с двумя модифицирующими агентами - янтарным ангидридом и уксусным ангидридом в рассчитанных соотношениях. При этом образуется супрамолекулярная структура из 380 производных полимиксина.

Фиг. 2. Схема комбинаторного синтеза производных тетрациклина с образованием супрамолекулярного комбинаторного производного (VIIa-d): тетрациклин вступает в реакцию взаимодействия с двумя модифицирующими агентами - янтарным ангидридом и уксусным ангидридом в рассчитанных соотношениях. При этом образуется супрамолекулярная структура из 92 производных тетрациклина.

Фиг. 3. ТСХ производных тетрациклина, вода: AcCN=1:1, проявления УФ лампа (190-300 нм).

Фиг. 4. Схема комбинаторного синтеза супрамолекулярного комбинаторного производного гентамицина (IXa-d): гентамицин (основание) вступает в реакцию взаимодействия с двумя модифицирующими агентами — янтарным ангидридом и уксусным ангидридом в рассчитанных соотношениях. При этом образуется супрамолекулярная структура из 764 производных гентамицина.

Фиг. 5. ТСХ производных гентамицин, вода: AcCN=1:1, проявление УФ лампа (190-300 нм) после обработки раствором серной кислоты.

Фармацевтические композиции

Могут быть использованы различные способы введения супрамолекулярных комбинаторных производных антибиотиков (СКПА). СКПА композицию можно давать перорально или можно вводить внутрисосудистой, подкожной, внутрибрюшинной инъекцией, в форме аэрозоля, глазным способом введения, в мочевого пузырь, 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 антимикробного СКПА, 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

5 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

10 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 , внутрибрюшинное ,

15 внутрикожное , чрескожное , внутритрахеальное введение и так далее . Антимикробные СКПА 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

20 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

25 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

30 или карбоксиметилцеллюлоза натрия ; со смазывающими агентами , такими как тальк или стеарат магния ; и , если желательны , 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 солюбилизаторы, 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, 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, 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 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 антимикробные комбинаторные антибиотики по изобретению, располагают близко к очагу инфекции, так чтобы локальная концентрация 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, 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 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 быть обусловлен материалами, из которых изготовлена капсула, растворяющимися при различных значениях pH, 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 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 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 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 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 ,
5 липиды и композицию для включения в липосомы , содержащую комбинаторные супрамолекулярные антибиотики , смешивают в подходящей водной среде , подходящим образом в солевой среде , где общее содержание твердых веществ будет находиться в диапазоне приблизительно 10-30 масс.%. После интенсивного перемешивания в течение коротких периодов времени , приблизительно 5-60 сек , пробирку помещают в теплую
10 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
15 охлаждением . Способ позволяет включать в липосомы супрамолекулярные структуры с высокой суммарной молекулярной массой .

Композиции с другими активными агентами

Для применения в рассматриваемых способах антимикробные СКПА по изобретению
20 могут быть включены в композиции с другими фармацевтически активными агентами , в частности другими антимикробными агентами , иммуномодуляторами , противовирусными средствами , противовирусными субстанциями . Другие интересующие агенты включают широкий спектр немодифицированных антибиотиков , известных в данной области техники . Классы антибиотиков включают пенициллины , например пенициллин G,
25 пенициллин V, метициллин , оксациллин , карбенициллин , нафциллин , ампициллин и так далее ; пенициллины в комбинации с 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 ;
30 ванкомицин ; и так далее . Также полезны противогрибковые агенты , включая полиены , например амфотерицин В, нистатин , флукозин ; и азолы , например миконазол , кетоконазол , итраконазол и флуконазол . Противотуберкулезные лекарственные средства включают изониазид , этамбутол , стрептомицин и рифампин . Также другие интересующие

агенты в плане создания новых композиций включают широкий спектр производных мононуклеотидов и других средств -ингибиторов РНК -полимераз , известных в данной области техники . Классы противовирусных средств включают интерфероны , ламивудин , рибавирин и так далее ; амантадин ; ремантадин , например зинамивир , озельтавимир и так
 5 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 композицию антимикробных СКПА по изобретению могут также быть включены цитокины , например
 10 интерферон гамма , фактор некроза опухоли альфа , интерлейкин 12 и так далее . Далее настоящее изобретение описано следующими примерами , которые не следует толковать как ограничивающие объем изобретения .

Пример 1. Получение супрамолекулярной комбинаторной смеси полимиксина (КПП)
 15 В 10 мл диоксана растворяют 390 μM полимиксина В (I) (CAS N 1404-26-8, $M_r = 1203.499 \text{ g/mol}$, $n=7$) (I), добавляют 889 μM янтарного ангидрида (III) и 889 μM уксусного ангидрида (II), раствор перемешивают и греют с обратным холодильником 10 минут . Раствор переливают в ампулы и лиофилизируют для удаления растворителя и уксусной кислоты . Комбинаторную смесь (Iva-d) используют для получения фармацевтических
 20 композиций , изучения структуры , определения биологической активности . На фиг . 1 приведена схема синтеза комбинаторных производных полимиксина .

Фиг .1.

Одна исходная молекула полимиксина содержит 7 доступных для модификации пептидных остатков аминокрупп и гидроксильных групп ($n=7$).

25 Расчеты количества молей модификаторов ведут согласно формул комбинаторики :
 $t = 4 \times (3 \times 2^{n-2} - 1)$; $k = n \times (2^n - 1)$, где t - количество разных производных молекул в комбинаторной смеси и количество молей полимиксина для реакции ; n - количество доступных для модификации аминокрупп и гидроксильных групп в структуре полимиксина ($n = 7$); k - количество молей каждого модификатора . Таким образом , имея
 30 только одну исходную молекулу полимиксина и два модификатора после комбинаторного

синтеза мы получаем 380 комбинаторных производных с разной степенью замещения, разного положения заместителей и разных перестановок остатков модификаторов не просто в виде смеси, а в виде трудно разделяемой супрамолекулярной смеси. В связи с наличием в разных производных как замещенных, так и не замещенных гидроксильных и аминокрупп, супрамолекулярные структуры образуются как через водородные, так и ионные связи. Модификаторы - янтарный ангидрид либо уксусный ангидрид можно вводить как одновременно, так и последовательно - либо сперва ввести янтарный ангидрид, прогреть смесь с обратным холодильником 10 минут, а затем ввести уксусный ангидрид и также прогреть смесь еще 10 минут. Аналогично в этой реакции в качестве одного из модификаторов вместо янтарного ангидрида можно использовать малеиновый ангидрид, аконитовый ангидрид, глутаровый, фталевый ангидрид и уксусный ангидрид, этиловый эфир муравьиной кислоты, монохлороуксусную кислоту, пропиолактон, этиленоксид и другие низкомолекулярные алкилирующие вещества (метилхлорид, этилхлорид, пропилхлорид).

Для HPLC использовали микроколоночный хроматограф Милихром А-02 в градиенте ацетонитрил (5-100%)/ 0,1 М хлорная кислота + 0,5 М перхлорат лития. Комбинаторное производное на хроматограмме давало один четкий уширенный пик и не разделялось на компоненты, хотя время удержания отличалось как от исходного полимиксина, так и от его полностью замещенных производных. Это свидетельствовало о том, что между разными комбинаторными производными (в нашем случае их 380) образовывались сложные супрамолекулярные структуры, не разделяемые хроматографически. Аналогично себя ведет данное комбинаторное производное (КПП) и при разделении в тонком слое (ацетонитрил : вода) дает только одну полосу, которая не совпадает ни с одним из полученных производных. Попытка использовать двумерную ТСХ в разных условиях также не позволила разделить комбинаторное производное. Это характерный признак супрамолекулярной структуры в комбинаторном производном (IVa-d).

Пример 2. Получение супрамолекулярной комбинаторной смеси тетрациклина (КПТ)

В 10 мл диоксана растворяют 92 мкМ тетрациклина (VI) (CAS N 60-54-8, $M_r = 444.44 \text{ g/mol}$, $n_D = 1.5$) (I), добавляют 155 мкМ янтарного ангидрида (III) и 155 мкМ уксусного ангидрида (II), раствор перемешивают и греют с обратным холодильником 10 минут, к

раствору добавляют 1200 μM ТРИС , перемешивают до растворения . Раствор переливают в ампулы и лиофилизируют для удаления растворителя и уксусной кислоты . Комбинаторную смесь (VIIa-d) используют для получения фармацевтических композиций , изучения структуры , определения биологической активности (КПТ) . На фиг . 5 1 приведена схема синтеза комбинаторных производных тетрациклина . В данной реакции вместо тетрациклина могут быть использованы окситетрациклин либо любое другое производное тетрациклина с доступными для модификации гидроксильными группами , а также любой другой антибиотик с двумя или более доступными для модификаций группами : аминогликозидные антибиотики , полиеновые антибиотики , тетрациклин , 10 макролидные антибиотики , линкозамин , грамицидин , гликопептидные антибиотики . Вместо модификторов ангидридов карбоновых кислот могут быть использованы галогенангидриды карбоновых и поликарбоновых кислот , таких как янтарная , малеиновая , фумаровая , молочная , пропионовая , другие галогенпроизводные , такие как хлорметан , бромэтан , хлорпропан , циклические алкилирующие соединения , подобные 15 оксирану , пропиолактону .

Фиг . 2.

Одна исходная молекула тетрациклина (I) содержит 5 доступных для модификации остатков гидроксильных групп ($n=5$).

Расчеты количества молей модификаторов ведут согласно формул комбинаторики :

20 $t = 4 \times (3 \times 2^{n-2} - 1)$; $k = n \times (2^n - 1)$, где t - количество разных производных молекул в комбинаторной смеси и количество молей тетрациклина для реакции ; n - количество доступных для модификации гидроксильных групп в структуре тетрациклина ($n=5$); k - количество молей каждого модификатора . Таким образом , имея только одну исходную молекулу тетрациклина и два модификатора после комбинаторного синтеза мы получаем 25 92 комбинаторных производных с разной степенью замещения , разного положения заместителей и разных перестановок остатков модификаторов не просто в виде смеси , а в виде трудно разделяемой супрамолекулярной смеси . В связи с наличием в разных производных как замещенных , так и не замещенных гидроксильных групп , супрамолекулярные структуры образуются как через водородные , так и ионные связи . 30 Модификаторы — янтарный ангидрид либо уксусный ангидрид можно вводить как одновременно , так и последовательно - либо сперва ввести янтарный ангидрид , прогреть

смесь с обратным холодильником , а затем ввести уксусный ангидрид и повторно прогреть смесь . Аналогично в этой реакции в качестве одного из модификаторов вместо янтарного ангидрида можно использовать малеиновый ангидрид , аконитовый ангидрид , глутаровый , фталевый ангидрид и уксусный ангидрид , этиловый эфир муравьиной кислоты ,
 5 монохлороуксусную кислоту , пропиолактон , этиленоксид и другие низкомолекулярные алкилирующие вещества (метилхлорид , этилхлорид , пропилхлорид) .

