

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **043514**(13) **B1**

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2023.05.30**

(21) Номер заявки  
**202091836**

(22) Дата подачи заявки  
**2020.08.28**

(51) Int. Cl. *A61K 31/714* (2006.01)  
*A61K 31/7064* (2006.01)  
*A61K 38/02* (2006.01)  
*A61P 31/12* (2006.01)  
*C40B 50/00* (2006.01)  
*C12N 15/87* (2006.01)  
*A61K 48/00* (2006.01)  
*B82Y 5/00* (2006.01)

### (54) СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ ДИНАМИЧЕСКИХ САМООРГАНИЗУЮЩИХСЯ НАНОСТРУКТУР С ПРОТИВОВИРУСНЫМИ СВОЙСТВАМИ

(31) **16/936,667**

(32) **2020.07.23**

(33) **US**

(43) **2022.01.31**

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

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

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

(56) WO-A1-2018231093  
WO-A1-2019212377  
WO-A1-2019098869  
US-B1-7094378  
RU-C1-2127125

QIANG Ma et al. Enhancement of the direct antimicrobial activity of Lysep3 against "Escherichia coli by inserting cationic peptides into its C terminus. Antonie Van" Leeuwenhoek, 110 (3), 2017, реферат

(57) Противовирусные супрамолекулярные наночастицы могут быть получены с использованием свойств молекулярного распознавания комбинаторных химических строительных блоков для самосборки в наночастицы. Супрамолекулярные наночастицы могут включать комбинаторные карбоксилированные кобаламины, полученные в результате первого комбинаторного синтеза; комбинаторные карбоксилированные дипиридамолы, полученные вторым комбинаторным синтезом; карбоксилированные основные аминокислоты, полученные в результате третьего комбинаторного синтеза, и их комбинации. Супрамолекулярные наночастицы представляют собой динамические самоорганизующиеся растворимые наноструктуры, которые имеют множество связывающих компонентов, органических ядер и терминальных компонентов. Связывающие компоненты включают комбинаторные карбоксилированные кобаламины с участками связывания. Органические ядра включают комбинаторный карбоксилированный дипиридамол, адаптированный для связывания с комбинаторными карбоксилированными кобаламинами, так что органические ядра могут обеспечивать механическую структуру для самоорганизующихся растворимых наноструктур и первого типа комплексов включения. Супрамолекулярные наночастицы включают терминальные компоненты по меньшей мере с одним терминальным связывающим элементом, способным связываться с остаточной связывающей областью связывающих компонентов, и как таковые могут обеспечивать второй тип комплексов включения.

**043514 B1**

**043514 B1**

## **Предпосылки создания изобретения**

### **Область техники**

Настоящее изобретение относится к супрамолекулярным наночастицам полученным с использованием самособирающихся в наночастицы комбинаторных химических строительных блоков, действующих на основе молекулярного распознавания, и методов контроля размера полученных наночастиц. Изобретение также включает способы применения супрамолекулярных структур для лечения вирусных инфекций.

Существует предсказуемость только для простых моделей молекулярной структуры. Химики ошибочно удовлетворяются парадигмами молекулярной структуры до такой степени, что действительность и предел полезности многих видов химии учат быть предсказуемыми.

В настоящее время химики ищут модели молекулярных структур и индивидуальных молекул, которые будут полезными для построения структур супрамолекулярного уровня. Супрамолекулярная химия (Википедия, 2020) является областью химии в отношении химических систем, состоящих из дискретного числа молекул. Силы, ответственные за пространственную организацию диапазона системы от слабых межмолекулярных сил, электростатического заряда, или водородных связей с сильной ковалентной связью, при условии, что электронная прочность сцепления остается небольшой относительно энергетических параметров компоненты. [В то время как традиционная химия сконцентрирована на ковалентной связи, супрамолекулярная химия рассматривает более слабые и обратимые нековалентные взаимодействия между молекулами. Эти силы включают в себя образование водородных связей, координационных связей металлов, гидрофобные силы Ван-дер-ваальсовых взаимодействий, пи-пи взаимодействия и электростатические эффекты.

Важные передовые концепции супрамолекулярной химии включают в себя молекулярную самосборку, молекулярное свертывание, молекулярное распознавание, химию хозяин-гость, механически заблокированные молекулярные архитектуры и динамическую ковалентную химию. Изучение нековалентных взаимодействий имеет решающее значение для понимания многих биологических процессов, которые зависят от этих сил для структуры и функции. Биологические системы часто являются вдохновением для супрамолекулярных исследований. Однако новые супрамолекулярные структуры связаны с новыми межмолекулярными отношениями во многих отношениях, которые являются дополнительными к химии самих молекулярных структур. Таким образом, хотя атомы играют решающую роль в парадигмах химии, молекулярная структура химического вещества все же занимает центральное место в химии многих важных технологических и биологических материалов. "Интеллектуальный клей" молекулярной структуры это ковалентная связь, связывающая атомы, и формирующая стереохимию атомов в пространстве. Парадигма ковалентной химической связи предоставляет множество правил, регулирующих структуру, динамику, физические характеристики и химические превращения молекул.

Уровень атомной структуры является недостаточным основанием для достаточного понимания аспектов химии где преобладают молекулярные аспекты. Уровень молекулярной структуры является недостаточным для понимания аспектов химии, где доминируют супрамолекулярные аспекты. В супрамолекулярных системах, химии молекул межмолекулярных связей связывают вместе в сборки мы можем назвать супер-молекулы. В супрамолекулярных системах, нековалентные межмолекулярные связи более далеко разнообразны и сложны, чем ковалентные внутримолекулярные связи в структурах, известные как молекулы. Супрамолекулярные системы могут быть скреплены значительно более слабыми силами, чем атомы в молекуле. Так, например, силы, удерживающие несколько молекул вместе в качестве супрамолекулярных структур могут включать в себя дисперсионные силы, водородные связи, и гидрофобные связи. Эти силы на атомарном уровне могут быть небольшими, однако наличие множественных слабых связей может происходить в соответствии с принципами кооперативности взаимодействий, с тем чтобы повысить энергетическую стабильность супрамолекулярной структуры. Тем не менее, кооперативные взаимодействия легко обратимы, так как каждое "связывание контакта" является относительно слабым. Это создает переменную супрамолекулярную гибкость структуры и различные комбинации молекулярных соединений и стереохимии конформационных отношений. Другими словами, супрамолекулярные системы могут участвовать в состояниях супер валентности, в которых супрамолекулярные комплексы, содержащие множество отдельных молекул являются стабильными во множестве комбинаций с общей конформации на обоих концах молекулы и супрамолекулярных уровней вследствие возможного суммирования различных комбинаций большого числа слабых межмолекулярных взаимодействий. Замечательные примеры таких моделей это мицелла и двойная спираль ДНК.

В одном из своих наиболее важных форм, супрамолекулярная химия связана со структурой и динамикой малой молекулы (называется гость), которая нековалентно связана с более крупной молекулой (называется хост или хозяин). Понятие гость/хозяин имеет наибольшую химическую информационную ценность, когда различие между гостем и хозяином ясно. Во многих гость/хозяин комплексах, гость представляет собой молекулу, которая является относительно небольшой по сравнению с хостом и хост может быть либо одной большой молекулой или сборкой молекул, которые ведут себя как единое целое. Как правило, хозяин обеспечивает клетку, которая полностью окружает гостя (гость/клетка) или хост обеспечивает полость (гость/полость), который частично окружает гостя. Тем не менее, есть и примеры,

для которых понятие гостя и хозяина размыты. Например, в мицеллах, состоящих из мономеров, поверхностно-активных веществ, один мономер может рассматриваться в качестве гостя в хосте в своей собственной супрамолекулярной сборке. В свою очередь, молекула, которая не является мономером поверхностно-активного вещества представляет собой чистого гостя в мицелле сборки поверхностно-активных веществ.

Важный термин для формирования межмолекулярной связи между гостем и принимающей стороной является "комплексообразование" - термин, который сохраняет идею химически соответствующей "рыхлости" на основе нековалентных связей между молекулами. В связи с этим, хозяин является партнером комплекса гость/хозяин свойства дизайна и структурные изменения которого определяются типом гостей, которые будут связаны в комплексе. Для другого партнера, являющегося гостем в этом комплексе, как правило, могут быть более менее изучены химия или физические свойства. Эти понятия являются производными от парадигм химии ферментов и обеспечивают знакомую и полезную рабочую основу для обсуждения супрамолекулярной химии. Комплекс гость/хозяин может рассматриваться как супермолекула или супрамолекулярная сборка в зависимости от сложности супрамолекулярной структуры при обсуждении. Супрамолекулярная химия: структура и динамика в топологическом, геометрическом и химическом уровне

Супрамолекулярная химия поясняется различными способами, такими как химия молекулярных ансамблей и межмолекулярных связей, химия за пределами молекулы, и химия нековалентной связи. Важно, что каждое определение, имеет свои ограничения и исключения. Действительно, супрамолекулярная химия может быть определена как химия молекулярных ансамблей из молекулы в молекулярной клетке растворителя к композиции молекулярных сборок (состоящему из белков, липидов, ДНК, РНК и т.д.), которые представляют собой огромную химическую сложность живой клетки.

Так как связь между молекулами в комплексах гость/хозяин часто является смесью многих слабых электростатических и дисперсионных взаимодействий, то трудно точно определить и классифицировать характер нековалентных связей. В качестве отправной точки для обсуждения супрамолекулярных сборок удобно рассматривать "окрестности" взаимодействий между некоторыми атомами гостя с тем хостом, который может контролировать физические и химические свойства комплекса гость/хозяин. Часто это свойства гостя, наиболее существенно модифицированные соседскими взаимодействиями через связывание с множеством других хостов, но объединенное супрамолекулярным свойством комплекса и модификацией принимающей структуры, также представляет значительный интерес и значение.

Под взаимодействиями соседей в супрамолекулярной химии мы имеем в виду, что две молекулы находятся в непосредственной близости друг от друга в течение определенного периода времени. В течение этого периода времени две молекулы могут рассматриваться как связанные независимо от характера связи и по причине близости их атомов друг к другу. Например, молекула, которая содержится в качестве гостя внутри принимающего фуллерена имеет определенную связь с внутренней клеткой фуллерена. Аналогичным образом, молекула, которая содержится в качестве гостя в полости хозяина, такого как циклодекстрин или кавитанд имеет определенное взаимодействие с атомами полости хозяина. Молекула, которая содержится в качестве гостя в кристалле и окружена молекулами кристаллического хозяина имеет определенные взаимодействия с окружающими ее молекулами кристалла. Наконец, гостевая молекула, которая интеркалирована в ДНК двойной спирали хозяина имеет химическую связь с небольшим набором определенных оснований, которые находятся в его окрестностях.

Наночастицы лекарств, как правило, частицы включающие лекарственные вещества, такие как малые молекулы лекарственных средства, пептиды, белки и нуклеиновые кислоты, а также компоненты, которые находятся в сборке с другими лекарственными веществами, такими как липиды и полимеры. Такие наночастицы могут обладать повышенным противораковым действием по сравнению с теми же, но свободными лекарствами. Это обусловлено более определенной ориентацией и тропностью к опухолевым тканям в связи с улучшенной фармакокинетикой и фармакодинамикой, а также более активной внутриклеточной доставкой. Эти свойства зависят от размера и свойств поверхности, в том числе определенной ориентации лигандов в наночастице. Ограниченное количество таких систем на основе наночастиц достигли клинического применения, и для начала информация становится доступной, для понимания некоторых вопросов перемещения этих экспериментальных систем в организме человека. Хотя огромное количество исследований продолжается в разработках и исследованиях наночастиц, лишь небольшое количество продуктов на основе наночастиц может стать клинически полезным. Например, известно, что иммуностимулирующие компоненты наночастиц трудно изготовить в крупном масштабе с помощью надлежащей производственной практики (GMP) и существуют огромные трудности в использовании анализа для оценки их химии, производства и качества.

Тем не менее, значительные усилия были направлены на изучение использования наночастиц в биологии и медицине и несколько видов наночастиц были испытаны в доклиническом исследовании на животных, в клинических испытаниях, и некоторые из них в настоящее время используются в клинике (Davis et al., *Nat. Rev. Drug Discov.* 2008, vol. 7, p. 771). Примеры видов наночастиц включают в себя золотые нанооболочки (Loo et al., *Technol. Cancer Res. Treat.*, vol. 3, p. 33, 2004), квантовые точки (Gao et al., *Nat. Biotechnol.*, vol. 22, p. 969, 2004; Me et al., *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, vol. 9, p. 257, 2007), супер-

парамагнитные наночастицы (Jun et al., *Angew. Chem.*, vol. 120, p. 5200, 2008; Jun et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 47, p. 5122, 2008). Наночастицы, несущие специфические целевые лиганды используются для визуализации в естественных условиях рака, а молекулы лекарственного средства могут быть упакованы в наночастицы или липосомы на основе полимеров (Heath et al., *Annu. Rev. Med.*, vol. 59, p. 251, 2008; Torchilin et al., *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 4, p. 145, 2005) для контролируемого освобождения лекарств (Napier et al., *Poly. Rev.*, vol. 47, p. 321, 2007; Gratton et al., *Acc. Chem. Res.*, vol. 41, p. 1685, 2008). Наночастицы с положительным зарядом были использованы в качестве невирусных системы доставки *in vitro* и в естественных условиях для генетических манипуляций и генетического программирования (Davis et al., *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 7, p. 771, 2008; Green et al., *Acc. Chem. Res.*, vol. 41, p. 749, 2008; Pack et al., *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 4, p. 581, 2005).

Существует потребность в разработке альтернативных процессов синтеза, для того, чтобы новые виды наночастиц могли стать доступными и имели улучшенные свойства, включая: (I) лучше контролируемый размер, (II) улучшенную морфологию, (III) низкую токсичность, (IV) меньшие побочные эффекты на иммунную систему, (v) более избирательная скорость деградации в естественных условиях, (VI) более физиологический поверхностный заряд, (VII), улучшенная химическая и физиологическая стабильность, (VIII), замедленный метаболизм, (IX) замедленная скорость элиминации из организма человека после их приема.

Наноструктуры на основе благородных металлов с уникальными фотофизическими свойствами с акцентированием внимания, на фототермические агенты для терапии рака (Anderson et al., *Science*, vol. 220, p. 524, 1983; Jain et al., *Acc Chem Res*, vol. 41, p. 1578, 2008; An et al., *Nano Today*, vol. 4, p. 359, 2009; Lal et al., *Acc Chem Res*, vol. 41, p. 1842, 2008). Изменение фототермических свойств наноструктур по их размеру и форме (Lal et al., *Acc Chem Res*, vol. 41, p. 1842, 2008; Skrabalak et al., *Acc Chem Res*, vol. 41, p. 1587, 2008). В частности, фототермические наноструктуры на основе золота (Au) хорошо известны (Lapotko et al., *Laser Surg Medi*, vol. 38, p. 631, 2006; Huang et al., *Lasers Med Sci*, vol. 23, p. 217, 2008), наноболочки (Gobin et al., *Nano Lett*, vol. 7, p. 1929, 2007; Hu et al., *J Am Chem Soc*, vol. 131, p. 14186, 2009; Kim et al., *Angewandte Chemie-International Edition*, vol. 45, p. 7754, 2006), наностержни (Dickerson et al., *Cancer Letters*, vol. 269, p. 57, 2008; Huang et al., *Langmuir*, vol. 24, p. 11860, 2008) и наноклетки (Skrabalak et al., *Acc Chem Res*, vol. 41, p. 1587, 2008; Chen et al., *Nano Lett*, vol. 7, p. 1318, 2007; Au et al., *ACS Nano*, vol. 2, p. 1645, 2008). Содержащие Au наноструктуры являются улучшением по сравнению с наночастицами на основе органических красителей и фототермических агентов с низким поглощением света и нежелательного побочного эффекта - фото-отбеливания (Huang et al., *Lasers Med Sci*, vol. 23, p. 217, 2008). Недостатком является то, что агентам на основе наноструктур необходим коротковолновый свет (в диапазоне от десятков до сотен нанометров) для уничтожения раковых клеток. (Lowery et al., *Clin Cancer Res*, vol. 11, p. 9097s, 2005). Кроме того, известные вещества на основе наноструктур не очень хорошо выводятся из печени, селезенки и почек), и эти кумулятивные свойства являются нежелательными для медицинского применения (Mitragotri et al., *Nat Mater*, vol. 8, p. 15, 2009; Choi et al., *Nat Biotechnol*, vol. 25, p. 1165, 2007; Nel et al., *Nat Mater*, vol. 8, p. 543, 2009). Для решения этой проблемы, фотофизические свойства металлических наноструктур улучшается путем модификаций, которые приводят к улучшению их совокупных свойств (Khlebtsov et al., *Nanotechnology*, vol. 17, p. 5167, 2006; Lu et al., *J Mater Chem*, vol. 19, p. 4597, 2009; Zhuang et al., *Angew Chem Int Ed Engl*, vol. 47, p. 2208, 2008; Troutman et al., *Adv Mater*, vol. 20, p. 2604, 2008; Ofir et al., *Chem Soc Rev*, vol. 37, p. 1814, 2008; Elghanian et al., *Science*, vol. 277, p. 1078, 1997; Lin et al., *Adv Mater*, vol. 17, p. 2553, 2005; Katz et al., *Angew Chem Int Ed Engl*, vol. 43, p. 6042, 2004; Cheng et al., *Nature Nanotechnology*, vol. 3, p. 682, 2008; Maye et al., *J Am Chem Soc*, vol. 127, p. 1519, 2005; Niemeyer, *Angewandte Chemie-International Edition*, vol. 40, p. 4128, 2001; Klajn et al., *Nat Chem*, vol. 1, p. 733, 2009). Особенно, Lapotko (*Cancer Lett*, vol. 239, p. 36, 2006) расширил пути агрегации фототермических наночастиц золота с использованием антител на клеточных мембранах и внутри клеток (Govorov et al., *Nano Today*, vol. 2, p. 30, 2007; Richardson et al., *Nano Lett*, vol. 9, p. 1139, 2009). Самосборка небольших металлических структурных блоков как коллоидов (Mitragotri et al., *Nat. Mater.*, vol. 8, p. 15, 2009; Choi et al., *Nat Biotechnol*, vol. 25, p. 1165, 2007; Nel et al., *Nat Mater*, vol. 8, p. 543, 2009) улучшила их почечный клиренс и сделало их лучшими фототермическим агентом.

Необходимы невирусные методы доставки генной терапии, которые могут (I) переносить и защищать генетический материал, например, ДНК и мРНК, и (б) доставлять генную терапию для избранных клеток и клеток разных типов тканей (Kim et al., *Nat Rev Genet*, vol. 8, p.p. 173-184, 2007). Улучшения в невирусных средствах доставки генов были сделаны (Glover et al., *Nat Rev Genet*, vol. 6, pp. 299-310, 2005; Rosi et al., *Chem. Rev.*, vol. 105, pp. 1547-1562, 2005). Невирусные системы доставки гена предшествующего уровня техники включает в себя (Niidome et al., *Gene Ther*, vol. 9, p. 1647-1652, 2002; Prata et al., *Chem. Commun.*, pp. 1566-1568, 2008; Woodrow et al., *Nat. Mater.*, vol. 8, pp. 526-533, 2009; Chen et al., *Chem. Commun.*, pp. 4106-4108, 2009; Torchilin et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 100, pp. 1972-1977, 2003). Наночастицы на основе средств доставки генов предшествующего уровня техники включает в себя (Liang et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 102, pp. 11173-11178, 2005; Kumar et al., *Chem. Commun.*, pp. 5433-5435, 2009; Bazin et al., *Chem. Commun.*, pp. 5004-5006, 2008; Cheon et al., *Acc. Chem. Res.*, vol. 41, pp. 1630-1640, 2008).

Несмотря на то, наночастицы являются перспективными для невирусных трансфекций агентов для эффективной и безопасной доставки нуклеиновых кислот в конкретный тип клеток или тканей, проблемы, связанные с их производством и использованием включают (1) медленные, многоступенчатые синтетические подходы, и (2) ограниченное разнообразие материалов доставки. Эти проблемы являются главным препятствием для достижения оптимальной производительности трансфекции. Таким образом, необходимыми методами являются более быстрые и эффективные способы производства, которые могут использовать различные материалы доставки.

#### **Краткое изложение изобретения**

Супрамолекулярные наночастицы с противовирусным действием могут включать в себя: сочетание наноструктур, выбранных из группы, состоящей из комбинаторных карбоксилированных кобаламинов, полученных из первого комбинаторного синтеза; комбинаторные карбоксилированные дипиридамолы, полученные от второго комбинаторного синтеза; карбоксилированных основных аминокислот, полученные из третьего комбинаторного синтеза, а также любое их сочетание.

Могут дополнительно включать в себя динамические самоорганизующиеся растворимые наноструктуры и эти наноструктуры могут дополнительно включать в себя множество компонентов связывания, множество органических ядер, и множество терминальных компонентов.

Супрамолекулярные наночастицы могут иметь один из связующих компонентов, которые могут дополнительно содержать комбинаторные карбоксилированные кобаламины, имеющих ряд связывающих областей, и органические ядра могут дополнительно содержать комбинаторные карбоксилированные дипиридамолы, имеющие по меньшей мере один связывающий элемент, приспособленные для связывания с комбинаторными карбоксилированными кобаламинами, и органические ядра могут дополнительно включать в себя механические структуры из динамических самоорганизующихся растворимых наноструктур, также комбинаторными карбоксилированными кобаламинами, которые связаны с комбинаторным карбоксилированным дипиридамолами и могут дополнительно включать в себя первичные комплексы включения.

Супрамолекулярная наночастица может содержать терминирующие компоненты каждый из которых может иметь по меньшей мере один элемент, завершающий связывание, и также могут дополнительно содержать вторичные комплексы включения.

Супрамолекулярные наночастицы могут содержать карбоксилированные основные аминокислоты, выбранные из таких как лизин, гистидин, аргинин, дериватизированный лизин, дериватизированный гистидин, дериватизированный аргинин, ацилированный лизин, ацилированный гистидин, ацилированный аргинин, и любые их комбинации.

Супрамолекулярная наночастица может иметь множество терминирующих компонентов, которые могут занимать оставшиеся участки связывания множества связывающих компонентов, а также когда множество терминирующих компонентов может быть эквивалентно количеству связывающих областей множества связывающих компонентов после чего дальнейшее связывание связывающих компонентов прекращается, также супрамолекулярные наночастицы могут дополнительно содержать дискретные наночастицы на основе динамических самоорганизующихся растворимых наноструктур.

В супрамолекулярных наночастицах могут содержаться комбинаторные карбоксилированные кобаламины, которые могут быть представлены смесью сукцинизированных цианокобаламинов.

В супрамолекулярных наночастицах могут содержаться комбинаторные карбоксилированные кобаламины, которые могут быть представлены смесью сукцинизированных метил-кобаламинов.

Супрамолекулярные наночастицы могут содержать комбинаторные карбоксилированные кобаламины, которые могут быть представлены смесью сукцинизированных гидроксикобаламинов.

Супрамолекулярные наночастицы могут содержать комбинаторные карбоксилированные кобаламины, которые могут быть представлены смесью сукцинизированных кобамидов.

