

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **037262**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.03.01

(21) Номер заявки
201791122

(22) Дата подачи заявки
2015.11.20

(51) Int. Cl. **A61K 31/00** (2006.01)
A61P 39/02 (2006.01)

(54) СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ОТРАВЛЕНИЙ, ВЫЗВАННЫХ УКУСАМИ ЯДОВИТЫХ ЗМЕЙ

(31) 62/082,895; 62/131,441; 62/243,374

(32) 2014.11.21; 2015.03.11; 2015.10.19

(33) US

(43) 2018.04.30

(86) PCT/US2015/061834

(87) WO 2016/081826 2016.05.26

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ОФИРЕКС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Левин Мэттью Р. (US)

(74) Представитель:
Виноградов С.Г. (BY)

(56) US-A1-20140087003

RUCAVADO A. et al. Effect of the metalloproteinase inhibitor batimastat in the systemic toxicity induced by Bothrops asper snake venom: understanding the role of metalloproteinases in envenomation. Toxicon., 2004 Mar 15; 43(4), p. 417-424, especially abstract

CLARK J.D. et al. Potential therapeutic uses of phospholipase A2 inhibitors. Expert Opinion on Therapeutic Patents, 2004, Vol. 14, no. 7, p. 937-950, especially p. 937, 940

WO-A1-2014039920

TRINH H.H. et al. Use of CROFAB® antivenin in the management of a very young pediatric copperhead nvenomation. The Journal of Emergency Medicine, 2005, Vol. 29, no. 2, pp. 159-162, especially abstract

(57) Изобретение предусматривает применение ингибитора PLA2, при котором ингибитор PLA2 представляет собой вареспладиб, метилвареспладиб, 9-[(фенил)метил]-5-карбамоилкарбазол-4-ил)оксиуксусную кислоту или их фармацевтически приемлемую соль или их смесь, для лечения субъекта, страдающего от отравления, вызванного укусом ядовитых змей. При этом изобретение также предусматривает способы лечения субъекта, страдающего от отравления, вызванного укусом ядовитых змей, включающие введение ингибитора PLA2 субъекту по отдельности или в комбинации с терапевтически эффективным количеством одного или нескольких веществ, выбранных из ингибитора металлопротеиназы, ингибитора сериновой протеазы, противоядия, неостигмина, ингибитора фактора распространения, антагониста рецептора NMDA, ингибитора ацетилхолинэстеразы, ингибитора L-аминоксидазы, ингибитора гиалуронидазы и др.

B1

037262

037262

B1

Перекрестные ссылки на родственные заявки

По настоящей заявке испрашивается приоритет на основании предварительных заявок США № 62/082895, под названием "Venom Neutralizing Drug Combinations for the Treatment of Snake bite in and Outside the Hospital Setting", поданной 21 ноября 2014 г., № 62/131441 идентичного названия, поданной 11 марта 2015 г., и № 62/243374 также идентичного названия, поданной 19 октября 2015 г. Полное раскрытие каждой из вышеупомянутых заявок включено в настоящую заявку посредством ссылки во всей своей полноте во всех отношениях.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к способам для лечения отравлений, вызванных укусами ядовитых змей, и находит применение в области медицины, здравоохранения и ветеринарной медицины.

Предпосылки к созданию изобретения

Яды животного происхождения являются разновидностью ядов, имеющих простые или сложные композиции, и они обычно впрыскиваются ядовитыми зубами, жалом, иглой или метательным элементом, содержащими токсины, чтобы обездвигать или убить жертву, или как средство защиты против хищников или соперников. Яд обычно попадает в организм жертвы при укусе или при уколе жалом (вводе заостренной конечности ядовитого животного). Несмотря на то, что многие яды животного происхождения вызывают только дискомфорт, некоторые яды животного происхождения являются высокотоксичными и могут привести к смерти жертвы, ампутации конечности или постоянному обезображиванию. К категории ядовитых животных относятся беспозвоночные (например, пауки "черная вдова", кубовая медуза и улитки конус), рыбы (например, бородавчатка и другие представители семейства скорпеновых (Scorpaenidae)) и рептилии (например, змеи и ядозубы). Следует отметить, что укусы ядовитых змей являются проблемой общественного здравоохранения во многих странах, и случаи отравления змеиным ядом имеют место на всех континентах за исключением Антарктики. По всему миру ежегодно регистрируется более пяти миллионов случаев укусов змей в год, из указанного числа более 400000 случаев приводят к серьезным последствиям. В результате укуса змей число смертельных случаев составляет приблизительно 125000, при этом число случаев укусов змей, приводящих к постоянной инвалидности, намного выше. По оценкам, ежегодно в Индии погибает более 40000 человек (главным образом, людей молодого возраста) от укусов змей. В Соединенных Штатах ежегодно регистрируется около 8000 укусов ядовитых змей и более 1500 случаев отравлений от укусов змей, имеющих высоко нейротоксичный яд в Австралии, несмотря на отсутствие гадюк на континенте. См. Alirol et al., 2010, "Snakebite in South Asia: A Review" PLoSNegl Trop Dis. 4(1): e603; и Kasturiratne et al., 2008, "The global burden of snakebite: a literature analysis and modeling based on regional estimates of envenoming and deaths", PLoS Med. 5:e218.

Яд змей широко различается по своему составу, и такие различия являются как внутривидовыми, так и межвидовыми, тем самым ограничивая перекрестную реактивность противоядий в отношении змеиных ядов, для которых они предназначены, и более того, отдалили змей филогенетически от общего предка с точки зрения создания противоядия. Различия между ядами могут иметь серьезные последствия для жертв укусов змей в силу того, что яды нейтрализуют специфические антитела, содержащиеся в противоядиях, делая их неэффективными против гетерологических токсинов, содержащихся в различных ядах животного происхождения. Casewell, et al., "Medically important differences in snake venom composition are dictated by distinct postgenomic mechanisms", Proceedings of the National Academy of Sciences 111.25 (2014): 9205-9210. Широкое разнообразие составов и внешних структурных особенностей змеиных ядов даже в рамках одного и того же вида змей или даже одной и той же отдельной змеи не позволяет разработать противоядие, которое было бы эффективным против широкого спектра змеиных ядов.

Многие яды змей включают компоненты, прерывающие ацетилхолиновую передачу сигнала между нервами и мышцами, парализуя скелетные мышцы, нарушая такую передачу и разрушая нервные окончания, тем самым исключая эффективность всех методов лечения кроме специализированной реаниматологической помощи. Многие яды змей разрушают мышцы, соединительные ткани и кожу, в то время как другие вызывают тяжелые и зачастую летальные нарушения, обусловленные кровотечением и свертываемостью крови, или имеется сочетание всех указанных эффектов (например, яды многих аспидовых змей, таких как яды коралловой змеи, тайпана, кобр и гадюк, таких как гадюка Рассела, европейская гадюка, и гремучей змеи, как правило, являются одновременно гемо/цитотоксичными и нейротоксичными). Яды змей зачастую представляют собой сложные смеси ферментных и неферментных токсинов, характеризующиеся различными механизмами воздействия, сочетающимися, например, нейротоксичность с гемо- или миотоксичностью.

Несмотря на то, что в некоторых случаях имеются противоядия, их эффективность при лечении жертв укусов змей может быть ограниченной в силу ряда причин. Во-первых, состав ядов даже у одного и того же вида змей может существенно различаться, а также действие яда даже отдельной змеи того вида в зависимости от потребляемой ею пищи и места ее обитания. Змеи одного и того же вида, разделенные лишь географически, могут иметь яд, существенно различающийся по составу: так, например, виды змей в одном регионе Индии (например, гадюка Расселла (*Daboia russelli*)) убивают свою жертву, в основном, за счет нарушения свертываемости крови, в то время как в другом регионе Индии яд этих змей

является более нейротоксичным. Аналогичным образом, состав яда европейской гадюки (например, *Viper berus*) может различаться до такой степени, что в некоторых случаях яд является более нейротоксичным, в то время как в других случаях цито-гемотоксичным. В Северной Америке при частоте рецидивов признаков и симптомов после проведения начального курса лечения с использованием противоядия требуется более высокая периодичность повторного лечения, которая варьируется в зависимости от региона. Во многих случаях при отсутствии поливалентного противоядия исключительно важно определить вид змеи в целях применения соответствующего противоядия, однако даже правильное определение вида змеи не гарантирует того, что данное противоядие было разработано. В этом случае используют максимально близко соответствующее, или "параспецифическое" противоядие в качестве наиболее эффективной аппроксимации, однако зачастую такое противоядие является неэффективным, вызывая при этом осложнения и приводя к серьезным финансовым затратам.

Во-вторых, в ряде случаев, таких как с североамериканскими коралловыми змеями (моноспецифическая сыворотка) или африканскими змеями (поливалентная сыворотка), противоядие было изъято с рынка. На африканском континенте к югу от Сахары указанные важные коммерческие препараты стали дефицитом ввиду того, что производители решили прекратить их выпуск. В 2015 г. организация "Врачи без границ" разместили в своем глобальном "Wishlist" (Facebook) информацию о необходимости повышения доступности к средствам лечения от укуса змей, и мировые новостные агентства сообщили, что на большей части африканского континента прекратится применение эффективных методов лечения с применением противоядия к 2016 г., при этом было заявлено, что (например, в пресс-релизах международной медицинской организации "Врачи без границ" от 4 и 8 сентября 2015 г.) "десятки тысяч людей будут продолжать умирать от змеиных укусов, если мировое медицинское сообщество не примет меры для обеспечения доступных средств лечения и противоядия".

В-третьих, и, возможно, самое главное, даже если был определен источник яда и существует соответствующее противоядие, вероятность того, что жертва будет иметь легкий доступ к противоядию чрезвычайно низка или противоядие является слишком дорогостоящим, в результате чего жертвы будут скорее рисковать умереть, чем искать дорогую медицинскую помощь. По оценкам более 75% смертельных случаев от укуса змей происходит за пределами лечебного учреждения, зачастую в месте проведения сельскохозяйственных работ. Большинство противоядий имеют короткий срок годности, и обычно они отсутствуют за пределами лечебного учреждения, ввиду требования наличия "холодовой цепи" и высокой частоты проявления тяжелых нежелательных реакций, при возникновении которых требуется либо профилактическая, либо неотложная помощь (например, в случае анафилаксии). Более того, поскольку укусы ядовитых животных часто случаются в отдаленных местах, вдали от населенных центров, маловероятно, что у жертвы будет возможность добраться до больницы вовремя и получить необходимое лечение после того, как симптомы уже проявились. В-третьих, противоядие не может эффективно проникать через уже поврежденные ядом ткани, поскольку физические свойства тромбов и некротической ткани не позволяют это сделать, и противоядие может только нейтрализовать циркулирующий яд или то, с чем он напрямую контактирует иным путем. Противоядие обычно считается неэффективным при установлении индуцированной нейротоксичной патологии из-за его неспособности проникновения в ткани периферической и центральной нервной систем. Скорее реанимационные мероприятия, такие как механическая вентиляция, позволяет спасти этих пациентов в большинстве случаев. Настоящее изобретение позволит сократить расходы реанимационного отделения и общую стоимость медицинской помощи для отдельных лиц и общества путем снижения необходимости в таких вмешательствах и может быть использовано в качестве терапии первой линии при укусах змей, используя любой способ введения по отдельности, совместного введения или в комбинации с другими известными видами терапии, такими как введение противоядия.

Дополнительно к противоядию были испытаны дополнительные методы для оказания помощи в случае укуса змеи. Ингибитор эдрофоний ацетилхолинэстеразы вводили внутривенно для оказания помощи в случае укуса змей (Warrell et al., 1983, "Severe neurotoxic envenoming by the Malayan krait *Bungarus condidus* (Linnaeus): response to antivenom and anticholinesterase", Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.) 286(6366): 678-80; Watt et al., 1986, "Positive response to edrophonium in patients with neurotoxic envenoming by cobras (*Naja naja philippinensis*). A placebo-controlled study" N. Engl. J. Med. 315(23): 1444-8; and Currie et al., 1988, "Resolution of neurotoxicity with anticholinesterase therapy in death-adder envenomation. Med. J. Aust. 148:522-525). Ингибиторы матриксных металлопротеиназ (MPI) и ингибиторы (PLA2) фосфолипазы A2 были предложены в качестве потенциальных методов лечения, однако эффективные примеры широкого спектра действия не были определены Villalta-Romero et al. ACS Med. Chem. Lett. 2012, 3, 540-543 and Marcusi et al. Snake venom phospholipase A2 inhibitors. Current Topics in Medicinal Chemistry, 2007.

Универсальные методы лечения пациентов от укусов змей с применением противоядия оказались недостаточными, поскольку молекулы яда имеют исключительно переменную внешнюю структуру и, как известно, представляют собой сложную и неэффективную цель для воздействия на них противоядия. Разработка фармакологических методов лечения укусов змей, характеризующихся либо специфической эффективностью, либо эффективностью широкого спектра действия, при отравлении змеиным ядом оказалась даже еще более труднодостижимой целью. Таким образом, существует определенная насущная

необходимость в эффективных и экономичных методах лечения укусов змей, которое должно быть оказано своевременно. Высокая стоимость противоядия и лечения укуса змей, в целом, соответствует определению Всемирной организации здравоохранения "катастрофически высокие затраты на медицинское обслуживание" и ввиду ограниченной эффективности современных методов лечения укусов змей и предполагаемого финансового краха. Таким образом, принятие решения лечиться или не лечиться при укусе змеи представляет дилемму, в отношении которой жертва обязана принять решение, в результате чего непринятие решения зачастую приводит к смерти или к нетрудоспособности. Кроме того, правительства многих стран не способны или не желают субсидировать производство препаратов, которые ими рассматриваются как неэффективные и устаревшие, или пытаются найти дешевые неэффективные противоядия, вынуждая фармацевтические компании снимать с рынка более эффективные, но дорогостоящие противоядия. Традиционные противоядные сыворотки не могут быть безопасно введены вне медицинского учреждения. Доступные, широкого спектра действия антидоты первой линии против яда укусов змей окажут незамедлительное положительное воздействие на здоровье миллионов людей, которые подвергаются риску угрозы для жизни и получения повреждений конечностей от укусов змей.

Краткое изложение существа изобретения

Изобретатель определил гибкие способы, позволяющие быстро и эффективно лечить поврежденные отравлением ткани, и широкий спектр связанных с этим последствий, из которых наиболее значимыми являются непосредственная угроза жизни, обусловленная летальным исходом, опосредованным нейротоксическим действием ядов змей, и гематологический синдром. Способы лечения настоящего изобретения являются эффективными против фермента PLA2 всех змеиных ядов независимо от вида змей и в других случаях независимо от прямого или косвенного воздействия других элементов яда, а также систем хозяина, тем самым снижая вероятность возникновения острой коагулопатии, повреждения тканей и почечной недостаточности наряду с другими вызванными ядом патологиями. Это позволяет снизить повреждающее воздействие как ферментных, так и неферментных компонентов яда, при этом ослабляя собственные патологические реакции жертвы в результате воздействия яда. Это примечательное открытие привело к разработке первого в истории лекарственного препарата для оказания медицинской помощи в полевых условиях при укусе змей, который может быть введен человеком, обладающим ограниченными медицинскими навыками вне медицинского учреждения, и, аналогичным образом, к созданию возможностей со времени изобретения противоядия впервые в истории устанавливать клиническую эквивалентность при использовании и испытании противоядий, когда указанные композиции используются в качестве терапии первой линии 110 в полевых или больничных условиях, обеспечивая при этом систематическое и научно обоснованное усовершенствование традиционных противоядий. Кроме того, исключительное достижение заключается в том, что антидот может быть введен перорально для создания терапевтически эффективных концентраций препарата в крови, прежде чем пациент будет доставлен в больницу, с целью повышения выживаемости и снижения осложнений, в частности, при комбинировании с эффективным ингибитором MP, SP или многофункциональным ингибитором ферментов змей и хозяина, которые проявляют сложное взаимодействие в патологии змеиного укуса.

Примечательно то, что способы лечения настоящего изобретения, в отличие от противоядия, обеспечивают быстрое проникновение в поврежденные ядом ткани и нервные окончания, включая нейромышечные соединения, позволяя достичь намного более быстрые и благоприятные результаты по сравнению с действием противоядия. Физические свойства противоядия как такового, кровяные сгустки, некротические ткани и нервная ткань ограничивают такое проникновение противоядия, в результате чего противоядие лишь нейтрализует циркулирующий яд или яд, с которым оно вступает иным образом в непосредственный контакт. Настоящее изобретение позволяет устранить указанные недостатки, и в некоторых примерах осуществления при сочетании с противоядной терапией в качестве терапии первой линии или при комбинировании с другим препаратом позволяет существенно повысить эффективность противоядия, чем при использовании только одного противоядия.

Таким образом, в одном примере осуществления настоящее изобретение относится к применению ингибитора PLA2 (обычно ингибитора sPLA2), при котором ингибитор PLA2 представляет собой вареспладиб, метилвареспладиб, 9-[(фенил)метил]-5-карбамоилкарбазол-4-ил)оксиуксусную кислоту или их фармацевтически приемлемую соль или их смесь для лечения отравлений, вызванных укусами ядовитых змей.

В соответствии с одним аспектом настоящее изобретение относится к способу лечения субъекта, страдающего от отравления, вызванного укусом ядовитых змей, путем введения ингибитора sPLA2, представляющего собой вареспладиб, метилвареспладиб, 9-[(фенил)метил]-5-карбамоилкарбазол-4-ил)оксиуксусную кислоту или их фармацевтически приемлемую соль или их смесь.

В альтернативном примере осуществления настоящее изобретение также относится к способу лечения субъекта, страдающего от отравления, вызванного укусом ядовитых змей, включающий введение ингибитора PLA2, представляющего собой вареспладиб, метилвареспладиб, 9-[(фенил)метил]-5-карбамоилкарбазол-4-ил)оксиуксусную кислоту или их фармацевтически приемлемую соль или их смесь, в комбинации с терапевтически эффективным количеством по меньшей мере одного агента, выбранного из группы, включающей ингибитор металлопротеиназы, ингибитор сериновой протеазы или их смесь.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения субъекта, страдающего от отравления, вызванного укусом ядовитых змей, включающий введение ингибитора PLA2 субъекту в комбинации с терапевтически эффективным количеством противоядия, при котором ингибитор PLA2 представляет собой вареспладиб, метилвареспладиб, 9-[(фенил)метил]-5-карбамоилкарбазол-4-ил)оксиуксусную кислоту или их фармацевтически приемлемую соль или их смесь.

Настоящее изобретение также предусматривает создание способа лечения субъекта, страдающего от отравления, вызванного укусом ядовитых змей, включающий введение ингибитора PLA2 субъекту в комбинации с ингибитором металлопротеиназы и/или ингибитором сериновой протеазы и терапевтически эффективным количеством противоядия, при котором ингибитор PLA2 представляет собой вареспладиб, метилвареспладиб, 9-[(фенил)метил]-5-карбамоилкарбазол-4-ил)оксиуксусную кислоту или их фармацевтически приемлемую соль или их смесь.

Предпочтительно ингибитор PLA2 или ингибитор PLA2 и ингибитор металлопротеинкиназы и/или ингибитор сериновой протеазы вводят субъекту совместно с терапевтически эффективным количеством по меньшей мере одного агента, выбранного из группы, состоящей из ингибитора фактора распространения, антагониста рецептора NMDA, ингибитора ацетилхолинэстеразы, ингибитора L-аминоксидазы, ингибитора гиалуронидазы.

Также предпочтительно, что ингибитор PLA2 или ингибитор PLA2 и ингибитор металлопротеиназы и/или ингибитор сериновой протеазы вводят субъекту путем инъекции, интраназально, интраокулярно, перорально, топикально или путем ингаляции; и субъекту опционально совместно или последовательно вводят ингибитор ацетилхолинэстеразы или комбинацию ингибитора ацетилхолинэстеразы и ингибитора ацетилхолинового мускаринового рецептора.

Также предпочтительно, что ингибитор PLA2 представляет собой вареспладиб, и вареспладиб вводится вводят субъекту совместно с ингибитором ацетилхолинэстеразы или комбинацией ингибитора ацетилхолинэстеразы и ингибитора ацетилхолинового мускаринового рецептора по отдельности или совместно.

Предпочтительно, что настоящее изобретение относится к способу, в котором ингибитор PLA2 представляет собой вареспладиб, метилвареспладиб и/или 9-[(фенил)метил]-5-карбамоилкарбазол-4-ил)оксиуксусную кислоту или ее фармацевтически приемлемую соль, и указанные выше ингибитор(ы) PLA2 вводят субъекту совместно по меньшей мере с одним веществом, выбранным из группы, включающей приномастат, маримастат, воринон, иломастат, габексат, нафамостат или батимастат и ингибитор ацетилхолинэстеразы или комбинацию ингибиторов ацетилхолинэстеразы и ингибитора ацетилхолинового мускаринового рецептора.

Также предпочтительно, что настоящее изобретение относится к способу, в котором ингибитор PLA2 представляет собой вареспладиб, метилвареспладиб и/или 9-[(фенил)метил]-5-карбамоилкарбазол-4-ил)оксиуксусную кислоту или ее фармацевтически приемлемую соль, и указанные выше ингибитор(ы) PLA2 вводят упомянутому выше субъекту совместно с неостигмином, далее в комбинации с ингибитором ацетилхолинового мускаринового рецептора, опционально в котором указанный выше вареспладиб и/или метилвареспладиб, указанные выше неостигмин и ингибитор ацетилхолинового мускаринового рецептора вводятся субъекту совместно в качестве единственно активных агентов.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу, в котором ингибитор PLA2 и ингибитор металлопротеиназы и/или сериновой протеазы вводятся субъекту путем инъекции, интраназально, интраокулярно, перорально, топикально или путем ингаляции, и/или в котором ингибитор металлопротеиназы выбран из группы, содержащей приномастат, BB-94 (маримастат), BB-2516 (батимастат), иломастат, вареспладиб, метилвареспладиб и их фармацевтически приемлемые соли, энантиомеры, диастереомеры и их смеси, или в котором ингибитор металлопротеиназы представляет собой приномастат или маримастат, вводимые субъекту перорально, путем инъекции, топикально или интраназально в концентрациях от приблизительно 1 до приблизительно 500 мкМ; и/или в количестве от приблизительно 0,0001 до приблизительно 100 г, или в котором ингибитор сериновой протеазы выбран из группы, состоящей из габексата, нафамостата, лейпептина, AEDSF (4-(2-аминоэтил)бензеносульфонилафлуорид гидрохлорид), их фармацевтически приемлемых солей, энантиомеров, диастереомеров по отдельности или совместно.

