

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **042029**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.12.28

(21) Номер заявки
202090764

(22) Дата подачи заявки
2017.12.08

(51) Int. Cl. *A61K 31/522* (2006.01)
A61K 31/353 (2006.01)
A61K 31/47 (2006.01)
A61K 31/352 (2006.01)
A61K 47/12 (2006.01)
A61P 31/22 (2006.01)
C40B 40/04 (2006.01)

(54) **ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ ЭЛИМИНАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ
ГЕРПЕСВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ ИЗ ТКАНЕЙ МАКРООРГАНИЗМА**

(43) **2020.08.03**

(86) **PCT/RU2017/000920**

(87) **WO 2019/112464 2019.06.13**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ФАРБЕР БОРИС СЛАВИНОВИЧ;
ФАРБЕР СОФЬЯ БОРИСОВНА (RU)**

(72) Изобретатель:
**Фарбер Борис Славинович, Фарбер
Софья Борисовна (RU), Мартынов
Артур Викторович (UA)**

(74) Представитель:
Васильева Г.С. (RU)

(56) WO-A1-2016205695
WO-A1-2013119825
SANTO SH KUMAR MAURYA ET
AL. ANTIDYSLIPIDAEMIC ACTIVITY OF
GLYCYRRHIZA GLABRA IN HIGH FRUCTOSE
DIET INDUCED DYSLIPIDAEMIC SYRIAN
GOLDEN HAMSTERS/ Indian Journal of Clinical
Biochemistry J4°24 (4), 2009, p. 404-409, abstract,
table 1
WO-A1-9734619

(57) В изобретении предлагается фармацевтическая композиция, предназначенная для элиминации возбудителей герпесвирусных инфекций из тканей макроорганизма, которая содержит ацикловир и супрамолекулярную структуру из неразделенной смеси комбинаторных производных эпигалокатехина галлата, полученную путем одновременной модификации эпигалокатехина галлата янтарным ангидридом и уксусным ангидридом в мольном соотношении компонентов реакции 764:2040:2040. Фармацевтическая композиция дополнительно может содержать супрамолекулярную структуру из неразделенной смеси комбинаторных производных глицирризина, полученную путем одновременной модификации янтарным ангидридом и уксусным ангидридом в мольном соотношении компонентов реакции 92:155:155. Также может содержать один или несколько низкомолекулярных активаторов TOLL-рецепторов: акридонуксусную кислоту, тилорон, зимозан, имидазохиолин, имиквимод или холекальциферол.

B1**042029****042029****B1**

Область техники

Изобретение относится к фармации, органической и биоорганической комбинаторной химии, а именно к двум новым комбинаторным библиотекам производных эпигалокатехина и глицирризина в виде супрамолекулярных структур, которые при использовании без разделения на отдельные компоненты в составе фармацевтической композиции обладают мощными противовирусными свойствами и способны приводить к элиминации возбудителей вирусных инфекций, вызванных представителями рода *Herpesviridae*.

Предшествующий уровень техники

Герпесвирусы.

Герпесвирусная инфекция может существовать у человека в различных формах: пожизненная латентная персистенция, рецидивирующее течение, формирование иммунодефицитов, соматической иммунозависимой патологии, хронического воспаления, опухолевых процессов - и даже встраиваться в генный аппарат. Особенностью течения герпесвирусных инфекций является возможность вовлечения в инфекционный процесс многих органов и систем, чем и обусловлено многообразие вызываемых герпес-вирусами заболеваний, варьирующих от простых кожно-слизистых до угрожающих жизни генерализованных инфекций. Важное свойство герпесвирусов - способность после первичного инфицирования человека в детском возрасте пожизненно персистировать и реактивироваться под влиянием различных экзо- и эндогенных провоцирующих факторов. Герпесвирусная инфекция лучше всего характеризуется одним образным выражением: "Однажды инфицирован - инфицирован на всю жизнь". Появляющиеся в ответ на внедрение вирусов герпеса специфические антитела зачастую не обеспечивают санацию от вирусов и часто не предупреждают рецидива заболевания. В связи с этим перед практикующими врачами - акушерами, педиатрами, терапевтами в первую очередь стоят задачи своевременной диагностики инфекции и определения активности ее течения. Правильная оценка и интерпретация полученных результатов клинического, специфического лабораторного и инструментального исследования позволяют разработать адекватные и наиболее безопасные лечебные и реабилитационные мероприятия для инфицированных и больных - беременной женщины, плода, ребенка, взрослого пациента. При герпесе, как и при других хронических заболеваниях с вирусной персистенцией, нередко развивается неполноценность иммунных реакций, обусловленная недостаточностью различных звеньев иммунной системы и ее неспособностью элиминировать вирус. Сохраняющиеся в течение всей жизни, иногда в довольно высоких титрах, низкоафинные вируснейтрализующие антитела хотя и препятствуют распространению вирусов, но не предупреждают возникновения рецидивов. Длительное нахождение герпесвирусов у человека становится возможным благодаря сложной стратегии противоборства и "ускользания" от иммунной системы хозяина. В достижении этого состояния можно выделить три пути стратегии возбудителя: "тайное присутствие", позволяющее длительно находиться не распознанным иммунной системой, локализуясь в латентном состоянии в нейронах (вирус простого герпеса - ВПГ), лимфоидных (вирус Эпштейна-Барр - ВЭБ) и гемопоэтических клетках (цитомегаловирус - ЦМВ); "эксплуатация" - использование иммунных реакций в собственных интересах; "саботаж" - повреждение механизмов иммунной защиты. Именно стратегия "саботажа", как считают, лежит в основе индуцированной вирусом иммуносупрессии, препятствующей полному удалению патогена и, как следствие, поддерживающей хроническое течение инфекции. В настоящее время герпесвирусы четко классифицированы и объединены в обширное семейство *Herpesviridae*. Семейство *Herpesviridae* включает в себя более 100 представителей, 8 из которых для человека наиболее патогенны (*human herpes virus* - HHV). Внешне сходство герпесвирусов настолько велико, что под электронным микроскопом их практически невозможно различить. Индивидуальность "родственников" начинает проявляться только тогда, когда дело доходит до антигенных свойств вирионных белков и степени гомологии ДНК. Герпесвирусы - филогенетически древнее семейство крупных ДНК-вирусов и, в зависимости от типа клеток, в которых протекает инфекционный процесс, характера репродукции вируса, структуры генома, молекулярно-биологических и иммунологических особенностей, подразделяются на 3 подсемейства: α , β и γ . Подсемейство *Alpha-herpesvirinae* (α -герпесвирусы) включает ВПГ-1, -2 и -3 (*Varicella Zoster virus*), которые характеризуются быстрой репликацией вируса и цитопатическим действием на культуры инфицированных клеток. Репродукция α -герпесвирусов протекает в различных типах клеток, особенно в эпителиальных, оказывая цитолитическое действие. В нейронах они вызывают латентную персистирующую инфекцию. Подсемейство *Beta-herpesvirinae* (β -герпесвирусы) видоспецифично, поражает различные виды клеток, которые при этом увеличиваются в размерах (цитомегалия), могут вызывать иммуносупрессивные состояния. Инфекция может принимать генерализованную или латентную форму, в культуре клеток легко возникает персистенция инфекции. Вирусы этой группы характеризуются медленным ростом в эпителиальных клетках, оказывая "цитомегалическое" и лимфопролиферативное действие. Вирусы могут поддерживаться в латентном состоянии в клетках эпителия слюнных желез, миндалин, почек, лимфоцитах, секреторных железах, почках и других тканях. К этой группе относятся ЦМВ, ВПГ-6, ВПГ-7. Подсемейство *Gamma-herpesvirinae* (γ -герпесвирусы) характеризуется тропностью к лимфоидным клеткам (Т- и В-лимфоциты), в которых они длительно персистируют с возможностью трансформироваться, вызывая лимфомы, саркомы. Инфекционный процесс часто останавли-

