

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

(19) Всемирная Организация
Интеллектуальной Собственности
Международное бюро

(43) Дата международной публикации
23 мая 2019 (23.05.2019)



(10) Номер международной публикации
WO 2019/098869 A1

- (51) Международная патентная классификация :
A 61K 31/505 (2006.01) C40B 50/08 (2006.01)
C40B 50/04 (2006.01) A 61P 43/00 (2006.01)
- (21) Номер международной заявки : PCT/RU20 17/00085 1
- (22) Дата международной подачи :
15 ноября 2017 (15.11.2017)
- (25) Язык подачи : Русский
- (26) Язык публикации : Русский
- (72) Изобретатели ; и
- (71) Заявители : ФАРБЕР , Борис Славинович (FARBER, Boris Slavinovich) [RU/RU]; проспект Кутузовский , 24, кв. 130А Москва , 121 15 1, Moscow (RU). ФАРБЕР , Софья Борисовна (FARBER, Sof'ya Borisovna) [RU/RU]; проспект Кутузовский , 24, кв.130А , Москва , 121 15 1, Moscow (RU).
- (72) Изобретатель : МАРТЫНОВ , Артур Викторович (MARTYNOV, Artur Viktorovich); ул.Корчагинцев , 1, кв.18, 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) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BV, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, 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, UG, ZM, ZW), евразийский (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU,

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

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR STIMULATING STEM CELL DIVISION AND SUPPRESSING BACTERIAL VIRULENCE

(54) Название изобретения : ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ СТИМУЛЯЦИИ ДЕЛЕНИЯ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК И ПОДАВЛЕНИЯ ВИРУЛЕНТНОСТИ БАКТЕРИЙ

(57) Abstract: The invention relates to a pharmaceutical composition for promoting tissue regeneration, stimulating stem cell division and suppressing bacterial virulence. The claimed composition comprises histone deacetylase and phosphodiesterase inhibitors and an unseparated combinatorial mixture of dipyrnidamole derivatives produced by a simultaneous modification by at least two covalent modifiers such as, for example, succinic anhydride and acetic anhydride. The composition can be used against resistant microorganisms by restoring their susceptibility to antibiotics.

(57) Реферат : Изобретение относится к фармацевтической композиции для активации регенерации тканей , стимуляции деления стволовых клеток и подавления вирулентности бактерий . Заявленная включает ингибиторы гистондеацетилазы и фосфодиэстеразы , а также неразделенную комбинаторную смесь производных дипиридамола , полученных путем одновременной модификации как минимум двумя ковалентными модифицирующими агентами , например , такими как янтарный ангидрид и уксусный ангидрид . Композиция может использоваться в борьбе с резистентными микроорганизмами путем восстановления их чувствительности в антибиотикам .



WO 19/098869 A1

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ СТИМУЛЯЦИИ ДЕЛЕНИЯ
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК И ПОДАВЛЕНИЯ ВИРУЛЕНТНОСТИ БАКТЕРИЙ

5 Область техники

Изобретение относится к органической и биорганической комбинаторной химии и фармации, а именно, к новой комбинаторной библиотеке производного дипиридамола и супрамолекулярным структурам на их основе, которые при использовании без разделения на отдельные компоненты обладают высокой

- 10 биологической активностью как средство стимуляции деления стволовых клеток в стволовые в виде фармацевтических композиций в комбинации с ингибиторами фосфодиэстеразы и ингибиторами гистондеацетилазы и фармацевтически приемлемыми вспомогательными формообразующими веществами. Также композиция предназначена для подавления вирулентности бактерий и
- 15 восстановления их чувствительности к антибактериальным препаратам, а также производства на их основе медицинских и ветеринарных биопрепаратов, пищевых добавок, пробиотиков и молочнокислых заквасок, производства вакцин.

Предшествующий уровень техники

- 20 Плюрипотентные стволовые клетки в настоящее время считаются наиболее перспективным источником молодости, отвечают за регенерацию тканей и поддержание физиологически здорового состояния иммунитета. Проблемой является уменьшение с возрастом собственных иПС клеток в организме и соответственно - старение. Японскими учеными (Tanabe *et.al.*, 2013) была обнаружена способность
- 25 высокодифференцированных клеток под влиянием генных векторов дифференцироваться в плюрипотентные. Недостатком данного направления является необходимость генетической модификации дифференцированных клеток и угроза образования раковых клеток. Авторам удалось найти группы препаратов, которые в композиции способны значительно увеличить процент выхода стволовых
- 30 клеток после генетической модификации. Это две группы соединений - ингибиторы цАМФ - фосфодиэстеразы и ингибиторы гистондеацетилазы. Хотя без генетической

модификации пока обойтись не удалось, выход стволовых клеток был увеличен в 1000 раз. С учетом этого, возникла идея, что можно найти низкомолекулярные вещества, способные заменить генетические векторы и вызвать дифференцировку (репрограммирование) тканей в стволовые.

5

Стадия созревания иПС клеток

Только небольшое число клеток проходит стадию созревания успешно, что проявляется в низкой эффективности репрограммирования в целом (Tanabe *et.al.*, 2013). На данном этапе эпигенетические модификации позволяют активировать экспрессию генов, кодирующих эндогенные факторы плюрипотентности, такие как Oct4, Nanog, Sall4 и др. (Feng *et.al.*, 2009).

Важную роль в созревании иПС клеток играет LIF-STAT сигнальный путь. При культивировании клеток на среде без добавления LIF (ингибирующий фактор лейкемии, leukemia inhibitory factor), который служит активирующим лигандом данного сигнального пути, формируются колонии, схожие по морфологии с эмбриональными стволовыми клетками, но после шести дней с момента образования они открепляются от адгезивной поверхности. Активация LIF-STAT пути приводит к деметилированию промоторов генов, обеспечивающих поддержание плюрипотентного состояния. Было показано, что транскрипционный фактор Stat3 напрямую блокирует ДНК-метилтрансферазу DNMT1 и гистоновые деацетилазы HDAC2, HDAC3 и HDAC8 (Tang and Tian, 2013).

WNT-сигнальный путь участвует в созревании иПС клеток, так как добавление Wnt3a-аКТНВН γ уно;его лиганда между шестым и девятым днями после начала репрограммирования увеличивает количество сформированных иПС колоний (Ho *et.al.*, 2013). Такие колонии экспрессируют эндогенный Nanog, возможно, именно продукт данного гена необходим клеткам для перехода из стадии созревания в стадию стабилизации (Samavarchi-Tehrani *et.al.*, 2010).

Стадия стабилизации иПС клеток

Только 1% клеток, вступивших на путь репрограммирования, доходит до этапа стабилизации. Она характеризуется наличием эндогенной экспрессии факторов поддержания плюрипотентности. Было показано, что на девятый день при

элиминации экзогенных факторов репрограммирования не происходит фенотипической реверсии клеток (Samavarchi-Tehrani *et.al.*, 2010).

На данном этапе наиболее четко прослеживаются различия между иПС клетками мыши и человека . При репрограммировании соматических клеток мышей ,
5 происходит реактивация X-хромосомы , которая в норме инактивирована у особей женского пола . В клетках человека реактивации X-хромосомы не происходит (Plath and Lowry, 2011).

Использование иПС клеток в генной терапии

10 Возможность генной коррекции индуцированных плюрипотентных стволовых клеток открывает широкие возможности использования их в тканезаместительной терапии . На данный момент целый ряд различных типов соматических клеток был успешно репрограммирован . Удалось получить иПС клетки из нейральных стволовых клеток , кератиноцитов , В-лимфоцитов ,
15 периферических мононуклеарных клеток крови и панкреатических β -клеток (Hawkins *et.al.*, 2014).

Первые эксперименты по использованию иПС клеток в терапевтических целях были проведены в лаборатории Йениша . Из фибробластов мышей , больных серповидно - клеточной анемией , были получены иПС клетки , мутацию в гене гемоглобина которых затем элиминировали с помощью гомологичной
20 рекомбинации . После генетической коррекции иПС клетки дифференцировали в культуре в предшественники эритроцитов и вводили мутантным мышам , где клетки проходили окончательную дифференцировку в эритроциты *in vivo*. В результате наблюдалось полное выздоровление больных животных (Hanna *et. ah*, 2007). Также
25 иПС клетки использовались в заместительной терапии анемии Фанкони мышей , в которой генетически скорректированные клетки также проходили дифференцировку в эритроциты *in vivo*. В результате наблюдалось выздоровление животных (Raya *et. ah*, 2009). иПС клетки человека впервые были получены из фибробластов кожи (Takahashi *et.al.*, 2007). На данный момент было репрограммировано множество
30 клеток пациентов с такими заболеваниями , как болезнь Гоше , мышечная дистрофия , болезнь Паркинсона , болезнь Хантингтона , серповидно -клеточная анемия , и ведутся исследования в направлении генотерапевтических модификаций полученных иПС клеток (Walia *et.al.*, 2012). иПС клетки , полученные от пациентов с различными заболеваниями , могут быть использованы для изучения молекулярных механизмов

болезней , поиска новых лекарственных соединений для терапии , тестирования эффективности уже разработанных медикаментов и проверки их токсичности . Впервые такой подход был использован для описания эффектов , оказываемых кардиоактивными соединениями на кардиомиоциты , дифференцированные из иПС 5 клеток (Yokoo *et.al.*, 2009). Получение иПС клеток от каждого пациента индивидуально является долгим и дорогостоящим процессом , зачастую непригодным для экстренной терапии заболеваний , таких как , например , повреждения спинного мозга . Наиболее перспективным представляется создание 10 банка иПС клеток , полученных от определенной выборки доноров . Проблему иммунного ответа при трансплантации чужеродных клеток можно частично решить при использовании доноров , которые являются гомозиготами по аллелям *HLA* генов гистосовместимости (Takahashi and Yamanaka, 2013). При совпадении одной из аллелей *HLA* гетерозиготного донора с аллелями гомозиготного пациента риск отторжения иПС клеток будет минимален . В данный момент под руководством 15 Синъя Яманака в Японии создается банк иПС клеток , полученных от доноров с наиболее распространенными *HLA* аллелями (Синъя Яманака , 2014, устное сообщение) .

Использование лентивирусных векторов для репрограммирования клеток . 20 Впервые иПС клетки были получены путем одновременной трансдукции четырьмя ретровирусами , несущими Oct4, Sox2, Klf4 и c-Myc (OSKM) (Takashi and Yamanaka, 2006). Ретровирусы и лентивирусы интегрируют в геном хозяина , что обеспечивает высокий уровень экспрессии трансгена , эффективное заражение 25 делящихся клеток , но при этом существует опасность инсерционного мутагенеза и активацию протоонкогенов , что может увеличить риск образования опухолей (Okita *et al.*, 2007).

Характеристика лентивирусной векторной системы .

Лентивирусная векторная система основана на вирусе иммунодефицита 30 человека -1 (ВИЧ -1), хорошо изученном патогенном вирусе человека . Она обладает рядом свойств , делающих её удобной для доставки генов , таких как широкий тропизм клеток -мишеней , способность заражать как делящиеся , так и не делящиеся клетки , отсутствие экспрессии вирусных белков после трансдукции , возможность

доставки сложных генетических элементов , таких , как полицистронные или интрон - содержащие последовательности , безопасность и простота использования (Sakuma *et al*, 2012).

