

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

(19) Всемирная Организация
Интеллектуальной Собственности

Международное бюро

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



W I P O I P C T



(10) Номер международной публикации
WO 2018/231093 A 1

- (51) Международная патентная классификация :
А 61К 38/03 (2006.01) А 61Р 31/12 (2006.01)
А 61К 38/04 (2006.01) С 40В 40/10 (2006.01)
- (21) Номер международной заявки : РСТ/RU20 17/000426
- (22) Дата международной подачи :
16 июня 2017 (16.06.2017)
- (25) Язык подачи : Русский
- (26) Язык публикации : Русский
- (72) Изобретатели ; и
- (71) Заявители : ФАРБЕР , Борис Славинович (FARBER, Boris Slavinovich) [RU/RU]; проспект Кутузовский , 24, кв. 130А , Москва , 121 151, Moscow (RU). ФАРБЕР , Софья Борисовна (FARBER, Sof'ya Borisovna) [RU/RU]; проспект Кутузовский , 24, кв. 130А , Москва , 121 15 1, Moscow (RU).
- (74) Агент : ВАСИЛЬЕВА , Галина Семеновна (VASYL'EVA, Galina Semenovna); а/я 121, Санкт -Петербург , 193 168, St.Petersburg (RU).
- (81) Указанные государства (если не указано иначе, для каждого вида национальной охраны) : АЕ, АG, АL, АМ, АО, АТ, АU, АZ, ВА, ВВ, ВG, ВН, ВR, ВW, ВY, ВZ, СA, СH, СL, СN, СO, СR, СU, СZ, DЕ, DJ, DК, DМ, DО, DZ, EС, EЕ, EГ, EС, FІ, GВ, GД, GЕ, GН, GМ, GТ, HН, HR, HU, ІD, ІL, ІN, ІR, ІS, JО, JР, KЕ, KГ, KН, KН, KР, KR, KW, KZ, LА, LС, LК, LR, LС, LУ, LY, MА, MД, MЕ, MГ, MК, MН, MВ, MХ, MY, MZ, NА, NГ, NІ, NО, NZ, OМ, PА, PЕ, PГ, PН, PЛ, PТ, QА, RО, RС, RU, RВ, SА, SС, SД, SЕ, SГ, SК, SЛ, SМ, SТ, SВ, SY, TН, TJ, TМ, TН, TR, TТ, TZ, UА, UГ, UС, UZ, VС, VН, ZА, ZМ, ZW.
- (84) Указанные государства (если не указано иначе, для каждого вида региональной охраны) : АRІPО (ВW, GН,

(54) Title: COMBINATORIAL DERIVATIVES OF OLIGOPEPTIDES HAVING ANTIVIRAL PROPERTIES

(54) Название изобретения : КОМБИНАТОРНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ОЛИГОПЕПТИДОВ С ПРОТИВОВИРУСНЫМИ СВОЙСТВАМИ

(57) Abstract: The invention relates to organic and bio-organic combinatorial chemistry, specifically to new combinatorial libraries of oligopeptide derivatives and supramolecular structures based thereon that have powerful antiviral properties when used without being separated into individual components. The aim of the invention is to synthesize combinatorial oligopeptide derivatives that have antiviral properties and a new mechanism of action and that can be used to significantly improve treatment effectiveness and reduce treatment duration in the case of viral diseases such as influenza and herpesvirus infections. This aim is achieved by synthesizing combinatorial oligopeptide derivatives having antiviral properties, characterized in that the combinatorial oligopeptide derivatives, in the structure of which lysine, histidine, and arginine amino groups as well as serine and threonine alcoholic residues are available for modification, are simultaneously combinatorially modified by at least two different covalent modifiers, and subsequently the resulting combinatorial mixture is used whole, without purification and without separation of each individual derivative, as an antiviral agent in various pharmaceutical compositions. The result is modified complementary protected oligopeptides that have powerful antiviral properties and on the basis of which a medicinal, veterinary, or cosmetic product having a broad spectrum of activity can be obtained. The agent has a broad spectrum of action and low toxicity, and is suitable for industrial production.

(57) Реферат : Изобретение относится к органической и биоорганической комбинаторной химии , а именно , к новым комбинаторным библиотекам производных олигопептидов и супрамолекулярным структурам на их основе , которые при использовании без разделения на отдельные компоненты обладают мощными противовирусными свойствами . В основу изобретения поставленная задача синтезировать комбинаторные производные олигопептидов с противовирусными свойствами и с новым механизмом действия , использование которых позволит значительно увеличить эффективность лечения и сократить сроки лечения вирусных заболеваний , таких как грипп , герпесвирусные инфекции . Поставленная задача решается путем синтеза комбинаторных производных олигопептидов с противовирусными свойствами , отличающихся тем , что комбинаторные производные олигопептидов , в структуре которых доступные для модификации остатки аминогрупп лизина , гистидина , аргинина , а также доступные для модификации спиртовые остатки треонина и серина одновременно комбинаторно модифицированы как минимум двумя разными ковалентными модификаторами и в дальнейшем полученная комбинаторная смесь целиком без очистки и без выделения каждого отдельного производного используется как противовирусное средство в различных фармацевтических композициях . Модифицированные комплементарные защищенные олигопептиды с мощными противовирусными свойствами , на основе которых может быть получен лекарственный , ветеринарный , или косметический препарат с широким спектром активности . Средство имеет широкий спектр действия , мало токсично и доступно для промышленного производства .

WO 2018/231093 A1

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

Опубликована :
— с отчётом о международном поиске (статья 21.3)

Комбинаторные производные олигопептидов с противовирусными свойствами

Область техники

5 Изобретение относится к органической и биорганической комбинаторной химии, а именно, к новым комбинаторным библиотекам производных олигопептидов и супрамолекулярным структурам на их основе, которые при использовании без разделения на отдельные компоненты обладают мощными противовирусными свойствами.

0 Предшествующий уровень техники

Вирусные болезни составляют более 90% всей зарегистрированной инфекционной патологии. Но внедренных в производство противовирусных средств, очень мало. Такие вещества часто имеют токсичные свойства, небольшой спектр действия, к ним быстро появляется эффект привыкания. Таким образом, разработка противовирусных средств,
5 которые бы не имели токсичных свойств, были эффективными в лечении широкого спектра вирусных инфекций, является актуальной задачей современной медицины. В настоящий момент известно очень мало веществ, которые были бы эффективны на всех этапах вирусной инфекции. Кроме интерферонов и их индукторов еще не известно таких веществ, которые бы одновременно объединяли лечебные и противовирусные свойства
0 относительно широко распространенных вирусных заболеваний - ВИЧ /СПИД, герпеса, гриппа, но др. Наиболее известным средством для лечения гриппа является ремантадин. Это вещество, которое блокирует только этап проникновения вируса в клетку и раннюю стадию специфической репродукции, не действует на патогенез заболевания. Долговременное использование этого препарата невозможно, потому что он имеет
5 нейротропные эффекты и может вызывать галлюцинации, нарушать функции мозга благодаря торможению проведению импульса по нервному волокну.

Среди других веществ, эффективных в лечении гриппа, известен лейкоцитарный α -интерферон. Этот белок синтезируется в активированных лейкоцитах человека. Он обладает способностью вызывать резистентность к гриппу у клеток эпителия носоглотки.
0 Но его лечебные свойства очень незначительны. Он малоэффективен на 2-6-й день заболевания гриппом и является профилактическим средством. Рекомбинантные интерфероны имеют большую стоимость и часто приводят к аллергическим реакциям.

Кроме того, с развитием заболевания эффективность терапии интерфероном уменьшается, а резистентность вируса к интерферону увеличивается.

Ближайшим прототипом вещества, которое патентуется, являются модифицированные белки и их использование для контроля вирусных инфекций [1]. Это обработанные разными ангидридами и ацилирующими средствами белки: альбумины, лактоферрин, трансферин, лактальбумин. Авторы запатентовали также механизм действия этих белков - торможение вирусной адгезии. Эти белки должны иметь молекулярную массу больше 60000 с небольшим колебанием. Показано значительное профилактическое антивирусное действие этих белков в опытах на культурах клеток. Вещества проявили активность относительно вирусов ВИЧ (человека и марышки), гриппа, цитомегаловируса, полиовирусу, вируса леса Селмики, вируса Сендай, парагриппа, Коксаки вируса. Авторы показали, что ацилированные белки нетоксичны и могут защищать животных против инфицирования вирусами.

Прототип имеет ряд недостатков: он является сугубо профилактическим средством (на клетки, которые уже инфицированы вирусом такие белки лечебного эффекта не оказывали) и не имеет лечебных свойств у инфицированных животных. В связи с тем, что прототип является высокомолекулярным белком, он может быть использован только для парентерального применения, препарат представляет собой индивидуальное высокомолекулярное соединение, а не олигопептиды и не представляет из себя динамической самоорганизующейся супрамолекулярной системы и, соответственно, вирусы будут быстро адаптироваться к препарату. Также известен патент [2], где описаны модифицированные пептиды с антивирусными свойствами и способ их получения, отличающиеся тем, что в качестве основного действующего вещества выступает смесь (ансамбль) олигопептидов - продуктов гидролиза белков с измененными на противоположный зарядами молекул, и для их получения сперва проводят частичный гидролиз белоксодержащего сырья, а затем проводят процесс химической модификации суммы полученных олигопептидов с заменой заряда их молекул на противоположный и используют в качестве антивирусного средства композицию из полученных олигопептидов. Эта сумма модифицированных олигопептидов способна тормозить активность гетеродимера β -импортина клетки и тормозить репликацию вирусов, репликационный цикл которых зависит от функций ядра. Ансамбль модифицированных олигопептидов на основе динамической самоорганизующейся системы эффективней в лечении вирусных инфекций, таких как грипп, герпес, вирусы болезней животных на всех стадиях развития

инфекционного процесса , когда другие препараты неэффективны . Средство имеет широкий спектр действия , мало токсично и доступно для промышленного производства , эффективно на всех стадиях репликационного цикла зависимых от клеточного ядра вирусов . К недостаткам аналога можно отнести невозможность стандартизации серий препарата ,

5 валидации методов анализа , непостоянство состава и фармакологических эффектов и нестабильность фармакологического эффекта из-за короткого времени полужизни в организме животных . Данные недостатки устраняются путем увеличения степеней свободы самоорганизующейся системы пептидов (увеличение количества производных в смеси) путем одновременной модификации структуры пептидов сразу двумя модификаторами .