вается на прелитической стадии, т.е. отсутствует образование вирусных частиц. Латентное потомство обнаруживается в лимфоидной ткани. В эту группу входят вирус Эпштейна-Барр и герпесвирус человека 8 типа, ассоциированный с саркомой Капоши (KSHV). Заболевания, вызываемые ВПГ 1 и 2 типа, принято называть герпетической или ВПГ инфекцией, прочие представители семейства *Herpesviridae* - герпес-вирусными. Представители *Herpesviridae*, несмотря на многие общие свойства, характерные для всего семейства, имеют и значимые различия. Сравнивая характеристики герпесвирусов, наиболее часто вызывающих заболевания у человека, обнаруживают большее число однотипных признаков, нежели различий. Так, имеют место одинаковая абсолютная патогенность, одинаковые пути заражения, восприимчивость, склонность к рецидивирующему течению с активацией на фоне интеркуррентных, в т.ч. инфекционных заболеваний, пожизненная персистенция в организме человека и невозможность их полной элиминации, способность "ускользнуть" от факторов иммунной защиты, в то же время способность подавления защитных функций человека. Вместе с тем имеются и различия: в первую очередь тропизм поражения и клинические характеристики. Согласно современным воззрениям инфектологии, человек, ввиду своей относительной эволюционной молодости, еще не успел образовать ни с одним из герпесвирусов равновесной системы, что делает их в разной степени патогенными. Однажды заразившись, человек фактически никогда с ними не расстанется и всю жизнь как бы носит в себе "неразорвавшуюся бомбу". Разрыв "бомбы" (реактивация "спящего" паразита) может произойти при неблагоприятных ситуациях (стресс, вторичная инфекция, переохлаждение, травма, обострение хронического заболевания и т.д.) даже спустя многие годы, что и наблюдается при латентном течении герпетической и цитомегаловирусной инфекций, хламидиозе, токсоплазмозе, ВИЧ-инфекции и т.д. Сегодня во многом определена значимость герпесвирусных инфекций в формировании соматических, казалось бы, неинфекционных заболеваний. Нередко при клинически выявленном медленном течении инфекционного процесса, развившемся вследствие герпесвирусной инфекции во внутриутробном периоде, манифестация его проявлений наблюдается не в периоде новорожденности, а в более старшем возрасте. Выявлено, что у большинства детей, умерших в возрасте до 14 лет от различных причин, фоновым заболеванием были именно внутриутробная инфекция и связанное с ней иммунодефицитное состояние. И это диагностировалось только тогда, когда наступил летальный исход. Следовательно, выявление и изучение латентно текущей инфекции, уходящей корнями во внутриутробный период, актуальная задача не только педиатрии, но и всего здравоохранения. Данный раздел остается самым трудным и практически неизученным. В настоящее время имеется множество свидетельств того, что персистирующие герпесвирусные инфекции являются этиологическим и патогенетическим факторами в развитии хронических соматических заболеваний - кардитов, аритмий сердца, бронхиальной астмы, аутоиммунных процессов, хронических и рецидивирующих обструктивных заболеваний легких, язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, рефрактерных форм хронического гломерулонефрита, сахарного диабета, синдрома хронической усталости, атеросклероза с поражением органов кровообращения, шизофрении и даже преждевременного старения. Многие из этих заболеваний даже в крупных руководствах по-прежнему описываются как идиопатические, неизвестной этиологии. Появляется все больше данных о роли герпесвирусов в формировании онкологических заболеваний. Еще в 1910 г. великий провидец И.И. Мечников печатает в газете "Русское слово" статью, в которой пишет буквально следующее: "Одна причина рака, безусловно, находится в самом организме, но другая попадает в него в виде экзогенного начала, скорее всего - вируса...". В 1911 г. американский ученый Пейтон Раус (1879-1970) обнаружил, что куриная саркома (саркома Рауса) может перевиваться не только клетками, но и субмикроскопическими агентами, экстрагируемыми из клеток, т.е. вызываться вирусами. В 1933 г. Шоуп открыл вирус папилломы, поражающий кроликов в Северной Америке, в 1936 г. Дж. Биттнер доказал вирусное происхождение рака молочной железы у мышей, в 1951 г. Л. Гроссом открыл вирус лейкоза мышей, в 1964 г. В. Ярретом - вирус лейкоза домашних кошек, а затем и вирус лейкоза обезьян. В 1946 г. советский вирусолог Л.А. Зильбер предложил вирусогенетическую теорию рака. Согласно этой теории, при онкогенезе ДНК вирусного происхождения внедряется (интегрируется) как фрагмент в ДНК клетки и становится составной частью клеточного генома. Эта интеграция - начальное звено в цепи процессов дальнейшего превращения нормальной клетки в раковую. "Каким бы путем опухолеродный вирус ни проник в организм человека, долгое время он ничем не проявляет своего присутствия. В этом нет ничего удивительного. Он мало болезнетворен. Ему нужны особые условия, чтобы проявить болезнетворность, и пока этих условий нет, вирус вполне безобиден" (Л.А. Зильбер). Л.А. Зильбер писал: "...можно считать доказанным, что механизм действия ДНК или РНК вирусов на клетку заключается в основном в интеграции их нуклеиновой кислоты с геномом клетки, благодаря чему в клетке возникают наследственные изменения, выводящие клетку из соподчинения системам, регулирующим клеточный рост". В настоящее время установлено, что к вирусам, причастным к раковым заболеваниям человека, относятся ДНК-содержащие вирусы, в частности вирусы Эпштейна-Барр и другие герпесвирусы. Вирус Эпштейна-Барр присутствует в клетках 10-20% от всех раковых опухолей желудка. Маркеры вирусов простого герпеса 1 и 2 типов, цитомегаловируса, вируса Эпштейна-Барр и вируса герпеса человека 6 типа обнаружены в крови и костном мозге большинства больных острыми лейкозами в период индукционной полихимиотерапии. В ходе масштабного исследования возбудителей инфекционных заболеваний, отнесенных Международным агентством по изучению рака (International Agency for Research on Cancer, Лион, Франция) к

разряду канцерогенных для человека, выявлено, что из 12,7 млн впервые выявленных случаев злокачественных опухолей, имевших место в 2008 г., доля инфекционно-обусловленных случаев составила 16,1%, т.е. около 2 млн. У женщин рак шейки матки составил около половины случаев инфекционно-обусловленных вспышек раковых заболеваний, у мужчин рак желудка и печени составил более 80%. С герпесвирусами (ВЭБ) были связаны злокачественные новообразования носоглотки, неходжкинская лимфома, саркома Капоши. Многообразие патологических процессов и различных заболеваний, связанных с персистирующими внутриклеточными патогенами, в том числе и с герпесвирусами, явилось основанием того, что в 2003 г. Европейское региональное бюро ВОЗ отнесло группу персистирующих внутриклеточных инфекций к числу болезней, определяющих будущее как инфекционной, так и соматической патологии человеческой популяции. Еще несколько десятков лет назад ведущими среди причин детской заболеваемости и смертности были острые инфекции. Грипп, кишечные, менингококковые инфекции, сепсис, пневмонии, инфекции мочевыводящих путей и связанные с ними заболевания были основной патологией, определяющей продолжительность жизни как детского, так и взрослого населения. Прошло совсем немного времени, и человечество вооружилось мощнейшими противoinфекционными средствами, среди которых основными стали антибиотики и вакцины. И теперь диагнозы "холера", "чума", "сепсис", "менингит", "пневмония" уже не являются смертным приговором для больного. Сегодня в большинстве случаев возможно не только излечение, более того, можно предотвратить само заболевание, вызванное этими инфекциями. Человечество начало смотреть в будущее с надеждой на избавление от инфекционных заболеваний. Наша самоуверенность дошла до того, что в 60-70-х годах прошлого века, т.е. 40-50 лет тому назад, известные ученые публично заявляли о конце века инфекций: "...книгу инфекций можно закопать глубоко в землю, они теперь не страшны..." Ведь практически побеждена страшная "испанка" начала XX века, унесшая больше жизней, чем Первая мировая война, уходят как страшный сон обездвиженность полиомиелита, малярийные ознобы, столбняк и многие страшные проявления инфекций. Но полыхнула "стафилококковая чума", пришли "забытые" полиомиелит, дифтерия; грянули ВИЧ и СПИД, лихорадка Эбола, птичий и свиной грипп и т.д. А сегодня это герпесвирусные инфекции, и их роль во влиянии на здоровье человека еще предстоит узнать. Ведь знаем мы об этих весьма распространенных инфекциях еще крайне мало, да и к науке об окружающем нас микро- и макром мире лишь прикоснулись, причем только к ее самому близкому краю. Сегодня мы не имеем общепринятых подходов к диагностике заболеваний, связанных с герпесвирусными инфекциями, не разработаны достоверные критерии, показания и характер проведения рациональной и адекватной терапии, а также отсутствуют достаточно эффективные лекарственные средства, проникающие внутрь клетки и способные к нейтрализации данной группы патогенов. Надеемся в цикле статей по проблемам герпесвирусных инфекций в какой-то мере ответить на некоторые, наиболее часто задаваемые вопросы [Юлиш Е.И. Здоровье ребенка. 2015. № 3 (63)].