Супрамолекулярные наночастицы могут содержать комбинаторные карбоксилированные кобаламины, которые могут быть выбраны из группы, состоящей из смеси сукцинизированных гидроксикобаламинов, смеси сукцинизированных кобамидов, смеси сукцинизированных гидроксикобаламинов, смеси сукцинизированных метил-кобаламинов, смеси сукцинизированных цианокобаламинов, и любых их комбинаций.

Супрамолекулярные наночастицы могут содержать по крайней мере одно из органических ядер, которые могут дополнительно содержать по меньшей мере один элемент на основе фото-динамического компонента, представленного супрамолекулярным комбинаторным карбоксилированным рибофлавином.

Супрамолекулярные наночастицы могут содержать супрамолекулярный комбинаторный карбоксилированный рибофлавин в виде супрамолекулярного комбинаторного сукцинизированного рибофлавина.

Супрамолекулярные наночастицы могут содержать супрамолекулярный комбинаторный карбоксилированный рибофлавин в виде супрамолекулярного комбинаторного сукцинизированного флавиномононуклеотида.

Супрамолекулярные наночастицы могут содержать супрамолекулярный комбинаторный карбоксилированный рибофлавин, представленный в виде супрамолекулярного комбинаторного сукцинизированного флавина-динуклеотида.

Супрамолекулярные наночастицы могут содержать комбинаторный карбоксилированный дипиридабол в виде супрамолекулярного сукцинилизированного комбинаторного дипиридамола.

Супрамолекулярные наночастицы могут содержать комбинаторные карбоксилированные дипиридаболы, представляющие собой супрамолекулярные малеилированные комбинаторные дипиридаболы.

Супрамолекулярные наночастицы могут содержать комбинаторные карбоксилированные дипиридаболы, представляющие собой супрамолекулярные карбоксиметилированные комбинаторные дипиридаболы.

Супрамолекулярные наночастицы могут содержать карбоксилированные основные аминокислоты, такие как сукцинилизированный лизин, сукцинилизированный гистидин, сукцинилизированный аргинин, или любые их комбинации.

Супрамолекулярные наночастицы могут содержать карбоксилированные основные аминокислоты, такие как малеилированный лизин, малеилированный гистидин, малеилированный аргинин в любой их комбинации.

Супрамолекулярные наночастицы могут содержать карбоксилированные основные аминокислоты, включающие карбоксиметилированный лизин, карбоксиметилированный гистидин, карбоксиметилированный аргинин, в любых комбинациях.

Супрамолекулярные наночастицы могут содержать карбоксилированные основные аминокислоты, включающие карбоксиметилированный лизин, карбоксиметилированный гистидин, карбоксиметилированный аргинин, сукцинилизированный лизин, сукцинилизированный гистидин, сукцинилизированный аргинин, малеилированный лизин, малеилированный гистидин, малеилированный аргинин, и любые их сочетания.

Супрамолекулярные наночастицы могут содержать множество терминирующих компонентов, которые могут состоять по крайней мере из одного из следующих веществ: полиэтиленгликоля, полимера, полипептида, олигосахарида, и любых их комбинаций.

Супрамолекулярные наночастицы могут содержать органические ядра, состоящие, по меньшей мере, из одного органического ядра, на основе дендримера, разветвленного полиэтиленimina, линейного полиэтиленimina, полилизина, полилактода, полилактод-со-гликозида, полиангидрида, поли-ε-капролактона, А полиметилметакрилата, поли (N-изопропил акриламида), полипептида, и любой их комбинации.

Супрамолекулярные наночастицы могут содержать связывающий компонент, представляющий собой поли-L-лизин.

### Краткое описание фигур

Приведенное выше краткое описание, а также последующее подробное описание предпочтительных вариантов осуществления настоящего изобретения, будет лучше понято при прочтении совместно с прилагаемыми чертежами. С целью иллюстрации изобретения, для предпочтительных вариантов осуществления изобретения показано чертежи. Следует понимать, однако, что изобретение не ограничивается точными компоновками и средствами.

На фиг. 1 показаны структуры растворимой самоорганизующейся наночастицы, динамический комбинаторный кобаламид как ядро, динамический комбинаторный дипиридабол, как-структурный компонент, динамические комбинаторные производные основных олигопептидов и аминокислот как-связывающий компонент.

На фиг. 2 показано самоорганизующееся динамическое комбинаторное производное дипиридамола и принципы его синтеза.

На фиг. 3 показано основу принципа молекулярного распознавания между различными веществами на базе нуклеотид-подобных структур.

На фиг. 4 показано схему синтеза для динамического рибофлавина (IV) с 44 компонентами смеси, которые реагируют друг с другом, а также показана формула для вычисления комбинаторного синтеза полностью замещенного производного, где  $m=1$ ,  $k=4$ , модификатор это (II), а продукт - тетра-сукцинил рибофлавин (V).

На фиг. 5 приведена структура динамических самоорганизующихся комбинаторных производных цианокобаламина.

На фиг. 6 приведена ВЭЖХ хроматограмма исходного цианокобаламина с такими хроматографическими условиями: разделение градиентное с использованием буфера А, который содержит 0,1 М хлорной кислоты с 1 М перхлората лития, и буфера В, который содержит ацетонитрил в градиенте (от 5% до 100%) на хроматографе Милихром А-02 с колонкой prontosil-18.

На фиг. 7 приведена ВЭЖХ хроматограмма комбинаторного производного цианокобаламина с 128 производными с такими хроматографическими условиями: разделение градиентное с использованием буфера А, который содержит 0,1 М хлорной кислоты с 1 М перхлората лития, и буфера В, который содержит ацетонитрил в градиенте (от 5% до 100%) на хроматографе Милихром А-02 с колонкой prontosil-18.

На фиг. 8 приведена схема синтеза комбинаторного производного дипиридамола (IV), который включает комбинаторную реакцию дипиридамола (I) с двумя модификаторами (II, III).

На фиг. 9 приведена схема тонкослойной хроматограммы комбинаторного производного дипиридамола (IV), начального дипиридамола (I) полностью ацилированного дипиридамола (Ib), и полностью

сукцинированного дипиридамола (Ic).

На фиг. 10 представлен результат ВЭЖХ анализа исходного пептида KKRKRKRKR. Для детекции пептида используется длина волны 280 нм с одной полосой поглощения.

На фиг. 11 представлена ВЭЖХ хроматограмма комбинаторного производного пептида KKRKRKRKR. Пики хроматограммы комбинаторного производного пептида KKRKRKRKR сдвинуты в ожидаемую более гидрофильную область, оставаясь расширенным этот пик делится еще дополнительно на 3 полосы.

На фиг. 12 приведена ВЭЖХ хроматограмма исходного пептида KKRKSTRKR. Оригинальный пептид, при использовании детектора в области 280 нм дает одну полосу поглощения.

На фиг. 13 представляет собой результат ВЭЖХ анализа комбинаторного производного пептида KKRKSTRKR, его хроматограмма содержит характерный тройной пик.

#### **Подробное описание изобретения**

В общем, варианты осуществления настоящего изобретения относятся к супрамолекулярным структурам, также называемым супрамолекулярными наночастицами (SNP), которые могут быть получены с использованием молекулярных свойств распознавания строительных блоков на основе динамической квази-живой самособирающейся системы. Варианты осуществления изобретения также включают способы получения супрамолекулярных структур с использованием молекулярного распознавания и с использованием способов регулирования размера полученных наночастиц. Варианты осуществления изобретения также включают способы применения супрамолекулярных структур для лечения вирусных инфекций.

В некоторых общих вариантах осуществления настоящего изобретения, супрамолекулярная наночастица (SNP), включает в себя:

а) множество связывающих компонентов, где каждый связующий компонент имеет множество областей связывания и в котором множество областей связывания содержат комбинаторные карбоксилированные кобаламины;

б) множество ядер для обеспечения механической структуры для самосборки супрамолекулярной растворимой системы, в котором множество ядер представляет собой органическое ядро, которое содержит элемент привязки ядра для связывания с множеством связывающих областей таким образом, чтобы образовать первый комплекс включения, где связывающий элемент ядра содержит комбинаторный карбоксилированный дипиридамол, и в котором первый комплекс включения представляет собой комбинаторный карбоксилированный кобаламин с комбинаторным карбоксилированным дипиридамолом; и

в) множество терминирующих компонентов с каждым терминирующим компонентом, содержащим один связывающий терминирующий элемент для образования связи с другими участками связывания одного из множества связывающих компонентов таким образом, чтобы сформировать второй комплекс включения, где первичный окончательный связывающий элемент содержит комбинаторный карбоксилированный дипиридамол, где вторичный комплекс включения представляет собой комбинаторный карбоксилированный дипиридамол,

где множество ядер и множество связывающих компонентов представляют собой самособирающиеся карбоксилированные основные аминокислоты, таких как лизин, гистидин, аргинин, а также любое сочетание для них и их карбоксилированных производных, которые при контакте друг с другом способны к самосборке с образованием самоорганизующейся супрамолекулярной растворимой системы, где множество компонентов действуют согласованно, чтобы занять остальные области связывания множества связывающих компонентов, и в котором присутствуют множество терминирующих компонентов в достаточном количестве, по отношению к количеству множества связывающих областей с множеством связывающих компонентов таким образом, чтобы терминировать дальнейшее связывание, так, чтобы образовать дискретную частицу.

#### **Структурный компонент**

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, структурный элемент имеет множество связующих регионов связывающих компонентов. Связывающий элемент представляет собой химический фрагмент, который связывается со специфической связывающей областью через одну или несколько межмолекулярных связей. Связывающий элемент структурного компонента и связывание области скрепляющего элемента, специально выбирает так, чтобы они селективно связывались друг с другом и можно было использовать свойство молекулярного распознавания для идентификации связывающих регионов. Например, область связывания может содержать комбинаторный карбоксилированный кобаламин или карбоксилированный кобаламин или другие производные кобаламина.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, конструктивный элемент по меньшей мере, представлен неорганическим или органическим ядром.

На фиг. 1 представлено вариант изобретения в виде структуры растворимой самоорганизующейся наночастицы, содержащей в виде ядра динамическое комбинаторное производное кобаламида, динамическое комбинаторное производное дипиридамола как структурный компонент, динамическое комбинаторное производное основных олигопептидов и аминокислот в качестве компонентов связывания. В некоторых вариантах осуществления изобретения ядро на основе самоорганизующейся структуры динами-

ческого производного кобаламина, имеет неорганическое ядро, выбранные из группы, состоящей из неорганической наночастицы, металла в виде наночастиц, наночастицы золота, серебра в виде наночастиц кремния, наночастицы металла, наночастицы окиси металла, и любой комбинации наночастиц представленных выше. Так, например, неорганические наночастицы включают наночастицы оксида металла или оксида другого элемента (например, наночастицы диоксида кремния или наночастицы оксида железа), и наночастицы других неорганических соединений. В качестве функциональных наночастиц могут быть использованы магнитные наночастицы, квантовые точки (например, наночастицы CdS, CdSe), или полутвердые токопроводящие частицы оксидов металлов.

Неорганическое ядро может иметь форму, выбранную из группы, включающей сферические, треугольные, кубические, звездчатые, стержнеобразные, в форме раковин, алмазоподобные, пластинчатые типы, пирамидальные, нерегулярные, в форме структур клетки, и их комбинаций.

Неорганические наночастицы известны в данной области техники. Неорганическое ядро может связываться с областями связывания компонентов наночастицы. В некоторых вариантах осуществления изобретения связывающий компонент имеет связывающую область, которая может связываться с неорганическим ядром напрямую. В других вариантах осуществления настоящего изобретения, поверхность неорганического ядра была получена с использованием множества элементов связывания таким образом, чтобы быть способными связываться с множеством областей связывания связующего компонента с помощью одного или несколько межмолекулярных сил.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, множество неорганических частиц ядра может присутствовать в супрамолекулярной структуре. В таких случаях, множество неорганических частиц ядра может связываться с множеством связывающих компонентов таким образом, чтобы образовать сшитую сеть или гидрогель. Непрерывный рост сшитой сети может быть ограничен или прекращен по желанию с помощью терминирующих компонентов, которые также могут связываться с областями связывания в связующих компонентах.

В некоторых вариантах осуществления структурный компонент представляет собой органическое ядро. Органические ядра могут включать производные комбинаторных самособирающихся кобаламинов, дендримеров, полимеров, белков, олигосахаридов, мицелл, липосом, пузырьков, и их комбинаций. Например, в некоторых случаях, органическое ядро может быть дендримером, полимером или полипептидом. Структурный компонент может включать структурное ядро на основе дендримера, А полиамидоамин дендримера (ПАД), разветвленный полиэтиленимин (РПЭ), линейный полиэтиленимин, полилизин, полилактид, полилактид-со-гликозид, полиангидрид, поли-ε-капролактон, А полиметилметакрилат, поли (N-изопропил акриламид), полипептид, и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления органического ядра представляет собой полиамидоамин дендример или полимер поли-L-лизин.

В некоторых вариантах осуществления, связывающие участки компонентов связывания взаимодействуют другими элементами, которые могут присутствовать как часть органической структуры ядра. В других вариантах осуществления органическое ядро дериватизировано с множеством элементов связывания, таких как, например, комбинаторные самособирающиеся производные дипиридамола. Связующие элементы могут связываться со связывающими областями компонента связывания с помощью одного или несколько межмолекулярных сил с последующей самосборкой в сшитую сеть или гидрогель. Непрерывное распространение сшитой сети, может быть ограничено или прекращено терминирующими компонентами, которые также могут реагировать с областями связывания компонента связывания. Связывающая область элемента связывания может быть выбрана в зависимости от типа связывания, на основе принципа молекулярного распознавания в том числе.

На фиг. 2 показан вариант осуществления изобретения в виде самоорганизующихся комбинаторных динамических производных дипиридамола и принцип их синтеза. Многочисленные дендримеры известны в данной области техники. Преимущество дендримеров ядер заключается в их быстром синтезе и легкой способности к функционализации за счет легкого связывания элементов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения дендример может быть синтезирован, путем включения внутрь себя обязательных элементов как частей структуры. Альтернативно, в других вариантах осуществления изобретения во время синтеза дендримера, реакционноспособная функциональная часть (группа) может присутствовать в каждой точке терминального элемента, добавленного к связующему элементу внутри ядра. Примеры конкретных дендримеров, пригодных для изобретения, включают такой как полиамидоаминный (ПАМ-дендример).

Многие полимеры известны в данной области техники. Преимущество использования полимерных ядер заключается в его быстром синтезе и его способности быть легко функционализированным скрепляющим элементом. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, в структуру полимера при синтезе может быть включен скрепляющий элемент. Альтернативно, в других вариантах осуществления, реакционноспособные функциональные группы на полимере может быть дериватизированы с химическими фрагментами, обеспечивающими функцию скрепляющего элемента. Так, например, полипептиды, содержащие в структуре остатки лизина с реакционной аминогруппой (-NH<sub>2</sub>) могут быть функционализированы со связывающими элементами. Одним из примеров является полипептид - поли-L-лизин.

В некоторых вариантах осуществления два или более различных структурных компонента присут-

ствуют, в этом случае каждый структурный компонент может иметь связывающие области (группы) для образования связи со связующим компонентом.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, структурный компонент может быть представлен полиамидамином дендримером, дериватизированным со связующим элементом/элементами, такими как олигопептид **KKRKRKRKR** и связанным с комбинаторным самоорганизующимся карбоксилированным производным этого же пептида.

Примечание: K - это одна буква названия аминокислоты лизина.

Примечание: R - представляет собой одну букву названия аминокислоты аргинина. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, конструктивный элемент может также представлять собой дериватизированные адамантином неорганические наночастицы, такие как дериватизированные адамантаном наночастицы металла, или дериватизированные адамантаном наночастицы оксида металла, более конкретно, например, наночастицами золота, дериватизированными с адамантаном.

#### Терминирующий компонент

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, терминирующие компоненты занимают участки взаимодействия связывающих компонентов, для ограничения непрерывного распространения и роста сети, когда терминирующие компоненты присутствуют в достаточном количестве, по отношению к областям взаимодействия в компонентах связывания. Связующий компонент и структурный компонент могут самостоятельно собираться в супрамолекулярную структуру, в то время как терминирующие компоненты могут только занимать области взаимодействия и предотвращать дальнейшую самосборку (рост сети) между компонентом связывания и структурным компонентом. Для некоторых вариантов осуществления настоящего изобретения, степень, в которой терминирующий компонент ограничивает процесс самосборки основана на относительном количестве (концентрации) связывающих компонентов по отношению к количеству участков взаимодействия на компонентах связывания. В некоторых вариантах осуществления изобретения, когда концентрация терминирующих компонентов достигает достаточного уровня, наблюдается самосборка из трех компонентов: (1) структурный компонент, (2) связующий компонент, и (3) терминирующий компонент, что приводит к образованию частиц (наночастиц), а не сшитой сети или гидрогеля. Преимущество этого подхода к супрамолекулярному получению наноразмерных частиц заключается в том, что размер конечных частиц (наночастиц) может быть легко рассчитано путем изменения относительных концентраций компонентов в смеси препарата.

В некоторых вариантах осуществления терминирующий компонент имеет один связывающий элемент, который связывается с одной из областей взаимодействия на связующем компоненте. В этих случаях, каждый терминирующий компонент имеет только один связывающий элемент. Связывающий элемент представляет собой химический фрагмент, который связывается с областью взаимодействия компонента связывания с помощью одного или несколько межмолекулярных сил. Эти терминирующие компоненты взаимодействуют только с одной областью взаимодействия на связующем компоненте. В этом случае сшивания между терминирующим компонентом и связующим компонентом можно избежать.

Терминирующий компонент может представлять собой полимер, полипептид, олигосахарид или небольшую молекулу и функционировать так долго, пока терминирующий компонент взаимодействует с областями связывания связующего компонента. В некоторых вариантах осуществления изобретения терминирующий компонент представляет собой полимер, который получен с использованием связующего элемента. В других вариантах терминирующий компонент представляет собой поли -этиленгликоль, дериватизированный со связующим элементом, например, содержит остатки малеиновой кислоты.

Супрамолекулярная структура может иметь два или более терминирующих компонента. В этих сценариях супрамолекулярная структура может иметь 2, 3, 4, 5, или 6 различных терминирующих компонентов. Каждый терминирующий компонент может иметь один и тот же связывающий элемент, или они могут иметь различные связывающие элементы, но каждый связывающий элемент будет взаимодействовать со связывающей областью связующего компонента.

#### Связывающие компоненты

Связывающие компоненты имеют множество участков связывания, которые взаимодействуют и связываются со структурным компонентом и терминаторным компонентом и могут включать в себя терминаторный компонент, выбранный из группы, состоящей из немодифицированного кобаламина, дипиридамола, основных аминокислот, немодифицированного пептида, такого как **KKRKRKRKR**, и любой их комбинации.

Область связывания представляет собой химический фрагмент, который связывается с структурным компонентом и терминирующим компонентом одной или более межмолекулярных сил.

В некоторых вариантах осуществления могут быть использованы два или более различных связывающих компонентов, при условии, что оба имеют области селективного взаимодействия, которые связываются со структурными и терминирующими компонентами.

Связывающий компонент может представлять собой полимер, олигосахарид, или полипептид. Как связывающий компонент может быть использован любой подходящий материал со множеством областей связывания. В качестве связывающего компонента также может быть использован полиэтиленмин или

разветвленный полиэтиленмин дериватизированный с множеством участков связывания. Конкретный пример связывающего компонента это разветвленный дериватизированный с бета-циклодекстрином полиэтиленмин. Другой пример связывающего компонента это поли-L-лизин, дериватизированный с  $\beta$ -циклодекстрином.

#### Молекулярное распознавание

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, связывающие области и/или связывающие элементы являются элементами молекулярного распознавания. Другими словами, область связывания образует пару молекулярного распознавания со структурным компонентом или терминирующим компонентом.

На фиг. 3 приведен принцип молекулярного распознавания между различными веществами на основе нуклеотидов, как структуры, которая имеет важное применение в некоторых вариантах этого изобретения. Молекулярное распознавание относится к конкретному взаимодействию между двумя или более молекулами через одну или более межмолекулярных сил. Молекулы, участвующие в молекулярном распознавании обладают молекулярной комплементарностью и называются парное молекулярное распознавание или хост-гостевой комплекс. В этом случае термины "хозяин" и "гости" не придают особое отношение, но описывают только два соединения, которые проявляют молекулярную комплементарность, т.е. связываться друг с другом с помощью молекулярного распознавания. А "хозяин" и "гость" связываются друг с другом, в то время как два соединения "хозяина" нет. Молекулярное распознавание это специфическое взаимодействие, означающее, что каждый элемент молекулярного распознавания будет связываться с комплементарными молекулами, имеющими определенные структурные особенности. В общем, компоненты пар молекулярного распознавания связываются друг с другом более плотно, чем в случае для неспецифического связывания, так как взаимодействия, которые происходят между двумя элементами молекулярных распознавания, являются многочисленными.

В некоторых вариантах осуществления изобретения пары молекулярного распознавания включают небольшие молекулы - комплексы типа хозяин/гость (включая, но не ограничиваясь комплексами включения), пары комплементарных последовательностей олигонуклеотидов (например, ДНК-ДНК, ДНК-РНК или РНК-РНК, которые связываются друг с другом путем гибридизации), антитело-антиген, белок-субстрат, белок-ингибитор, и белок-белковые взаимодействия (такие как альфа-спиральные пептидные цепи и  $\beta$ -листовые пептидные цепи).

В некоторых вариантах осуществления изобретения супрамолекулярные структуры самособираются путем молекулярного распознавания. В этом случае области связывания на связывающем компоненте образует пару молекулярного распознавания со связыванием элементов на структурном элементе. Связывание элементов на терминальном компоненте также происходит с участками связывания на компоненте связывания с образованием пары молекулярного распознавания. Пары молекулярного распознавания, образованные между компонентом связывания и структурным компонентом и могут быть такими же, как пары молекулярного распознавания, образованные между компонентом связывания и терминальным компонентом, или они могут быть разными. Другими словами, в некоторых вариантах осуществления изобретения связывающий элемент на структурном компоненте может быть таким же, как связывающий элемент на терминирующем компоненте, или они могут быть разными, но оба связывающих элемента связываются с той же областью связывания на компоненте связывания.

Для настоящего изобретения, пары молекулярного распознавания включают пары молекулярного распознавания, комбинации пар молекулярного распознавания и множество нескольких пар молекулярных распознавания. Некоторые примерные варианты осуществления изобретения включают использование пар молекулярного распознавания, состоящие из адамантан- $\beta$ -циклодекстринового комплекса, диазобензен- $\alpha$ -циклодекстринового комплекса, стероид-основанных пар молекулярного распознавания, пар молекулярного распознавания на основе пирена, стероидов, родамина в комплексе с циклодекстрином, доксорубицина в комплексе с циклодекстрином, биотин-стрептавидином, комплементарной пары оснований нуклеотидов, комплементарной пары нуклеотидов, комплементарной пары олигонуклеотидов, и их комбинаций.