0 Это приводит к увеличению количества производных как минимум на два порядка . Кроме того , вместо природных пептидов и ферментативного гидролиза в предлагаемом нами изобретении предлагается изначально использовать в качестве мишени сигнальные пептиды ядерной локализации , участвующие в переносе вирусного генома в ядро . Такой препарат с известной аминокислотной последовательностью , известным механизмом

5 действия , легко стандартизуется по составу и фармакологической активности , а также методам анализа . Метод бинарной модификации олигопептидов ранее не был известен и никогда не применялся для получения самоорганизующихся комбинаторных структур .

Раскрытие изобретения

0 В основу изобретения поставленная задача синтезировать комбинаторные производные олигопептидов с противовирусными свойствами и с новым механизмом действия , использование которых позволит значительно увеличить эффективность лечения и сократить сроки лечения вирусных заболеваний , таких как грипп , герпесвирусные инфекции .

5 Поставленная задача решается путем синтеза комбинаторных производных олигопептидов с противовирусными свойствами , отличающиеся тем , что комбинаторные производные олигопептидов , в структуре которых доступные для модификации остатки аминокислотных групп лизинов , гистидинов , аргининов , а также доступные для модификации спиртовые остатки треонина и серина одновременно комбинаторно модифицированы как

0 минимум двумя разными ковалентными модификаторами и в дальнейшем полученная комбинаторная смесь целиком без очистки и без выделения каждого отдельного производного используется как противовирусное средство в различных фармацевтических

композициях . Мольное соотношение компонентов комбинаторной реакции может быть рассчитано согласно формул :

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

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

5 где

n = количество доступных для замещения групп в олигопептиде ;

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

0 k = количество молей каждого из двух модификаторов в реакции комбинаторного синтеза для получения максимального количества разных производных . В качестве ковалентных модификаторов структуры олигопептидов в комбинаторном синтезе могут быть использованы такие комбинации : как минимум ангидриды двух дикарбоновых кислот , как минимум ангидриды двух трикарбоновых кислот , как минимум один ангидрид трикарбоновой кислоты и один ангидрид дикарбоновой кислоты , для алкилирования могут 5 быть использованы как минимум два галогенпроизводные ; комбинаторную модификацию проводят путем одновременного алкилирования как минимум одним галогенпроизводным и ацилированием одним ангидридом дикарбоновой или трикарбоновой кислоты ; комбинаторную модификацию проводят путем одновременного алкилирования галогенпроизводным и ацилированием ангидридом дикарбоновой или трикарбоновой 0 кислоты . В качестве олигопептидов может быть использован классический сигнал ядерной локализации (cNLS), состоящий из одного или двух кластеров положительно заряженных аминокислотных остатков : K-K/R-X-K/R или K/R-K/R-X₁₀₋₁₂(K/R)_{3/5}, где X — любая аминокислота . Также в качестве олигопептида может быть использован пептид , состоящий из двух кластеров положительно заряженных аминокислотных остатков : KKRKRKRKR.

5 Олигопептиды настоящего изобретения могут быть произведены синтетически или , при необходимости , рекомбинантно стандартными способами . Конкретные варианты осуществления олигопептидов подробно описаны в экспериментальной части дальше . Предпочтительно , олигопептиды изобретения готовят стандартно известными химическими способами синтеза , такими как , например , описывает Merrifield (J. Am. Chem. Soc. (1963) 85:21492154). С другой стороны , олигопептиды настоящего изобретения могут 0 быть произведены с помощью способов клонирования и экспрессии рекомбинантной ДНК в микроорганизм /хозяин или клетку , несущей фрагмент ДНК , последовательность

нуклеиновых кислот , кодирующую один из вышеописанных пептидов . Нуклеиновая кислота , кодирующая последовательности , может быть приготовлена синтетически , или может быть получена из существующих последовательностей нуклеиновых кислот сайтспецифическим мутагенезом . Эти последовательности нуклеиновой кислоты могут

5 после этого быть клонированы в подходящем экспрессирующем векторе и преобразованы или трансфицированы в подходящую клетку хозяина , такую как *E. coli*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Streptomyces*, клетки млекопитающих (такие как CHO , HEK или COS1 клетки) , дрожжи (например , *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*), клетки насекомых или вирусные системы экспрессии , такие как системы бакуловируса . Специалист ,

О квалифицированный в этой области техники , узнает способы создания последовательностей нуклеиновых кислот и обеспечения средств для обеспечения возможности их экспрессии . Также возможно включить аминокислоты неприродного происхождения (как D-аминокислоты) в пептиды через способы генной инженерии . Затем , пептид может быть отделен от культуры клеток хозяина . Это может быть достигнуто общей

5 очисткой белка и способами выделения , которые являются доступными в уровне техники . Такие способы могут , например , включать иммуноадсорбцию или хроматографию . Также возможно обеспечить пептиды меткой (такой как гистидиновая метка) во время синтеза , который обеспечивает быстрое связывание и очистку , после которой метку ферментативно удаляют для получения активного пептида . Если пептид не может быть закодирован или

О экспрессирован , но при этом является очень похожим на пептид , который может быть закодирован или экспрессирован , то может быть применен способ для приготовления пептида , на который похож пептид , с последующей одной или более стадиями , в которых вышеупомянутый пептид модифицируют химическими или ферментативными способами для приготовления конечного пептида . Олигопептиды также могут быть получены

5 расщеплением олигопептида от большего пептида , используя протеолитические ферменты , как пепсин , папаин и т.д. Олигопептиды также могут быть получены расщеплением олигопептида от большего пептида , используя протеолитические ферменты , как пепсин , папаин и т.д. Некоторые более полные сущности способов , которые могут быть применены в получении пептидов , описаны в: W. F. Anderson, Nature 392 Supp., 30 April 1998, p. 2530;

0 Pharmaceutical Biotechnology, Ed. D. J. A. Crommelin and R. D. Sindelar, Harwood Academic Publishers, 1997, p. 5370, 167180, 123152, 820; Protein Synthesis: Methods and Protocols, Ed. R. Martin, Humana Press, 1998, p. 1442; SolidPhase Peptide Synthesis, Ed. G. B. Fields, Academic Press, 1997, p. 1780; Amino Acid and Peptide Synthesis, Oxford University Press,

1997, p. 189. Новые пептиды по любому из пунктов формулы изобретения могут быть быстро сделаны специалистом, квалифицированным в этом уровне техники.

Терминология

5

Алкилирование - введение алкильного заместителя в молекулу органического соединения. Типичными алкилирующими агентами являются алкилгалогениды, алкены, эпоксисоединения, спирты, реже альдегиды, кетоны, эфиры, сульфиды, диазоалканы. Катализаторами алкилирования являются минеральные кислоты, кислоты Льюиса, а также цеолиты. Алкилирование широко применяется в химической и нефтехимической промышленности.

0

Ансамбль или супрамолекулярный ансамбль - термин из супрамолекулярной химии. Объекты супрамолекулярной химии — супрамолекулярные ансамбли, строящиеся самопроизвольно из комплементарных, т. е. имеющих геометрическое и химическое соответствие фрагментов, подобно самопроизвольной сборке сложнейших пространственных структур в живой клетке [3,4]. В связи с тем, что при синтезе из одного олигопептида при наличии двух модификаторов синтезируется более 1500 разных производных, между их молекулами обязательно образуются межмолекулярные ионные и водородные связи. Таких супрамолекулярные структуры обладают значительно более высокой биологической активностью, чем исходный пептид. В эксперименте была подтвержденная эффективность препарата при гриппе, герпесе, на моделях *in vivo* и *in ovo*, что описано ниже. Нами использована комбинаторная смесь олигопептидов в виде супрамолекулярного ансамбля без разделения на отдельные компоненты.

5

0

Ацилирование - введение ацильного остатка RCO- (ацила) в состав органического соединения, как правило, путём замещения атома водорода, введение остатка уксусной кислоты CH₃CO - называют ацетилированием, бензойной C₆H₅CO- — бензоилированием, муравьиной HCO - — формилированием. В зависимости от атома, к которому присоединяется ацильный остаток, выделяют С-ацилирование, N-ацилирование, O-ацилирование. В качестве ацилирующих агентов используют галогенангидриды и ангидриды кислот.

5

0

Комбинаторная библиотека (**combinatorial library**) [лат. *combinare* — соединять, сочетать; греч. *biblion* — книга и *theke* — хранилище] — набор большого числа всевозможных химических соединений, белков, генов или олигонуклеотидов,

позволяющий осуществлять в нем быстрый поиск целевых генов или белков -мишеней .
Например , набор , состоящий из миллионов различных химических веществ , или совокупность рекомбинантных молекул ДНК , полученная встраиванием в вектор кДНК легкой и тяжелой цепей различных антител , и др .

5 Комбинаторный синтез - синтез методами комбинаторной химии , включает одновременную реакцию между тремя и более реагентами с образованием комбинаторного продукта синтеза , состоящего из десятков производных . Эти производные затем разделяют хроматографически , подтверждают их структуру и изучают биологическую активность .
0 Одновременная комбинаторная модификация двумя модификаторами - если в реакции комбинаторного синтеза используют полифункциональную молекулу , имеющую более двух доступных для модификации групп и в реакцию , сразу вводят два модифицирующих агента , например , уксусный ангидрид и янтарный ангидрид . В результате реакции образуется смесь ацилированных производных в разных положениях - ацетил -сукцинил производных .

