

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

(19) Всемирная Организация
Интеллектуальной Собственности
Международное бюро



(10) Номер международной публикации
WO 2012/105873 A1

(43) Дата международной публикации
09 августа 2012 (09.08.2012)

WIPO | PCT

(51) Международная патентная классификация:
C07C 229/50 (2006.01) A61P 31/18 (2006.01)
C07C 227/14 (2006.01) A61P 31/22 (2006.01)
A61K 31/197 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61P 31/16 (2006.01) A61P 17/06 (2006.01)

СУВОРОВА, Ольга Николаевна (SUVOROVA, Olga Nikolaevna) [RU/RU]; ул. Гжатская, 8-20, Нижний Новгород, 603000, Nizhny Novgorod (RU).

(21) Номер международной заявки: PCT/RU2012/000063

(74) Общий представитель: РАСНЕЦОВ, Лев Давидович (RASNETSOV, Lev Davidovich); ул. Костина, 4, офис 310, Нижний Новгород, 603000, Nizhny Novgorod (RU).

(22) Дата международной подачи:
06 февраля 2012 (06.02.2012)

(81) Указанные государства (если не указано иначе, для каждого вида национальной охраны): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(25) Язык подачи: Русский

(26) Язык публикации: Русский

(30) Данные о приоритете:
2011103541 01 февраля 2011 (01.02.2011) RU

(72) Изобретатель; и

(71) Заявитель : РАСНЕЦОВ, Лев Давидович (RASNETSOV, Lev Davidovich) [RU/RU]; ул. Грузинская, 15-39, Нижний Новгород, 603000, Nizhny Novgorod (RU).

(72) Изобретатели; и

(75) Изобретатели/Заявители (только для US): ШВАРЦМАН, Яков Юдеlevич (SHVARTSMAN, Iakov Yudelevich) [RU/RU]; ул. Ошарская, 88-31, Нижний Новгород, 603105, Nizhny Novgorod (RU).

(81) Указанные государства (если не указано иначе, для каждого вида региональной охраны): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), евразийский (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), европейский патент (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO,

[продолжение на следующей странице]

(54) Title: HYDRATED N-FULLERENE AMINO ACIDS, METHOD FOR PRODUCING THE LATTER, AND PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS ON THE BASIS THEREOF

(54) Название изобретения : ГИДРАТИРОВАННЫЕ N-ФУЛЛЕРЕН-АМИНОКИСЛОТЫ, СПОСОБ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ НА ИХ ОСНОВЕ

(57) Abstract: The invention relates to the pharmaceutical industry and to medicine, specifically to novel hydrated amino-acid derivatives of fullerene C₆₀ of general formula C₆₀(H)₃{NH(CH₂)_nCOOH}₃·xH₂O, where C₆₀ - fullerene, n = 5, 6, 7, x = 8 - 10, and also to a method for producing said derivatives, and to the production of pharmaceutical compositions on the basis thereof. Hydrated N-fullerene amino acids are formed in the interaction of fullerene with 15 times the molar excess of anhydrous potassium salts of amino acids in a medium of organic aromatic solvent with slow addition to the resultant suspension of an interphase catalyst and with mixing and heating to a temperature not exceeding 60 °C until the solution is completely decolorized and a solid residue formed, after which the latter is separated out, and then 0.8 M of aqueous solutions of potassium salts of fullerene amino-acid derivatives is treated with a solution of organic or mineral acids, followed by centrifugation, rinsing and drying of the residue. A pharmaceutical composition which exhibits its activity against the herpes virus, flu viruses of various origin and HIV, and also anti-tumour and anti-psoriatic activity, comprising, as active substance, an effective quantity of hydrated N-fullerene amino acids.

(57) Реферат: Изобретение относится к фармацевтической промышленности и медицине, а именно к новым гидратированным аминокислотным производным фуллерена C₆₀ общей формулы C₆₀(H)₃{NH(CH₂)_nCOOH}₃·xH₂O, где C₆₀ - фуллерен, n = 5, 6, 7, x = 8 - 10, а также к способу их получения и созданию фармацевтических композиций на их основе. Гидратированные N-фуллерен-аминокислоты образуются при взаимодействии фуллерена с 15-кратным мольным избытком безводных калиевых солей аминокислот в среде органического ароматического растворителя при медленном добавлении к полученной суспензии межфазного катализатора при перемешивании и нагревании до температуры не выше 60 °C до полного обесцвечивания раствора и формирования твердого осадка, который затем выделяют, после чего осуществляют обработку 0,8 М водных растворов калиевых солей фуллеренаминокислот ОДЫ раствором органических или минеральных кислот с последующим центрифугированием, промывкой и высушиванием осадка. Фармацевтическая композиция, обладающая активностью против вируса герпеса, вирусов гриппа различной природы, ВИЧ, а также противоопухолевой и противопсориатической активностью, содержащая в качестве активного вещества гидратированные N-фуллерен-аминокислоты в эффективном количестве.