#### Функциональные элементы

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, один из структурных компонентов, связывающий компонент или терминирующий компонент, включает в себя функциональный элемент. Функциональный элемент может представлять собой химический фрагмент, который придает дополнительную функцию или активность супрамолекулярной структуре, не присущую ей пока функциональный элемент отсутствует. Функциональный элемент может представлять собой светолучающее (т.е. флуоресцирующее или фосфоресцирующее) соединение, такое как комбинаторное самоорганизующееся производное рибофлавина. Флуоресцирующие и фосфоресцирующие супрамолекулярные структуры могут быть использованы, например, в визуализации исследований *in vitro* или *in vivo*. Так, например, люминесцентный рибофлавин под действием УФ-света и может быть использован в качестве функционального элемента. Функциональный элемент может также представлять собой соединение, содержащее радиоактивный или магнитно-активный изотоп. Так, например, позитрон - излучаю-

щие изотопы, такие как  $^{64}\text{Cu}$  может быть использован для измерения биораспределения супрамолекулярных структур. Другие полезные подходящие изотопы были бы очевидны любому специалисту.

На фиг. 4. приведено схему синтеза для функционального элемента в качестве примера осуществления настоящего изобретения, в котором функциональным элементом является динамический рибофлавин (IV), с 44 компонентами в смеси, которые реагируют друг с другом, а также с формулой для вычисления комбинаторного синтеза и схемы синтеза полностью его замещенного производного, где  $m=1$ ,  $k=4$ , и модификатор (II), является тетра-сукцинил рибофлавином (v). В некоторых вариантах осуществления изобретения, функциональный элемент может быть таргетным элементом, который доставляется благодаря супрамолекулярной структуре в конкретные клетки. Такие системы доставки с функциональными элементами внутри могут быть представлены олигонуклеотидами, антителами, и небольшими молекулами, которые связываются с белками клеточной поверхности. В общем, любой химический фрагмент, который специфически связывается с одним или более рецепторами клеточной поверхности могут быть включены в супрамолекулярную структуру, чтобы быть функциональным элементом. Белками клеточной поверхности могут быть, например, белки, на раковой клетке или на бактериях или грибах. Конкретные примеры функциональных элементов, которые являются клеточными таргетными фрагментами ориентации для настоящего изобретения, могут быть RGD и EGF, фолиевая кислота, трансферрин, и включать антитела нацеленные на маркеры клеточной поверхности, такие как, например, Герцептин для Her2 в клетках рака молочной железы.

Для этого изобретения в качестве функционального элемента может быть выбран свободно проникающий в клетку функциональный элемент, который действует через функцию увеличения проницаемости клеточных мембран. Специфические примеры лигандов, которые увеличивают проницаемость клеточной мембраны, включают TAT лиганд. Различные другие лиганды, действующие через проницаемость клеточной мембраны также могут быть использованы в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения супрамолекулярная структура может иметь два или более функциональных элемента. Например, супрамолекулярная структура может иметь два таргетных функциональных элемента в качестве средства для повышения селективности доставки в нужные клетки, или в качестве средства для повышения аффинности связывания с помощью нескольких функциональных элементов, направленных на поверхностное таргетное взаимодействие белок-клетка. Клетка означает биологическую клетку. Другие примеры нескольких функциональных элементов включают супрамолекулярные структуры, имеющие таргетные функциональные элементы и имеющие функциональные элементы увеличения проницаемости клеток, как средство для комбинирования синергических эффектов улучшенной транспортировки препарата к клетке и увеличения проницаемости клеточной мембраны. Еще один пример из синергетического действия множества функциональных элементов в супрамолекулярной структуре это использование супрамолекулярной структуры, имеющей (1) компонент визуализации, функциональный элемент, который является светоизлучающим или функциональным элементом радиоизотопа и (2) таргетный функциональный элемент для визуализации целевых клеток. Настоящие варианты осуществления изобретения включают в себя использование комбинаций функциональных элементов, таких как два таргетных функциональных элемента, в т.ч. функциональный элемент увеличения проницаемости клеточных мембран, либо двух таргетных функциональных элементов в т.ч. функциональный элемент визуализации, а также использование комбинаций указанных выше функциональных элементов.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, супрамолекулярная структура включает в себя два или более терминирующих компонента, каждый из которых может дополнительно включать в себя функциональный элемент. В этом случае, множественные функциональные элементы могут быть введены в частицу с помощью нескольких терминирующих компонентов. Например, супрамолекулярная структура может иметь (1) терминирующий компонент, не имеющий никакого функционального элемента и (2) терминирующий компонент, имеющий таргетный элемент. Терминирующие компоненты, не имеющие функционального элемента могут обмениваться с терминирующими компонентами имеющих функциональный элемент путем обработки супрамолекулярной структуры вторичным терминирующим компонентом или путем обработки супрамолекулярной структуры смесью других терминирующих компонентов. Аналогично, супрамолекулярная структура может быть получена с использованием смеси терминирующих компонентов, каждый из которых будет включен в супрамолекулярную структуру.

#### Нагрузки (груз)

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения супрамолекулярная структура может включать в себя нагрузку. Нагрузка определяется как химический фрагмент, который может быть инкапсулирован внутрь супрамолекулярной структуры, и который может высвобождаться из супрамолекулярной структуры. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, груз могут связываться с одним или более структурных компонентов, компонентом связывания или терминирующим компонентом. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, груз представляет собой химическую группу, которая может неспецифично связываться со связывающими

областями связующего компонента и который предотвращать помехи в самосборке наночастиц со стороны груза. Например, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, груз представляет собой небольшую молекулу, выбранную из группы, состоящей таких лекарств, как доксорубицин, таксол, рапамицин, цисплатин, другие противораковые препараты, полезные для химиотерапии рака, в т.ч. белок, пептид, олигонуклеотид, мРНК, плазида, молекулы (системы) доставки генов, а также любые их комбинации.

Предполагается, для некоторых вариантов осуществления настоящего изобретения, что наночастицы не во всех случаях могут инкапсулировать один и тот же груз. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения супрамолекулярные структуры могут доставлять терапевтические протеины и олигонуклеотиды к клетке-мишени, и сами эти супрамолекулярные структуры используются для защиты терапевтических соединений, белков и/или олигонуклеотидов от деградации. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения супрамолекулярная структура может включать в себя два или более груза. Выбор соотношения и количества двух или более терапевтических соединений в супрамолекулярной структуре обеспечивает корректную доставку препаратов в клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения в качестве груза помимо мелких молекул в супрамолекулярную структуру может также быть включена плазида. Во многих вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрено инкапсулировать в супрамолекулярные структуры множество видов грузов и различных сочетаний грузов.

#### Способы получения супрамолекулярной структуры

Настоящее изобретение включает способы получения описанных выше супрамолекулярных структур, путем приготовления суспензии структурных компонентов и связующих компонентов; добавления связующих компонентов к указанной суспензии.

Соотношение структурных компонентов для связующих компонентов и терминирующих компонентов выбираются в соответствии с заранее определенным размером указанных супрамолекулярных структур. Структурные, связующие и терминирующие компоненты самособираются в супрамолекулярные структуры, имеющие, по существу, заранее заданный размер. В некоторых случаях, заранее заданный размер, по крайней мере, более 10 нм и меньше 800 нм (нанометров).

Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения включают способы получения супрамолекулярных структур.

Один общий пример способа получения супрамолекулярной структуры включает в себя такие этапы: приготовление суспензии структурных компонентов и связывающих компонентов;

добавление терминирующих компонентов к суспензии структурных компонентов и связывающих компонентов с образованием смеси; и

формирующие супрамолекулярную структуру из смеси терминирующих компонентов со структурными и связывающими компонентами.

Дополнительно, варианты осуществления включают общий способ получения супрамолекулярной структуры включают такие этапы:

выбор соотношения количеств структурных компонентов к количеств связующих компонентов; и

выбор соотношения для количеств структурных компонентов к количеству терминирующих компонентов.

Дополнительно, варианты осуществления включают в себя общий способ получения супрамолекулярной структуры этап, в котором

есть выбор соотношения для количеств структурных компонентов к количеству связующих компонентов.

Дополнительно, варианты осуществления изобретения включают в себя общий способ получения супрамолекулярной структуры в котором

есть выбор соотношения количества структурных компонентов к количеству терминирующих компонентов.

Дополнительно, варианты осуществления изобретения включают общий способ получения супрамолекулярной структуры дополнительно включает в котором

есть выбор соотношения количества связующих компонентов к количеству терминирующих компонентов.

Соотношение структурных компонентов для связывания компонентов с терминальными компонентами выбираются в соответствии с заранее определенным размером указанной супрамолекулярной структуры. Структурные, связующие и терминирующие компоненты самособираются (самоорганизуются) в супрамолекулярные структуры, приобретающие, по существу, заранее заданный размер. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, заранее определенный размер находится в пределах от примерно 5 нм до 2000 нм. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения желательным является заранее определенный размер частиц в пределах, по крайней мере, от 20 нм до 400 нм. Размер супрамолекулярных структур можно легко регулировать путем изменения соотношения между компонентами, используемыми для получения супрамолекулярных структур. Также может быть легко получено широкое разнообразие супрамолекулярных структур различных размеров, возможность комбинатор-

ного синтеза также позволяет получать разные размеры супрамолекулярных структур, и оптимизировать конкретную функцию для обеспечения их активности.

Супрамолекулярная структура может быть легко получена путем объединения компонентов вместе. По крайней мере, три компонента самособираются в супрамолекулярную структуру. Дополнительные компоненты (структурные, связывающие или терминирующие) или карго соединения (груз или нагрузка) также могут быть использованы, при условии, что минимум элементов присутствуют. Дополнительные компоненты могут включать в себя один или несколько функциональных элементов.

После того, как формируется супрамолекулярная структура, компоненты могут быть заменены на другие компоненты, несущие соответствующие элементы связывания или областей связывания путем обработки супрамолекулярной структуры дополнительными компонентами. Например, одни терминирующие компоненты могут быть обменены путем обработки супрамолекулярной структуры на другие терминирующие компоненты (например, обогащенные функциональными элементами). Кроме того, структурные или связывающие компоненты могут обмениваться путем обработки супрамолекулярной структуры дополнительными структурными или связывающими компонентами. Суспензия или раствор компонентов может быть обработан ультразвуком для ускорения или помощи в протекании компонентных обменных реакций.

Размер супрамолекулярных структур может легко регулироваться путем изменения соотношения между компонентами, используемыми для получения супрамолекулярных структур. Широкое разнообразие супрамолекулярных структур различных размеров может быть легко получено. Это также дает возможность комбинаторного синтеза, так как массивы супрамолекулярных структур могут быть получены на основе их конкретной функции и оптимизации их активности.

Используя обмен компонентов, размеры супрамолекулярных структур могут быть скорректированы после того, как супрамолекулярные структуры будут сформированы путем обработки предварительно изготовленных супрамолекулярных структур дополнительным компонентом. Например, если предварительно сформированную супрамолекулярную структуру обрабатывают дополнительным количеством связывающего компонента, размер структуры будет уменьшаться. Если предварительно сформированную супрамолекулярную структуру обрабатывают дополнительным структурным компонентом, то размер будет увеличиваться. Примеры такого эффекта представлены в приведенных ниже примерах.

Супрамолекулярная структура может быть диссоциирована в естественных условиях *in vitro* и *in vivo*, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения.

Функциональные элементы могут также легко корректироваться с помощью этого метода. Во многих случаях компонента, несущая функциональный элемент молекула может быть включена в смесь, используемую для получения супрамолекулярной структуры. Доля, в которой функциональные элементы присутствуют в супрамолекулярной структуре может быть легко отрегулирована путем изменения соотношения между функциональными элементами. Например, если функциональный элемент представлен на связующем компоненте, соотношение связующего компонента, имеющего функциональный элемент и связывающего компонента, в которых отсутствует функциональный элемент определяет степень, в которой функциональный элемент присутствует в образованной супрамолекулярной структуре. То же самое справедливо, когда функциональный элемент присутствует на терминирующем компоненте или структурной компоненте.

Когда функциональные элементы присутствуют на терминальных компонентах, предварительно собранные супрамолекулярные структуры могут быть обработаны терминирующими компонентами, имеющими функциональные элементы. Часть терминирующих компонентов будет обмениваться функциональными элементами с последующим образованием супрамолекулярной структуры. Множество терминирующих компонентов с множеством различных функциональных элементов могут быть добавлены в супрамолекулярную структуру аналогичным образом. Степень, в которой функциональный элемент присутствует на результирующей супрамолекулярной структуре определяется концентрацией терминирующего компонента для обработки предварительно сформированной супрамолекулярной структуры.

Индивидуальные компоненты могут быть легко получены используя хорошо известные методы химического синтеза. Связующие элементы выбираются в зависимости от типа межмолекулярных сил, выбранных для связывания компонентов друг с другом. На основе химии молекулярного распознавания, химические фрагменты могут быть выбраны в качестве связующего элемента или по характеру области связывания. Для структурных компонентов, неорганические ядра могут быть синтезированы с использованием способов, известных в данной области техники, чтобы обеспечить обязательные элементы на поверхности, когда это необходимо. Органические соединения, такие как полимеры и дендримеры, могут быть синтезированы с помощью известных методов с подходящими связывающими элементами. Альтернативно, также могут быть получены органические ядра, в том числе полимеры, дендримеры, и/или полипептидов и имеющие реакционноспособные функциональные группы, модифицированные подходящими связывающими элементами или связывающими областями.

Существует множество методов дериватизации органических соединений с подходящими связывающими элементами. Например, реакционноспособные функциональные группы органических соединений, таких как гидроксилы, тиолы, амины, карбоновые кислоты, галогениды, алкены, алкины, азиды и другие,

могут вступать в реакцию или активироваться для взаимодействия с множеством других функциональных групп с образованием ковалентных связей. Например, аминокислоты, имеющие свободную группу  $-NH_2$ , могут реагировать со связующими элементами, несущими аминокислотные группы, такими как изоцианаты, изотиоцианаты и активированные сложные эфиры, такие как сложные эфиры N-гидроксисукцинимиды (NHS). Таким образом, связывающие элементы могут быть легко добавлены к любому компоненту. Количество связывающих элементов на конкретном компоненте может варьироваться в зависимости от количества реактивных сайтов и количества реактивного связывающего элемента, используемого для получения компонента. Для конкретных примеров см. примеры, описанные ниже.

Химия, которая обычно используемая для дериватизации белков, также может использоваться для добавления связывающих элементов к белкам, пептидам или антителам. Например, сочетание аминов или тиол-енового взаимодействия с образованием необратимых связей.

В некоторых случаях может потребоваться линкер. Специалистам в данной области известны различные бифункциональные сшивающие агенты для ковалентного связывания с белками, любой из которых может быть использован. Например, гетеродифункциональные сшивающие агенты, такие как сукцинимидил-4-[N-малеимидометил]циклогексан-1-карбоксилат (SMCC) и сложный эфир маламидобутирил-оксисукцинимид (GMBS), могут использоваться для взаимодействия с аминами (через сложные эфиры сукцинимидной связи), а затем с образованием ковалентной связи со свободным тиолом (через маламид). Другие сшивающие агенты, такие как сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио) пропионат (SPDP), могут реагировать с аминами (через эфир сукцинимиды) и образовывать ковалентную связь со свободным тиолом посредством тиолового обмена. Другие бифункциональные сшивающие агенты включают бис (сложный эфир N-гидросукцинимиды) субериновой кислоты, который может реагировать с двумя аминами. Другие бифункциональные и гетеробифункциональные сшивающие агенты, пригодные для использования с различными модификациями поверхности, будут очевидны специалистам в данной области.

В некоторых вариантах реализации изобретения желательно включить обратимый (расщепляемый) сшивающий агент, разнообразие которых известно квалифицированному специалисту. Например, 4-аллилокси-4-оксобутановая кислота имеет алкеновую группу на одном конце, которую можно использовать для связывания тиол-ена с тиолом, а другой ее конец представляет собой карбоксильную группу, которая может быть связана с амином. В середине сшивающего агента есть сложноэфирная группа, которая должна медленно гидролизироваться с течением времени в физиологических условиях. Другие расщепляемые сшивающие агенты будут очевидны квалифицированному специалисту. К ним относятся, например, дисульфидные связи, которые расщепляются при восстановлении.

#### Использование супрамолекулярных структур

Супрамолекулярные структуры имеют множество применений, особенно в биологической области. Простые методы, необходимые для получения супрамолекулярных структур, позволяют быстро получать супрамолекулярные структуры различных размеров или несущие определенные функциональные элементы. Использование различных материалов для структурных, связывающих и терминирующих компонентов позволяет использовать самые разные утилиты.

Супрамолекулярные структуры можно диссоциировать в средах *in vitro* и *in vivo* согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения. Это дает возможность высвобождения груза (полезной нагрузки) из супрамолекулярной структуры.

Супрамолекулярные структуры можно использовать для генной терапии (*in vivo*) или для клеточной трансфекции (*in vitro*) путем доставки генов или плазмид в клетки.

Изобретение включает способы доставки гена в клетку путем контактирования клетки с супрамолекулярной структурой, описанной в данном документе, несущей в качестве груза плазмиды. Обработка клетки супрамолекулярной структурой приводит к интернализации супрамолекулярной структуры с последующим высвобождением плазмиды в клетку. Это может привести к эффективной "трансфекции" целевой клетки интересующей плазмидой. Обычно таким образом в клетку можно ввести любую плазмиду, несущую любой ген. Аналогичным образом элементы нацеливания (таргетные элементы) и/или проникновения (пенетрации) в клетки могут улучшить специфичность и/или интернализацию клеток.

Изобретение также включает способы доставки терапевтических соединений путем обработки клетки супрамолекулярной структурой, описанной в данном документе, с терапевтическим соединением в качестве груза. Терапевтическое соединение может быть, например, белком или пептидом (включая антитела), олигонуклеотидом (например, мРНК) или небольшой молекулой. Небольшая молекула может быть, например, противораковым (например, доксорубин, таксол, паклитаксел, цисплатин или рапамицин), антибиотиком, антибактериальным или противогрибковым агентом. Функциональные элементы супрамолекулярной структуры могут улучшать нацеливание, интернализацию или распределение клеток. Более чем одно терапевтическое соединение может быть доставлено в единственной супрамолекулярной структуре, и, если необходимо, соотношение терапевтических соединений можно контролировать.

Другие способы использования супрамолекулярных структур, описанных в данном документе, включают методы фототермотерапии путем обработки клеток супрамолекулярными структурами, описанными в данном документе, содержащими наночастицы золота в качестве структурных компонентов.

### Фармацевтические композиции

Супрамолекулярные структуры или наночастицы, обсуждаемые в настоящем документе, могут быть включены в различные композиции для использования в диагностических или терапевтических способах лечения, особенно для лечения вирусных инфекций.

Композиции (например, фармацевтические композиции) могут быть собраны в виде сборки. Как правило, фармацевтическая композиция по изобретению содержит эффективное количество (например, фармацевтически эффективное количество) композиции по изобретению.

Композиция по изобретению может быть составлена в виде фармацевтической композиции, которая содержит композицию по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель. Под "фармацевтически приемлемым носителем" подразумевается материал, который не является нежелательным с биологической или иной точки зрения, т.е. материал можно вводить субъекту, не вызывая каких-либо нежелательных биологических эффектов или который не взаимодействует вредным образом с любым из других компонентов фармацевтического препарата или состава, в котором он содержится. Носитель, естественно, будет выбран так, чтобы свести к минимуму любое разложение активного ингредиента и свести к минимуму любые неблагоприятные побочные эффекты у субъекта, что хорошо известно специалисту в данной области. Для обсуждения фармацевтически приемлемых носителей и других компонентов фармацевтических композиций см. Remington's Pharmaceutical Sciences, 18-е изд., Mack Publishing Company, 1990. Некоторые подходящие фармацевтические носители будут очевидны для квалифицированного специалиста и включают, например, воду (включая стерильную и/или деионизированную), подходящие буферы (такие как PBS), физиологический раствор, среду для культивирования клеток (такую как DMEM), искусственную спинномозговую жидкость и т.п.

Фармацевтическая композиция или набор по изобретению может содержать другие фармацевтические препараты в дополнение к композициям по изобретению. Другой(ие) агент(ы) можно вводить в любое подходящее время во время лечения пациента либо одновременно, либо последовательно. Специалист в данной области поймет, что конкретный состав будет частично зависеть от конкретного применяемого агента и выбранного пути введения. Соответственно, существует большое разнообразие подходящих составов композиций по настоящему изобретению.

Составы, которые подходят для местного введения непосредственно в ЦНС, включают, например, подходящие жидкие носители или кремы, эмульсии, суспензии, растворы, гели, кремы, пасты, пены, смазки или спреи. Местное введение в ЦНС возможно при вскрытии ЦНС раной или во время операции. Специалист в данной области поймет, что подходящий состав может быть выбран, адаптирован или разработан на основе конкретного применения. Дозировки для композиций по настоящему изобретению могут быть в стандартной лекарственной форме. Термин "единичная лекарственная форма", используемый здесь, относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичных доз для животных (например, людей), каждая единица содержит заранее определенное количество агента по изобретению, отдельно или в комбинации с другими терапевтическими агентами, рассчитанными в количестве, достаточном для получения желаемого эффекта в сочетании с фармацевтически приемлемым разбавителем, носителем или наполнителем.

Специалист в данной области может легко определить подходящую дозу, график и способ введения для точного состава используемой композиции, чтобы достичь желаемого эффективного количества или эффективной концентрации агента у отдельного пациента. Доза композиции по изобретению, вводимая животному, в частности человеку, в контексте настоящего изобретения должна быть достаточной, чтобы повлиять, по крайней мере, на детектируемую величину диагностического или терапевтического ответа у индивидуума в течение разумного периода времени. Доза, используемая для достижения желаемого эффекта, будет определяться множеством факторов, включая эффективность конкретного вводимого агента, фармакодинамику, связанную с агентом в организме хозяина, тяжесть болезненного состояния инфицированных людей, наличие других лекарств, вводимых субъекту и т.д. Размер дозы также будет определяться наличием любых неблагоприятных побочных эффектов, которые могут сопровождать конкретное применяемое средство или его композицию. Обычно желательно по возможности свести к минимуму побочные эффекты. Доза биологически активного материала будет варьироваться; подходящие количества для каждого конкретного агента будут очевидны квалифицированному специалисту.

Другой вариант осуществления изобретения представляет собой набор, применимый для любого из способов, раскрытых в данном документе, либо *in vitro*, либо *in vivo*. Такой набор может включать одну или несколько композиций по изобретению. Необязательно, наборы содержат инструкции по выполнению способа. Необязательные элементы набора включают подходящие буферы, фармацевтически приемлемые носители и т.п., контейнеры или упаковочные материалы. Реагенты набора могут находиться в контейнерах, в которых реагенты стабильны, например, в лиофилизированной форме или в стабилизированных жидкостях. Реагенты также могут быть в форме одноразового использования, например, в форме однократной дозировки.