При попытке разработать наиболее безопасную для использования векторную систему было разработано несколько поколений лентивирусных векторов (Ramezani *et al*, 2002), из которых наиболее часто используются векторы третьего поколения .

Геном ВИЧ -1 - одноцепочечная молекула РНК длиной приблизительно 9 тысяч пар оснований , кодирующая девять вирусных белков (Sakuma *et al*, 2012). Продукты экспрессии генов *gag*, *pol* и *env* - соответственно белки вирусного кора , ферменты для репликации вируса и вирусный поверхностный гликопротеин gp160. Белки генов *tat* и *rev* активируют вирусную транскрипцию , контролируют сплайсинг транскриптов и их экспорт в ядро . Четыре оставшихся гена кодируют вспомогательные белки *Vif*, *Vpr*, *Vpu* и *Nef*. Вирусный геном содержит длинные концевые повторы (LTR, long terminal repeats), необходимые для обратной транскрипции и интеграции вируса в геном , и сигнал упаковки «Ψ».

Самыми первыми лентивирусными векторами были вирусы , несущие трансгены и способные к репликации . Для безопасности использования была проведена серия модификаций , в результате которой геном ВИЧ -1 был разделён на две плазмиды : (i) плазмиду , содержащую геном ВИЧ -1 с делецией в гене *env*, (ii) плазмиду , экспрессирующую *Env* и не содержащую сигнала упаковки (Page *et al*, 1990). Такая конструкция позволяла производить вирусы , способные вызывать только один раунд инфицирования , так как в заражаемые клетки не попадал ген *env*, необходимый для формирования полноценной вирусной частицы .

Продукт гена *env*, поверхностный гликопротеин gp160 процессируется на два белка , gp120 и gp41. Вместе они составляют субъединицу на поверхности вирусной частицы , играющий роль лиганда для молекул CD4, CXCR4 и CCR5. Таким образом , ВИЧ -1 может инфицировать только экспрессирующие их клетки : Т-лимфоциты , моноциты , макрофаги , дендритные клетки . Для повышения клеточного тропизма использовалось «псевдотипирование » лентивирусных векторов путём замены гликопротеина *Env* на гликопротеин G вируса везикулярного стоматита (VSV-G, от vesicular stomatitis virus) (Akkina *et al*, 1996). VSV-G способен связываться с распространённым компонентом клеточной мембраны фосфатидилсерином , что дало векторам возможность заражать широкий спектр клеток , включая клетки не млекопитающих (рыб). Также VSV-G значительно стабильней , чем белки *env*, что

позволило получать при концентрировании ультрацентрифугированием большие титры вируса .

Для уменьшения вероятности случайного образования лентивирусов , способных к репликации , при использовании лентивиральной системы доставки 5 трансгенов было создано так называемое первое поколение векторов . Геном ВИЧ -1 делился на три плазмиды : (i) плазмиду , содержащую гены *gag*, *pol*, а также гены регуляторных и упаковочных белков ; (ii) плазмиду с VSV-G; (iii) плазмиду с целевыми рекомбинантными белками . Первые две плазмиды не содержали LTR и сигнала упаковки , которые позволили бы генам вирусных белков попасть в 10 формирующиеся вирусные частицы . Таким образом , в клетках -мишенях будет экспрессироваться только трансгенные белки . Также разделение на три плазмиды значит , что для образования лентивирусов , способных к репликации , потребуется как минимум два события рекомбинации .

Вспомогательные вирусные белки Vif, Vpr, Vpr и Nef необходимы для 15 эффективной вирулентности ВИЧ -1 *in vivo*. Например ,Vif и Vpr нейтрализуют клеточные противовирусные факторы APOBEC3G и Tetherin, а Nef способствует деградации молекул MHC I и CD4 (Sakuma et al., 2012). Но в случае лентивекторов вспомогательные белки можно удалить без влияния на эффективность трансфекции .

Таким образом , второе поколение лентивирусных векторов содержит всего 20 четыре из девяти генов ВИЧ -1: *gag*, *pol*, *tat* и *rev*.

Регуляторные белки Tat и Rev абсолютно необходимы для репликации ВИЧ -1 (Terwilliger *et al.*, 1988). Tat служит активатором и усилителем транскрипции вирусных генов , а Rev способствует ядерному экспорту вирусных транскриптов в ядро . Для повышения безопасности использования лентивекторной системы ген 25 белка Rev встроен в отдельную плазмиду . Также достигнута независимость от Tat заменой промоторного региона в 5'-LTR в плазмиде с трансгеном на сильный промотор цитомегаловируса или респираторного синцитиального вируса .

В третьем поколении лентивекторов используются четыре плазмиды : (i) плазида с генами *gag* и *pol*; (ii) плазида , экспрессирующая Rev; (iii) плазида , 30 экспрессирующая VSV-G; (iv) плазида с трансгеном . Для формирования лентивирусов , способных к репликации , потребовалось бы как минимум три события рекомбинации , но даже в этом случае получившиеся вирусы не имели бы Tat и вспомогательных белков .

В лаборатории Йениша была разработана система репрограммирования на основе лентивирусов, дефектных по гену интегразы, которые не способны интегрировать в геном клеток. Первая лентивиральная конструкция несет последовательность, кодирующую саморазрезающуюся полицистронную

5 конструкцию факторов OSKM под единым промотором тетрациклинового оператора. В данной конструкции все четыре репрограммирующих фактора разделены саморазрезающимися 2A пептидами, которые в процессе трансляции позволяют синтезировать смесь соответствующих транскрипционных факторов. В присутствии доксициклина с промотором связывается белок-трансаKTиватор,

10 последовательность гена которого доставляется с помощью второго типа лентивирального вектора. В результате для активации экспрессии OSKM необходимо одновременное попадание только двух лентивирусов в клетку. Гетерогенность иПС клонов, полученных с помощью такой системы репрограммирования, значительно ниже (Carey *et.al.*, 2009).

15 Использование индуцированных плюрипотентных стволовых клеток - одно из наиболее перспективных направлений в лечении заболеваний, вызванных дефектами экспрессии генов. В иПС клетки, полученные из соматических клеток больного, вносится нормальная копия гена, в результате чего происходит восстановление его функции. Доставка ДНК в плюрипотентные клетки возможна

20 различными способами, и наиболее перспективный из них - использование искусственных хромосом.

Существует большое количество различных способов доставки генетического материала в клетку. Их можно условно разделить на две группы: с использованием плазмидных векторов или с применением линеаризованных молекул ДНК,

25 кодирующих целевой ген.

Идеальный вектор для доставки генетической информации должен удовлетворять ряду условий (по: Kouprina *et. al.*, 2014):

- 1) возможность использования полноразмерных генов со всеми эндогенными регуляторными элементами;
- 30 2) возможность физиологической, нативной регуляции экспрессии гена;
- 3) стабильная долговременная экспрессия внесенного гена, без интеграции в геном либо регулируемая временная экспрессия;
- 4) высокая эффективность и специфичность трансфекции целевых клеток;
- 5) отсутствие риска раковой трансформации клеток и вызова иммунного

ответа .

Наиболее распространенными вирусами , используемыми для передачи генетического материала , являются аденовирусы , аденоассоциированные вирусы , ретровирусы (включая лентивирусы , способные интегрировать в геном хозяина) и
5 лентивирусы (дефектные по интегразе) .

Аденовирусы являются вирусами с линейным двуцепочечным ДНК -геномом . Он не интегрируется в геном клетки -носителя , поэтому аденовирус не может эффективно заражать делящиеся клетки . Также есть ограничение на размер последовательности , клонируемой в геном аденовируса (меньше , чем 10 Кб) , что
10 вызвано небольшим размером капсида . Но главным минусом в использовании аденовирусов является сильный и быстрый иммунный ответ при попадании вируса в клетку .

Аденоассоциированные вирусы являются безоболочечными вирусами с линейным одноцепочечным ДНК -геномом . Они не являются автономными , для
15 репликации и экспрессии вирусного генома и сборки капсида необходимо присутствие аденовируса или вируса герпеса . В отсутствие вирусов -помощников аденоассоциированные вирусы переходят в латентную фазу и могут интегрироваться в ядро клетки хозяина только по определенным сайтам девятнадцатой хромосомы . Возможно клонирование в вирусный вектор только небольших последовательностей
20 (до 9 Кб) . Вызывают умеренный иммунный ответ .

Ретровирусы - вектор , наиболее часто применяемый для доставки генетического материала . Геном представлен одноцепочечной молекулой РНК . Происходит интеграция в геном клетки хозяина , что способствует устойчивой экспрессии трансгена . Но встраивание происходит преимущественно по сайтам ,
25 находящимся рядом с местами старта транскрипции в геноме клетки , что может приводить к инсерционному мутагенезу (Wu *et. al.*, 2003). В стволовых и гематopoэтических клетках мыши наблюдается транскрипционный сайленсинг трансгена .

Лентивирусы относятся к ретровирусам , но могут заражать как делящиеся ,
30 так и неделящиеся клетки благодаря интеграции в их геном . Лентивекторная система сконструирована на основе вируса иммунодефицита человека -1, но является непатогенной и безопасной для использования . Также были созданы лентивирусы , мутантные по гену интегразы , а потому не способные встраиваться в геном . Такие вирусы обеспечивают стабильную экспрессию трансгена в неделящихся клетках и

временную - в делящихся (Wanisch and Yanez-Munoz, 2009). Lentивирусы , дефектные по интегразе на данный момент являются одними из наиболее перспективных вирусных систем доставки генетического материала .

5 Главным недостатком всех вирусных систем доставки трансгенов является их малая емкость и возможность использования только кДНК гена без эндогенных регуляторных элементов (Kourgrina *et. al.*, 2013). При таких условиях невозможно достичь нативного контроля экспрессии гена . Таким образом , для успешной экспрессии трансгенов в целевых клетках необходим вектор без ограничений по размеру клонируемой последовательности , стабильно экспрессирующийся как в 10 делящихся , так и в неделящихся клетках , при этом без осуществления интеграции в геном и не вызывающий иммунный ответ . Векторной системой , обладающей этими свойствами , являются искусственные хромосомы .

Предложенная нами схема синтеза комбинаторных производных на основе одной полифункциональной исходной молекулы (например , дипиридамола) путем 15 реакции с двумя и более исходными модификаторами без последующего разделения и выделения 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 20 новшеством в данном подходе является правильный расчет мольного соотношения количества реагентов : как исходного полифункционального соединения (в данном случае - дипиридамола) 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 25 растворах образует супрамолекулярные структуры друг с другом в произвольных положениях и ведет себя как исходный дипиридамол , 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 30 условий разделения не смогли привести к разделению смеси , при этом на ЯМР Н¹ спектре наблюдался явный хаос из полос поглощения водородов как металлических групп остатка уксусной кислоты , так и этильных групп остатка янтарной кислоты так и водородов незамещенных фенильных гидроксидов . Отличием от исходной

молекулы также является значительное изменение биологической активности и расширение его спектра .