Роль ингибиторов гистондеацетилазы в "проявлении" латентных герпесвирусов, потенцирование эффектов ацикловира.

Индукция литической фазы EBV-инфекции в сочетании с воздействием антигерпетического лекарственного средства представляет собой перспективный целевой терапевтический подход к терапии EBV-ассоциированных лимфом и других патологий, ассоциированных с латентными герпесвирусами. Короткоцепочечные жирные кислоты и другие вещества были использованы для индукции экспрессии генов литической фазы EBV в культурах клеток и у животных, но эти исследования, как правило, не были переведены в клиническое применение. Недавний успех клинического испытания с использованием аргинина бутирата - ингибитора пан-HDAC (пан-HDAC) и ганцикловира для лечения EBV-лимфомы стимулировал проведение изучения потенциала нескольких ингибиторов HDAC для стимуляции экспрессии генов литической фазы EBV человека в клетках лимфомы. Представленные результаты исследования включали такие препараты: жирные кислоты с короткой цепью (бутират натрия и вальпроевая кислота); гидроксамовые кислоты (оксафлатин, Scriptaid, субероил анилид гидроксамовая кислота, panobinostat [LBH589] и belinostat [PXD101]); бензамид MS275; циклический тетрапептид апицидин; и недавно обнаруженный ингибитор HDAC-лейлазола. За исключением субероил-анилид-гидроксамовой кислоты и PXD101, все другие ингибиторы HDAC эффективно сенсibilизировали клетки EBV-лимфомы к ганцикловиру. LBH589, MS275 и крупказол были эффективны при наномолярных концентрациях и от 104 до 110 раз более эффективны, чем бутират. Эффективность этих ингибиторов HDAC делают их потенциально применимыми в качестве сенсibilизаторов к противовирусным препаратам для лечения EBV-ассоциированных лимфом [Blood. 2012; 119(4): 1008-1017].

В другой статье также показано, что комбинированное лечение инфицированных клеток ацикловиrom (ACV) и вальпроевой кислотой (VPA) выявило 50-250-кратное потенцирование противовирусной активности ACV [Iran J Med Sci 2002; 27(4): 180-187].

Эпигалокатехин галлат как ингибитор гистондеацетилазы.

Поскольку опосредованное p300/CBP гиперацетилирования RelA (p65) имеет решающее значение для активации ядерного фактора KB (NF-KB), ослабление ацетилирования p65 является потенциальной молекулярной мишенью для предотвращения хронического воспаления, играющего важную роль в патологии атеросклероза и рака. Во время скринингового исследования для идентификации природных со-

единений с активностью ингибитора гистоновой ацетилтрансферазы (HDAC) был идентифицирован эпигаллокатехин-3-галлат (EGCG) в качестве нового HDACi, эффективный для ингибирования большинства HDAC, включая HDAC, SIRT1 и HMTase. В дозе 100 Ммоль/л EGCG аннулирует р300-индуцированное ацетилирование p65 *in vitro* и *in vivo*, повышает уровень цитозольного ИКБА и подавляет индуцированную NF-KB активацию фактора некроза опухоли (TNFA). Также было показано, что EGCG ингибирует транслокацию p65 к ядру, индуцированную TNF α , подтверждая, что гиперацетилирование имеет решающее значение для трансдукции NF-KB, а также его активности. Кроме того, обработка EGCG ингибировала ацетилирование p65 и экспрессию генов-мишеней NF-KB в ответ на различные раздражители. Наконец, было показано, что EGCG уменьшает связывание pAC с промоторной областью гена интерлейкина-6, что подчеркивает важность баланса между HAT и гистондеацетилазами в опосредованной NF-KB воспалительной сигнальной реакции. Важно отметить, что EGCG при 50 Ммоль/л полностью блокирует экспрессию цитокинов, индуцированных инфекцией EBV, а затем трансформацию В-лимфоцитов, индуцированную EBV. Эти результаты показывают решающую роль ацетилирования в развитии воспалительных заболеваний [Cancer Res 2009; 69(2):583-92].

Глицирризиновая кислота.

Для глицирризиновой кислоты показана противовирусная активность в отношении латентных вирусов, таких как вирус Эпштейна-Барр и Саркома Капоши-ассоциированного вируса. Это единственный антивирусный препарат, обладающий способностью полностью элиминировать вирусы герпеса из В-лимфоцитов даже в том случае, когда эти вирусы находятся в латентном состоянии. Также глицирризин проявил антивирусную активность в отношении цитомегаловируса, вирусов герпеса 1 и 2 типов, гриппа, коронавируса CAPC [Lin J.-C., Cherng J.-M., Hung M.-S., Baltina L.A., Baltina L., Kondratenko R. Antiviral Res. 2008; 79(1):6-11. doi:10.1016/j.antiviral.2008.01.160.]

Терминология.

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

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

Комбинаторный синтез - синтез методами комбинаторной химии, включает одновременную реакцию между тремя и более реагентами с образованием комбинаторного продукта синтеза, состоящего из десятков производных. Эти производные затем разделяют хроматографически, подтверждают их структуру и изучают биологическую активность.

Одновременная комбинаторная модификация двумя модификаторами - если в реакции комбинаторного синтеза используют полифункциональную молекулу, имеющую более двух доступных для модификации групп, и в реакцию сразу вводят два модифицирующих агента, например уксусный ангидрид и янтарный ангидрид. В результате реакции образуется смесь ацилированных производных в разных положениях - ацетилсукцинил производных.

Комбинаторная библиотека (combinatorial library) [лат. combinare - соединять, сочетать; греч. biblion - книга и theke - хранилище] - набор большого числа всевозможных химических соединений, белков, генов или олигонуклеотидов, позволяющий осуществлять в нем быстрый поиск целевых генов или белков-мишеней. Например, набор, состоящий из миллионов различных химических веществ, или совокупность рекомбинантных молекул ДНК, полученная встраиванием в вектор кДНК легкой и тяжелой цепей различных антител, и др.