5 Терапевтически эффективное количество - для целей настоящего описания относится к количеству лекарства , то есть комбинаторного производного олигопептида согласно настоящему изобретению , достаточного для проявления противовирусной активности , для разных вирусов , моделей животных данное количество может отличаться .

0 Краткое описание чертежей :

Фиг . 1.- ВЭЖХ исходного пептида с аминокислотной последовательностью **KKRKRKRKR** (условия хроматографирования : градиентное разделение в условиях буфер А : 0,1 М хлорная кислота / 1 М перхлорат лития ; буфер В : ацетонитрил от 5% до 100%;
5 хроматограф Милихром А -02, колонка пронтосил -18)

Фиг . 2. - ВЭЖХ комбинаторного производного пептида с аминокислотной последовательностью **KKRKRKRKR** (условия хроматографирования : градиентное разделение в условиях буфер А : 0,1 М хлорная кислота / 1 М перхлорат лития ;
0 буфер В : ацетонитрил от 5% до 100%; хроматограф Милихром А -02, колонка пронтосил -18).

Фиг . 3.- ВЭЖХ исходного пептида с аминокислотной последовательностью **KKRKSTRKR** (условия хроматографирования : градиентное разделение в условиях буфер А : 0,1 М хлорная кислота / 1 М перхлорат лития ; буфер В : ацетонитрил от 5% до 100%; хроматограф Милихром А -02, колонка пронтосил -18)

5

Фиг . 4.- ВЭЖХ супрамолекулярного комбинаторного производного пептида (СКП) с аминокислотной последовательностью **KKRKSTRKR** (условия хроматографирования : градиентное разделение в условиях буфер А : 0,1 М хлорная кислота / 1 М перхлорат лития ; буфер В : ацетонитрил от 5% до 100%; хроматограф Милихром А -02, колонка пронтосил -18).

0

Лучший вариант осуществления изобретения

5 Пример 1. Получение комбинаторной смеси олигопептида **KKRKRKRKR** (далее KR)

Предварительно олигопептид **KKRKRKRKR** получают с использованием стандартной методики на пептидном синтезаторе либо генно -инженерным путем .

В 50 мл фосфатного буферного раствора растворяют 1 Ммоль олигопептида **KKRKRKRKR**, добавляют 3 Ммоль янтарного ангидрида и 3 Ммоль фталевого ангидрида , перемешивают раствор до полного растворения обоих ангидридов . Раствор разливают по флаконам , лиофилизируют и используют для анализа и исследований . Расчет мольных соотношений двух модификаторов к олигопептиду проводят по формулам :

0

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

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

5

где

n=количество доступных для замещения групп в олигопептиде (n=9);

m=количество молей исходного олигопептида и количество разных молекул его комбинаторных производных после синтеза (из одного исходного пептида образуется 1532 разных производных как по местам замещений , так и по перестановкам);

0

k=количество молей каждого из двух модификаторов в реакции комбинаторного синтеза для получения максимального количества разных производных (k=4599)

При этом, мольное соотношение для получения максимального количества разных производных (1532 разных молекул) составляет 3:3:1 (янтарный ангидрид : фталевый ангидрид : олигопептид KKRKRKRKR).

5 На Фиг. 1. показан результат ВЭЖХ анализа исходного пептида KKRKRXRKR. Исходный пептид при использовании детектора в области 280 нм дает одну полосу поглощения.

0 На Фиг. 2. показан результат ВЭЖХ анализа комбинаторного производного пептида KXRKRKRKR. Как видно из хроматограммы, пик пептида не только располагается в другом месте - в области более гидрофильной области, он еще уширен, разделен на 3 дополнительные полосы. Это свидетельствует о том, что между 1532 разными производными пептида существуют внутримолекулярные /супрамолекулярные связи ионного и водородного характера, которые не способны быть разорванными в процессе ВЭЖХ разделения в классических условиях градиентной ВЭЖХ. При использовании тонкослойной хроматографии и капиллярного гель-электрофореза также не удалось 5 разделить супрамолекулярное производное на отдельные фрагменты. Для модификации пептида могут быть использованы другие комбинации как минимум двух разных модификаторов: ангидридов карбоновых и поликарбоновых кислот, галогенангидридов карбоновых кислот, галогенуглеводородов. В качестве пептидов могут быть использованы как один индивидуальный олигопептид так и смеси олигопептидов, полученные как 0 стандартным методом с применением пептидных синтезаторов, так и методами генной инженерии и с использованием рекомбинантной технологии.

Для проверки биологической (антивирусной) активности синтезированных производных с другими соотношениями компонентов в реакции комбинаторного синтеза изучали противовирусную активность производных скрининговым методом на моделях 5 вируса гриппа H1N1 (Inf), референтного штамма вируса везикулярного стоматита (Vesic-VVS) и вируса герпеса 1 типа (Herp. - штам Л-2) в планшетах на культуре куриных фибробластов по степени деградации (цитопатический эффект, открепление от дна лунки). Степень «слущивания» клеток определяли по окраске культуры витальным красителем, концентрацию которого определяли спектрофотометрически относительно здорового 0 монослоя и пустой лунки. Результаты исследований *in vitro* приведены в таблице 1.

Таблица 1. - Антивирусная активность супрамолекулярных комбинаторных производных оплигопептида KKRKRKRKR, полученных в реакции с разным мольным соотношением модификаторов

№ п/п	Мольные соотношения реагентов *			% цитопротекторного антивирусного действия **		
	m	k1	k2	Inf	Heф	Vesic
1	1532	18396****	1	0	0	0
2	1532	9198	4	0	0	0
3	-II-	4599	9	0	0	0
4	-II-	2299	18	0	0	0
5	-II-	1149	36	0	0	0
6	-II-	575	72	0	0	0
7	-II-	287	143	0	0	0
8	-II-	143	287	0	0	0
9	-II-	72	575	0	0	0
10	-II-	36	1149	0	0	0
11	-II-	18	2299	0	0	0
12	-II-	9	4599	0	0	0
13	-II-	1	9198	0	0	0
14	-II-	0	18396****	0	0	0
16	-II-	9198****	9198****	0	0	0
17	-II-	4599	4599	100	100	100
18	-II-	2299	2299	50	50	50
19	-II-	1149	1149	25	25	25
20	-II-	575	575	0	0	0
21	-II-	287	287	0	0	0
22	-II-	143	143	0	0	0
23	-II-	72	72	0	0	0
24	-II-	36	36	0	0	0
25	-II-	18	18	0	0	0
26	-II-	9	9	0	0	0

27	-II-	1	1	0	0	0
28	-II-	18396***	0	0	0	0
29	-II-	9198	0	0	0	0
30	-II-	4599	0	0	0	0
31	-II-	2299	0	0	0	0
32	-II-	1149	0	0	0	0
33	-II-	575	0	0	0	0
34	-II-	287	0	0	0	0
35	-II-	143	0	0	0	0
36	-II-	72	0	0	0	0
37	-II-	36	0	0	0	0
38	-II-	18	0	0	0	0
39	-II-	9	0	0	0	0
40	-II-	1	0	0	0	0
41	-II-	0	18396***	0	0	0
42	-II-	0	9198	0	0	0
43	-II-	0	4599	0	0	0
44	-II-	0	2299	0	0	0
45	-II-	0	1149	0	0	0
46	-II-	0	575	0	0	0
47	-II-	0	287	0	0	0
48	-II-	0	143	0	0	0
49	-II-	0	72	0	0	0
50	-II-	0	36	0	0	0
51	-II-	0	18	0	0	0
52	-II-	0	9	0	0	0
53	-II-	0	1	0	0	0
54	-II-	0	0	0	0	0

* m- количество молей олигопептида KKRKRKRKR в реакции комбинаторного синтеза ; k1- количество молей янтарного ангидрида в реакции ; k2 - количество молей фталевого ангидрида в реакции ;

** % оставшегося монослоя клеток после инфицирования вирусами и замены культуры на исследуемый препарата в культуре после 48 часов инкубации в присутствии исследуемого вещества, добавленного в предварительно подобранной концентрации ($ED_{90}=0,05$ мкг /мл);

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

Как видно из таблицы, только при рассчитанном соотношении компонентов, когда образуется максимальное количество разных производных олигопептида, образуется биологическая активная и эффективная супрамолекулярная структура (производное 17 или KR), способная в дозе 0,05 мкг /мл полностью защищать монослой клеток (ED_{100}) от деградирующего цитопатического действия вирусов.

5 Пример 2. Получение комбинаторной смеси олигопептида KKRKSTRKR (далее KR2)

Предварительно олигопептид KKRKSTRKR получают с использованием стандартной методики на пептидном синтезаторе либо генно-инженерным путем.

В 50 мл фосфатного буферного раствора растворяют 1 Ммоль олигопептида KKRKSTRKR, добавляют 3 Ммоль янтарного ангидрида и 3 Ммоль малеинового ангидрида, перемешивают раствор до полного растворения обоих ангидридов. Раствор разливают по флаконам, лиофилизируют и используют для анализа и исследований. Расчет мольных соотношений двух модификаторов к олигопептиду проводят по формулам:

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

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

5 где

n = количество доступных для замещения групп в олигопептиде ($n=9$);

t = количество молей исходного олигопептида и количество разных молекул его комбинаторных производных после синтеза (из одного исходного пептида образуется 1532 разных производных как по местам замещений, так и по перестановкам);

О k = количество молей каждого из двух модификаторов в реакции комбинаторного синтеза для получения максимального количества разных производных ($k=4599$)

При этом, мольное соотношение для получения максимального количества разных производных (1532 разных молекул) составляет 3:3:1 (янтарный ангидрид : фталевый ангидрид : олигопептид KKRKSTRKR).