Для HPLC использовали микроколоночный хроматограф Милихром А-02 в градиенте ацетонитрил (5-100%)/ 0,1 М хлорная кислота + 0,5 М перхлорат лития . Комбинаторное производное на хроматограмме давало один четкий уширенный пик и не
 10 разделялось на компоненты , хотя время удержания отличалось как от исходного полимиксина , так и от его полностью замещенных производных . Это свидетельствовало о том , что между разными комбинаторными производными (в нашем случае их 380) образовывались сложные супрамолекулярные структуры , не разделяемые хроматографически . Аналогично себя ведет данное комбинаторное производное (ПММ) и
 15 при разделении в тонком слое (ацетонитрил :вода , У Ф детекция) и дает только одну полосу , которая не совпадает ни с одним из полученных производных .

ЯМР ^{13}C : С : 199,4 ; 197,6; 169,5; 149,9; 156,2; 93,4; 83,1; СН : 76,7; С : 108,6; 116,4; 143,5; 106,2; СН : 117,1; 120,7; 128,1; 27,4; 38,6; CH_2 : 14,7; С : 147,5; 171,1; 173,1; 174,7; 172,0; CH_3 : 44,6; 24,0; CH_2 : 28,8; 29,8; 29,1

20 Фиг . 3.

Как видно из рисунка ТСХ , Комбинаторная смесь (полоса VHa-d) менее подвижна и имеет $R_f=0,47$, тогда как исходный немодифицированный тетрациклин (VI) самый легкий и $R_f=0,59$. Полностью ацилированный тетрациклин (VIIb) и сукцинилированный тетрациклин (VIIC) занимают промежуточное положение между нативным
 25 тетрациклином и комбинаторным . Полоса комбинаторного тетрациклина не разделяется ни при двумерной ТСХ , ни в условиях ВЭЖХ (не приводится) .

Пример 3. Получение супрамолекулярной комбинаторной смеси гентамицина
 30 (аминогликозид) (КПГ)

В 10 мл диоксана растворяют 764 мМ гентамицина основание (VIII) (CAS N 1403-66-3, $M_r = 477.603 \text{ g/mol}$, $n=8$) (VIII), добавляют 2040 мМ янтарного ангидрида (III) и 2040 мМ уксусного ангидрида (II), раствор перемешивают и греют с обратным холодильником 5-50 минут. Раствор переливают в ампулы и лиофилизируют для удаления растворителя и уксусной кислоты. Комбинаторную смесь (IXa-d) используют для получения фармацевтических композиций, изучения структуры, определения биологической активности (КПГ). На фиг. 4 приведена схема синтеза комбинаторных производных гентамицина. В данной реакции вместо гентамицина могут быть использованы стрептомицин, амикацин либо любой другой представитель аминогликозидных антибиотиков с доступными для модификации гидроксильными и аминогруппами, а также любой другой антибиотик с двумя или более доступными для модификации группами: аминогликозидные антибиотики, полиеновые антибиотики, тетрациклин, макролидные антибиотики, линкозамин, грамицидин, гликопептидные антибиотики. Вместо модификторов ангидридов карбоновых кислот могут быть использованы галогенангидриды карбоновых и поликарбоновых кислот, таких как янтарная, малеиновая, фумаровая, молочная, пропионовая, другие галогенпроизводные, такие как хлорметан, бромэтан, хлорпропан, циклические алкилирующие соединения, подобные оксирану, пропиолактону.

Фиг. 4.

Одна исходная молекула гентамицина (I) содержит 8 доступных для модификации остатков гидроксильных и метил-амино групп ($n=8$).

Расчеты количества молей модификаторов ведут согласно формул комбинаторики:

$t = 4 \times (3 \times 2^{n-1})$; $k = \eta \times (2^n - 1)$, где t - количество разных производных молекул в комбинаторной смеси и количество молей тетрациклина для реакции; n - количество доступных для модификации гидроксильных и аминогрупп в структуре гентамицина ($n=8$); k - количество молей каждого модификатора. Таким образом, имея только одну исходную молекулу гентамицина и два модификатора после комбинаторного синтеза мы получаем 764 комбинаторных производных с разной степенью замещения, разного положения заместителей и разных перестановок остатков модификаторов не просто в виде смеси, а в виде трудно разделяемой супрамолекулярной смеси. В связи с наличием в разных производных как замещенных, так и не замещенных гидроксильных а

метиламиногрупп , супрамолекулярные структуры образуются как через водородные , так и ионные связи . Модификаторы - янтарный ангидрид либо уксусный ангидрид можно вводить как одновременно , так и последовательно - либо сперва ввести янтарный ангидрид , прогреть смесь с обратным холодильником , а затем ввести уксусный ангидрид и повторно прогреть смесь . Аналогично в этой реакции в качестве одного из модификаторов вместо янтарного ангидрида можно использовать малеиновый ангидрид , аконитовый ангидрид , глутаровый , фталевый ангидрид и уксусный ангидрид , этиловый эфир муравьиной кислоты , монохлороуксусную кислоту , пропиолактон , этиленоксид и другие низкомолекулярные алкилирующие вещества (метилхлорид , этилхлорид , пропилхлорид) .

ЯМР C^{13} : CH : 107,9; 107,1; 87,1; CH_2 : 63,8; C : 70,2; CH : 85,0; CH : 90,0; CH 64,4; CH 74,4; CH 65,0; CH 53,4; CH 55,7; CH 49,3; CH_2 22,4; 34,8; 23,9; C : 170,2; 174,7; 173,8; 172,3; 173,0; CH : 60,2; CH_3 : 31,6; 34,0; 15,8; CH_2 : 29,8; 29,1; 30,2; 29,4; CH_3 : 21,1; 17,5;

Данные ЯМР C^{13} комбинаторного производного подтверждают наличие как этильных групп остатков янтарной кислоты в его структуре , так и ацетильных остатков - продуктов реакции с уксусным ангидридом .

Для HPLC использовали микроколоночный хроматограф Милихром А-02 в градиенте ацетонитрил (5-100%)/ 0,1 М хлорная кислота + 0,5 М перхлорат лития . Комбинаторное производное на хроматограмме давало один четкий уширенный пик и не разделялось на компоненты , хотя время удержания отличалось как от исходного полимиксина , так и от его полностью замещенных производных . Это свидетельствовало о том , что между разными комбинаторными производными (в нашем случае их 764) образовывались сложные супрамолекулярные структуры , не разделяемые хроматографически . Аналогично себя ведет данное комбинаторное производное (ПММ) и при разделении в тонком слое (ацетонитрил : вода , У Ф детекция после обработки 10% раствором серной кислоты) и дает только одну полосу , которая не совпадает ни с одним из полученных производных .

Фиг . 5.

Как видно из фиг . 5, ТСХ , Комбинаторная смесь (полоса IXa-d) менее подвижна и имеет $R_f=0,27$, тогда как исходный немодифицированный гентамицин (VIII) самый легкий и $R_f=0,36$. Полностью ацилированный гентамицин (ГХБ) и сукцинированный гентамицин

(IXc) занимают промежуточное положение между нативным гентамицином и комбинаторным . Полоса комбинаторного гентамицина не разделяется ни при двумерной ТСХ , ни в условиях ВЭЖХ (не приводится).

- 5 Пример 4. Определение антимикробной активности патентуемых средств **in vitro**
- Объектами исследования были 14 комбинаторных производных антибиотиков : полимиксина (IV), тетрациклина (VII), гентамицина (IX), стрептомицина (X), линкомицина (XI), канамицина (XII), эритромицина (XIII), мидекамицина (XIV), амфотерицина В (XV), ванкомицина (XVI), нистатина (XVII), амикацина (XVIII),
- 10 тобрамицина (XIX), спиромицина (XX). Антимикробную активность соединений изучали на коллекции тест -штаммов микроорганизмов , полученных из музея микроорганизмов института и музеев живых культур разных лабораторий ГУ «ИМИ НАМИ » (г. Харьков). Коллекция включала в себя следующие мультирезистентные штаммы : бактерий — *Staphylococcus aureus* (золотистый стафилококк), *E.coli* (кишечная палочка), *Shigella*
- 15 *flexneri* (дизентерийная палочка), *B. antracoides* (антракоид), *Proteus vulgaris* (вульгарный протей), *seudoonas aureinosa* (синегнойная палочка) грибов — *Candida spp.* (дрожжеподобные грибы рода Кандида), *Microsporium Ian.* (возбудитель микроспории), *Trick mentagrophytes* (возбудитель трихофитии), *Aspergillus niger* (аспергиллы). Для культивирования бактерий использовали бульон Хоттингера (рН 7,2-7,4), а для грибов
- 20 среду Сабуро (рН 6,0-6,8). Антимикробную и фунгистатическую активность оценивали по минимальной подавляющей концентрации (МПК) — наименьшему количеству вещества , которое полностью задерживало рост бактерий или грибов после выращивания . МПК определяли общепринятым методом серийных разведений с коэффициентом 2 в жидкой питательной среде . С этой целью готовили исходное разведение испытуемого
- 25 соединения с концентрацией 50 мкг /мл питательной среды (бульон Хоттингера). В дальнейшем проводили последовательное двукратное разведение , в результате чего в 1 мл питательной среды содержалось 25; 12,5; 6,25; 3,12 мкг /мл и т.д. Эталонами сравнения служили нистатин и этакридина лактат . Эта комбинаторная смесь производных антибиотика ведет себя как квазиживая система — она адаптируется под индивидуальные
- 30 условия организма , предотвращая появление резистентности у бактерий . Результаты исследований противомикробной и антигрибковой активности производных таннидов представлены в табл . 1.

Как видно из табл. 1, максимальную антимикробную активность в отношении резистентных штаммов микроорганизмов проявили все комбинаторные производные антибиотиков, в отличие от их немодифицированных производных, которые изначально не обладали антимикробной активностью в отношении указанных штаммов.

- 5 Антисептическую активность на уровне исходных производных (31,25 мкг /мл) проявили соединения (XV) и (XVII), относящиеся к группам производных полиеновых антисептических средств, тогда как исходные немодифицированные амфотерицин и нистатин не оказывали антисептического действия на данные резистентные штаммы. Меньшей антисептической активностью обладали производные (IV), (XVIII), (XIX) (XX),
- 10 хотя изначально эти антибиотики не обладали вообще антисептической активностью, тем более в отношении мультирезистентных штаммов. Максимальную активность в отношении практически всех исследуемых микроорганизмов в дозе 3,12 мкг /мл проявило производное XII или супрамолекулярное комбинаторное производное канамицина, тогда как исходное производное вообще не обладало активностью на данные резистентные
- 15 штаммы.