WO 2012/105873 A1



RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— с информацией о просьбе восстановления прав на
приоритет в отношении одного или более чем одного
притязания на приоритет (правила 26bis.3 и 48.2(b)
(vii))

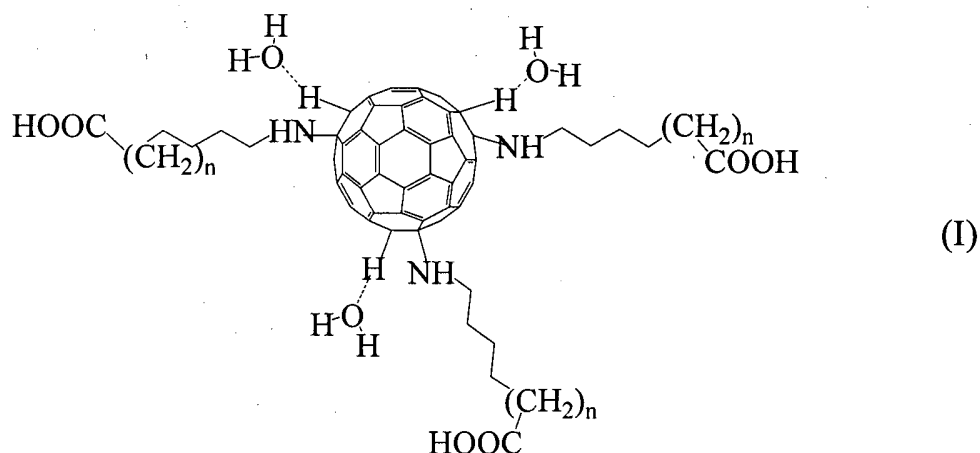
Опубликована:

— с отчётом о международном поиске (статья 21.3)

Гидратированные N-фуллерен-аминокислоты, способ их получения и фармацевтические композиции на их основе

Область техники

Изобретение относится к фармацевтической промышленности и медицине и касается новых гидратированных аминокислотных производных фуллерена C_{60} формулы (I), а также способа их получения и создание фармацевтических композиций на их основе.



Предшествующий уровень техники

Возможность использования фуллеренов, как биологически активных соединений вызвало интенсивное развитие химии функциональных производных фуллерена, особенно после того, как было показано, что ряд водорастворимых производных фуллерена проявляют высокую противовирусную активность (Partha R, Conyers JL, "Biomedical applications of functionalized fullerene-based nanomaterials" Int.J.Nanomedicine, 2009, 4, 261-75 Pat US 6204391, 2005, "Water soluble fullerenes with antiviral activity", R.Bakry et al., "Medicinal application of fullerenes" International Journal of Nanomedecine, 2007 (4) 639-649, Z.Zhu, D.I.Schuster, M.Tuckermann, "Molecular Dynamics Study of the Connection between Flap Closing and Binding of Fulleren-Based Inhibitors of the HIV-1 Protease", Biochemistry, 2003, v.42, 1326-1333).

Применение производных фуллерена в медицине основано на липофильных свойствах фуллеренового ядра, позволяющих фуллереновым производным проникать через клеточные мембраны, и способности фуллерена с высоким квантовым выходом генерировать синглетный кислород, расщепляющий ДНК. Эти свойства обеспечивают функциональным производным фуллерена проявление цитотоксических, противовирусных и других свойств (Bedrov D., Smith G.D., Davande H., "Passive transport of fullerenes through a lipid membrane." J.Phys.Chem., B, 2008, v.112., p.2078-84, Qiao R., Roberts A.E., "Translocation of fullerene and its derivatives across a lipid bilayer", Nano Lett., 2007, v.7, p.614-9. Nelsen G.D., и др., "In vivo biology and toxicology of fullerenes and their derivatives", Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology, 2008, v.103, p.197-208).