5 На Фиг. 3. показан результат ВЭЖХ анализа исходного пептида KKRKSTRKR. Исходный пептид при использовании детектора в области 280 нм дает одну полосу поглощения .

0 На Фиг. 4. показан результат ВЭЖХ анализа комбинаторного производного пептида KKRKSTRKR. Как видно из хроматограммы, пик пептида не только располагается в другом месте - в более гидрофильной области, он еще уширен, разделен на 4 дополнительные полосы. Это свидетельствует о том, что между 1532 разными производными пептида существуют внутримолекулярные /супрамолекулярные связи ионного и водородного характера, которые не способны быть разорванными в процессе ВЭЖХ разделения в классических условиях градиентной ВЭЖХ. При использовании тонкослойной хроматографии и капиллярного гель-электрофореза также не удалось разделить 5 супрамолекулярное производное на отдельные фрагменты. Для модификации пептида могут быть использованы другие комбинации как минимум двух разных модификаторов : ангидридов карбоновых и поликарбоновых кислот, галогенангидридов карбоновых кислот, галогенуглеводородов. В качестве пептидов могут быть использованы как один индивидуальный олигопептид так и смеси олигопептидов, полученные как стандартным 0 методом с применением пептидных синтезаторов, так и методами генной инженерии и с использованием рекомбинантной технологии.

Для определения максимально переносимой концентрации (МПК) в токсикологических опытах и изучения противовирусной активности препарата KR использованы следующие виды перевиваемых клеток человеческого и животного 5 происхождения :

- ПТ - перевиваемые клетки почки эмбриона крупного рогатого скота ;
- Тг - перевиваемые клетки трахеи эмбриона крупного рогатого скота ;
- Нер -2- перевиваемые клетки рака гортани человека ;
- HeLa - перевиваемые клетки рака тела матки ;
- 0 - Эмбрионы куриные

Клетки выращивали в среде 199 с добавлением 10% бычьей сыворотки и антибиотиков (пенициллина и стрептомицина). В качестве тест-вирусов использованы вирусы гриппа

(H3N2), везикулярного стоматита (Штамм Индиана), коронавируса (X 343/44) и вирус простого герпеса 1 типа (штамм Л-2).

Исследования проводили по методикам, рекомендованным Государственным фармакологическим центром МЗ Украины.

5

Пример 2. Изучение токсичности и определение МПК препарата **KR** на культурах клеток и на куриных эмбрионах

Для определения МПК использовали двухсуточные культуры клеток с хорошо сформированным монослоем клеток. Препарат **KR** испытан на четырех видах перечисленных выше клеток в 5 повторениях. В каждом опыте для исследования использовали не менее 10 пробирок каждой из культур. После удаления из пробирок ростовой среды вносили 0,2 мл испытуемого раствора и по 0,8 мл поддерживающей питательной среды. Пробирки с клетками инкубировали при 37 °С в течение 7-8 дней.

0

Контролем служили пробирки с культурами клеток, в которые не добавляли препарат.

5

Учет результатов проводили по наличию или отсутствию цитопатического действия на клетки при просмотре в микроскопе при малом увеличении $\times 10$. Степень цитотоксического действия определяли по изменению морфологии клеток (округление и сморщивание клеток, отторжение от стекла дегенерированных клеток) по четырехплюсовой системе от + до ++++.

0

Максимально переносимую концентрацию определяли по максимальному количеству вещества, не вызывающего цитопатического действия на клетки. Для этого в различных разведениях препарата в дозе 0,2 мл вносили в культуру клеток.

Для изучения токсичности *in vivo* в различных дозах препарата в объеме 0,2 мл вносили в аллантаисную полость 9-10 дневных куриных эмбрионов (по 5 эмбрионов на разведение МП) по следующей методике:

5

брали 10-11- дневные эмбрионы, овоскопировали, наносили карандашом метку над воздушным мешком на стороне, противоположной расположению эмбриона, где меньше кровеносных сосудов. Отмеченное место обеззараживали спиртовым раствором йода, затем здесь же прокалывали скорлупу и в отверстие вводили туберкулиновым шприцем материал в объеме 0,1 мл. Для попадания в аллантаисную полость иглу шприца вводили на глубину 10-15 мм параллельно продольной оси яйца. После заражения отверстие вновь

0

5 дезинфицировали спиртовым раствором йода, запечатывали парафином и помещали для инкубации в термостат при температуре 35-37 °С на 72 часа. Перед вскрытием эмбрионы помещали на 18-20 ч в холодильник при температуре 4° С для максимального сужения кровеносных сосудов. После этого яйца помещали на лоток тупым концом вверх, скорлупу над воздушным мешком обеззараживали спиртовым раствором йода и 96% этиловым спиртом, затем разбивали и удаляли стерильным пинцетом. Также удаляли оболочку, выстилающую дно воздушного мешка, предварительно отсепарировав её от подлежащей хорион-аллантаической оболочки. Через 24 и 48 часов инкубирования в термостате при 37 °С учитывали количество живых и нормально развивающихся эмбрионов. Расчет LD50 и МПД проводили по методу Кербера.

0 В результате исследований на различных культурах было установлено, что KR нетоксичен для культур клеток в дозе более 50 мг/мл. (для повышения концентрации препарат лиофилизировали и затем разводили до 5% концентрации). Результаты изучения токсичности на различных культурах представлены в таблице 2.

5

Таблица 2. Токсичность KR на культурах клеток

№ п/п	Культура клеток	МПК (мг/мл)
1	ПТ	более 50
2	Tr	-/-
3	Нер -2	-/-
4	HeLa	-/-

МПК для культур клеток, обработанных KR составляет более 50 мг/мл

Пример 3. Изучение противовирусного действия препарата KR2 на вирус гриппа А (H3 N2)

0 Водные растворы KR в различных дозах (десятикратные разведения) вводили 15 куриным эмбрионам в аллантаическую полость в объеме 0,2 мл через 12 часов после внесения вируса в рабочей дозе (100 ТЦД₅₀/0,2 мл).

Каждый опыт сопровождался контролем тест-вируса в рабочей дозе. Зараженные и незараженные (контроль) эмбрионы инкубировали при 36°С в течение 48 часов. Затем

производили вскрытие эмбрионов , из которых отсасывали аллантаисную жидкость . Титрование вируса в аллантаисной жидкости проводили по общепринятой методике с 1% эритроцитами 0(1) группы крови человека . Определили коэффициент защиты (КЗ). Титр вируса в опытной и контрольной группах куриных эмбрионов представлен в таблице 3.

5

Таблица 3. Эффективная концентрация **KR2** на модели гриппозной инфекции **in ovo**

Группа	Концентрация препарата (мг/мл)	Титр вируса (lg ТЦД ₅₀ /мл)		Минимальная эффективная концентрация (МЭК мг/мл)
		опыт	контроль	
Контрольная (вводили 0,9 % раствор натрия хлорида)	-	12	12	-
Опытная	50±5	0	12	0,05
	5±1	0	12	
	0,5 ± 0,05	2	12	
	0,05±0,005	4	12	5
	0,005±0,0005	6	12	

Как видно из таблицы 3, минимальная эффективная концентрация **KR2** в отношении вируса гриппа , которая полностью тормозит синтез вируса , равна 0,05 мг/мл. При увеличении разведения препарата , эффективность **KR2** падает и имеет дозозависимый характер . Данный факт свидетельствует о наличии прямого противовирусного эффекта у препарата **KR2** в отношении вируса гриппа H3N2.

0

Пример 4. Исследование противовирусного действия препарата **KR** на цитопатические вирусы (вирус везикулярного стоматита , коронавирус , вирус простого герпеса 1 типа)

5

Противовирусную активность в отношении этой группы вирусов определяли в культуре вышеуказанных клеток . Постановку реакции осуществляли следующим способом : 0,2 мл соответствующего вируса в рабочей дозе (100 ТЦД₅₀/0,2 мл) вносили в объеме 0,2 мл в 2-х суточную отмытую культуру клеток . Добавляли 0,8 мл

поддерживающей среды . При появлении в культуре ЦПД вносили препарат KR в различных дозах . В качестве контроля выполняли то же самое с тест -вирусами без препарата . Клетки инкубировали при 37⁰ С в термостате . Учет опыта производили на 3,5,7 день .

5 Снижение титра вируса под влиянием испытуемого препарата на 2 lg и более в сравнении с контролем оценивали , как проявление противовирусной активности .

Результаты изучения противовирусной активности препарата KR представлены в таблице 4

0 Таблица 4. Изучение противовирусного действия препарата KR в отношении вирусов : (везикулярного стоматита , коронавируса , вируса простого герпеса 1 типа)

Препарат	Вирус	МЭК, мг/мл	Максимальное падение титра вируса, lg ТЦД 50/мл
KR	ВВС	0,05	3,9
	КВ	0,05	2,9
	ВПГ1	0,05	4,9

Как видно из таблицы 4, KR обладает противовирусной активностью и способностью подавлять репродукцию всех изученных нами вирусов в концентрации 0,05 мг/мл при МПК = 50 мкг /мл. ХТИ препарата составляет 1000. Кроме того , KR был активен в отношении всех изученных вирусов , тогда как не один препарат сравнения не проявлял подобной активности . Таким образом , препарат не связан с конкретными особенностями вируса или клеточной культуры , а влияет на общие для всех клеток механизмы .

0 Пример 5. Изучение противовирусного действия KR2 in vitro на моделях вирусов сельскохозяйственных животных

5 Испытания проводили в 96-ти луночных пластиковых панелях с вирусом трансмиссивного гастроэнтерита свиней (ТГС) штамм «Д-52» с исходным титром 10^{4,0} ТЦД 50/мл (тканевых цитопатических доз) в перевиваемой культуре клеток тестикул поросенка (ПТП) и вирусом диареи крупного рогатого скота штамм «Орегон » с исходным титром 10^{7,0} ТЦЦ 50/мл в перевиваемой культуре клеток почки сайги (ПС).