Деацетилазы гистонов (англ. Histone deacetylases, HDACs), (КФ 3.5.1) - ферменты, катализирующие удаление ацетильной группы ϵ -N-ацетиллизина гистонов, внесенные ферментами гистонацетилазами (histone acetylases, HATs) в остатки K3 и K14 гистона H3 и K5, K8, K12 и K16 гистона H4, а также остатки некоторых лизинов гистонов H2A и H2B. Модифицируя гистоны и изменяя конформацию хроматина, гистондеацетилазы играют важную роль в регуляции экспрессии генов. В то время как гиперацетилирование гистонов под действием гистонацетилаз обычно связано с повышением транскрипционной активности, гистондеацетилазы вызывают гипоацетилирование и вследствие репрессию генов. Гипоацетилирование приводит к уменьшению промежутка между нуклеосомой и намотанной на нее ДНК. Более плотная упаковка ДНК уменьшает ее доступность для транскрипционных факторов, что приводит к транскрипционной репрессии. Обычно гистондеацетилазы действуют в составе крупных комплексов, вместе с другими белками подавляющими активность хроматина. Субстратами гистондеацетилаз могут быть не только гистоны, но и некоторые другие белки (p53, E2F, α -тубулин и MyoD). Семейство состоит

из 18 белков, принадлежащих к 4 классам. 11 представителей, принадлежащие к I (reduced potassium dependency 3 (RPD3)-подобные; HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC8), II (класс дрожжевой гистондеацетилазы 1, Hda1; не путать с HDAC11, HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC9, HDAC10) и IV классам (HDAC11), названы "классическими" гистондеацетилазами, в то время как представители класса III названы сиртуинами. Представители I и II классов ингибируются трихостатином А (TCA, TSA), в то время как представители других классов нечувствительны к нему.

Ингибиторы гистондеацетилаз (HDACi).

На настоящий момент существует ряд ингибиторов гистондеацетилаз, начиная со сложных соединений, выделенных из бактерий и грибов (TCA, тапоксин), и кончая относительно простыми соединениями (бутират). Большинство HDACi имеют трехкомпонентную структуру, состоящую из цинк-связывающего участка, линкера и последовательностью, взаимодействующей с аминокислотными остатками у входа в активный центр HDAC. Ингибиторы классических деацетилаз функционируют путем вытеснения иона цинка из активного центра и таким образом инактивируя систему смены зарядов. TCA обладает оптимальной конформацией для попадания в активный центр, имея гидроксаматную группу и пятиуглеродный линкер перед фенильной группой. TCA вызывает наисильнейший обратимый эффект из известных HDACi (его IC 50% находится в наномолярной области). HDACi вызывают гиперацетилирование, активацию транскрипции, и по некоторым данным, активное деметилирование ДНК. Поскольку HDACi замедляют рост и приводят к дифференцировке и апоптозу раковых клеток, ведутся активные разработки по их применению для терапии рака (вориностат, ромидеписин, белиностат). HDACi индуцируют апоптоз, арест клеточного цикла, старение, дифференцировку, иммуногенность клеток и ингибируют ангиогенез при некоторых видах рака. Наиболее успешными примерами использования HDACi являются вориностат и ромидеписин у пациентов с рефракторной кожной и периферической Т-клеточной лимфомой. В соответствии с химической структурой можно выделить 4 класса HDACi-гидроксаматы, циклические пептиды, алифатические кислоты и бензамиды. Большая часть сведений об этих молекулах основана на онкологических исследованиях. К пан-HDACi (неспецифическим HDACi) в основном относятся гидроксаматы. Гидроксаматы представлены трихостатином А (TSA), который ингибирует рост клеток при раке легкого и груди и является пан-клеточным ингибитором HDAC. TSA не вошел в клиническую практику по причине нежелательных явлений - апоптоз нормальных клеток и повреждение ДНК. Суберанилогидроксаминевая кислота (SAHA) (вориностат) также является гидроксаматом, это первый HDACi, одобренный FDA для клинического применения. Его действие приводит к активации антипролиферативных генов p21WAF1, p27 KIP1, DR5 и TNF α , и снижению активности положительных регуляторов роста: CDK2, CDK4, cyclin D1 и cyclin D2. В настоящее время исследуется множество молекул из класса гидроксаматов: e CBHA, LAQ-824, PXD-101, LBH-589, ITF2357, оксамфлатин, ABHA, SBHA, Scriptaid, пироксамид, SK-7041, SK-7068 и тубацин. В последнее время ставится под сомнения активность пан-HDACi в отношении HDAC класса IIa, но в результате более подробных исследований открываются "истинные" пан-HDACi, например пандакостат. Дальнейшие перспективы пан-HDACi осложняются тем, что они малоэффективны в отношении солидных опухолей, но причины этого остаются неизвестными. В настоящее время значительное внимание уделяется разработке HDACi, селективных к определенным изоформам HDAC. Тем не менее, поиски новых пан-HDACi продолжают. Свидетельством тому являются и действия фармкомпаний: так в сентябре 2014 г. компании Servier и Pharmacyclists заключили соглашение о совместной разработке абексिनостата и других соединений. Появляются пан-HDACi "нового поколения", такие, как гивиностат, продолжаются и клинические испытания "старых" HDACi, таких, как панабиностат в составе моно- и комбинированной терапии, в том числе и солидных опухолей.

Ближайшим прототипом предлагаемой композиции является патент США [US9334272 B2] "Производные пуриновых и пиримидиновых противовирусных агентов и их использование в качестве перспективных противораковых агентов" в котором приводятся различные антигерпетические производные ацикловира в комбинации с ингибиторами гистондеацетилазы для терапии рака, которые потенцировали друг друга и подавляли рост раковых клеток. Недостатком данного прототипа является отсутствие в композиции комбинаторного производного бивалентно модифицированного эпигаллокатехина галлата, который даже в немодифицированном виде является ингибитором всех гистондеацетилаз, а в модифицированном виде его эффективная доза в 40 раз выше по отношению к SIRT1 и HDAC-3, кроме того, он совместно с ацикловиrom способен полностью элиминировать возбудитель как *in vivo*, так и *in vitro*. Также в прототипе отсутствует комбинаторное производное бивалентно модифицированного глицирризина, обладающего способностью подавлять репликацию вирусов герпеса в фазе латенции. В прототипе же не показана способность их производных вызывать полную элиминацию возбудителей герпесвирусов, а только повышение токсичности производных против некоторых раковых клеток.

Раскрытие изобретения

В основу изобретения поставленная задача получить фармацевтическую композицию, предназначенная для элиминации возбудителей герпесвирусных инфекций из тканей, которая содержит ацикловир и супрамолекулярную структуру из неразделенной смеси комбинаторных производных эпигаллокатехина галлата, полученную путем одновременной модификации эпигаллокатехина галлата янтарным ангидри-