Из вышеприведенного описания будет очевидно, что в описанное здесь изобретение могут быть внесены изменения и модификации, чтобы адаптировать его к различным применениям и условиям. Такие варианты осуществления также входят в объем следующей формулы изобретения. Перечисление

списка элементов в любом определении переменной в данном документе включает определения этой переменной как любого отдельного элемента или комбинации (или подкомбинации) перечисленных элементов. Изложение варианта осуществления в данном документе включает этот вариант осуществления как любой отдельный вариант осуществления или в сочетании с любыми другими вариантами осуществления или их частями. Термины, перечисленные в единственном времени, также включают множественные, если контекст не указывает иное. Примеры, раскрытые ниже, предназначены для иллюстрации изобретения, но не для ограничения его объема. Другие варианты изобретения будут очевидны рядовому специалисту в данной области техники и охватываются прилагаемой формулой изобретения. Все цитируемые публикации, базы данных и патенты включены сюда в качестве ссылки для всех целей.

Способы получения, характеристики и использования соединений по настоящему изобретению проиллюстрированы в следующих примерах. Исходные материалы получают в соответствии с процедурами, известными в данной области или как показано здесь. Следующие ниже примеры представлены для более полного понимания изобретения. Эти примеры являются только иллюстративными и никоим образом не должны рассматриваться как ограничение изобретения.

Могут быть использованы различные методы введения супрамолекулярных комбинаторных производных кобаламина (CDC). Композицию CDC можно вводить перорально или можно вводить внутрисосудисто, подкожно, внутривенно инъекцией, в форме аэрозоля, в мочевого пузырь, местно и так далее. Например, способы ингаляции хорошо известны в данной области. Доза терапевтической композиции будет широко варьироваться в зависимости от конкретного вводимого антивирусного CDC, природы заболевания, частоты введения, пути введения, клиренса используемого агента от хозяина и т.п. Начальная доза может быть выше при последующих более низких поддерживающих дозах. Дозу можно вводить с частотой один раз в неделю или один раз в две недели, или можно разделить на меньшие дозы и вводить один или несколько раз в день, два раза в неделю и так далее для поддержания эффективного уровня дозы. Во многих случаях для перорального введения требуется более высокая доза, чем для внутривенного введения.

Соединения по настоящему изобретению могут быть включены в различные композиции для терапевтического введения. Более конкретно, соединения настоящего изобретения могут быть включены в фармацевтические композиции в комбинации с подходящими фармацевтически приемлемыми носителями или разбавителями и могут быть включены в препараты в твердой, полутвердой, жидкой или газообразной формах, таких как капсулы, порошки, гранулы, мази, кремы, пены, растворы, суппозитории, инъекции, формы для ингаляций, гели, микросферы, лосьоны и аэрозоли. По существу, введение соединений может осуществляться различными способами, включая пероральное, буккальное, ректальное, парентеральное, внутривенное, внутримышечное, трансдермальное, интратрахеальное введение и так далее. Противовирусные ССМ по изобретению могут быть распределены системно после введения или могут быть локализованы с использованием имплантата или другой композиции, которая удерживает активную дозу в месте имплантации.

Соединения по настоящему изобретению можно вводить отдельно, в комбинации друг с другом, или они могут использоваться в комбинации с другими известными соединениями (например, перфорин, противовоспалительными средствами и так далее). В фармацевтических дозированных формах соединения можно вводить в форме их фармацевтически приемлемых солей. Следующие ниже методы и вспомогательные вещества приведены только в качестве примера и никоим образом не ограничивают изобретение. Для препаратов для перорального введения все соединения можно использовать по отдельности или в комбинации с подходящими добавками для производства таблеток, порошков, гранул или капсул, например, с обычными добавками, такими как лактоза, маннит, кукурузный крахмал или картофельный крахмал; со связующими агентами, такими как кристаллическая целлюлоза, производные целлюлозы, гуммиарабик, кукурузный крахмал или желатин; с разрыхлителями, такими как кукурузный крахмал, картофельный крахмал или натрийкарбоксиметилцеллюлоза; с тальком или стеаратом магния и, если необходимо, с разбавителями, буферными агентами, увлажняющими агентами, консервантами и ароматизаторами.

Соединения могут быть включены в композиции для инъекций путем их растворения, суспендирования или эмульгирования в водном или неводном растворителе, таком как растительные или другие аналогичные масла, синтетические глицериды алифатической кислоты, сложные эфиры высших алифатических кислот или пропиленгликоль; и, если желательно, с обычными добавками, такими как солюбилизаторы, изотонические агенты, суспендирующие агенты, эмульгаторы, стабилизаторы и консерванты. Соединения можно использовать в аэрозольной композиции для ингаляционного введения, в том числе с использованием небулайзеров. Соединения настоящего изобретения могут быть включены в подходящие пропелленты под давлением, такие как дихлордифторметан, пропан, азот и тому подобное. Кроме того, соединения могут быть включены в суппозитории путем смешивания с различными основами, такими как эмульгирующие основы или водорастворимые основы. Соединения по настоящему изобретению можно вводить ректально с использованием суппозитория. Суппозиторий может содержать вспомогательные вещества, такие как масло какао, карбовакс и полиэтиленгликоли, которые плавятся при температуре тела, но остаются твердыми при комнатной температуре.

Стандартные лекарственные формы для перорального или ректального введения, такие как сиропы, эликсиры и суспензии, где каждая стандартная доза, например, чайная ложка, столовая ложка, таблетка или суппозиторий, может содержать заранее определенное количество композиции, содержащей одно или несколько соединений настоящего изобретения. Точно так же стандартные лекарственные формы для инъекции или внутривенного введения могут содержать соединение по настоящему изобретению в композиции в форме раствора в стерильной воде, физиологическом растворе или другом фармацевтически приемлемом носителе. Имплантаты для замедленного высвобождения композиций хорошо известны в данной области. Имплантаты изготавливаются в форме микросфер, пластин и т. Д. Из биоразлагаемых или небiorазлагаемых полимеров. Например, полимеры молочной и/или гликолевой кислоты образуют разлагающийся полимер, который хорошо переносится хозяином.

Имплант, содержащий противовирусные комбинаторные кобаламиды согласно изобретению, расположен близко к очагу инфекции (в случае респираторной вирусной инфекции, легкие и бронхи), так что местная концентрация активного агента увеличивается по сравнению с другими участками тела. Термин "стандартная лекарственная форма" относится к физически дискретным единицам, подходящим для использования в качестве разовых доз для людей и животных, каждая единица содержит заранее определенное количество соединений по настоящему изобретению, которое, согласно расчетам, достаточно для обеспечения желаемого эффекта вместе с фармацевтически приемлемым разбавителем, носителем или наполнителем. Описание стандартных дозированных форм по настоящему изобретению зависит от конкретного используемого соединения и эффекта, который должен быть достигнут, а также от фармакодинамики соединения, используемого в организме хозяина. Обычно доступны фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, такие как вспомогательные вещества, адъюванты, носители или разбавители.

Кроме того, обычно доступны фармацевтически приемлемые эксципиенты, такие как агенты, регулирующие pH, и буферные агенты, агенты тоничности, стабилизаторы, смачивающие агенты и тому подобное. Типичные дозы для системного введения находятся в диапазоне от 0,1 пг (пикограмм) до 1000 миллиграммов на кг веса тела субъекта на одно введение. Типичная доза может представлять собой одну таблетку для приема от двух до шести раз в день или одну капсулу или таблетку с замедленным высвобождением для приема один раз в день с пропорционально более высоким содержанием активного ингредиента. Эффект пролонгированного высвобождения может быть обусловлен материалами, из которых изготовлена капсула, растворяющимися при различных значениях pH, капсулами, обеспечивающими медленное высвобождение под действием осмотического давления, или любым другим известным способом контролируемого высвобождения. Специалистам в данной области техники будет ясно, что уровни доз могут варьироваться в зависимости от конкретного соединения, тяжести симптомов и предрасположенности субъекта к побочным эффектам. Некоторые из конкретных соединений более эффективны, чем другие.

Предпочтительные дозы этого соединения могут быть легко определены специалистами в данной области различными способами. Предпочтительный метод заключается в измерении физиологической активности соединения. Один из представляющих интерес методов - использование липосом в качестве носителя для доставки. Липосомы сливаются с клетками целевой области и обеспечивают доставку содержимого липосом в клетки. Контакт липосом с клетками поддерживается в течение времени, достаточного для слияния, с использованием различных методов поддержания контакта, таких как изоляция, связывающие агенты и тому подобное. В одном аспекте изобретения липосомы предназначены для получения аэрозоля для легочного введения. Липосомы могут быть изготовлены из очищенных белков или пептидов, которые опосредуют слияние мембран, таких как вирус Сендай или вирус гриппа.

Липиды могут представлять собой любую полезную комбинацию известных липидов, образующих липосомы, включая катионные или цвиттерионные липиды, такие как фосфатидилхолин. Остальные липиды обычно представляют собой нейтральные или кислые липиды, такие как холестерин, фосфатидилсерин, фосфатидилглицерин и т.п. Для получения липосом метод, описанный Kato et al. (1991) J. Biol. Chem 266: 3361. Вкратце, липиды и композиция для включения в липосомы, содержащие комбинаторные супрамолекулярные кобаламиды, смешивают в подходящей водной среде, подходяще в солевой среде, где общее содержание твердых веществ будет в диапазоне примерно 110 мас.%. После интенсивного перемешивания в течение коротких периодов примерно 5-60 секунд пробирку помещают в теплую водяную баню с температурой примерно 25-40°C, и этот цикл повторяют примерно 5-10 раз. Затем композицию обрабатывают ультразвуком в течение подходящего периода времени, обычно приблизительно 1-10 с, и, возможно, дополнительно перемешивают с помощью вихревой мешалки. Затем объем увеличивают путем добавления водной среды, обычно увеличивая объем примерно в 1-2 раза, с последующим перемешиванием и охлаждением. Метод позволяет включать в липосомы супрамолекулярные структуры с высокой общей молекулярной массой.

Композиции с другими активными агентами

Для использования в рассматриваемых способах был рассмотрен ряд противовирусных супрамолекулярных структур. Одна противовирусная супрамолекулярная структура называется KS. Антивирусная KS по изобретению может быть включена в композиции с другими фармацевтически активными агентами.

ми, в частности с другими противовирусными, противомикробными или противораковыми агентами. Другие представляющие интерес агенты включают широкий спектр противовирусных производных мононуклеотидов и других ингибиторов РНК-полимеразы, известных в данной области. Классы противовирусных агентов включают интерфероны, ламивудин, рибавирин и так далее; амантадин; ремантадин, такой как зинамивир, осельтамивир и так далее; ацикловир, валацикловир, валганцикловир и т. д. Другие группы противовирусных средств включают адефовир, вбакавир, диданозин, эмтрицитабин, ламивудин, нелфинавир, ритонавир, сакинавир, даклатасвир, ставудин, тенофовир, эфавиренц, невирапин, индинавир, лобалавир и ритонавир и ритонавир. холекальциферол. Цитокины, такие как интерферон гамма, фактор некроза опухоли альфа, интерлейкин 12 и так далее, также могут быть включены в композицию вместе с KS по настоящему изобретению. Настоящее изобретение далее описывается следующими примерами, которые не следует рассматривать как ограничивающие объем изобретения.

Алкилирование определяется как введение алкильного заместителя в органическую молекулу. Типичными алкилирующими агентами являются алкилгалогениды, алкены, эпоксидные соединения, спирты, реже альдегиды, кетоны, сложные эфиры, сульфиды, диазоалканы. Катализаторами алкилирования являются минеральные кислоты, кислоты Льюиса, а также цеолиты. Алкилирование широко используется в химической и нефтехимической промышленности.

Ансамбль или супрамолекулярный ансамбль - это термин из супрамолекулярной химии. Для настоящего изобретения объектами супрамолекулярной химии являются ансамбли, спонтанно построенные из комплементарных геометрически и химически соответствующих молекулярных фрагментов. При синтезе супрамолекулярных структур из одного комбинаторного производного с неполным замещением доступных групп может быть синтезировано более 100 различных дериватизированных супрамолекулярных структур из-за возможных химических перестановок и комбинаций. Примечательно, что между их молекулами обязательно образуются межмолекулярные ионные и водородные связи, а дериватизированные супрамолекулярные структуры обладают значительно более высокой биологической активностью, чем исходная молекула цианокобаламина.

Используя способы настоящего изобретения, было изготовлено лекарство, которое эффективно *in vivo* против гриппа, герпеса, на моделях *in Ovo* (в яйцах) и коронавируса крупного рогатого скота. Для изготовления препарата использовали комбинаторную смесь карбоксиметилкобаламина в виде супрамолекулярного ансамбля без разделения на отдельные компоненты.

Комбинаторная библиотека - это набор из большого количества химических соединений, белков, генов или олигонуклеотидов, позволяющий быстро искать гены-мишени или белки-мишени. Например, набор комбинаторной библиотеки может состоять из миллионов различных химических веществ или, например, набора рекомбинантных молекул ДНК, полученных путем вставки различных антител в легкую и тяжелую цепи кДНК.

Комбинаторный синтез включает синтез методами комбинаторной химии множества одновременных реакций между тремя или более реагентами с образованием продуктов комбинаторного синтеза, которые включают сотни производных объединенных реагентов. Производные объединенных реагентов можно разделить хроматографически, чтобы подтвердить их структуру и изучить биологическую активность. Последние подходы включают использование неразделенных и/или неочищенных смесей продуктов комбинаторного синтеза по различным причинам, в том числе из-за того, что такие смеси продуктов комбинаторного синтеза имеют более значительные и более переменные профили биологической активности, чем биологические профили отдельных компонентов комбинаторного синтеза - продуктов синтеза.

Терапевтически эффективное количество (ТЭК) - это термин для настоящего изобретения, который относится к количеству лекарственного средства. Для некоторых вариантов осуществления настоящего изобретения терапевтически эффективное количество комбинаторных производных цианокобаламина представляет собой количество, которое обеспечивает терапевтически эффективную противовирусную активность. Ожидается, что ТЭК будет отличаться для разных вирусов и разных животных моделей.

### Примеры

Пример 1 представляет собой пример применения настоящего изобретения на практике с использованием комбинаторно-модифицированного кобаламина, служащего ядром супрамолекулярной структуры. Это ядро синтезировано с использованием комбинаторных производных цианокобаламина с противовирусными свойствами и называется KS. Затем создаваемые фармацевтические композиции и лекарственные формы отличаются тем, что алкилированные производные цианокобаламина представляют собой неразделенную комбинаторную смесь производных от монозамещенного до полностью замещенного производного для всех групп R1-R7 следующей структуры, изображенной на фиг. 5, где по крайней мере один из заместителей R1-R7 представляет собой  $-\text{CH}_2-\text{COOM}$  в любом положении, а М представляет собой атом металла или водорода. М также может быть представлен одним из металлов: К, Mg, Са, Cu, Fe, Li, Na, Ba, Ag, Pt, Ai, Ti или Sb. В другом варианте изобретения фармацевтическая композиция может дополнительно содержать ванилин в составе лекарственной формы и холекальциферол. В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция может дополнительно включать незамещенный метилкобаламин, дигидроксикобаламин (гидроксикобаламин), кобамамид или их смесь в ле-

карственной форме. Предлагаемые фармацевтические композиции, например, могут быть составлены в виде различных лекарственных форм, включая, но не ограничиваясь этим, аэрозольный состав для использования в небулайзере или спрее, для использования инъекционного состава для внутримышечных инъекций (IM), внутривенных (IV) инъекций и внутривенных (IVI) инфузий.

Вируцид определяется как любой физический или химический агент, который дезактивирует или уничтожает вирусы. Это отличается от противовирусного препарата, который ингибирует пролиферацию вируса внутри клетки (Virucide, Wikipedia, 2020). Показана разница между вируцидным и вирулицидным - заключается в том, что вируцидное действие является частью вирулицидного, в то время как вирулицидное действие означает полное уничтожение вирусов, (вируцидное или вирулицидное действие, Wikki-diff, 2020).

Пример 2 представляет собой пример синтеза комбинаторной смеси карбоксиметилированного цианокобаламина, который может быть использован для создания противовирусной супрамолекулярной структуры, называемой КС.

Синтез проводится следующим образом: 1 ммоль (миллимоль, mM) цианокобаламина растворяют в 50 мл трис-буферного раствора, и 4 ммоль монохлоруксусной кислоты добавляют при перемешивании до полного растворения обоих компонентов, а затем раствор перемешивают помещают в термостат при 40°C на 7 дней. Затем раствор разливают во флаконы, лиофилизируют, чтобы отогнать избыток монохлоруксусной кислоты и соляной кислоты, и используют для анализа и исследований. В примере синтеза 2 можно получить 27 производных (128 производных) карбоксиметилированных цианокобаламинов.

На фиг. 6 показано ВЭЖХ хроматограмму (жидкостной хроматографией высокого давления) исходного цианокобаламина. Исходный кобаламин дает одну линию поглощения при использовании УФ-детектора.

На фиг. 7 показано ВЭЖХ хроматограмму комбинаторного производного цианокобаламина. Хроматограмма показывает, что пик производного находится в другом месте. Производные с более гидрофильной областью покидают колонку ВЭЖХ раньше, и, таким образом, характерная черта хроматограммы производных расширяется и разделяется на дополнительные полосы. Это предполагает, что производные цианокобаламина могут иметь внутримолекулярные и супрамолекулярные ионные и водородные связи, которые остаются неизменными во время процесса разделения ВЭЖХ, выполняемого в классических условиях с помощью градиентной ВЭЖХ. Также было невозможно с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) и капиллярного гель-электрофореза (CGEP) разделить и идентифицировать фрагмент супрамолекулярной структуры. Другие химические комбинации могут быть использованы для дериватизации цианокобаламина, включая использование ангидридов карбоновых кислот и ангидридов поликарбоновых кислот, галогенидов карбоновых кислот и галоидуглеродов. Для некоторых вариантов осуществления настоящего изобретения можно использовать метилкобаламин, гидроксокобаламин (гидроксико-баламин) и/или кобамамид в качестве первичного кобаламина для дериватизации.

Далее, в эксперименте по изучению противовирусной активности ( $ED_{90}=10-30$  мкг/мл) были изучены несколько жидких лекарственных форм. Одной из изученных жидких противовирусных лекарственных форм является КС (чистое комбинаторное производное). Вторая изученная жидкая противовирусная лекарственная форма это КС, которая представляет собой смесь КС с ванилином (ван) и холекальциферолом (С). Таким образом, в форме обозначений:  $КС=(КС+ван+С)$ . Третьей исследованной жидкой противовирусной лекарственной формой является КСО, которая представляет собой смесь КС с ванилином (ван) и кобамамидом (СО). Таким образом, в форме обозначений:  $КСО=(КС+ван+СО)$ .

Для проверки биологической (противовирусной) активности синтезированных производных КС противовирусную активность производных исследовали методом скрининга на моделях вируса гриппа H1N1 (Inf), эталонного штамма вируса везикулярного стоматита (Vesic. -VVS) и вируса простого герпеса 1 типа (Herp. - штамм L-2), коронавируса - вируса инфекционного бронхита птиц (ИБП) в матрасах на культуре фибробластов курицы по степени деградации (цитопатический эффект, отслоение со дна матраса). Степень "шелушения" клеток определяли путем окрашивания культуры витальным красителем, концентрацию которого определяли спектрофотометрически относительно здорового монослоя и пустой лунки. Результаты исследований *in vitro* показаны в табл. 1 ниже.

Таблица 1

Противовирусная активность супрамолекулярных комбинаторных производных цианокобаламина KS и его лекарственных форм

| Композиция                                                          | %, цитопротективное антивирусное действие ** |               |              |              |
|---------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|---------------|--------------|--------------|
|                                                                     | Inf                                          | Herp          | Vesic        | IBP          |
| KS                                                                  | 75                                           | 80            | 74           | 82           |
|                                                                     | 70                                           | 58            | 94           | 80           |
|                                                                     | 79                                           | 66            | 90           | 73           |
|                                                                     | 89                                           | 89            | 96           | 77           |
|                                                                     | 100                                          | 93            | 100          | 79           |
| <b>n±N, %</b>                                                       | <b>83±12</b>                                 | <b>77±15</b>  | <b>91±10</b> | <b>78±3</b>  |
| KS+van                                                              | 94                                           | 100           | 94           | 80           |
|                                                                     | 93                                           | 95            | 93           | 89           |
|                                                                     | 98                                           | 90            | 98           | 90           |
|                                                                     | 100                                          | 100           | 100          | 100          |
|                                                                     | 100                                          | 100           | 83           | 100          |
| <b>n±N, %</b>                                                       | <b>97*±3</b>                                 | <b>97*±4</b>  | <b>94*±7</b> | <b>92*±8</b> |
| KS+van+CO                                                           | 90                                           | 88            | 94           | 100          |
|                                                                     | 100                                          | 70            | 100          | 100          |
|                                                                     | 100                                          | 100           | 94           | 100          |
|                                                                     | 93                                           | 100           | 95           | 92           |
|                                                                     | 80                                           | 100           | 100          | 88           |
| <b>n±N, %</b>                                                       | <b>93*±8</b>                                 | <b>92*±13</b> | <b>97*±3</b> | <b>96*±6</b> |
| Негативный контроль чистой культуры (без вируса)                    | 100                                          | 100           | 100          | 100          |
| Позитивный контроль инфицированной культуры (с вирусом без лечения) | 0                                            | 10            | 5            | 0            |

\* группы (KS + van) и (KS + van + CO) статистически значительно более эффективны, чем чистый KS;

\*\* для средней эффективной дозы 10 µg/ml

Как видно из табл. 1, все варианты лекарственных форм на основе KS обладают противовирусным эффектом, который может защитить 50% или более клеток инфицированной культуры. Лекарственные формы с ванилином и другими производными кобаламина статистически значимо ( $P < 0,05$ ) превышают эффективность чистого вещества KS.

Для определения предельно переносимой концентрации (МПК) в токсикологических экспериментах и изучения противовирусной активности препарата KS и его лекарственных форм для инъекций использовали следующие типы трансплантируемых клеток человеческого и животного происхождения: ПТ, Тр, Нер-2, HELA, и куриный эмбрион. ПТ означает трансплантируемые клетки почек эмбриона крупного рогатого скота. Тр означает клетки трахеи эмбриона крупного рогатого скота. Нер-2 означает трансплантируемые клетки рака гортани человека. HeLa означает перевиваемые раковые клетки матки человека.

Клетки выращивали в среде 199 с добавлением 10% бычьей сыворотки и антибиотиков (пенициллин и стрептомицин). В качестве тест-вирусов использовали вирусы гриппа (H1N1), везикулярного стоматита (штамм Indiana), коронавирус (X 343/44) и вирус простого герпеса типа 1 (штамм L-2), коронавирус инфекционного бронхита птиц (штамм IEK-KL2).

Исследование токсичности. Определение МТС для лекарственных форм KS и субстанции KS на клеточных культурах и куриных эмбрионах.

Двухдневные культуры клеток с хорошо сформированным монослоем клеток использовали для определения МТС. KS и его лекарственные формы были протестированы на четырех перечисленных выше типах клеток (n=5 экспериментов). В каждом эксперименте использовалось не менее 10 пробирок каждой культуры. После удаления ростовой среды из пробирок добавляли 0,2 мл исследуемого раствора и 0,8 мл поддерживающей питательной среды. Пробирки с клетками инкубировали при 37°C в течение 7-8 дней. Контрольными экспериментами служили пробирки с культурами клеток без добавления лекарств.