При испытании вирусстатического (ингибирующего) действия культуры клеток инфицировали вирусами в дозах 100 и 10 ТЦДед/мл и инкубировали в термостате при 37° С. KR2 в различных дозах вносили в культуры клеток (КК) через 1-1,5 часов после заражения (после периода адсорбции). На каждое разведение брали по 8 лунок. После внесения соединения культуры клеток инкубировали при 37 °С в течение 72-144 часов до четкого проявления ЦПД (цитопатогенного действия) в контроле вирусов.

Контролями служили культуры клеток, инфицированные вирусом, инактивные КК и КК, куда вносили только различные концентрации KR2. Вирусстатическое действие определяли по разнице титров вирусов в опыте и контроле.

При определении вирулицидного (инактивирующего) действия разные дозы раствора соединения смешивали в равных объемах с вирусосодержащим материалом и инкубировали в термостате при 37 °С в течение 24 часов. Контролем служили вирусосодержащий материал, к которому вместо раствора соединения добавляли плацебо (физраствор) и инактивные культуры клеток. Смеси после контакта титровали параллельно с контролем. Результаты учитывали через 72-144 часа после инкубирования при 37° С, после четкого проявления ЦПД в контролях вирусов. Вирулицидное действие определяли по разнице титров вирусов в опыте и контроле и выражали в Ig ТЦД 50.

В результате проведенных исследований установлено, что соединение KR2 в концентрации 40 мкг \мл подавляло репродукцию вируса ТГС на 2,75 Ig ТЦД 50.М Л, при заражающей дозе 100 ТЦД 50/мл и в той же дозе на 3,75 Ig ТЦДед /мл, при заражающей дозе 10 ТЦД 50/мл. В дозе 40 мкг /мл KR2 инактивировал вирус ТГС на 2,0 Ig ТЦД 50/мл. Соединение KR в дозе 40 мкг \мл инактивировал вирус диареи КРСна 3,5 Ig ТЦД 50/М Л.

Таким образом, соединение KR2 обладает вирусстатическим (ингибирующим) и вирулицидным (инактивирующим) действием на вирусы ТГС и диареи КРС, на его основе возможно создание химиопрепаратов для лечения и профилактики инфекционных болезней вирусной этиологии.

Пример 6. Изучение противовирусной активности KR в эксперименте на животных (Герпесвирусный керато -конъюнктивит /энцефалит у кролей)

Особенности экспериментальной системы и уровень ее адекватности естественному заболеванию человека несомненно играют решающую роль в оценке влияния антивирусного вещества на течение инфекции. Герпетическая экспериментальная

инфекция представляет собой интерес в связи с тем, что заболевания герпетической природы широко распространены и чрезвычайно вариабельны по клиническим проявлениям. Модели экспериментального герпеса на животных находят все более широкое применение в изучении новых противовирусных веществ.

5 Как известно, одной из клинических форм системного герпеса является герпетический энцефалит, который воспроизводится у морских свинок, хомяков, крыс, мышей, кроликов, собак, обезьян.

0 Герпетический кератоконъюнктивит у кроликов среднего веса 3,5 кг был получен путем нанесения инфекционного материала (вирус герпеса 1 типа, штамм Л-2) на скарифицированную роговицу. Животного фиксировали, анестезию глаза проводили дикаином (закапывали в глаз). Раздвигали веки глаза, наносили несколько царапин на роговицу при помощи иглы шприца. Затем вводили вируссодержащий материал и, смыкая веки, круговыми движениями втирали его в роговицу. Доза вируса: 0,05 мл. В опыте использовали 16 кролей, из них десятерым вводили KR (ежедневно со второго дня инфицирования -14 дней в дозе 20 мг/кг, а шестерым - плацебо (0,9 % натрия хлорида)).

5 После заражения кролей ВПГ 1 ежедневно контролировали состояние роговицы, наличие кератоконъюнктивита, энцефальных нарушений и наличие в лимфоцитах периферической крови антигенов ВПГ 1 методом РИФ до и после инфицирования. До инфицирования у всех животных в лимфоцитах отсутствовало специфическое свечение, что свидетельствовало об отсутствии в периферической крови антигенов вируса герпеса 1 типа. На 3 день после инфицирования у всех животных в крови определялся антиген ВПГ 1, ИФ=70%. Кроме того, у трех кролей (двух - из опытной группы до начала лечения и у одного из контрольной группы) появились энцефальные проявления - судорожный синдром, отсутствие аппетита. У всех животных развился кератоконъюнктивит.

5 На 4 день после инфицирования опытной группе кролей ввели в ушную вену KR в дозе 20 мг/кг веса тела, а контрольной группе ввели 0,9% раствор натрия хлорида. Каждый день в течение двух недель повторяли эту процедуру один раз в день. В опытной группе все животные выжили, а антиген ВПГ 1 в крови не определялся на 13-14 день. Кроме того, в опытной группе энцефальные проявления исчезли к 7 дню применения препарата, тогда как в контроле погибло 2 животных. К 14 дню лечения в опытной группе погибло одно животное, тогда как в контроле - 6. Соответственно индекс эффективности был равен 83,3 %, что свидетельствует о высокой лечебной эффективности KR на модели герпетического кератоконъюнктивита /энцефалита у кролей. Кроме того, кроли в опытной группе набрали

в весе и у всех животных отсутствовали признаки кератоконъюнктивита .
Химиотерапевтический индекс для кролей по препарату KR составил 1000, что свидетельствует о перспективности KR как высокоэффективного противовирусного препарата с широким спектром действия и низкой токсичностью .

5

Пример 7. Влияние препарата **KR** на бройлеров кросса Кобб -500

Целью испытаний являлось изучение влияния препарата KR на репродукцию вакцинных штаммов вирусов по редукции титра соответствующих специфических антител . Известно , что многие антивирусные препараты , подавляя репродукцию живых вакцинных штаммов вирусов приводят к угнетению синтеза специфических антивирусных антител . Этот эффект связан с недостаточной интенсивностью вызванного вакциной инфекционного процесса в организме птицы и слабым иммунным ответом . При этом известно , что во многих случаях , например , при инфекционной бурсальной болезни , применение живой вакцины приводит к индукции синтеза настолько избыточного титра антител , что истощается bursa , птица становится чувствительной к другим вирусам , наблюдается уменьшение привеса и увеличение падежа . Применение препарата KR должно было показать наличие у него антивирусных свойств по нескольким параметрам : редукции избыточного уровня (титров) антител , уменьшению падежа (сохранность) , увеличение привеса .

0

В эксперимент брали бройлеров на 36 и 41 день по 15 животных в группу . KR выпаивали за сутки до вакцинации живыми вакцинами против ИББ , болезни Гамборо (БГ) и инфекционного бронхита (ИБ). В контроле были птицы , которым не выпаивали KR , но вакцинировали . В таблицах 5-6 приведены результаты исследований .

: Таблица 5. Привес бройлеров (на момент забоя) в опытной и контрольной группах

Показатель	Привес**, +%	Сохранность**, +%
Опытная группа (n=15)	5,0±0,5*	1,0±0,2*
Контрольная группа (n=15)	-1,2±0,2*	-2,1±0,3*

* - против невакцинированного контроля , который принимался за основу .

** - (P=0,01)

Как видно из таблицы 5, в опытной группе привес животных увеличился на $(5,0 \pm 0,5)\%$ против уменьшения веса в контрольной вакцинированной, но не леченной группе $(-1,2 \pm 0,2)\%$. Также в опытной группе наблюдалось увеличение сохранности на $(1,0 \pm 0,2)\%$.

5 В таблице 6 приведены изменения в титрах специфических антивирусных антител в леченной KR вакцинированной группе, вакцинированной не леченной группе и невакцинированной группе.

0 Таблица 6 Изменение титра антител против ИББ, БГ и ИБ в вакцинированных группах и невакцинированном контроле

	Среднее изменение титра специфических антител, $\pm T$		
	ИББ	БГ	ИБ
Опытная группа (вакцинированные и леченные KR) (n=15)	-1000 \pm 400	-600 \pm 200	-1100 \pm 400
Контрольная группа № 1 (вакцинированные, но не леченные KR) (n=15)	+2800 \pm 700	+3400 \pm 1200	+2800 \pm 1000
Контрольная группа (не леченные и не вакцинированные)	0		

Как видно из таблицы 6, KR обладает прямым (не иммуностимулирующим) действием в отношении всех трех вирусов. Наибольший ингибирующий эффект наблюдался в группе с инфекционным бронхитом - редукция титра антител на 1200 единиц.

5 В вакцинированном, но не леченом контроле, титры антител возростали от 2800 единиц до 3400 единиц, что свидетельствовало об эффективном процессе размножения живой вакцины в организме птицы.

Таким образом, применение KR позволят в среднем на 5% увеличить привес бройлеров и на 1% уменьшить падеж.

KR обладает прямым антивирусным действием, подавляя репродукцию вирусов инфекционной бурсальной болезни, болезни Гамборо и инфекционного бронхита.

5 KR позволяет умеренно подавлять репликацию вакцинных вирусов, обеспечивая достаточный уровень защитных антител и предотвращая истощение иммунитета птицы и соответствующее уменьшение привеса и увеличение падежа.

Пример 8. Изучение влияния KR на эффективность вакцинации бройлеров живыми вакцинами

Влияние KR на эффективность вакцинации проводили непосредственно в птицеводческом хозяйстве при выращивании бройлеров. При патологоанатомическом изучении бройлеров наблюдали характерные изменения для колибактериоза, кокцидиоза, а также многочисленные кровоизлияния на слизистых оболочках прямого отдела кишечника, в 5 участке перехода железистого желудка в мышечный, цокалевых железах. Содержимое железистого желудка было окрашено в зеленый цвет. Гибель бройлеров достигала около 15 - 20%. При исследовании сывороток крови бройлеров в 38-42 суточном возрасте в реакции задержки гемагглютинации (РЗГА) обнаруживали специфические титры антител к вирусу болезни Нью-Касла (БНК) выше протективных (1:1024, 1:2048).