Предпочтительно, что настоящее изобретение относится к способу, в котором ингибитор PLA2 представляет собой вареспладиб и/или метилвареспладиб, в котором вареспладиб вводят субъекту путем инъекции и указанный метилвареспладиб вводят субъекту прерорально, топикально или интраназально в концентрациях в пределах от приблизительно 0,1, 1, 10, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500 до приблизительно 1250, от 750 до приблизительно 1250, от приблизительно 801 до приблизительно 1000 мкМ; и(или) в количестве в пределах от приблизительно 0,0001, 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 100 до 1000 мг.

Также предпочтительно, что ингибитор PLA2 вводят субъекту в комбинации с противоядием.

Также предпочтительно, что ингибитор PLA2 представляет собой вареспладиб или его фармацевтически приемлемую соль.

Также предпочтительно, что ингибитор PLA2 представляет собой метилвареспладиб или его фар-

мацевтически приемлемую соль.

Также предпочтительно, что ингибитор PLA2 представляет собой 9-[(фенил)метил]-5-карбамоилкарбазол-4-ил)оксиуксусную кислоту или ее фармацевтически приемлемую соль.

Ввиду отсутствия внебольничных фармацевтических методов лечения при отравлении змеиным ядом и основных эффективных методов лечения, за исключением традиционного противоядия, изобретение позволяет удовлетворить давно назревшую исключительно важную медицинскую потребность в методах лечения. Кроме того, схемы лечения изобретения являются экономичными, безопасными и могут быть переведены с экстренной медицинской помощи на амбулаторное или упрощенное стационарное лечение.

Таким образом, настоящее изобретение предусматривает создание доступного по цене, широко применяемого антидота от укусов змей и для лечения других, вызванных ядом травм, который окажет помощь миллионам людей, рискующим умереть или получить травму конечности при отравлении змеиным ядом. Следует отметить, что вареспладиб и метилвареспладиб, пролекарство вареспладиба, являются эффективными и имеют высокую активность против широкого спектра ядов животного происхождения. Оба проявляют эффективность при ингибировании ферментов металлопротеиназы и сериновой протеазы змеиного яда, а также демонстрируют практичность при оперативном лечении укусов любых змей в качестве терапии первой линии. Вареспладиб и метилвареспладиб могут быть введены по отдельности, совместно или смешаны с противоядием, ингибиторами металлопротеиназы, ингибиторами сериновой протеазы и другими ингибиторами или эффективными лекарствами, а также противоядиями в любом порядке, составе или в любой лекарственной форме. Существует несколько эффективных путей доставки как для лекарства, так и пролекарства и их сочетаний с другими фармацевтически эффективными композициями.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показана временная динамика активности PLA2, когда избыток яда сочетали с вареспладибом, метилвареспладибом или только с одним ядом (контроль). Как вареспладиб, так и метилвареспладиб проявили устойчивое ингибирование активности sPLA2 змеиного яда несмотря на чрезвычайную активность избытка яда (пример 3).

На фиг. 2А и В показана временная динамика активности металлопротеиназы при комбинировании исключительно высоких концентраций яда с испытуемыми веществами (пример 4).

На фиг. 3 показана временная динамика активности сериновой протеазы при комбинировании исключительно высоких концентраций яда с известными ингибиторами металлопротеиназы и sPLA2. Вареспладиб и метилвареспладиб проявляли ингибиторную активность против испытуемой сериновой протеазы змеиного яда (пример 5).

На фиг. 4 показано ингибирование активности PLA2 змеиных ядов вареспладибом. Ни вареспладиб, ни дарапладиб не ингибировали значительно sPLA2 пчелиного яда с той же самой степенью активности, как sPLA2 змеиного яда. Вареспладиб, но не дарапладиб (отрицательный контроль) эффективно ингибирует PLA2 змеиного яда. Стоит отметить, что PLA2 пчелиного яда не ингибируется вареспладибом (пример 6).

На фиг. 5А-В вареспладиб и метилвареспладиб продемонстрировали высокую степень активности против активности sPLA2 змеиного яда. Ни вареспладиб, ни метилвареспладиб не обладает той же самой степенью активности против sPLA2 пчелиного яда (пример 6).

На фиг. 6А-Н вареспладиб является профилактически и терапевтически эффективным против летальных доз яда *Micrurus fulvius* (Арлекиновый коралловый аспид) у мышей и крыс. Приведены примеры испытания настоящего изобретения *in vivo* на мышах и крысах. Проведение терапии с использованием вареспладиба до, одновременно или после подкожных инъекций высоких доз яда арлекинового кораллового аспиды продемонстрировало высокую выживаемость у мышей и крыс, обусловленную проведением курса такого лечения на основе вареспладиба. Был предотвращен острый гемолиз путем проведения терапии с использованием внутривенного введения вареспладиба, и уровни PLA2 были соответственно снижены за счет терапии с вареспладибом у тех же самых животных. 100% крыс, которым вводили вареспладиб внутривенно после подкожного введения яда арлекинового кораллового аспиды, выжило (пример 7).

На фиг. 7 проиллюстрирован повышенный уровень выживаемости мышей, которым совместно инъекционно вводили яд гремучей змеи и вареспладиб или вареспладиб и ингибитор металлопротеиназы. Кроме того, мыши, которым ввели метилвареспладиб и ингибитор металлопротеиназы, были защищены от гибели при воздействии яда гремучей змеи (*C. atrox*) (пример 8).

На фиг. 8 продемонстрировано, что мыши, которым предварительно подкожно инъекционно вводили вареспладиб, были защищены от гибели при введении яда гадюки Расселла (*Daboia russelli*), который также был введен подкожно (пример 9).

На фиг. 9 показано, что вареспладиб является профилактически и терапевтически эффективным против летальных доз яда гадюки обыкновенной (*Viper a berus*) (яд гадюки обыкновенной в организме мышей (пример 10).

На фиг. 10 показано ингибирование приномастатом, батимаастатом и маримаастатом ядов семейства

аспидовых змей *in vitro*.

На фиг. 11 показано действие приномастата в качестве ингибитора металлопротеиназы ядов гадюк *in vitro*.

На фиг. 12 показано действие батимастата в качестве ингибитора металлопротеиназы ядов гадюк *in vitro*.

На фиг. 13 показано действие маримастата в качестве ингибитора металлопротеиназы ядов гадюк *in vitro*.

На фиг. 14 показано действие сериновой протеазы в качестве ингибитора яда гадюки и одного аспиды (in vitro). Нафамостат проявил исключительно высокую активность против яда семейства аспидовых змей и тайпана *in vitro*.

На фиг. 15 в табл. 3 приведены концентрации полумаксимального ингибирования (IC₅₀s) для ингибирования sPLA₂ вареспладибом (пример 12). Вареспладиб проявил неожиданно высокую активность против нескольких змеиных ядов (пример 12).

На фиг. 16 в табл. 4 приведены концентрации полумаксимального ингибирования (IC₅₀) для ингибирования sPLA₂ метилвареспладибом. Метилвареспладиб проявил неожиданно высокую активность против нескольких змеиных ядов (пример 12).

На фиг. 17 в табл. 5 приведены концентрации полумаксимального ингибирования (IC₅₀) для приномастата индуцированного ингибирования металлопротеиназы *in vitro* (пример 2). Приномастат обладает более широким спектром активности против металлопротеиназы змеиного яда по сравнению с активностью, о которой сообщалось ранее.

На фиг. 18 в табл. 6 приведены концентрации полумаксимального ингибирования (IC₅₀) для маримастата индуцированного ингибирования металлопротеиназы *in vitro*.

На фиг. 19 в табл. 7 приведены концентрации полумаксимального ингибирования (IC₅₀) для батимастата индуцированного ингибирования металлопротеиназы *in vitro*.

На фиг. 20 в табл. 8 приведены концентрации полумаксимального ингибирования (IC₅₀) для вориностата, иломастата, габексатинафамостата индуцированного ингибирования металлопротеиназы *in vitro*.

Подробное описание изобретения

I. Определения

Нижеприведенные термины используются по всему описанию настоящего изобретения. В том случае, если термину не будет дано конкретное определение в данном контексте, то следует понимать, что этот термин используется в соответствии со значением, очевидным специалистами в данной области.

В тех случаях, когда указывается диапазон значений, следует понимать, что каждое промежуточное значение до десятой доли единицы нижнего предела, если в контексте однозначно не указано иное, между верхним и нижним пределом указанного диапазона, или любое иное фактическое или промежуточное значение в этом указанном диапазоне включено в настоящее изобретение. Изобретение также может охватывать верхний и нижний пределы указанных меньших диапазонов, которые могут быть независимо включены в меньшие диапазоны, с учетом любого специфически исключенного предела в указанном диапазоне. В том случае, если указанный диапазон включает один или оба предела, диапазоны, исключаящие любой из двух, либо оба из указанных включенных пределов, также включены в изобретение. В тех случаях, если заместитель является возможностью включения в одну или более групп Маркуша, следует понимать, что предусматривается использование только тех заместителей, которые образуют устойчивые связи.

Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют одно и то же значение, однозначно и повсеместно понимаемое специалистами в данной области техники, к которой относится настоящее изобретение. Несмотря на то, что любые способы и материалы, аналогичные и эквивалентные способам и материалам, описание которых приведено в настоящей заявке, также могут быть использованы на практике или при испытании настоящего изобретения, ниже приведено описание предпочтительных методов и материалов.

Следует отметить, что в соответствии со значением, используемым в настоящем контексте и в прилагаемой формуле изобретения, формы единственного числа включают ссылки на множественно число, если только в контексте четко не указано иное.

В соответствии со значением, используемым в настоящем контексте, "AChE" является сокращением ацетилхолина; "AChEI" является сокращением ингибитора ацетилхолинэстеразы; "mAChR" является сокращением ацетилхолинового мускаринового рецептора; "nAChR" является сокращением никотинового ацетилхолинового рецептора; ингибиторы AChE, которые также могут ингибировать бутирилхолинэстеразы (BChE), псевдохлинэстеразы, а также подразумеваются и другие. "MP" является сокращением для металлопротеиназы (например, матриксной металлопротеиназы млекопитающих, MMPs, змеиного яда металлопротеазы, SVMps; "SP" является сокращением для сериновых протеаз; "MPI" является сокращением для ингибитора металлопротеиназы. Яды животного происхождения (например, яды змей) секретируются, и в контексте ядов животного происхождения "PLA₂" и "sPLA₂" используются взаимозаменяемо; PLA₂-I является сокращением ингибитора фосфолипазы; и "SPI" - сокращением ингибитора сериновой протеазы.

Далее нижеприведенные термины имеют следующие определения.

Термин "пациент" или "субъект" используется по всему тексту описания настоящего изобретения с целью описания животного, в основном млекопитающего, в частности, включая одомашненное животное (например, собака, кот, корова, лошадь, овца, коза и т.д.) и предпочтительно человека, которым предоставляется лечение, включая профилактическое лечение (профилактику), с использованием соединений или композиций в соответствии с настоящим изобретением. Для лечения указанных состояний и заболеваний, являющихся специфическими в отношении конкретного животного, такого как пациент-человек, термин пациент относится к указанному конкретному животному. В большинстве случаев пациент или субъект настоящего изобретения представляет собой пациента-человека одного или обоих полов. Субъекты, предполагаемые для проведения лечения в соответствии с методом настоящего изобретения, включают людей, домашних животных, лабораторных животных, домашний скот, лошадей и т.д.

Термин "эффективный" используется в настоящем контексте, если не указано иное, для описания количества соединения или компонента, который при использовании в контексте его применения, позволяет получить предполагаемый результат или оказать влияние на предполагаемый результат независимо от того, относится ли этот результат к профилактике и(или) лечению отравления змеиным ядом и(или) к болезненному состоянию или к состояниям/симптому в соответствии с приведенным описанием. Термин "эффективный" также предполагает все другие термины эффективного количества или эффективной концентрации (включая термин "терапевтически эффективный"), описание которых приведено или используется в настоящей заявке. Термин "эффективный" также включает периоды введения, независимо от того является ли такое введение единичным введением, зачастую перорально или путем инъекции, или единичным введением спустя часы, дни или недели дополнительного введения до момента времени прекращения введения ввиду полного выведения яда из организма пациента или на основе решения внедрения альтернативной терапии, включая введение традиционной композиции противоядия на основе сыворотки. Следует отметить, что в одном аспекте настоящее изобретение предусматривает введение эффективного количества композиции в соответствии с приведенным в настоящей заявке описанием до тех пор, пока не будут достигнуты снижение опасных уровней активности sPLA2 или металлопротеиназы, нормализация состава крови и факторов коагуляции, и до тех пор, пока не будет наблюдаться устойчивое улучшение признаков или симптомы отравлений у пациента. После введения композиции может быть продолжено лечение или повторное лечение с использованием альтернативных композиций, в частности, включающих традиционные противоядные композиции.

Термин "соединения" используют в настоящем контексте для описания любого специфического соединения или биоактивного вещества, раскрытого в настоящей заявке, включая любые и все стереоизомеры (включая диастереомеры), отдельные оптические изомеры (энантиомеры) или рацемические смеси, фармацевтически приемлемые соли, включая альтернативные фармацевтически приемлемые соли, пролекарственные формы и дейтерированные или другие изотопные замещения. Термин "соединения" в настоящем описании относится к устойчивым соединениям. В пределах его использования в данном контексте термин "соединения" может относиться к единичному соединению или к смеси соединений, как далее описано в настоящей заявке. Соединения для использования в настоящем изобретении могут также включать гидраты, сольваты и(или) полиморфы отдельных соединений. При раскрытии биоактивного вещества для использования в настоящем изобретении понимается, что такой термин в пределах контекста его использования включает его фармацевтически приемлемые соли и(или) альтернативные фармацевтически приемлемые соли, если однозначно не указано иное.

"Укус змеи" включает "сухой" укус змеи, а также укусы, приводящие к отравлению змеиным ядом или укусы неядовитых или неопределенных змей. Существует ряд способов определения того, что субъект пострадал от укуса змеи. Указанные способы определения укуса включают: субъект или другое лицо явилось очевидцем укуса; наблюдается физическое подтверждение укуса змеи (например, колотые ранки или рваные раны, локализованная боль, местное покраснение или отек); у субъекта проявляются признаки или симптомы, указывающие на отравление укусом змеи (например, боль, покраснение, нарушение свертываемости крови или другое подтверждение отравлений, вызванных укусами ядовитых животных, например слабость или паралич); у субъекта проявляются признаки или симптомы, указывающие на нейротоксическое отравление змеиным ядом, и у субъекта ранее не диагностировалось состояние, за исключением нейротоксического отравления змеиным ядом, служащего причиной признаков или симптомов; обнаружен яд или действие яда (например, в месте укуса, в моче или в крови, с использованием комплекта для обнаружения яда от укуса змеи/действия яда) или путем проведения анализа повышенной активности PLA2. Визуальная идентификация змеи может указывать на то, что субъект был укушен ядовитой змеей, обладающей нейротоксичным ядом, даже при отсутствии следов ядовитых клыков или зубов (например, при укусе крайта (*Bungarus*)).

"Признаки" и "симптомы" нейротоксического отравления змеиным ядом включают парестезию, сонливость, парез взгляда, паралич малых мышц, приводящий к блефароптозу (ретракция верхнего века), слабость мышц шеи, дисфагию, мидриаз, фасцикуляцию, повышенное слюноотделение, повышенное потоотделение, потерю координации мышц, боль в животе, затрудненную речь, тошноту, затрудненное глотание и другой бульбарный паралич и рвоту, гипотензию, расстройство дыхания и паралич дыхатель-

ных мышц. В некоторых случаях у субъекта проявляются ранние признаки, включающие ранние признаки нейротоксического отравления змеиным ядом, такие как паралич малых мышц в форме ретракции верхнего века, парез взгляда, затруднённое глотание и другой бульбарный паралич. Клинические оценки мышечной функции субъекта, подвергшегося отравлению змеиным ядом, или у которого имеются подозрения на отравление змеиным ядом, включают остроту зрения, свободное глотание, свободу высунуть язык, дикция, способность полностью поднимать голову от кровати и держать ее более пяти секунд (сгибание шеи) и пониженный пик дыхательного потока.

"Яд" имеет свое нормальное значение и является ядовитой секрецией животного, такого как змея, другие рептилии, амфибии, пауки, скорпионы, клещи, конус улитки, кишечнополостные (медузы) и т.д., вводимой при укусе или уколе жалом.

"Противоядие", "антитело против антигенов змеиного яда" или "антитоксическая иммунная сыворотка" представляет собой биологический продукт, используемый при лечении отравлений в результате укусов. Противоядия обычно получают путем "доения" змей. Затем яд разводят и вводят путем инъекции лошади, овце, кролику или козе или в куриные яйца. В организме субъекта-животного или в яйце возникает иммунный ответ на яд, при котором вырабатываются антитела против антигенных молекул яда, которые затем могут извлекаться из крови животного, подвергаться очистке и использоваться для лечения пациентов, пострадавших от отравления змеиным ядом. В международном масштабе противоядия должны соответствовать стандартам фармакопеи и Всемирной организации здравоохранения.

"Параспецифические" противоядия - противоядия, обладающие действием или свойствами, дополняющими действия и свойства специфических противоядий и считающимися эффективными с медицинской точки зрения (например, для определения параспецифических действий противоядия).

"Отравление" относится к введению яда в организм жертвы в результате укуса змеи и включает нейротоксическое и не нейротоксическое отравление ядом и отравление ядами неопределенного характера, а также офтальмию в результате "выстреливания" яда коброй. Примеры не нейротоксического отравления ядом включают гемотоксическое, васкулотоксическое, кардиотоксическое и миотоксическое отравление, и в общем называется в описании ниже "гемотоксическим" или "цитотоксическим" отравлением ядом.

"Нейротоксическое отравление" относится к отравлению нейротоксичным ядом.

"Ядовитая змея" относится к змее, имеющей яд с любым соотношением нейротоксических, гемотоксических, васкулотоксических, миотоксических, цитотоксических и(или) других токсических свойств. Например, и в том числе ядовитые змеи включают кобру, крайт, гадюку Рассела, мамбу, прибрежный тайпан, новогвинейскую гадюкообразную смертельную змею, бумсланг (ужеобразную змею), гремучую змею, арлекиновый коралловый аспид, ластохвостов (*Hydrophiinae*), помимо многих других. Все гадюки, включая гремучих змей, гадюку Рассела, песчаную эфу, копьеголовую гадюку, европейскую гадюку, куфию и щитомордника, помимо многих других, являются ядовитыми. В общей сложности существует приблизительно 600 видов ядовитых змей, причем выявлено, что более 200 из них имеют медицинское и ветеринарное значение по всему миру. Следует иметь в виду, что яды змей имеют сложные составы протеинов и других веществ с токсическими свойствами. Таким образом, яд змеи, обладающий нейротоксическим действием, может включать вещества с гемотоксическими, васкулотоксическими, кардиотоксическими, миотоксическими и(или) другими токсическими свойствами, в том числе нейротоксины.

Термины "лечить", "проводить лечение" и "лечение" используются синонимично в отношении любого действия, приносящего терапевтический эффект пациенту, подвергнутому риску или страдающему от отравления, включая улучшение состояния за счет облегчения, ингибирования, подавления или устранения по меньшей мере одного симптома, замедления прогрессирования или поражения от отравления змеиным ядом или связанной с ним болезни, предотвращение, замедление или ингибирование вероятности возникновения симптомов отравлений, вызванных укусами ядовитых животных, и т.д. Лечение, в соответствии со значением, используемым в настоящем контексте, может включать как профилактическое, так и терапевтическое лечение в основном отравлений, вызванных укусами ядовитых животных, а также других нарушений, связанных с отравлением ядом, описанных в настоящей заявке или также известных специалистам в данной области техники.

"Устойчивый при хранении" означает что композиция является устойчивой в течение периода времени, составляющего по меньшей мере от приблизительно трех до приблизительно шести месяцев или более, при температуре приблизительно от 20-35°C до приблизительно 40°C.

Термин "фармацевтически приемлемый" в соответствии со значением, используемым в настоящем контексте, означает, что соединение или композиция является приемлемой для введения субъекту, включая пациента-человека, для проведения лечения, описанного в настоящей заявке, без исключительно вредных побочных эффектов с учетом тяжести заболевания и необходимости проведения лечения.

Термин "низкомолекулярный" в соответствии со значением, используемым в настоящем контексте, относится к молекуле с низким молекулярным весом, менее приблизительно 2500, или менее приблизительно 1000, или менее приблизительно 750, или менее приблизительно 500.

Термин "совместное введение" используют для описания введения двух или более активных соеди-

нений в эффективных количествах. Хотя термин "совместное введение" предпочтительно включает введение двух или более активных соединений пациенту приблизительно в одно и то же время (одновременно, совместно или даже последовательно), не обязательно, чтобы соединения фактически вводили точно в одно время (одновременно) или даже в быстрой последовательности (совместно/последовательно), только при этом необходимо, чтобы количество соединения было введено пациенту или субъекту таким образом, чтобы обеспечивалась эффективная концентрация в крови, сыворотке или плазме или в лёгочной ткани одновременно для достижения намеченного результата.

Термин "комбинирование" относится к более чем одному активному соединению, включенному в состав единичной лекарственной формы для введения пациенту в такой единичной лекарственной форме. Как было отмечено, термин "совместное введение" включает термин "комбинирование", по меньшей мере, для целей синхронизации введения рассматриваемых активных соединений.

II. Ингибиторы фосфолипазы A2

Липазы являются ферментами, высвобождающими биологически активные молекулы из мембранных липидов. Семейство основных ферментов липазы включает фосфолипазу A2 (PLA₂). Фосфолипаза A2 катализирует гидролиз фосфолипидов в позиции sn-2, в результате которого получают свободную жирную кислоту и лизофосфолипид. PLA₂ способствует высвобождению и(или) формированию по меньшей мере трех важных липидных медиаторов из мембран арахидоновой кислоты, фактора активации тромбоцитов и лизофосфатидиловой кислоты. Высвобождение арахидоновой кислоты из мембранных фосфолипидов с помощью PLA считается основным этапом в регулировании выработки эйкозаноида внутри клетки. Ферменты PLA₂ обычно группируются в цитозольную PLA₂ (cPLA₂), секреторную PLA₂ (sPLA₂) и кальций-независимую PLA₂ (iPLA₂). PLA₂ яда (например, змеиного яда) секретируется (т.е. sPLA₂). Классификация основана на молекулярном весе, потребности в кальции, структурных свойствах, субстратной специфичности и функциональной роли. См. Ray, et al., "Phospholipase A₂ in Airway Disease: Target for Drug Discovery", *Journal of Drug Discovery and Therapeutics* 1 (8) 2013, 28-40.