ния по настоящему изобретению могут быть включены в приемлемые пропелленты под давлением, такие как дихлордифторметан, пропан, азот и тому подобное. Кроме того, ПФК могут быть включены в суппозитории смешиванием с множеством основ, таких как эмульгирующие основы или водорастворимые основы. Соединения по настоящему изобретению могут быть введены ректально с использованием суппозитория. Суппозиторий может содержать наполнители, такие как масло какао, карбоваксы и полиэтиленгликоли, расплавляющиеся при температуре тела, но твердые при комнатной температуре. Могут быть изготовлены стандартные лекарственные формы для перорального или ректального введения, такие как сиропы, эликсиры и суспензии, где каждая единица дозы, например чайная ложка, столовая ложка, таблетка или суппозиторий, содержит predetermined количество композиции, содержащей одно или более соединений по настоящему изобретению. Сходным образом, стандартные лекарственные формы для инъекции или внутривенного введения могут содержать соединение по настоящему изобретению в композиции в форме раствора в стерильной воде, нормальном физиологическом растворе или другом фармацевтически приемлемом носителе. Имплантаты для длительного высвобождения композиций хорошо известны в данной области техники. Имплантаты изготавливают в форме микросфер, пластинок и так далее с биodeградируемыми или не являющимися биodeградируемыми полимерами. Например, полимеры молочной и/или гликолевой кислот образуют деградируемый полимер, хорошо переносимый хозяином. Имплантат, содержащий ПФК по изобретению, располагают близко к очагу патологии, так чтобы локальная концентрация активного агента была повышенной по сравнению с остальными областями тела. При использовании здесь термин "стандартная лекарственная форма" относится к физически дискретным единицам, подходящим для использования в качестве однократных доз для субъектов людей и животных, при этом каждая единица содержит predetermined количество соединений по настоящему изобретению, которого, согласно вычислениям, достаточно для оказания желаемого эффекта, совместно с фармацевтически приемлемым разбавителем, носителем или наполнителем. Описания стандартных лекарственных форм по настоящему изобретению зависят от конкретного используемого соединения, и эффекта, который должен быть достигнут, и фармакодинамики используемого соединения у хозяина. Фармацевтически приемлемые эксципиенты, такие как наполнители, адъюванты, носители или разбавители, общедоступны. Кроме того, общедоступны фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, такие как агенты для регулирования pH и буферные агенты, агенты для регулирования тоничности, стабилизаторы, смачивающие агенты и тому подобное. Типичные дозы для системного введения варьируют от 0,1 мг до 1000 мг/кг массы тела субъекта на одно введение. Типичная доза может представлять собой одну таблетку для приема от двух до шести раз в сутки или одну капсулу или таблетку с длительным высвобождением для приема один раз в сутки с пропорционально более высоким содержанием активного ингредиента. Эффект длительного высвобождения может быть обусловлен материалами, из которых изготовлена капсула, растворяющимися при различных значениях pH, капсулами, обеспечивающими медленное высвобождение под воздействием осмотического давления или любым другим известным способом контролируемого высвобождения. Специалистам в данной области техники будет ясно, что уровни доз могут варьировать в зависимости от конкретного соединения, тяжести симптомов и предрасположенности субъекта к побочным эффектам. Некоторые из конкретных соединений обладают большей активностью, чем другие. Предпочтительные дозы данного соединения могут быть легко определены специалистами в данной области техники множеством способов. Предпочтительным способом является измерение физиологической активности ПФК. Один из интересующих способов представляет собой применение липосом в качестве наполнителя для доставки. Липосомы сливаются с клетками целевой области и обеспечивают доставку содержимого липосом внутрь клеток. Контакт липосом с клетками поддерживают в течение времени, достаточного для слияния, с использованием различных способов поддержания контакта, таких как выделение, связывающие агенты и тому подобное. В одном аспекте изобретения липосомы разработаны для получения аэрозоля для легочного введения. Липосомы могут быть изготовлены с очищенными белками или пептидами, опосредующими слияние мембран, такими как вирус Сендай или вирус гриппа и так далее. Липиды могут представлять собой любую полезную комбинацию известных липидов, образующих липосомы, включая катионные или цвиттерионные липиды, такие как фосфатидилхолин. Остальные липиды будут обычно нейтральными или кислыми липидами, такими как холестерин, фосфатидилсерин, фосфатидилглицерин и тому подобное. Для получения липосом может быть использован способ, описанный Kato et al. (1991) J. Biol. Chem. 266:3361. Кратко, липиды и композицию для включения в липосомы, содержащую патентуемую композицию, смешивают в подходящей водной среде, подходящим образом в солевой среде, где общее содержание твердых веществ будет находиться в диапазоне приблизительно 110 мас.%. После интенсивного перемешивания в течение коротких периодов времени, приблизительно 5-60 с, пробирку помещают в теплую водяную баню при приблизительно 25-40°C и этот цикл повторяют приблизительно 5-10 раз. Затем композицию обрабатывают ультразвуком на протяжении подходящего периода времени, обычно приблизительно 1-10 с, и, возможно, дополнительно перемешивают на вихревой мешалке. Затем объем увеличивают добавлением водной среды, обычно увеличивая объем в приблизительно 1-2 раза, с последующим взбалтыванием и охлаждением. Способ позволяет включать в липосомы супрамолекулярные структуры с высокой суммарной молекулярной массой.

Композиции с другими активными агентами.

Для применения в рассматриваемых способах ПФК по изобретению могут быть включены в композиции с другими фармацевтически активными агентами, в частности другими противовирусными, иммуномодулирующими и антимикробными агентами, известными в данной области техники. Классы средств для терапии герпесвирусных инфекций и их осложнений представлены в стандартизованных протоколах лечения данных патологий и могут комбинироваться с патентуемыми ПФК, например рибавирин, йоддезоксифторидин, ганцикловир, валганцикловир, валацикловир, пенцикловир. В композицию ПФК по изобретению могут также быть включены цитокины, например интерферон альфа, интерферон гамма, интерферон-бета, фактор некроза опухоли альфа, интерлейкин 12, индукторы интерферона циклоферон, тилорон, другие активаторы TOLL-рецепторов: зимозан, имидазохинолин, имиквимод, индуктор завершения фагоцитоза холекальциферол. Далее настоящее изобретение описано следующими примерами, которые не следует толковать как ограничивающие объем изобретения.

Пример 1. Получение комбинаторной смеси производных эпигалокатехина галлата (КЭГГ).

В 10 мл диоксана растворяют 764 мкМ эпигалокатехина галлата(I), добавляют 2040 мкМ янтарного ангидрида(III) и 2040 мкМ уксусного ангидрида, раствор перемешивают и греют с обратным холодильником 20 мин. Раствор переливают в ампулы и лиофилизируют для удаления растворителя и уксусной кислоты. Комбинаторную смесь используют для получения фармацевтических композиций, изучения структуры, определения биологической активности. На фиг. 1 приведена схема синтеза комбинаторных производных I. Одна исходная молекула (I) содержит 8 доступных для модификации фенольных гидроксильных групп.

Расчеты количества молей модификаторов ведут согласно формул комбинаторики

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

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

где m - количество разных производных молекул в комбинаторной смеси и количество молей (I) для реакции;

n - количество доступных для модификации фенольных гидроксидов в структуре I (n=8);

k - количество молей каждого модификатора.

Таким образом, имея только одну исходную молекулу (I) и два модификатора после комбинаторного синтеза мы получаем 764 комбинаторных производных (IV a-d) с разной степенью замещения, разного положения заместителей и разных перестановок остатков модификаторов не просто в виде смеси, а в виде трудно разделяемой супрамолекулярной смеси. Модификаторы - янтарный ангидрид либо уксусный ангидрид можно вводить как одновременно, так и последовательно - либо сперва ввести янтарный ангидрид, прогреть смесь с обратным холодильником 20 мин, а затем ввести уксусный ангидрид и также прогреть смесь еще 20 мин. Аналогично в этой реакции в качестве модификаторов вместо янтарного и/или уксусного ангидридов могут быть использованы: малеиновый ангидрид, аконитовый ангидрид, глутаровый, фталевый ангидрид и уксусный ангидрид, этиловый эфир муравьиной кислоты, монохлоруксусную кислоту, пропиолактон, этиленоксид и другие низкомолекулярные алкилирующие вещества (метилхлорид, этилхлорид, пропилахлорид). ЯМР С13-спектры определяли на спектрометре Bruker.

ЯМР С13 для комбинаторного производного эпигалокатехина (IVa-d): 157.8, 94.8, 95.3, 157.2, 99.4, 24.8, 157.3, 68.6, 82.7, 130.9, 129.9, 112.0, 145.3, 144.6, 146.3, 169.0, 2-3, 165.9, 121.2, 108.6, 109.6, 146.1, 140.3, 133/4, 154.3, 171.1, 28.8, 29.1, 174.7.

Для HPLC использовали микроколоночный хроматограф Милихром А-02 в градиенте ацетонитрил (5-100%)/0,1 М хлорная кислота + 0,5 М перхлорат лития. Комбинаторное производное на хроматограмме (фиг. 4) давало один четкий уширенный пик и не разделялось на компоненты, хотя время удержания отличалось как от эпигалокатехина, так и от его полностью замещенных производных. Это свидетельствовало о том, что между разными комбинаторными производными (в нашем случае их 764) образовывались сложные супрамолекулярные структуры, не разделяемые хроматографически. Аналогично себя ведет данное комбинаторное производное (КЭГГ) и при разделении в тонком слое (ацетонитрил:вода) и дает только одну полосу, которая не совпадает ни с одним из полученных производных.

В табл. 1 приведен результат скрининга производных (I) с разным соотношением модификаторов в качестве ингибиторов гистондеацетилаз.

НАТ и HDAC.