Таблица .1. Антибактериальная и фунгистатическая активность супрамолекулярных комбинаторных производных антибиотиков по МПК, мкг /мл

Номер соединения	Штаммы микроорганизмов *									
	S.aureus IMI res3	E.coli IMI res3	S.flexneri IMI res3	B.antracoides IMI res3	P.aeruginosa IMI res3	P.vulgaris IMI res3	C.albicans res3 IMI	M.anosum IMI res3	T.mentagrophytes IMI res3	A.niger IMI res3
IV	3,12	3,12	6,25	6,25	250	250	-	250	250	250
VII	3,12	3,12	3,12	6,25	6,25	-	-	-	-	-
IX	3,12	3,12	3,12	6,25	6,25	-	-	250	-	-
X	6,25	6,25	6,25	6,25	12,5	250	-	-	-	-
XI	6,25	6,25	6,25	6,25	12,5	250	-	-	-	-
XII	3,12	3,12	3,12	3,12	3,12	3,12	-	-	-	-
XIII	6,25	6,25	6,25	6,25	3,12	6,25	-	-	-	-
XIV	6,25	6,25	6,25	3,12	6,25	6,25	-	-	-	-
XV	-	-	-	-	-	-	31,25	31,25	31,25	31,25
XVI	3,12	3,12	3,12	250	12,5	3,12	-	-	-	-
XVII	-	-	-	-	-	-	31,25	31,25	31,25	31,25
XVIII	6,25	6,25	6,25	6,25	12,5	6,25	31,25	250	250	250
XIX	6,25	6,25	6,25	6,25	3,12	6,25	31,25	250	250	250

XX	3,12	3,12	3,12	3,12	3,12	3,12	250	250	250	250
Этакриди на лактат	31,2	125	-	-	-	-	62,5	62,5	16,2	62,5

Примечания : - — не обладает активностью в дозе до 500 мкг /мл; *- на рост данных штаммов исходные немодифицированные производные антибиотиков влияния не оказывали даже в дозах выше 500 мкг /мл.

Таким образом , комбинаторные супрамолекулярные производные антибиотиков
5 обладают мощной антимикробной и антигрибковой активностью в отношении мультирезистентных штаммов микроорганизмов и грибов , тогда как исходные немодифицированные антибиотики не обладали таковой активностью вообще .

Пример 5. Эффективность СКПА против резистентного штамма **Escherichia coli**
IMI2001 в модели нейтропенического перитонита /сепсиса у мышей и оценка средней
10 эффективной дозы (**ED50**).

Задачей данного исследования было исследование зависимости доза-ответ после
внутривенного (в/в) введения однократной дозы СКПА (КПТ) в диапазоне 0,16-12 мг/кг.
Эффект исследовали против резистентной E. coli IMI2001 в модели нейтропенического
перитонита . Введение меропенема в дозе 40 мг/кг включали в качестве группы
15 положительного контроля . Количество колоний в крови и перитонеальной жидкости определяли через 5 ч после введения . Модель перитонита /сепсиса у мышей является хорошо известной моделью для исследований антимикробной активности , как описано N. Frimodt-Moller и J.D.

Knudsen в Handbook of Animal Models of Infection (1999), ed. by O. Zak & M.A. Sande,
20 Academic Press, San Diego, US.

Материалы и методы

- 30 самок беспородных мышей NMRI, 25-30 грамм (Harlan Scandinavia).
- Escherichia coli IMI2001 от IMGNAMN, Kharkov, Ukraine. Клинический изолят из
человеческой раны от 2003 г.с множественной лекарственной устойчивостью (к
25 ампициллину , цефтазидиму , азтреонаму , гентамицину , ципрофлоксацину).
- СКПА в ацетате Рингера , рН 6, 1,2 мг/мл, 6,0 мл. Раствор хранили при 4°C до
использования . Анализы использованных композиций для введения проводили по

окончании фазы исследования , проводимой на живых животных , и в этих анализах были получены следующие результаты .

Таблица 2. Соотношения концентраций в эксперименте

Предполагаемая концентрация	Измеренная концентрация
1,2 мг/мл	1,16 мг/мл
0,6 мг/мл	0,53 мг/мл
0,3 мг/мл	0,28 мг/мл
0,15 мг/мл	0,12 мг/мл
0,075 мг/мл	0,047 мг/мл
0,03 мг/мл	0,040 мг/мл
0,016 мг/мл	0,002 мг/мл

- Наполнитель (ацетат Рингера , рН 6). Раствор хранили при 4°C до использования .

5 - Meronem (AstraZeneca, 500 мг вещества для инфузии , меропенем).- Стерильная вода .

- Стерильный 0,9% физиологический раствор .

- Циклофосфамид , Arodan (A-Pharma, 1 г).- Чашки с агаром и 5% лошадиной крови .

- Чашки с агаром , бромтимоловым синим и лактозой .

Лабораторный виварий и содержание мышей . Температуру и влажность в виварии регистрировали ежедневно . Температура составляла 21°C +/- 2°C, и ее можно было регулировать нагреванием и охлаждением . Влажность составляла 55 +/- 10%. Смена воздуха происходила приблизительно 10-20 раз в час, и период света/темноты был в 12-часовом интервале 06:00-18:00/18:00-06:00. У мышей был свободный доступ к питьевой воде для домашних животных и пище (2016, Harlan). Мышей содержали в макролоновых клетках 3 типа по 3 мыши в клетке . В качестве подстилки использовали Aspen Wood от Tarvei. Кроме того , животным давали бумажные полоски Sizzle-nest в качестве материала для гнезд . Мышам метили хвосты для различения мышей в клетке . Мышей взвешивали за сутки до введения .

Приготовление растворов СКПА

20 Раствор с концентрацией 1,2 мг/мл дополнительно разводили в PBS-наполнителе следующим образом .

Таблица 3. Соотношение концентрация вещества и наполнителя

0,6 мг/мл ~ 7,5 мг/кг :	1,5 мл 1,2 мг/мл КПП + 1,5 мл наполнителя
-------------------------	---

0,3 мг/мл ~ 5,0 мг/кг:	1,5 мл 0,6 мг/мл КПП + 1,5 мл наполнителя
0,15 мг/мл ~ 2,5 мг/кг:	1,5 мл 0,3 мг/мл КПП + 1,5 мл наполнителя
0,075 мг/мл ~ 1,25 мг/кг:	1,5 мл 0,15 мг/мл КПП + 1,5 мл наполнителя
0,03 мг/мл ~ 0,63 мг/кг:	1,5 мл 0,075 мг/мл КПП + 2,25 мл наполнителя
0,016 мг/мл ~ 0,16 мг/кг:	1,5 мл 0,03 мг/мл КПП + 1,5 мл наполнителя

Приготовление раствора меропенема . Введение меропенема в дозе 40 мг/кг было включено в качестве группы положительного контроля . В общей сложности 500 мг меропенема (одну ампулу) растворяли в 10 мл воды в концентрации примерно 50 мг/мл. Этот исходный раствор разводили далее до 4 мг/мл (0,4 мл, 50 мг/мл + 4,6 мл физиологического раствора).

5

Приготовление циклофосфида . В общей сложности 1 г циклофосфида (одну ампулу Arodan 1 г) растворяли в 50 мл воды , примерно 20 мг/мл, на каждые сутки его использования . Этот исходный раствор разводили далее до 11 мг/мл (16,5 мл, 20 мг/мл + 13,5 мл физиологического раствора) для использования на -4 сутки или до 5 мг/кг (8,25 мл 20 мг/мл + 21,75 мл физиологического раствора) для использования на -1 сутки .

10

Введение циклофосфида мышам . У мышей индуцировали нейтропению инъекцией 0,5 мл раствора циклофосфида внутривентрально за 4 суток (200 мг/кг) и 1 сутки (100 мг/кг) до заражения .

15

Заражение мышей . Свежие колонии *E. coli* IMI2001, полученные в течение ночи в чашке с агаром и 5% лошадиной крови , суспендировали и разводили в стерильном физиологическом растворе приблизительно до 2×10^6 КОЕ /мл. За один час до начала введения (момент времени -1 ч) проводили внутривентральное заражение мышей 0,5 мл суспензии *E. coli* в латеральный нижний квадрант живота . Приблизительно через 0,5-1 ч после введения мышам перорально вводили 45 мкл нейрофена (20 мг ибупрофена на мл, что соответствовало 30 мг/кг) в качестве болеутоляющего средства .

20

Введение препаратов мышам . Мышам проводили однократное в/в введение КПП , меропенема или наполнителя в латеральную хвостовую вену на протяжении приблизительно 30 секунд в объеме 10 мл/кг в момент времени 0 ч (см. Таблицу 1). Определение дозы было основано на средней массе тела 30 г. Мышам с массой тела 28-32 г вводили 0,30 мл раствора . Мышам с массой тела 27-28 г вводили 0,25 мл раствора и мышам с массой тела 32,1-36 г вводили 0,35 мл раствора .

25

Таблица 4. Схема введения и забора образцов в модели перитонита у мышей

Заражение , внутрибрюшинно , - 1 ч	Внутривенное введение , 0 ч	Забор образцов и №№ мышей	
		0 ч	5 ч
0,5 мл E. coli IMI2001 1×10 ⁶ КОЕ /мл	Наполнитель , ацетат Рингера		1-2-3
	КПТ , 0,16 мг/кг		4-5-6
	КПТ , 0,30 мг/кг		7-8-9
	КПТ , 0,75 мг/кг		10-1 1-12
	КПТ , 1,5 мг/кг		13-14-15
	КПТ , 3,0 мг/кг		16-17-18
	КПТ , 6,0 мг/кг		19-20-21
	КПТ , 12 мг/кг		22-23-24
	Меропенем , 40 мг/кг		25-26-27
	Без введения	28-29-30	

T указывает время относительно введения . Числа в столбцах забора образцов представляют собой идентификационные номера мышей . Клиническая балльная оценка мышей . Мышей наблюдали в течение исследования и присваивали им баллы от 0 до 5 в зависимости от их поведения и клинических признаков .

5 Балл 0: здоровые .

Балл 1: минимальные клинические признаки инфекции и воспаления , например , наблюдение минимальных признаков расстройства или изменения активности .

10 Балл 2: отчетливые признаки инфекции , такие как социальная самоизоляция , снижение любопытства , измененное положение тела, пилоэрекция или изменения характера движений .

Балл 3: выраженные признаки инфекции , такие как тугоподвижность , снижение любопытства , измененное положение тела, пилоэрекция , боль или изменения характера движений .

Балл 4: сильная боль , и мышь сразу умерщвляли для минимизации страданий животного .

15 Балл 5: смерть мыши .

Забор образцов . Количество колоний определяли в крови и перитонеальной жидкости на 0 и 5 ч. Мышей анестезировали CO_2+O_2 и забор крови производили из разреза в

подмышечной области в пробирки типа Эппендорф с покрытием этилендиаминтетрауксусной кислотой (EDTA). Мышей умерщвляли сразу после забора крови, и в общей сложности 2 мл стерильного физиологического раствора вводили внутривенно и проводили мягкий массаж живота до его вскрытия и забора образцов жидкости пипеткой. Затем каждый образец разводили в 10 раз в физиологическом растворе и капли объемом 20 мкл наносили на чашки с синим агаром. Все чашки с агаром инкубировали 18-22 ч при 35°C на воздухе.