Ингибиторы PLA₂ были определены в растениях, змеином яде и других источниках. Ингибиторы PLA₂s были исследованы как возможные терапевтические средства для лечения воспалительных заболеваний. См. Magrioti, Victoria, and George Kokotos, "Phospholipase A2 inhibitors as potential therapeutic agents for the treatment of inflammatory diseases". *Expert opinion on therapeutic patents* 20.1 (2010): 1-18, and Dennis, Edward A., et al. "Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention". *Chemical reviews* 111.10 (2011): 6130-6185. Marcussi et al. предположили, что биотехнологический потенциал ингибиторов PLA₂s позволяет создать терапевтические молекулярные модели с антифибринолитической активностью в качестве дополнения к традиционной сывороточной терапии против PLA₂s. См. Marcussi, Silvana, et al. "Snake venom phospholipase A2 inhibitors: medicinal chemistry and therapeutic potential". *Current Topics in Medicinal Chemistry* 7.8 (2007): 743-756). Также см. Abhijit Dey and Jitendra Nath De, 2012. *Phytopharmacology of Antiophidian Botanicals: A Review*", *International Journal of Pharmacology*, 8: 62-79, and LS Guimaraes, Cesar, et al. "Biodiversity as a Source of Bioactive Compounds Against Snakebites". *Current medicinal chemistry* 21.25 (2014): 2952-2979. Тем не менее, ни один из низкомолекулярных ингибиторов PLA₂s не был одобрен в качестве средств для лечения отравлений.

Ингибиторы PLA₂s, которые могут быть использованы в настоящем изобретении, включают, в частности, вареспладиб, метилвареспладиб, 9-[(фенил)метил]-5-карбамоилкарбазол-4-ил)оксиуксусную кислоту или их фармацевтически приемлемую соль или их смесь. Вареспладиб представляет собой ингибитор sPLA₂, композиция которого была составлена для внутривенного и перорального введения и который был исследован в целях лечения гиперлипидемии, синдрома системной воспалительной реакции, вызванной сепсисом и острым грудным синдромом (осложнение серповидно-клеточной анемии). См. "Вареспладиб" *American Journal of Cardiovascular Drugs*. 11 (2): 137-43. 2011. Метилвареспладиб представляет собой пролекарство вареспладиба, в общем предпочтительное для перорального введения.

В соответствии с описанием, приведенным в настоящем контексте, было продемонстрировано, что вареспладиб и метилвареспладиб обладают особыми свойствами, которые позволяют использовать их в качестве средств для проведения "универсального" первоочередного, многократного, полного лечения отравлений ядом. Как указывалось выше, вареспладиб и метилвареспладиб дополнительно к проявлению активности ингибирования PLA₂ против широкого спектра змеиных ядов ослабляет патологическую реакцию на змеиный яд, тем самым снижая вред за счет прямого и косвенного ингибирования токсичности змеиного яда. Указанная активность широкого спектра против змеиного яда является исключительно необычной с учетом наших наблюдений того, что вареспладиб и метилвареспладиб не являются активными ингибиторами PLA₂ пчелиного яда и, как правило, активность лекарственных ингибиторов PLA₂ ниже для змеиных ядов, чем для ядов млекопитающих.

Следует отметить, что вареспладиб и метилвареспладиб также ингибируют активность металлопротеиназы и сериновой протеазы яда ряда змей. Безусловно, следует отметить, что при проведении ряда экспериментов вареспладиб и метилвареспладиб оказались более активными ингибиторами металлопротеиназы и сериновой протеазы яда гадюки Рассела по сравнению с несколькими значимыми с медицинской точки зрения примерами указанных ингибиторов (например, нафамостата, маримастата и батимастата).

Также неожиданными оказались результаты исследования того, что концентрации полумаксимального ингибирования (IC50) вареспладиба и метилвареспладиба в отношении всех протестированных змеиных ядов, были существенно ниже значений, о которых сообщалось в отношении ингибирования человеческого sPLA2.

Также было обнаружено, что даже когда действие яда в основном было цитотоксическим (включая все проявления в цельных жидких составных органах), монотерапия с использованием вареспладиба и метилвареспладиба позволила достичь исключительно высокого уровня выживаемости мышей, в организм которых был введен яд змей. Это указывает на то, что вареспладиб и метилвареспладиб являются эффективными при лечении отравления змеиным ядом включая, в частности, яд таких змей, как техасский гремучник (*C. atrox*), мойавский ромбический гремучник (*C. scutulatus*), гадюка Рассела (*V. Russellii* (*Daboia*)), гадюка обыкновенная (*V. berus*) и арлекиновый коралловый аспид (*M. fulvius*) с геморрагическими вариантами. Без привязки к конкретному механизму тот факт, что вареспладиб и метилвареспладиб могут безопасно подавлять реакцию организма-хозяина и являются более активными против PLA2 змеиного яда (более низкая концентрация полумаксимального ингибирования (IC50)), чем против человеческого sPLA, обуславливает частично защиту от неблагоприятных последствий гемолиза и других разрушений тканей. Непосредственная и косвенная активность вареспладиба и метилвареспладиба ингибирования металлопротеиназы и сериновой протеазы яда и хозяина обуславливает частично эффект защиты против неблагоприятных последствий гемолитических ядов животного происхождения.

Другие ингибиторы PLA2, такие как, в частности, 1H-индол-3-глиоксиамиды, являются также эффективными при лечении отравлений ядом змей. Специалист в данной области техники, руководствуясь настоящим изобретением, имеет возможность определить ингибиторы PLA2 и терапевтические комбинации, эффективные против широкого спектра ядов змей и(или) специально разработанные для конкретной разновидности ядов змей

III. Противоядие

Активность ингибирования PLA2, металлопротеиназы и сериновой протеазы многими противоядиями против токсинов змей быть повышена, например, с помощью только одних вареспладиба, метилвареспладиба (обычно используемых в качестве ингибиторов PLA2s) и в комбинации с приномастатом, батимастатом, маримастатом (с вареспладибом, метилвареспладибом в сочетании с противоядием или без них) и другими ингибиторами, обладающими специфической и неспецифической активностью против компонентов яда и благотворной модификацией реакции организма-хозяина или сочетанием благотворных эффектов.

Способность более быстрой доставки антидота по сравнению с приготовлением противоядия (последовательное введение доз) позволит решить долгосрочную неудовлетворенную необходимость в проведении рандомизированных клинических испытаний противоядия, т.к. низкомолекулярные антидоты могут быть доставлены прежде, чем будет принято окончательное решение о необходимости или отсутствии необходимости введения противоядия. В комбинации с противоядием - открытие того, что активность комбинаций лекарственных препаратов-противоядие повышается - позволит решить долгосрочную неудовлетворенную потребность в ограничении использования противоядия, уменьшении осложнений, сокращении производственных/складских расходов и времени пребывания в стационаре.

Совместная терапия с применением противоядия может быть исключительно приемлемой в случае отравлений ядом, содержащим как нейротоксичные, так и гемотоксичные компоненты, вызывающие как паралич, так и кровотечение или нарушение свертываемости крови, в том случае, если укус нанесен гадюкой, аспидом или ужеобразной змеей, при этом противоядие варьируется по необходимости и составу в зависимости от специфических потребностей региона, риска от змеиного укуса и лечебных ресурсов.

Важно отметить, что фармацевтические композиции, включающие вареспладиб, метилвареспладиб и опционально предпочтительные ингибиторы металлопротеиназы, такие как приномастат, батимастат и маримастат, улучшают активность параспецифических противоядий. В описании настоящей заявки ниже приведены специфические и параспецифические противоядия и композиции на основе противоядий, которые могут быть использованы в комбинации с низкомолекулярным ингибитором PLA2 (например, 1H-индол-3-глиоксиамидом, таким как вареспладиб и(или) метилвареспладиб) для лечения при отравлении ядом змей.

Иллюстративные противоядия.

Ниже приведен неограничивающий список противоядий, в отношении которых вареспладиб и метилвареспладиб могут улучшить показатели за счет повышения эффективности составов противоядия при заблаговременном введении, совместном введении или комбинировании.

Противоядие от укуса гремучей змеи, произведенное компанией by Pfizer Inc. Противоядие от укуса гремучей змеи (*Crotalidae*) представляет собой поливалентный продукт лошадиной сыворотки, представляющий собой очищенный и концентрированный препарат сывороточных глобулинов, полученных путем фракционирования крови здоровых лошадей, иммунизированных ядами следующих животных: ромбический гремучник (*Crotalus adamanteus*) Техасский гремучник (*C. atrox*), страшный гремучник (*C. durissusterrificus*) и кайсака (*Bothrops atrox*). Противоядие от укуса гремучника показано для лечения отравлений, вызванных укусами ямкоголовых или гремучих змей (гремучников).

Противоядие AnavipSnakeVenom, разработанное InstitutoBioclon SA de CV, RareDiseaseTherapeutics Inc. Anavip содержит в качестве активного ингредиента фрагменты иммуноглобулина лошадиной сыворотки F(ab')₂, предназначенной для нейтрализации яда ямкоголовых змей (Crotalinae).

Противоядие Antislake Snake Venom Serum Snake Venom, разработанное компанией Indian Drugs & Pharmaceuticals Ltd. Противоядная сыворотка, содержащая иммуноглобулины поливалентной лошадиной сыворотки, показана для лечения укусов змей.

Противоядие Anti-Vipers Serum VACSERA Snake Venom Poisoning, разработанное Holding Company for Biological Products & Vaccines (VACSERA). Сыворотка против яда змей семейства гадюковых содержит поливалентную антисыворотку против яда гадюки. Она показана для лечения укусов гадюк.

Противоядие, разработанное компанией PFIZER INC. Противоядие (арлекиновый коралловый аспид (*Micrurus fulvius*) представляет собой очищенный, концентрированный и лиофилизированный препарат сывороточных глобулинов, полученный путем фракционирования крови здоровых лошадей, иммунизированных ядом арлекинового кораллового аспида (*Micrurus fulvius*).

Antiviperino BIRMEX Snake Venom Poisoning, Laboratorios de Biologicos y Reactivos de Mexico S A de C V (Birmex). Antiviperino содержит иммуноглобулины лошадей, иммунизированных ядом гадюки обыкновенной (*Vipera berus*);

ASVS-Africa Snake Venom Poisoning, Bharat Serums And Vaccines Limited, представляет собой поливалентный антитоксин против змеиного яда. Это очищенный и концентрированный препарат сывороточных глобулинов, полученный путем фракционирования крови здоровых лошадей, гипериммунизированных ядом различных змей. ASVS-Africa показано для лечения отравлений, вызванных укусами ядовитых змей.

ASVS - Asia Snake Venom Poisoning, Bharat Serums And Vaccines Limited, Globulins, ASVS-Asia представляет собой поливалентную антисыворотку против змеиного яда. Антисыворотка против змеиного яда представляет собой очищенный концентрированный препарат сывороточных глобулинов, полученный путем фракционирования крови здоровых лошадей, гипериммунизированных ядами различных змей.

Black snake Antivenom CSL LTD Snake Venom Poisoning, CSL Limited. Противоядие от укуса черного полоза приготавливают из плазмы лошадей, иммунизированных ядом королевской коричневой змеи (*Pseudechis australis*), также известной как мулга, затем отбирают ту часть лошадиной крови, которая нейтрализует указанный яд. Яд королевской коричневой змеи содержит нейротоксины, миотоксины и антикоагулянтный токсин. Противоядие от укуса черного полоза используют для лечения пациентов, проявляющих симптомы системного отравления после укуса королевской коричневой змеи, или мулги, и родственных видов и подвидов, и используется как "параспецифическое" противоядие.

Bothrofav Snake Venom Poisoning, Sanofi: антитела, глобулины, иммуноглобулины, иммунопротеины, сывороточные глобулины, BothroFav представляет собой F(ab')₂ содержащую антисыворотку, используемую для лечения отравлений, вызванных укусами мартинического ботропа.

Brown Snake Antivenom Snake Venom Poisoning, CSL Limited: антитела, антитоксины, биологические факторы, глобулины, иммунопротеины, пептиды, сывороточные глобулины; противоядие от яда восточной коричневой змеи приготавливают из плазмы лошадей, иммунизированных ядом восточной коричневой змеи (*Pseudonaja textilis*). Противоядие от укуса восточной коричневой змеи показано для лечения пациентов, проявляющих симптомы системного отравления после укуса змеи из рода ложные кобры Гюнтера (*Pseudonaja*). Этот род включает восточную коричневую змею, змею-даджити западную коричневую змею.

CoralmySnakeVenomPoisoning, InstitutoBioclon SA deCV: токсины, биологические вещества, Coralmyn представляет собой поливалентное терапевтическое средство от укусов коралловых аспидов, содержащее фрагменты F(ab')₂ и Fab иммуноглобулина G (IgG).

Сывороточные глобулины, CroFab® (BTG) содержит препарат из фрагментов овечьих иммуноглобулинов против яда ямкоголовых змей в качестве активного ингредиента. Поливалентный иммунный FAb-антидот против яда семейства ямкоголовых (овечий) представляет собой фрагмент Fab иммуноглобулина G (IgG), против специфического яда, действующий путем связывания с токсинами яда и нейтрализующий токсины яда и способствующий их перераспределению из тканей-мишеней и выведению из организма пациента.

Death Adder Antivenom CSL LTD Snake Venom Poisoning, CSL LTD Venom Poisoning, CSL Limited. Противоядие приготавливают из плазмы крови лошадей, иммунизированных ядом гадюкообразной смертельной змеи (*Acanthophis antarcticus*). Противоядие от укуса гадюкообразной смертельной змеи показано для лечения пациентов, проявляющих симптомы системного отравления после укуса гадюкообразных смертельных змей.

Fav-Afrique, Sanofi, Globulins: FAV-Afrique представляет собой поливалентное противоядие, полученное путем иммунизации лошадей ядом 10 различных видов змей, наиболее опасных в Африке и относящихся к семейству аспидовых и гадюковых. Сохраняются и очищаются только фрагменты F(ab')₂. Указанная сыворотка способна уменьшить количество циркулирующего яда и тем самым снизить его токсичность. Favirept (Sanofi Pasteur) представляет собой поливалентное лошадиное противоядие F(ab')₂,

показанное для лечения укуса змей, обитающих на Ближнем Востоке: африканские гадюки (*Bitis*), эфы (*Echis*), настоящая кобра (*Naja*), рогатые гадюки (*Cerastes*) и гигантские гадюки.

Леофилизованный противоядие против укусов желто-зеленой куфии (хабу), производимое компанией KAKETSUKEN. Леофилизованный противоядие против укусов желто-зеленой куфии содержит иммуноглобулин лошадиного происхождения против яда желто-зеленой куфии (*Trimeresurus flavoviridis*). Леофилизованный противоядие против укусов щитомордника (KAKETSUKEN) является противоядием лошадиного происхождения.

Поливалентный противоядие от укусов змей, выпускаемое компанией CSL LTD: поливалентный противоядие содержит антитела к яду следующих змей: коричневый король или мулга (*Pseudechis australis*), тигровая змея (*Notechis scutatus*), восточная коричневая змея (*Pseudonaja textilis*), гадюкообразная смертельная змея (*Acanthophis antarcticus*), тайпан (*Oxyuranus scutellatus*). Противоядие приготавливают из плазмы лошадей, иммунизированных ядом этих змей. Оно показано для лечения пациентов в Папуа-Новая Гвинея и во всех австралийских штатах, за исключением штата Виктория и штата Тасмания.

Противоядие от укуса ластоногих, выпускаемое компанией "CSL Limited". Противоядие от укуса ластоногих приготавливают из плазмы крови лошадей, иммунизированных ядом морской змеи - носатой энгидрины (*Enhydrina schistose*). Противоядие от укуса морской змеи показано для лечения пациентов, у которых проявляются признаки системного отравления вследствие укуса морской змеи.

Поливалентная сыворотка против яда змей, выпускаемая компанией Serum Institute of India Ltd., представляет собой поливалентную сыворотку против яда змей, приготовленную из гипериммунизированных лошадей против ядов четырех чаще всего встречающихся ядовитых змей в Индии;

Противоядие BIOLOGICAL E, выпускаемое компанией Biological E. Limited, представляет собой поливалентный препарат, перевариваемый пепсином, очищенный и концентрированный, полученный из лошадиной гипериммунной сыворотки. Он используется для нейтрализации яда песчаной эфы (*Echis carinatus*), очковой змеи (*Naja naja*), индийского крайта (*Bangarus caeruleus*) и гадюки Рассела (*Daboia*).

Компания VINS Bioproducts Ltd. Производит антисыворотку, содержащую иммуноглобулины (лошадиные) змеиного яда в качестве активного ингредиента. Вакцина от змеиного яда, выпускаемая компанией United Company for Biological Industries Ltd (BioEgypt) показана в качестве профилактической вакцины против укуса змей.

Противоядие против укуса тайпана, выпускаемое компанией CSL LTD, представляет собой противоядие, приготавливаемое из плазмы лошадей, иммунизированных ядом тайпана (*Oxyuranus scutellatus*), и аналогичные препараты.

Противоядие от укуса тигровой змеи, выпускаемое компанией CSL LTD, приготавливают из плазмы лошадей, иммунизированных ядом тигровой змеи (*Notechis scutatus*). Противоядие от укуса тигровой змеи показано для лечения пациентов, проявляющих симптомы системного отравления после укуса тигровой змеи, медянки или черного полоза.

ViperaTAb содержит иммуноглобулины яда гадюки обыкновенной в качестве активного ингредиента. Противоядие представляет собой поливалентный иммунный-fab (овечий), включающий специфические фрагменты антитела, связывающие и нейтрализующие компоненты яда гадюки обыкновенной, включая протеазы, липазы и кардиотоксины, способствующие их перераспределению из тканей-мишеней и последующего выведения из организма пациента.

Viperafav (Sanofi) представляет собой противоядие поливалентного лошадиного иммуноглобулина F(ab')₂, показанное для профилактики отравления при укусе европейских змей (*Vipera* sp).

Змеиная антисыворотка (KAMADA) Antivipmyn, выпускаемая Institute Bioclon SA de CV, содержит фрагменты иммуноглобулина (лошадиного) против змеиного яда в качестве активного ингредиента. Она представляет собой поливалентные фрагменты F(ab')₂ иммуноглобулина, G (IgG) гипериммуноглобулина, содержащие противозмеиное fab-терапевтическое средство.

IV. Ингибиторы металлопротеиназы

В соответствии с одним аспектом настоящего изобретения комбинированную терапию с использованием ингибитора PLA2 (вареспладиб, метилвареспладиб, 9-[(фенил)метил]-5-карбамоилкарбазол-4-ил)оксиксусная кислота) проводят в комбинации с низкомолекулярным ингибитором, проявляющим активность против металлопротеиназы змеиного яда.

Эффективные "ингибиторы металлопротеиназы" включают, в частности, приномастат, ВВ-94 (маримастат), ВВ-2516 (батимастат), иломастат, их фармацевтически приемлемые соли, энантиомеры, диастереомеры и их смеси.

Следует отметить, что, комбинация вареспладиба и(или) метилвареспладиба без определенных ингибиторов металлопротеиназы и с ними подтверждает свою эффективность при лечении укусов всех основных ядовитых змей в Японии, многих, если не всех, американских гадюк и других змей по всему миру. Кроме того, совместное введение вареспладиба и(или) метилвареспладиба с неостигмином обеспечивает эффективное лечение укусов всех арлекиновых коралловых аспидов, обитающих в Северной Америке и Южной Америке, открытие, имеющее исключительно большое терапевтическое значение, поскольку оно позволяет проводить оперативное лечение при угрожающих жизни симптомах, в частности, путем введения препаратов самим пострадавшим от отравления в результате укуса ядовитых змей.

В некоторых примерах осуществления настоящего изобретения ингибитор металлопротеиназы представляет собой ингибитор, описанный ниже в примере 12 ("Открытие на основе метода высокопроизводительного скрининга эффективных ингибиторов металлопротеиназы яда тещасского гремучника (*C. atrox*) (представляющего гадюк Нового света), или в примере 13 ("пример 13. Открытие на основе метода высокопроизводительного скрининга ингибиторов металлопротеиназ яда эф (*E. carinatus*) (представляющих гадюк Старого света)).

V. Ингибиторы сериновой протеазы

В соответствии с одним аспектом настоящего изобретения комбинированную терапию с использованием ингибитора PLA2 проводят в комбинации с низкомолекулярным ингибитором, проявляющим активность против сериновой протеазы змеиного яда.

Эффективный ингибитор сериновых протеаз включает, в частности, нафамостат и габексат, лейпептин, AEDSF (4-(2-аминоэтил)бензеносульфонилафторид гидрохлорид), их фармацевтически приемлемых солей, энантиомеров, диастереомеров VIII.

Дополнительные вещества

A. Ингибиторы ацетилхолинэстеразы

Ацетилхолин (ACh) является нейромедиатором, синтезированным в цитоплазме нервных клеток и в не нейронных тканях, таких как ткани, имеющиеся в поверхности слизистых оболочек головы и шеи. Когда потенциал действия достигает нервное окончание, везикула высвобождает ацетилхолин в синапс. Находясь в синапсе ацетилхолин диффундирует через синаптическую щель и связывается с постсинаптическим рецептором ацетилхолина. Связывание ацетилхолина со своим рецептором запускает процесс деполяризации постсинаптической клетки. Посредованный рецепторами отклик впоследствии завершается, когда ацетилхолин под воздействием ацетилхолинэстеразы гидролизуется в уксусную кислоту и холин. Ацетилхолинэстераза (AChE; EC 3.1.1.7) представляет собой сериновую протеазу, гидролизующую ацетилхолин. Анализ активности ацетилхолинэстеразы известен специалистам в данной области техники (см., например, Ellman et al., *Biochem. Pharmacol.*, 7, 88-95, 1961).

Ацетилхолин связывается с двумя основными видами рецепторов - никотиновым ацетилхолиновым рецептором (nAChR) и мускариновым ацетилхолиновым рецептором (mAChR). Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы обычно входят в состав плазматических мембран определенных нейронов и находятся на постсинаптической стороне нейромышечных соединений (которая контролирует скелетные мышцы). Мускариновые ацетилхолиновые рецепторы, как правило, входят в состав органов, связанных с парасимпатической нервной системой. Вредному действию нейротоксичных ядов змей или остаточным явлениям недеполяризующих нервно-мышечных блокаторов (NMBAs) можно противодействовать путем ингибирования ацетилхолинэстеразы в нейромышечном соединении. Ацетилхолинэстераза завершает отклик никотинового ацетилхолинового рецептора, гидролизуя ацетилхолин в уксусную кислоту и холин. Возможно, что ингибирование активности ацетилхолинэстеразы предотвращает гидролиз ацетилхолина, что повышает эффективную концентрацию ацетилхолина в нейромышечном соединении и тем самым ослабляет действие α -нейротоксинов и других нейротоксинов, таких как β -нейротоксины или остаточные эффекты NBAs.