Ядерный экстракт клеток HeLa (NE) получали, как описано ранее [Yoon H.G., Choi Y., Cole P.A., Wong J. Mol Cell Biol 2005, 25: 324-35]. Анализ активности SIRT1 и HDAC-3 определяли с использованием коммерческого доступного набора (Biovision Biotechnology) в соответствии с инструкцией производителя. Активность деацетилазы SIRT1 анализировали с помощью набора SIRT1/Sir2 Deacetylase Fluorometric Assay (CycLex). В таблице приведены данные ингибирования гистондеацетилаз SIRT1 и HDAC-3 производными эпигалокатехина с разным соотношением модификаторов.

Таблица 1

Ингибирующая способность в отношении SIRT1 и HDAC-3 со стороны супрамолекулярных комбинаторных производных (I), полученных в реакции с разным мольным соотношением модификаторов

№ п/п	Мольные соотношения реагентов*			K _i (mM)	
	m	k1	k2	HDAC-3	SIRT
1	764	8160***	8160***	>4	>5
2	-/-	4080	4080	>4	>5
3	-/-	2040	2040	0.10±0.02	0.24±0.03
4	-/-	1020	1020	0.60±0.03	0.80±0.05
5	-/-	510	39	>4	>5
6	-/-	255	19	>4	>5
7	-/-	127	10	>4	>5
8	-/-	63	5	>4	>5
9	-/-	31	2	>4	>5
10	-/-	15	1	>4	>5
13	-/-	0	0	>4	>5
14	-/-	8160***	0	>4	>5
16	-/-	4080	0	>4	>5
17	-/-	2040	0	>4	>5
18	-/-	1020	0	>4	>5
19	-/-	510	0	>4	>5
20	-/-	255	0	>4	>5
21	-/-	127	0	>4	>5
22	-/-	63	0	>4	>5
23	-/-	31	0	>4	>5
24	-/-	15	0	>4	>5
25	-/-	0	1	>4	>5
26	-/-	1	15	>4	>5
27	-/-	0	31	>4	>5
28	-/-	0	63	>4	>5
29	-/-	0	127	>4	>5
30	-/-	0	255	>4	>5
31	-/-	0	510	>4	>5
32	-/-	0	1020	>4	>5
33	-/-	0	2040	>4	>5
34	-/-	0	4080	>4	>5
35	-/-	0	8160	>4	>5
36	-/-	8160***	1	>4	>5
37	-/-	4080	15	>4	>5
38	-/-	2040	31	>4	>5
39	-/-	1020	63	>4	>5
40	-/-	510	127	>4	>5
41	-/-	255	255	>4	>5
42	-/-	127	510	>4	>5
43	-/-	63	1020	>4	>5
44	-/-	31	2040	>4	>5
45	-/-	15	4080	>4	>5
46	-/-	0	8160	>4	>5

* m - количество молей (I) в реакции комбинаторного синтеза;

k1 - количество молей янтарного ангидрида в реакции;

k2 - количество молей уксусного ангидрида в реакции;

** K_i (mM) - концентрации высвобождения флюоресцентного диацетилованного продукта различных концентрация субстрата были использованы для расчетов Lineweaver-Burk расчеты. Данные средних значений от двух независимых экспериментов.

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

Как видно из табл. 1, только при рассчитанном соотношении компонентов, когда образуется максимальное количество разных производных (I), образуется биологическая активная и эффективная супрамолекулярная структура (производное IV (a-d)), способная в дозе 0,1 мкМ/л на 50% ингибировать как HDAC-3, так и SIRT, что на 3 порядка меньше, чем исходная доза немодифицированного (I). Другие производные либо не отличались от немодифицированного (I) по способности ингибировать HDAC-3 и SIRT, либо были значительно менее активными. Это свидетельствует, что при оптимальном соотношении модификаторов при образовании в растворе всех возможных производных (764 вариации производных (I) с разными перестановками и размещениями в заместителях) образуется более сложная надмолекулярная "квазиживая" структура с другими свойствами и более чем на 3 порядка большей фармакологической активностью.

Пример 2. Получение полностью сукцинированного эпигалокатехина.

В 10 мл диоксана растворяют 10 мМ эпигалокатехина(I), добавляют 80 мМ янтарного ангидрида(III), раствор перемешивают и греют с обратным холодильником 20 мин. Раствор переливают в ампулы и лиофилизируют.

ЯМР C13 октасукцинил эпигалокатехина: 174.7, 29.1, 28.8, 171.1, 149.3, 108.5, 149.6, 107.4, 155.3, 112.9, 25.0, 68.3, 82.1, 174.7, 29.1, 28.8, 133.1, 118.9, 118.9, 144.5, 133.5, 144.5, 165.9, 123.4, 118.5, 146.0, 140.5, 146.0, 167.9.

HPLC (Milichrom A-02; Gradient $\text{HClO}_4/\text{LiClO}_4:\text{AcCN}$ 5-100%): 1 пик 18,0 мин.

Пример 3. Получение полностью ацетилированного эпигалокатехина.

В 10 мл диоксана растворяют 10 мМ эпигалокатехина(I), добавляют 80 мМ уксусного ангидрида(II), раствор перемешивают и греют с обратным холодильником 20 мин. Раствор переливают в ампулы и лиофилизируют.

ЯМР C13 октаацетил эпигалокатехина: 20.3, 169.0, 149.3, 108.5, 20.3, 169.0, 107.4, 155.3, 112.9, 25.0, 68.3, 82.1, 133.1, 118.9, 118.9, 144.5, 133.5, 118.5, 123.4.

HPLC (Milichrom A-02; Gradient $\text{HClO}_4/\text{LiClO}_4:\text{AcCN}$ 5-100%): 1 пик 23,3 мин.

Пример 4. Получение комбинаторной смеси производных глицирризина (КСПГ).

В 10 мл диоксана растворяют 92 мкМ глицирризина(V), добавляют 155 мкМ янтарного ангидрида(III) и 155 мкМ уксусного ангидрида, раствор перемешивают и греют с обратным холодильником 20 мин. Раствор переливают в ампулы и лиофилизируют для удаления растворителя и уксусной кислоты. Комбинаторную смесь используют для получения фармацевтических композиций, изучения структуры, определения биологической активности. На фиг. 2 приведена схема синтеза комбинаторных производных V. Одна исходная молекула (V) содержит 5 доступных для модификации гидроксильных групп в гликозидном остатке.

Расчеты количества молей модификаторов ведут согласно формул комбинаторики

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

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

где m - количество разных производных молекул в комбинаторной смеси и количество молей (I) для реакции;

n - количество доступных для модификации спиртовых гликозидных гидроксильных групп в структуре I (n=5);

k - количество молей каждого модификатора.

Таким образом, имея только одну исходную молекулу (V) и два модификатора после комбинаторного синтеза мы получаем 92 комбинаторных производных (VI a-d) с разной степенью замещения, разного положения заместителей и разных перестановок остатков модификаторов не просто в виде смеси, а в виде трудно разделяемой супрамолекулярной смеси. Модификаторы - янтарный ангидрид либо уксусный ангидрид можно вводить как одновременно, так и последовательно - либо сперва ввести янтарный ангидрид, прогреть смесь с обратным холодильником 20 мин, а затем ввести уксусный ангидрид и также прогреть смесь еще 20 мин. Аналогично в этой реакции в качестве модификаторов вместо янтарного ангидрида и/или уксусного ангидрида могут быть использованы: малеиновый ангидрид, аконитовый ангидрид, глутаровый, фталевый ангидрид и уксусный ангидрид, этиловый эфир муравьиной кислоты, монохлороуксусную кислоту, пропиолактон, этиленоксид и другие низкомолекулярные алкилирующие вещества (метилхлорид, этилхлорид, пропилахлорид). ЯМР C13-спектры определяли на спектрометре Bruker.