Результаты. Количество колоний определяли в начале введения и через 5 ч после введения. Количество КОЕ и клинические показатели мышей показаны в Таблице 3.

10 Перед проведением вычислений проводили log₁₀-трансформацию количества КОЕ. КОЕ /мл в заражающем материале было определено как 6,29 log₁₀. В начале введения среднее log₁₀ КОЕ /мл составляло 5,76 в перитонеальной жидкости и 5,13 в крови, и уровни КОЕ сохранялись на сходном уровне в группе наполнителя (5,72 и 4,65 log₁₀ КОЕ /мл в перитонеальной жидкости и крови, соответственно) через 5 ч после введения. Несколько

15 сниженные уровни КОЕ наблюдали в крови и перитонеальной жидкости после введения КПП в дозе 0,16-3,0 мг/кг. Введение КПП в дозе 6 и 12 мг/кг приводило к значительному снижению уровней КОЕ ($p < 0,001$) по сравнению с введением наполнителя, как в перитонеальной жидкости, так и в крови (Таблица 3). Введение меропенема в дозе 40 мг/кг также приводило к значимому снижению по сравнению с мышами, которым

20 вводили наполнитель, как в крови ($p < 0,05$), так и в перитонеальной жидкости ($p < 0,01$). Кривые доза-ответ (данные не показаны) вычисляли в GraphPad Prism с использованием сигмовидной кривой доза-ответ (вариабельный угол наклона). Определенные по этим кривым значения ED₅₀ составили 2,11±1,01 мг/кг в перитонеальной жидкости и 2,12±0,33 мг/кг в крови. Максимальный эффект КПП, E_{max}, определяли как разность log КОЕ при

25 отсутствии ответа и при максимальном ответе. Отсутствие ответа характеризовали как количество колоний на уровне, определенном у мышей, которым вводили наполнитель. E_{тах}, вычисленный как разность между «Верхним плато» ("Top plateau") и «Нижним плато» ("Bottom plateau") в GraphPad Prism с использованием сигмовидной кривой доза-ответ, составил 4,72 log₁₀ КОЕ для перитонеальной жидкости и 3,15 log₁₀ КОЕ для

30 крови. Кроме того, с использованием GraphPad Prism оценивали 1, 2 и 3 log уничтожения, определяемые как доза, необходимая для снижения бактериальной нагрузки на 1, 2 или 3 log по сравнению с началом лечения. 1, 2 и 3 log уничтожения для КПП составляли 1,11 мг/кг, 2,95 мг/кг и 4,73 мг/кг, соответственно, в перитонеальной жидкости и 0,25 мг/кг,

Наполнитель	1	T=5	1	1	5,74		5,05	
	2	T=5	1	0	5,54	5,72	4,78	4,65
	3	T=5	1	1	5,88		4,11	
КПТ 0,16 мг/ кг	4	T=5	1	1	5,16		4,27	
	5	T=5	1	1	4,78	5,31	4,19	4,54
	6	T=5	1	0	5,98		5,16	
КПТ 0,30 мг/ кг	7	T=5	1	0	2,76		1,40	
	8	T=5	1	1	5,74	4,26	4,63	2,88
	9	T=5	1	0	4,27		2,60	
КПТ 0,75 мг/ кг	10	T=5	1	0	5,74		5,07	
	11	T=5	1	1	4,95	5,16	4,30	4,46
	12	T=5	1	1	4,78		4,00	
КПТ 1,5 мг/ кг	13	T=5	1	0	3,33		3,51	
	14	T=5	1	1	4,72	4,41	3,92	3,99
	15	T=5	1	0	5,18		4,54	
КПТ 3,0 мг/ кг	16	T=5	1	1	4,74		3,86	
	17	T=5	1	1	4,74	3,91	3,57	2,81
	18	T=5	1	0	2,24		1,00	
КПТ 6,0 мг/ кг	19	T=5	1	1	2,18	2,12	1,00	1,00
	20	T=5	1	1	2,18	***	1,00	***
	21	T=5	1	1	2,00		1,00	
КПТ 12 мг/кг	22	T=5	1	1	1,00	1,36	1,00	1,00
	23	T=5	1	0	1,69	***	1,00	***
	24	T=5	1	0	1,40		1,00	
Меропенем 40 мг/ кг	25	T=5	1	1	3,92	2,64	2,48	2,38
	26	T=5	1	1	1,70	**	1,70	*
	27	T=5	1	0	2,30		2,95	
Нет	28	T=0	1		5,84		5,08	
	29	T=0	1		5,78	5,76	4,98	5,13

	30	T=0	1		5,65		5,34	
PF - перитонеальная жидкость								
Звездочками указаны значимые отличия от группы наполнителя (дисперсионный анализ, множественное сравнение).								
* соответствует $p < 0,05$; ** соответствует $p < 0,01$; *** соответствует $p < 0,001$.								

Предел выявления 1,4 log₁₀ КОЕ /мл. Образцы без обнаруженных бактерий представлены как 1,0 log₁₀ КОЕ /мл.

- Пример 6. Модель перитонита /сепсиса : эффект КПП в дозе 7.5 мг/кг с течением времени против **Escherichia coli IMH00ly** мышей **NMRI** с нейтропенией
- 5 Введение. Задачей данного исследования было исследование эффективности КПП *in vivo* после внутривенного (в/в) введения однократной дозы 7,5 мг/кг. Эффект исследовали против *Escherichia coli* IMI2001 в модели перитонита у мышей **NMRI** с нейтропенией во избежание использования муцина, который обычно используют в модели перитонита у
- 10 мышей. У мышей индуцировали нейтропению инъекциями циклофосфамида. Введение меропенема в дозе 40 мг/кг включали в качестве группы положительного контроля и введение наполнителя включали в качестве группы отрицательного контроля. Количество колоний в перитонеальной жидкости и крови определяли через 2 и 5 ч после введения.
- Материалы и методы
- 15 - 30 самок беспородных мышей **NMRI**, 28-32 грамма (Kiev).
- *Escherichia coli* IMI2001 из IMINAMN, Ukraine, Kharkov. Клинический изолят из человеческой раны от 2013 г. с множественной лекарственной устойчивостью (к ампициллину, цефтазидиму, азтреонаму, гентамицину, цiproфлоксацину).
- КПП в ацетате Рингера, pH 6, 1,2 мл, 0,75 мг/мл. Анализы вводимых композиций,
- 20 проведенный после исследования, показал концентрацию приблизительно 0,78 мг/мл.
- Наполнитель (ацетат Рингера, pH 6), 3 мл.
- Meronem (AstraZeneca, 500 мг вещества для инфузии, меропенем - Apodan (A-Pharma, 1 г циклофосфамида).
- Стерильная вода.
- 25 - Стерильный 0,9% физиологический раствор.
- Чашки с агаром и 5% лошадиной крови.
- Чашки с агаром, бромтимоловым синим и лактозой.

- Лабораторный виварий и содержание мышей . Температуру и влажность в виварии регистрировали ежедневно . Температура составляла $21^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, и ее можно было регулировать нагреванием и охлаждением . Влажность составляла $55 \pm 10\%$. Смена воздуха происходила приблизительно 10-20 раз в час, и период света/темноты был в
- 5 12-часовом интервале 06:00-18:00/18:00-06:00. У мышей был свободный доступ к питьевой воде для домашних животных и пище (2016, Harlan). Мышей содержали в макролоновых клетках 3 типа по 3 мыши в клетке . В качестве подстилки использовали Aspen Wood от Tarvei. Кроме того , животным давали бумажные полоски Sizzle-nest в качестве материала для гнезд . Мышам метили хвосты для различения мышей в клетке .
- 10 Раствор КПП . Раствор КПП с концентрацией 0,75 мг/мл хранили при $+4^{\circ}\text{C}$ до одного часа перед инъекцией , после этого при комнатной температуре .
- Приготовление раствора меропенема . В общей сложности 500 мг меропенема (одну ампулу) растворяли в 10 мл воды , примерно 50 мг/мл, на сутки его использования . Этот исходный раствор разводили далее до 4 мг/мл (0,4 мл, 50 мг/мл + 4,6 мл физиологического
- 15 раствора) .
- Приготовление циклофосфида . В общей сложности 1 г циклофосфида (одну ампулу Arodan) растворяли в 50 мл воды , примерно 20 мг/мл, на каждые сутки его использования . Этот исходный раствор разводили далее до 11 мг/мл (16,5 мл, 20 мг/мл + 13,5 мл физиологического раствора) для использования на -4 сутки или до 5 мг/кг (8,25 мл 20
- 20 мг/мл + 21,75 мл физиологического раствора) для использования на -1 сутки .
- Введение циклофосфида мышам . У мышей индуцировали нейтропению инъекцией 0,5 мл раствора циклофосфида внутривентрально за 4 суток (200 мг/кг) и 1 сутки (100 мг/кг) до заражения .
- Заражение мышей . Свежие колонии *E. coli* AID#172, полученные в течение ночи в чашке с агаром и 5% лошадиной крови , суспендировали и разводили в стерильном физиологическом растворе приблизительно до 2×10^6 КОЕ /мл. За один час до начала введения (момент времени -1 ч) проводили внутривентральное заражение мышей 0,5 мл суспензии *E. coli* в латеральный нижний квадрант живота . Через 2,5 ч после введения при существенных клинических признаках инфекции мышам перорально вводили 45 мкл
- 30 нейрофена (20 мг ибупрофена на мл, что соответствовало 30 мг/кг) в качестве болеутоляющего средства .
- Балльная оценка мышей . При каждом заборе образцов у мышей проводили балльную оценку клинических признаков инфекции .

Балл 0: здоровые .

Балл 1: минимальные клинические признаки инфекции и воспаления , например , наблюдение минимальных признаков расстройства или изменения активности .

Балл 2: отчетливые признаки инфекции , такие как социальная самоизоляция , снижение
5 любопытства , измененное положение тела , пилоэрекция или изменения характера движений .

Балл 3: выраженные признаки инфекции , такие как тугоподвижность , снижение любопытства , измененное положение тела , пилоэрекция , боль или изменения характера движений .

10 Балл 4: сильная боль , и мышь сразу умерщвляли для минимизации страданий животного .
Балл 5: смерть мыши .

Введение препаратов мышам . Мышам проводили однократное в/в введение КПП , меропенема или наполнителя в латеральную хвостовую вену на протяжении
15 приблизительно 30 секунд в момент времени 0 ч (см. Таблицу 6). Определение дозы было

основано на средней массе тела 30 г. Мышам с массой тела 28-32 г вводили 0,30 мл раствора . Мышам с массой тела 27-28 г вводили 0,25 мл раствора и мышам с массой тела 32,136 г вводили 0,35 мл раствора . Мыши 17 случайно ввели 0,35 мл, несмотря на то, что ее масса тела составляла 29,5 г. По-видимому , это не повлияло на результаты , поскольку уровни КОЕ у этой мыши были очень сходны с двумя другими мышами данной группы .