Нейротоксины (такие как α -и β -нейротоксины), содержащиеся в змеином яде, конкурируют с ацетилхолином или блокируют ацетилхолин для связывания с никотиновыми ацетилхолиновыми рецепторами. Большинство смертей от ацетилхолин-модулирующих нейротоксинов вызвано параличом скелетных мышц, обусловленным пресинаптически таргетированными токсинами, препятствующими функционированию нервной системы ("пресинаптические") или на участках ацетилхолин-рецептора, связанных с прямой активацией стороны мышечного сокращения ("постсинаптический"). Все это в совокупности, т.е. указанные особенности, нейромышечное соединение и повреждение или нарушение указанных механизмов, ведет к развитию дыхательной недостаточности, и если пострадавшему от укуса не будет оказана медицинская помощь, летальный исход неизбежен. В целом механизм действия указанных нейротоксинов заключается в нарушении нормального функционирования никотинового ацетилхолинового рецептора за счет снижения эффективной концентрации ацетилхолина, имеющегося для связывания с нейромышечным соединением. Это происходит ввиду того, что нейротоксины являются антагонистами никотинового ацетилхолинового рецептора и конкурируют с ацетилхолином за участок связывания никотинового ацетилхолинового рецептора или повреждают сам синапс, снижая способность нейрона высвобождать ацетилхолин. Выраженность физиологической реакции яда/нейротоксина непосредственно коррелирована с аффинностью связывания нейротоксина с никотиновым ацетилхолиновым рецептором или нервными окончаниями, обеспечивающими высвобождение ацетилхолина или обоих.

Эффективные ингибиторы ацетилхолинэстеразы включают, в частности, амбеноний; демаркарий; донепезил; эдрофоний; галантамин; гуперзин А; ладостигил; лактукопикрин; неостигмин; физостигмин; пиридостигмин; ривастигмин; такрин; фосфолин иодид; иунгеремин.

Эффективные антагонисты мускаринового ацетилхолинового рецептора включают конкурентные антагонисты. Антагонист мускаринового ацетилхолинового рецептора может быть обратимым конкурентным антагонистом, и предпочтительно, чтобы он не переходил гематоэнцефалический барьер. Пред-

почтительно, чтобы антагонист мускаринового ацетилхолинового рецептора был избирательным в отношении мускаринового ацетилхолинового рецептора по сравнению с никотиновым ацетилхолиновым рецептором и имел время полужизни от 4 до 6 ч или менее. Эффективные антагонисты мускаринового ацетилхолинового рецептора включают, в частности, гликопирролатиатропин, и предпочтительные комбинации совместной терапии ингибитором ацетилхолинэстеразы - антагонистом мускаринового ацетилхолинового рецептора включают неостигмин и гликопирролат или атропин.

VI. Дозировки и пути введения

В целом, дозировки и пути введения фармацевтических композиций и терапевтических соединений, описание которых приведено в настоящей заявке, определяются в зависимости от размера и состояния субъекта, а также в соответствии со стандартной фармацевтической практикой. Уровни используемых доз могут варьироваться в широком диапазоне и могут быть без каких-либо сложностей определены специалистами в данной области техники. Как правило, используются дозы, количество которых измеряется от миллиграмм до граммов.

Вводимая доза будет варьироваться в зависимости от известных факторов, таких как фармакодинамические характеристики конкретного вещества, способа и пути его введения; возраста, состояния здоровья и веса реципиента; характера и выраженности симптомов, типа сопутствующего лечения, периодичности лечения и требуемого эффекта. Как правило, ежедневная доза может составлять от приблизительно 0,1 до 500 мг на 1 кг веса тела. Обычно доза от 0,5 до 50, предпочтительно от 1 до 25 мг на 1 кг в сутки при введении дозы в виде разделенных доз 1-6 раз в сутки либо в форме пролонгированного высвобождения является эффективной для достижения требуемого результата.

В зависимости от состояния пациента ему могут быть введены дозы в более узком или в более широком диапазоне до проявления симптомов или признаков укуса змей, в то время как более высокие дозы могут быть введены субъекту при показании агрессивного вмешательства для снижения повышающихся уровней sPLA2.

В общем, ингибитор sPLA2 вводят животному таким образом, чтобы в организме находилось его терапевтически эффективное количество. Терапевтически эффективное количество может известным образом быть определено для отдельного пациента путем введения активного соединения при увеличении доз и наблюдения за его воздействием на пациента, заключающегося в следующем: например, уменьшение паралича, уменьшения повреждения тканей или подавление повышающихся уровней активности sPLA2 или уменьшения других симптомов и признаков, связанных с укусами змей.

В целом, соединение должно быть введено таким образом и в такой дозе, чтобы обеспечить достижение уровня концентраций ингибитора sPLA2 или другого ингибитора в крови животного в пределах от 0,01 до 5000 нг/мл и предпочтительно уровня концентрации в пределах от 1 до 1000 нг/мл.

Далее настоящее изобретение проиллюстрировано на нижеприведенных неограничивающих примерах.

Пример 1. Эксперименты in vitro.

Обзор. Первоначальные эксперименты были проведены с целью оценки активности sPLA2 с использованием аналога 1,2-диглицераноилфосфатидилхолина, и они не были оптимизированы, однако они позволили получить исключительно надежные результаты, подтверждающие идею изобретателя о необходимости проведения более тщательных испытаний вареспладиба и метилвареспладиба.

Предпосылки. Фосфолипаза A2 (PLA2) катализирует гидролиз фосфолипидов в позиции sn-2, в результате которого получают свободную жирную кислоту и лизофосфолипид. Считается, что высвобождение арахидоновой кислоты из мембранных фосфолипидов с помощью PLA2 является ключевой стадией контроля выработки эйкозаноида внутри клетки. Контроль PLA2 пчелиного яда представлял собой раствор PLA2 пчелиного яда в количестве 100 мкг/мл, поставляемый в качестве положительного контроля в комплекте (Каталог комплектов Abeam номер abl33089). В качестве субстрата для МР использовали DQ-желатин, и анализ проводили в соответствии с инструкциями производителя по проведению анализа желатиназы EnzChek. Активность МР яда не была оптимизирована при проведении начального эксперимента, однако были оптимизированы скорости реакции в ходе экспериментов, проводимых лабораторией по независимому подрядному контракту. Анализ SP был проведен с использованием Nct-бензоил-L-аргинин-7-амидо-4-метилкумарингидрохлорида. Указанные комплекты хранили в соответствии с указанными требованиями при -20°C. Если не указано иное, при проведении экспериментов был использован только неочищенный, нефракционированный лиофилизированный яд, закупленный у компании Sigma или Miami Serpentarium.

Установка планшета. Следовали инструкциям производителей (перефразированы в данном контексте), если не указано иное. Анализ данных: xcel в соответствии с рекомендациями производителей. Аналитические образцы МР и SP были подготовлены и размещали в планшете таким же образом, как и аналитические образцы PLA2, за тем исключением, что были использованы другие субстраты и флуорофору. Фосфатно-солевой буфер (PSB) использовали в качестве буфера в случае с аналитическими образцами МР и SP, и поглощаемость была определена при 495 нм. Субстратом для МР служил DQ желатин, и анализ проводили в соответствии с инструкциями производителя по проведению анализа желатиназы

EnzChek, за тем исключением, что эксперименты проводили нестандартно при 37°C для определения температуры тела человека, и начальные эксперименты по активности PLA2, MP и активности SP не были оптимизированы для скрининга (например, использовали исключительно большие дозы яда - 10 мг/мл маточного раствора во всех случаях, т.к. качество яда не было известно при конечной концентрации 0,444 мг/мл в тестовых лунках). Анализ SP был выполнен с использованием Na-бензоил-L-аргинин-7-амидо-4-метилкумарингидрохлорида (Sigma). Особенности метода контрактной лаборатории отличаются от методов начальных экспериментов, проводимых изобретателем настоящего изобретения в плане оптимизации яда и субстрата, размера планшета (384 лунок вместо 96), объема и температуры и других факторов, включая различных операторов, таких как описаны непосредственно ниже, выполненных в соответствии с первыми пилотными экспериментами и в дальнейшем продолженными контрактной лабораторией.

Пример 2. Низкомолекулярный скрининг и эксперименты зависимости доза-ответ.

Низкомолекулярный скрининг и эксперимент зависимости доза-ответ проводили в Йельском центре по молекулярным открытиям (Yale Center for Molecular Discovery). Используемая аппаратура при наличии показаний включала автоматическую пипетирующую станцию Tecan EVO (2), жидкостный манипулятор TecanAquarius, автоматическую пипетирующую систему MatrixPlateMatePlus (2), роботов для переноса жидкости MatrixPlateMate2X2 и дозаторов жидкости Titertek и ThermoMultidrop (7). Сканирующие планшеты-ридеры PerkinElmerEnVision (3) и Tecaninfinite M1000 (2) обеспечивают точное измерение поглощающей способности, флюоресценции, поляризации флюоресценции и люминесценции в форматах 96- и 384-луночных планшетов. Система визуализации GE In Cell Analyzer 2200 позволяет получить многоцветные флюоресцентные изображения проходящего света с планшетов. Тестируемые коллекции, используемые в первой фазе скрининга, были выбраны изобретателем или отобраны из библиотек известных соединений и природных продуктов, имеющихся на момент проведения экспериментов по отобраным ядам, в том числе библиотеки NCC, GenPlus, Pharmakon, BioactiveLipids, ProteaseInhibitors, ProcuredDrugs и одобренные FDA лекарственные средства. Библиотека GenPlus (NINDS Custom Collection) из MicroSource Discovery Systems содержит 960 соединений. Этот уникальный подбор известных биоактивных соединений обеспечивает проведение одновременной оценки сотен реализуемых на рынке лекарственных средств и биохимических стандартов. Коллекция библиотеки Pharmakon 1600 (MicroSource) включает известные лекарственные средства, используемые во всем мире или исследуемые при проведении клинических испытаний. Библиотека Enzo включает комплект 640 соединений лекарственных средств, одобренных Федеральным управлением по лекарственным средствам, и содержит информацию о биоактивности, безопасности и биодоступности в отношении каждого репрезентативного соединения.

Каждый анализ был охарактеризован аналогичным образом с использованием хорошо отработанной в Центре методики. Анализы, как правило, выполняют в 384-луночных микротитрационных планшетах. В соответствии со стандартной процедурой три популяции образцов добавляли к каждому планшету; две контрольные популяции (32 лунки на контроль в 384-луночном планшете) и испытываемая популяция (320 лунок), в которые помещают соединения. Лунки с положительным контролем (с+) были обработаны с целью моделирования результата анализа активных низкомолекулярных соединений. В лунки отрицательного контроля (с-) добавляли раствор ДМСО (в который вводят соединения). Сигналы из лунок повторного положительного и отрицательного контроля использовали для оценки эффективности аналитического образца, в частности его чувствительности и воспроизводимости, а также его приемлемости для высокопроизводительного скрининга. Статистическое значение - Z'-фактор - математически представляет разделение сигналов между двумя популяциями контроля и возможности анализа, позволяющие отличать активные соединения с высокой вероятностью от пассивных соединений (J-H. Zhang, TDY Chung, KR. Oldenburg, (1999), A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughputs creening assays, J. Biomol. Screen, 4, 67-73). Был подсчитан 71 фактор по средним сигналам положительного и отрицательного контроля и их стандартные отклонения по каждому планшету с использованием формулы: $Z' = 1 - [3(\sigma_{c+} + \sigma_{c-}) / (\mu_{c+} - \mu_{c-})]$.

Глубокий анализ по скринингу единичных соединений позволил неизменно определять Z'-факторы со значением более 0,5. Обычно высокопроизводительный скрининг образцов с высокой дискриминационной способностью также позволяет получить отношения сигнал/фон (средние сигналы положительного контроля, деленные на отрицательный контроль) более пяти и коэффициенты вариации (средне скорректированные стандартные отклонения) для положительного и отрицательного контроля ниже 15% (Y. Sui, Z. Qu, (2007), Alternative statistical parameter for high-throughput screening assay quality assessment, J.Biomo. lScreen, 12, 229-34).

В каждом случае проводилась оценка целого ряда общих экспериментальных параметров, включающих тип планшета, количество разведений реактивов, протоколы аликвотирования, референсные стандарты, комплекты спектроскопических фильтров, параметры обнаружения и чувствительность к диметилсульфоксиду (ДМСО). В общем протоколе реагенты добавляли последовательно для достижения заполнения всего объема лунок в размере 20 мкл в 384-луночных планшетах с использованием жидкост-

ного манипулятора Aquarius (Tecan) или роботизированной пипетирующей станции PlateMatePlus (Matrix) дозаторов жидкости Multidrop (TiterTek или Thermo). Соединения из химических лабораторий доводили до конечной концентрации, составлявшей приблизительно 10 мкМ/лунку, с использованием комплекта головок игольчатого микродозатора с наконечниками на 384 лунки (V&P Scientific, Inc.) на Aquarius или PlateMatePlus. Количественное определение сигналов проводится на планшет-ридерах или на системе визуализации с использованием алгоритмов комплексного анализа изображений или программного обеспечения CellProfiler. Данные первичного скрининга анализируют с использованием коммерческого программного обеспечения и пакета баз данных (ActivityBase (IDBS)) с целью мониторинга проведения анализа и определения порогов на основе сигналов аналитических образцов для определения соединений, проявляющих высокую активность, и обоснования дальнейшей характеристики. После оценки, проведенной медицинскими химиками, соединения-лидеры (проявляющие физиологическую активность) могут быть размещены в планшетах в любом количестве форматов с целью подтверждения, обнаружения артефактов, проведения испытаний на клеточных линиях млекопитающих или анализа зависимости "доза-эффект". Как указывалось, данные были нанесены на графики и подогнаны к моделям, таким как значения концентрации полумаксимального ингибирования (IC50) или полумаксимальной эффективной концентрации вещества (EC50).

Пример 3. Анализ ингибирования активности sPLA2.

Был проведен скрининг ингибиторов sPLA2, MP и SP яда. Маточные растворы яда при концентрации 10 мг/мл использовали без стандартного разведения для проведения анализа различных ингибиторов sPLA2, MP и SP. Конечная концентрация яда в аналитических образцах была исключительно высокой и составляла 0,444 мг/мл. Следует отметить, что несмотря на избыточное поглощение субстрата в контрольных лунках, ряд ингибиторов проявил выраженную способность ингибировать поглощение субстрата. Наиболее значимыми из указанных ингибиторов явились вареспладиб и метилвареспладиб, проявлявшие эффект даже при концентрациях яда, превышающих в 100000 раз оптимальные концентрации (см., например, фиг. 4 концентрации яда для сравнения, используя те же комплекты и методы). Выводы в результате обзора данных, полученных при проведении трех анализов маточных растворов яда, заключались в том, что в отношении ряда ядов животного происхождения вареспладиб и метилвареспладиб проявили ингибирование MP и SP в некоторых случаях, позволяя предположить, что они могли бы явиться высокоценным универсальным антидотом и ключевым элементом широкого спектра антидотов яда змей.

На фиг. 1 проиллюстрирован период действия PLA2 змеиного яда в присутствии вареспладиба (100 мкМ) или метилвареспладиба (100 мкМ). Несмотря на использование избыточного количества яда (при конечной концентрации 0,444 мг/мл), вареспладиб ингибировал активность PLA2 во всех протестированных змеиных ядах, и следует отметить, что ингибирование также в ряде случаев проявило его пролекарство - метилвареспладиб (это, в частности, касается яда песчаной эфы (*Echis carinatus*)). Стрелка указывает на вареспладиб, и направленный вниз треугольник обозначает случаи, при которых пролекарство метилвареспладиб ('Met-Вареспладиб') проявило выраженное и существенное ингибирование PLA2 змеиного яда.

Пример 4. Анализ ингибирования активности MP.

На фиг. 2А-2В проиллюстрировано ингибирование активности металлопротеиназы при комбинировании яда (0,444 мг/мл) с ингибитором. На фиг. 2А показан период действия активности металлопротеиназы при комбинировании яда (0,444 мг/мл) с ингибитором (100 мкМ). Ингибиторы MP батимастат и маримастат наиболее последовательно проявляют выраженное ингибирование протестированных ядов животного происхождения. Ацетилцистеин (NAC), диметилэйкозодиеновая кислота (DEDA) и дигидроксibenзойная кислота (DBA) также проявили различные уровни ингибирования MP. Следует отметить, что вареспладиб проявил ингибирование активности MP в ряде змеиных ядов, при этом отдельно следует отметить яд гадюки Рассела. На фиг. 2В на гистограмме показано, что с течением времени (ось x) маримастат, батимастат и вареспладиб продемонстрировали сравнительное ингибирование яда гадюки Рассела (*Daboia russelli*) при 100 мкМ.

Насколько известно изобретателю, ранее не было никаких данных об ингибиторной активности вареспладиба против яда MP. Указанные результаты предполагают либо прямое ингибирование MP, либо регуляторную роль PLA2 в активности указанных ключевых компонентов яда, либо как первое, так и второе. Это дает основания предположить, что одно средство или комбинация всего лишь из двух или трех лекарственных средств обеспечивают успешное лечение укусов ряда опасных, смертоносных змей без необходимости введения или приема противоядия, и идея была испытана, как описано в примере 8.

Пример 5. Анализ ингибирования активности SP.

На фиг. 3 приведены данные из той же самой серии, в которой использовали высокие концентрации яда (конечная концентрация 0,444 мг/мл) для проведения анализа ингибирования активности sPLA2, MP и SP, используя методы, описанные в примере 1. Даже при исключительно высоких концентрациях яда вареспладиб и метилвареспладиб оказывали сильное ингибиторное действие на змеиный яд сериновых протеаз по сравнению с маримастатом и батимастатом при одинаковых концентрациях (100 мкМ) *in vitro*.

Пример 6. Анализ ингибирования активности sPLA2.

Для подтверждения результатов предшествующих экспериментов, в которых использовались только растворы ядов с высокой концентрацией для анализа воздействия на sPLA2, и было проведено поглощение субстрата, выбранные ингибиторы PLA2, такие как вареспладиб и дарапладиб с более низкими концентрациями, были использованы при в большей степени оптимизированных условиях проведения анализа и в соответствии с рекомендациями производителя. Другое отличие указанного анализа от анализа, описание которого приведено со ссылкой на фиг. 1, 2А и 3, заключается в том, что анализы проводили при 25°C. Ингибирование PLA2 змеиного яда было очевидно в отношении всех змей так называемой "Большой 4" Индии: (индийская кобра) (*Naja naja*), индийский крайт (*B. caeruleus*) (и ленточный крайт (*B. fasciatus*)), а также песчаная эфа (*E. carinatus*) и гадюка Рассела (*D. Russellii*). Следует отметить, что активность PLA2 пчелиного яда не была ингибирована ни вареспладибом, ни дарапладибом.

На фиг. 4 проиллюстрировано, что вареспладиб, но не дарапладиб (ингибитор Lp-PLA2) ингибировал PLA2 змеиного яда *in vitro*. Стоит отметить, что PLA2 пчелиного яда не была ингибирована ни вареспладибом, ни дарапладибом. Отсутствовал явный синергетический эффект между дарапладибом и вареспладибом при проведении испытаний двух средств в комбинации (данные не приведены). Данные были нормализованы к контролю яда. Анализы были проведены, как и в примере 1, за тем исключением, что активность яда была оптимизирована до испытания лекарственного средства, и были проведены испытания при значительно более низких концентрациях вареспладиба, тем не менее, пришли к тому же заключению: сильное ингибирование активности фермента PLA2 змеиного яда.

На фиг. 5А-5R проиллюстрировано, что вареспладиб и метилвареспладиб ингибировали измеренную активность sPLA2 ряда важных с медицинской точки зрения ядов животного происхождения *in vitro* (методы доза-ответ в примере 2). На фиг. 5А индийская кобра (*Naja naja*), 5В крайт (*Bungarus caeruleus*), 5С гадюка Рассела (*Daboia russelli*), 5D песчаная эфа (*Echis carinatus*), 5Е тайпан (*Oxyuranus scutellatus*) и 5F арлекиновый коралловый аспид (*Micrurus fulvius*) показано, что вареспладиб и метилвареспладиб являются менее активными ингибиторами sPLA2 пчелиного яда 5G при концентрации вплоть до 1 мкМ, и только слабый эффект при концентрациях до 100 мкМ, фиг. 5Н черная мамба (*Dendroaspis polylepis*), 5I гадюкообразная смертельная змея (*Acanthophis antarcticus*), 5J гадюка обыкновенная, 5К короткохвостый щитомордник (*A blornhoffiibrevicaudus*), 5L ромбический гремучник (*Crotalus adamanteus*), 5М медноголовый щитомордник (*Agkistrodon contortrix*), 5N техасский гремучник (*Crotalus atrox*), 5О мойавский ромбический гремучник (*Crotalus scutulatus scutulatus*), 5Р водяной щитомордник (*Agkistrodon piscivorus*), 5Q техасский гремучник (*Crotalus atrox*), 5R мойавский ромбический гремучник (*Crotalus scutulatus*) позволяет повторить эксперимент. Широкий диапазон действия и высокая активность вареспладиба (V) и метилвареспладиба (V-m) против PLA2 репрезентативного змеиного яда по всему миру являются глубоко впечатляющими.

Пример 7. Вареспладиб обладает защитными и терапевтически эффективными свойствами против яда арлекинового кораллового аспиды (*M. Fulvius*) у мышей и крыс.

Указанный пример демонстрирует, что введение вареспладиба (4 мг/кг, если не указано иное) позволило защитить мышей, отравленных ядом арлекинового кораллового аспиды (4 мг/кг).

Мышам был подкожно введен яд арлекинового кораллового аспиды, приблизительно в 4 раза превышающий LD50 (обычно оцениваемую в размере 1,3 мг/кг, подкожно) (0,1 мг яда арлекинового кораллового аспиды для приблизительной дозы ~4 мг/кг). До инъекции яда животным вводили подкожно либо полную дозу в размере 0,1 мг вспомогательного вещества вареспладиба (имитация лечения), либо расчетную концентрацию вареспладиба в размере 4 мг/кг за ~10-15 мин до введения яда.