0 Изучение влияния KR в дозе 0,03 мл/кг живого веса на эффективность вакцинации против БНК. Для этого один из птичников был принят за контроль, другие были опытными (таблица 7).

5 Таблица 7. Результаты изучения влияния KR на эффективность вакцинации в птицеводстве

№ группы	№ птичника	Количество голов (тыс.)	Схема применения м п
Контроль	4	40,0	KR не давали
Опыт 1	8	40,0	Из 7-суточного возраста в течение 3 суток до вакцинации живыми вирусными вакцинами

Опыт 2	7	40,0	За 1 сутки до вакцинации против БНК
Опыт 3	5	40,0	В течение 3 суток до вакцинации и через 7-10 суток после вакцинации против БНК

Условия досмотра , параметры микроклимата , режим освещенности , плотность посадки , режим кормления был одинаковым во всех группах согласно методических рекомендаций по выращиванию кросса РОС 308.

5 Напряженность иммунитета определяли в возрасте 42 суток в РЗГА . Одновременно учитывали клиническое состояние птицы , процент сохранения , прироста и затраты корма .

Результаты проведенных испытаний из определения эффективности КР при проведении вакцинации бройлеров против БНК приведены в таблице 8.

0 Таблица 8. Влияние КР на эффективность вакцинации против болезни Нью -Касла

Показатели	Контроль	Опыт 1	Опыт 2	Опыт 3
Средний титр, в РЗГА	20±8	38±16	84±28	124±30*
Напряженность иммунитета, %	75	87,5	100	100

Примечание : * P<0,05,

Средние титры специфических антител к вирусу БНК как в контроле , так и опытных группах были на уровне протективных . Однако , при исследовании сывороток бройлеров в 5 42 суточном возрасте при применении КР установлено достоверное увеличение среднего титра в опытной 3 группе в сравнении с контролем в 6 раз (< 0,01). В опытных группах (1,2) не установлено достоверной разницы титров антител в сравнении с контролем , однако они были на уровне протективных и обнаружена тенденция к увеличению этого показателя в 1,8 и 4,3 раза . Групповой иммунитет в контроле составлял 75%, тогда как в опытных группах 0 (3,4) 100%, в 1 опытной группе 87,5%. Гибель бройлеров составляла в контроле - 9,8%, тогда как процент гибели уменьшился в опытных группах : в 2,8 ; 3,3 и 4 раза

соответственно в сравнении с контролем . Среднесуточные приросты в опытных группах колебались в пределах 52-54 г., тогда как в контроле - 48 г .

5 Таким образом , можно сделать вывод , что оптимальной схемой использования KR для бройлеров в регионах со сложной эпизоотической ситуацией с БНК является применение препарата в дозе 0,03 мл/кг живого веса на протяжении 3 суток до вакцинации и через 7-10 суток после вакцинации против БНК . Применение препарата по вышеупомянутой схеме приводит к повышению среднего титра специфических антител к вирусу БНК в 6 раз и уменьшению гибели бройлеров в 4 раза .

0 Фармацевтические композиции

Могут быть использованы различные способы введения супрамолекулярных комбинаторных производных пептидов (СКП) . СКП композицию можно давать перорально или можно вводить внутрисосудистой , подкожной , внутрибрюшинной инъекцией , в форме аэрозоля , глазным способом введения , в мочевого пузыря , местно и так далее . Например , 5 способы ингаляционного введения хорошо известны в данной области техники . Доза терапевтической композиции будет варьировать в широких пределах в зависимости от конкретного вводимого антивирусного СКП , 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 0 поддерживающими дозами . Дозу можно вводить с частотой один раз в неделю или один раз в две недели , или делить на меньшие дозы и вводить их один или несколько раз в сутки , два раза в неделю и так далее для поддержания эффективного уровня дозы . Во многих случаях для перорального введения будет необходима более высокая доза , чем для внутривенного введения . Соединения по данному изобретению могут быть включены во множество 5 композиций для терапевтического введения . Более конкретно , соединения по настоящему изобретению могут быть включены в фармацевтические композиции в сочетании с подходящими фармацевтически приемлемыми носителями или разбавителями и могут быть включены в препараты в твердой , полутвердой , жидкой или газообразной формах , таких как капсулы , порошки , гранулы , мази , кремы , пены , растворы , суппозитории , 0 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 , внутрикожное , чрескожное , внутритрахеальное введение и так далее . Антивирусные СКП

по изобретению могут распределяться системно после введения или могут быть локализованы с использованием имплантата или другой композиции, удерживающей активную дозу в месте имплантации. Соединения по настоящему изобретению могут быть введены сами по себе, в комбинации друг с другом, или они могут быть использованы в комбинации с другими известными соединениями (например, перфорином, противовоспалительными агентами, и так далее). В фармацевтических лекарственных формах соединения могут быть введены в форме их фармацевтически приемлемых солей. Следующие способы и эксципиенты приведены лишь в качестве примеров и никоим образом не являются ограничивающими. Для препаратов для перорального введения соединения могут быть использованы сами по себе или в комбинации с подходящими добавками для изготовления таблеток, порошков, гранул или капсул, например, с обычными добавками, такими как лактоза, маннит, кукурузный крахмал или картофельный крахмал; со связывающими агентами, такими как кристаллическая целлюлоза, производные целлюлозы, аравийская камедь, кукурузный крахмал или желатины; с разрыхлителями, такими как кукурузный крахмал, картофельный крахмал или карбоксиметилцеллюлоза натрия; со смазывающими агентами, такими как тальк или стеарат магния; и, если желательно, с разбавителями, буферными агентами, увлажняющими агентами, консервантами и корригентами. Соединения могут быть включены в композиции для инъекций путем их растворения, суспендирования или эмульгирования в водном или неводном растворителе, таком как растительные или другие подобные масла, синтетические глицериды алифатических кислот, эфиры высших алифатических кислот или пропиленгликоля; и, если желательно, с обычными добавками, такими как 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

5 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

0 полимерами . Например , полимеры молочной и/или гликолевой кислот образуют деградируемый полимер , хорошо переносимый хозяином . Имплантат , содержащий противовирусные комбинаторные пептиды 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

5 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

0 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

5 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 1000 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

0 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.

5 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.

0 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

5 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

0 холестерин, фосфатидилсерин, фосфатидилглицерин и тому подобное. Для получения липосом может быть использован способ, описанный Kato et al.(1991) *J. Biol. Chem.* 266:3361. Кратко, липиды и композицию для включения в липосомы, содержащую комбинаторные супрамолекулярные антибиотики, смешивают в подходящей водной среде, подходящим образом в солевой среде, где общее содержание твердых веществ будет

5 находиться в диапазоне приблизительно П О масс.%. После интенсивного перемешивания в течение коротких периодов времени, приблизительно 5-60 сек, пробирку помещают в теплую водяную баню при приблизительно 25-40° С и этот цикл повторяют приблизительно 5-10 раз. Затем композицию обрабатывают ультразвуком на протяжении подходящего периода времени, обычно приблизительно 1-10 сек, и, возможно, дополнительно

0 перемешивают на вихревой мешалке. Затем объем увеличивают добавлением водной среды, обычно увеличивая объем в приблизительно 1-2 раза, с последующим взбалтыванием и охлаждением. Способ позволяет включать в липосомы супрамолекулярные структуры с высокой суммарной молекулярной массой.

Композиции с другими активными агентами

Для применения в рассматриваемых способах противовирусные СКП по изобретению могут быть включены в композиции с другими фармацевтически активными агентами, в частности другими противовирусными, антимикробными или противораковыми агентами. Другие интересующие агенты включают широкий спектр противовирусных 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, озельтавир и так далее; ацикловир, валацикловир, валганцикловир; и так далее. Другие группы противовирусных средств включают адефовир, вбакавир, диданозин, эмтрицитабин, ламивудин, ставудин, тенофовир, эфавиренз, невирапин, индинавир, лопинавир и ритонавир, нельфинавир, ритонавир, сакинавир, даклатасвир, софовбувир. В композицию СКП по изобретению могут также быть включены цитокины, например, 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.

Промышленная применимость

Изобретение относится к органической и биоорганической комбинаторной химии, а именно, к новым комбинаторным библиотекам производных олигопептидов и супрамолекулярным структурам на их основе, которые при использовании без разделения на отдельные компоненты обладают мощными противовирусными свойствами. Полученные таким образом препараты являются полностью экологически безопасными, биodeградируемыми и полностью метаболизируемыми как в организме пациентов, так и в окружающей среде, а технологии их получения относятся к группе полностью безотходных. Производство патентуемого средства осуществимо на существующем оборудовании фармацевтических предприятий и не требует разработки нового уникального оборудования, не требует энергозатрат и является безотходным и экологически чистым.