20

Заражение T=-1 ч	Введение T=0 ч	Забор образцов T=0 ч	Забор образцов T=2 ч	Забор образцов T=5 ч
0,5 мл E. coli IMI2001=10 ⁶ КОЕ/мл	КПП			4, 5, 6
	Меропенем			7, 8, 9
	Наполнитель (ацетат Рингера)			10, 11, 12
	КПП		16, 17, 18	
	Меропенем		19, 20, 21	

	Наполнитель (ацетат Рингера)		22, 23, 24	
	Нет		25, 26, 27	
	Нет	28, 29, 30		
Т указывает время относительно введения. Числа в столбцах забора образцов представляют собой идентификационные номера мышей.				

Забор образцов . Количество колоний определяли в крови и перитонеальной жидкости на 0, 2 и 5 ч после введения согласно Таблице 6.

Мышей анестезировали $\text{CO}_2 + \text{O}_2$ и забор крови проводили из разреза в подмышечной области . Мышей умерщвляли цервикальной дислокацией и в общей сложности 2 мл стерильного физиологического раствора вводили внутривентриально и проводили мягкий массаж живота , затем его вскрывали и проводили забор образцов жидкости пипеткой . Каждый образец разводили в 10 раз в физиологическом растворе и капли объемом 20 мкл наносили на чашки с кровяным агаром . Все чашки с агаром инкубировали 18-22 ч при 35°C на воздухе .

10 Результаты . Количество колоний и клинические показатели мышей показаны в Таблице 2. Перед проведением вычислений проводили \log_{10} -трансформацию количества КОЕ для получения нормального распределения .КОЕ /мл в заражающем материале было определено как $6,50 \log_{10}$. В начале введения среднее \log_{10} КОЕ /мл составляло 3,57 в перитонеальной жидкости и 3,54 в крови , и уровень КОЕ повышался до 5,43 и 4,58 в

15 перитонеальной жидкости и крови , соответственно , через 2 ч у животных , которым вводили наполнитель , и до 5,72 и 4,74 в перитонеальной жидкости и крови , соответственно , через 5 ч у мышей , которым вводили наполнитель , чего и следовало ожидать .Через 2 ч после введения КПП наблюдали значимо сниженные уровни КОЕ , как в крови , так и в перитонеальной жидкости , по сравнению с введением наполнителя

20 ($p < 0,001$).Дополнительное снижение уровней КОЕ , как в крови , так и в перитонеальной жидкости , наблюдали через 5 ч после введения КПП ($p < 0,001$ по сравнению с контролем наполнителем). Уровни КОЕ были более чем на 3 \log_{10} КОЕ /мл ниже , чем после введения наполнителя .Введение меропенема также приводило к значимому ($p < 0,01$) снижению уровней КОЕ по сравнению с введением наполнителя в перитонеальной жидкости через 2

25 и 5 ч после введения , но в крови только через 5 ч после введения . Отсутствие значимого снижения в крови через 2 ч после введения может отражать скорее выраженную

вариабельность в группе наполнителя , а не слабый эффект меропенема . Различия уровней КОЕ после введения КПП или меропенема по сравнению с введением наполнителя были следующими .

Таблица 8. Различия уровней КОЕ после введения КПП или меропенема по сравнению с введением наполнителя

КПП, 7,5 мг/кг	2 ч: брюшина -1,63 log КОЕ/мл	кровь -2,50 log КОЕ/мл
	5 ч: брюшина -3,76 log КОЕ/мл	кровь -3,74 log КОЕ/мл
Меропенем, 40 мг/кг	2 ч: брюшина -1,51 log КОЕ/мл	кровь -0,82 log КОЕ/мл
	5 ч: брюшина -1,51 log КОЕ/мл	кровь -1,64 log КОЕ/мл

У всех мышей были незначительные симптомы инфекции или не было симптомов инфекции .

Обсуждение и заключение . Задачей данного исследования было исследование эффективности КПП после внутривенного (в/в) введения однократной дозы 7,5 мг/кг в модели нейтропенического перитонита у мышей NMRI. Для КПП наблюдали значимое ($p < 0,001$) снижение более чем на 3 log₁₀ КОЕ /мл по сравнению с введением наполнителя в крови и перитонеальной жидкости через 5 ч после введения . Кроме того , через 2 ч после введения КПП наблюдали значимое снижение ($p < 0,001$) как в крови , так и в перитонеальной жидкости . Меропенем продемонстрировал значимое снижение по сравнению с группой наполнителя ($p < 0,01$) как в крови , так и в перитонеальной жидкости через 5 ч, но через 2 ч после введения только в перитонеальной жидкости .

Таблица 9. Количество колоний Б. coli IMI2001y мышей , которым вводили однократную дозу КПП , наполнителя или меропенема

Введение	№	Время забора образцов	Балл			log ₁₀ КОЕ			
			T=0 ч	T=2 ч	T=5 ч	PF	Среднее B PF	Кровь	Среднее в крови
КПП 7,5 мг/кг	4	T=5	0		0	2,18	1,96 ***	1,00	1,00 ***
	5	T=5	0		1	2,30		1,00	
	6	T=5	0		1	1,40		1,00	

Меропенем 40 мг/кг	7	T=5	0		0	4,38	4,21 **	3,20	3,10 **
	8	T=5	0		0	4,00		2,85	
	9	T=5	0		0	4,26		3,26	
	10	T=5	0		0	5,39		4,63	
Наполнитель	11	T=5	0		0	5,99	5,72	5,24	4,74
	12	T=5	0		0	5,78		4,36	
КПП 7,5 мг/кг	16	T=2	0	1		4,24	3,79 **	2,04	2,08 **
	17	T=2	0	1		3,60		2,20	
	18	T=2	0	1		3,54		2,00	
Меропенем 40 мг/кг	19	T=2	0	1		4,12	3,92 **	3,60	3,76
	20	T=2	0	1		3,40		3,57	
	21	T=2	0	1		4,24		4,11	
	22	T=2	0	0		4,89		3,21	
Наполнитель	23	T=2	0	1		5,65	5,43	5,39	4,58
	24	T=2	0	0		5,74		5,15	
	25	T=2	0	0		4,45		4,39	
Нет	26	T=2	0	0		5,42	5,08	4,57	4,33
	27	T=2	0	0		5,38		4,02	
	28	T=0	0			1,88		1,00	
Нет	29	T=0	0			3,71	3,57	4,27	3,54
	30	T=0	0			5,13		5,35	
PF - перитонеальная жидкость . Использованный заражающий материал : $1,97 \cdot 10^6$ КОЕ /мл.									
* Мыши было введено 0,35 мл вместо 0,30 мл исследуемого соединения .									
* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ по сравнению с группой наполнителя .									

Пример 7. Модель инфекции бедра с нейтропенией : эффективность КПП против **Escherichia coli 1M 12001** и оценка **ED50**

Введение. Задачей данного исследования было исследование зависимости доза-ответ после внутривенного (в/в) введения однократной дозы КПП в диапазоне 0,16-12 мг/кг.

Эффект исследовали против *E. coli* IMI2001 в модели инфекции бедра с нейтропенией . Введение меропенема в дозе 40 мг/кг включали в качестве группы положительного контроля . Количество колоний в бедрах определяли через 5 ч после введения . Модель инфекции бедра является хорошо известной моделью для исследований антимикробного эффекта и проникновения в ткани , как описано S. Gudmundsson & H. Erlensdottir: Handbook of Animal Models of Infection (1999), ed. by O. Zak & M.A. Sande, Academic Press, San Diego, US, и в некоторых других публикациях . См. обзор D. Andes & C. Craig: Animal model pharmacokinetics and pharmacodynamics: a critical review. International Journal of Antimicrobial Agents, 19(4): 261-268.

- 10 Материалы и методы . 40 самок беспородных мышей NMRI, 25-30 грамм (Kiev, Ukraine). *Escherichia coli* IMI2001 из IMGNAMN, Kharkov, Ukraine. Клинический изолят из человеческой раны от 20q3 г. с множественной лекарственной устойчивостью (к ампициллину , цефтазидиму , азтреонаму , гентамицину , ципрофлоксацину).
- КПП в ацетате Рингера , рН 6, 1,2 мг/мл, 6,0 мл. Раствор хранили при 4°C до использования .
- 15 Анализы использованных композиций для введения проводили по окончании фазы исследования , проводимой на живых животных , и в этих анализах были получены следующие результаты .

Таблица 10. Концентрации используемых препаратов

Предполагаемая концентрация	Измеренная концентрация
1,2 мг/мл	1,4 мг/мл
0,6 мг/мл	0,57 мг/мл
0,3 мг/мл	0,28 мг/мл
0,15 мг/мл	0,15 мг/мл
0,075 мг/мл	0,063 мг/мл
0,03 мг/мл	0,02 мг/мл
0,016 мг/мл	0,014 мг/мл

- Наполнитель (ацетат Рингера , рН 6). Раствор хранили при 4°C до использования .
- 20 - Meronem (AstraZeneca, 500 мг вещества для инфузии , меропенем). Номер партии : 09466C. Срок годности : август 2013 г.
- Стерильная вода .
- Стерильный 0,9% физиологический раствор .
- Sendoxan (циклофосфамид , Baxter, 1 г). Номер партии : 0A 671C. Срок годности :

январь 2013 г.

- Чашки с агаром и 5% лошадиной крови .

- Чашки с агаром , бромтимоловым синим и лактозой .

Лабораторный виварий и содержание мышей . Температуру и влажность в виварии регистрировали ежедневно . Температура составляла 21°C +/- 2°C, и ее можно было регулировать нагреванием и охлаждением . Влажность составляла 55 +/- 10%. Смена воздуха происходила приблизительно 10-20 раз в час, и период света/темноты был в 12-часовом интервале 06:00-18:00/18:00-06:00. У мышей был свободный доступ к питьевой воде для домашних животных и пище (2016, Harlan). Мышей содержали в макролоновых клетках 3 типа по 4 мыши в клетке . В качестве подстилки использовали Aspen Wood от Tapvei. Кроме того , животным давали бумажные полоски Sizzle-nest в качестве материала для гнезд . Мышам метили хвосты для различения мышей в клетке . Мышей взвешивали за сутки до введения .

Приготовление растворов КПП . Раствор с концентрацией 1,2 мг/мл дополнительно разводили в PBS-наполнителе следующим образом .

Таблица 11. Дозирование препаратов в разных концентрациях и формах .