Выжившие животные были умерщвлены при вдыхании CO₂ по завершению эксперимента и периодов наблюдения в пределах от ~12 до 30 ч (при этом предел выживания устанавливался на 24 ч). Стоит отметить, что введение только однократных доз вареспладиба обеспечило выживание многих животных, а не лишь продление их период выживания. Также следует отметить фактическое отсутствие геморрагических осложнений и острого гемолиза у контрольной группы животных. Фактически отсутствовал острый гемолиз у животных, получивших лечение (например, 6G), а также обнаружилось незначительное или полное отсутствие легочного кровотечения при вскрытии. Вызванное ядом повышение уровня PLA2 было подавлено вареспладибом и соответствовало как клиническим описаниям животных, так и острому гемолизу (или его отсутствию). Обычно отмечалось, что животные были бодрыми, активными и реагирующими на терапию с использованием терапевтически эффективных доз вареспладиба. Лечение мышей метилвареспладибом до введения высоких доз яда обеспечило полную защиту от действия яда и дало основания полагать, что незамедлительное лечение в полевых условиях укусов за счет приема перорального состава является вполне реальным путем блокирования важных компонентов яда до того, как они распространились по организму, как это обычно случается к моменту времени, когда пациентам будет предоставлена медицинская помощь. Один важный результат указанных экспериментов (при пероральном и парентеральном введении) заключается в том, что один антидот для одного или более важных с медицинской точки зрения змеиных ядов позволяет частично нейтрализовать действие как нейротоксичных, так и гемотоксичных компонентов змеиного яда, обеспечивая при этом спасение жизни. Поскольку несколько мышей погибло только при лечении однократной дозой (при отсутствии исследований по оп-

ределению доз), предполагается, что ингибитор PLA2 (например, вареспладиб) может быть введен многократно в некоторых лечебных схемах, и(или) после лечения вареспладибом может последовать вспомогательное лечение с использованием других лекарственных средств. На фиг. 6А-Н показано действие вареспладиба у мышей или крыс, отравленных ядом арлекинового кораллового аспида при различных концентрациях, обычно при 4-8 мг/кг, и прохождение предварительного лечения или лечения обычно с одноразовым приемом вареспладиба создает большие преимущества выживания по сравнению с животными, получавшими при лечении плацебо (вспомогательное вещество). У мышей вареспладиб 4-8 мг/кг подкожно или перорально с метилвареспладибом, по усмотрению. У крыс вареспладиб или вспомогательное вещество вводили внутривенно на 30 секунде или 5 минуте после подкожного введения яда при 4 мг/кг или 8 мг/кг. Проводили отбор проб крови и анализ на активность sPLA2, при этом образцы брали через хирургически имплантированный в яремную вену катетер через точные промежутки времени (исходное время, 30 мин, 1 ч и 4 ч). Именно на основании такого отбора проб впервые было сделано наблюдение о создании защиты от гемолиза (6G). Указанное неожиданное действие вареспладиба - защита от гемолиза - дает основания полагать без привязки к нескольким механизмам, что основанные на вареспладибе лекарственные средства позволяют предотвратить или ослабить коагулопатию и уменьшить повреждение тканей.

На фиг. 6А показан исход лечения 5 из 5 (100%) мышей, которым подкожно ввели 4 мг/кг яда арлекинового кораллового аспида. Контрольные мыши быстро погибли от паралитических и геморрагических осложнений. 0 из 5 (0%) мышей, которым ввели предварительно вареспладиб (4 мг/кг) за несколько минут до инъектирования яда, погибло в течение 8 ч. Только у одной мыши появились слабые симптомы геморрагии, однако они были в меньшей степени выражены, чем у контрольных мышей. У выживших мышей не было обнаружено ярко выраженных симптомов коагулопатии или геморрагии на момент смерти (2 из 5). Две мыши выжили, и у одной на 30-й час проявился лишь незначительный блефароптоз, который практически исчез в интервале времени от 24 до 30 ч после введения яда. На графике выживаемости Каплана-Мейера показана высокая результативность выживаемости при лечении вареспладибом. На фиг. 6В мышам, которым скормили галеты с метилвареспладибом или вспомогательным веществом в неограниченном количестве, была введена высокая доза яда арлекинового кораллового аспида приблизительно 5 ч спустя после скармливания галет (N=2 в каждой группе). Ни у одной из получивших противоядие мышей, не проявились какие-либо признаки или симптомы отравлений, и в течение всего времени мыши оставались бодрыми, активными и реагирующими на терапию и возобновляли свой бег в колесе несколько минут спустя после введения яда. На фиг. 6С яд и вареспладиб (4 мг/кг) или яд и вспомогательное вещество смешивали непосредственно до введения и инъектировали подкожно. На 5-й час (300 мин, указывающая вниз стрелка) выжившим животным повторно вводили 1/2 дозы вареспладиба (2 мг/кг) или вспомогательного вещества. 5 из 5 получивших ингибитор мышей выжили до конечной временной точки, составлявшей 24 ч (1440 мин), и 4 из 5 контрольных мышей в конечном счете погибли. На фиг. 6D приведены результаты двух экспериментов с использованием одного и того же протокола. Мышам либо вводили яд и плацебо/вспомогательное вещество (N=7), метилвареспладиб (N=3) или вареспладиб (N=7) приблизительно в интервале времени от 30 с до 1,5 мин после введения яда. Это первая демонстрация того, что вареспладиб может быть введен в терапевтическом режиме в качестве единичного однокомпонентного терапевтического средства лечения отравления змеиным ядом. Подтверждающие эксперименты и результаты, приведенные на фиг. 6Е-Н, были проведены на крысах контрактной лабораторией для оценки возросшего объема информации об активности вареспладиба действовать в терапевтическом режиме и определения того, что степень его воздействия при внутривенном введении была такой же, как и при подкожном введении. На фиг. 6Е и 6F яд арлекинового кораллового аспида вводили подкожно (4 мг/кг или 8 мг/кг) и затем вводили вспомогательное вещество или вареспладиб в количестве 8 мг/кг через 30 с или 5 мин после отравления змеиным ядом. 12 из 12 животных, которым были введены указанные вещества, выжили в течение периода времени, составившего 24 ч, при этом 10 из 12 крыс оставались "бодрыми, активными и отвечающими на лечение", в то время как 6 из 6 контрольных животных погибли приблизительно через 500 мин. Образцы сыворотки всех контрольных животных показали острый гемолиз, в то время как у животных, получивших препарат, не наблюдалось гемолиза или же он наблюдался в исключительно слабовыраженной форме (фиг. 6G - образец справа, 4-часовой контрольный момент времени, T=5 мин). После умерщвления обнаружилось, что у животных, получивших препарат, либо не наблюдалось легочного кровотечения, либо оно имело слабо выраженную форму, в то время как у всех исследованных контрольных животных имелись острые симптомы легочного кровотечения. На фиг. 6Н показано существенное подавление активности PLA2, несмотря на высокие дозы яда арлекинового кораллового аспида, введенного подкожно, в результате чего летальность составила 100% в течение 8 ч (яд/вспомогательное вещество), и 100% выживших животных, получивших ингибиторы (4 мг/кг яда N=6; 8 мг/кг яда N=6). 12 из 12 выжившим животным был внутривенно введен вареспладиб либо на 30-й секунде, либо на 5 минуте после введения яда.

Пример 8 (фиг. 7). Лекарственные средства на основе вареспладиба обеспечивают защиту от летального исхода при отравлении змеиным ядом ямголовых.

Как показано на фиг. 7, вареспладиб и метилвареспладиб служат основой для успешного медика-

ментозного лечения при отравлении змеиным ядом гадюки по отдельности или в сочетании с таким ингибитором МР, как, например, приномастат, или ингибитором SP, принимаемым парентерально или перорально. Фиг. 7А. Мыши, которым вводили совместно яд мойавского ромбического гремучника (*C. scutellatus*) и однократную дозу вареспладиба, пережили мышей контрольной группы, которым вводили только яд (яд только контрольной группе, подкожно N=4; яд + вареспладиб подкожно N=4). Фиг. 7В.

Мыши, получавшие метил-вареспладиб + маримастат в неограниченном количестве до отравления змеиным ядом, пережили мышей контрольной группы, которым инъецировали только яд (только яд подкожно N=4; яд + перорально вареспладиб/маримастат N=4). Фиг. 7С. Мыши, которым вводили совместно яд и однократную дозу вареспладиба + смесь маримастата/батимастата), пережили мышей контрольной группы (только яд, подкожно, N=3; смесь яд + вареспладиб/ингибитор МР, N=3). Фиг. 7D. Мыши, получавшие в неограниченном количестве галеты, обработанные метил-вареспладибом и приномастатом, были защищены от летального исхода от яда техасского гремучника (*C. atrox*), который вводили им подкожно спустя 3 ч после того, как галеты были положены в клетку, и в результате наблюдения было непосредственно установлено, что каждая мышь по меньшей мере один раз кормилась указанными галетами (N=4 в каждой группе).

Пример 9 (фиг. 8). Вареспладиб обеспечивает защиту мышей от летального исхода при отравлении ядом гадюки Расселла (*Daboia russelli*).

Гадюка Рассела (*Daboia russelli*) является основной змеей-убийцей среди "змей Большой 4" в Индии. Катастрофические гематологические и неврологические нарушения являются обычными проявлениями, характеризующимися исключительно изменчивой картиной нарушения свертываемости крови и параличом, что приводит к угрозе катастрофы неврологической, почечной и двигательной функций конечностей. Вареспладиб в данном сценарии выполняет защитную функцию против инсульта периферической и центральной нервных систем, почечной недостаточности и серьезных нарушений свертываемости крови. Мыши, которым предварительно подкожно ввели вареспладиб (4 мг/кг) за 60-90 мин до введения им смертельной дозы яда гадюки Рассела, пережили контрольную группу мышей, как показано на фиг. 8 (N=3 в каждой группе). У всех мышей наблюдалась локальная гематома в месте инъекции, но контрольная группа мышей погибла исключительно от паралича. Все получавшие препарат животные прожили 24 ч, но на 30-й час ослабели и погибли по неизвестной причине, возможно связанной с действием яда - прямым или косвенным.

Пример 10 (фиг. 9). Вареспладиб обеспечивает защиту и является терапевтически эффективным средством против яда гадюки обыкновенной *in vivo* у мышей.

Как показано на фиг. 9, мыши, которым инъецировали смертельные дозы яда гадюки обыкновенной, пережили или были полностью защищены от гибели при подкожном введении вареспладиба (4 или 8 мг/кг, если не указано иное) при одновременном введении яда или после его введения. Все мыши, которым внутривенно вводили вареспладиб после введения яда, прожили 24 ч. Обыкновенная гадюка (*V. betrus*) является наиболее распространенной гадюкой в мире, обитающей по всей Европе и Евразии вплоть до Северного полярного круга. Она вырабатывает как гемо-, так и нейротоксины, особенно опасные для детей, домашних животных и крупных животных, таких как лошади. Фиг. 9А. Мыши, которым инъецировали яд и вареспладиб одновременно в подкожное пространство, пережили контрольную группу мышей (яд + вспомогательное вещество) (N=7 в каждой группе). Фиг. 9В. Мыши, которым инъецировали летальные дозы яда непосредственно до подкожного введения вареспладиба, пережили контрольную группу мышей (N=7 в каждой группе). У мышей, инъецированных только одним вареспладибом, не проявилось никаких признаков токсического воздействия (N=2). 9С. Вареспладиб, вводимый подкожно или внутривенно (8 мг/кг) в латеральную хвостовую вену после введения яда, обеспечил значительный уровень выживаемости: 5 из 5 животных, прошедших лечение внутривенным введением вареспладиба, прожили в течение 24 ч в некомфортных условиях, в то время как 0 из 5 животных контрольной группы прожили не более 7 ч. 4 из 5 животных, прошедших лечение после введения яда (после подкожного введения яда им был подкожно введен вареспладиб), пережили контрольную группу мышей.

Пример 11. Комбинация противоядия и вареспладиба.

Целью настоящего эксперимента является определение того, каким образом вареспладиб и противоядие, CroFab® (поливалентный иммунный FAb-антидот против яда семейства ямкоголовых (овечий); BTG Pic.) взаимодействуют для блокирования PLA2 - основного компонента яда. Используя процедуру анализа, описание которой приведено в примере 2, была определена IC50% отдельно для CroFab®, отдельно для вареспладиба и в сочетании вареспладиба с CroFab®. Невозможно было предсказать, будут ли две композиции несовместимы или будут оказывать аддитивное действие. Следует отметить, что наблюдался синергетический эффект.

Расчет независимости по Блисссу (анализ проводят с использованием метода регрессии, разработанного и описанного в работе Cokol et al. (2011) Systematic exploration of synergistic drug pairs. Molecular System Biology. 7: 544). В первом уравнении основным количеством является "бета". Значение "бета" менее 1 указывает на синергизм, в то время как значение "бета" более 1 дает основание предполагать антагонизм. Результаты анализа заключаются в следующем: "p-значение" - уровень значимости значения

бета. Значения бета (в круглых скобках), указывающие на синергизм между вареспладибом и поливалентным противоядием "CroFab®" яда ямкоголовых были следующими: медноголовый щитомордник (*A. contortrix*) (0,86), техасский гремучник (*C. atrox*) (0,848), ромбический гремучник (*C. adamanteus*) (0,855) и гадюкообразная смертельная змея (*A. antarcticus*) австралийский аспид, относимый к кобрам (0,725). Для каждого из этих четырех примеров р-значение <0,0001. Значения концентраций IC50 для указанного эксперимента приведены в табл. 1 ниже.

Таблица 1

Синергетическая активность противоядия (CroFab®) плюс низкомолекулярный ингибитор sPLA2 (вареспладиб)

	Вареспладиб IC50 (нМ) с CroFab®	Вареспладиб (IC50 нМ)	CroFab® (IC50 мг/мл)
Водяной щитомордник	0.05	0.28	2.86
Медноголовый щитомордник	0.045	0.22	5.51
Мойавский ромбический гремучник	0.82	1.51	16.2
Техасский гремучник	0.07	0.32	4.85
Ромбический гремучник	0.05	0.25	3.96
Гадюкообразная смертельная змея	0.43	0.74	190.6

Вышеуказанная экспериментальная процедура была проведена для отобранных ингибиторов МР, используемых по отдельности и в комбинации только с CroFab® и с вареспладибом (табл. 2), ниже. В табл. 2 представлено действие различных ингибиторов в сочетании с противоядием.

В этом примере с CroFab® была определена концентрация, при которой CroFab® ингибировал 50% активности МР змеиного яда, и затем добавляли ингибиторы с целью определения того, будет ли обеспечиваться эффективная нейтрализация остальных 50% МР. Приведены данные по комбинациям в тех случаях, когда добавляли вареспладиб (1 мкМ), с целью нейтрализации фоновой активности PLA2. Были выбраны приномастат, маримастат и батимастат исходя из их способности нейтрализовать МР змеиного яда, как определено в экспериментах в табл. 1. Восточный щитомордник (*A. blomhoffi*) был включен для определения того, возможно ли будет более эффективно проводиться лечение в условиях, при которых противоядие не показано для конкретного вида змеи, путем добавления одного или более низкомолекулярных ингибиторов.

Иллюстрация воздействия различных ингибиторов на металлопротеазу змеиного яда. Короткохвостый подвид восточного щитомордника (*A. blomhoffibrevicaudis*) не является змеей, против яда которой показана терапия с использованием противоядия CroFab®, но добавление приномастата к противоядию или комбинация приномастат + вареспладиб без противоядия иллюстрирует два новых метода, с помощью которых может быть повышена эффективность специфического поливалентного противоядия или параспецифического противоядия (низкомолекулярный ингибитор + противоядие или низкомолекулярный ингибитор, такой как приномастат + молекула на основе вареспладиба).

Таблица 2

Действие различных ингибиторов в сочетании с противоядием

Яд	Комбинация ингибиторов	R-квадрат	IC500 для ингибитора (мкМ) CroFab® (мг/мл)
Короткохвостый подвид восточного щитомордника	Только один CroFab®	0.995	0.37
	CroFab® + Приномастат	0.997	0.02
	Приномастат+Вареспладиб	0.993	~ 0.02
Техасский гремучник	Только один CroFab®	0.996	0.18
	CroFab® + Приномастат	0.980	0.02
	Приномастат+Вареспладиб	0.975	0.04
Каскавелла, подвид <i>terrificus</i>	Только один CroFab®	0.998	0.09
	CroFab® + Приномастат	0.929	~ 0.01
	Приномастат+Вареспладиб	0.987	~ 0.01
Мойавский ромбический гремучник	Только один CroFab®	0.998	0.02
	CroFab® + Приномастат	0.638	~ 0.01
	Приномастат+Вареспладиб	0.920	0.002

Были использованы методы, используемые в примере 2 выше, с целью получения значений концентрации полумаксимального ингибирования (IC50) для вареспладиба, метилвареспладиба (для ингибирования PLA2) и для приномастата, маримастата, батимастата, вориностата, иломастата, габексата и нафамостата по различным ядам в соответствии с данными, приведенными в табл. 3-8, фиг. 15-20 и 10-14.

Результаты указанных экспериментов были табулированы и представлены в таблицах и на чертежах. Результаты подтверждают, что во многих случаях значения концентрации полумаксимального ингибирования (IC₅₀) вареспладиба и метилвареспладиба для ингибирования PLA₂ являются исключительно низкими для широкого спектра змеиных ядов. Это же справедливо в отношении значений концентрации полумаксимального ингибирования (IC₅₀) приномастата, маримастата и батимистата для ингибирования металлопротеиназы. Как указано, вориностат, габексатинафамостат были несколько менее эффективными, в целом, при IC₅₀ микромолекулярном диапазоне. Ранее не было известно, что приномастат обладает таким широким диапазоном подавляющего действия на змеиный яд.

Пример 13. Метод высокопроизводительного скрининга. Разработка эффективных ингибиторов МР яда техасского гремучника (*C. atrox*) (представляющего гадюк Нового света).

Высокопроизводительный скрининг (HTS) в соответствии с описанием в примере 2 проводили для определения ингибиторов МР яда техасского гремучника (*C. atrox*), являющихся эффективными в комбинации с вареспладибом или метилвареспладибом, для лечения отравления, вызванного ядом *C. atrox* и ядом других гадюк Нового света. Результаты приведены в виде процентного (%) снижения активности МР. Прошедшие скрининг вещества включали одобренные Федеральным управлением по лекарственным средствам США лекарственные средства, биоактивные липиды и ингибиторы протеаз библиотеки (YCMD библиотеки: GenPlus, лекарственные средства, одобренные Федеральным управлением по лекарственным средствам США, NCC, Pharmakon 1600, Bioactivelipid and Protease). Нижеприведенные вещества ингибировали, по меньшей мере, 1% активности МР. Следует отметить, что наблюдалось ингибирование МР при использовании габексата. Габексат является одобренным и зарегистрированным для продажи препаратом, обладающим широким диапазоном действия на воспалительные пути и являющимся ингибитором сериновой протеазы. Не предполагалось, что ингибитор SP будет также ингибировать цинковую протеазу, так же как и семейство МР. CGS 27023 позволял достичь эффект >95%. Актинонин обладает 92% активностью и может считаться эффективным в экстренных случаях. Примечательно то, что вориностат обладает 42% активностью. Аспартам при 6,31% и другие искусственные подсластители могут быть эффективными в качестве парциальных ингибиторов, служащих для улучшения вкуса вареспладиба и метилвареспладиба, которые имеют слегка горьковатый вкус, а вареспладиб слегка солоноватый вкус при смешивании с бикарбонатом и 10% декстрозой (личное наблюдение).

Пример 14. Метод высокопроизводительного скрининга. Разработка ингибиторов МР против укуса песчаной эфы *E. carinatus* (представляющей гадюк Старого света).

Высокопроизводительный скрининг (HTS) в соответствии с описанием в примере 2 проводили для определения ингибитора МР яда песчаной эфы (*E. carinatus*), являющимся эффективным в комбинации с вареспладибом или метилвареспладибом, для лечения отравления ядом песчаной эфы (*E. carinatus*) и ядом других гадюк Старого света.

Высокопроизводительный скрининг, включающий одобренные Федеральным управлением по лекарственным средствам США лекарственные средства, биоактивные липиды и библиотеки ингибиторов протеаз (YCMD библиотеки GenPlus, одобренные Федеральным управлением по лекарственным средствам США лекарственные средства, NCC, Pharmakon 1600, Bioactivelipid and Protease), с 67% эффектом. Цефиксим и другие цефалоспорины проявили поразительно активное действие против МР яда песчаной эфы (*E. carinatus*) и являются эффективными для профилактики проявлений отравления змеиным ядом, инфекций и воспаления, в частности, в комбинации с вареспладибом или метилвареспладибом их сочетаниями с одним или более из следующих средств: с 28% эффектом - неожиданно эффективными оказались норэпинефрин и другие симпатомиметические средства и допаминергические средства, которые, как известно, используют при лечении при болезни Паркинсона, ингибиторы одобрены Федеральным управлением по лекарственным средствам США и легко доступны там, где обитают песчаные эфы (*E. carinatus*). С 28% эффектом - нафамостат и одобренный Федеральным управлением по лекарственным средствам США ингибитор сериновой протеазы проявили неожиданную активность против сериновой протеазы яда тайпана, при этом он имеет структуру, аналогичную структуре габексата, который проявил 23% эффект. Аспартам проявил 6% эффект, аналогичный эффекту, наблюдаемому в отношении техасского гремучника (*C. atrox*), и он может быть включен в составы препаратов для перорального применения на основе вареспладиба для улучшения вкуса (наблюдение изобретателя). Инъекционное введение препарата на основе вареспладиба в сочетании с бупивакаином (>10% эффект) снижает боль при инъекции и парализует гладкие мышцы лимфатических сосудов, тем самым замедляя распространение яда.

Пример 15. Разработка с помощью высокопроизводительного скрининга ингибиторов PLA₂ аспидовых с использованием яда арлекинового кораллового аспида.

Высокопроизводительный скрининг (HTS) в соответствии с описанием, приведенным в примере 1, проводили для определения ингибиторов PLA₂ яда арлекинового кораллового аспида, являющихся эффективными в комбинации с вареспладибом или метилвареспладибом, для лечения отравлений, вызванных ядом аспидовых. (YCMD библиотеки: GenPlus, одобренные Федеральным управлением по лекарственным средствам США лекарственные средства, NCC, Pharmakon 1600, библиотеки биоактивных липидов и протеазы: керамид (керамин) проявлял 43% эффект (% ингибирование). Было обнаружено, что

другие ингибиторы проявили эффективность, а также сурамин и его другие смеси и композиции в комбинации с вареспладибом, метилвареспладибом, В-витаминами, антибиотиками, индоксамом и другими указанными ниже средствами, некоторые из которых также обладают свойствами эффективного ингибирования МР и SP. Сурамин - антипаразитарное действие 21%, лидокаин - 11%, тропикамид >15% и атропин - эффект >20% могут быть включены в парентеральные, пероральные, назальные и интраокулярные лекарственные формы терапевтических стратегий на основе вареспладиба, в частности, в сочетании с неостигмином, ривастигмином и физостигмином, все из которых проявляют эффект ингибирования sPLA2 яда аспиды в диапазоне от 15 до 20%, при этом достигается значительная полезность и действенность по дополнительной нейтрализации постсинаптических α -токсинов змеиного яда, вызывающих слабость.

Пример 16. Пример составов - дозировки и лекарственные формы.

А. Иллюстративные инъекционные составы.