Гидратированные формы фуллерена проявляют высокую биологическую активность как биоантиоксиданты, что обусловлено образованием активных структурных форм водных кластеров, координированных на сфере фуллерена (Andrievsky G.V., Brushkov V.I., Tykhonov A.A., Gudkov S.V. "Peculiarities of the antioxidant and radioprotective effects of hydrated C60 fullerene nanostructures in vitro and in vivo". Free Radical Biology and Medicine, 2009, v.47, p.786-793).

Основной проблемой, затрудняющей биологические исследования фуллеренов и их производных и создания лечебных препаратов на их основе, является сложность введения фуллереновых систем в водные растворы.

Перспективным методом получения водорастворимых фуллереновых композиций является химическая модификация сферы фуллерена введением гидрофильных солубилизирующих лигандов.

В настоящее время получен большой ряд функционализированных фуллеренов, содержащих гидрофильные фрагменты как в боковой цепи присоединенных к фуллерену лигандов (детергентный тип комплексов), так и сферический тип производных, когда имеются
5 полярные группы, распределенные по фуллереновой сфере (такой тип включает фуллеренолы, аминоксиды).

Наиболее перспективными для использования являются аминокислотные производные фуллерена.

Неприродные аминокислоты алифатического ряда, содержащие 6 и более метиленовых групп, проявляют ряд особенностей, проявляющихся в процессах их гидратации и их биохимической активности. Спектральные исследования структуры воды в водных растворах аминокислот показывают, что увеличение числа метиленовых групп между амино- и карбоксильной группами приводит к
10 увеличению деструкции водных кластеров. Исследования фармакологических свойств производных аминокислот широкого ряда $R-(CH)_nCOOH$ показали более высокую активность систем с n больше и равным 6.

Производные фуллерена C_{60} сферического типа с аминокислотами, полученные по реакции нуклеофильного присоединения аминокислот по аминогруппе к сфере фуллерена описаны в патентах РФ №№ 2196602, 2124022, 2236852, которые можно предложить в качестве аналогов настоящего изобретения.
20

В патенте РФ № 2196602 предложен способ ингибирования репродукции ВИЧ и ЦМВ-инфекций при помощи соединений на основе аминокислотных и дипептидных производных фуллерена. В качестве аминокислотного производного фуллерена использованы
25

натриевые соли фуллеренаминокапроновой и фуллеренаминомасляной кислот.

В патенте РФ № 2124022 для получения фуллеренаминокапроновой кислоты к раствору фуллерена в о-дихлорбензоле добавляют водный раствор калиевой соли аминокaproновой кислоты и 18-краун-6. Реакционную массу перемешивают 6-8 часов при 60°C. Затем растворители отгоняют, остаток обрабатывают насыщенным раствором хлористого калия и остаток фуллеренового производного промывают водой. Выход целевого продукта количественный. Полученная (моногидро)N-фуллеренаминокапроновая кислота растворима в диметилсульфоксиде, диметилформамиде, пиридине. В заявленном методе синтеза не определены условия выделения конечного продукта.

Основным недостатком полученных соединений, которые представляют собой продукты моноприсоединения, является их нерастворимость в воде. Другим недостатком изобретения является использование в их синтезе краун-эфира в качестве межфазного катализатора, который сложно отделять от получаемых продуктов реакции.

В патенте РФ № 2236852 защищается средство для ингибирования репродукции оболочечных вирусов, представляющее собой фуллеренполикарбоновые анионы общей формулы $C_{60}H_n[NH(CH_2)_mC(O)O^-]_n$, полученные в результате взаимодействия фуллерена с солью аминокислоты в среде органического растворителя в присутствии полиалкиленоксида.

Для получения этих соединений к раствору фуллерена в о-дихлорбензоле (толуоле или любом другом органическом растворителе) вносят аминокислоту в виде соли (калиевой или натриевой),