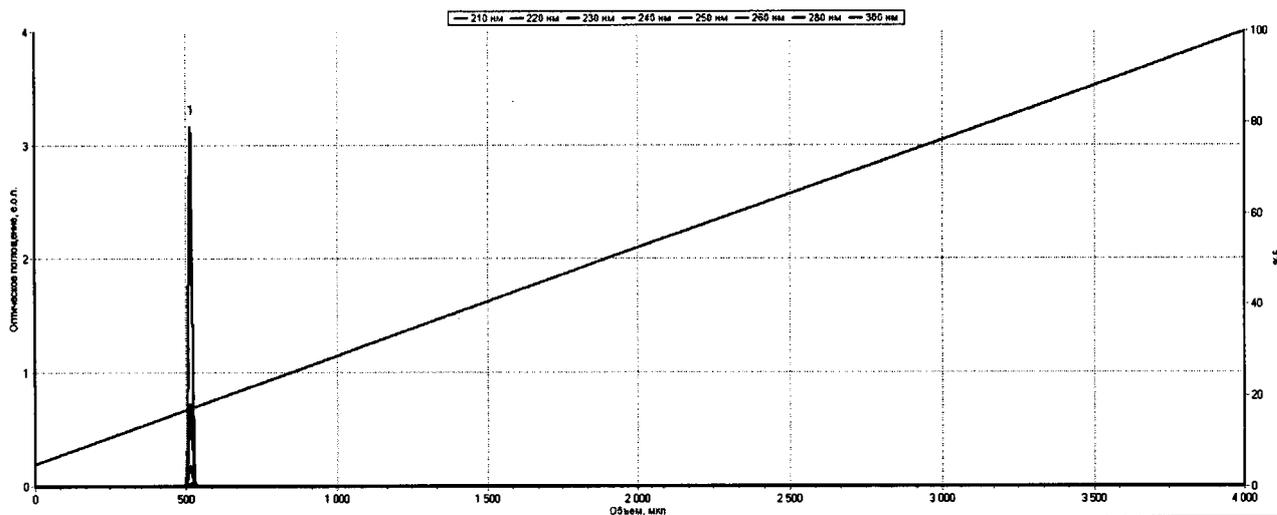
Список литературы

- ¹ Robert Walter Jansen, Dirk Klaas Fokke Meijer, Grietje Molema, Erik Desire Alice De Clercq, Rudi Wilfried Jan Pauwels, Dominique Schols Modified proteins and their use for controlling viral infection // A61K 3804; A61K 3816, US Patent № 5869457, Reg. 9.02.1999. Appl. Sep 4, 1997
- ² Евразийский патент ЕА 025624 «Модифицированные пептиды с антивирусными свойствами и способ их получения»
- ³ <http://dic.academic.ru/dic.nsf/ruwiki/79240>
- ⁴ Jean-Marie Lehn. Supramolecular Chemistry. Concepts and Perspectives.- Weinheim; New York; Basel; Cambridge; Tokyo: VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1995.-P. 103 (Chapter 7)

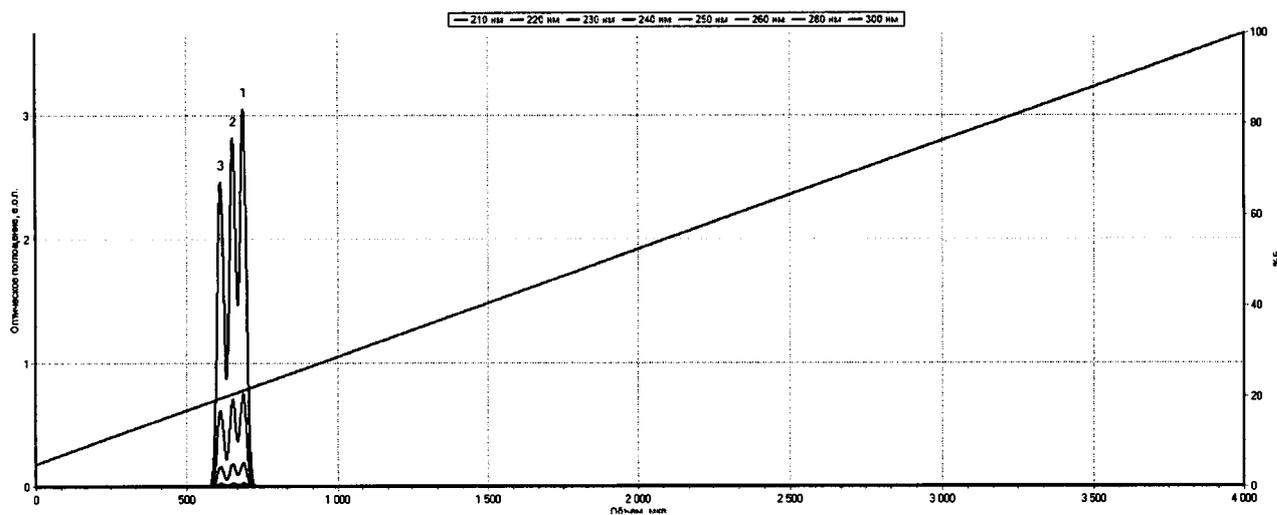
Формула изобретения

1. Комбинаторные производные олигопептидов с противовирусными свойствами ,
отличающиеся тем , что в структуре комбинаторных производных олигопептидов
5 доступные для модификации остатки аминокрупп лизинов , гистидинов , аргининов , а также
доступные для модификации спиртовые остатки треонина и серина при их наличии в
структуре исходного олигопептида или смеси олигопептидов одновременно комбинаторно
модифицированы как минимум двумя разными ковалентными модификаторами и в
10 дальнейшем полученная комбинаторная смесь целиком без очистки и без выделения
каждого отдельного производного используется как противовирусное средство в
различных фармацевтических композициях .
2. Комбинаторные производные олигопептидов с противовирусными свойствами по п.1.,
отличающиеся тем , что молярное соотношение компонентов комбинаторной реакции
рассчитывают согласно формул :
- 15 (1) $k = n \times (2^n - 1)$
(2) $m = 4 \times (3 \times 2^{n-2} - 1)$
- где
п=количество доступных для замещения групп в олигопептиде ;
т =количество молей исходного олигопептида и количество разных молекул его
20 комбинаторных производных после синтеза ;
к=количество молей каждого из двух модификаторов в реакции комбинаторного
синтеза для получения максимального количества разных производных ;
3. Комбинаторные производные олигопептидов с противовирусными свойствами по п.1.,
отличающиеся тем , что разные ковалентные модификаторы — это ангидриды как
25 минимум двух дикарбоновых кислот .
4. Комбинаторные производные олигопептидов с противовирусными свойствами по п.1.,
отличающиеся тем , что разные ковалентные модификаторы — это ангидриды как
минимум двух трикарбоновых кислот .
5. Комбинаторные производные олигопептидов с противовирусными свойствами по п.1.,
30 отличающиеся тем , что разные ковалентные модификаторы — это как минимум один
ангидрид трикарбоновой кислоты и один ангидрид дикарбоновой кислоты .

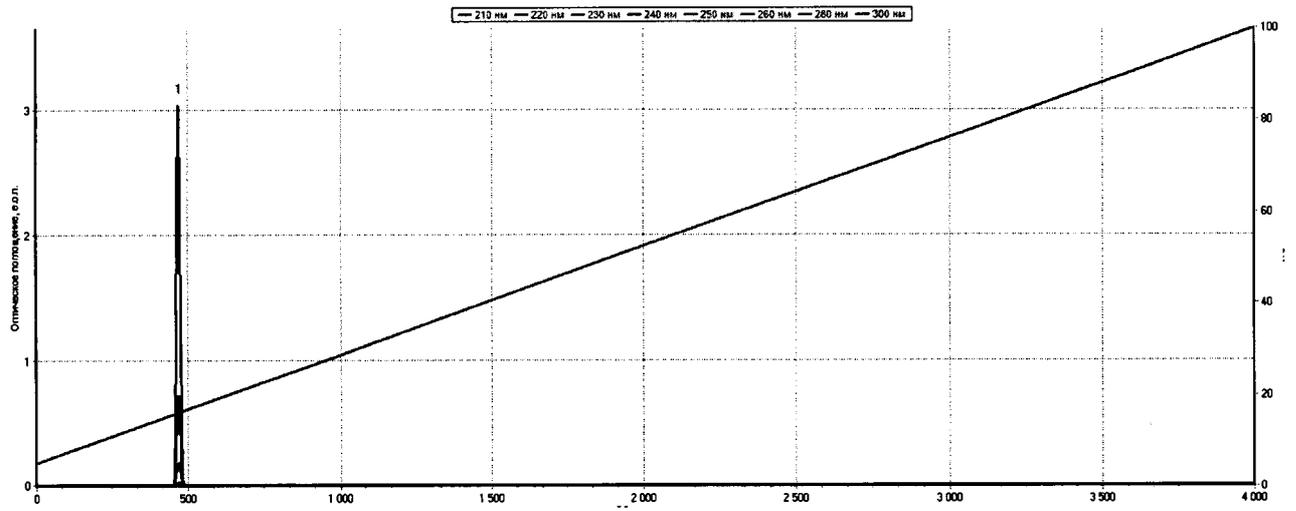
6. Комбинаторные производные олигопептидов с противовирусными свойствами по п.1., отличающиеся тем, что разные ковалентные модификаторы — это как минимум два галогенпроизводные .
- 5 7. Комбинаторные производные олигопептидов с противовирусными свойствами по п.1., отличающиеся тем, что разные ковалентные модификаторы — это как минимум одно галогенпроизводное и один ангидрид дикарбоновой или трикарбоновой кислоты .
8. Комбинаторные производные олигопептидов с противовирусными свойствами по п.1., отличающиеся тем, что в качестве исходных олигопептидов используют классический сигнал ядерной локализации (cNLS), состоящий из одного или двух кластеров
10 положительно заряженных аминокислотных остатков : K-K/R-X-K/R или K/R-K/R-X_i—_{1,2}(K/R)_{3/5}, где X — любая аминокислота .
9. Комбинаторные производные олигопептидов с противовирусными свойствами по п.1., отличающиеся тем, что в качестве исходного олигопептида используют пептид,
состоящий из двух кластеров положительно заряженных аминокислотных остатков :
15 KKRKRKRKR.