0,6 мг/мл ~ 7,5 мг/кг:	1,5 мл 1,2 мг/мл КПП + 1,5 мл наполнителя
0,3 мг/мл ~ 5,0 мг/кг:	1,5 мл 0,6 мг/мл КПП + 1,5 мл наполнителя
0,15 мг/мл ~ 2,5 мг/кг:	1,5 мл 0,3 мг/мл КПП + 1,5 мл наполнителя
0,075 мг/мл ~ 1,25 мг/кг:	1,5 мл 0,15 мг/мл КПП + 1,5 мл наполнителя
0,03 мг/мл ~ 0,63 мг/кг:	1,5 мл 0,075 мг/мл КПП + 2,25 мл наполнителя
0,016 мг/мл ~ 0,16 мг/кг:	1,5 мл 0,03 мг/мл КПП + 1,5 мл наполнителя

Приготовление раствора меропенема . Введение меропенема в дозе 40 мг/кг было включено в качестве группы положительного контроля .В общей сложности 500 мг меропенема (одну ампулу) растворяли в 10 мл воды , примерно 50 мг/мл. Этот исходный раствор разводили далее до 4 мг/мл (0,4 мл, 50 мг/ мл + 4,6 мл физиологического раствора) .

Приготовление циклофосфида . В общей сложности 1 г циклофосфида (одну ампулу Sendoxan 1 г) растворяли в 50 мл воды , примерно 20 мг/мл, на каждые сутки его использования . Этот исходный раствор разводили далее до 11 мг/мл (16,5 мл, 20 мг/мл + 13,5 мл физиологического раствора) для использования на -4 сутки или до 5 мг/кг (8,25 мл 20 мг/мл + 21,75 мл физиологического раствора) для использования на -1 сутки .

Введение циклофосфамида мышам . У мышей индуцировали нейтропению инъекцией 0,5 мл раствора циклофосфамида внутривенно за 4 суток (200 мг/кг) и 1 сутки (100 мг/кг) до заражения .

Заражение мышей . Свежие колонии *E. coli* IMI2001, полученные в течение ночи в чашке с агаром и 5% лошадиной крови , суспендировали и разводили в стерильном физиологическом растворе приблизительно до 2×10^7 КОЕ /мл. За один час до начала введения (момент времени -1 ч) проводили внутримышечное заражение мышей 0,05 мл суспензии *E. coli* в левую заднюю лапу . Приблизительно через 0,5 ч после введения мышам перорально вводили 45 мкл нейрофена (20 мг ибупрофена на мл, что соответствовало 30 мг/кг) в качестве болеутоляющего средства .

Введение препаратов мышам . Мышам проводили однократное в/в введение КПП , меропенема или наполнителя в латеральную хвостовую вену на протяжении приблизительно 30 секунд в объеме 10 мл/кг в момент времени 0 ч (см. Таблицу 1). Определение дозы было основано на средней массе тела 30 г. Мышам с массой тела 28-32 г вводили 0,30 мл раствора . Мышам с массой тела 27-28 г вводили 0,25 мл раствора и мышам с массой тела 32,1-36 г вводили 0,35 мл раствора .

Таблица 12. Схема введения и забора образцов в модели инфекции бедра у мышей

Заражение, внутримышечно, -1 ч	Внутривенное введение, 0 ч	Забор образцов и №№ мышей	
		0 ч	5 ч
0,05 мл <i>E. coli</i> IMI2001 2×10^7 КОЕ/мл	Наполнитель, ацетат Рингера		1-2-3-4
	КПП, 0,16 мг/кг		5-6-7-8
	КПП, 0,30 мг/кг		9-10-11-12
	КПП, 0,75 мг/кг		13-14-15-16
	КПП, 1,5 мг/кг		17-18-19-20
	КПП, 3,0 мг/кг		21-22-23-24
	КПП, 6,0 мг/кг		25-26-27-28
	КПП, 12 мг/кг		29-30-31-32
	Меропенем, 40 мг/кг		33-34-35-36
Без введения		37-38-39-40	

Т указывает время относительно введения. Числа в столбцах забора образцов представляют собой идентификационные номера мышей.

Клиническая балльная оценка мышей . Мышей наблюдали в течение исследования и присваивали им баллы от 0 до 5 в зависимости от их поведения и клинических признаков .

Балл 0: здоровые .

Балл 1: минимальные клинические признаки инфекции и воспаления , например ,
5 наблюдение минимальных признаков расстройства или изменения активности .

Балл 2: отчетливые признаки инфекции , такие как социальная самоизоляция , снижение любопытства , измененное положение тела , пилоэрекция или изменения характера движений .

Балл 3: выраженные признаки инфекции , такие как тугоподвижность , снижение
10 любопытства , измененное положение тела , пилоэрекция , боль или изменения характера движений .

Балл 4: сильная боль , и мышь сразу умерщвляли для минимизации страданий животного .

Балл 5: смерть мыши .

Забор образцов

15 Количество колоний определяли в бедрах на 0 и 5 ч. Мышей анестезировали $\text{CO}_2 + \text{O}_2$ и умерщвляли . Сразу после этого убрали кожу , получали заднюю левую лапу и замораживали ее при -70°C . После оттаивания бедра гомогенизировали с использованием Dispomix Drive. Затем каждый образец разводили в 10 раз в физиологическом растворе и
20 капли объемом 20 мкл наносили на чашки с синим агаром . Все чашки с агаром инкубировали 18-22 ч при 35°C на воздухе .

Результаты . Количество колоний определяли в начале введения и через 5 ч после введения . Количество КОЕ показано в Таблице 3. Перед проведением вычислений проводили \log_{10} -трансформацию количества КОЕ . КОЕ /мл в заражающем материале было определено как $7,35 \log_{10}$, что соответствовало $6,05 \log_{10}$ КОЕ /мышь . Наблюдаемая
25 высокая вариабельность может быть обусловлена субоптимальным заражением некоторых мышей , приводящим к слишком низким показателям КОЕ . По этой причине наименьшее значение в каждой группе исключали из графиков и вычислений (см. Таблицу 3). В начале введения среднее \log_{10} КОЕ /мл составляло 4,93 и повышалось до 6,49 \log_{10} КОЕ /мл в группе наполнителя через 5 ч после введения . Несколько сниженные
30 уровни КОЕ наблюдали после введения КПП в дозе 0,16-3,0 мг/кг. После введения КПП в дозе 6 мг/кг ($p < 0,05$) и 12 мг/кг ($p < 0,01$) наблюдали значительное снижение уровней КОЕ по сравнению с введением наполнителя (Таблица 9). Введение меропенема в дозе 40 мг/кг приводило к определенному , но незначимому снижению по сравнению с мышами ,

которым вводили наполнитель .Кривые доза-ответ (не показаны) вычисляли в GraphPad Prism с использованием сигмовидной кривой доза-ответ (вариабельный угол наклона). Определенное по этим кривым значение ED50 составило 5,9 мг/кг . Тем не менее , нижнее плато получено не было , и, следовательно , это значение может быть заниженным .

- 5 Максимальный эффект КПП , E_{T_a} , определяли как разность \log КОЕ при отсутствии ответа и при максимальном ответе . Отсутствие ответа характеризовали как количество колоний на уровне , определенном у мышей , которым вводили наполнитель . E_{T_a} , вычисленный как разность между «Верхним плато » и «Нижним плато » в GraphPad Prism с использованием сигмовидной кривой доза-ответ , составил $2,4 \log_{10}$ КОЕ /мл. Кроме того , 1
- 10 \log уничтожения , определяемый как доза , необходимая для снижения бактериальной нагрузки на 1 \log по сравнению с началом лечения , определенный с использованием GraphPad Prism, составил 6,1 мг/кг . 2 и 3 \log уничтожения получены не были .
- Ни у одной мыши ни в одной временной точке не наблюдали клинических признаков инфекции .

Таблица 13. Показатели эффективности КПП против E. coli AID#172, вычисленные в GraphPad Prism

Наибольшее	1,1 $\Delta \log_{10}$ КОЕ/мл
Наименьшее	-1,3 $\Delta \log_{10}$ КОЕ/мл
E _{max}	2,4 $\Delta \log_{10}$ КОЕ/мл
ED50	5,9 мг/кг
R2	0,46
1 \log уничтожения	6,1 мг/кг

Таблица 14. E. coli IMI2001 в бедрях мышей с нейтропенией, которым вводили однократную дозу КПП, меропенема или наполнителя

Введение T=0 ч	№ мыши	Время забора образцов	\log_{10} КОЕ, бедро	Среднее	Введение T=0 ч	№ мыши	Время забора образцов	\log_{10} КОЕ, бедро	Среднее
Наполнитель	1	T=5	5,16□	6,49	КПП 3,0 мг/кг	21	T=5	5,30	6,07
	2	T=5	6,47			22	T=5	6,03	
	3	T=5	6,13			23	T=5	4,85□	
	4	T=5	6,86			24	T=5	6,89	

КПП 0,16 мг/кг	5	T=5	3,18 \square	5,16	КПП 6,0 мг/кг	25	T=5	2,75	4,10*
	6	T=5	6,03			26	T=5	4,54	
	7	T=5	3,30			27	T=5	1,48 \square	
	8	T=5	6,15			28	T=5	5,01	
КПП 0,30 мг/кг	9	T=5	2,00 \square	5,09	КПП 12 мг/кг	29	T=5	2,48 \square	3,32**
	10	T=5	5,40			30	T=5	3,27	
	11	T=5	3,10			31	T=5	3,19	
	12	T=5	6,78			32	T=5	3,51	
КПП 0,75 мг/кг	13	T=5	2,9 \square	6,33	Меропенем 40 мг/кг	33	T=5	3,08 \square	4,25
	14	T=5	5,72			34	T=5	3,81 \square	
	15	T=5	7,27			35	T=5	4,99	
	16	T=5	6,00			36	T=5	3,94	
КПП 1,5 мг/кг	17	T=5	2,56 \square	5,62	Без введения	37	T=0	4,98	4,93
	18	T=5	6,23			38	T=0	3,81 \square	
	19	T=5	4,93			39	T=0	4,79	
	20	T=5	5,70			40	T=0	5,01	
\square Это значение было исключено из вычислений, поскольку его сочли как выпадающее значение.									
Звездочками указаны значимые отличия от группы наполнителя (дисперсионный анализ, множественное сравнение).									
* соответствует $p < 0,05$; ** соответствует $p < 0,01$.									

Предел выявления $1,4 \log_{10}$ КОЕ /мл. Объем описанного и заявленного здесь изобретения не следует ограничивать конкретными аспектами, раскрытыми здесь, поскольку эти аспекты являются лишь иллюстрацией некоторых аспектов изобретения. Предполагают, что любые эквивалентные аспекты входят в объем данного изобретения. Действительно, различные модификации изобретения, в дополнение к показанным и описанным здесь, будут очевидны специалистам в данной области техники из предшествующего описания. Предполагают, что такие модификации также входят в объем прилагаемой формулы изобретения. В случае конфликта следует руководствоваться настоящим описанием, включая определения.