Частью результатов эксперимента было определить наличие или отсутствие цитопатического эффекта. Наличие или отсутствие цитопатического эффекта (ЦПЭ) определяли, рассматривая клетки под микроскопом при 10-кратном увеличении. Степень цитотоксического действия оценивали с помощью системы "четыре плюс" (+, ++, +++, +++) для оценки изменения морфологии клеток: (1) округление и сморщивание клеток и (2) отторжение дегенерированных клеток от стекла.

Максимально переносимая концентрация (МТС) определялась путем определения максимального количества вещества, которое не оказывало цитопатического действия на клетки. Для этого определения к культуре клеток добавляли различные разведения лекарства в дозе 0,2 мл.

Для изучения токсичности препарата *in vivo* при различных дозах препарата использовали дозу препарата в объеме 0,2 мл на 10-11-дневных куриных эмбрионах (5 эмбрионов на разведение МР). Дозу препарата вводили в аллантоисную полость куриного эмбриона следующим образом. Эмбрионы в возрасте 10-11 дней подвергались овоскопии и помечались карандашом на воздушной подушке на стороне, противоположной месту расположения эмбриона, где меньше кровеносных сосудов. Помеченное карандашом место было продезинфицировано спиртовым раствором йода, затем оболочка протыкалась, а затем 0,2 мл дозы препарата вводилось в отверстие с помощью туберкулинового шприца в полость аллантоиса с помощью иглы шприца на глубину 10°. 15 мм параллельно продольной оси яйца. После инъекции лунку снова продезинфицировали спиртовым раствором йода и заделали парафиновым воском. Затем яйцо было помещено для инкубации с использованием термостата, установленного на температуру 35-37°C, на 72 часа. Перед вскрытием яиц их помещали на 18-20 ч в холодильник при температуре 24°C, чтобы максимально сузить кровеносные сосуды эмбриона. После этого яйца помещали на поднос тупым концом вверх. Затем оболочку над воздушной подушкой продезинфицировали спиртовым раствором йода и 96% этанолом. Яйцо было разбито, и эмбрион был удален стерильным пинцетом. Мембрана, выстилающая дно воздушного мешка, также была удалена, предварительно отделив ее от подлежащей хорионо-аллантоисной мембраны. Количество живых и нормально развивающихся эмбрионов после 24 и 48 ч инкубации в термостате при 37°C подсчитывали для расчета LD<sub>50</sub> и МТД в соответствии с методом Кербера.

В результате этих экспериментальных исследований было обнаружено, что KS и его лекарственные формы не токсичны для культур клеток при дозе KS более 50 мг/мл. Для увеличения концентрации лекарственного средства раствор лекарственного средства лиофилизировали, а затем разбавляли до концентрации 5%.

Результаты исследования токсичности KS в различных культурах представлены в табл. 2 ниже.

Таблица 2

Токсичность KS и его лекарственных форм на культурах клеток

| № п/п                | Культура клеток | Токсичность (mg / ml) |
|----------------------|-----------------|-----------------------|
| <b>KS субстанция</b> |                 |                       |
| 1                    | PT              | More than 50          |
| 2                    | Tr              | -/-                   |
| 3                    | Hep -2          | -/-                   |
| 4                    | Hela            | -/-                   |
| <b>KS+van</b>        |                 |                       |
| 5                    | PT              | More than 50          |
| 6                    | Tr              | -/-                   |
| 7                    | Hep -2          | -/-                   |
| 8                    | Hela            | -/-                   |
| <b>KS+van+CO</b>     |                 |                       |
| 9                    | PT              | More than 50          |
| 10                   | Tr              | -/-                   |
| 11                   | Hep -2          | -/-                   |
| 12                   | Hela            | -/-                   |

МТС для культур клеток, обработанных как чистым KS, так и его лекарственными формами, составляет более 50 мг/мл, что свидетельствует о низкой токсичности предлагаемого средства. Для дальнейших исследований мы выбрали наиболее эффективный образец лекарственной формы KS+ван+CO, затем KCO.

Исследование противовирусного действия лекарственного средства KSO на вирус гриппа А (H1N1)

Для дальнейших исследований был выбран предпочтительный вариант осуществления настоящего изобретения. Это KSO, который представляет собой жидкую противовирусную формулу (KS+ван+CO). Водные растворы KSO в различных дозах (десятикратные разведения) вводили 15 куриным эмбрионам в аллантоисную полость в объеме 0,2 мл через 12 ч после введения вируса в рабочей дозе (100 TCD<sub>50</sub>/0,2 мл). Каждый эксперимент сопровождался контролем тестового вируса в рабочей дозе. Инфицированные и неинфицированные (контрольные) эмбрионы инкубировали при 36°C в течение 48 ч. Затем эмбрионы вскрывали, из которых аспирировали аллантоисную жидкость. Титрование вируса в аллантоисной жидкости проводили по общепринятой методике с 1% эритроцитов 0 (1) группы крови человека. Определяли коэффициент защиты (ПК).

Титр вируса в экспериментальной и контрольной группах куриных эмбрионов представлен в

табл. 3 ниже.

Таблица 3

Эффективная концентрация KSO в модели инфекции гриппа in Ovo

| Группа                                         | Концентрация препарата (mg / ml) | Титр вирусов (lg TCA <sub>50</sub> /мл) |         | Минимальная эффективная концентрация (IEC mg / ml) |
|------------------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------------|---------|----------------------------------------------------|
|                                                |                                  | experiment                              | control |                                                    |
| Контроль (вводили 0,9% раствор натрия хлорида) | -                                | 12                                      | 12      | -                                                  |
| Эксперимент                                    | 50±5                             | 0                                       | 12      | 0,005                                              |
|                                                | 5±1                              | 0                                       | 12      |                                                    |
|                                                | 0,5±0,05                         | 1                                       | 12      |                                                    |
|                                                | 0,05±0,005                       | 2                                       | 12      |                                                    |
|                                                | 0,005±0,0005                     | 5                                       | 12      |                                                    |
|                                                | 0,0005±0,00005                   | 10                                      | 12      |                                                    |

Как видно из табл. 3, минимальная эффективная концентрация (ТЕС) по отношению к вирусу гриппа, который подавляет синтез вируса в 50% клеток, равна 0,005 мг/мл при увеличении разведения. При применении препарата эффективность КСО снижается и носит дозозависимый характер. Этот факт указывает на наличие прямого противовирусного действия у КСО по отношению к вирусу гриппа H1N1. Термин lg для настоящего изобретения означает десятичный логарифм или десятичный логарифм в противоположность натуральному логарифму.

Изучение противовирусного действия препарата КСО на цитопатические вирусы (вирус везикулярного стоматита, коронавирус, вирус кори).

Противовирусную активность против цитопатических вирусов: вируса везикулярного стоматита, коронавируса и вируса кори определяли в культуре указанных выше клеток. Реакцию проводили следующим образом: 0,2 мл соответствующего вируса в рабочей дозе (100 TCA<sub>50</sub>/0,2 мл) добавляли в объеме 0,2 мл в 2-дневную отмытую культуру клеток. Затем добавляли 0,8 мл поддерживающей среды. Когда в культуре проявился ЦПЭ (цитопатический эффект), вводили КСО в различных дозах. В качестве контроля то же самое было сделано с тест-вирусами без препарата. Клетки инкубировали при 37°C в инкубаторе. Данные эксперимента и наблюдения проводились на 3, 5 и 7 дни эксперимента. Снижение титра вируса под действием исследуемого препарата на 2 мкг и более по сравнению с контролем оценивали как проявление противовирусной активности.

Результаты исследования противовирусной активности препарата КСО представлены в табл. 4.

Таблица 4

Изучение противовирусного действия КСО в отношении вирусов:  
везикулярного стоматита, коронавируса, вируса кори)

| Композиция | Вирус | МЭК, мг/мл | Максимальное разведение титра вируса, lg TCA <sub>50</sub> /мл |
|------------|-------|------------|----------------------------------------------------------------|
| КСО        | VVS   | 0,05       | 4,9                                                            |
|            | CV    | 0,05       | 3,0                                                            |
|            | MV    | 0,05       | 4,7                                                            |

Как видно из табл. 4, КСО обладает противовирусной активностью и способностью подавлять размножение всех изученных нами вирусов в концентрации 0,05 мг/мл (ED<sub>90</sub>) с ПДК=50 мкг/мл. СТИ препарата составляет 1000. Кроме того, КСО был активен в отношении всех изученных вирусов. Таким образом, препарат КСО не связан со специфическими характеристиками вируса или культуры клеток, а влияет на механизмы, общие для всех клеток.

Изучение противовирусного действия КСО на моделях вирусов  
сельскохозяйственных животных in vitro

Тесты проводили в 96-луночных пластиковых планшетах со штаммом D-52 вируса трансмиссивного гастроэнтерита свиней (TGS) с начальным титром 10<sup>4</sup> TCD<sub>50</sub>/мл (тканевые цитопатические дозы) в трансплантированной культуре тестовых клеток поросят (РТР) и штаммом большого вируса диареи крупного рогатого скота "Орегон" с исходным титром 10<sup>7</sup> TCD<sub>50</sub>/мл в трансплантированной культуре клеток почки сайгака (PS).

При тестировании вирусостатического (ингибирующего) действия, культуры клеток инфицировали вирусами в дозах 100 и 10 TCD<sub>50</sub>/мл и инкубировали в инкубаторе при 37°C. КСО в различных дозах

вводили в культуры клеток (КК) через 1-1,5 ч после заражения (после периода адсорбции). На каждое разведение ушло 8 лунок. После приготовления соединения культуры клеток инкубировали при 37°C в течение 72-144 ч до явного проявления СРЕ (цитопатогенного эффекта) в контроле вирусов. В качестве контроля служили инфицированные вирусом культуры клеток, интактные КК и КК, в которые вводили только разные концентрации КСО. Вирусостатический эффект определяли по разнице титров вирусов в опыте и контроле.

При определении вирулицидного (инактивирующего) эффекта разные дозы раствора соединения смешивали в равных объемах с вирусосодержащим материалом и инкубировали в термостате при 37°C в течение 24 ч. Вирусосодержащий материал использовали в качестве контроля, к которому вместо раствора соединения добавляли плацебо (физиологический раствор) и культуры интактных клеток. Смеси после контакта титровали параллельно с контролем. Результаты определяли через 72-144 ч после инкубации при 37°C, после явного проявления ЦПЭ в вирусных контролях. Вирицидный эффект определяли по разнице титров вирусов в опыте и контроле и выражали в lg TCD<sub>50</sub>.

В результате этих исследований было обнаружено, что соединение КСО в концентрации 40 мкг/мл подавляло размножение вируса TGS на 2,75 lg TCD<sub>50</sub>/мл при инфекционной дозе 100 TCD<sub>50</sub>/мл и в той же дозе, на 3,75 lg TCD<sub>50</sub>/мл, инфекционная доза 10 TCD<sub>50</sub>/мл. В дозе 40 мкг/мл КСО инактивировал вирус TGS при концентрации 2,0 lg TCD<sub>50</sub>/мл. Композиция КСО в дозе 40 мкг/мл инактивировала вирус диареи крупного рогатого скота при 4,9 lg TCD<sub>50</sub>/мл.

Таким образом, соединение КСО оказывает вирусостатическое (ингибирующее) и вирулицидное (инактивирующее) действие на TGS-вирусы и диарею крупного рогатого скота, и на его основе могут быть созданы химиопрепараты для лечения и профилактики инфекционных заболеваний вирусной этиологии.

Исследование противовирусной активности КСО на кроликах с

экспериментальным герпесвирусным керато-конъюнктивитом/энцефалитом

Экспериментальные герпетические инфекции важны для изучения, поскольку герпетические заболевания широко распространены и чрезвычайно разнообразны по своим клиническим проявлениям. Модели экспериментального герпеса на животных находят все более широкое применение при изучении новых противовирусных веществ. Одна из клинических форм системного герпеса, а именно герпетический энцефалит, легко вызывается у морских свинок, хомячков, крыс, мышей, кроликов, собак и обезьян.

Герпетический кератоконъюнктивит у кроликов (средний вес 3,5 кг) вызывали нанесением инфекционного материала (штамм L-2 вируса простого герпеса типа 1) на скарифицированную роговицу после того, как глаз анестезировали инстилляциями дикаина и роговицу несколько раз. Затем веко закрывали и растирали круговыми движениями. Доза вируса составляла 0,05 мл, доза 6,75 lg TCD<sub>50</sub>/мл. В этой серии экспериментов было использовано 16 кроликов. Десяти кроликам вводили КСО (ежедневно со второго дня заражения до 14 дней) в дозе 20 мг/кг, шести кроликам вводили плацебо 0,9% раствор хлорида натрия.

После инфицирования роговицы кролика HSV1 ежедневно контролировали наличие кератоконъюнктивита, энцефалических заболеваний и антигенов HSV1 в лимфоцитах периферической крови методом RIF. До заражения лимфоциты у всех животных не имели специфической люминесценции, что указывало на отсутствие антигенов вируса герпеса 1 типа в периферической крови. На 3-й день после заражения у всех животных в крови определяли антиген HSV1, IF=70%. У трех кроликов (у двух из опытной группы до лечения и у одного из контрольной) развились энцефальные проявления - судорожный синдром и отсутствие аппетита. У всех животных развился керато-конъюнктивит. На 4-е сутки после заражения экспериментальной группе кроликов вводили КСО в ушную вену в дозе 20 мг/кг массы тела, в ушную вену контрольной группы вводили 0,9% раствор натрия хлорида. Ежедневно в течение двух недель эту процедуру повторяли один раз в день. Все животные экспериментальной группы выжили, антиген HSV1 в крови не обнаруживался на 13-14-е сутки, а энцефальные проявления закончились на 7-е сутки введения препарата, а 2 животных контрольной группы погибли. На 14-й день одно животное экспериментальной группы умерло, тогда как 6 животных умерли в контрольной группе, не получавшей КСО. Индекс эффективности КСО составил 83,3% в модели герпетического кератоконъюнктивита/энцефалита на кроликах, а экспериментальная группа кроликов прибавила в весе. Химиотерапевтический индекс составил 1000. КСО - эффективный противовирусный препарат с широким спектром действия и малой токсичностью.

Антивирусное действие препарата КСО на цыплят-бройлеров кросса Cobb-500

Действие лекарственного средства КСО на размножение штаммов вакцинного вируса измеряли на основании эффекта КСО по снижению титра соответствующих специфических антител. Многие противовирусные препараты подавляют размножение живых вакцинных штаммов вирусов, подавляя при этом синтез специфических противовирусных антител. Этот эффект связан с недостаточной интенсификацией инфекционного процесса вакциной и слабым иммунным ответом. Например, птицы с инфекционной бурсальной болезнью, подвергшиеся воздействию живой вакцины, могут вырабатывать избыточные антитела, поэтому птица становится чрезмерно чувствительной к другим вирусам, теряет вес и увеличивается смертность. Использование препарата КСО должно было показать наличие противовирусных свойств по нескольким направлениям: снижение избыточного уровня (титров) антител, снижение забо-

леваемости (безопасности), увеличение набора веса.

В эксперименте цыплят-бройлеров отбирали на 36 и 41 дни по 15 животных в группе.

KSO выпили за день до вакцинации живыми вакцинами против IBD, болезни Гамборо (HD) и коронавирусного инфекционного бронхита (IB). В контроле находились птицы цыплят-бройлеров, которых не кормили KSO, но были вакцинированы. В табл. 5 и 6 приведены результаты этих исследований.

Таблица 5

Прирост бройлеров (на момент убоя) в опытной и контрольной группах

| Индикатор                 | Привес **, +% | Сохранность **, +% |
|---------------------------|---------------|--------------------|
| Опытная группа (n=15)     | 7,6±0,7*      | 1,0±0,1*           |
| Контрольная группа (n=15) | -1,8±0,6*     | -4,6±0,4*          |

\* - против невакцинированного контроля, который был взят за основу

\*\* - (P<0,01)

Как видно из табл. 5, в экспериментальной группе прибавка веса животных увеличивалась на (7,6±0,7)% по сравнению со снижением веса в контрольной группе, вакцинированной, но не леченной (-1,8±0,6)%. Также в опытной группе наблюдалось повышение безопасности на (1,0±0,1)%. В табл. 6 показаны изменения титров специфических противовирусных антител в группе, получавшей вакцинацию KSO, в группе, не прошедшей вакцинацию, и в группе, не подвергавшейся вакцинации.

Таблица 6

Изменение титра антител против IBD, BG и IB в вакцинированных группах и невакцинированном контроле

|                                                                    | Среднее изменение титра специфических антител, ±T |            |           |
|--------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|------------|-----------|
|                                                                    | IBB                                               | BG         | IB        |
| Опытная группа (вакцинированная и пролеченная KSO) (n=15)          | -2000±200                                         | -700±100   | -1000±300 |
| Контрольная группа №1 (вакцинирована, но не лечилась KSO) (n = 15) | +3000±780                                         | +3600±1000 | +3000±820 |
| Контрольная группа (без лечения и без прививки)                    | 0                                                 |            |           |

Как видно из табл. 6, KSO оказывает прямое (не иммуностимулирующее) действие против всех трех вирусов. Наибольший ингибирующий эффект наблюдался в группе с инфекционным бронхитом - снижение титра антител на 2000 единиц. В вакцинированном, но необработанном контроле титры антител увеличились с 3000 единиц до 3600 единиц, что указывает на эффективный процесс воспроизводства вируса живой вакцины в птице. Таким образом, использование KSO позволяет увеличить прирост цыплят-бройлеров на 5% и снизить смертность на 1%. KSO оказывает прямое противовирусное действие, подавляя размножение вирусов инфекционной бурсальной болезни, болезни Гамборо и коронавирусного инфекционного бронхита.

KSO обеспечивает умеренное подавление репликации вакцинных вирусов, обеспечивая достаточный уровень защитных антител и предотвращая истощение иммунитета птиц и соответствующее снижение прибавки в весе и повышение смертности.

Влияние KSO на эффективность вакцинации цыплят-бройлеров живыми вакцинами

Влияние KSO на эффективность вакцинации проводили непосредственно на птицефабрике при выращивании цыплят-бройлеров. При патологоанатомическом исследовании цыплят-бройлеров (также называемых просто бройлерами) наблюдались характерные изменения для колибактериоза, кокцидиоза, а также многочисленные кровоизлияния на слизистых оболочках прямой кишки, в зоне перехода железистого желудка в мышечные, базальные железы. Содержимое железистого желудка окрашено в зеленый цвет. Гибель бройлеров достигала 15-20%. При исследовании сыворотки крови бройлеров в возрасте 38-42 дней специфические титры антител к вирусу болезни Ньюкасла (NCV) оказались выше защитных в реакции задержки гемагглютинации (HADP)(1:1024, 1:2048).

Исследование влияния KSO в дозе 0,03 мл/кг живого веса на эффективность вакцинации против BHK. Для этого один из курятников взят на контроль, остальные - опытные (см. табл. 7).

Таблица 7

Результаты исследования влияния KSO на эффективность вакцинации домашней птицы

| Номер группы | Номер курятника | Количество птиц (тыс.) | График применения                                                       |
|--------------|-----------------|------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| Контроль     | 3               | 40,0                   | KSO не давали                                                           |
| Опыт 1       | 12              | 40,0                   | С 7-дневного возраста за 3 дня до вакцинации живыми вирусными вакцинами |
| Опыт 2       | 6               | 40,0                   | За 1 день до вакцинации против BNK                                      |
| Опыт 3       | 9               | 40,0                   | В течение 3 дней до вакцинации и 7-10 дней после вакцинации против BNK  |

Условия осмотра, параметры микроклимата, условия освещения, густота посадки, условия кормления были одинаковыми во всех группах в соответствии с инструкциями по выращиванию кросса РОС 308.

Иммунитет определяли в возрасте 42 дней в HADR. При этом учитывались клиническое состояние птицы, процент консервации, роста и затрат на корм.

Результаты тестов для определения эффективности KSO при вакцинации бройлеров против BNK показаны в табл. 8.

Таблица 8

Влияние KSO на эффективность вакцинации против болезни Ньюкасла

| Показатели                 | Контроль | Опыт 1 | Опыт 2 | Опыт 3  |
|----------------------------|----------|--------|--------|---------|
| Средний титр в РГА         | 25±3     | 45±13  | 95±32  | 180±46* |
| Напряженность иммунитета % | 75       | 88,6   | 100    | 100     |

Note: \*P<0,05

Средние титры специфических антител к BNV как в контрольной, так и в экспериментальной группах были защитными. Однако при исследовании сыворотки бройлеров в возрасте 42 дней с применением KSO установлено достоверное увеличение среднего титра в опытной группе 3 по сравнению с контролем в 6 раз (<0,01). В опытных группах (1, 2) достоверной разницы в титрах антител по сравнению с контролем не обнаружено, однако они были на защитном уровне и выявлена тенденция к увеличению этого показателя в 1,8 и 4,3 раза. Групповой иммунитет в контроле составил 75%, в опытных группах (3,4) 100%, в 1-й опытной группе 88,6%. Гибель бройлеров была в контроле - 9,8%, в то время как процент гибели снизился в опытных группах: 2,9; в 4,5 и 4,4 раза соответственно по сравнению с контролем. Среднесуточные прибавки в весе в экспериментальных группах составляли от 50 до 55 г, тогда как в контрольных группах средний прирост веса составлял 46 г.

Таким образом, можно сделать вывод, что оптимальной схемой применения KSO для бройлеров в регионах со сложной эпизоотической ситуацией с БНК является применение препарата в дозе 0,03 мл/кг живого веса за 3 дня до вакцинации и за 7 дней до вакцинации. 10 дней после вакцинации против БНК. Применение препарата по приведенной схеме приводит к шестикратному увеличению среднего титра специфических антител к вирусу BNK и снижению смертности цыплят-бройлеров в 4 раза.

Пример 3 касается получения супрамолекулярной комбинаторной смеси производных дипиридамола (CD), как связывающего и терминирующего компонента.

Процедура примера 3 включает первое разбавление 222 мкМ дипиридамола (I) (CAS N 58-32-2, M<sub>r</sub>=504,636 г/моль, n=4) в 50 мл диоксана в смеси с 50 мл ледяной уксусной кислоты и добавление 60 мкМ янтарного ангидрида (III) и 61 мкМ уксусного ангидрида (II). Затем раствор перемешивают и нагревают с помощью обратного холодильника от 5 до 50 минут. Затем раствор разливают во флаконы и лиофилизируют для удаления растворителей и уксусной кислоты с получением комбинаторной смеси (IV), которая представляет собой CD. Комбинаторная смесь (IV) используется для изготовления фармацевтических композиций, изучения структур и определения биоактивности CD.

На фиг. 8 представлена схема примера 3 комбинаторного синтеза производных дипиридамола (CD). Вместо модификаторов ангидрида карбоновой кислоты необязательно могут быть использованы галогениды карбоновых и поликарбоновых кислот, такие как янтарная, малеиновая, фумаровая, молочная, пропионовая, другие галогенпроизводные, такие как хлорметан, бромэтан, хлорпропан, циклические алкилирующие соединения, такие как оксиран или пропиолактон. для получения комбинаторных производных дипиридамола.