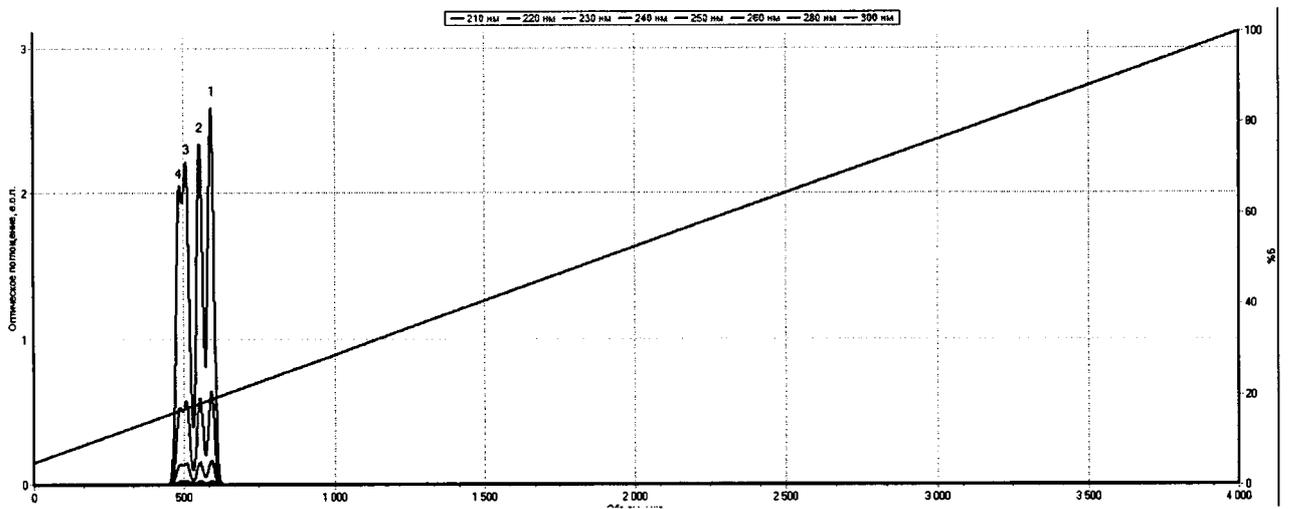
Фиг.1



Фиг.2



Фиг.3



Фиг.4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/RU 201 7/000426

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61 K 38/03 (2006.01); A61 K 38/04 (2006.01); A61 P 31/1 2 (2006.01); C40B 40/1 0 (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61 K 38/03, A 6 1 K 38/04, A61 P 31/12, C40B 40/10

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)

Esp@cenet, USPTO, RUPAT, PatSearch (RUPTO internal), PAJ, DWPI, CIPO, PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2012/070975 A 1 (FARBER BORIS SLAVINOVICH et al.) 31.05.2012, the abstract, p.2, example 1	1-9
Y	BECKER R.R. et.al. Protein modification by reaction with n-carboxyamino protein modification by acid anhydrides. J. Biol. Chem., 1953, 204, pp.745-752	1-9
Y	WO 2006/056227 A 1 (EBERHARD- KARLS UNI TUE et.al) 01.06.2006, the abstract, p.15, paragraph 4, p. 16, lines 4-7, p. 17, lines 1-7, p.22, paragraph 6, p.23, table 1, items 11-13, 20 of the claims	8-9
Y	Soniat M. et al. Nuclear localization signals for four distinct karyopherin- β nuclear import systems. Biochem J., 2015 Jun 15; 468(3), pp.353-362	8-9
Y	Signal yadernoi lokalizatsii. Vikipediya, 24.04.2017, pp.1 -3	8-9

 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

12 March 2018 (12.03.2018)

Date of mailing of the international search report

05 April 2018 (05.04.2018)

Name and mailing address of the ISA/

RU

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/RU 2017/000426

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	OEVERMANN A. et al. The antiviral activity of naturally occurring proteins and their peptide fragments after chemical modification, Antiviral Research, 2003, Vol. 59, pp. 23-33	1-9
A	ZHIWU SUN et al. Intranasal Administration of Maleic Anhydride-Modified Human Serum Albumin for Pre-Exposure Prophylaxis of Respiratory Syncytial Virus Infection. Viruses, 2015 Feb; 7(2), pp. 798-816	1-9

<p>А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ</p> <p style="text-align: right;"> <i>A 61k 38/03 (2006.01)</i> <i>A 61k 38/04 (2006.01)</i> <i>A 61p 31/12 (2006.01)</i> <i>C40v 40/10 (2006.01)</i> </p> <p>Согласно Международной патентной классификации МПК</p>																				
<p>В. ОБЛАСТЬ ПОИСКА</p> <p>Проверенный минимум документации (система классификации с индексами классификации)</p> <p style="text-align: center;">A 61k 38/03, A 61k 38/04, A 61p 31/12, C40v 40/10</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 style="text-align: center;">Esp@cenet, USPTO, RUPAT, PatSearch (RUPTO internal), PAJ, DWPI, CIPO, PubMed</p>																				
<p>С. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ :</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;">Категория *</th> <th style="width: 70%;">Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей</th> <th style="width: 20%;">Относится к пункту №</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">Y</td> <td>WO 2012/070975 A 1 (ФАРБЕР БОРИС СЛАВИНОВИЧ и др.) 31.05.2012, реферат, с.2, пример 1</td> <td style="text-align: center;">1-9</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Y</td> <td>BECKER R.R. et.al. Protein modification by reaction with n-carboxyamino protein modification by acid anhydrides. J. Biol. Chem., 1953, 204, сс.745-752</td> <td style="text-align: center;">1-9</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Y</td> <td>WO 2006/056227 A1 (ЕБЕРНАРД-КАРЛС УНИ ТУЕ et.al) 01.06.2006, реферат, с.15, 4 абзац, с. 16, строки 4-7, с. 17, строки 1-7, с.22, абзац 6, с. 23, таблица 1, п.п. 11-13, 20 формулы</td> <td style="text-align: center;">8-9</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Y</td> <td>Soniati M. et al. Nuclear localization signals for four distinct karyopherin-β nuclear import systems. Biochem J., 2015 Jun 15;468(3), pp.353-362</td> <td style="text-align: center;">8-9</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Y</td> <td>Сигнал ядерной локализации. Википедия, 24.04.2017, сс.1-3</td> <td style="text-align: center;">8-9</td> </tr> </tbody> </table>			Категория *	Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №	Y	WO 2012/070975 A 1 (ФАРБЕР БОРИС СЛАВИНОВИЧ и др.) 31.05.2012, реферат, с.2, пример 1	1-9	Y	BECKER R.R. et.al. Protein modification by reaction with n-carboxyamino protein modification by acid anhydrides. J. Biol. Chem., 1953, 204, сс.745-752	1-9	Y	WO 2006/056227 A1 (ЕБЕРНАРД-КАРЛС УНИ ТУЕ et.al) 01.06.2006, реферат, с.15, 4 абзац, с. 16, строки 4-7, с. 17, строки 1-7, с.22, абзац 6, с. 23, таблица 1, п.п. 11-13, 20 формулы	8-9	Y	Soniati M. et al. Nuclear localization signals for four distinct karyopherin-β nuclear import systems. Biochem J., 2015 Jun 15;468(3), pp.353-362	8-9	Y	Сигнал ядерной локализации. Википедия, 24.04.2017, сс.1-3	8-9
Категория *	Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №																		
Y	WO 2012/070975 A 1 (ФАРБЕР БОРИС СЛАВИНОВИЧ и др.) 31.05.2012, реферат, с.2, пример 1	1-9																		
Y	BECKER R.R. et.al. Protein modification by reaction with n-carboxyamino protein modification by acid anhydrides. J. Biol. Chem., 1953, 204, сс.745-752	1-9																		
Y	WO 2006/056227 A1 (ЕБЕРНАРД-КАРЛС УНИ ТУЕ et.al) 01.06.2006, реферат, с.15, 4 абзац, с. 16, строки 4-7, с. 17, строки 1-7, с.22, абзац 6, с. 23, таблица 1, п.п. 11-13, 20 формулы	8-9																		
Y	Soniati M. et al. Nuclear localization signals for four distinct karyopherin-β nuclear import systems. Biochem J., 2015 Jun 15;468(3), pp.353-362	8-9																		
Y	Сигнал ядерной локализации. Википедия, 24.04.2017, сс.1-3	8-9																		
<p><input checked="" type="checkbox"/> последующие документы указаны в продолжении графы С. <u>I</u> Данные о патентах-аналогах указаны в приложении</p>																				
<table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> <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> </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> <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>"Х" 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>"Y" 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 патентом-аналогом</p> </td> </tr> </table>			<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>"Х" 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>"Y" 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 патентом-аналогом</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>"Х" 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>"Y" 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 патентом-аналогом</p>																			
<p>Дата действительного завершения международного поиска</p> <p style="text-align: center;">12 марта 2018 (12.03.2018)</p>		<p>Дата отправки настоящего отчета о международном поиске</p> <p style="text-align: center;">05 апреля 2018 (05.04.2018)</p>																		
<p>Наименование и адрес ISA/RU: Федеральный институт промышленной собственности, Бережковская наб., 30-1, Москва, Г-59, ГСП -3, Россия, 125993 Факс : (8^195) 531-63-18, (8-499) 243-33-37</p>		<p>Уполномоченное лицо :</p> <p style="text-align: center;">Н.Солодухина</p> <p>Телефон № 495 531 65 15</p>																		

С. (Продолжение). ДОКУМЕНТЫ СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕВАЛЕНТНЫМИ		
Категория *	Цитируемые документы с указанием , где это возможно , релевантных частей	Относится к пункту №
A	OEVERMANN A. et al. The antiviral activity of naturally occurring proteins and their peptide fragments after chemical modification, Antiviral Research, 2003, Vol. 59, pp. 23-33	1-9
A	ZHIWU SUN et al. Intranasal Administration of Maleic Anhydride-Modified Human Serum Albumin for Pre-Exposure Prophylaxis of Respiratory Syncytial Virus Infection. Viruses, 2015 Feb; 7(2), pp. 798-816	1-9