Борьба с резистентностью микроорганизмов

- 5 В последнее время отмечается интенсификация разработок биотехнологических методов получения биомассы микроорганизмов для производства препаратов белковой природы , значительный процент которых принадлежит продуктам бактериального происхождения (вакцины , анатоксины , пробиотики и проч .). Одним из путей решения задачи оптимизации синтеза биотехнологических белковых и
- 10 небелковых компонентов и наращивания микробной массы является поиск и моделирование стимуляторов роста микроорганизмов . В последнее время публикуется много научных работ по изучению стимулирующего воздействия различных физических , химических и других факторов на биологические свойства клеток . Широким спектром биологической активности характеризуются
- 15 стимуляторы химического происхождения - имидазол , изохинолин и их производные , которые входят в структуру многих природных и синтетических соединений , способных индуцировать интенсивность роста микробной популяции . Использование энхансеров является важным достижением в области биотехнологических производств , они могут повышать как процент выхода
- 20 биотехнологических белковых продуктов , так и наращивание микробной массы вне рамок физиологической нормы на порядок и выше . Таким образом , есть теоретическая возможность значительно ускорить скорость накопления микробной массы и синтез микроорганизмами белковых продуктов . Повышение ростовой и ферментативной активности микроорганизмов способствовать увеличению
- 25 биомассы клеток и соответственно метаболитов для дальнейшего их эффективного применения в различных отраслях хозяйства , в частности , в биотехнологической , медицинской и фармацевтической промышленности . Для того , чтобы патогенный микроорганизм мог вызвать инфекционную болезнь он должен обладать одной характеристикой - вирулентностью - способностью не только проникать в
- 30 макроорганизм , размножаться в нем , но и подавлять его защитные механизмы , следствием чего и является развитие инфекционной болезни . Вирулентность - признак не видовой , как патогенность , а штаммовый , т.е. присущ не всему виду , а конкретным штаммам . Вирулентность можно также определить как фенотипическое проявление патогенного генотипа микроорганизмов . Как количественный признак

вирулентность , в отличие от качественного - патогенности , имеет единицы измерения . Она измеряется количеством , т. е. дозой микроорганизмов , вызывающих определенной биологический эффект . Это могут быть :

5 - DCL (*dosis certae letalis*) - это абсолютно летальная доза - минимальное количество возбудителя , которое вызывает гибель 100 % взятых в опыт лабораторных животных ;

- DLM (*dosis letalis minima*) - это минимальная летальная доза - минимальное количество возбудителя , вызывающее гибель 95 % взятых в опыт лабораторных животных ;

10 - LD50 - это минимальное количество возбудителя , вызывающее гибель 50 % взятых в опыт лабораторных животных (используется для измерения вирулентности наиболее часто).

При этом всегда указывается вид лабораторного животного , на котором определялась данная доза , так как чувствительность разных видов лабораторных животных к тем или иным микроорганизмам различна . Обязательно указывается также и способ введения культуры микроорганизмов - внутрибрюшинно , внутримышечно , интраназально , внутривенно .

Вирулентность является лабильным признаком . Она может изменяться как в сторону повышения , так и снижения , как *in vivo*, так и *in vitro*. При максимальном снижении вирулентности патогенные микроорганизмы могут стать авирулентными , т. е. невирулентными , но вирулентные микроорганизмы - всегда патогенны . Вирулентность реализуется через ряд последовательных процессов взаимодействия микробных клеток с клетками и тканями макроорганизма :

адгезивность - способность прикрепляться к клеткам ;
25 колонизационность - способность размножаться на их поверхности ;
инвазивность - способность проникать в клетки и прилежащие ткани и образование биологически активных продуктов , в том числе токсинов .

Адгезия микроорганизмов к рецепторам чувствительных клеток макроорганизма - это важнейший элемент их взаимодействия , так как если не произошло адгезии
30 микроорганизмов , то обычно они и не размножаются , а выводятся из организма . Многие микроорганизмы в процессе эволюции приобрели особые морфологические и химические структуры , которые обеспечивают адгезию . К ним относятся ворсинки и адгезины - специфические структуры (белки и углеводы) на поверхности микробной клетки , соответствующие рецепторам клеток макроорганизма .

Терминология

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

Алкилирование - введение алкильного заместителя в молекулу органического соединения. Типичными алкилирующими агентами являются алкилгалогениды, алкены, эпокси соединения, 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.

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.

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.

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 .

Стволовые клетки — недифференцированные , плюрипотентные (незрелые) клетки , имеющиеся у многих видов многоклеточных организмов . Стволовые клетки способны самообновляться , образуя новые стволовые клетки , делиться посредством митоза и дифференцироваться в специализированные клетки , то есть превращаться в клетки различных органов и тканей . Развитие многоклеточных организмов начинается с одной стволовой клетки , которую принято называть зиготой . В результате многочисленных циклов деления и процесса дифференцировки образуются все виды клеток , характерные для данного биологического вида . В человеческом организме таких видов клеток более 220 . Стволовые клетки сохраняются и функционируют и во взрослом организме , благодаря им может осуществляться обновление и восстановление тканей и органов . Тем не менее , в процессе старения организма их количество уменьшается . В современной медицине стволовые клетки человека трансплантируют , то есть пересаживают в лечебных целях . Например , трансплантация гемопоэтических стволовых клеток производится для восстановления процесса гемопоэза (кроветворения) при лечении лейкозов и лимфом .

Регенерация (восстановление) — способность живых организмов со временем восстанавливать повреждённые ткани , а иногда и целые потерянные органы . Регенерацией также называется восстановление целого организма из его искусственно отделённого фрагмента (например , восстановление гидры из небольшого фрагмента тела или диссоциированных клеток) . У протистов регенерация может проявляться в восстановлении утраченных органоидов или частей клетки . Регенерация , происходящая в случае повреждения или утраты какого - нибудь органа или части организма , называется репаративной . Регенерацию в процессе нормальной жизнедеятельности организма , обычно не связанную с повреждением или утратой части организма , называют физиологической . У человека хорошо регенерирует эпидермис , к регенерации способны также такие его производные , как волосы и ногти . Способностью к регенерации обладает также костная ткань (кости срастаются после переломов) . С утратой части печени (до 75 %) оставшиеся фрагменты начинают увеличиваться в размере благодаря увеличению размера самих клеток , но не благодаря увеличению их количества . Таким образом

печень полностью восстанавливает первоначальную массу . При определённых условиях могут регенерировать кончики пальцев . До недавних пор считалось , что нервная система не способна к регенерации , но последние исследования показали , что ЦНС обладает нейрогенезом , то есть способностью создавать новые нейроны и
5 впоследствии образовывать новые синаптические соединения .

Репаративной называют регенерацию , происходящую после повреждения или утраты какой -либо части тела . Выделяют типичную и атипичную репаративную регенерацию . При типичной регенерации утраченная часть замещается путём развития точно такой же части . Причиной утраты может быть внешнее воздействие
10 (например , ампутация) , или же животное намеренно отрывает часть своего тела (автотомия) , как ящерица , обламывающая часть своего хвоста , спасаясь от врага .

При атипичной регенерации утраченная часть замещается структурой , отличающейся от первоначальной количественно или качественно . У регенерировавшей конечности головастика число пальцев может оказаться меньше
15 исходного , а у креветки вместо ампутированного глаза может вырасти антенна (гетероморфоз) .

Фосфодиэстеразы (ФДЭ , англ . phosphodiesterase, PDE) — это группа ферментов , гидролизующих фосфодиэфирную связь (под -подкласс КФ 3.1.4). В широком смысле к ним относятся ДНКазы , РНКазы , цАМФ -фосфодиэстеразы , цГМФ -
20 фосфодиэстеразы , фосфолипаза С и фосфолипаза D. Иногда под этим термином подразумевают более узкую группу ферментов , участвующих в регуляции сигнальных путей , то есть в первую очередь цАМФ -фосфодиэстеразы и цГМФ -фосфодиэстеразы .

Ингибиторы фосфодиэстераз . Фармакологическое действие Силденафила и его
25 аналогов обусловлено специфическим конкурентным ингибированием цГМФ -ФДЭ типа 5 пещеристого тела , что приводит к повышению уровня цГМФ в ткани и последующей вазодилатации за счет увеличения высвобождения NO. Ингибиторы ФДЭ 4 типа важны для терапии хронической обструктивной болезни легких в качестве противовоспалительных агентов , модифицирующих течение заболевания . К
30 таким препаратам относятся рофлумиласт и циломиласт . Рофлумиласт известен отечественным врачам как Даксас . Другие ингибиторы ФДЭ 4: Апремиласт . Ингибиторы ФДЭ 3: Цилостазол .

Деацетилазы гистонов (англ. Histone deacetylases, HDACs), (К Ф 3.5.1) — ферменты, катализирующие удаление ацетильной группы ϵ -N-ацетил-лизина гистонов, внесенные ферментами гистонацетилазами (histone acetylases, HATs) в остатки К 3 и К 14 гистона Н3 и К 5, К 8, К 12 и К 16 гистона Н4, а также остатки некоторых лизинов гистонов Н2А и Н2В. Модифицируя гистоны и изменяя конформацию хроматина, гистондеацетилазы играют важную роль в регуляции экспрессии генов. В то время как гиперацетилирование гистонов под действием гистонацетилаз обычно связано с повышением транскрипционной активности, гистондеацетилазы вызывают гипoaцетилирование и вследствие, репрессию генов. Гипoaцетилирование приводит к уменьшению промежутка между нуклеосомой и намотанной на неё ДНК. Более плотная упаковка ДНК уменьшает её доступность для транскрипционных факторов, что приводит к транскрипционной репрессии. Обычно гистондеацетилазы действуют в составе крупных комплексов, вместе с другими белками подавляющими активность хроматина. Субстратами гистондеацетилаз могут быть не только гистоны, но и некоторые другие белки (p53, E2F, α -тубулин и MyoD). Семейство состоит из 18 белков, принадлежащих к 4-м классам. 11 представителей, принадлежащие к I (reduced potassium dependency 3 (RPD3)-подобные; HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC8), II (класс дрожжевой гистон деацетилазы 1, Hda1; не путать с HDAC1!; HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC9, HDAC10) и IV классам (HDAC11), названы «классическими» гистон деацетилазами, в то время как представители класса III названы сиртуинами. Представители I и II классов ингибируются трихостатином А (TSA, TSA), в то время как представители других классов нечувствительны к нему.