На фиг. 8 представлена одна исходная молекула дипиридамола (I), которая содержит 4 свободные гидроксильные группы, доступные для модификации (n=4) для создания комбинаторной смеси. Аминогруппы как часть остаточного морфолина и пиримидинового ядра могут быть протонированы и защищены от модификации в данных условиях реакции. Расчет количества молей модификатора проводится по формулам комбинаторики:  $m = 4 \times (3 \times 2^{n-2} - 1)$ ;  $k = n \times (2^n - 1)$ , где m - количество различ-

ных производных молекул в комбинаторной смеси и количество молей дипиридамола для реакции;  $n$  - количество гидроксильных групп, доступных для модификации в структуре дипиридамола ( $n=4$ );  $k$  - количество молей каждого модификатора. Таким образом, имея только одну исходную молекулу дипиридамола и два модификатора после комбинаторного синтеза, мы теоретически получим 12 комбинаторных производных с разной степенью замещения, разными положениями заместителей и разной перетасовкой остатков модификатора. Это не простая смесь, а сложная супрамолекулярная структура. Из-за присутствия как замещенных, так и незамещенных гидроксильных групп в различных производных будут образовываться супрамолекулярные структуры как за счет водородных, так и ионных связей, включая третичные аминогруппы гетероциклов.

Опционно в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модификаторы, такие как янтарный ангидрид или уксусный ангидрид, могут быть использованы и введены одновременно и последовательно, или, янтарный ангидрид может быть сначала введен и нагрет в смеси с использованием обратного холодильника, а затем можно ввести уксусный ангидрид и повторно нагреть смесь. Аналогичным образом, с помощью этого подхода к синтезу, вместо использования янтарного ангидрида в качестве модификатора, другие варианты осуществления настоящего изобретения рассматриваются с помощью альтернативных синтетических подходов, в которых используются родственные химические модификаторы, включая, например, ангидриды, такие как малеиновый ангидрид, аконитовый ангидрид, глутаровая кислота или фталевая кислота, ангидрид; кислоты, такие как, например, уксусный ангидрид, этилмуравьиная кислота или монохлоруксусная кислота; и различные алкилирующие агенты, включая, например, пропиолактон, оксид этилена, метилхлорид, этилхлорид или пропилхлорид.

ЯМР  $C^{13}$  (углерод-13-ядерный магнитный резонанс) проводили на комбинаторных производных дипиридамола (CD). Результаты C: 96,1; 161,8; 170,0; 157,8;  $CH_2$ : 58,9; 61,7; 58,1; 61,4; 29,2; 29,1; CO: 173,1; 174,7; 170,2; и  $CH_2$  (в морфолиновом цикле) 52,7; 25,4; 25,5. Данные ЯМР  $C^{13}$  комбинаторного производного подтверждают наличие как этильных групп остатков янтарной кислоты в его структуре ЦД, так и ацетильных остатков как продуктов реакции с модификатором уксусным ангидридом.

ВЭЖХ проводили на колонке для ВЭЖХ (микроколоночный хроматограф Milichrom A-02 с градиентом ацетонитрил (5-100%)/0,1 М перхлорной кислоты и 0,5 М перхлората лития). CD на хроматограмме ВЭЖХ демонстрирует один четкий уширенный пик и не разделяется на компоненты, хотя время удерживания отличается как от исходного дипиридамола, так и от его полностью замещенных производных. Сложные супрамолекулярные структуры, образованные между 12 различными комбинаторными производными CD, не были разделены хроматографически с помощью этого колоночного метода ВЭЖХ. Точно так же это комбинаторное производное дипиридамола (CD) не было разделено с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ), в которой в качестве подвижной фазы использовался ацетонитрил: вода, и использовалось УФ-детектирование. CD-ТСХ показала только одну полосу, которая не совпадала ни с одним из полученных производных.

На фиг. 9 изображена TLC комбинаторной смеси (IV), которая менее подвижна, чем исходный немодифицированный дипиридамол (I) и является самой легкой полосой на ТСХ. Полосы полностью ацилированного дипиридамола (Ib) и сукцинированного дипиридамола (Ic) на ТСХ появляются между полосами ТСХ природного дипиридамола и комбинаторного дипиридамола. Кроме того, комбинаторная полоса дипиридамола не была разделена на ее сложные супрамолекулярные структуры с помощью двумерной ТСХ или с помощью ВЭЖХ (данные не показаны).

Было проведено исследование для тестирования ингибирования цАМФ-фосфодиэстеразы различными супрамолекулярными комбинаторными производными дипиридамола. Различные супрамолекулярные комбинаторные производные дипиридамола были получены в реакциях синтеза с использованием различных молярных соотношений модификаторов. Использовали твердофазный сэндвич-ELISA с циклическим АМР (иммуноферментный анализ). Реакцию останавливали добавлением двойного объема 1% ТСА.

Таблица 9

Ингибирующее действие в отношении цАМФ-фосфодиэстеразы (PDE) супрамолекулярных комбинаторных производных дипиридамола, полученных в реакции с различным молярным соотношением модификаторов

| No. | Молекулярное соотношение реагентов * |       |       | ED <sub>50</sub> относительно цАМФ, мкг/мл, погрешность измерения 10% |
|-----|--------------------------------------|-------|-------|-----------------------------------------------------------------------|
|     | m                                    | k1    | k2    |                                                                       |
| 1   | 44                                   | 88*** | 88*** | >500                                                                  |
| 2   | -//-                                 | 70    | 70    | 100                                                                   |
| 3   | -//-                                 | 61    | 60    | 0.01                                                                  |
| 4   | -//-                                 | 30    | 30    | 5                                                                     |

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

\* m- число молей дипиридамола в реакции комбинаторного синтеза; k1 - количество молей янтарного ангидрида в реакции; k2 - количество молей уксусного ангидрида в реакции;

\*\* ED<sub>50</sub> мкг/мл ингибирование PDE определяли путем разбавления начальной концентрации производного дипиридамола;

\*\*\* максимальное молярное соотношение, при котором все группы в дипиридамоле замещаются, превышение этого соотношения приводит к тому, что в реакции в среде остаются непрореагировавшие модификаторы - янтарный ангидрид и уксусный ангидрид

В приведенной выше табл. 9 представлены экспериментальные данные, которые, взятые в целом, выявляют неожиданную эффективность ингибирования фермента для некоторых вариантов осуществления настоящего изобретения. Из табл. 9, пункт № 3 видно, что ED<sub>50</sub> для ингибирования цАМФ-фосфодиэстеразы супрамолекулярными комбинаторными производными дипиридамола является самым низким (0,01 мкг/мл ED<sub>50</sub>), когда молярное соотношение трех модификаторов реагентов (m, k1 и k2) составляет 44:61:60. Обратите внимание, что при m, равном 44, довольно небольшое снижение количества молярных соотношений k1 и k2 с 70,70 до 60,61 вызывает удивительное 10 000-кратное улучшение ингибирования цАМФ-фосфодиэстеразы. То, что можно было бы ожидать в соответствии с положениями предшествующего уровня техники, касающимися синтетической органической химии, одним из высококвалифицированных специалистов в данной области техники, привело бы к очень незначительному изменению количеств модификации дериватизации супрамолекулярных комбинаторных производных дипиридамола. Кроме того, также удивительно и неожиданно, что в отношении молярного количества реагента m дальнейшее снижение соотношений реагентов k1 и k2 с 60,61 до 30,30 привело бы к 500-кратной потере активности супрамолекулярного комбинаторного производного дипиридамола с точки зрения их способности ингибировать фосфодиэстеразу цАМФ. Это открытие ясно демонстрирует исключительную чувствительность и неожиданную полезность способов синтеза настоящего изобретения для получения супрамолекулярных комбинаторных производных дипиридамола, а также неочевидность соединений, содержащих супрамолекулярные комбинаторные производные дипиридамола. Кроме того, следует отметить, что табл. 9, позиции 1 и 10 указывает на то, что ингибиторы цАМФ фосфодиэстеразы с наиболее низкой эффективностью представляют собой супрамолекулярные комбинаторные производные дипиридамола, которые были либо максимально, либо минимально модифицированы k1 и k2. реагенты в присутствии фиксированного количества реагента m. Таким образом, было обнаружено, что комбинаторные композиции синтетических химических продуктов и подробности их синтеза, представленные в табл. 9 как позиции с 1 по 9, имеют неожиданные вариации в полезности в качестве ингибитора цАМФ фосфодиэстеразы.

В следующей табл. 10 показаны составы исследуемых фармацевтических композиций (FC, CD).

Таблица 10

Состав и соотношение ингредиентов фармацевтической композиции (FC CD)  
на капсулу или пилюлю

| No. | Название ингредиента | %        |
|-----|----------------------|----------|
| 1   | 2                    | 3        |
| 1.  | CD                   | 0.1-20.0 |
| 2.  | Папаверин            | 0.5-10.0 |
| 3.  | Аскорбиновая кислота | 0.2-10.0 |
| 4.  | Бендазол             | 0.5-10.0 |
| 5.  | Тадалафил            | 1-5.0    |
| 6.  | Натрия вальпроат     | 5-20.0   |
| 7.  | Наполнители          | до 100%  |

В качестве контроля животным применяли ту же композицию с теми же веществами (в виде геля Carborol), но без CD (FC).

Пример 3 касается комбинаторных основных аминокислот и основного олигопептида в качестве связывающего компонента. Комбинаторная смесь олигопептидов **KKRKRKRKR** в дальнейшем обозначается аббревиатурой KR. Предварительно олигопептид **KKRKRKRKR** получают с использованием стандартной методики получения пептида на синтезаторе пептидов или методом генной инженерии. Процедура следующая: 1 ммоль олигопептида **KKRKRKRKR** растворяют в 50 мл забуференного

фосфатом физиологического раствора, затем добавляют 3 ммоль янтарного ангидрида и 3 ммоль фталевого ангидрида, и раствор перемешивают до полного растворения обоих ангидридов. Раствор разливают во флаконы, лиофилизируют и используют для анализов и исследований. Расчет молярных соотношений двух модификаторов к олигопептиду проводят по формулам:

$$(1) k = n \times (2^n - 1) \text{ и } (2) m = 4 \times (3 \times 2^{n-2} - 1).$$

N=количество доступных для замещения групп в олигопептиде (n=9). m=количество молей исходного олигопептида. Количество различных молекул его комбинаторных производных после синтеза из одного и того же исходного пептида составляет 1532 различных производных на основании этих расчетов с учетом мест замен и перестановок, k=количество молей каждого из двух модификаторов в реакции комбинаторного синтеза для получения максимального количества различных производных (k=4599). В этом примере молярное соотношение для получения максимального количества различных производных (1532 различных молекулы) составляет 3:3:1 (янтарный ангидрид: фталевый ангидрид: олигопептид KKRKRKRKR).

На фиг. 10 показано результат анализа ВЭЖХ исходного пептида KKRKRKRKR.

Исходный пептид при использовании детектора в области 280 нм дает одну полосу поглощения. Фиг. 11 показывает результат анализа ВЭЖХ комбинаторного производного пептида KKRKRKRKR.

Как видно из хроматограммы, пик пептида не просто расположен в другом месте - в области более гидрофильной области, а уширен, разделен на 3 дополнительных полосы. Данные ВЭЖХ предполагают, что среди 1532 различных производных пептида существуют ионные и водородные внутримолекулярные/ супрамолекулярные связи, которые не разрываются во время процесса разделения в условиях классической градиентной ВЭЖХ. С помощью тонкослойной хроматографии и капиллярного гелевого электрофореза также не удалось разделить супрамолекулярные производные на отдельные фрагменты.

В других вариантах осуществления изобретения для модификации пептида могут использоваться другие комбинации по меньшей мере двух различных модификаторов, где модификаторы представляют собой ангидриды карбоновых и поликарбоновых кислот, галогениды карбоновых кислот и/или галогенуглероды. Пептид, модифицированный одним индивидуальным олигопептидом или смесью олигопептидов. Пептиды можно получить стандартными методами, включая использование пептидных синтезаторов, методы генной инженерии и/или методы рекомбинантной технологии, известные в уровне техники.

Для проверки биологической (противовирусной) активности синтезированных производных с различным соотношением компонентов в реакции комбинаторного синтеза противовирусную активность производных исследовали методом скрининга на моделях вируса гриппа H1N1 (Inf), эталонный штамм вируса везикулярного стоматита (Vesic-VVS) и вируса герпеса 1 типа (Heф. - штамм L-2) в таблице на культуре куриных фибробластов в зависимости от степени деградации (цитопатический эффект, отслоение со дна лунки). Степень "деградации" клеток определяли путем окрашивания культуры витальным красителем, концентрацию которого определяли спектрофотометрически по отношению к здоровому монослою и пустой лунке. Результаты исследований *in vitro* показаны в табл. 11 ниже.

Таблица 11

Противовирусная активность супрамолекулярных комбинаторных производных олигопептида **KKRKRKRKR**, полученных в реакции с различным молярным соотношением модификаторов

| №  | Молярное соотношение реагентов * |          |          | % цитопротекторная<br>противовирусная активность ** |      |       |
|----|----------------------------------|----------|----------|-----------------------------------------------------|------|-------|
|    | m                                | k1       | k2       | Inf                                                 | Herp | Vesic |
| 1  | 1532                             | 18396*** | 1        | 0                                                   | 0    | 0     |
| 2  | 1532                             | 9198     | 4        | 0                                                   | 0    | 0     |
| 3  | -//-                             | 4599     | 9        | 0                                                   | 0    | 0     |
| 4  | -//-                             | 2299     | 18       | 0                                                   | 0    | 0     |
| 5  | -//-                             | 1149     | 36       | 0                                                   | 0    | 0     |
| 6  | -//-                             | 575      | 72       | 0                                                   | 0    | 0     |
| 7  | -//-                             | 287      | 143      | 0                                                   | 0    | 0     |
| 8  | -//-                             | 143      | 287      | 0                                                   | 0    | 0     |
| 9  | -//-                             | 72       | 575      | 0                                                   | 0    | 0     |
| 10 | -//-                             | 36       | 1149     | 0                                                   | 0    | 0     |
| 11 | -//-                             | 18       | 2299     | 0                                                   | 0    | 0     |
| 12 | -//-                             | 9        | 4599     | 0                                                   | 0    | 0     |
| 13 | -//-                             | 1        | 9198     | 0                                                   | 0    | 0     |
| 14 | -//-                             | 0        | 18396*** | 0                                                   | 0    | 0     |
| 16 | -//-                             | 9198***  | 9198***  | 0                                                   | 0    | 0     |
| 17 | -//-                             | 4599     | 4599     | 100                                                 | 100  | 100   |
| 18 | -//-                             | 2299     | 2299     | 50                                                  | 50   | 50    |
| 19 | -//-                             | 1149     | 1149     | 25                                                  | 25   | 25    |
| 20 | -//-                             | 575      | 575      | 0                                                   | 0    | 0     |
| 21 | -//-                             | 287      | 287      | 0                                                   | 0    | 0     |
| 22 | -//-                             | 143      | 143      | 0                                                   | 0    | 0     |
| 23 | -//-                             | 72       | 72       | 0                                                   | 0    | 0     |
| 24 | -//-                             | 36       | 36       | 0                                                   | 0    | 0     |
| 25 | -//-                             | 18       | 18       | 0                                                   | 0    | 0     |
| 26 | -//-                             | 9        | 9        | 0                                                   | 0    | 0     |
| 27 | -//-                             | 1        | 1        | 0                                                   | 0    | 0     |
| 28 | -//-                             | 18396*** | 0        | 0                                                   | 0    | 0     |
| 29 | -//-                             | 9198     | 0        | 0                                                   | 0    | 0     |
| 30 | -//-                             | 4599     | 0        | 0                                                   | 0    | 0     |
| 31 | -//-                             | 2299     | 0        | 0                                                   | 0    | 0     |
| 32 | -//-                             | 1149     | 0        | 0                                                   | 0    | 0     |
| 33 | -//-                             | 575      | 0        | 0                                                   | 0    | 0     |
| 34 | -//-                             | 287      | 0        | 0                                                   | 0    | 0     |
| 35 | -//-                             | 143      | 0        | 0                                                   | 0    | 0     |
| 36 | -//-                             | 72       | 0        | 0                                                   | 0    | 0     |
| 37 | -//-                             | 36       | 0        | 0                                                   | 0    | 0     |
| 38 | -//-                             | 18       | 0        | 0                                                   | 0    | 0     |
| 39 | -//-                             | 9        | 0        | 0                                                   | 0    | 0     |
| 40 | -//-                             | 1        | 0        | 0                                                   | 0    | 0     |
| 41 | -//-                             | 0        | 18396*** | 0                                                   | 0    | 0     |
| 42 | -//-                             | 0        | 9198     | 0                                                   | 0    | 0     |
| 43 | -//-                             | 0        | 4599     | 0                                                   | 0    | 0     |
| 44 | -//-                             | 0        | 2299     | 0                                                   | 0    | 0     |
| 45 | -//-                             | 0        | 1149     | 0                                                   | 0    | 0     |
| 46 | -//-                             | 0        | 575      | 0                                                   | 0    | 0     |
| 47 | -//-                             | 0        | 287      | 0                                                   | 0    | 0     |
| 48 | -//-                             | 0        | 143      | 0                                                   | 0    | 0     |
| 49 | -//-                             | 0        | 72       | 0                                                   | 0    | 0     |
| 50 | -//-                             | 0        | 36       | 0                                                   | 0    | 0     |
| 51 | -//-                             | 0        | 18       | 0                                                   | 0    | 0     |
| 52 | -//-                             | 0        | 9        | 0                                                   | 0    | 0     |
| 53 | -//-                             | 0        | 1        | 0                                                   | 0    | 0     |
| 54 | -//-                             | 0        | 0        | 0                                                   | 0    | 0     |

\* m - количество молей олигопептида **KKRKRKRKR** в реакции комбинаторного синтеза;  
K1 - количество молей янтарного ангидрида в реакции; K2 - количество молей фталевого ангидрида в реакции;

\*\*\*% оставшегося монослоя клеток после заражения вирусами и замены культуры исследуемым препаратом в культуре через 48 ч инкубации в присутствии тестируемого вещества, добавленного в заранее выбранной концентрации ( $ED_{90}=0,05$  мкг/мл.);

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

Как видно из табл. 11, доза 0,05 мкг/мл производного супрамолекулярной структуры № 17 (KR) полностью защищала клеточный монослой ( $ED_{100}$ ) от разрушающего цитопатического действия вирусов. Расчетное молярное соотношение реагентов для производного № 17: реагент m=1532, реагент k1=4599 и реагент k2=4599. Это молярное соотношение трех реагентов вызвало образование максимального количества различных производных олигопептидов (см. сноски к табл. 11)).

Синтез комбинаторной смеси олигопептида **KKRKSTRKR** (называемого KR2)

Предварительно олигопептид **KKRKSTRKR** KR2 получают с использованием стандартной методики с использованием пептидного синтезатора или генной инженерии.

1 мМ олигопептида **KKRKSTRKR** растворяют в 50 мл фосфатно-солевого буфера, добавляют 3 мМ янтарного ангидрида и 3 мМ малеинового ангидрида, и раствор перемешивают до полного растворения обоих ангидридов. Раствор разливают во флаконы, лиофилизируют и используют для анализов и исследований. Расчет молярных соотношений двух модификаторов к олигопептиду проводится по формулам: (1)  $k = n \times (2^n - 1)$  (2)  $m = 4 \times (3 \times 2^{n-2} - 1)$ , где: n=количество замещающих групп в олигопептиде (n=9); m=количество молей исходного олигопептида и количество различных молекул его комбинаторных производных после синтеза (из одного исходного пептида образуется 1532 различных производных как в местах замен, так и в перестановках); и k=количество молей каждого из двух модификаторов в реакции комбинаторного синтеза для получения максимального количества различных производных (k=4599). В этом случае молярное соотношение для получения максимального количества различных производных (1532 различных молекулы) составляет 3:3:1 (янтарный ангидрид: фталевый ангидрид: олигопептид **KKRKSTRKR**).

На фиг. 12. приведено результат анализа ВЭЖХ исходного пептида **KKRKSTRKR**.

Исходный пептид при использовании детектора в области 280 нм дает одну полосу поглощения. Фиг. 13 показывает результат анализа ВЭЖХ комбинаторного производного пептида **KKRKSTRKR**.

Как видно из хроматограммы, пик пептида не просто расположен в другом месте, а в более гидрофильной области и он довольно уширен, разделен на 4 дополнительных полосы. Это предполагает, что между 1532 различными производными пептида существуют внутримолекулярные/супрамолекулярные связи ионной и водородной природы, которые не могут быть разорваны во время разделения ВЭЖХ в условиях классической градиентной ВЭЖХ. Используя тонкослойную хроматографию и капиллярный гель-электрофорез, также не удалось разделить супрамолекулярное производное на отдельные фрагменты. Для модификации пептида можно использовать другие комбинации по меньшей мере двух различных модификаторов: ангидридов карбоновых и поликарбоновых кислот, галогенидов карбоновых кислот, галогенуглеродов. В качестве пептидов можно использовать один индивидуальный олигопептид, а также смеси олигопептидов, полученные как стандартным методом с использованием синтезаторов пептидов, так и методами генной инженерии и с использованием рекомбинантной технологии.

Для определения максимально переносимой концентрации (МПК) в токсикологических экспериментах и изучения противовирусной активности препарата KR использовали следующие типы трансплантируемых клеток человеческого и животного происхождения: PT, Tr, Ner-2, Hela и куриные эмбрионы. Отметим, что ПТ - это трансплантируемые клетки почек эмбриона крупного рогатого скота. Tr - трахеальные клетки эмбриона крупного рогатого скота. Ner-2 - трансплантируемые клетки рака гортани человека. HeLa - это перевиваемые раковые клетки матки.

Клетки выращивали в среде 199 с добавлением 10% бычьей сыворотки и антибиотиков (пенициллин и стрептомицин). В качестве тестовых вирусов использовались вирусы гриппа (H3N2), везикулярный стоматит (штамм Indiana), коронавирус (X 343/44) и вирус простого герпеса типа 1 (штамм L-2).

Противовирусный эффект препарата KR2 был изучен на вирусе гриппа А (H3 N2).

Водные растворы KR2 в различных дозах (десятикратные разведения) вводили 15 куриным эмбрионам в аллантоисную полость в объеме 0,2 мл за 12 ч после введения вируса в рабочей дозе ( $100 TCD_{50}/0,2$  мл). Каждый эксперимент сопровождался контролем тестового вируса в рабочей дозе. Инфицированные и неинфицированные (контрольные) эмбрионы инкубировали при 36°C в течение 48 ч. Затем эмбрионы вскрывали, из которых извлекали аллантоисную жидкость. Титрование вируса в аллантоисной жидкости проводили по общепринятой методике с 1% эритроцитов 0 (1) группы крови человека. Определяли коэффициент защиты (K3). Титр вируса в опытной и контрольной группах куриных эмбрионов представлен в табл. 12.