Иллюстративные инъекционные составы настоящего изобретения включают следующее (вспомогательные вещества, проиллюстрированные в заявке на патент США № 20120232031):

1) водный инъекционный раствор, включающий ингибитор PLA2 в 10% β -гидроксипропилциклодекстрине (BHPC) в воде;

2) водный инъекционный раствор, включающий ингибитор PLA2 (1,0 г), этиловый спирт (0,5 мл), аскорбиновую кислоту (0,5 г), хлорбутанол (0,1 мл), гиалуронат натрия (10 г) и хлорид натрия (0,9%) в необходимом количестве до 100 мл;

3) водный инъекционный раствор, включающий ингибитор PLA2 (2,0 г), поли(молочную кислоту) (PLA) (1,0 г), натрия цитрат (1 мл), раствор Рингера в необходимом количестве до 100 мл;

4) водный инъекционный раствор, включающий ингибитор PLA2 (1,5 г), сополимеры молочной и гликолевой кислот (PLGA) (1,5 г), бензиловый спирт в необходимом количестве до 1 мл 2% витамина Е, кукурузное масло в необходимом количестве до 100 мл; и

5) водный инъекционный раствор, включающий ингибитор PLA2 (2,5 г), сополимеры молочной и гликолевой кислот (PLGA) (1,5 г), бензиловый спирт в необходимом количестве до 1 мл 2%, витамин Е, кукурузное масло в необходимом количестве до 100 мл.

Одна иллюстративная доза ингибитора металлопротеиназы и ингибитора фосфолипазы A_2 (PLA₂), являющаяся эффективной для лечения отравлений, вызванных укусами ядовитых животных, включает приблизительно 0,01, 0,1, 1, 10, 100 и 1000 мг ингибитора металлопротеиназы и ингибитора фосфолипазы A_2 (PLA₂), или в количестве в пределах от приблизительно 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 до приблизительно 100 г каждого ингибитора металлопротеиназы и ингибитора PLA2, диспергированных, растворенных или разбавленных в фармацевтически приемлемом носителе (вспомогательном веществе)) для достижения концентрации ингибитора 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 230, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 525, 550, 575, 600, 625, 650, 675, 700, 725 до приблизительно 750 мкМ или максимумом до 800, 850, 900, 950 или 1000 мкМ.

Пример 17. Реакция на змеиный укус.

Субъект, который был однозначно укушен змеей или с подозрением на змеиный укус, который не проявляет или проявляет незначительные, если таковые имеются, в отдельных случаях, первые признаки слабости в виде ретракции верхнего века или другого бульбарного паралича, боли в месте укуса или нарушения свертываемости крови, и при этом ядовитый или не ядовитый тип змеи известен или неизвестен. У субъекта с течением времени проявляется клиническое улучшение в виде повышенной функции мышц (определенное субъективным улучшением активности, мобильности и легкости дыхания или путем количественной оценки, с использованием таких методов, как электромиография, и других стандартизованных показателей стабильности состояния здоровья. Если состояние пациента ухудшается, то дополнительные дозы вышеупомянутых терапевтических сред вводят через соответствующие интервалы времени до тех пор, пока пациент не поправится, либо не потребуются наиболее распространенные методы реанимации. В отличие от известных методов преимущество метода настоящего изобретения заключается в том, что вышеупомянутая схема лечения может быть проведена лицом с минимальным медицинским образованием или без медицинского образования (например, субъектом, не имеющим медицинского образования, который должен самостоятельно ввести препарат или принять лекарство в полевых условиях), в том числе самими отравленными ядом пациентами или субъектами.

ССЫЛОЧНЫЕ МАТЕРИАЛЫ В АЛФАВИТНОМ ПОРЯДКЕ

2. Abhijit Dey and Jitendra Nath De, 2012. *Phytopharmacology of Antiophidian Botanicals: A Review*, (Фитофармакология противозмеиных растительных препаратов: Обзор) *International Journal of Pharmacology*, 8: 62-79
3. Alirol et al., 2010, "Snake bite in South Asia: A Review" ("Отравления при змеиных укусах змей в Южной Азии: Обзор") *PLoS Negl Trop Dis*. 4(1): e603
4. Anil, A., S. Singh, A. Bhalla, N. Sharma, R. Agarwal, and I. D. Simpson. 2010, Role of neostigmine and polyvalent antivenom in Indian common krait (*Bungarus caeruleus*) bite. (Роль неостигмина и поливалентного противоядия при укусе индийского крайта (*Bungarus caeruleus*)). *J. Infect. Prev.* 3:83-87.
5. Arora, P., S. Sharma, and S. Garg. 2002. Permeability issues in nasal drug delivery. (Проблемы проницаемости при назальной доставке лекарства.) *Drug Discov. Today* 7:967-975.
6. Brogгинi, M., C. Benvenuti, V. Botta, A. Fossati, and Valenti. 1991. Bioavailability of intranasal neostigmine: comparison with intravenous route. (Биодоступность интраназального неостигмина: сравнение с внутривенным путем доставки). *Методы Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 13:193-198.
7. Casewell, et al., "Medically important differences in snake venom composition are dictated by distinct postgenomic mechanisms" ("Важные отличия с медицинской точки зрения состава змеиного яда обусловлены четкими постгеномными механизмами"), *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111.25 (2014): 9205-9210
8. Chippaux, J. P. 2008. Estimating the global burden of snakebite can help to improve management. (Оценка глобального бремени укуса змей может помочь улучшить лечение от укусов). *PLoS Med.* 5:e221.
- Cokol et al. (2011) Systematic exploration of synergistic drug pairs. *Molecular System Biology*. (Систематическое исследование пар лекарственных средств синергетического действия. *Molecular System Biology*). 7: 544)
- Costantino et al., 2008, "Intranasal administration of acetylcholinesterase inhibitors," ("Интраназальное введение ингибиторов ацетилхолинэстеразы"), *BMC Neuroscience* 2008, 9(Suppl 3): S6;
- Currie et al., 1988, "Resolution of neurotoxicity with anticholinesterase therapy in deathadder envenomation". («Снижение нейротоксичности помощью ингибитора антихолинэстеразы при отравлении ядом гадюкообразной смертельной змеи»). *Med. J. Aust.* 148:522-525)

Dennis, Edward A., et al. "Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention". ("Ферменты фосфолипазы A2: физическая структура, биологические функции, осложнения болезни, химическое ингибирование и терапевтическое вмешательство"). *Chemical reviews* 111.10 (2011): 6130-6185

Di Costanzo, A., A. Toriello, C. Mannara, C. Benvenuti, and G. Tedeschi. 1993. Intranasal versus intravenous neostigmine in myasthenia gravis: assessment by computer analysis of saccadic eye movements. (Сравнение интраназального и внутривенного введения неостигмина при тяжелой миастении: оценка путем проведения компьютерного анализа саккадированных движений глаз). *Clin. Neuropharmacol.* 16:511-517.

Dooley, J. M., K. J. Goulden, J. G. Gatien, E. J. Gibson, and B. S. Brown. 1986. Topical therapy for oropharyngeal symptoms of myasthenia gravis. (Местная терапия орофарингеальных симптомов тяжелой миастении). *Ann. Neurol.* 19:192-194

Fossati, A., M. G. Vimercati, G. L. Bandi, and A. Formenti. 1990, Pharmacokinetic study of neostigmine after intranasal and intravenous administration in the guinea pig. (Фармакокинетическое исследование неостигмина после интраназального и внутривенного введения морским свинкам). *Drugs Exp. Clin. Res.* 16:575-579.

Girish, K. S., and K. Kemparaju. 2011. Overlooked issues of snakebite management: time for strategic approach. (Недооцененные проблемы, связанные с лечением укусов змей: время для разработки стратегического подхода). *Curr. Top. Med. Chem.* 11:2494-2508.

Gore et al., 1998, "Comparative biomembrane permeation of tacrine using Yucatan minipigs and domestic pigs as the animal model" ("Сравнительная проницаемость такрина через биомембраны с использованием юкатанских мини-свиней и домашних свиней в качестве животной модели") *J PharmSci* 87:441-447;

Kasturiratne et al., 2008, "The global burden of snake bite: a literature analysis and modeling based on regional estimates of envenoming and deaths," ("Глобальное бремя змеиных укусов: анализ литературы и моделирование на основе региональных оценок отравлений и смертей") *PLoSMed.* 5:e218.

LS Guimaraes, Cesar, et al. "Biodiversity as a Source of Bioactive Compounds Against Snakebites." ("Биоразнообразие как источник биоактивных соединений против змеиных укусов"). *Current medicinal chemistry* 21.2S (2014): 2952-2979.

Magrioti, Victoria, and George Kokotos. "Phospholipase A2 inhibitors as potential therapeutic agents for the treatment of inflammatory diseases." ("Ингибиторы фосфолипазы A2 как возможные терапевтические средства для лечения воспалительных заболеваний"). *Expert opinion on therapeutic patents* 20,1 (2010): 1-18),

Mebs, D. 2002. *Venomous and Poisonous Animals*. (Ядовитые и вызывающие отравления животные). CRC Press, Boca Raton, Florida. 339 pages.

Marcussi, Silvana, et al. "Snake venom phospholipase A2 inhibitors: medicinal chemistry and therapeutic potential." ("Ингибиторы фосфолипазы A2 змеиного яда: медицинская химия и возможности применения в терапии"). *Current Topics in Medicinal Chemistry* 7.8 (2007): 743-756).

Medecins Sans Frontieres: Snakebite how a public health emergency went under the radar. (Змеиный укус; как чрезвычайная ситуация в области здравоохранения остается без внимания). <http://www.doctorswithoutborders.org/article/snakebite-how-public-health-emergency-went-under-radar>

Ray, et al., "Phospholipase A₂ in Airway Disease: Target for Drug Discovery," ("Фосфолипаза A₂ при заболевании дыхательных путей: Цель по разработке новых лекарственных средств"), *Journal of Drug Discovery and Therapeutics* 1 (8) 2013, 28-40

Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 19th Ed., incorporated herein by reference, at Chapter 95 "Aerosols", and Chapter 41, "Drug Absorption, Action and Disposition." (The Science and Practice of Pharmacy, 19th Ed., incorporated herein by reference, at Chapter 95 "Аэрозоли", and Chapter 41, "Абсорбция лекарственного средства, действие и фармакокинетика").

Ricciardi, R., B. Rossi, M. Nicora, A. Sghirlanzoni, and A. Muratorio. 1991. Acute treatment of myasthenia gravis with intranasal neostigmine: clinical and electromyographic evaluation. (Неотложное лечение тяжелой миастении с помощью интраназального неостигмина: клинико-электромиографическая оценка). *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 54:1061-1062.

Sghirlanzoni et al., "Efficacy of intranasal administration of neostigmine in myasthenic patients." ("Эффективность интраназального введения неостигмина у пациентов с миастенией") *J Neurol.* 239:165-9 (1992).

Sharma, S. K., P. Bovier, N. Jha, E. Alirol, L. Loutan, and F. Chappuis. 2013. Effectiveness of Rapid Transport of Victims and Community Health Education on Snakebite Fatalities in Rural Nepal. (Эффективность быстрой доставки жертв змеиных укусов и медико-санитарное просвещение общин по вопросам летального исхода при змеиных укусах в сельских районах Непала). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 00,

Sghirlanzoni, A., D. Pareyson, C. Benvenuti, G. Cei, V. Cosi, M. Lombardi, et al. 1992.

Efficacy of intranasal administration of neostigmine in myasthenic patients. (Эффективность интраназального введения неостигмина у пациентов с миастенией). *J. Neurol.* 239:165-169.

Sui Y, Qu Z, (2007), Alternative statistical parameter for high-throughput screening assay quality assessment, (Альтернативный статистический параметр для качественной оценки высокопроизводительного скринингового анализа), J BiomolScreen, 12, 229-34.

"Varespladib" ("Вареспладиб"), American Journal of Cardiovascular Drugs. 11 (2): 137-43. 2011.

Villaltaomero et al. ACS Med Chem Lett 2012, 3, 540-543

Warrell et al., 1983, "Severe neurotoxic envenoming by the Malayan krait Bungarus candidus (Linnaeus): response to antivenom and anticholinesterase.," ("Тяжелое нейротоксическое отравление при укусе малайского крайта (Bungarus candidus) (Linnaeus): реакция на противоядие и антихолинэстеразу"), Br Med J (Clin Res Ed) 286(6366):678-80;

Warrell, D. A., S. Looareesuwan, N. J. White, R. D. Theakston, M. J. Warrell, W. Kosakarn, et al. 1983. Severe neurotoxic envenoming by the Malayan krait Bungarus candidus (Linnaeus): response to antivenom and anticholinesterase. (Тяжелое нейротоксическое отравление при укусе малайского крайта (Bungarus candidus) (Linnaeus): Реакция на противоядие и антихолинэстеразу). BMJ 286:678-680,

Warrell, D. A. 2012. Snakebite: a neglected problem in twenty-first century India (Змеиные укусы: Игнорируемая проблема в Индии двадцать первого века). NatlMed. J. India 24:321-324.

ВОЗ. 2010, Guidelines for the Prevention and Clinical Management of Snakebite in Africa (Руководство по профилактике и оказанию клинической медицинской помощи при змеиных укусах в Африке). World Health Organization, Brazzaville, Congo, Pp. 87-88.

Watt, G., R. D. Theakston, C. G. Hayes, M. L. Yambao, R. Sangalang, C. P. Ranoa, et al. 1986. Положительная реакция на эдрофоний у пациентов с нейротоксическим отравлением при укусе филиппинской кобры (Naja naja philippinensis). Плацебо-контролируемое исследование. N. Engl. J. Med. 315:1444-1448

Watt et al., Positive response to edrophonium in patients with neurotoxic envenoming by cobras (Naja naja philippinensis). A placebo-controlled study. (Положительная реакция на эдрофоний у пациентов с нейротоксическим отравлением при укусе филиппинской кобры (Naja naja philippinensis). Плацебо-контролируемое исследование"). N Engl J Med. 1986 315(23):1444-8

(J-H Zhang, TDY Chung, KR Oldenburg, (1999), A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays, (Простой статистический параметр для использования при оценке и валидации высокопроизводительных скрининговых анализов), J Biomol. Screen, 4, 67-73.).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение ингибитора PLA2 для лечения субъекта, страдающего от отравления, вызванного укусом ядовитых змей, при котором ингибитор PLA2 представляет собой вареспладиб, метилвареспладиб, 9-[(фенил)метил]-5-карбамоилкарбазол-4-ил)оксиуксусную кислоту или их фармацевтически приемлемую соль или их смесь.

2. Способ лечения субъекта, страдающего от отравления, вызванного укусом ядовитых змей, включающий введение субъекту ингибитора PLA2, при котором ингибитор PLA2 представляет собой вареспладиб, метилвареспладиб, 9-[(фенил)метил]-5-карбамоилкарбазол-4-ил)оксиуксусную кислоту или их фармацевтически приемлемую соль или их смесь.

3. Способ лечения субъекта, страдающего от отравления, вызванного укусом ядовитых змей, вклю-

чающий введение субъекту ингибитора PLA2 в комбинации с терапевтически эффективным количеством по меньшей мере одного агента, выбранного из группы, включающей ингибитор металлопротеиназы, ингибитор сериновой протеазы или их смесь, при котором ингибитор PLA2 представляет собой вареспладиб, метилвареспладиб, 9-[(фенил)метил]-5-карбамоилкарбазол-4-ил)оксиуксусную кислоту или их фармацевтически приемлемую соль или их смесь.

4. Способ лечения субъекта, страдающего от отравления, вызванного укусом ядовитых змей, включающий введение субъекту ингибитора PLA2 в комбинации с терапевтически эффективным количеством противоядия, при котором ингибитор PLA2 представляет собой вареспладиб, метилвареспладиб, 9-[(фенил)метил]-5-карбамоилкарбазол-4-ил)оксиуксусную кислоту или их фармацевтически приемлемую соль или их смесь.

5. Способ лечения субъекта, страдающего от отравления, вызванного укусом ядовитых змей, включающий введение субъекту ингибитора PLA2 в комбинации с ингибитором металлопротеиназы и/или ингибитором сериновой протеазы и терапевтически эффективным количеством противоядия, при котором ингибитор PLA2 представляет собой вареспладиб, метилвареспладиб, 9-[(фенил)метил]-5-карбамоилкарбазол-4-ил)оксиуксусную кислоту или их фармацевтически приемлемую соль или их смесь.

6. Способ по любому из пп.2-5, при котором ингибитор PLA2 или ингибитор PLA2 и ингибитор металлопротеиназы и/или ингибитор сериновой протеазы вводят субъекту совместно с терапевтически эффективным количеством по меньшей мере одного агента, выбранного из группы, состоящей из ингибитора фактора распространения, антагониста рецептора NMDA, ингибитора ацетилхолинэстеразы, ингибитора L-аминоксидазы, ингибитора гиалуронидазы.

7. Способ по пп.2-6, в котором ингибитор PLA2 или ингибитор PLA2 и ингибитор металлопротеиназы и/или ингибитор сериновой протеазы вводят субъекту путем инъекции, интраназально, интраокулярно, перорально, топикально или путем ингаляции; и субъекту опционально совместно или последовательно вводят ингибитор ацетилхолинэстеразы или комбинацию ингибитора ацетилхолинэстеразы и ингибитора ацетилхолинового мускаринового рецептора.

8. Способ по п.7, в котором ингибитор PLA2 представляет собой вареспладиб, и вареспладиб вводят субъекту совместно с ингибитором ацетилхолинэстеразы или комбинацией ингибитора ацетилхолинэстеразы и ингибитора ацетилхолинового мускаринового рецептора.

9. Способ по пп.7, 8, в котором ингибитор PLA2 представляет собой вареспладиб, метилвареспладиб и/или 9-[(фенил)метил]-5-карбамоилкарбазол-4-ил)оксиуксусную кислоту или ее фармацевтически приемлемую соль, и указанные выше ингибитор(ы) PLA2 вводят субъекту совместно по меньшей мере с одним веществом, выбранным из группы, включающей приномастат, маримастат, вориностат, иломастат, габексат, нафамостат или батимастат и ингибитор ацетилхолинэстеразы или комбинацию ингибиторов ацетилхолинэстеразы и ингибитора ацетилхолинового мускаринового рецептора.

10. Способ по любому из пп.7-9, в котором ингибитор PLA2 представляет собой вареспладиб, метилвареспладиб и/или 9-[(фенил)метил]-5-карбамоилкарбазол-4-ил)оксиуксусную кислоту или ее фармацевтически приемлемую соль, и указанные выше ингибитор(ы) PLA2 вводят упомянутому выше субъекту совместно с неостигмином, далее в комбинации с ингибитором ацетилхолинового мускаринового рецептора, опционально в котором указанный выше вареспладиб и/или метилвареспладиб, указанные выше неостигмин и ингибитор ацетилхолинового мускаринового рецептора вводят субъекту совместно в качестве единственно активных агентов.

11. Способ по любому из пп.7-10,

в котором ингибитор PLA2 и ингибитор металлопротеиназы и/или сериновой протеазы вводят субъекту путем инъекции, интраназально, интраокулярно, перорально, топикально или путем ингаляции, и/или

в котором ингибитор металлопротеиназы выбран из группы, содержащей приномастат, ВВ-94 (маримастат), ВВ-2516 (батимастат), иломастат и их фармацевтически приемлемые соли, энантиомеры, диастереомеры и их смеси, или

в котором ингибитор металлопротеиназы представляет собой приномастат или маримастат, вводимые субъекту перорально, путем инъекции, топикально или интраназально в концентрациях от 1 до 500 мкМ и/или в количестве от 0,0001 до 100 г, или

в котором ингибитор сериновой протеазы выбран из группы, состоящей из габексата, нафамостата, лейпептина, AEDSF (4-(2-аминоэтил)бензеносульфонила флуорид гидрохлорид), их фармацевтически приемлемых солей, их энантиомеров, диастереомеров или их смеси.

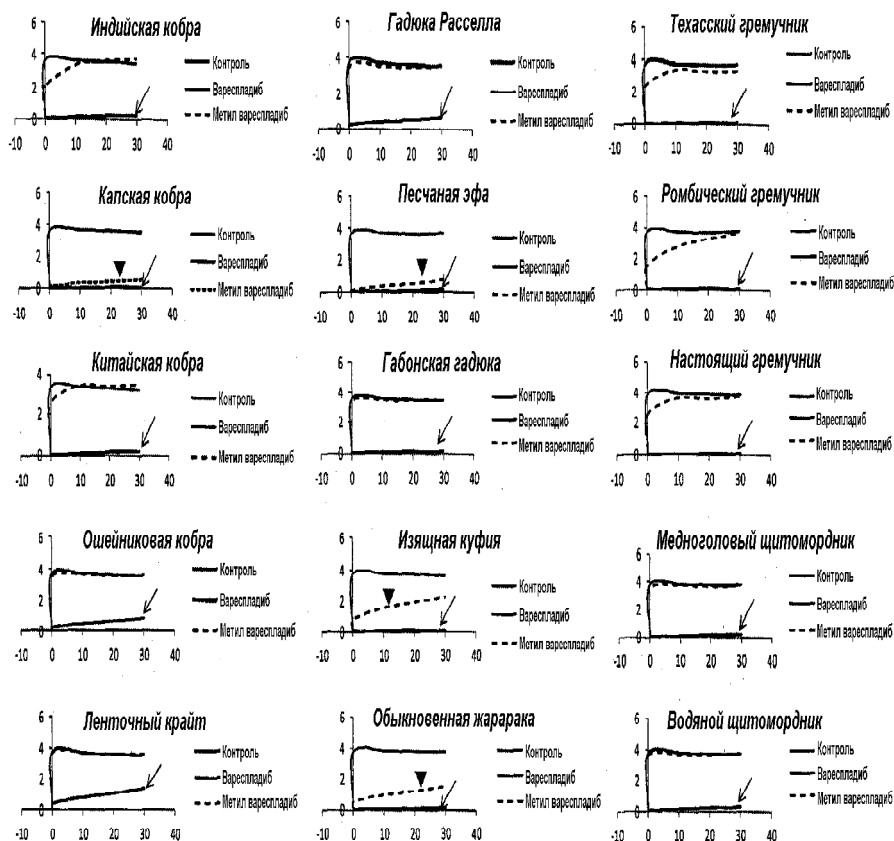
12. Способ по любому из пп.2-11, в котором ингибитор PLA2 представляет собой вареспладиб и/или метилвареспладиб, в котором вареспладиб вводят субъекту путем инъекции и указанный метилвареспладиб вводят субъекту перорально, топикально или интраназально в концентрациях в пределах от 0,1, 1, 10, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500 до 1250, от 750 до 1250, от 801 до 1000 мкМ и(или) в количестве в пределах от 0,0001, 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 100 до 1000 мг.

13. Способ по любому из пп.4, 5 или 12, в котором ингибитор PLA2 вводят субъекту в комбинации с противоядием.

14. Способ по любому из пп.2-13, в котором ингибитор PLA2 представляет собой вареспладиб или его фармацевтически приемлемую соль.