Ингибиторы гистондеацетилаз (**HDACi**). На настоящий момент существует ряд ингибиторов гистондеацетилаз, начиная со сложных соединений выделенных из бактерий и грибов (TSA, тапоксин), и кончая относительно простыми соединениями (бутират). Большинство HDACi имеют трехкомпонентную структуру, состоящую из цинк-связывающего участка, линкера и последовательностью, взаимодействующей с аминокислотными остатками у входа в активный центр HDAC. Ингибиторы классических деацетилаз функционируют путём вытеснения иона цинка из активного центра и таким образом инактивируя систему смены зарядов. TSA обладает оптимальной конформацией для попадания в активный центр, имея гидроксаматную группу и пятиуглеродный линкер перед фенильной группой. TSA

вызывает наисильнейший обратимый эффект из известных HDACi (его IC50% находится в наномолярной области). HDACi вызывают гиперацетилирование, активацию транскрипции, и по некоторым данным, активное деметилирование ДНК. Поскольку HDACi замедляют рост и приводят к дифференцировке и апоптозу раковых клеток, ведутся активные разработки по их применению для терапии рака (вориностат, ромидеписин, белиностат). HDACi индуцируют апоптоз, арест клеточного цикла, старение, дифференцировку, иммуногенность клеток и ингибируют ангиогенез при некоторых видах рака. Наиболее успешными примерами использования HDACi являются вориностат и ромидеписин у пациентов с рефракторной кожной и периферической Т-клеточной лимфомой. В соответствии с химической структурой можно выделить 4 класса HDACi - гидроксаматы, циклические пептиды, алифатические кислоты и бензамиды. Большая часть сведений об этих молекулах основана на онкологических исследованиях. К пан-HDACi (неспецифическим HDACi) в основном относятся гидроксаматы. Гидроксаматы представлены трихостатином А (TSA), который ингибирует рост клеток при раке легкого и груди и является пан-клеточным ингибитором HDAC. TSA не вошел в клиническую практику по причине нежелательных явлений - апоптоз нормальных клеток и повреждение ДНК. Суберанилогидроксиаминовая кислота (SAHA) (вориностат) также является гидроксаматом, это первый HDACi, одобренный FDA для клинического применения. Его действие приводит к активации антипролиферативных генов p21WAF1, p27 KIP1, DR5 и TNF α , и снижению активности положительных регуляторов роста: CDK2, CDK4, cyclin D1 и cyclin D2. В настоящее время исследуется множество молекул из класса гидроксаматов: есвина, LAQ-824, PXD-101, LBH-589, ITF2357, оксамфлатин, АВНА, SBНА, Scriptaid, пироксамид, SK-7041, SK-7068 и тубацин. В последнее время ставится под сомнения активность пан-HDACi в отношении HDAC класса Pa, но в результате более подробных исследований открываются «истинные» пан-HDACi, например пандакостат. Дальнейшие перспективы пан-HDACi осложняются тем, что они малоэффективны в отношении солидных опухолей, но причины этого остаются неизвестными. В настоящее время значительное внимание уделяется разработке HDACi, селективных к определенным изоформам HDAC. Тем не менее, поиски новых пан-HDACi продолжаются. Свидетельством тому являются и действия фармкомпаний: так, в сентябре 2014 года компании Servier и Pharmacyclists заключили соглашение о совместной разработке абексиностата и других

соединений . Появляются пан-HDACi «нового поколения », такие , как гивиностат , продолжают и клинические испытания «старых » HDACi, таких , как панабиностат в составе моно - и комбинированной терапии , в том числе и солидных опухолей .

5 Известна композиция (US Patent Application US20080103165A1 Ppar mediated modulation of neurogenesis), представляющая собой способы лечения заболеваний и состояний центральной и периферической нервной системы в том числе путем стимулирования или увеличения нейрогенеза , нейропролиферацией и / или нейродифференцировкой . Включает композиции и методы , основанные на
10 использовании агентов , активирующих рецепторы пероксисомы (PPAR), необязательно в сочетании с одним или несколькими другими нейрогенными агентами , для стимулирования или увеличения нейрогенного ответа и / или для лечения болезни . Фармацевтическая композиция включает модуляторы фосфодиэстеразы , гистондеацетилазы , модуляторы ГАБА -рецепторов и другие
15 вещества . Недостатком изобретения является узко специализированное назначение композиции - стимуляция нейрогенеза только через стимуляцию деления стволовых клеток -предшественников нейронов , кроме того , авторы не показали влияние указанных веществ на плюрипотентные стволовые клетки и на иммунитет . Также в композиции отсутствует комбинаторное производное дипиридамола с двумя
20 модификторами , которое позволяет заменить одновременно все известные ингибиторы фосфодиэстеразы и проявляется в комбинации способность к стимуляции как деления стволовых клеток в комбинации с ингибиторами гистондеацетилазы . Известен метод подавления вирулентности бактерий путем добавления в среду культивирования эффективных количеств фенилпропаноидных
25 ингибиторов [US Patent Application Publication US2010/0249234 A 1 Sep. 30, 2010 (Methods of reducing virulence in bacteria) Ching-Hong Yang]. Недостатком данного изобретения является явная генотоксичность добавляемого компонента и невозможность его применения в медицине . Вещество хотя и подавляло экспрессированные факторы вирулентности , но влияло исключительно на гены ,
30 причем необратимо . Такие бактерии , хотя и утрачивали факторы вирулентности , становились явными мутантами и наследовали признаки низкой вирулентности в будущих поколениях . Наша композиция не вызывает мутации , не обладает генотоксичностью . Указанные в приведенных аналогах недостатки устраняются

путем использования фармацевтической композиции на основе ингибиторов гистондеацетилазы и ингибиторов цАМФ -фосфодиэстеразы («комбинаторное производное дипиридамола с двумя модификторами, которое заменяет одновременно все известные ингибиторы фосфодиэстеразы») в комбинации с комбинаторной смесью бинарно модифицированных производных дипиридамола. Данная комбинация проявляет несколько суперэффектов: кроме стимуляции деления плюрипотентных клеток, активировать регенерацию тканей при ранениях, через омоложение тканей разглаживать морщины, модулировать иммунную систему.

Также в присутствии данной композиции резистентные бактерии утрачивают многие факторы вирулентности, становятся чувствительными к классическим антибиотикам.

Раскрытие изобретения

Целью изобретения является создание фармацевтической композиции, предназначенной для активации регенерации тканей, стимуляции деления стволовых клеток, а также обладающей способностью подавлять вирулентность микроорганизмов, что в перспективе может позволить использование данной композиции в лечении инфекционных заболеваний у людей и животных путём применения энхансеров перед курсом противомикробной терапии.

Поставленная цель достигается путем создания фармацевтической композиции, включающей ингибиторы фосфодиэстеразы, в т.ч. дипиридамол, и ингибиторы гистондеацетилазы, а также фармацевтически приемлемые вспомогательные формообразующие вещества, которая также содержит неразделенную смесь комбинаторных производных дипиридамола, полученных путем одновременной модификации как минимум двумя ковалентными модифицирующими агентами. Также в качестве ковалентных модификаторов дипиридамола могут быть использованы такие комбинации: янтарный ангидрид и монохлороуксусная кислота; малеиновый ангидрид и янтарный ангидрид; малеиновый ангидрид и монохлороуксусная кислота либо любые два модификатора из списка: уксусный ангидрид, пропионовый ангидрид, бутановый ангидрид, уксусно-пропионовый ангидрид, уксусно-будтановый ангидрид, глутаровый ангидрид, фталевый ангидрид, цис-аконитовый ангидрид, транс-аконитовый ангидрид, лимонный ангидрид, изолимонный ангидрид, ацетилхлорид,

ацетилфторид , пропионилхлорид , бутироилхлорид , этоксиоксалилмонохлорид .
Также фармацевтическая композиция может дополнительно содержать аскорбиновую кислоту в качестве антиоксиданта и бендазол в качестве ингибитора аденилатциклазы .

5 Краткое описание чертежей

Фиг .1. Схема синтеза комбинаторного производного дипиридамола (IV) в комбинаторной реакции дипиридамола (I) с двумя модификаторами (II, III).

Фиг .2. Тонкослойная хроматограмма комбинаторного производного дипиридамола (IV), исходного дипиридамола (I), полностью ацилированного дипиридамола (Ib) и полностью сукцинированного дипиридамола (Ic).

Фармацевтические композиции

Могут быть использованы различные способы введения супрамолекулярных комбинаторных производных дипиридамола (СКПД). СКПД композицию можно давать перорально или можно вводить внутрисосудистой , подкожной ,
15 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 СКПД , природы заболевания , частоты введения , способа введения , клиренса
20 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
25 многих случаях для перорального введения будет необходима более высокая доза , чем для внутривенного введения . СКПД по данному изобретению могут быть включены во множество композиций для терапевтического введения . Более конкретно , СКПД по настоящему изобретению могут быть включены в фармацевтические композиции в сочетании с подходящими фармацевтически
30 приемлемыми носителями или разбавителями и могут быть включены в препараты в твердой , полутвердой , жидкой или газообразной формах , таких как капсулы ,

порошки , гранулы , мази , кремы , пены , растворы , суппозитории , инъекции , формы для ингаляционного применения , гели , микросферы , лосьоны и аэрозоли . Как таковое , введение СКПД может быть осуществлено различными способами , включая пероральное , трансбуккальное , ректальное , парентеральное , внутрибрюшинное ,

5 внутрикожное , чрескожное , внутритрахеальное введение и так далее . СКПД по изобретению могут распределяться системно после введения или могут быть локализованы с использованием имплантата или другой композиции , удерживающей активную дозу в месте имплантации . СКПД по настоящему изобретению могут быть введены сами по себе , в комбинации друг с другом , или они могут быть

10 использованы в комбинации с другими известными соединениями (например , аскорбиновой кислотой , бендазолом , противовоспалительными агентами , и так далее) . В фармацевтических лекарственных формах СКПД могут быть введены в форме их фармацевтически приемлемых солей . Следующие способы и эксципиенты приведены лишь в качестве примеров и никоим образом не являются

15 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 ,

20 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 . СКПД могут быть

25 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 ,

30 суспендирующие агенты , эмульгаторы , стабилизаторы и консерванты . СКПД могут быть использованы в аэрозольной композиции для ингаляционного введения . СКПД 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 . СКПД 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 5 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 .

10 Сходным образом , стандартные лекарственные формы для инъекции или внутривенного введения могут содержать СКПД 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 15 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 СКПД по изобретению , располагают близко к очагу травмы , так чтобы локальная 20 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 25 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 СКПД , и эффекта , который должен быть достигнут , и фармакодинамики используемого 30 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 рН и буферные агенты , агенты для регулирования тоничности , стабилизаторы , смачивающие агенты и тому подобное . Типичные дозы

для системного введения варьируют от 0,1 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

5 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

10 данной области техники будет ясно, что уровни доз могут варьировать в зависимости от конкретного соединения, тяжести симптомов и предрасположенности субъекта к побочным эффектам. Предпочтительные дозы СКПД могут быть легко определены специалистами в данной области техники множеством способов. Предпочтительным способом является измерение

15 физиологической активности СКПД. 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

20 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

25 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.

30 Кратко, липиды и композицию для включения в липосомы, содержащую СКПД, смешивают в подходящей водной среде, подходящим образом в солевой среде, где общее содержание твердых веществ будет находиться в диапазоне приблизительно 10-20 масс.%. После интенсивного перемешивания в течение коротких периодов времени, приблизительно 5-60 сек, пробирку помещают в теплую водяную баню при

- приблизительно 25-40° С и этот цикл повторяют приблизительно 5-10 раз. Затем композицию обрабатывают ультразвуком на протяжении подходящего периода времени, обычно приблизительно 1-10 сек, и, возможно, дополнительно перемешивают на вихревой мешалке. Затем объем увеличивают добавлением водной
- 5 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.
- 10 Композиции с другими активными агентами
- В композицию, согласно формулы, могут быть включены такие ингибиторы фосфодиэстераз, как: винпоцетин, никардипин, нимодипин, ликсазион, циклостамид, милринон, цилостазол, дигидропиридазион, ролипрам, денбуфиллин, циломиласт, рофлумиласт, силденафил, арифло, варденафил, тадалафил, запринаст,
- 15 тиадиазол, папаверин, но это не ограничивает композицию указанными веществами. Также в композицию могут входить ингибиторы гистон деацетил азы: вальпроевая кислота, вальпроево-гидроксамовая кислота, циннамовая гидроксамовая кислота, фенилбутират, тубацин, вориностат, депсипептид, бутират, но это не ограничивает композицию указанными веществами. Для применения в рассматриваемых способах
- 20 СКПД по изобретению могут быть включены в композиции с другими фармацевтически активными агентами, в частности антимикробными агентами, иммуномодуляторами, противовирусными средствами, противовирусными субстанциями. Другие интересующие агенты включают широкий спектр антибиотиков, известных в данной области техники. Классы антибиотиков включают
- 25 пенициллины, например пенициллин G, 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;
- 30 сульфонамиды; хинолоны; хлорамфеникол; метронидазол; спектиномицин; триметоприм; ванкомицин; и так далее. Также полезны противогрибковые агенты, включая полнены, 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 ;

5 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 СКПД по

10 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 .