Таблица 12

Эффективная концентрация KR2 в модели инфекции гриппа in ovo

| Group                                          | Концентрация препарата (mg / ml) | Титр вируса (lg TCA <sub>50/mL</sub> ) |          | Минимальная эффективная концентрация (MEC mg/mL) |
|------------------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------------|----------|--------------------------------------------------|
|                                                |                                  | эксперимент                            | контроль |                                                  |
| Контроль (вводили 0,9% раствор натрия хлорида) | -                                | 12                                     | 12       | -                                                |
| Эксперимент                                    | 50±5                             | 0                                      | 12       | 0,05                                             |
|                                                | 5±1                              | 0                                      | 12       |                                                  |
|                                                | 0,5 ± 0,05                       | 2                                      | 12       |                                                  |
|                                                | 0,05±0,005                       | 4                                      | 12       |                                                  |
|                                                | 0,005±0,0005                     | 6                                      | 12       | 5                                                |

Как видно из табл. 12, минимальная эффективная концентрация KR2 против вируса гриппа, которая полностью ингибирует синтез вируса, составляет 0,05 мг/мл. С увеличением разведения препарата эффективность KR2 снижается и носит дозозависимый характер. Этот факт свидетельствует о наличии прямого противовирусного действия препарата KR2 по отношению к вирусу гриппа H3N2.

Исследование противовирусного действия препарата KP на цитопатические вирусы (вирус везикулярного стоматита, коронавирусы, вирус простого герпеса 1 типа). Противовирусную активность в отношении этой группы вирусов определяли в культуре указанных выше клеток. Реакцию проводили следующим образом: 0,2 мл соответствующего вируса в рабочей дозе (100 TCD<sub>50</sub>/0,2 мл) добавляли в объеме 0,2 мл в 2-дневную отмытую культуру клеток. Добавляли 0,8 мл поддерживающей среды. Когда в культуре появился СРР, препарат KR вводили в различных дозах. В качестве контроля то же самое было сделано с тест-вирусами без препарата. Клетки инкубировали при 37°C в термостате. Опыт зафиксирован на 3,5,7 суток. Снижение титра вируса под воздействием исследуемого препарата на 2 lg и более по сравнению с контролем оценивали как проявление противовирусной активности. Результаты исследования противовирусной активности препарата KP2 представлены в табл. 13.

Таблица 13

Исследование противовирусного действия препарата KP2 в отношении вирусов: везикулярного стоматита, коронавируса, вируса простого герпеса 1 типа)

| Препарат | Вирус | MEC, mg/mL | Максимальное падение титра вируса, lg TCA <sub>50/mL</sub> |
|----------|-------|------------|------------------------------------------------------------|
| KR2      | VSV   | 0,05       | 3,9                                                        |
|          | CV    | 0,05       | 2,9                                                        |
|          | HSV1  | 0,05       | 4,9                                                        |

Как видно из табл. 13, KR2 обладает противовирусной активностью и способностью подавлять репродукцию всех изученных нами вирусов в концентрации 0,05 мг/мл с MEC=50 мкг/мл. СТИ препарата составляет 1000. Кроме того, KR2 был активен против всех изученных вирусов, в то время как ни один из препаратов сравнения не показал такой активности. Таким образом, действие препарата не связано с конкретными характеристиками вируса или культуры клеток, а влияет на механизмы, общие для всех клеток.

Аспекты изобретения включают супрамолекулярные структуры, также называемые супрамолекулярными растворимыми наночастицами (SNP), имеющие а) множество связывающих компонентов, каждый из которых имеет множество связывающих областей, причем множество связывающих областей включает комбинаторные карбоксилированные кобаламины; б) множество ядер, которые подходят, по меньшей мере, для обеспечения некоторой механической структуры упомянутых самоорганизующихся супрамолекулярных растворимых систем, при этом каждое из упомянутого множества ядер представляет собой органическое ядро, которое содержит, по меньшей мере, один элемент связывания ядра, приспособленный для связывания со связывающими областями с образованием первого комплекса включения, где сердцевинный связывающий элемент включает комбинаторный карбоксилированный дипиридамо, и где первый комплекс включения представляет собой комбинаторный карбоксилированный кобаламин с комбинаторным карбоксилированным дипиридамолом; в) множество концевых компонентов, каждый из которых имеет один концевой связывающий элемент, который связывается с оставшимися связывающими областями одного из указанного множества связывающих компонентов, образуя второй комплекс включения, где единственный концевой связывающий элемент содержит комбинаторный карбоксилированный дипиридамо, и где второй комплекс включения представляет собой комбинаторный карбоксилированный дипиридамо; г) множество ядер и множество связывающих компонентов представляют собой самособирающиеся карбоксилированные основные аминокислоты - лизин, гистидин и аргинин, и собираются при контакте с образованием самоорганизующихся супрамолекулярных растворимых сис-

тем, и е) множество концевых компонентов взаимодействуют, чтобы занять оставшиеся связывающие области множества связывающих компонентов, и множество концевых (терминальных) компонентов присутствует в количестве, достаточном по сравнению с множеством связывающих областей множества связывающих компонентов, чтобы прекратить дальнейшее связывание, тем самым образуя дискретную частицу.

Структурные компоненты и связывающие компоненты некоторых вариантов осуществления настоящего изобретения, содержащие супрамолекулярные структуры, также называемые супрамолекулярными растворимыми наночастицами (SNP), могут самособираться при приведении в контакт друг с другом с образованием супрамолекулярной структуры. Терминирующие компоненты могут действовать, занимая связывающие области связывающих компонентов, чтобы прекратить дальнейшее связывание, когда завершающие компоненты присутствуют в достаточном количестве по сравнению с связывающими областями связывающих компонентов. В некоторых вариантах реализации структурный компонент содержит множество связывающих элементов, которые связываются с областями связывания компонентов связывания. В некоторых вариантах осуществления терминаторный компонент имеет единственный связывающий элемент, который связывается с одной связывающей областью на одном связывающем компоненте. В некоторых вариантах реализации супрамолекулярная структура имеет по меньшей мере два или более различных концевых компонента.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения связывающие области (на связывающем компоненте) могут связываться с оконечными (терминальными) компонентами или структурными компонентами с образованием пары молекулярного распознавания. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере один структурный компонент, по меньшей мере один связывающий компонент или по меньшей мере один завершающий компонент имеет функциональный элемент. В некоторых вариантах реализации супрамолекулярная структура имеет два или более различных функциональных элемента.

В некоторых вариантах реализации изобретение представляет собой композицию вещества, содержащего супрамолекулярные структуры, также называемые супрамолекулярными растворимыми наночастицами (SNP), содержащую смесь комбинаторных карбоксилированных кобаламинов, содержащую, например, смесь сукцинилированного производного цианокобаламина, цианокобаламина, метилкобаламин, гидроксикобаламин и/или кобамид.

В других вариантах осуществления изобретения изобретение представляет собой композицию вещества, содержащего супрамолекулярные структуры, также называемые супрамолекулярными растворимыми наночастицами (SNP), содержащую смесь комбинаторных карбоксилированных кобаламинов, включающую сукцинилированный гидроксикобаламин, сукцинилированный кобамид, сукцинилированный метилкобаламин и/или сукцинилированный цианокобаламин.

В других вариантах осуществления изобретения изобретение представляет собой композицию вещества, содержащего супрамолекулярные структуры, также называемые супрамолекулярными растворимыми наночастицами (SNP), содержащую смесь супрамолекулярных комбинаторных карбоксилированных рибофлавинов, включающую супрамолекулярные комбинаторные сукцинилированные производные рибофлавинов и флавоуклеаров. / или флавиндинуклеотид.

В еще других вариантах осуществления изобретения изобретение представляет собой композицию веществ, содержащую супрамолекулярные структуры, также называемые супрамолекулярными растворимыми наночастицами (SNP), содержащую смесь комбинаторных карбоксилированных дипиридамолов, содержащих супрамолекулярные сукцинилированные комбинаторные производные дипиридамола; супрамолекулярные малеилированные комбинаторные производные дипиридамола и/или карбоксиметилированные комбинаторные производные дипиридамола.

В других вариантах осуществления изобретения изобретение представляет собой композицию вещества, содержащего супрамолекулярные структуры, также называемые супрамолекулярными растворимыми наночастицами (SNP), содержащую супрамолекулярные структуры, дополнительно содержащие карбоксилированные основные аминокислоты, такие как лизин, гистидин и аргинин, и может включать бис-сукцинилированные, малеилированные и карбоксиметилированные аминокислотные производные карбоксилированных основных аминокислот, таких как лизин, гистидин и аргинин.

В других вариантах осуществления изобретения изобретение представляет собой композицию, в которой терминирующий компонент может включать по меньшей мере одно из следующих веществ: полиэтиленгликоль, полимер, полипептид или олигосахарид, а органическое ядро содержит по меньшей мере одно из дендримеров, разветвленного полиэтиленimina, линейный полиэтиленimin, полилиния, полилактид, полилактид-со-гликозид, полиангидриды, поли-ε-капролактоны, полиметилметакрилат, поли (N-изопропилакриламид) или полипептиды.

В других вариантах осуществления изобретения изобретение представляет собой композицию, в которой связывающий компонент дополнительно включает комбинаторные карбоксилированные производные основного олигопептида **KKKRKRKR**, их карбоксилированные производные в форме сукцинилированных, малеилированных и карбоксиметилированных производных в смеси друг с другом. Также в качестве связывающего и терминированного компонента может использоваться поли-L-лизин.

Другие аспекты изобретения включают способы получения супрамолекулярных структур путем приготовления суспензии структурных компонентов, связывающих компонентов и концевых (терминирующих) компонентов. Другие аспекты изобретения включают выбор соотношения количества структурного компонента(ов) к связывающему компоненту(ам) к концевому компоненту(ам) для определенной цели, включая выбор размера, предназначенного для супрамолекулярных структур. Преимущественно структурный компонент(ы), связывающий компонент(ы) и завершающий (терминальный) компонент(ы) могут быть способны к самосборке в предпочтительные супрамолекулярные структуры с по существу заранее определенным размером.

Обратите внимание, что значение супрамолекулярной структуры относится, например, к значениям супрамолекулярной сборки и супрамолекулярной структуры. Супрамолекулярная сборка, например, может быть определена как комплекс молекул, удерживаемых вместе нековалентными связями. Например, супрамолекулярная сборка может состоять просто из двух молекул (например, двойной спирали ДНК или соединения включения) или более крупного(ых) комплекса(ов) молекул, образующих, например, сферу, стержень или лист, как частицы, наночастицы или дискретные частицы. Мицеллы, липосомы и биологические мембраны также являются примерами некоторых видов супрамолекулярных ансамблей. Размеры супрамолекулярных сборок предположительно имеют широкий возможный диапазон, например, для вариантов осуществления настоящего изобретения, диапазон от примерно 5 нм до примерно 10 мк.

Настоящее описание раскрывает диапазоны размеров супрамолекулярных сборок и структур по отдельности или комбинации супрамолекулярных структур (сборок), образующих наночастицы. Общая область супрамолекулярной химии - это область химии, касающаяся химических систем, состоящих из дискретного числа молекул. Сила сил, ответственных за пространственную организацию системы, варьируется от слабых межмолекулярных сил, электростатического заряда или водородной связи до сильной ковалентной связи, при условии, что сила электронного взаимодействия остается небольшой по сравнению с энергетическими параметрами компонента. В то время как традиционная химия концентрируется на ковалентной связи, супрамолекулярная химия дополнительно касается более слабых и обратимых нековалентных взаимодействий между молекулами, которые, следовательно, производят комбинации малых молекул для супермолекул или супрамолекулярных ансамблей, в которых количество супрамолекулярных структур задумано изобретателем и раскрыто в описании и может быть вычисленным или оцененным числом с использованием вычислений комбинаторной химии и комбинаторной математики, которые раскрыты в настоящем описании.

Супрамолекулярные сборки образуются и могут иметь среднее время жизни, поддерживаемое водородными связями, координацию металлов, гидрофобные силы, силы Ван-дер-Ваальса, пи-пи-взаимодействия и электростатические эффекты между небольшими молекулами, которые составляют комбинаторные супрамолекулярные сборки.

Супрамолекулярная химия также касается динамических (спонтанных, энергозависимых, энтропийных и термодинамических процессов) молекулярной самосборки, молекулярного фолдинга, молекулярного распознавания, химии хозяин-гость, механически взаимосвязанных молекулярных архитектур и динамической ковалентной химии. Основы этих идей о супрамолекулярной науке основаны на учениях предшествующего уровня техники, как было раскрыто в разделе "Предпосылки изобретения". Понятие "супрамолекулярные растворимые системы" включает супрамолекулярные растворимые системы в целом и включает растворимость их компонентов, а также растворимость сборки и ее компонентов на различных этапах процесса сборки, образующих супрамолекулярные сборки (структуры).

Обратите внимание, что значение наночастицы включает значения сверхмелкозернистой частицы и/или дискретной частицы. Наночастица в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения имеет наибольший размер, который составляет от 1 нм до 10000 нм. Структурные, связывающие и завершающие компоненты самоорганизуются в супрамолекулярные структуры, имеющие по существу заранее определенный размер.

Предпочтительно в некоторых случаях предварительно определенный размер предпочтительно составляет по меньшей мере примерно 10 нм и меньше примерно 800 нм (нанометров). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения заданный размер составляет от примерно 5 нм до 2000 нм. Предпочтительно в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения заданный размер составляет, по меньшей мере, примерно 20 нм и менее примерно 400 нм (нанометров). Средний абсолютный/максимальный размер гидратированной наночастицы может быть измерен в жидкости прямым лазерным сканированием (DLS) с использованием Malvern Instruments Zetasizer для расчета размеров. Оптическая и/или рентгеновская технология или тестирование с использованием мембранных методов фильтрации с нанометровым и/или микронным фильтром, известных в предшествующем уровне техники, также могут быть полезны для определения среднего размера или относительного размера наночастиц.

Если термин представлен в единственном числе, изобретатели также рассматривают аспекты изобретения, описанные во множественном числе этого термина. Таким образом, например, ссылка на "способ" включает в себя один или несколько способов и/или этапов описанного здесь типа и/или которые станут очевидными для специалистов в данной области техники после прочтения этого раскрытия. Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, включают, по

меньшей мере, то же значение, которое обычно понимается специалистом в области, к которой принадлежит это изобретение. Все публикации, упомянутые в данном документе, полностью включены в настоящий документ посредством ссылки. Если есть расхождения в терминах и определениях, используемых в ссылках, которые включены посредством ссылки или в будущих публикациях, термины, используемые в этой заявке на патент, будут иметь значение, указанное здесь. Специалистам в данной области техники будет понятно, что изменения могут быть внесены в варианты осуществления, описанные выше, без отступления от их широкой концепции изобретения. Поэтому понятно, что это изобретение не ограничено конкретными раскрытыми вариантами осуществления, но предназначено для охвата модификаций в пределах сущности и объема настоящего изобретения, как определено прилагаемой формулой изобретения.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Супрамолекулярные наночастицы с противовирусным действием, включающие комбинацию наноструктур, выбранных из группы, состоящей из комбинаторных карбоксилированных кобаламинов, полученных в результате первого комбинаторного синтеза, комбинаторных карбоксилированных дипиридамолов, полученных в результате второго комбинаторного синтеза, карбоксилированных основных аминокислот, полученных в результате третьего комбинаторного синтеза, и любого их сочетания.

2. Супрамолекулярные наночастицы по п.1, которые дополнительно содержат динамические самоорганизующиеся растворимые наноструктуры, и при этом наноструктуры дополнительно содержат множество связывающих компонентов, множество органических ядер и множество терминирующих компонентов.

3. Супрамолекулярные наночастицы по п.2, в которых один из связывающих компонентов дополнительно включает комбинаторные карбоксилированные кобаламины, которые имеют ряд областей связывания, при этом органические ядра дополнительно содержат комбинаторные карбоксилированные дипиридамолы, которые имеют по меньшей мере один связывающий элемент, адаптированный для связывания с комбинаторными карбоксилированными кобаламинами, в которых органические ядра дополнительно содержат механические структуры для динамических самоорганизующихся растворимых наноструктур, и где связывание комбинаторных карбоксилированных кобаламинов с комбинаторными карбоксилированными дипиридамолами может дополнительно включать первые комплексы включения.

4. Супрамолекулярные наночастицы по п.3, в которых каждый терминирующий компонент имеет по меньшей мере один терминирующий связывающий элемент, который связывается с оставшейся связывающей областью одного из связывающих компонентов и может дополнительно содержать вторые комплексы включения.

5. Супрамолекулярные наночастицы по п.4, в которых карбоксилированные основные аминокислоты выбраны из группы, состоящей из лизина, гистидина, аргинина, дериватизированного лизина, дериватизированного гистидина, дериватизированного аргинина, ацилированного лизина, ацилированного гистидина, ацилированного аргинина и любые их комбинации.

6. Супрамолекулярные наночастицы по п.5, в которых множество терминирующих компонентов занимают оставшиеся связывающие области из множества связывающих компонентов, при этом множество терминирующих компонентов находится в эквивалентном количестве или большем, чем количество связывающих областей множества компонентов связывания для того, чтобы прекратить дальнейшее связывание связывающих компонентов, и при этом супрамолекулярные наночастицы дополнительно содержат дискретные наночастицы, основанные на динамических самоорганизующихся растворимых наноструктурах.

7. Супрамолекулярные наночастицы по п.1, в которых комбинаторные карбоксилированные кобаламины представляют собой смесь сукцинилированных цианокобаламинов.

8. Супрамолекулярные наночастицы по п.1, в которых комбинаторные карбоксилированные кобаламины представляют собой смесь сукцинилированных метилкобаламинов.

9. Супрамолекулярные наночастицы по п.1, в которых комбинаторные карбоксилированные кобаламины представляют собой смесь сукцинилированных гидроксикобаламинов.

10. Супрамолекулярные наночастицы по п.1, в которых комбинаторные карбоксилированные кобаламины представляют собой смесь сукцинилированных кобамидов.

11. Супрамолекулярные наночастицы по п.1, в которых комбинаторные карбоксилированные кобаламины выбраны из группы, состоящей из смеси сукцинилированных гидроксикобаламинов, смеси сукцинилированных кобамидов, смеси сукцинилированных гидроксикобаламинов, смеси сукцинилированных метилкобаламинов, смеси сукцинилированных цианокобаламинов и любых их комбинаций.

12. Супрамолекулярные наночастицы по п.2, в которых по меньшей мере одно из органических ядер дополнительно содержит по меньшей мере один элемент, выбранный из фотодинамического компонента, которым являются супрамолекулярные комбинаторные карбоксилированные рибофлавины.

13. Супрамолекулярные наночастицы по п.12, в которых супрамолекулярные комбинаторные карбоксилированные рибофлавины представляют собой супрамолекулярные комбинаторные сукцинилиро-

ванные рибофлавины.

14. Супрамолекулярные наночастицы по п.12, в которых супрамолекулярные комбинаторные карбоксилированные рибофлавины представляют собой супрамолекулярные комбинаторные сукцинилированные мононуклеотиды флавина.

15. Супрамолекулярные наночастицы по п.12, где супрамолекулярные комбинаторные карбоксилированные рибофлавины представляют собой супрамолекулярные комбинаторные сукцинилированные флавиндинуклеотиды.

16. Супрамолекулярные наночастицы по п.1, в которых комбинаторные карбоксилированные дипиридамолы представляют собой супрамолекулярные сукцинилированные комбинаторные дипиридамолы.

17. Супрамолекулярные наночастицы по п.1, в которых комбинаторный карбоксилированный дипиридамола представляют собой супрамолекулярный малеилированный комбинаторный дипиридамола.

18. Супрамолекулярные наночастицы по п.1, в которых комбинаторный карбоксилированный дипиридамола представляют собой супрамолекулярный карбоксиметилированный комбинаторный дипиридамола.

19. Супрамолекулярные наночастицы по п.5, в которых карбоксилированные основные аминокислоты выбраны из группы, состоящей из сукцинилированного лизина, сукцинилированного гистидина, сукцинилированного аргинина и любой их комбинации.

20. Супрамолекулярные наночастицы по п.5, в которых карбоксилированные основные аминокислоты выбраны из группы, состоящей из малеилированного лизина, малеилированного гистидина, малеилированного аргинина и любой их комбинации.

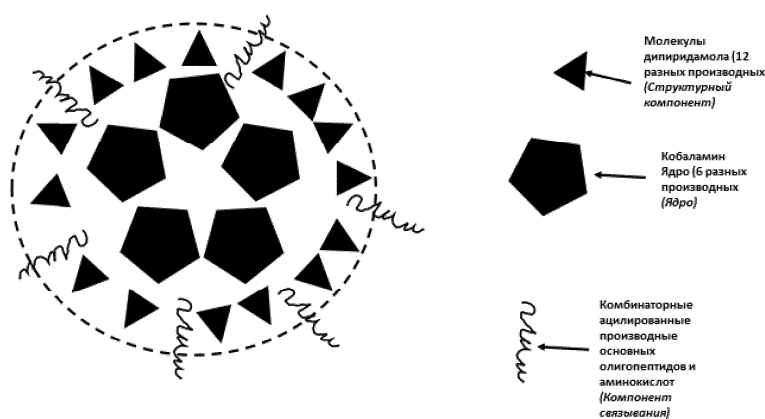
21. Супрамолекулярные наночастицы по п.5, в которых карбоксилированные основные аминокислоты выбраны из группы, состоящей из карбоксиметилированного лизина, карбоксиметилированного гистидина, карбоксиметилированного аргинина и любой их комбинации.

22. Супрамолекулярные наночастицы по п.5, в которых карбоксилированные основные аминокислоты выбраны из группы, состоящей из карбоксиметилированного лизина, карбоксиметилированного гистидина, карбоксиметилированного аргинина, сукцинилированного лизина, сукцинилированного гистидина, сукцинилированного аргинина, малеилированного гистидина и любой их комбинации.

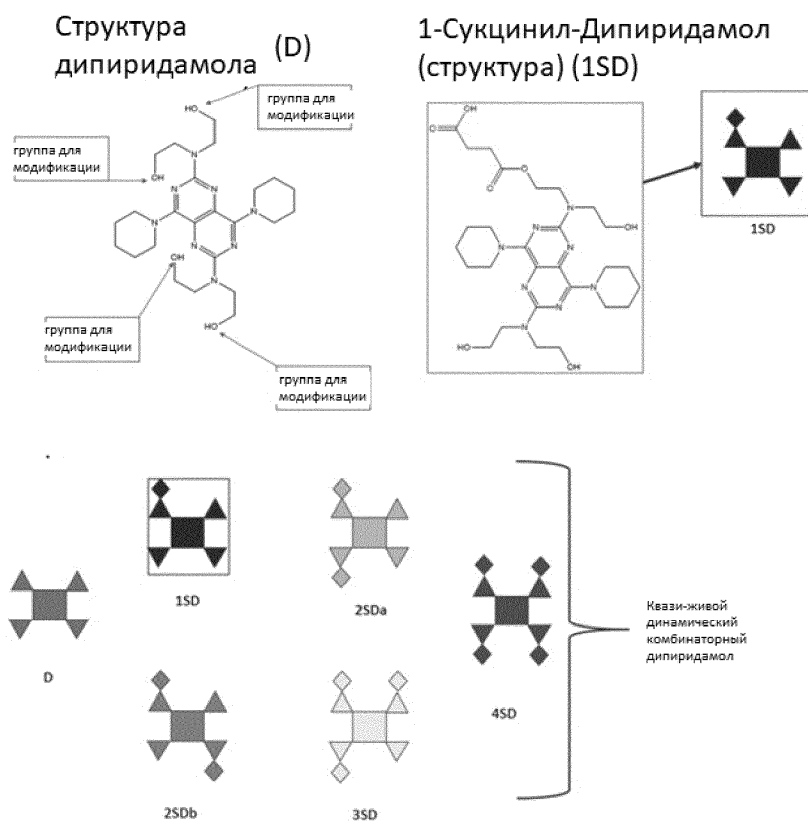
23. Супрамолекулярные наночастицы по п.4, в которых множество терминальных компонентов содержат по крайней мере один концевой компонент, выбранный из группы, состоящей из полиэтиленгликоля, полимера, полипептида, олигосахарида и любой их комбинации.