Список литературы

- ¹ Accounts of Chemical Research. 1996. Vol. 29. № 3
- ² Chemical Reviews. 1997. № 3-4
- ³ Handbook of combinatorial chemistry: drugs, catalysts, materials. Weinheim, 2002. Vol. 1-2
- 5 ⁴ Combinatorial chemistry on solid supports. B., 2007
- ⁵ US Patent US5602097A, appl. US08305768

Формула изобретения

1. Комбинаторные производные антибиотиков на основе супрамолекулярных структур, отличающиеся тем, что супрамолекулярные структуры (В) получены путем комбинаторного синтеза из одной исходной молекулы полифункционального антибиотика (А₁) с двумя и более доступными для ковалентной модификации группами в реакции, как минимум, с двумя разными ковалентными модификаторами (М₂ и М₃) одновременно согласно схеме синтеза

5 $m A_1 + k M_2 + k M_3 = t B$, при этом образуется комбинаторная смесь модифицированных производных исходной молекулы, с максимальным разнообразием производных, а в качестве биологически активных веществ для создания фармацевтических композиций используют цельную комбинаторную смесь в виде супрамолекулярной структуры без разделения на индивидуальные компоненты.

2. Комбинаторные производные антибиотиков на основе супрамолекулярных структур по п.1., отличающиеся тем, что мольное соотношение компонентов реакции рассчитывают на основе формул:

$$(0) \quad k = n \times (2^n - 1)$$

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

где

п=количество доступных для замещения групп в полифункциональной молекуле антибиотика (А₁);

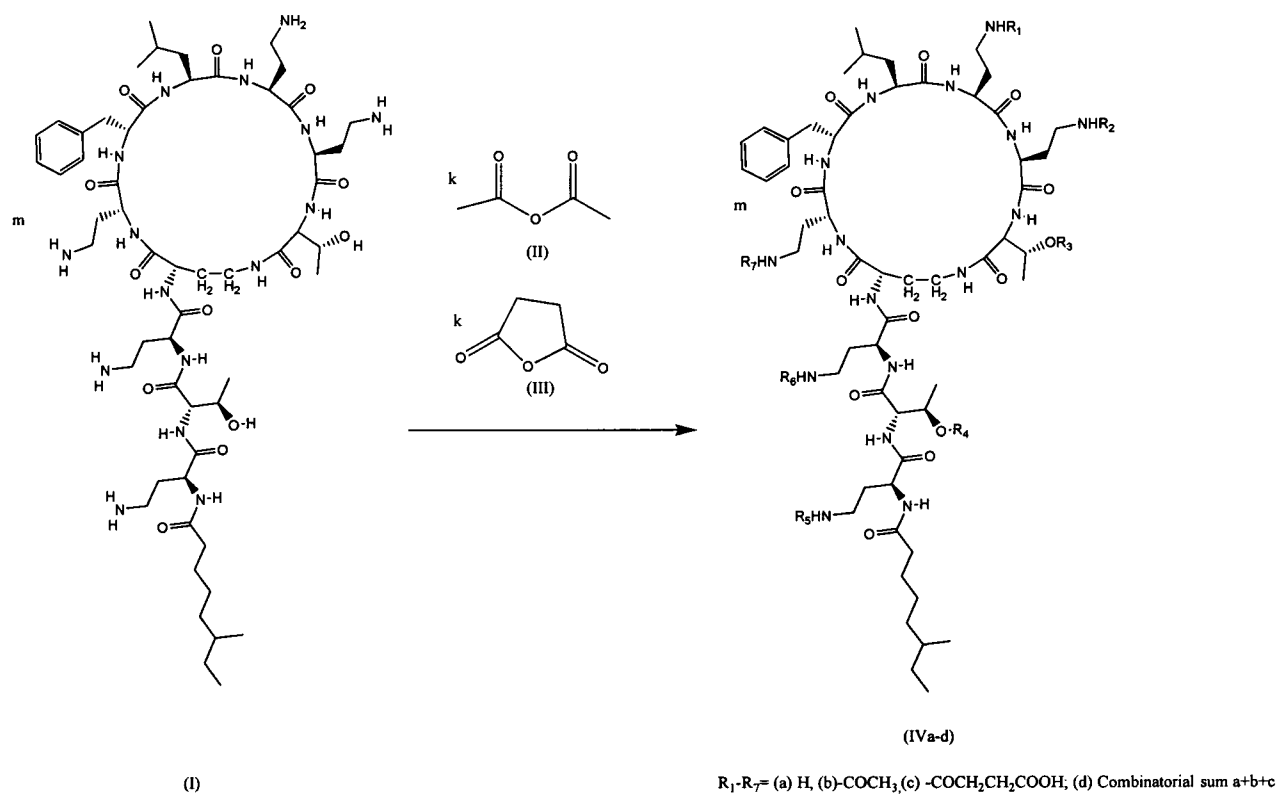
т=количество молей исходной полифункциональной молекулы (А₁) и количество разных молекул комбинаторных производных (В) после синтеза;

к=количество молей каждого из двух модификаторов (М₂ и М₃) в реакции комбинаторного синтеза для получения максимального количества разных производных, а в реакции образуется комбинаторная смесь В модифицированных производных исходной молекулы антибиотика (А₁), количество комбинаций которых является максимальным (т)

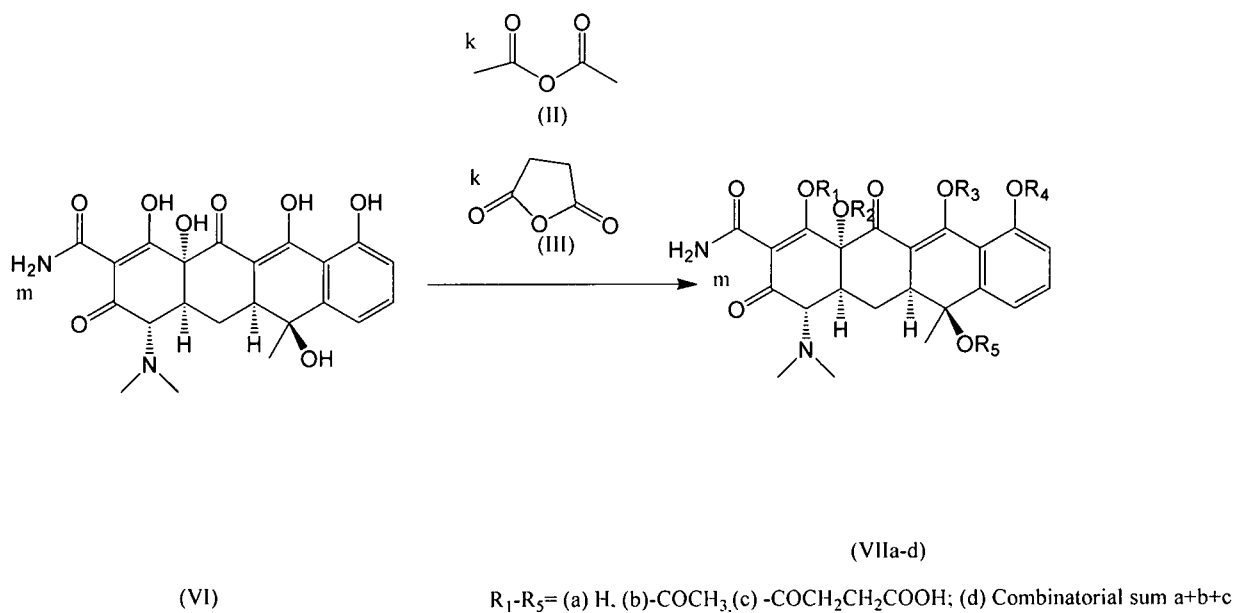
3. Комбинаторные производные антибиотиков на основе супрамолекулярных структур по п.1, отличающиеся тем, что исходная молекула (А₁) представляет собой полимиксин.

4. Комбинаторные производные антибиотиков на основе супрамолекулярных структур по п.1, отличающиеся тем, что исходная молекула (Ai) представляет собой аминокликозидный антибиотик .
5. Комбинаторные производные антибиотиков на основе супрамолекулярных структур по п.1, отличающиеся тем, что исходная молекула (Ai) представляет собой полиеновый антибиотик .
6. Комбинаторные производные антибиотиков на основе супрамолекулярных структур по п.1, отличающиеся тем, что исходная молекула (Ai) представляет собой тетрациклин
7. Комбинаторные производные антибиотиков на основе супрамолекулярных структур по п.1, отличающиеся тем, что исходная молекула (Ai) представляет собой макролидный антибиотик
7. Комбинаторные производные антибиотиков на основе супрамолекулярных структур по п.1, отличающиеся тем, что исходная молекула (Ai) представляет собой антибиотик линкозамин
9. Комбинаторные производные антибиотиков на основе супрамолекулярных структур по п.1, отличающиеся тем, что исходная молекула (Ai) представляет собой антибиотик грамицидин
10. Комбинаторные производные антибиотиков на основе супрамолекулярных структур по п.1, отличающиеся тем, что исходная молекула (Ai) представляет собой антибиотик гликопептиды
11. Комбинаторные производные антибиотиков на основе супрамолекулярных структур по п.1, отличающиеся тем, что модификаторы M_2 и M_3 это ацилирующие агенты группы ангидридов органических моно - и поликарбоновых кислот
12. Комбинаторные производные антибиотиков на основе супрамолекулярных структур по п.1, отличающиеся тем, что модификаторы M_2 и M_3 это галогенангидриды карбоновых кислот
13. Комбинаторные производные антибиотиков на основе супрамолекулярных структур по п.1, отличающиеся тем, что модификаторы M_2 и M_3 это алкилирующие агенты галоген производные углеводов

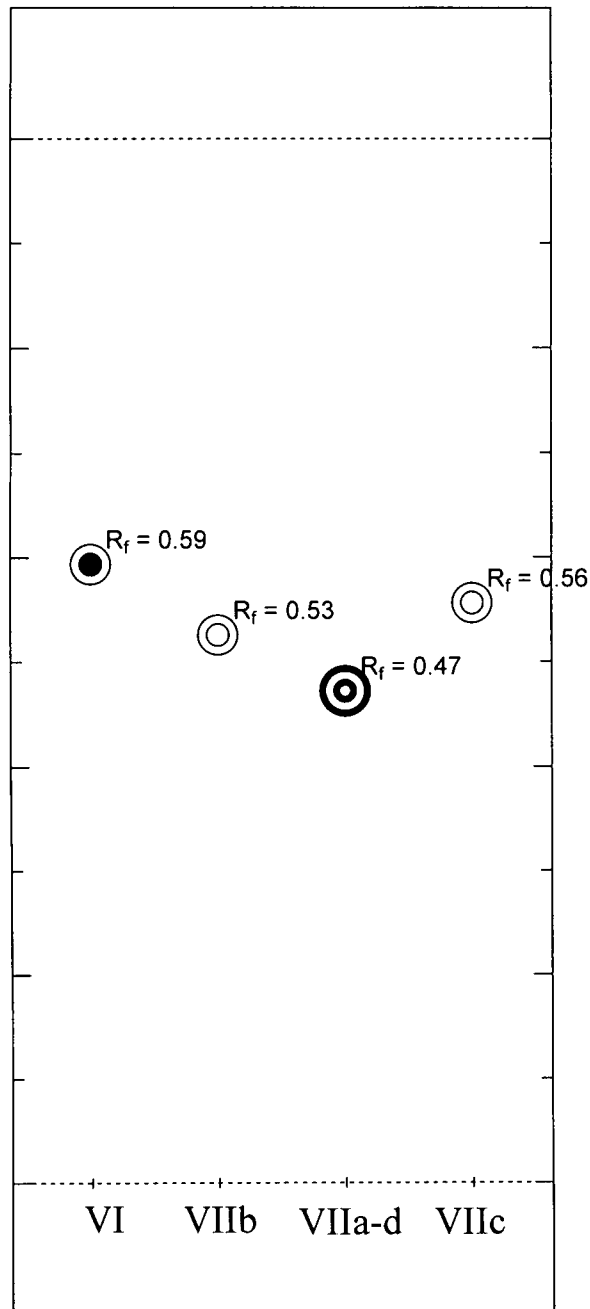
14. Комбинаторные производные антибиотиков на основе супрамолекулярных структур по п.1, отличающиеся тем, что модификатор M_2 это ацилирующий агент - ангидрид моно - или поликарбоновой кислоты либо галоген ангидрид карбоновой кислоты, а M_3 это алкилирующий агент - галогенпроизводное углеводов