затем добавляют солюбилизатор. Порядок внесения в реакционную среду аминокислоты и солюбилизатора не важен, можно вносить их в виде комплекса, предварительно смешав. В качестве солюбилизатора используют различные полиалкиленоксиды: полиэтиленгликоли мол. массы от 150 до 400, и выше 400 (например, ПЭГ-1500), а также полиэтиленгликоли, имеющие свободные концевые группы, но и с замещенными (например, диметиловый эфир полиэтиленгликоля мол. массы 500). Для увеличения скорости реакции добавляют любой сильный восстановитель (щелочные металлы). Соотношение фуллерена и аминокислоты увеличено более чем в 50 раз. Превращение в желаемую фармацевтически приемлемую соль, особенно натриевую или калиевую, выполнялась путем обработки кислоты подходящим основанием или путем добавления соли слабой летучей кислоты. В частности, не растворимая в воде фуллеренполикарбонная кислота превращается в более предпочтительные фармацевтически приемлемые соли, такие как натриевая соль, которые растворимы в воде. Добавление соли слабой летучей кислоты происходит путем обработки раствора солью щелочного металла и слабой летучей кислоты. При концентрировании раствора путем выпаривания или лиофилизации слабая кислота удаляется, а смесь фуллеренполикарбонных кислот выделяется в виде смесей их солей щелочных металлов. Целевой продукт по данному изобретению характеризуется постоянством состава, содержание в целевом продукте основного вещества составляет всего 87,8 %.

Основными недостатками фуллеренаминокислотных производных, полученных представленным в патенте методом получения является то, что данным способом получают смесь фуллеренкарбоксилатных анионов, как солевых, так и кислотных форм. Полу-

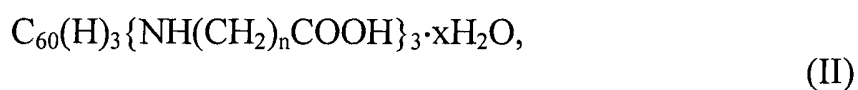
читать индивидуальное соединение способом, описанным в патенте, не представляется возможным. Также фуллеренполиаминокислоты, полученные запатентованным способом, в кислотной форме практически нерастворимы в воде. Получить стабильную фармацевтическую композицию с фуллеренполикарбоновыми анионами не удалось, т.к. в процессе хранения соединения выпадают в осадок. Фуллеренполиаминокислоты оказывают влияние на лейкопоз: вызывают сдвиг лейкоцитарной формулы и индуцируют появление молодых форм нейтрофилов - нейтрофильных метамиелоцитов у подопытных животных (крыс и кроликов). С точки зрения безопасности (безвредности) это свидетельствует о наличии у данных субстанций токсичности, вызывающей указанные изменения. Применение в синтезе большого избытка калиевой или натриевой солей аминокислот и больших избытков растворителей приводит к возникновению экологических проблем, связанных с утилизацией отходов производства, а также к удорожанию процесса производства. Использование щелочных металлов для увеличения скорости реакции является технологически невозможным при использовании хлорированных ароматических растворителей.

20 Раскрытие изобретения

Задачей заявляемого технического решения является получение индивидуальных гидратированных соединений фуллерена C_{60} с аминокарбоновыми кислотами, обладающих активностью против вируса герпеса, вируса гепатита С, вирусов гриппа различной природы, ВИЧ, а также противоопухолевой и противовоспалительной активностью, не оказывающих токсического действия на организм; способ получения данных соединений и фармацевтические композиции, включающие данные соединения.

Для решения поставленной задачи предложена группа изобретений, объединенных единым изобретательским замыслом: соединение, способ его получения и фармацевтические композиции, содержащие указанное соединение.

- 5 Поставленная задача решается индивидуальным гидратированным соединением фуллерена C_{60} с аминокарбоновыми кислотами общей формулы (II), характеризующееся тем, что на одну молекулу фуллерена приходится три ковалентно связанных аминокислотных фрагмента, имеющих в своей структуре активные центры
- 10 гидратации, приводящие к образованию водорастворимых гидратов, и длинные углеводородные цепи, позволяющие удерживать молекулы воды во внутренней координационной сфере фуллереновых комплексов.



где C_{60} – фуллерен, $n = 5, 6, 7$, $x = 8-10$

- Указанная задача решается тем, что гидратированные фуллереновые производные аминокислот формулы (II), образуются при
- 15 взаимодействии фуллерена с 15-кратным мольным избытком безводных калиевых солей аминокислот в среде органического ароматического растворителя при медленном добавлении к полученной суспензии межфазного катализатора при перемешивании и нагрева-
- 20 нии до температуры не выше $60-80^\circ C$ до полного обесцвечивания раствора и формирования твердого осадка, который затем выделяют, после чего осуществляют обработку $0,8\text{ M}$ водных растворов калиевых солей фуллеренаминокислот $0,1\text{ N}$ раствором органических или минеральных кислот с последующим центрифугировани-
- 25 ем, промывкой и высушиванием осадка.