15 **Пример 1.** Получение супрамолекулярной комбинаторной смеси дипиридамола (КД)

В 50 мл диоксана в смеси с 50 мл ледяной уксусной кислоты растворяют 222 μM дипиридамола (I) (CAS N 58-32-2, $M_r = 504.636 \text{ g/mol}$, $p=4$), добавляют 60 μM янтарного ангидрида (III) и 61 μM уксусного ангидрида (II), раствор перемешивают

20 и греют с обратным холодильником 5-50 минут . Раствор переливают в ампулы и лиофилизируют для удаления растворителя и уксусной кислоты . Комбинаторную смесь (IV) используют для получения фармацевтических композиций , изучения структуры , определения биологической активности (КД). На фиг .1 приведена схема синтеза комбинаторных производных дипиридамола . 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 .

30 **Фиг . 1.**

Одна исходная молекула дипиридамола (I) содержит 4 доступных для модификации остатков гидроксильных групп ($p=4$). Аминогруппы в составе остатков

морфолина и пиридининового ядра - протонированы и защищены от модификации в данных условиях реакции .

Расчеты количества молей модификаторов ведут согласно формул комбинаторики :

- 5 $w = 4 \times (3 \times 2^{n-2} - 1)$; $k = \eta^x (2^n - 1)$, где w - количество разных производных молекул в комбинаторной смеси и количество молей дипиридамола для реакции ; n - количество доступных для модификации гидроксильных групп в структуре дипиридамола ($n = 4$); k - количество молей каждого модификатора . Таким образом , имея только одну исходную молекулу дипиридамола и два модификатора после комбинаторного
- 10 синтеза , мы получаем 12 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
- 15 структуры образуются как через водородные , так и ионные связи , в т.ч. со третичными аминогруппами гетероциклов . 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
- 20 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 ,
- 25 пропилхлорид) .

ЯМР C^{13} : C: 96,1; 161,8; 170,0; 157,8; CH_2 : 58,9; 61,7; 58,1; 61,4; 29,2; 29,1; CO: 173,1; 174,7; 170,2; CH_2 (in morpholine cycle) 52,7; 25,4; 25,5

- Данные ЯМР C^{13} комбинаторного производного подтверждают наличие как этильных групп остатков янтарной кислоты в его структуре , так и ацетильных
- 30 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 дипиридамола, так и от его полностью замещенных производных. Это свидетельствовало о том, что между разными комбинаторными производными (в нашем случае их 12) образовывались сложные супрамолекулярные структуры, не разделяемые хроматографически. Аналогично себя ведет данное комбинаторное производное (КД) и при разделении в тонком слое (ацетонитрил : вода, У Ф детекция) и дает только одну полосу, которая не совпадает ни с одним из полученных производных.

Фиг. 2.

10 Как видно из фиг. 2, ТСХ, Комбинаторная смесь (IV) менее подвижна, тогда как исходный немодифицированный дипиридамола (I) самый легкий. Полностью ацилированный дипиридамола (Ib) и сукцинилированный дипиридамола (Ic) занимают промежуточное положение между нативным дипиридамолом и комбинаторным. Полоса комбинаторного дипиридамола не разделяется ни при двумерной ТСХ, ни в 15 условиях ВЭЖХ (не приводится).

Далее проводили исследование ингибирования цАМФ-фосфодиэстеразы со стороны супрамолекулярных комбинаторных производных дипиридамола, полученных в реакции с разным мольным соотношением модификаторов по конечной концентрации АМФ методом ELISA. Реакцию останавливали добавлением 20 двукратного объема 1% ТХУ.

Таблица 1. Ингибирующая способность в отношении цАМФ-фосфодиэстеразы (ФДЕ) со стороны супрамолекулярных комбинаторных производных дипиридамола, полученных в реакции с разным 25 мольным соотношением модификаторов

№ п/п	Мольные соотношения реагентов*			ЕД ₅₀ по отношению к цАМФ, мкг/мл, ошибка измерений 10%
	m	k1	k2	
1	44	88***	88***	>500
2	-//-	70	70	100
3	-//-	61	60	0,01
4	-//-	30	30	5

5	-//-	15	15	10
6	-//-	7	7	60
7	-//-	3	3	115
8	-//-	2	2	210
9	-//-	1	1	300
10	-//-	0	0	300

* ш - количество молей дипиридамола в реакции комбинаторного синтеза ; к 1 - количество молей янтарного ангидрида в реакции ; к 2 - количество молей уксусного ангидрида в реакции ; ** ЕД 50 мкг /мл ингибирования ФДЕ , определялась разведением исходной концентрации производного дипиридамола ; ***

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

10 Как видно из таблицы 1, наименьший ЕД₅₀ наблюдается именно в области с рассчитанными мольными соотношениями модификаторов (44:61 :60). Таким образом , благодаря получению комбинаторного производного дипиридамола можно на 5 порядков снизить эффективную дозу дипиридамола для полного ингибирования ФДЕ .

15 В следующей таблице 2 приведены составы исследуемых фармацевтических композиций .

Таблица 2. Состав и соотношение ингредиентов фармацевтической композиции (Ф К К Д) на одну капсулу или таблетку

№ п/п	Наименование ингредиентов	%
1	2	3
1.	КД	0,1-20,0
2.	Папаверин	0,5-10,0
3.	Аскорбиновая кислота	0,2-10,0
4.	Бендазол	0,5-10,0
5.	Тадалафил	1-5,0
6.	Вальпроат натрия	5-20,0

7.	Вспомогательные вещества	до 100%
----	--------------------------	---------

В качестве контроля животным наносили ту же композицию с теми же веществами (в виде карбополового геля), но без КД (ФК).

Пример 2. Определение влияния композиций ФК и ФККД на регенерацию тканей

5

Изучение ранозаживляющих свойств композиций проводили на самцах белых крыс Vistar.

У 38 животных, которых предварительно анестезировали, на дорсальном боку тела, сзади правой лопатки выстригали область кожи размером 2 на 2 см. Кожу брали пинцетом, оттягивали ее, срезали фрагмент кожи размером 2 см, глубина раны 2 мм, средняя площадь раны составила $4 \pm 1,0$ см². Полученную раны многоугольной формы интенсивно кровоточили. Затем животным первой и второй групп (по 10 в каждой) на рану наносили «ФК» и «ФККД». Раны крыс 3-й группы обрабатывали «пантенолом», 4-ю группу из 8 животных составляла контрольная группа, раны этих животных не обрабатывали. Препараты наносили таким образом, чтобы образовавшиеся гели покрывали всю поверхность раны и захватывали небольшой фрагмент вокруг раны. Сверху на гель наносили клей БФ-6, высушивали и животных отпускали в клетки. Через 3, 6, 9, 11 и 13 дней от начала эксперимента (до заживления ран у животных всех групп) проводилось планиметрическое исследование, которое позволило судить об особенностях репаративных процессов. Измерение площади ран проводилось таким образом: на целлюлоидную пленку, которая прикладывалась к ране, наносили ее контуры, после чего с помощью миллиметровой бумаги определяли площадь раневой поверхности. Результаты первой серии опытов (Табл. 3) показали, что под влиянием композиции ФККД значительно ускорилось заживление ран на всех стадиях исследования, тогда как ФК незначительно ускорял заживление ран. Эффективность композиции ФККД была статистически выше, чем у композиции ФК и Пантенол.

30 Таблица 3. Показатели заживления кожных ран у крыс под влиянием композиций ФККД и ФК.

Препарат	Состав композиции	и	Площадь раны * (S)				
			за время наблюдений, см ² (M ± m)				
			1-3 сутки	3-6 сутки	6-9 сутки	9-11 сутки	11-13 сутки
ФККД	КД, папаверин, аскорбиновая кислота, бендазол, тадалафил, вальпроат натрия, карбопол и вспомогательные вещества	10	4,1±0,4	1,1±0,1	0,1±0,1	-	-
Ф К	папаверин, аскорбиновая кислота, бендазол, тадалафил, вальпроат натрия, карбопол и вспомогательные вещества	10	4,3±0,4	1,7±0,2	0,7±0,2	0,5±0,1	-
Пантенол	Карбопол	10	4,0±1,1	3,5±0,3	2,6±0,4	1,2±0,3	0,3±0,1
Контроль	-	8	4,0±0,6	3,6±0,6	2,6±0,6	1,5±0,5	0,5±0,2

* P < 0,05

Как видно из таблицы 3, фактически в 2 раза быстрее заживали раны у животных, раны которых, были обработаны композицией ФККД (с 13 до 6 суток), тогда как эффективность контрольного образца Пантенол не отличалась от контроля.

5 Эпителизация ран инициировалась уже на второй день после нанесения композиции.

Пример 3. Повышение уровней клеток -предшественников у мышей (плюрипотентных)

10 Оценивали влияние подкожного (s.c.) введения ФККД мышам СЗН/НЗ J на количество гранулоцитарно -макрофагальных (CFU-GM), эритроидных (BFU-E) и

полипотентных (КОЕГЭММ) клеток -предшественников в 1 мл крови. Для образования колоний *in vitro* предшественники стимулировали комбинацией 1 Ед/мл rhu Epo, 50 нг/мл SLE, кондиционированной средой мышиных клеток селезенки, содержащей 5% об./об. митогена лаконоса (PWMSCM), и 0,1 мМ гемина. Планшеты считали после 7 дней инкубации.

Наблюдали количество клеток -предшественников мобилизованных ФККД в зависимости от времени при однократной подкожной инъекции 5 мг/кг и результаты представлены в Таблице 4.

Таблица 4 - Абсолютное число клеток -предшественников в 1 мл крови			
	Метилцеллюлозная культура		
	CFU-GM	BFU-E	CFU-GEMM
Контроль	290,2	48,3	26,1
ФККД:15"	793,7	129,4	92,3
ФККД:33"	1803,3	210,1	116,7
ФККД:120"	830,6	103,2	50,3

10

Чтобы оценить дозозависимые эффекты, ФККД вводили в концентрации 1, 2,5, 5 и 10 мг/кг путем однократной подкожной инъекции и определяли количество предшественников в 1 мл крови за 1 час после введения, результаты представлены в Таблице 5. Максимальной мобилизации клеток -предшественников достигали при использовании дозы 2,5-10 мг/кг ФККД приблизительно через 0,5-1 час после инъекции, что показано в Таблице 6.