ЯМР C13 для комбинаторного производного глицирризина (VI a-d): 174.7, 29.1, 29.5, 173.1, 172.9, 68.0, 71.6, 84.2, 82.5, 78.5, 109.8, 68.5, 68.6, 78.8, 112.1, 77.6, 173.2, 67.9, 53.1, 39.0, 29.6, 23.5, 57.2, 36.6, 17.2, 69.0, 18.0, 43.1, 40.4, 18.7, 200.8, 123.0, 158.1, 47.1, 32.4, 33.1, 15.4, 39.1, 51.5, 25.0, 43.3, 42.2, 36.2, 19.9, 182.7.

Для HPLC использовали микроколоночный хроматограф Милихром А-02 в градиенте ацетонитрил (5-100%)/0,1 М хлорная кислота + 0,5 М перхлорат лития. Комбинаторное производное на хроматограмме давало один четкий уширенный пик и не разделялось на компоненты, хотя время удержания отличалось как от глицирризина, так и от его полностью замещенных производных. Это свидетельствовало о том, что между разными комбинаторными производными (в нашем случае их 92) образовывались слож-

ные супрамолекулярные структуры, не разделяемые хроматографически. Аналогично себя ведет данное комбинаторное производное (КСПГ) и при разделении в тонком слое (ацетонитрил:вода) и дает только одну полосу, которая не совпадает ни с одним из полученных производных.

Пример 5. Получение полностью сукцинилированного глицирризина.

В 10 мл диоксана растворяют 10 мМ глицирризина(V), добавляют 50 мМ янтарного ангидрида(III), раствор перемешивают и греют с обратным холодильником 20 мин. Раствор переливают в ампулы и лиофилизируют.

ЯМР C13 октасукцинил глицирризина: 174.7, 29.1, 29.5, 173.1, 71.6, 84.2, 82.5, 78.5, 109.8, 68.5, 68.6, 78.8, 112.1, 77.6, 173.2, 67.9, 53.1, 39.0, 29.6, 23.5, 57.2, 36.6, 17.2, 69.0, 18.0, 43.1, 40.4, 18.7, 200.8, 123.0, 158.1, 47.1, 32.4, 33.1, 15.4, 39.1, 51.5, 25.0, 43.3, 42.2, 36.2, 19.9, 182.7.

HPLC (Milichrom A-02; Gradient $\text{HClO}_4/\text{LiClO}_4:\text{AcCN}$ 5-100%): 1 пик 19,6 мин.

Пример 6. Получение полностью ацетилированного глицирризина.

В 10 мл диоксана растворяют 10 мМ глицирризина(V), добавляют 50 мМ уксусного ангидрида(II), раствор перемешивают и греют с обратным холодильником 20 мин. Раствор переливают в ампулы и лиофилизируют.

ЯМР C13 октаацетил глицирризина: 172.9, 68.0, 71.6, 84.2, 82.5, 78.5, 109.8, 68.5, 68.6, 78.8, 112.1, 77.6, 173.2, 67.9, 53.1, 39.0, 29.6, 23.5, 57.2, 36.6, 17.2, 69.0, 18.0, 43.1, 40.4, 18.7, 200.8, 123.0, 158.1, 47.1, 32.4, 33.1, 15.4, 39.1, 51.5, 25.0, 43.3, 42.2, 36.2, 19.9, 182.7.

HPLC (Milichrom A-02; Gradient $\text{HClO}_4/\text{LiClO}_4:\text{AcCN}$ 5-100%): 1 пик 22,1 мин.

На фиг. 3 приведена интегральная хроматограмма 4 веществ: комбинаторного производного эпигалокатехина галлата (2), его октасукцинильного (1) и октаацетильного (3) производных и контроль - немодифицированный эпигалокатехина галлат (4). Как видно из графиков, время (объем) удержания производных отличается как от исходного эпигалокатехина галлата, так и между собой, что свидетельствует о том, что это разные соединения. Также, пик (2) не разделился на несколько мелких фрагментов, также его не удалось разделить и с применением разных условий тонкослойной хроматографии, что свидетельствует о стабильном характере образовавшейся супрамолекулярной структуры из разных производных. Полностью сукцинилированный и полностью ацетилированный эпигалокатехины не проявляли биологической активности.

На фиг. 4 приведена интегральная хроматограмма 4 веществ: комбинаторного производного глицирризина (2), его октасукцинильного (1) и октаацетильного (3) производных и контроль - немодифицированный глицирризин (4). Как видно из графиков, время (объем) удержания производных отличается как от исходного глицирризина, так и между собой, что свидетельствует о том, что это разные соединения. Также пик (2) не разделился на несколько мелких фрагментов, также его не удалось разделить и с применением разных условий тонкослойной хроматографии, что свидетельствует о стабильном характере образовавшейся супрамолекулярной структуры из разных производных. Полностью сукцинилированный и полностью ацетилированный глицирризин не проявляли биологической активности.

Для проверки биологической (антивирусной) активности синтезированных производных с другими соотношениями компонентов в реакции комбинаторного синтеза изучали противовирусную активность производных скрининговым методом на моделях вируса Эпштейна-Барр (штамм X-20696) в планшетах на культуре В-лимфомы по изменению количества копий геномов вируса в 1 мл культуральной среды методом ПЦР через выявление ампликона LAT-фрагментов вируса (Synevo Lab). Вещества вводились в 1/10 дозы исходной глицирризиновой кислоты (конечная концентрация производных в среде составила 11 мкМ/мл), изначально обладающей антивирусной активностью в отношении вируса Эпштейна-Барр в $\text{ED}_{50}=55$ мкМ/мл. Клетки культивировались в планшетах в среде Игла с добавлением донорской плазмы крови при температуре 37°C.

Результаты исследований *in vitro* приведены в табл. 2.

Таблица 2

Способность супрамолекулярного комбинаторного производного глицирризина КСПГ элиминировать из культуры клеток лимфомы вирус Эпштейна-Барр

№ п/п	Мольные соотношения реагентов*			Количество log копий** геномов вирусов в мл культуральной жидкости
	m	k1	k2	
1	92	930***	930***	>4,0
2	-/-	465	465	>4,0
3	-/-	155	155	0
4	-/-	77	77	2,0
5	-/-	39	39	>4,0
6	-/-	19	19	>4,0
7	-/-	10	10	>4,0
8	-/-	5	5	>4,0
9	-/-	2	2	>4,0
10	-/-	1	1	3,0
13	-/-	0	0	3,0
14	-/-	930***	0	>4,0
16	-/-	465	0	>4,0
17	-/-	155	0	>4,0
18	-/-	77	0	>4,0
19	-/-	39	0	>4,0
20	-/-	19	0	>4,0
21	-/-	10	0	>4,0
22	-/-	5	0	>4,0
23	-/-	2	0	3,0
24	-/-	1	0	3,0
25	-/-	0	1860***	>4,0
26	-/-	1	930	>4,0
27	-/-	0	465	>4,0
28	-/-	0	155	>4,0
29	-/-	0	77	>4,0
30	-/-	0	39	>4,0
31	-/-	0	19	>4,0
32	-/-	0	10	>4,0
33	-/-	0	5	>4,0
34	-/-	0	2	2,0
35	-/-	0	1	3,0
36	-/-	1860***	1	>4,0
37	-/-	930	1	>4,0
38	-/-	465	2	>4,0
39	-/-	155	5	>4,0
40	-/-	77	10	>4,0
41	-/-	39	19	>4,0
42	-/-	19	39	>4,0
43	-/-	10	77	>4,0
44	-/-	5	155	>4,0
45	-/-	2	465	>4,0
46	-/-	1	930	>4,0

* m - количество молей глицирризина в реакции комбинаторного синтеза;

k1 - количество молей янтарного ангидрида в реакции;

k2 - количество молей уксусного ангидрида в реакции;

** Log означает, что цифра в столбце - это десятичный логарифм концентрации ДНК, например 3 в столбце означает 10^3 геномов/мл, ошибка измерения 0,5 log/мл;

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

Как видно из табл. 2, только при рассчитанном соотношении компонентов, когда образуется максимальное количество разных производных глицирризина, образуется биологическая активная и эффективная супрамолекулярная структура (производное № 3 в таблице или КСПГ), способное в дозе 11 мкг/мл полностью элиминировать возбудитель вируса Эпштейна-Барр из культуры клеток (ED₁₀₀) при отсутствии какого-либо цитотоксического эффекта на клетки. Аналогичные эффекты проявляет производное № 3 из табл. 1 и в культурах почки обезьяны, латентно инфицированной такими вирусами, как вирус герпеса человека 1 типа, вирус герпеса человека 2 типа, вирус герпеса Зостер, цитомегаловирус человека, вирус герпеса человека 6 типа. Латентное инфицирование культуры вызывалось предварительной обработкой культуры клеток субэффективной концентрацией ацикловира. Добавление к КСПГ дополнительно КЭГГ уменьшало в 10 раз эффективную концентрацию КСПГ до 5 мкг/мл и уменьшало период определения вирусного генома в культуральной среде до 3 дней.