Также, согласно изобретению, безводные калиевые соли аминокислот используют в мелкодисперсном состоянии, что позволяет повысить реакционную способность процесса, его эффективность и экономичность, а выделение твердого осадка калиевых солей фуллеренаминокислот осуществляют фильтрованием, промывкой этиловым спиртом и высушиванием. В качестве межфазного катализатора используют метиловые эфиры полиэтиленоксидов молекулярной массы 200, 400, 500, как наиболее доступные и безопасные катализаторы.

10 Указанная задача решается также созданием фармацевтических композиций, содержащих в качестве активного вещества водорастворимые гидратированные фуллерен-аминокислоты формулы (II), обладающих активностью против вируса герпеса, вируса гепатита С, вирусов гриппа различной природы, ВИЧ, а также противо-
15 опухолевой и противопсориатической активностью.

 Фармацевтические композиции по предложенному техническому решению содержат соединение общей формулы (II) в количестве, эффективном для достижения желаемого результата, и могут быть введены в виде стандартных лекарственных форм (например,
20 в твердой, полутвердой или жидкой формах), содержащих соединения предложенного технического решения в качестве активного ингредиента в смеси с носителем или наполнителем, пригодным для внутримышечного, внутривенного, перорального, сублингвального, ингаляционного, местного, интраназального и интаректального
25 введения. Активный ингредиент может быть включен в композицию вместе с обычно используемыми нетоксичными фармацевтически приемлемыми носителями, пригодными для изготовления

растворов, таблеток, пилюль, капсул, драже, суппозиториях, эмульсий, суспензий, мазей, гелей и любых других лекарственных форм.

Конкретный уровень дозировок и частота приема лекарства для каждого конкретного пациента будет зависеть от большого числа факторов, включая активность конкретного производного фуллерена, метаболическую стабильность и длительность действия, скорость выделения, возраст пациента, вес тела, общее состояние здоровья, пол, лекарственные комбинации, а также тяжесть заболевания у данного индивида, подвергаемого лечению.

Для орального применения в виде суспензий композиции готовят согласно методам, широко известным в области приготовления фармацевтических рецептур, и они могут содержать микрокристаллическую целлюлозу или ее производные для обеспечения массы, альгиновую кислоту или альгинат натрия в качестве суспендирующего агента, метилцеллюлозу в качестве усилителя вязкости и подслащивающие агенты и/или отдушки, известные в этой области. В форме таблеток такие композиции могут содержать микрокристаллическую целлюлозу, кальций фосфат, крахмал, стеарат магния и лактозу и/или другие эксципиенты, связующие вещества, расширители, дезинтеграторы, разбавители и смазывающие вещества, известные в данной области.

При применении в виде назальных аэрозолей или путем ингаляции такие композиции готовят методами, хорошо известными в области фармацевтических рецептур, и они могут выпускаться в виде растворов на физиологическом растворе, с использованием бензойной кислоты или других подходящих консервантов, промоторов адсорбции для усиления биоприменимости, и/или других со-

любилизирующих или диспергирующих агентов, известных в данной области.

Растворы или суспензии для инъекций могут формироваться согласно известным методам, с использованием нетоксичных, парентерально применимых разбавителей или растворителей, таких как маннит, 1,3-бутандиол, вода, раствор Рингера или изотонический раствор хлористого натрия или подходящих диспергирующих или смачивающих и суспендирующих агентов, таких как стерильные, мягкие, устойчивые масла, включая синтетические моно- или диглицериды, или жирные кислоты, включая олеиновую кислоту.

При ректальном применении в виде свечей такие композиции могут готовиться путем смешивания лекарства с таким нераздражающим эксципиентом, как масло какао, синтетические глицеридные сложные эфиры или полиэтиленгликоли, которые являются твердыми веществами при обычных температурах, но сжижаются и/или растворяются в ректальной полости с выделением лекарства.

При местном применении в виде мазей, гелей, кремов, линиментов и т.д. такие композиции могут готовиться путем смешивания активных ингредиентов с приемлемой мазевой основой.

В качестве мазевой основы могут быть использованы жировые, углеводородные или гидрофильные основы, например вазелин, вазелиновое масло, парафин, воск, ланолин, полиэтиленгликоль и др.

В качестве основы для гелей могут быть использованы метилцеллюлоза, натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы, оксипропилцеллюлоза, полиэтиленгликоль или полиэтиленоксид, карбопол, поливинилпирролидон, поливиниловый спирт и т.д.