15

Таблица 5 . Абсолютное число клеток -предшественников в 1 мл крови			
	Метилцеллюлозная культура		
	CFU-GM	BFU-E	CFU-GEMM
Контроль	188,2	17	18
ФККД:10 мг/кг	831,7	122,7	80,9
ФККД:5 мг/кг	611,5	93,3	71,7
ФККД:2,5 мг/кг	689,7	99,9	77,2
ФККД:1 мг/кг	426	62	27,7
Предшественники			
Время	Метилцеллюлозная культура		
	GM	BFU-E	CFU-GEMM
15"	2,88	2,85	3,87
30"	6,74	4,28	4,67
2'	2,90	2,16	1,93

Мобилизация клеток -предшественников мыши при комбинировании с *MIP-1a* и *G-CSF*

- 5 Исследовали способность ФККД в комбинации с макрофагальным белком воспаления мыши (μ) (*MIP-1 α*) мобилизовать клетки -предшественники путем предварительного введения μ *G-CSF* или без него . Ранее было показано , что *MIP-1a* способствует мобилизации клеток -предшественников у мышей и человека (Broxmeyer, H.E. et al. *Blood Cells, Molecules and Diseases* (1998) 24(2): 14-30). Группы
- 10 мышей рандомизировали для введения с помощью подкожной инъекции контрольного разбавителя (физиологический раствор) или *G-CSF* в дозе 2,5 мкг на мышь дважды в день в течение двух дней . Через одиннадцать часов после последней инъекции физиологического раствора или *G-CSF* мышей делили на группы , которые получали *MIP-1a*, вводимый внутривенно в общей дозе 5 мкг , ФККД , вводимый
- 15 подкожно в дозе 5 мг/кг, или комбинацию *MIP-1 α* и ФККД в тех же дозах . Через один час мышей умерщвляли , и определяли количество клеток -предшественников в 1 мл крови . В мобилизации клеток -предшественников ФККД действовал более эффективно , чем аддитивный способ , если его применяли в комбинации с

макрофагальным белком воспаления мыши (mu) (MIP)-I α , при этом каждый вводили через 11 часов после введения rhu G-CSF или контрольного разбавителя (физиологического раствора) и за 1 час до взятия крови.

Клиническое повышение уровней клеток -предшественников

- 5 Исследование проводили на пяти здоровых волонтерах (P1-P5), имеющих исходное количество белых клеток крови от 4500 до 7500 клеток /мм³. Каждый пациент получал однократную подкожную (s.c.) инъекцию 80 мкг /кг ФККД в 0,9% физиологическом растворе из исходного раствора 10 мг/мл ФККД в физиологическом растворе в стерильных условиях. Образцы крови отбирали с
- 10 помощью катетера до введения дозы и через различные периоды времени вплоть до 24 часов после введения препарата. Образцы крови оценивали относительно общего количества белых клеток крови, CD34-позитивных клеток -предшественников (с помощью анализа FACS) как CD34-позитивных клеток -предшественников (с помощью анализа FACS) как процент общего количества белых клеток крови, а
- 15 также абсолютного количества в 1 мл и статуса в кровообращении гранулоцитарно - макрофагальных (CFU-GM), эритроидных (BFU-E) и полипотентных (КОЕГЭММ) клеток -предшественников. Как видно из таблиц 4 и 5, введение ФККД вызывало повышение количества белых клеток крови и CD34- позитивных клеток - предшественников у волонтеров, которое оказывалось максимальным через 6 часов
- 20 после введения.

Таблица 6. ФККД -индуцированная мобилизация белых клеток крови у разных волонтеров ($\times 10^3$ WBC)

ID	Тестирование	Исходные данные	Лечение, часы						
			0,5	1	2	4	6	9	12
P1	6,9	6,5	8,15	14,9	21,9	23,9	28,7	22,53	7,15
P2	6,12	5,7	6,77	8,97	16,7	19,0	19,9	21,6	9,12
P3	4,52	5,5	7,63	9,44	17,9	18,15	19,9	19,94	5,12
P4	5,17	5,29	4,25	7,73	12,7	16,13	16,8	18,5	5,16
P5	4,55	5,16	6,18	8,64	10,9	16,83	19,32	19,14	4,93

**Таблица 7. ФККД -индуцированная мобилизация CD34-позитивных клеток ,
выраженная как процент от общего количества WBC у разных волонтеров**

ID	Исходные данные	Лечение, часы				
		1	3	6	9	2
P1	,06	,03	,09	,12	,12	,09
P2	,07	,08	,09	,13	,12	,12
P3	,06	,16	,07	,08	,13	,09
P4	,06	,09	,09	,11	,10	,10
P5	,12	,12	,13	,2	,2	,16

В крови также исследовали упомянутые предшественники , активированные ФККД .
 Определяли абсолютное число неразделенных нуклеарных клеток и нуклеарных
 клеток низкой плотности в 1 мл крови (разделение в Fico-hyraque), а также
 5 абсолютное число в 1 мл и статус в круге кровообращения
 гранулоцитарномacroфагальных (CFU-GM), эритроидных (BFU-E) и полипотентных
 (КОЕГЭММ) клеток -предшественников у нормальных доноров , которым подкожно
 вводили ФККД . Вышеуказанные показатели оценивали перед введением и через 1, 3,
 6, 9 и 24 часа после введения ФККД . Все результаты относительно клеток
 10 предшественников представлены на основании оценки 3 культуральных планшетов
 на анализ на точку . Количество клеток -предшественников и статус в круге
 кровообращения , количества CFU-GM, BFU-E и КОЕГЭММ исследовали в
 метилцеллюлозных культурах при стимуляции клеток 1 Ед/мл рекомбинантного
 человеческого (rhu) эритропоэтина , 100 Ед/мл rhu гранулоцитарно -макрофагального
 15 колониестимулирующего фактора (GM-CSF), 100 Ед/мл rhu Интерлейкина -3 (IL-3) и
 50 нг/мл rhu steel-фактора (SEF=фактор стволовых клеток (SCF)). CFU-GM также
 оценивали в агаровых культурах после стимуляции 100 Ед/мл rhu GM-CSF и 50 нг/
 мл rhu SLE. В обоих типах исследований колонии оценивали после 14 часов
 инкубации в увлажненной атмосфере с 5% CO₂ и пониженном (5%) давлении O₂.
 20 Статус клеток -предшественников в круге кровообращения определяли , используя
 высокоспецифичный цитолитический способ , по активности [3H]-тимидина , как
 описано ранее (Broxmeyer, H.E. et al. Exp. Hematol. (1989) 17:455-459. Результаты
 представляли сначала как среднее суммарное изменение в абсолютном количестве
 нуклеарных клеток и предшественников за 1, 3, 6, 9 и 24 часа по сравнению с их

количеством до инъекции (=Время (Т)0) для всех пяти доноров, что представлено в таблицах 8-10. В таблицах ниже: STD - Стандартное отклонение; STE - Стандартная ошибка; PBL-US - периферическая кровь - неразделенная; PBL-LD - периферическая кровь - низкая плотность (разделение в Ficoll); P - Значимость с использованием 2-параметрического t-теста.

Таблица 8. Суммарное изменение, сравниваемое с периодом временем=0 (Средняя величина из 5 клонов)														
	Содержание нуклеарных клеток													
	PBL-US					PBL-LD								
	Сред- нее	ST D	ST E	%CHG	P	Сред- нее	ST D	STE	% C H G	P				
T=0	1,00	0,00	0,00	0,0		1,00	0,0 0	0,00	0,0					
T=1	1,69	0,00	0,00	68,6	0,0 17	1,86	0,0 0	0,00	86, 2	0,000				
T=3	2,80	0,51	0,23	180,2	0,0 00	2,86	0,2 8	0,12	18 5,6	0,000				
T=6	3,26	0,61	0,27	225,8	0,0 00	3,66	0,4 3	0,19	26 6,3	0,001				
T=9	3,09	0,69	0,31	209,4	0,0 00	3,64	1,1 8	0,53	26 4,3	0,001				
T=2 4	1,07	0,65	0,29	7,0	0,5 53	1,05	1,1 9	0,53	4,6	0,815				
Метилцеллюлозная культура														
	CFU-GM					BFU -E					CFU-GEMM			
	Средни й	ST D	STE	%C HG	P	Сред ний	STD	STE	%C HG	P	Сред ний	STD	ST E	%CH
T=0	1,00	0,00	0,00	0,0		1,00	0,00	0,00	0,0		1,00	0,00	0,0 0	0,0

T=1	4,77	0,00	0,00	376,70	0,01	1,99	0,00	0,00	98,90	0,02	2,32	0,00	0,00	131,80
T=3	13,52	1,55	0,72	1242,35	0,01	3,21	0,50	0,22	221,30	0,04	4,33	0,44	0,20	332,50
T=6	21,77	5,58	2,58	2079,66	0,00	6,01	1,25	0,56	500,50	0,06	10,07	0,59	0,27	907,20
T=9	10,41	5,11	2,29	952,30	0,00	4,34	2,99	1,34	334,40	0,00	5,25	4,54	2,03	425,40
T=24	1,48	3,11	1,34	55,50	0,05	1,26	1,02	0,45	26,39	0,14	1,53	3,04	1,36	53,20

В таком случае результаты представлены как суммарное изменение от уровней T=0 для каждого индивидуального донора, как показано в таблицах 8-10.

5

Таблица 9 Суммарное изменение, сравниваемое с периодом временем=0 для каждого индивидуального пациента (P)

	Содержание нуклеарных клеток									
	PBL-US					PBL-LD				
	P1	P2	P3	P4	P5	P1	P2	P3	P4	P5
T=0	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
T=1	2,54	1,38	1,38	1,36	1,76	2,07	1,99	1,48	1,66	2,10
T=3	3,55	2,74	2,02	2,46	3,23	2,83	3,25	2,17	2,82	3,20
T=6	3,97	2,94	2,74	2,60	4,04	4,07	3,90	2,27	2,78	5,30
T=9	3,27	3,30	2,69	2,24	3,96	3,65	4,43	2,47	2,48	5,17
T=24	1,21	1,43	0,96	0,77	0,99	1,01	1,71	0,79	0,60	1,12

Таблица 10 Предшественники

Метилцеллюлозная культура		
CFU-GM	BFU-E	CFU-GEMM

	P1	P2	P3	P4	P5	P1	P2	P3	P4	P5	P1	P2	P3	P4	P5
T=0	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
T=1	5,09	5,33	3,70	6,87	2,84	2,58	1,46	2,30	1,46	2,13	2,07	2,26	2,22	1,96	3,07
T=3	7,12	17,02	15,07	20,72	8,40	5,13	1,98	2,61	2,60	3,75	4,25	3,47	4,34	5,14	4,43
T=6	14,66	23,96	20,99	28,54	20,39	9,14	3,67	4,54	3,34	9,35	7,47	9,35	6,52	9,10	17,92
T=9	6,26	12,51	9,42	14,08	10,09	5,43	4,61	3,71	2,93	5,05	2,64	7,09	2,47	4,52	9,55
T=24	1,10	1,91	1,43	1,51	1,83	1,06	1,88	1,14	0,79	1,44	1,12	2,62	0,69	0,98	2,25

Как видно из таблиц, представленных выше, применение композиции ФККД значительно увеличивает количество всех исследованных классов плюрипотентных клеток в крови добровольцев уже через 6 часов после начала применения композиции.