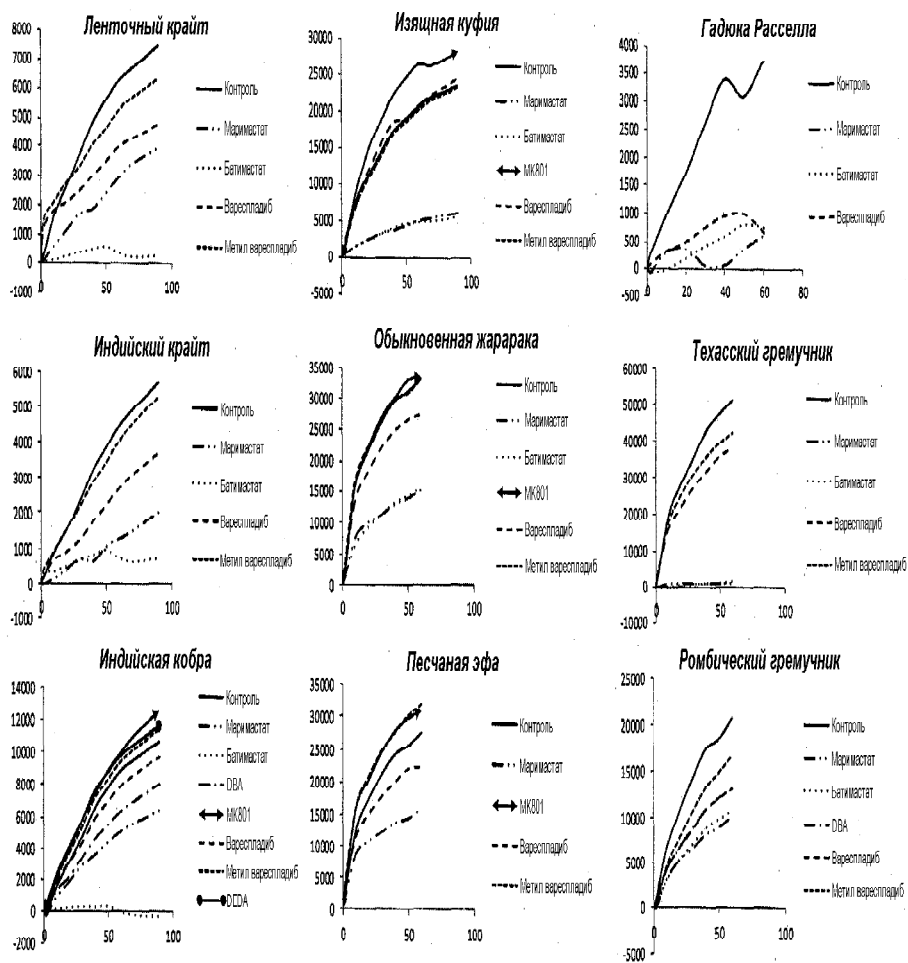
15. Способ по любому из пп.2-13, в котором ингибитор PLA2 представляет собой метилвареспладиб или его фармацевтически приемлемую соль.

16. Способ по любому из пп.2-13, в котором ингибитор PLA2 представляет собой 9-[(фенил)метил]-5-карбамоилкарбазол-4-ил)оксиуксусную кислоту или ее фармацевтически приемлемую соль.



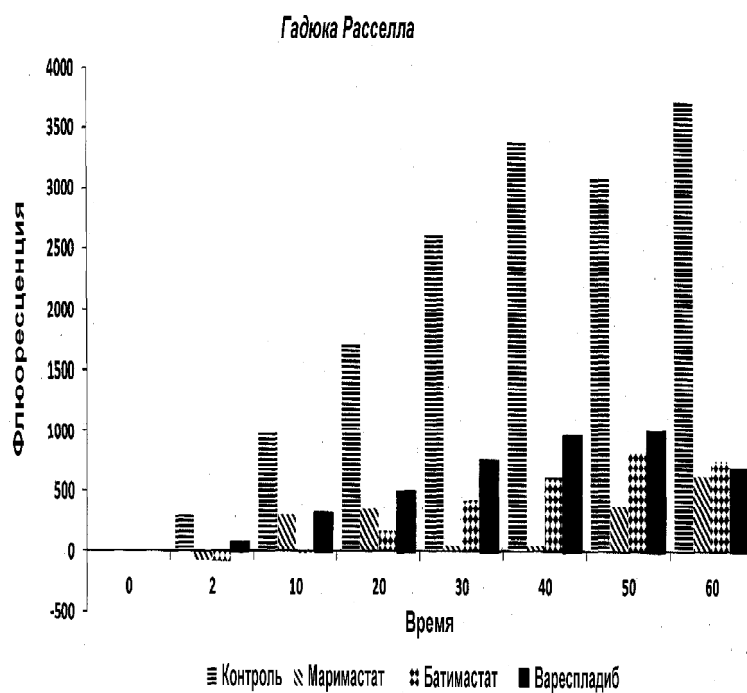
X-ось = время (минуты); Y-ось = поглотительная способность

Фиг. 1

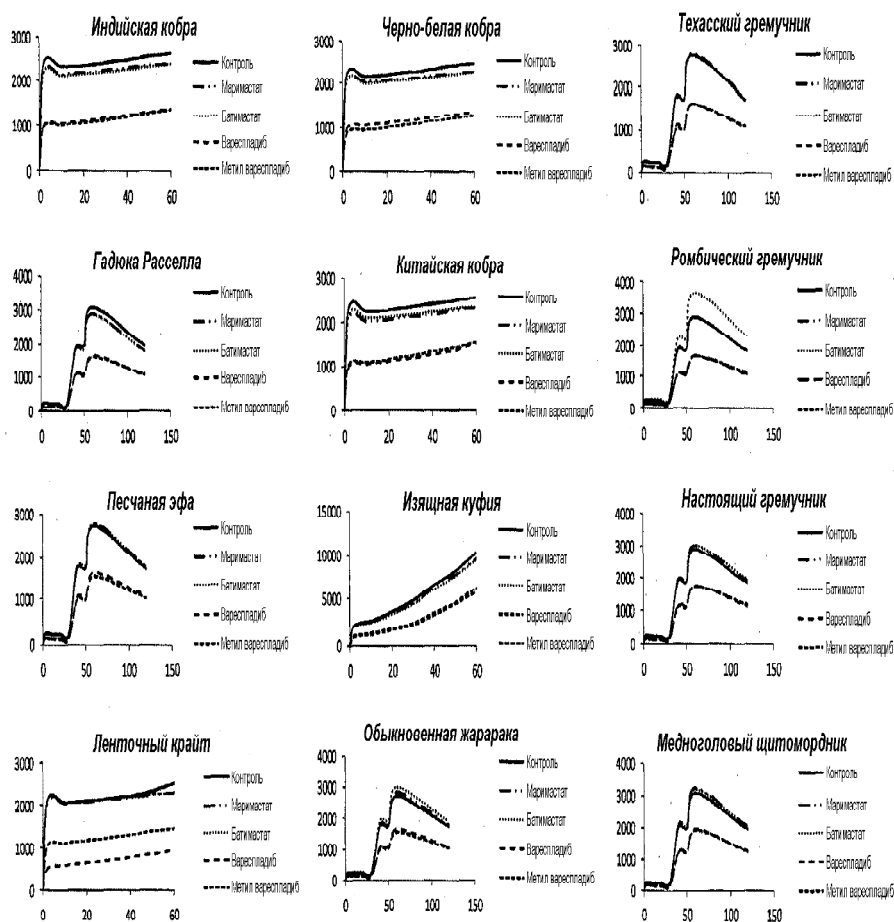


X-ось = время (минуты); Y-ось = флюоресценция

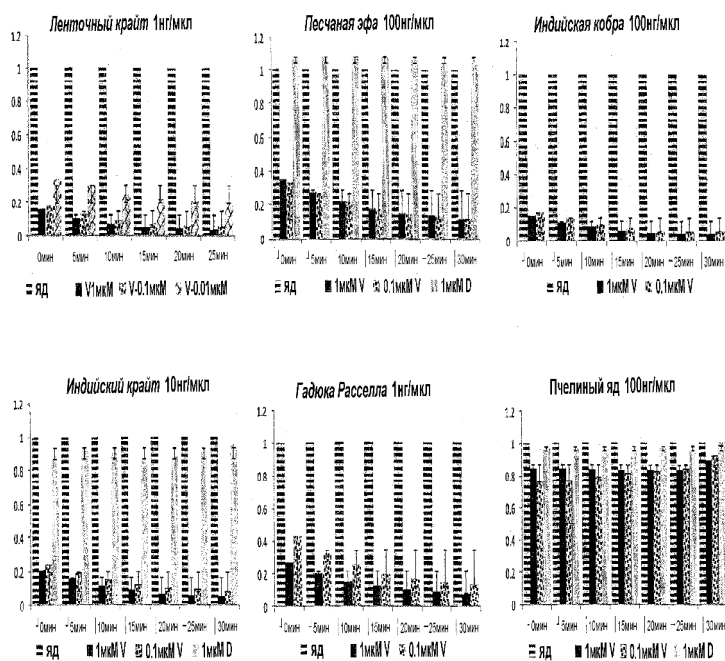
Фиг. 2А



Фиг. 2В

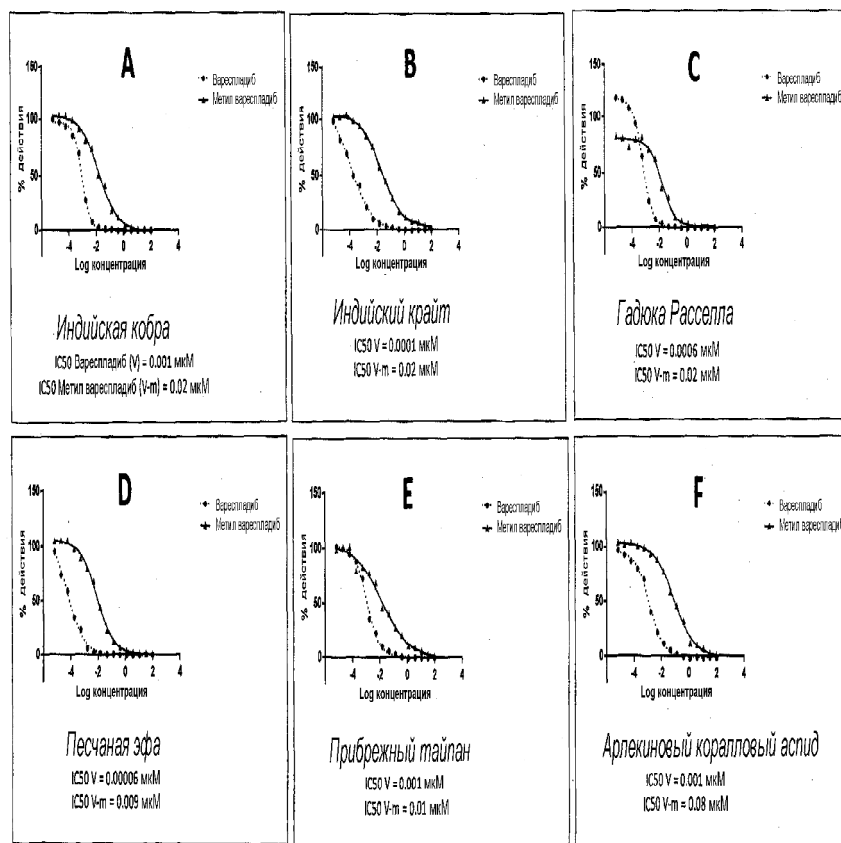


Фиг. 3

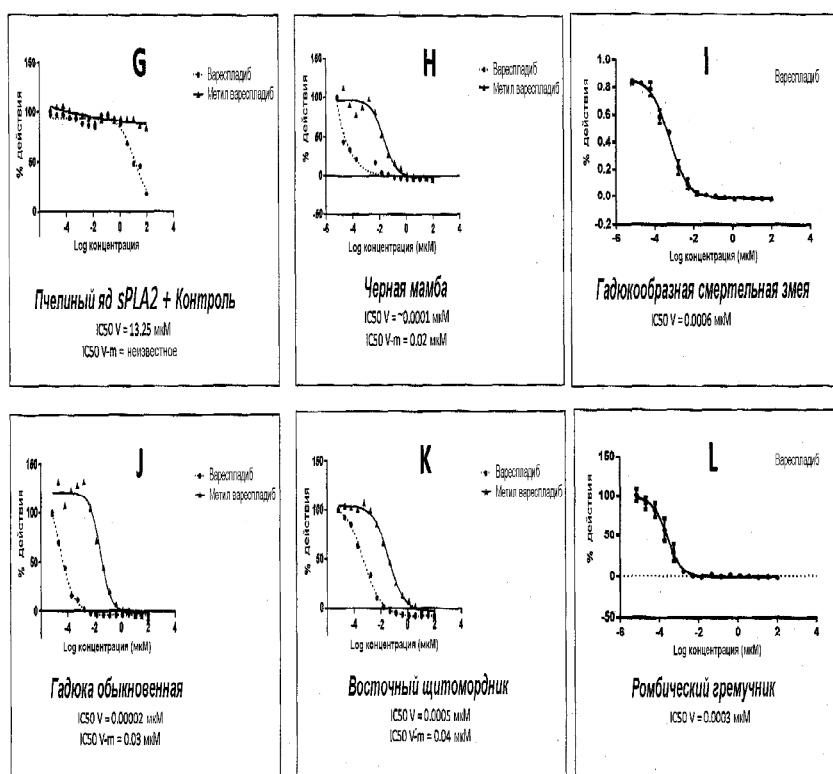


X-ось = время (минуты); Y-ось = поглощательная способность, нормированная к контролю;
V – вaresпладиб; D – дарapладиб

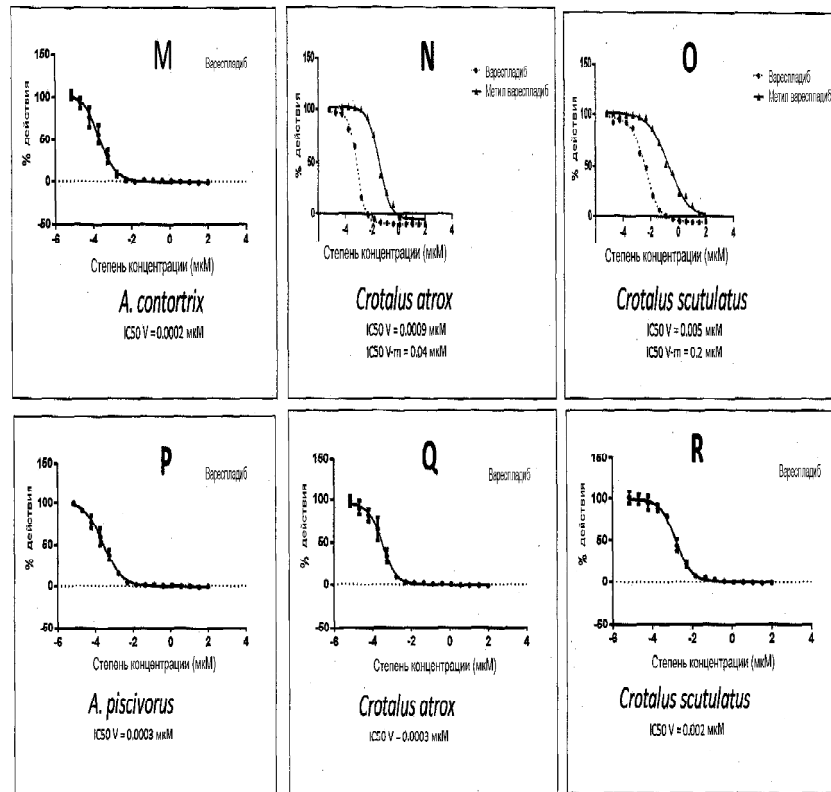
Фиг. 4



Фиг. 5А-Ф

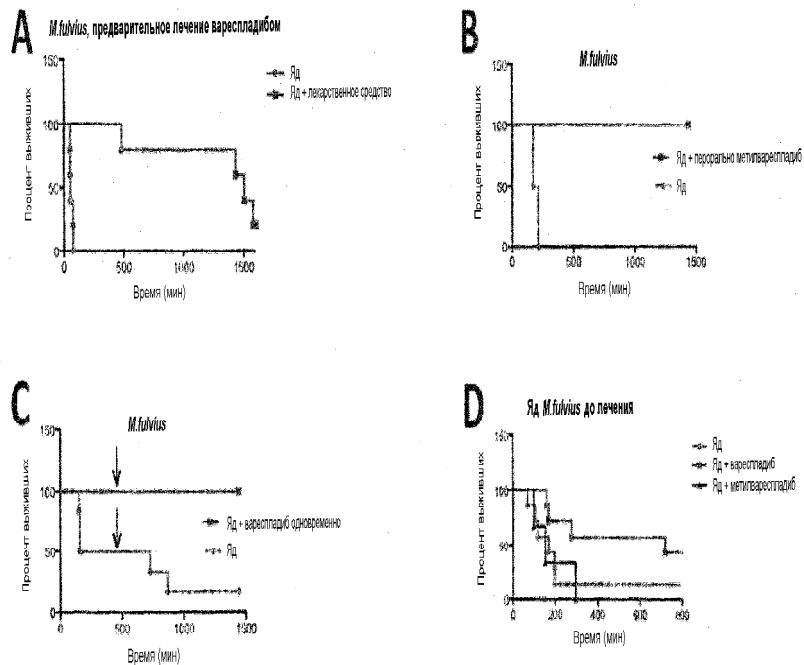


Фиг. 5Г-Л

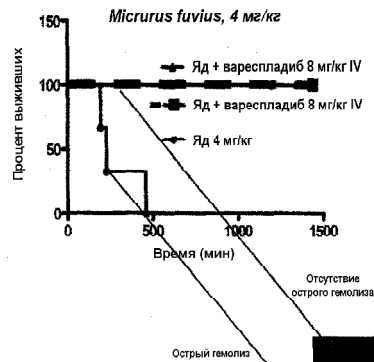
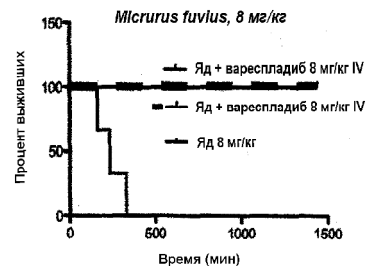


Фиг. 5M-R

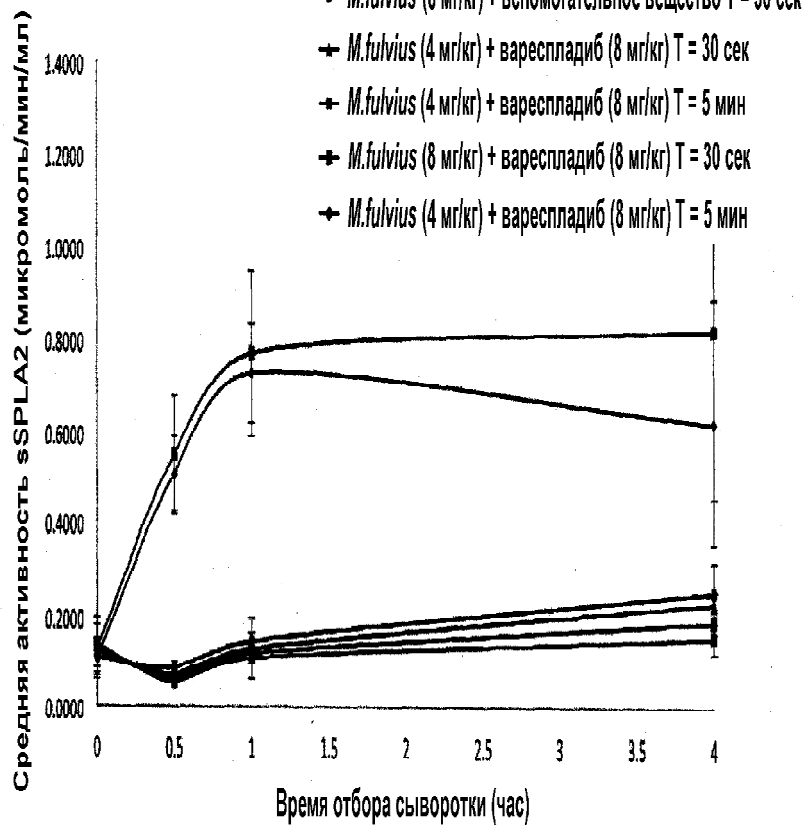
Воздействие яда арлекинового кораллового асида
на мышей/крыс