Предложенное изобретение касается соединений, способа получения этих соединений и их фармацевтически приемлемых ассоциатов с полярными реагентами. Полученные соединения не оказывают влияния на лейкопоз: не вызывают сдвига лейкоцитарной формулы и не индуцируют появление молодых форм нейтрофилов - нейтрофильных метамиелоцитов у подопытных животных (крыс и кроликов). С точки зрения безопасности (безвредности) это свидетельствует об отсутствии у данных соединений токсичности, вызывающей указанные изменения. Заявляемый способ позволяет получить различные по составу композиции на основе фуллеренаминокислот в зависимости от соотношения реагентов и условий проведения процесса, а именно: водорастворимые гидратированные фуллерен-аминокислоты общей формулы (II).

Способ основан на использовании в стадии синтеза оптимальных соотношений исходных реагентов, минимальных количеств органического растворителя и межфазного катализатора, с последующем выделением заявляемых соединений с использованием концентрированных растворов органических и минеральных кислот, что приводит к количественному получению фуллеренаминокислотных композиций определенного состава и возможности применения заявляемого способа для их промышленного синтеза, отличающегося эффективностью и экологичностью.

Технический результат предлагаемого технического решения состоит в получении устойчивых индивидуальных водорастворимых гидратированных соединений фуллерена C_{60} с аминокарбоновыми кислотами, не оказывающих токсического воздействия на организм. Разработан эффективный способ получения индивидуальных устойчивых гидратированных производных фуллерена, обла-

дающих противовирусной, противоопухолевой и противопсориатической активностью.

Заявляемое изобретение иллюстрируется следующими примерами.

5 Варианты осуществления изобретения

Пример 1. Получение гидрата N-фуллерен-(трис-ε-аминокапроновой кислоты) (по номенклатуре ИЮПАК - гидрат N-фуллерен-(трис-6-аминогексановой кислоты) формулы: $N-C_{60}(H)_3\{NH(CH_2)_5COOH\}_3 \cdot 10 H_2O$.

К раствору 60 г (0,08 моля) фуллерена C_{60} в 4,5 л о-дихлорбензола добавляют 204 г (1,2 молей) тонко измельченной безводной калийной соли ϵ -аминокапроновой кислоты. К полученной суспензии при перемешивании и нагревании не выше 60°C прибавляют в течение 2-х часов смесь о-дихлорбензола и метилового эфира полиэтиленгликоля 500 в соотношении 5:1. Реакционную смесь перемешивают при температуре не выше 60°C в течение 5 часов до полного обесцвечивания раствора и формирования твердого осадка. Затем смесь фильтруют, осадок на фильтре промывают несколькими порциями этилового спирта и высушивают в вакууме при температуре не выше 60°C . Выделенную смесь калиевых солей фуллеренаминогексановой кислоты и аминокетоксановой кислоты растворяют в 100 л дистиллированной воды. В раствор медленно при перемешивании добавляют 0,1N раствор соляной кислоты до pH 5,1. Смесь отстаивают до полного высаживания продукта, Затем водный слой декантируют. Осадок, представляющий собой тонкую взвесь твердого продукта в воде, центрифугируют и промывают водой до pH 6. Осадок высушивают при температуре не выше 60°C в вакуумном сушильном шкафу.

Выход продукта количественный и составляет 115 г.

Соединение представляет собой темно-коричневое твердое вещество, растворимое в воде, растворимое в смесях $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ - 1:10 и ДМФА: H_2O - 1:100.

5 По данным термогравиметрического анализа полученное соединение содержит 10 молей H_2O . При температуре 350°C происходит интенсивное разрушение комплекса. Остаток после разложения содержит фуллерен и продукты его окисления.

ИК-спектр продукта (I) содержит полосы поглощения, характерные для N-замещенных аминокислот: группа $-\text{COOH}-$ 1704 см^{-1} , 1658 см^{-1} , N-H-валентные колебания 3400 см^{-1} , N-H-деформационные- 1552 см^{-1} , полосы поглощения $\text{C}_{60}\text{-NH-R-}$ 1104 см^{-1} , 930 см^{-1} , 830 см^{-1} .

Электронный спектр поглощения не содержит полосы поглощения свободного фуллерена.