Пример 4. - Редукция вирулентности *P. aeruginosa* под влиянием ФККД на примере подавления адгезивных свойств

Известно, что адгезия микроорганизмов - первый этап колонизации, главный и определяющий фактор их вирулентности и патогенности. С помощью адгезинов микробы распознают рецепторы на мембранах клеток, прикрепляются к ним и колонизируют различные поверхностные структуры клеточной стенки. Способность бактерий к адгезии и колонизации поверхностей закреплена естественным отбором. Эта функция необходима бактериям при сапрофитном существовании. Например, легионеллы активно прикрепляются к поверхности цианобактерий, холерные вибрионы активно колонизируют зоопланктон, хитин которых используется ими как источник питания и стимулирует размножение холерных вибрионов. Изучение адгезии микроорганизмов имеет особое значение для медицинской микробиологии, получившее клиническое подтверждение: установлено, что при отсутствии адгезинов, ни бактерии, ни грибы не могут расти и формировать колонии, а если нет колонизации, то нет инфекции и болезни.

Адгезия бактериального патогена может осуществляться к компонентам внеклеточного матрикса - фибронектина, коллагена, ламинину и др. Матриксные белки имеют последовательность RGD, с которой взаимодействуют интегрины клеточной поверхности. Тем самым белки внеклеточного матрикса способствуют прилипанию бактерий к клеткам-мишеням хозяина. Адгезия бактерий к таким

белкам носит специфический характер и каждый патоген реализует эту возможность по-своему. Для проявления патогенности некоторых бактерий критическое значение имеет их взаимодействие с матричными белками.

Большинство грамотрицательных бактерий прикрепляются к эпителиальным клеткам человека и животных с помощью адгезинов, представляющих собой особые органеллы. Многие патогенные микроорганизмы способны проникать в клетки хозяина и активно в них размножаться. Для проникновения в клетки бактерии используют адгезивные молекулы, названные инвазины. Самый распространенный механизм включает активацию сигналов в клетке хозяина, позволяющих инвазию бактерий с помощью запуска нормальных клеточных реакций.

Учитывая наличие веществ, которые способны влиять на проявление адгезивности, прослеживается возможность направлять их действие на предотвращение развития инфекционного процесса. Одним из способов блокировки механизмов адгезии является использование антибактериальных препаратов в низких концентрациях, ингибирующих процесс закрепления патогенов в зоне первичного инфицирования. С этой целью возможно применение и специфических бактериофагов, а также использовать при разработке вакцин.

Для определения адгезивных свойств микроорганизмов наиболее удобная модель, в которой в качестве клеток макроорганизма используют эритроциты человека. Увеличение биомассы клеток под воздействием энхансеров приводит к изменению некоторых биохимических тестов. Одним из них является адгезивные свойства микроорганизмов (табл. 11)

Таблица 11.- Сравнительные адгезивные свойства (ИА) *P.aeruginosa* в присутствии ФККД

ФККД, %	Индекс адгезии(ИА)		
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 12-76
0,01±0,005	2,6±0,3*	3,4±0,2*	3,5±0,3*
0,001±0,0005	1,8±0,2*	1,4±0,2*	1,7±0,4*
Контроль	3,2±0,3	3,1±0,3	3,2±0,3

Примечания : * - разница показателей статистически достоверна (p < 0,05)

Как свидетельствуют данные определения степени адгезии по ИА при культивировании *P. aeruginosa* на средах с ФККД, которые приведены в табл. 11, индексы адгезии отличались от показателей контроля. Композиция ФККД в пересчете на комбинаторный дипиридабол в концентрации $0,001 \pm 0,0005$ % способствовала снижению адгезивной активности штаммов синегнойной палочки до $(1,4 \pm 0,3) - (1,8 \pm 0,4)$. Среднеадгезивные штаммы под влиянием ФККД становились низкоадгезивными. Индекс адгезии составлял $(1,4 - 1,7)$ против $(3,1 - 3,2)$ при выращивании на среде без добавления ФККД.

В результате статистической обработки данных табл. 11 было показано, что различия между индексами адгезии штаммов, культивируемых на средах с ФККД в концентрациях от $0,001 \pm 0,0005\%$ до $0,01 \pm 0,005\%$ и контролем статистически значимы. Это свидетельствует об эффективности использования ФККД в концентрации от $0,001 \pm 0,0005\%$ до $0,1 \pm 0,05\%$ для снижения адгезивной активности микроорганизмов.

15

Пример 5. Редукция вирулентности *P. aeruginosa* под влиянием ФККД на примере восстановления чувствительности бактерий к антибиотикам (зоны задержки роста на твердой питательной среде)

Исследования проводят *in vitro* диско-диффузионным методом на штаммах *P. Aeruginosa*, указанных в предыдущих опытах. Готовят параллельно два ряда чашек, содержащих агар Мюллера-Хинтона, причем в чашки второго ряда вводят $0,01-0,005\%$ раствор ФККД. После этого на поверхность агара засевают бактерии исследуемых штаммов из суспензии, содержащей 10^8 м.к.л./мл. Для этого готовят бактериальную взвесь, соответствующую концентрации 10^9 м.к.л./мл по оптическому стандарту мутности 10 ед., которую разводят физиологическим раствором в 10 раз (до 10^8 м.к.л./мл). После впитывания суспензии в агар на его поверхность накладывают диски с полимиксином, цефтриаксоном, левофлоксацином, амикацином, имипинемом (также при дополнительных пассажах вводили цефазолин и амоксициллин, но чувствительность к ним не появлялась). В качестве контролей служат посевы на чашки со средой, не содержащей ФККД, и среды, на которые диски не накладывают. Посевы инкубируют в течение 48 часов при 37°C в одном пассаже, затем проводят пересев в аналогичных условиях на следующие пассажи. Всего проводили 4 пассажа с контролями. Результаты учитывают по диаметру зон

задержки роста бактерий . На среде без ФККД зоны задержки отсутствуют (показатель устойчивости бактерий к антибиотику), тогда как на среде , содержащей 0,005-0,01% ФККД , вокруг дисков формируется зона ингибирования роста бактерий от 25 до 40 мм в диаметре (появление чувствительности к антибиотику).

5 В результате исследований было обнаружено , что на среде без ФККД зона подавления роста бактерий вокруг дисков с полимиксином и амикацином отсутствуют . При введении в состав среды (0,005-0,01)% ФККД (чашка 2) вокруг дисков с полимиксином и амикацином появляется зона ингибирования роста бактерий , свидетельствующая о повышении чувствительности бактерий к
10 антибиотику . К антибиотикам , к которым у синегнойной палочки генетически обусловленная (изначальная) антибиотикорезистентность , зоны задержки роста не наблюдались . Таким образом , композиция ФККД способна статистически достоверно ингибировать приобретенную антибиотикорезистентность у синегнойной палочки .

15 Аналогичные исследования были проведены для мультирезистентных госпитальных штаммов *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *S. aureus*. Во всех случаях , чувствительность бактерий к антибиотикам восстанавливалась на 3-4 пассаже и не отличалась от аналогичных ATCC -штаммов .

20 Пример 6. Редукция вирулентности *P. aeruginosa* под влиянием ФККД на примере восстановления чувствительности бактерий к антибиотикам (задержка роста в жидкой питательной среде, определение изменений МПК)

Исследование проводят на штаммах *P.aeruginosa*, приведенных в предыдущих примерах - методом серийных разведений *in vitro* с использованием ФККД .
25 Оценивают снижение устойчивости штаммов синегнойной палочки к амикацину и полимиксину . Готовят два ряда чашек с питательной средой Мюллера -Хинтона : 1-й ряд содержит различные концентрации исследуемого антибиотика (амикацина и полимиксина) - 31, 62, 125, 250, 500 мкг /мл среды (двукратные разведения). Параллельно готовят такой же ряд чашек , но в среду дополнительно вводят ФККД в
30 концентрации (0,0001-0,001)%. На чашки засевают по 0,05 мл (капля) исследуемого штамма из бактериальной взвеси , содержащей 10^8 м.кл./мл по оптическому стандарту мутности 10 ед. В качестве контролей используют среду Мюллера -Хинтона без антибиотика и среду Мюллера -Хинтона , содержащую 0,0001% ФККД без антибиотика . Посевы инкубируют при 37°C в течение 48 ч. Результаты

учитывают по величине МПК (минимальная подавляющая концентрация) при обязательном росте бактерий на контрольных чашках (см. таблицу 12). Из таблицы видно , что при воздействии на бактерии ФККД возбудитель псевдомонозов снижает резистентность к исследуемым антибиотикам в 10 раз .

5

Таблица 12.- Определение степени восстановления чувствительности мультирезистентных нозокомиальных возбудителей под действием композиции ФККД в разных концентрациях

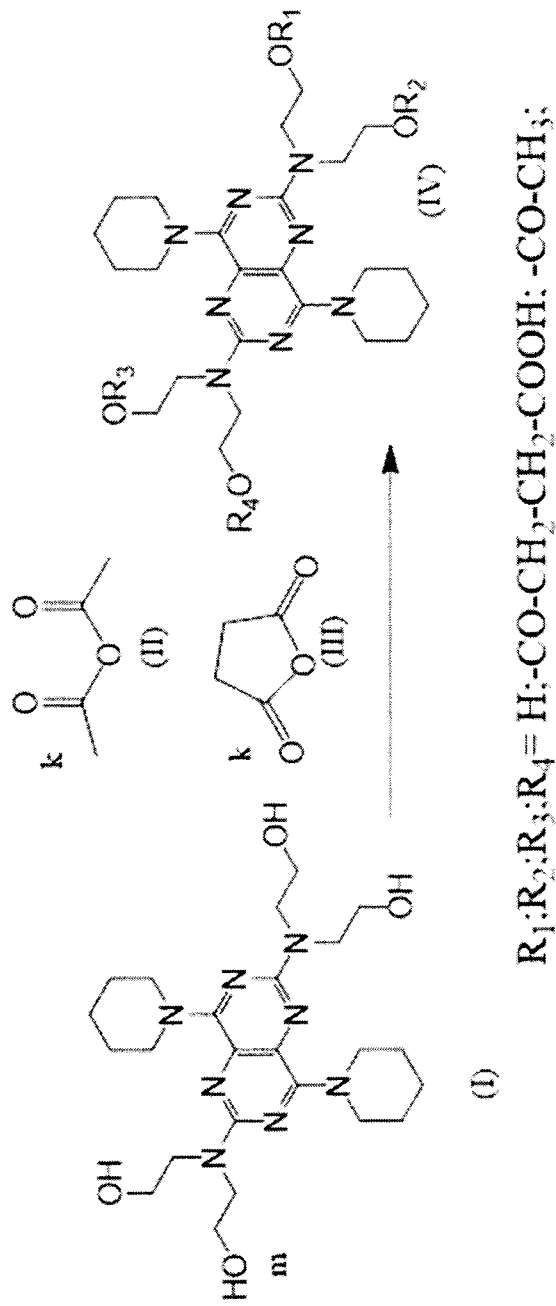
Штаммы	ФККД, %	Противомикробные средства (МПК, мкг/мл)				
		Полимикс ин	Амикац ин	Цефтриакс он	Левифлоксацин	Имипинем
<i>P. aeruginosa</i> IMI-2016	Контроль (без ФККД)	250	>500	>500	>500	>500
	ФККД 0,001	31	15	250	125	250
	ФККД 0,0001	125	125	500	250	125
<i>A. baumannii</i> IMI-2016	Контроль (без ФККД)	>500	>500	>500	>500	>500
	ФККД 0,001	31	15	250	125	250
	ФККД 0,0001	62	125	125	62	31
<i>K. pneumoniae</i> IMI-2016	Контроль (без ФККД)	>500	>500	>500	>500	>500
	ФККД 0,001	62	31	125	125	250