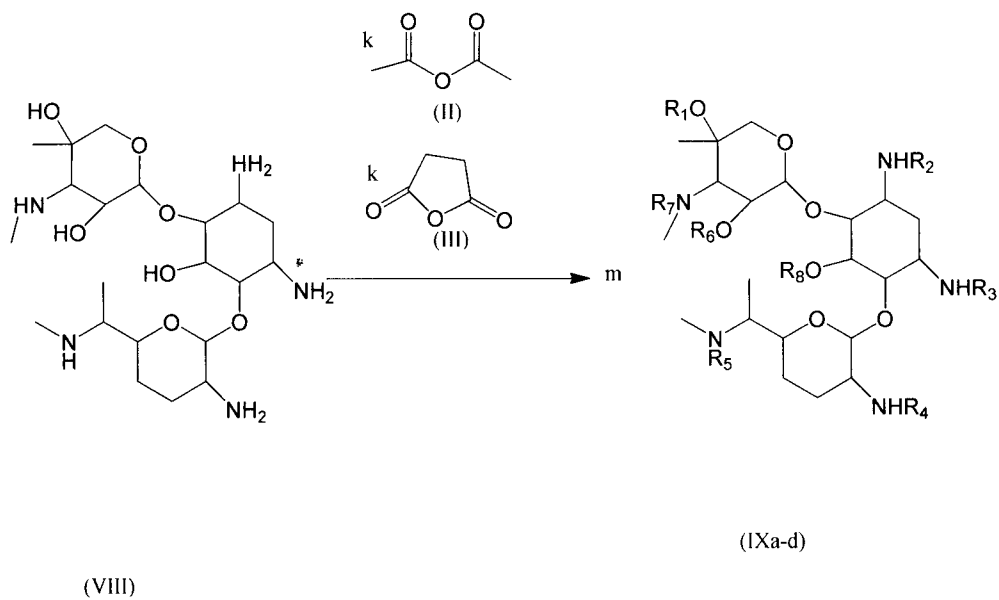
Фиг. 1



Фиг.2

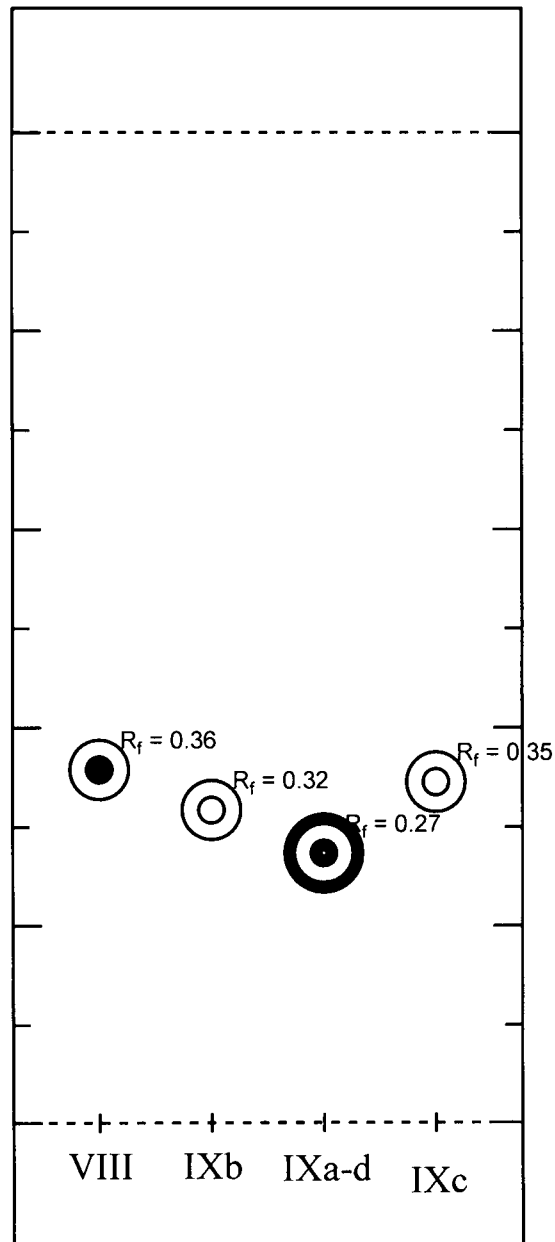


Фиг.3



R₁-R₈= (a) H, (b) -COCH₃, (c) -COCH₂CH₂COOH; (d) Combinatorial sum a+b+c

Фиг.4



Фиг.5

<p>А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ (см. дополнительный лист)</p> <p>Согласно Международной патентной классификации МПК</p>		
<p>В. ОБЛАСТЬ ПОИСКА</p> <p>Проверенный минимум документации (система классификации с индексами классификации)</p> <p>C07C 13/66, 13/62, C07H 15/236, 15/234, 15/22, C07K 7/62, 7/08, C40B 40/00, 40/10, 40/12, C07B 61/00, A61P 31/04, A61K 31/7036, 38/12, 31/03, 31/337</p> <p>Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в поисковые подборки</p> <p>Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)</p> <p>STN, RUPAT, EAPO, Esp@senet, PAJ, USPTO, CIPO, DEPATIS, PCT Online, PATSEARCH</p>		
<p>С. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ:</p>		
<p>Категория *</p>	<p>Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей</p>	<p>Относится к пункту №</p>
X Y	US 3828021 A (MERCK & CO INC) 06.08. 1974, примеры, формула	1, 2, 4, 12-14 3, 5-7, 9-10
X	US 4212859 A 1 (SCHERING CORPORATION) 15.07. 1980, примеры, формула	1, 4, 11
Y	WO 2010/138899 A 2 (THE CLEVELAND CLINIC FOUNDATION) 02.12.2010, параграфы [0092]-[0098]	3, 5-7, 10
Y	WO 2015/186058 A1 (UNIV STELLENBOSCH,) 10.12.2015, с. 10	9
A	US 4 117221 A1 (SCHERING CORPORATION) 26.09. 1978, кол. 3-8, примеры, формула	1-14
A	US 4002742 A1 (SCHERING CORPORATION) 11.01.1977, кол. 14, примеры, формула	1-14
<p><input checked="" type="checkbox"/> последующие документы указаны в продолжении графы С. <input type="checkbox"/> данные о патентах -аналогах указаны в приложении</p>		
<p>* Особые категории ссылочных документов:</p> <p>"А" документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным</p> <p>"Е" более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее</p> <p>"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)</p> <p>"О" документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию и т.д.</p> <p>"Р" документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета</p> <p>"Т" более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение</p> <p>"X" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности</p> <p>"γ" 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</p> <p>"&" документ, являющийся патенте m-аналогом</p>		
<p>Дата действительного завершения международного поиска</p> <p>02 апреля 2018 (02.04.2018)</p>		<p>Дата отправки настоящего отчета о международном поиске</p> <p>19 апреля 2018 (19.04.2018)</p>
<p>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</p>		<p>Уполномоченное лицо: Е.Гусева Телефон № 495 531 65 15</p>

С. (Продолжение). ДОКУМЕНТЫ СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕВАЛЕНТНЫМИ		
Категория *	Цитируемые документы с указанием , где это возможно , релевантных частей	Относится к пункту №
А	US 2006/0240473 A1 (THE UNIVERSITY OF LIVERPOOL) 26.10.2006, примеры , чертежи , формула	1-14

C07C 13/66 (2006.01)
C07H 151236 (2006.01)
C07K 7/62 (2006.01)
C40B 40/00 (2006.01)
C40B 40/10 (2006.01)
C40B 40/12 (2006.01)
A 61P 31/04 (2006.01)
A 61K 31/7036 (2006.01)
A 61K 38/12 (2006.01)
A 61K 31/03 (2006.01)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/RU 2017/000424

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See supplemental sheet

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)

C07C 13/66, 13/62, C07H 15/236, 15/234, 15/22, C07K 7/62, 7/08, C40B 40/00, 40/1 0, 40/1 2, C07B 61/00. A61 P 31/04. A61 K 31/7036. 38/12. 31/03. 31/337

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 Y	US 3828021 A (MERCK & SO INC) 06.08.1 974, examples, the claims	1, 2, 4, 12-14 3, 5-7, 9-10
X	US 421 2859 A 1 (SCHERING CORPORATION) 15.07.1 980, examples, the claims	1, 4, 11
Y	WO 2010/1 38899 A2 (THE CLEVELAND CLINIC FOUNDATION) 02.12.201 0, par. [0092]-[0098]	3, 5-7, 9-10
Y	WO 2015/1 86058 A 1 (UNIV STELLENBOSCH,) 10.12.201 5, p. 10	9
A	US 4 117221 A 1 (SCHERING CORPORATION) 26.09.1 978, col. 3-8, examples, the claims	1-14
A	US 4002742 A 1 (SCHERING CORPORATION) 11.01 .1977, col. 14, examples, the claims	1-14

 Further documents are listed in the continuation of Box C. 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

02 April 2018 (02.04.2018)

Date of mailing of the international search report

19 April 2018 (19.04.2018)

Name and mailing address of the ISA/
RU

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/RU 2017/000424

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2006/0240473 A 1 (THE UNIVERSITY OF LIVERPOOL) 26.1 0.2006, examples, the drawings, the claims	1-14

C07C 13/66 (2006.01)
C07H 151236 (2006.01)
C07K 7/62 (2006.01)
C40B 40/00 (2006.01)
C40B 40/10 (2006.01)
C40B 40/12 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61K 31/7036 (2006.01)
A61K 38/12 (2006.01)
A61K 31/03 (2006.01)