24. Супрамолекулярные наночастицы по п.3, в которых органические ядра содержат по меньшей мере одно органическое ядро, выбранное из группы, состоящей из дендримера, разветвленного полиэтиленimina, линейного полиэтиленimina, полилизина, полилактоида, со-гликозида аполилактоида, полиангидрида, поли-ε-капролактона, полиметилметакрилата, поли (N-изопропилакриламида) и полипептида и любые их комбинации.

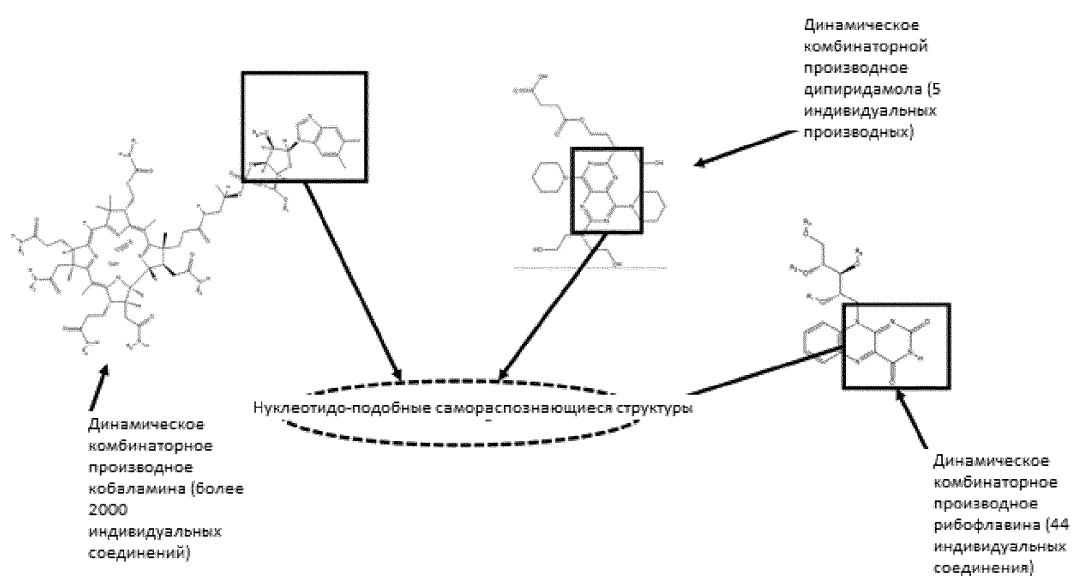
25. Супрамолекулярные наночастицы по п.2, в которых связывающий компонент представляет собой поли-L-лизин.



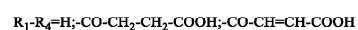
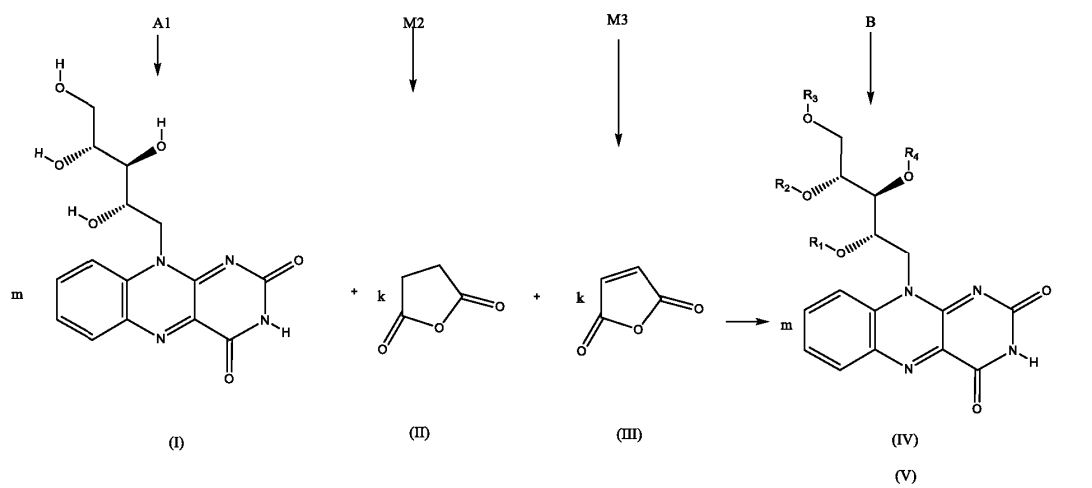
Фиг. 1



ФИГ. 2



ФИГ. 3

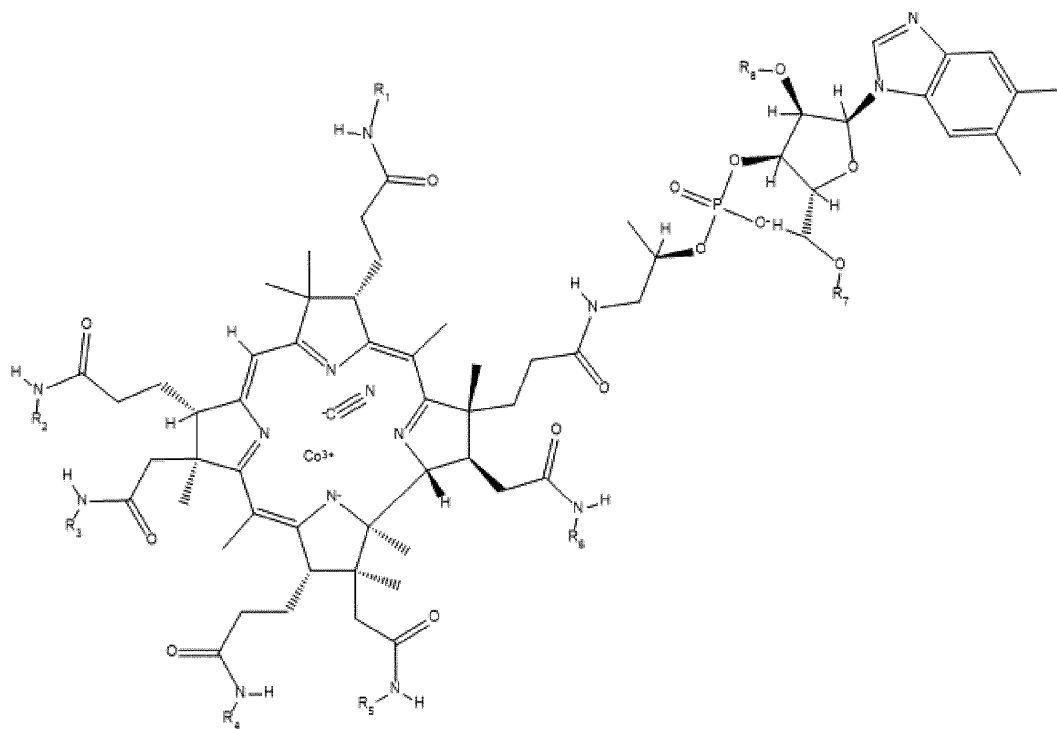


$$(F1) \quad m A1 + k M2 + k M3 = m B$$

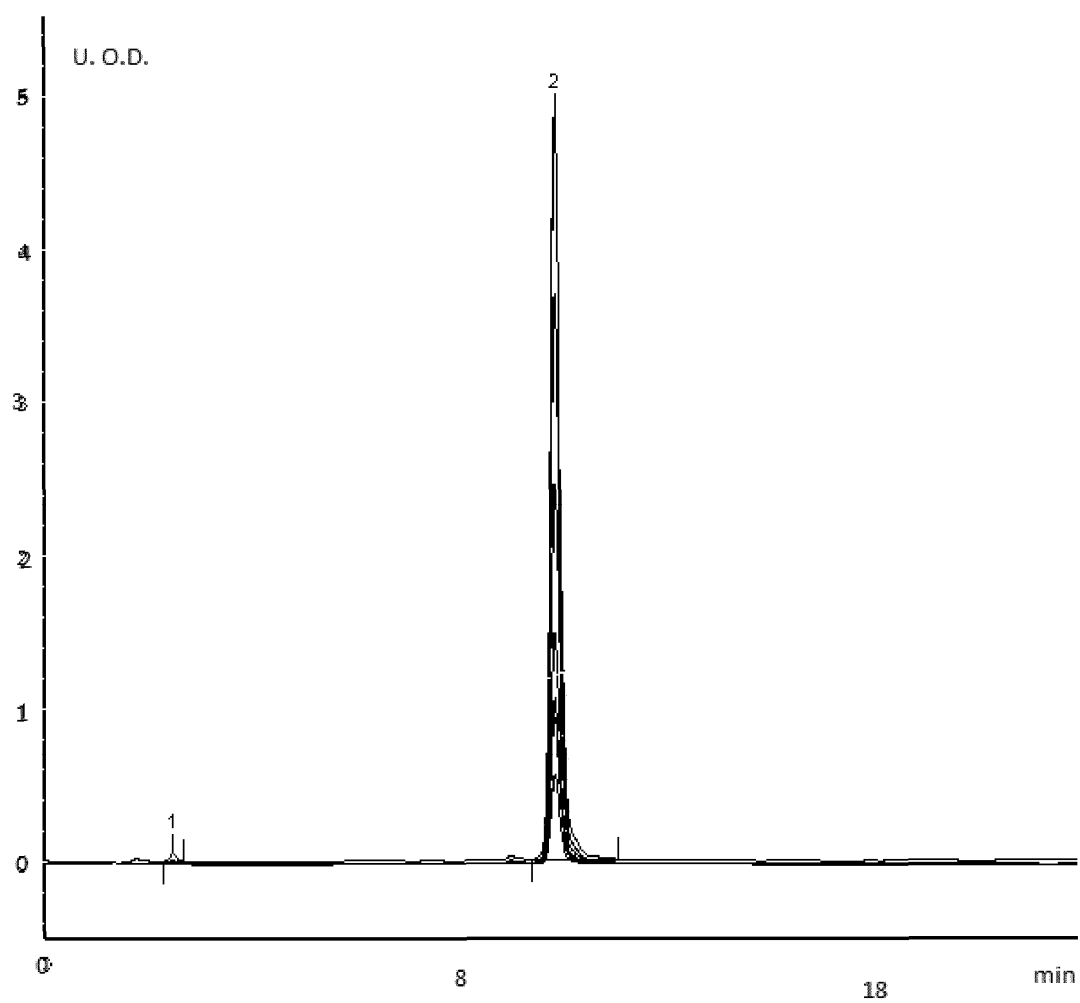
$$(F2) \quad k = n * (2^n - 1) = 4 * (2^4 - 1) = 60$$

$$(F3) \quad m = 4 * (3 * 2^{n-2} - 1) = 44$$

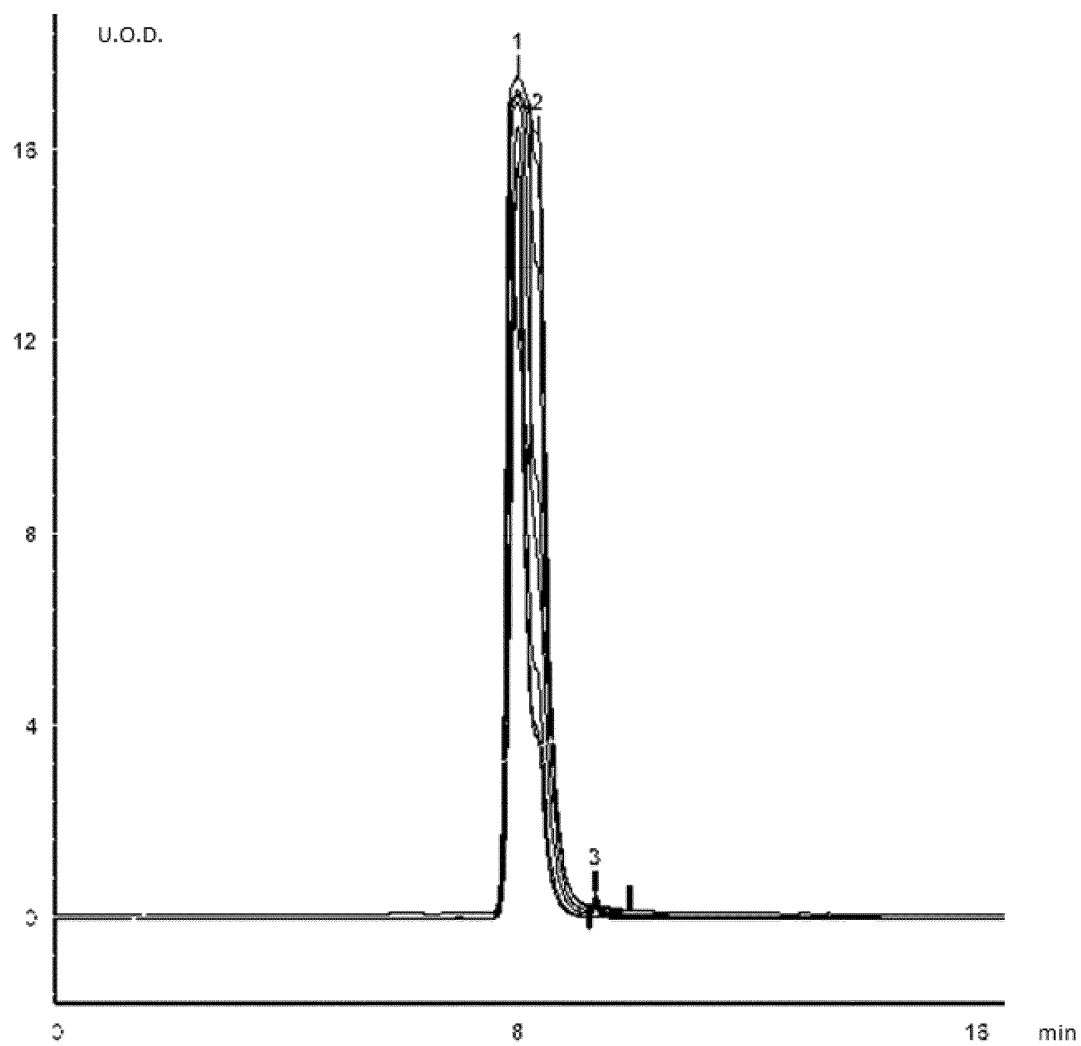
Фиг. 4



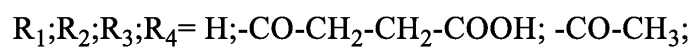
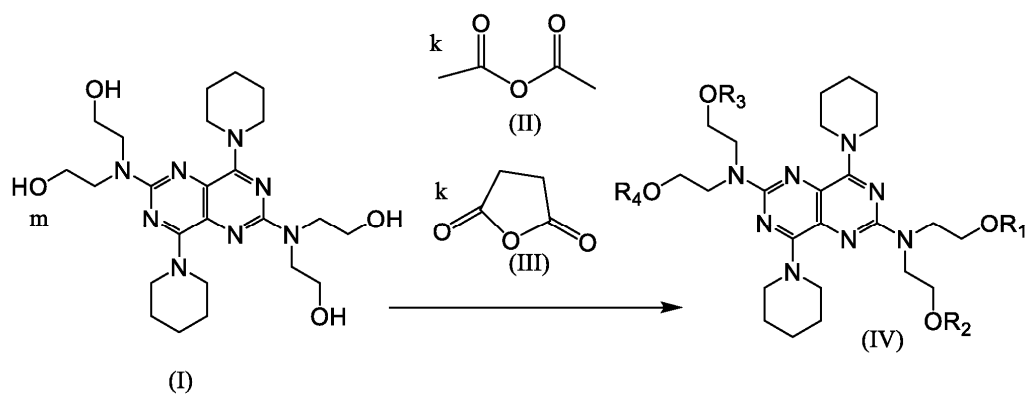
Фиг. 5



Фиг. 6

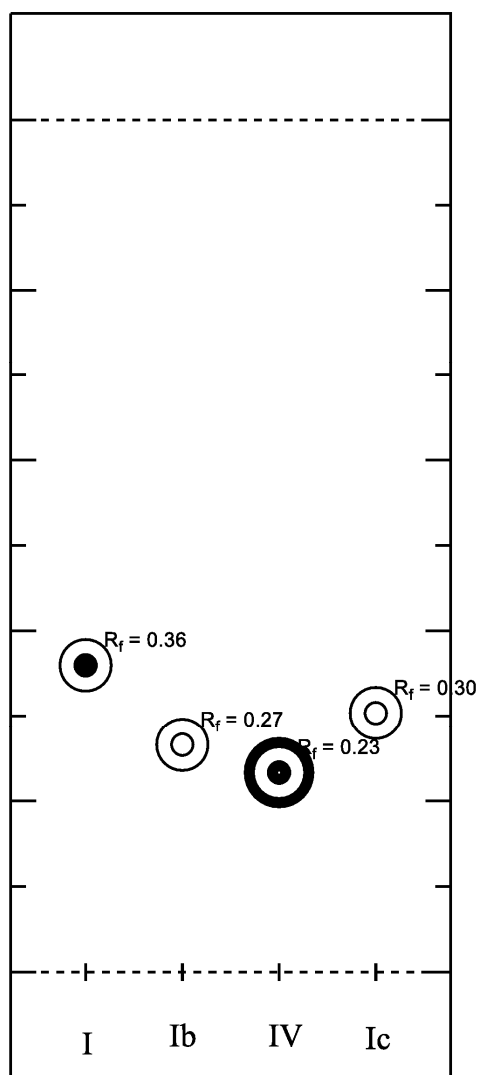


Фиг. 7

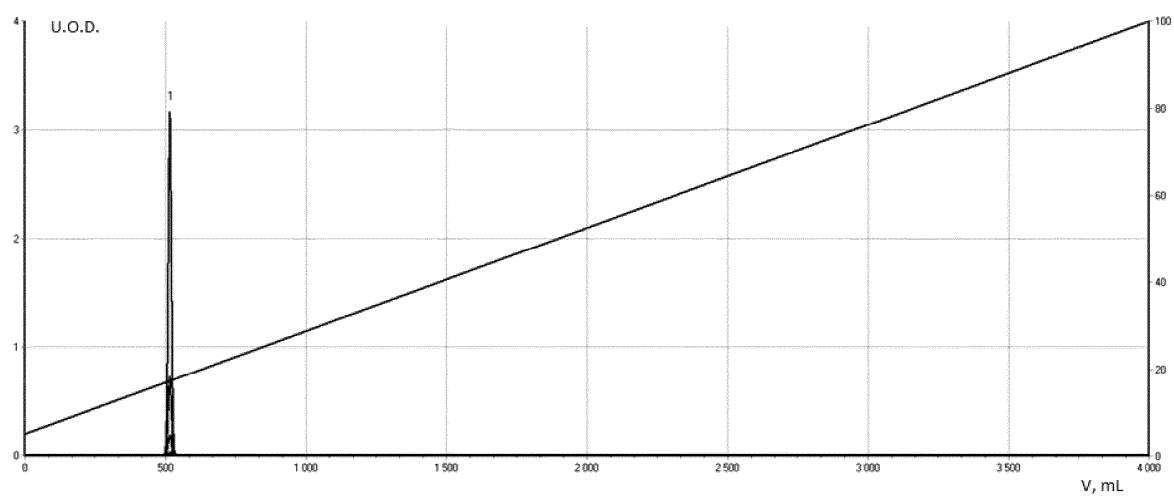


Фиг. 8

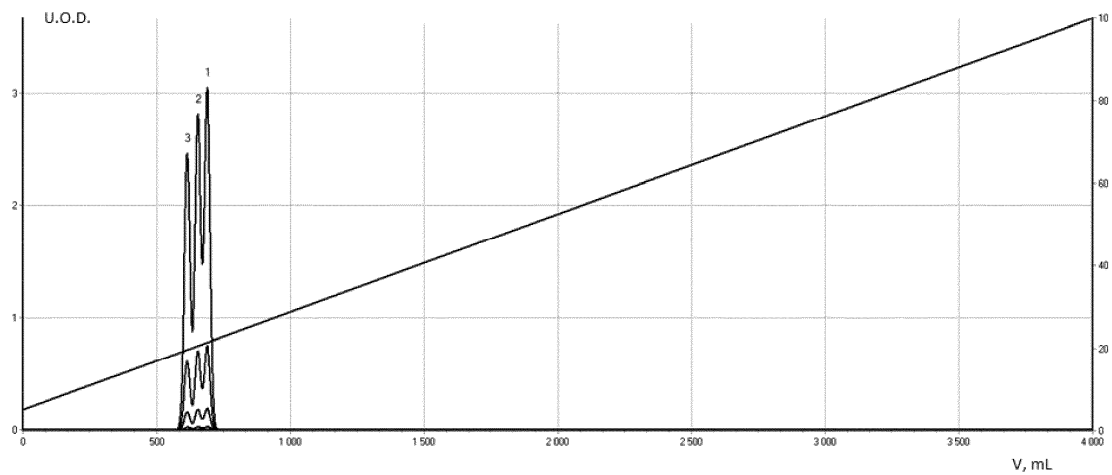
043514



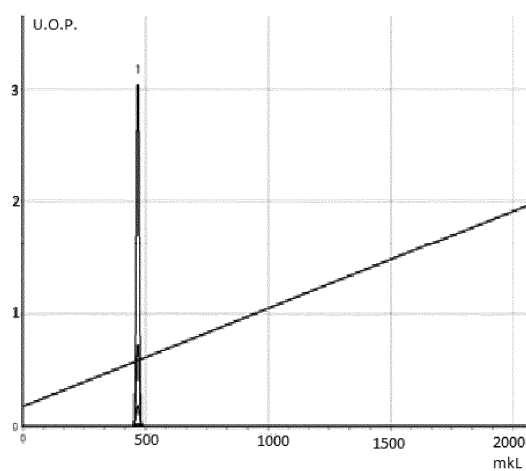
Фиг. 9



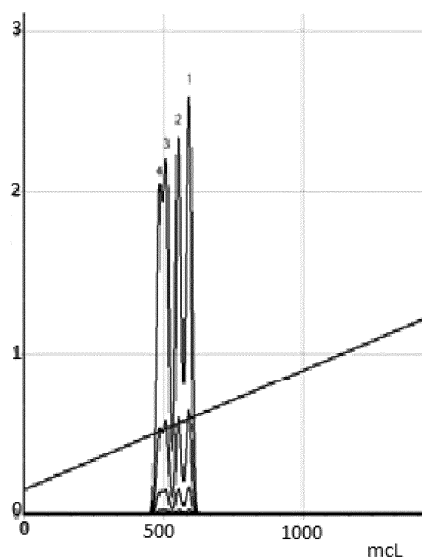
Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12



Фиг. 13