Элементный анализ соединения показывает следующие соотношения элементов: $\%\text{C}=72,75$; $\%\text{H}=4,70$; $\%\text{N}=2,32$; рассчитано для брутто-формулы $\text{C}_{78}\text{H}_{39}\text{O}_6\text{N}_3\cdot 10\text{H}_2\text{O}$: $\%\text{C}=72,38$, $\%\text{H}=4,3$, $\%\text{N}=3,24$.

Количество карбоксильных групп в продукте определялось по реакциям с солями металлов и аминами. По реакции с азотнокислым серебром количественно выделен комплекс состава $\text{C}_{60}(\text{H})_3\{\text{NH}(\text{CH}_2)_5\text{COOAg}\}_3\cdot 10\text{H}_2\text{O}$. (Найдено: $\%\text{Ag}=20,88$, $\%\text{C}=57,80$, $\%\text{N}=2,51$, $\%\text{H}=3,32$; рассчитано для: $\text{C}_{78}\text{H}_{36}\text{O}_6\text{N}_3\text{Ag}_3(10\text{H}_2\text{O})$ - $\%\text{Ag}=20,00$, $\%\text{C}=57,88$, $\%\text{N}=2,60$, $\%\text{H}=3,46$).

25 По реакции с трисамином получен водорастворимый комплекс состава $\text{C}_{60}(\text{H})_3\{\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{COO}^- \text{NH}_3^+\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3\}_3$ (найденно $\%\text{C}=64,88$, $\%\text{H}=4,56$, $\%\text{N}=5,08$, рассчитано для $\text{C}_{90}\text{H}_{72}\text{O}_{15}\text{N}_6\cdot 10\text{H}_2\text{O}$: $\%\text{C}=65,2$, $\%\text{H}=4,34$, $\%\text{N}=5,10$).

Пример 2. Получение гидрата N-фуллерен-(трис- ω -аминоэнантовой кислоты) (по номенклатуре ИЮПАК - гидрат N-фуллерен-(трис-7-аминогептановой кислоты) формулы: $\text{N-C}_{60}(\text{H})_3\{\text{NH}(\text{CH}_2)_6\text{COOH}\}_3 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$.

5 К раствору 72 г (0,1 моля) фуллерена C_{60} в 4 л о-дихлорбензола добавляют 182 г (1,2 молей) тонко измельченной безводной калийной соли ω -аминоэнантовой кислоты. К полученной суспензии при перемешивании и нагревании не выше 80°C прибавляют в течение 3-х часов смесь о-дихлорбензола и метилового
10 эфира полиэтиленгликоля 500 в соотношении 5:1. Реакционную смесь перемешивают при температуре не выше 80°C в течение 8 часов до полного обесцвечивания раствора и формирования твердого осадка. Затем смесь фильтруют, осадок на фильтре промывают несколькими порциями этилового спирта и высушивают в вакууме
15 при температуре не выше 60°C . Выделенную смесь калиевых солей фуллеренаминоэнантовой и аминокислот растворяют в 120 л дистиллированной воды. В раствор медленно при перемешивании добавляют 0,1Н раствор соляной кислоты до pH 5,1. Смесь отстаивают до полного высаживания продукта, затем водный слой
20 декантируют. Осадок, представляющий собой тонкую взвесь твердого продукта в воде, центрифугируют и промывают водой до pH 6. Осадок высушивают при температуре не выше 60°C в вакуумном сушильном шкафу.

Выход продукта количественный и составляет 130 г.

25 Соединение представляет собой темно-коричневое твердое вещество, растворимое в воде, растворимое в смесях $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ - 1:10 и ДМФА: H_2O - 1:100.

По данным термогравиметрического анализа полученное соединение содержит 8 молей H_2O . При температуре 450°C происходит интенсивное разрушение комплекса. Остаток после разложения содержит фуллерен и продукты его окисления.

5 ИК-спектр продукта содержит полосы поглощения, характерные для N-замещенных аминокислот: группа $-\text{COOH}-$ 1707 см^{-1} 1650 см^{-1} , N-H-вал.колебания - 3400 см^{-1} , N-H-деформационные - 1552 см^{-1} , полосы поглощения $\text{C}_{60}\text{-NH-R-}$ 1104 см^{-1} , 930 см^{-1} , 830 см^{-1} .

10 Электронный спектр поглощения содержит полосу поглощения при 260 нм .