	ФККД 0,0001	125	62	250	250	125
--	----------------	-----	----	-----	-----	-----

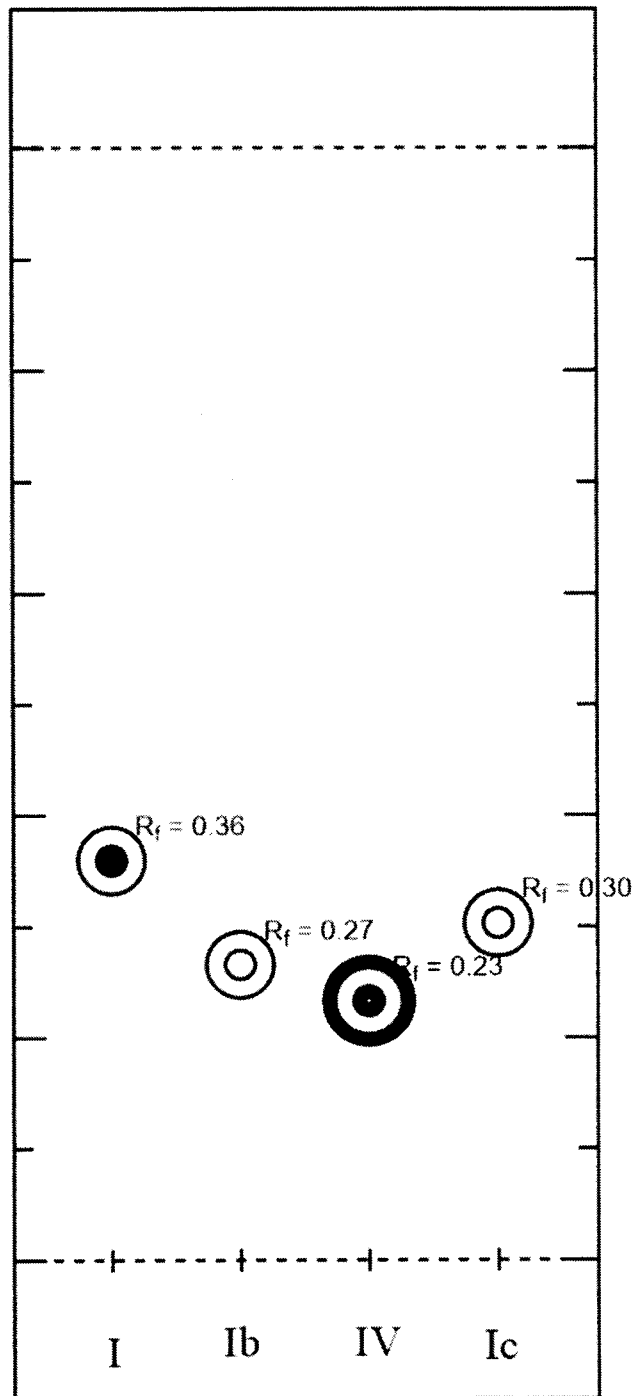
Как видно из таблицы 12, чувствительность к антибиотикам возрастала в 33 раза для амикацина и синегнойной палочки и в 16 раз для полимиксина и синегнойной палочки. Для ацинетобактера и клебсиеллы наблюдалась схожая картина. Хотя 5 чувствительность к другим антибиотикам также возрастала в 2-4 раза, но их концентрация не уменьшалась до значений, перспективных для применения в клинике. Таким образом, применение композиции ФККД является перспективным для восстановления чувствительности к антибиотикам у мультирезистентных штаммов микроорганизмов.

Формула изобретения

1. Фармацевтическая композиция , предназначенная для активации регенерации тканей , стимуляции деления стволовых клеток и подавления вирулентности бактерий , включающая ингибиторы гистондеацетилазы , дипиридамола и другие ингибиторы фосфодиэстеразы , а также фармацевтически приемлемые вспомогательные формообразующие вещества , отличающаяся тем , что дополнительно содержит неразделенную смесь комбинаторных производных дипиридамола , полученных путем одновременной модификации как минимум двумя ковалентными модифицирующими агентами .
2. Фармацевтическая композиция по п.1., отличающаяся тем , что в качестве ковалентных модификаторов дипиридамола используют янтарный ангидрид и монохлороуксусную кислоту .
3. Фармацевтическая композиция по п.1., отличающаяся тем , что в качестве ковалентных модификаторов дипиридамола используют малеиновый ангидрид и янтарный ангидрид .
4. Фармацевтическая композиция по п.1., отличающаяся тем , что в качестве ковалентных модификаторов дипиридамола используют малеиновый ангидрид и монохлороуксусную кислоту .
5. Фармацевтическая композиция по п.1., отличающаяся тем , что в качестве ковалентных модификаторов дипиридамола могут быть использованы любые два модификатора из списка : уксусный ангидрид , пропионовый ангидрид , бутановый ангидрид , уксусно - пропионовый ангидрид , уксусно - бутановый ангидрид , глутаровый ангидрид , фталевый ангидрид , цис - аконитовый ангидрид , транс - аконитовый ангидрид , лимонный ангидрид , изолимонный ангидрид , ацетилхлорид , ацетилфторид , пропионилхлорид , бутироилхлорид , этоксиоксалилмонохлорид .
6. Фармацевтическая композиция по п.1., отличающаяся тем , что дополнительно содержит аскорбиновую кислоту
7. Фармацевтическая композиция по п.1., отличающаяся тем , что дополнительно содержит бендазол



Фиг.1



Фиг.2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/RU 2017/000851

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/505 (2006.01); C40B 50/04 (2006.01); C40B 50/08 (2006.01); A61P 43/00 (2006.01)

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 31/505, A61P 43/00, C40B 50/04, 50/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

PatSearch (RUPTO internal), Esp@cenet, PAJ, USPTO, Information Retrieval System of FIPS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2013/100792 A1 (MARTYNOV ARTUR VIKTOROVICH et al.) 04.07.2013, points 1-3 of the claims	1-7
Y	Dipiridamol forma vypuska. 10.09.2017 [on line] [retrieved on 17.07.2018] Found on Internet: < http://visexep.mcartur.ru/zaym/dipiridamol-forma-vipuska.php?utm_source=www.google.ru >	1-7
Y	KAZACHENKO K.JU. Poluchenie i perspektivy primeneniya geneticheski modifitsirovannykh pljuripotentnykh stvolovykh kletok. Klinicheskaya praktika, 2013, N°2, p. 62, col. 2	1-7
Y	LIN Wenwei et al. Synthesis, Flow Cytometric Evaluation, and Identification of Highly Potent Dipyridamole Analogues as Equilibrative Nucleoside Transporter 1 inhibitors. J. Med. Chem. 2007 50 . 3906-3920 c. 3907 schema 2	1-7



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

04 July 2018 (04.07.2018)

Date of mailing of the international search report

09 August 2018 (09.08.2018)

Name and mailing address of the ISA/
RU

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/RU 2017/000851

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LEE Hong-Kee et al. Combinatorial Mixture Synthesis and Biological Evaluation of Dihydrophenyl Triazine Antifolates. <i>Bioorganic & Medicinal Chemistry</i> , 1999, 7, pp. 1255-1262, the abstract, p. 1257-1258, fig. 1, table 1-3	1-7
Y	EA 023447 B1 (FARBER BORIS SLAVINOVICH et al.) 30.06.2016, p. 2, points 8-10 of the claims	2-5
Y	WO 2012/112566 A1 (ALLERGAN, INC. et al.) 23.08.2012, par. [0030], [0077]	6
Y	WO 2006/083779 A2 (MYLAN LABORATORIES, INC. et al.) 10.08.2006, par. [0094]	7

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ А 61К 31/505 (2006.01) С40В 50/04 (2006.01) С40В 50/08 (2006.01) А 61Р 43/00 (2006.01)		
Согласно Международной патентной классификации МИК		
В. ОБЛАСТЬ ПОИСКА Проверенный минимум документации (система классификации с индексами классификации) А 61К 31/505, А 61Р 43/00, С40В 50/04, 50/08		
Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в поисковые подборки		
Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины) PatSearch (RUPTO internal), Esp@cenet, PAJ, USPTO, Information Retrieval System of FIPS		
С. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ:		
Категория*	Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
Y	WO 2013/100792 A1 (МАРТЫНОВ АРТУР ВИКТОРОВИЧ и др.) 04.07.2013, пп. 1-3 формулы	1-7
Y	Дипиридабол форма выпуска. 10.09.2017 [онлайн] [найдено 17.07.2018] Найдено из интернет: < http://visexep.mcartur.ru/zaym/dipiridamol-forma-vipuska.php?utm_source=www.google.ru >	1-7
Y	КАЗАЧЕНКО К.Ю. Получение и перспективы применения генетически модифицированных плюрипотентных стволовых клеток. Клиническая практика, 2013, №2, с. 62, кол. 2	1-7
Y	LIN Wenwei et al. Synthesis, Flow Cytometric Evaluation, and Identification of Highly Potent Dipyridamole Analogues as Equilibrative Nucleoside Transporter 1 inhibitors. J. Med. Chem., 2007, 50, pp. 3906-3920, с. 3907, схема 2	1-7
<input checked="" type="checkbox"/> последующие документы указаны в продолжении графы С. <input type="checkbox"/> данные о патентах-аналогах указаны в приложении		
* “А” “Е” “L” “O” “P”	Особые категории ссылочных документов: документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее документ, подвергающий сомнению притязание(я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано) документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию и т.д. документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета	“T” более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение “X” документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности “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 “&” документ, являющийся патентом-аналогом
Дата действительного завершения международного поиска 04 июля 2018 (04.07.2018)		Дата отправки настоящего отчета о международном поиске 09 августа 2018 (09.08.2018)
Наименование и адрес ISA/RU: Федеральный институт промышленной собственности, Бережковская наб., 30-1, Москва, Г-59, ГСП-3, Россия, 125993 Факс: (8-495) 531-63-18, (8-499) 243-33-37		Уполномоченное лицо: В. Соловьева Телефон № (495)531-64-81

С. (Продолжение). ДОКУМЕНТЫ СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕВАЛЕНТНЫМИ		
Категория*	Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
Y	LEE Hong-Kee et al. Combinatorial Mixture Synthesis and Biological Evaluation of Dihydrophenyl Triazine Antifolates. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 1999, 7, pp. 1255-1262, реферат, с. 1257-1258, фиг. 1, табл. 1-3	1-7
Y	EA 023447 B1 (ФАРБЕР БОРИС СЛАВИНОВИЧ и др.) 30.06.2016, с. 2, пп. 8-10 формулы	2-5
Y	WO 2012/112566 A1 (ALLERGAN, INC. et al.) 23.08.2012, параграфы [0030], [0077]	6
Y	WO 2006/083779 A2 (MYLAN LABORATORIES, INC. et al.) 10.08.2006, параграф [0094]	7