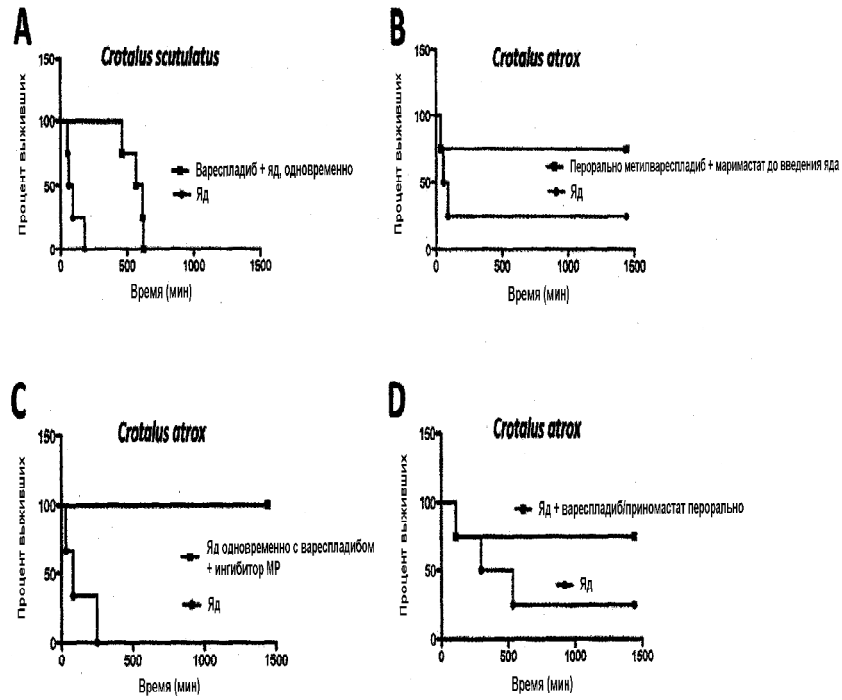
Фиг. 6A-D

E**F****G**

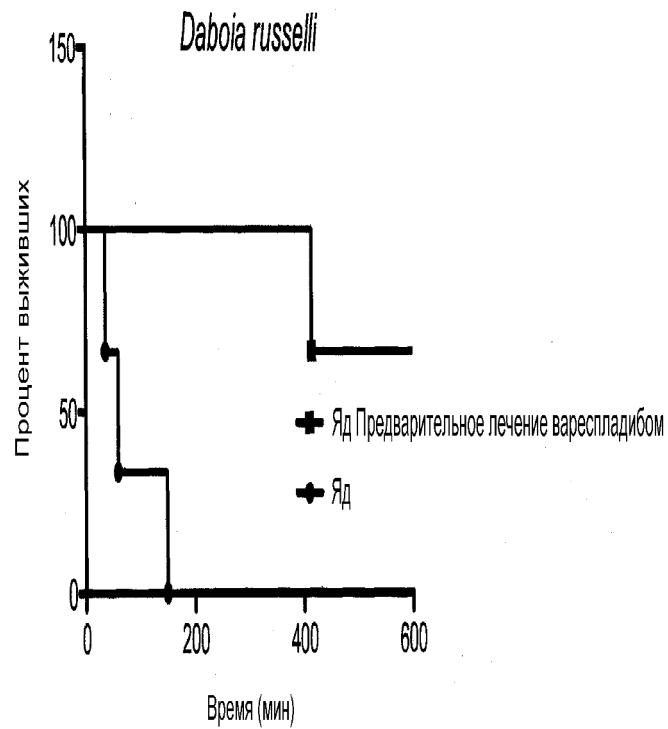
Фиг. 6E-G

H

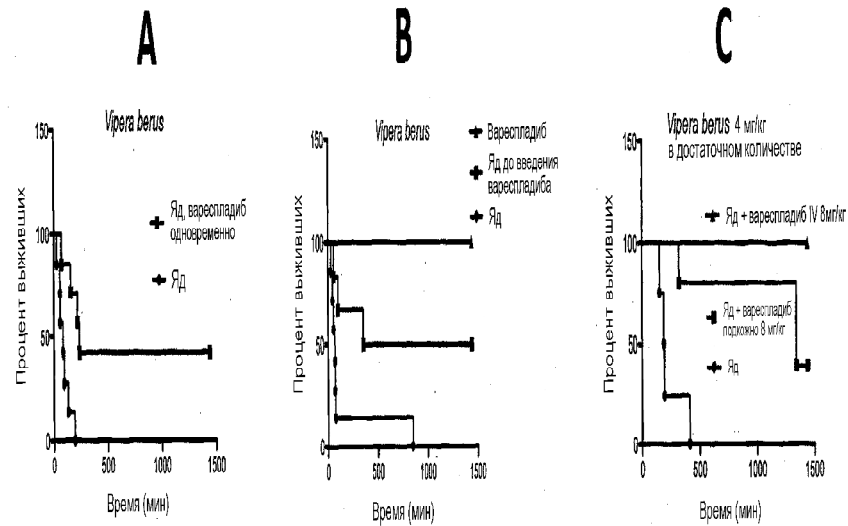
Фиг. 6H



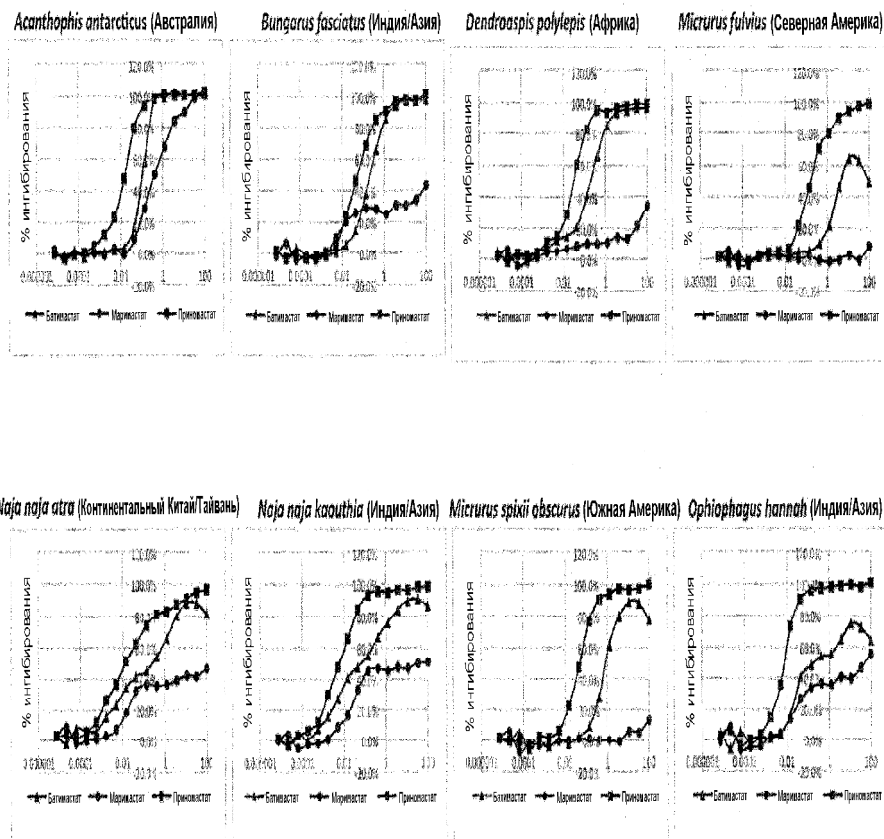
Фиг. 7



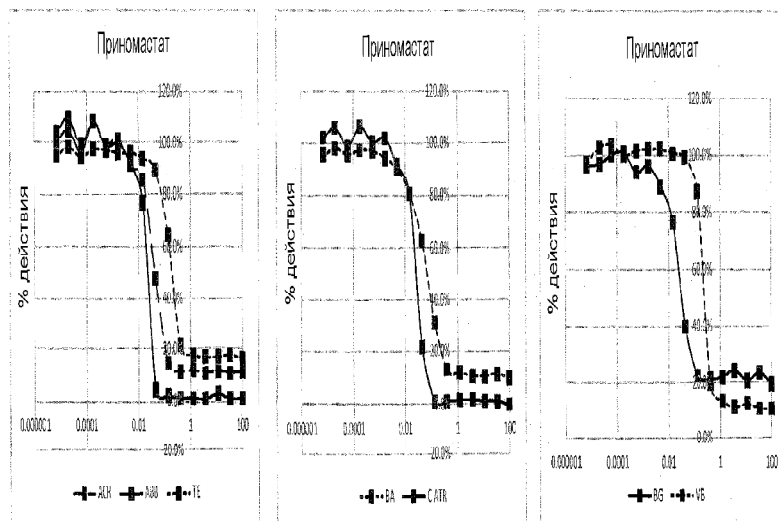
Фиг. 8



Фиг. 9

Ингибирование приномастом, батимастом ядов семейства аспидовых *in vitro*

Фиг. 10



Азия/Юго-Восточная Азия/Япония/Корея Северная и Южная Америка Африка/Европа

ACR = *Agkistrodon calloselasma rhodostoma*

ABB = *Agkistrodon blomhoffii brevicaudus*

TE = *Trimeresurus elegans* (Protobothrops)

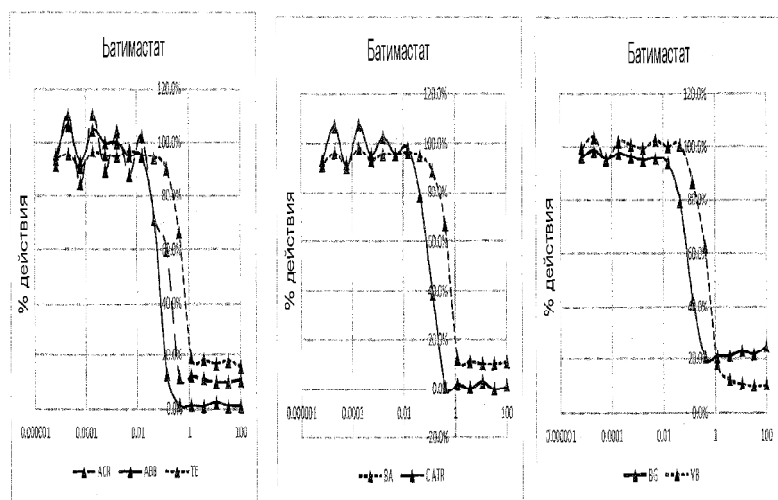
BA = *Bothrops asper*

CA = *Crotalus atrox*

BG = *Bitis gabonica*

VB = *Vipera berus*

Фиг. 11



Азия/Юго-Восточная Азия/Япония/Корея Северная и Южная Америка Африка/Европа

ACR = *Agkistrodon calloselasma rhodostoma*

ABB = *Agkistrodon blomhoffii brevicaudus*

TE = *Trimeresurus elegans* (Protobothrops)

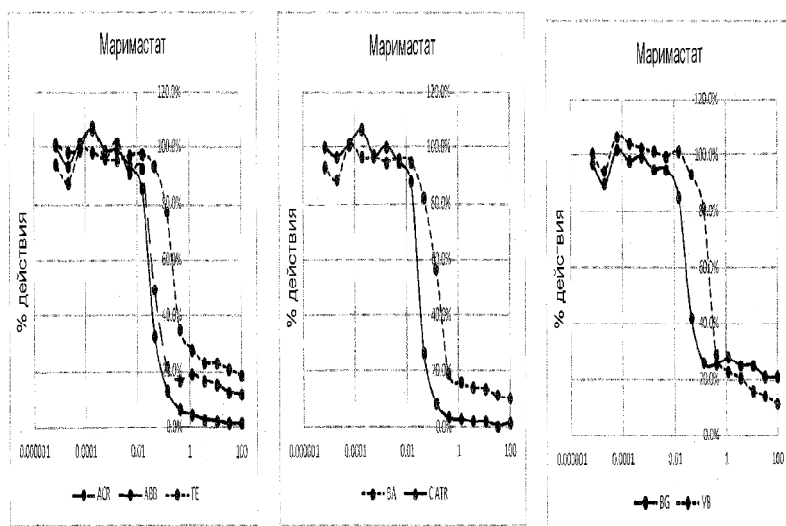
BA = *Bothrops asper*

CA = *Crotalus atrox*

BG = *Bitis gabonica*

VB = *Vipera berus*

Фиг. 12



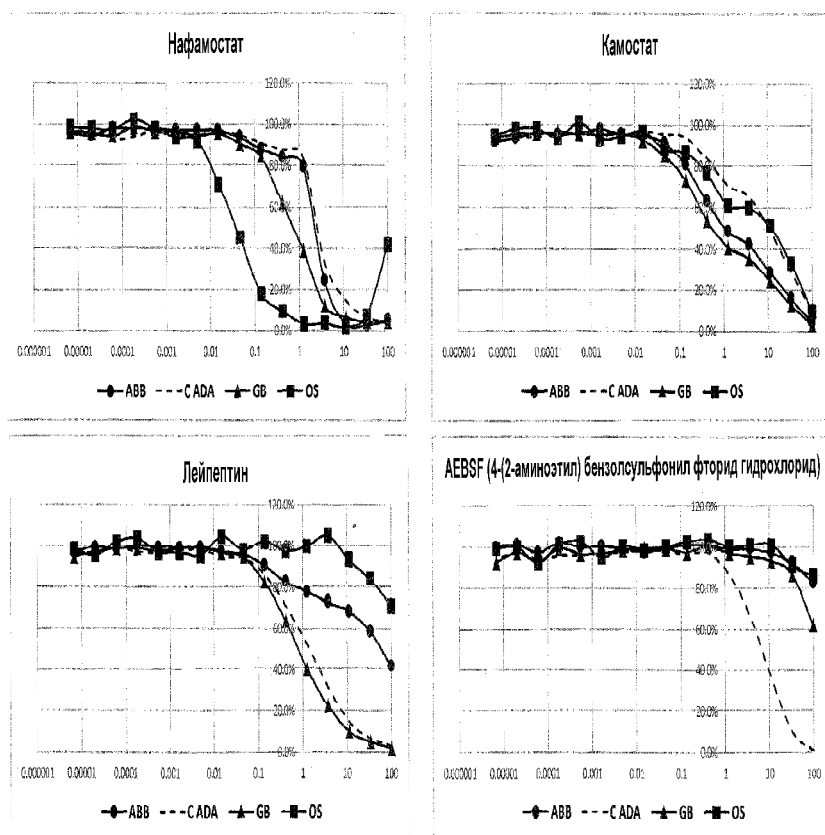
Азия/Юго-Восточная Азия/Япония/Корея

Северная и Южная Америка

Африка/Европа

ACR = *Agkistrodon calloselasma rhodostoma*BA = *Bothrops asper*BG = *Bitis gabonica*ABG = *Agkistrodon blomhoffii brevicaudus*CA = *Crotalus atrax*VB = *Vipera berus*TE = *Trimeresurus elegans* (Protobothrops)

Фиг. 13

ABB = *Agkistrodon blomhoffii brevicaudus*; CADA = *Crotalus adamanteus*; GB = *Gloydius brevicaudus* (Корея); OS = *Oxyuranus scutellatus*

Фиг. 14

Вареспладиб обладает исключительно широким спектром и активностью против многочисленных ядов важной с медицинской точки зрения, *in vitro*. IC₅₀ (мкМ) основана на анализах по ингибированию SPLA2 в соответствии с детальным описанием, приведенном в Примере 2.

Яд	R-квадрат	IC50 мкМ
<i>Acanthophis antarcticus</i>	0.994	0.0006
<i>Agkistrodon blomhoffii brevicaudus</i>	0.997	0.0005
<i>Agkistrodon contortrix</i>	0.985	0.0002
<i>Agkistrodon piscivorus</i>	0.991	0.0003
Пчелиный яд, контроль	0.948	13.25
<i>Bitis gabonica</i>	0.982	0.0003
<i>Bothrops asper</i>	0.990	0.0001
<i>Bothrops jararaca</i>	0.994	0.0002
<i>Bungarus caeruleus</i>	0.996	0.0001
<i>Crotalus adamanteus</i>	0.993	0.0002
<i>Crotalus atrox</i>	0.986	0.0003
<i>Crotalus durissus terrificus</i>	0.998	0.005
<i>Crotalus scutulatus scutulatus</i>	0.992	0.002
<i>Dendroaspis polylepis</i>	0.962	~0.0001
<i>Echis carinatus</i>	0.996	0.00006
<i>Laticauda semifasciata</i>	0.991	0.00006
<i>Micrurus fulvius</i>	0.998	0.001
<i>Naja naja atra</i>	0.975	0.0008
<i>Naja naja kaouthia</i>	0.995	0.00005
<i>Naja naja naja</i>	0.999	0.001
<i>Notechis scutatus scutatus</i>	0.959	0.00006
<i>Ophiophagus hannah</i>	0.999	0.003
<i>Oxyuranus scutellatus</i>	0.997	0.001
<i>Pseudechis australis</i>	0.997	0.003
<i>Vipera berus</i>	0.997	0.00002
<i>Vipera russelli</i>	0.999	0.0006

Фиг. 15

Таблица 3

Метилвареспладиб (перорально доступное пролекарство вареспладиба) обладает исключительно высокой активностью против яда нескольких видов змей, *in vitro*. IC₅₀ (мкМ) основана на анализах по ингибированию SPLA2 в соответствии с детальным описанием, приведенном в Примере 2, и позволяет предположить создание оригинальной стратегии по лечению змеиных укусов непосредственно после укуса змеи.

Яд	R-квадрат	IC50 мкМ
<i>Agkistrodon blomhoffii brevicaudus</i>	0.996	0.04
Пчелиный яд	неизвестное	неизвестное
<i>Bungarus caeruleus</i>	0.999	0.02
<i>Bungarus fasciatus</i>	0.985	0.02
<i>Crotalus adamanteus</i>	0.997	0.02
<i>Crotalus atrox</i>	0.996	0.04
<i>Crotalus durissus terrificus</i>	0.994	0.26
<i>Crotalus scutulatus scutulatus</i>	0.994	0.21
<i>Dendroaspis polylepis</i>	0.973	0.02
<i>Echis carinatus</i>	0.998	0.01
<i>Laticauda semifasciata</i>	0.950	0.02
<i>Micrurus fulvius</i>	0.998	0.08
<i>Naja naja atra</i>	0.970	0.01
<i>Naja naja kaouthia</i>	0.988	0.02
<i>Naja naja naja</i>	0.997	0.02
<i>Notechis scutatus scutatus</i>	0.964	0.03
<i>Ophiophagus hannah</i>	0.996	0.01
<i>Oxyuranus scutellatus</i>	0.989	0.01
<i>Pseudechis australis</i>	0.987	0.09
<i>Vipera berus</i>	0.975	0.03
<i>Vipera russelli</i> (Daboia)	0.993	0.02

Фиг. 16

Таблица 4

Приномастат обладает более широким спектром действия против металлопротеиназ яда по сравнению со спектром действия, о котором сообщалось ранее. IC₅₀ (мкМ) основана на анализах по ингибированию ММР в соответствии с детальным описанием, приведенном в Примере 2. Предусматривается, что приномастат может быть скомбинирован с вареспладибом для парентерального введения или метилвареспладибом для перорального введения, и может быть создана эффективная стратегия для безыгольного лечения непосредственно после укуса змеи.

Яд	R-квадрат	IC50 мкМ
<i>Agkistrodon blomhoffii brevicaudus</i>	0.997	0.02
<i>Agkistrodon contortrix</i>	0.983	0.06
<i>Agkistrodon piscivorus</i>	0.986	0.02
<i>Bitis gabonica</i>	0.997	0.03
<i>Bothrops asper</i>	0.998	0.06
<i>Bothrops jararaca</i>	0.998	0.05
<i>Crotalus adamanteus</i>	0.995	0.12
<i>Crotalus atrox</i>	0.98	0.02
<i>Crotalus durissus terrificus</i>	0.994	0.01
<i>Crotalus scutulatus scutulatus</i>	0.921	0.002
<i>Echis carinatus</i>	0.953	0.02
<i>Gloydius brevicaudus</i>	0.987	0.03
<i>Micrurus fulvius</i>	0.982	0.12
<i>Naja naja naja</i>	0.999	0.1
<i>Pseudechis australis</i>	0.999	1.3
<i>Trimeresurus elegans</i>	0.998	0.16
<i>Vipera berus</i>	0.999	0.22
<i>Vipera russelli</i>	0.98	0.16

Фиг. 17

Таблица 5

Маримастат обладает более широким спектром действия против металлопротеиназ яда по сравнению со спектром действия, о котором сообщалось ранее. IC₅₀ (мкМ) основана на анализах по ингибированию ММР в соответствии с детальным описанием, приведенном в Примере 2. Предусматривается, что введение маримастата может быть стратегически скомбинировано с вареспладибом для парентерального введения или метилвареспладибом для перорального введения, и может быть создана эффективная стратегия для безыгольного лечения непосредственно после укуса змеи.

Яд	R-квадрат	IC50 мкМ
<i>Agkistrodon blomhoffii brevicaudus</i>	0.997	0.04
<i>A. calloselasma rhodostoma</i>	0.992	0.04
<i>Agkistrodon contortrix</i>	0.968	0.06
<i>Agkistrodon piscivorus</i>	0.959	0.04
<i>Bitis gabonica</i>	0.993	0.03
<i>Bothrops asper</i>	0.994	0.14
<i>Bothrops jararaca</i>	0.994	0.06
<i>Crotalus adamanteus</i>	0.985	0.16
<i>Crotalus atrox</i>	0.997	0.03
<i>Crotalus durissus terrificus</i>	0.996	0.01
<i>Echis carinatus</i>	0.92	0.04
<i>Naja naja naja</i>	0.995	0.13
<i>Trimeresurus elegans</i>	0.993	0.22
<i>Vipera berus</i>	0.991	0.22
<i>Vipera russelli</i>	0.989	0.23

Фиг. 18

Таблица 6

Батимастат обладает более широким спектром действия против металлопротеиназ змеиного яда по сравнению со спектром действия, о котором сообщалось ранее. IC₅₀ (мкМ) основана на анализе по ингибированию MMP в соответствии с детальным описанием, приведенном в Примере 2. Предусматривается, что введение батимастата может быть стратегически скомбинировано с вареспладибом для парентерального введения в качестве эффективной стратегии для лечения укусов змей.

Яд	R-квадрат	IC50 мкМ
<i>Acanthophis antarcticus</i>	0.999	1.21
<i>Agkistrodon blomhoffii brevicaudus</i>	0.999	0.03
<i>Agkistrodon piscivorus</i>	0.974	0.056
<i>Bitis gabonica</i>	0.998	0.084
<i>Crotalus adamanteus</i>	0.995	0.460
<i>Crotalus atrox</i>	0.961	0.031
<i>Crotalus durissus terrificus</i>	0.977	0.023
<i>Crotalus scutulatus scutulatus</i>	0.958	0.004
<i>Echis carinatus</i>	0.959	0.075
<i>Micrurus fulvius</i>	0.979	0.056
<i>Trimeresurus elegans</i>	0.998	0.49
<i>Vipera berus</i>	0.996	0.45

Фиг. 19
Таблица 7

Вориноустат, иломаустат, габексат, нафамостат обладают более широким спектром действия против металлопротеиназ змеиного яда по сравнению со спектром действия, о котором сообщалось ранее. Стоит отметить, что синтетические ингибиторы протеазы габексат и нафамостат оказывают значительный эффект на активность металлопротеиназ яда некоторых змей. IC₅₀ (мкМ) основана на анализе по ингибированию MMP в соответствии с детальным описанием, приведенном в Примере 2. Предусматривается, что данные препараты вводятся парентерально или перорально по отдельности или в комбинации с терапией с использованием вареспладиба для эффективного лечения укусов змей.

Вориноустат	Яд	R-квадрат	IC50 мкМ
	<i>Agkistrodon blomhoffii brevicaudus</i>	0.971	20.0
	<i>Agkistrodon contortrix</i>	0.89	22.2
	<i>Agkistrodon piscivorus</i>	0.942	27.0
	<i>Bitis gabonica</i>	0.986	10.9
	<i>Bothrops asper</i>	0.992	4.5
	<i>Crotalus adamanteus</i>	0.798	25.6
	<i>Crotalus atrox</i>	0.991	15.8
	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	0.98	24.89
	<i>Echis carinatus</i>	0.885	21.5
	<i>Gloydius brevicaudus</i>	0.947	25.3
	<i>Trimeresurus elegans</i>	0.964	36.0
	<i>Vipera berus</i>	0.991	22.3
Габексат	<i>Agkistrodon blomhoffii brevicaudus</i>	0.996	6.6
	<i>Agkistrodon contortrix</i>	0.932	11.95
	<i>Agkistrodon piscivorus</i>	0.952	1.4
	<i>Bothrops jararaca</i>	0.996	18.5
	<i>Crotalus adamanteus</i>	0.995	1.6
	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	0.96	0.25
	<i>Echis carinatus</i>	0.995	3.2
	<i>Gloydius brevicaudus</i>	0.999	2.63
	<i>Gloydius brevicaudus(2)</i>	0.993	1.21
	<i>Oxyuranus scutellatus</i>	0.993	10.4
Нафамостат	<i>Agkistrodon blomhoffii brevicaudus</i>	0.992	2.28
	<i>Agkistrodon piscivorus</i>	0.978	114.8
	<i>Bothrops jararaca</i>	0.995	4.33
	<i>Crotalus adamanteus</i>	0.995	2.69
	<i>Crotalus atrox</i>	0.896	37.2
	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	0.96	3.4
	<i>Echis carinatus</i>	0.999	5.7
	<i>Gloydius brevicaudus</i>	0.979	1.05
	<i>Oxyuranus scutellatus</i>	0.953	0.030

Фиг. 20
Таблица 8



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2