Пример 7. Изучение противовирусной активности КСПГ и КЭГГ в эксперименте на животных (герпесвирусный кератоконъюнктивит/энцефалит у кролей).

Как было сказано ранее, комбинация ингибитора гистондеацетилаз КСПГ и противовирусного средства, эффективно действующего в латентную фазу вирусной репликации КЭГГ способно либо элиминировать возбудителя из организма, либо значительно уменьшить его нагрузку на организм. Учитывая роль герпесвирусов в этиологии атеросклероза, рака, аллергических аутоиммунных патологий, артрозов, позволить более успешно лечить целую группу ассоциированных с герпесвирусами патологий. Для изучений на моделях животных был использован 5% водный раствор калиевой соли эквивалентной смеси КСПГ и КЭГГ. Особенности экспериментальной системы и уровень ее адекватности естественному заболеванию человека, несомненно, играют решающую роль в оценке влияния антивирусного вещества на течение инфекции. Герпетическая экспериментальная инфекция представляет собой интерес в связи с тем, что заболевания герпетической природы широко распространены и чрезвычайно вариабельны по клиническим проявлениям. Модели экспериментального герпеса на животных находят все более широкое применение в изучении новых противовирусных веществ. Как известно, одной из клинических форм системного герпеса является герпетический энцефалит, который воспроизводится у морских свинок, хомяков, крыс, мышей, кроликов, собак, обезьян. Герпетический кератоконъюнктивит у кроликов среднего веса 3,5 кг был получен путем нанесения инфекционного материала (вирус герпеса 1 типа, штамм Л-2) на скарифицированную роговицу. Животного фиксировали, анестезию глаза проводили дикаином (закапывали в глаз). Раздвигали веки глаза, наносили несколько царапин на роговицу при помощи иглы шприца. Затем вводили вируссодержащий материал и, смыкая веки, круговыми движениями втирали его в роговицу. Доза вируса: 0,05 мл. В опыте использовали 16 кролей, из них десятерым вводили смеси КСПГ и КЭГГ (ежедневно со второго дня инфицирования - 14 дней в дозе 20 мг/кг, а шестерым - плацебо (0,9% натрия хлорида). После заражения кролей ВПГ1 ежедневно контролировали состояние роговицы, наличие кератоконъюнктивита, энцефальных нарушений и наличие геномов вируса в крови методом ПЦР после инфицирования. До инфицирования у всех животных ампликоны вируса герпеса в крови отсутствовали. На 3 день после инфицирования у всех животных в крови определялся сенс ВПГ1 в количестве 3 log/мл. Кроме того, у двух кролей появились энцефальные проявления - судорожный синдром, отсутствие аппетита. На 4 день после инфицирования опытной группе кролей ввели в ушную вену смеси КСПГ и КЭГГ в дозе 50 мкг/кг веса тела, а контрольной группе ввели 0,9% раствор натрия хлорида. Каждый день в течение двух недель повторяли эту процедуру один раз в день. В опытной группе все животные выжили, а антиген ВПГ1 в крови не определялся на 13-14 день. Кроме того, в опытной группе энцефальные проявления исчезли к 5 дню применения препарата, тогда как в контроле погибло 2 животных. К 14 дню лечения в опытной группе погибло два животных, тогда как в контроле - 6. Соответственно индекс эффективности был равен 83,3%, что свидетельствует о высокой лечебной эффективности КСПГ/КЭГГ на модели герпетического кератоконъюнктивита/энцефалита у кролей. Кроме того, кроли в опытной группе набрали в весе и у всех животных отсутствовали признаки кератоконъюнктивита. Химотерапевтический индекс для кролей по препарату КСПГ/КЭГГ составил 1000, что свидетельствует о перспективности КСПГ/КЭГГ как высокоэффективного противовирусного препарата с широким спектром действия и низкой токсичностью и способностью полностью элиминировать возбудитель герпесвируса.

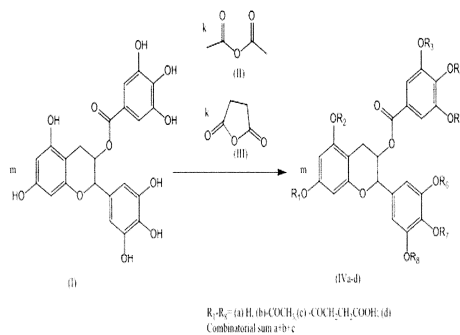
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция для элиминации возбудителей герпесвирусных инфекций из тканей макроорганизма, которая содержит ацикловир и супрамолекулярную структуру из неразделенной смеси комбинаторных производных эпигалокатехина галлата, полученную путем одновременной модификации эпигалокатехина галлата янтарным ангидридом и уксусным ангидридом в мольном соотношении компонентов реакции 764:2040:2040.

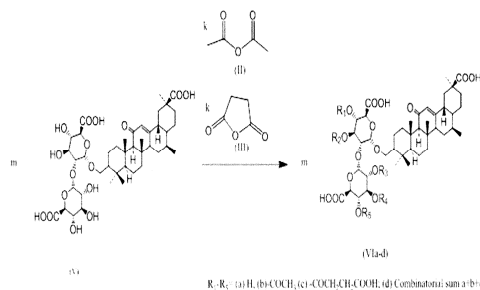
2. Фармацевтическая композиция по п.1, отличающаяся тем, что дополнительно содержит супрамолекулярную структуру из неразделенной смеси комбинаторных производных глицирризина, полученную путем одновременной модификации янтарным ангидридом и уксусным ангидридом в мольном соотношении компонентов реакции 92:155:155.

3. Фармацевтическая композиция по п.1, отличающаяся тем, что дополнительно содержит один или несколько низкомолекулярных активаторов TOLL-рецепторов: акридонуксусную кислоту, тилорон, зимозан, имидазохинолин, имиквимод.

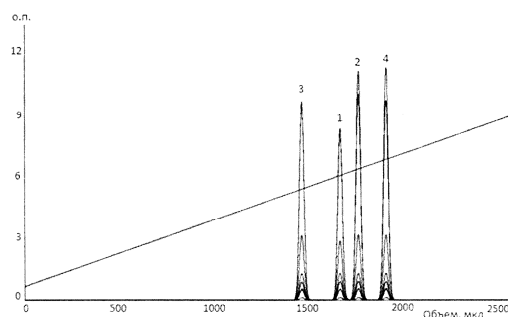
4. Фармацевтическая композиция по п.1, отличающаяся тем, что дополнительно содержит холекальциферол.



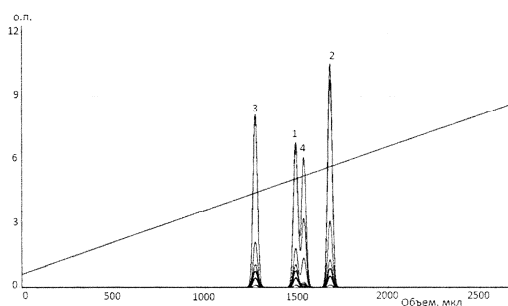
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4