Элементный анализ продукта показывает следующие соотношения элементов: $\%\text{C}=73,55$; $\%\text{H}=4,60$; $\%\text{N}=3,18$; рассчитанные значения для брутто-формулы $\text{C}_{81}\text{H}_{45}\text{O}_6\text{N}_3$ ($8\text{ H}_2\text{O}$) - $\%\text{C}=74,82$,
15 $\%\text{H}=4,69$, $\%\text{N}=3,23$.

По реакции с азотнокислым серебром выделена серебряная соль фуллеренаминокислоты, количественно доказывающая наличие трех аминокислотных фрагментов в составе полученного продукта.

20 Пример 3. Получение гидрата N-фуллерен-(трис-8-аминооктановой кислоты) формулы: $\text{N-C}_{60}(\text{H})_3\{\text{NH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}\}_3 \cdot 10\text{ H}_2\text{O}$.

Проводят аналогично примеру 1 только вместо тонко измельченной безводной калийной соли ϵ -аминокапроновой кислоты (ω -аминоэнантовой кислоты) используют калиевую соль аминокислотной кислоты. Анализ полученного соединения доказывает представляемый состав комплекса.

Была изучена противовирусная активность соединения в отношении ВИЧ, ВПГ, вируса гриппа, а также противоопухолевая активность. Соединение обладает высокой противоопухолевой и противовирусной активностью в отношении всех названных вирусов.

- 5 Ниже приведены лучшие примеры осуществления изобретения. В приведенных ниже примерах соединение, полученное способом, описанным в примере 1, названо по тексту препарат № 1 (фуллерен-трис-аминокапроновой кислоты гидрат).

10 Пример 4. Изучение активности фуллерен-трис-аминокапроновой кислоты в отношении вируса иммунодефицита человека.

Исследования проводились в ГУ НИИ вирусологии им. Д.И.Ивановского РАМН, г. Москва. В задачу исследований входило изучение активности препарата в отношении вируса иммунодефи-
15 цита человека.

К клеткам добавляли исследуемый препарат и инфицировали вирусом в дозе 0,01 ТЦИД₅₀/клетка. Инкубировали культуры клеток при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ и 98% влажности 4-5 дней. Учет результатов проводили окрашиванием клеток с помощью красителя и
20 световой микроскопии: исследование цитопатического эффекта вируса (ЦПД) и вирусиндуцируемого синцитийобразования (синцитий - конгломерат нескольких клеток с общей клеточной оболочкой, образовавшейся в результате слияния их мембран).

Степень цитодеструкции оценивали под микроскопом по об-
25 щепринятой четырехкрестовой системе знаками + или – соответственно количеству погибших клеток в каждой из четырех лунок, соответствующих одному исследуемому показателю.

++++ -100%^{ая} гибель клеток в четырех лунках, использованных в опыте на одно разведение

+++ - 75%^{ая} гибель клеток в каждой из четырех лунок,

++ - 50%^{ая} гибель клеток в каждой из четырех лунок,

5 + - 25%^{ая} гибель клеток в каждой из четырех лунок,

+ - начало дегенерации,

- - отсутствие цитодеструкции.

Результаты исследования представлены в таблицах 1-2.

Полученные данные (таблица 1, 2) показали, что препарат
10 № 1 обладает противовирусной активностью в отношении вируса иммунодефицита человека типа 1 в концентрации 1 – 10 мкг/мл. ЭК₅₀ (50%-эффективная концентрация) предлагаемого препарата 5,0 мкг/мл.

Пример 5. Изучение активности фуллерен-трис-
15 аминокaproновой кислоты в отношении вируса гриппа.

Исследования проводились в ГУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН, г. Москва. В задачу исследований входило изучение противовирусной активности препарата в культуре клеток MDCK в отношении вируса гриппа A/IV-Moscow/01/2009
20 (H1N1)_{swl}.

Препарат разводили в диметилсульфоксиде (ДМСО) (5 мг субстанции + 0,5 мл ДМСО) с последующим добавлением 4,5 мл среды для культур клеток MEM, получая т.о. сток в концентрации 1,0 мг/мл. В последующем проводили разведения стоков средой
25 MEM до рабочих концентраций 6,5 мкг/мл – 12,5 – 25,0 – 50,0 – 100 мкг/мл.

Определение противовирусной активности вещества проводили по снижению репродукции вируса гриппа в культуре клеток MDCK, выявляемой ИФА.

С этой целью клетки МДСК выращивали в 96-луночных планшетах до полного монослоя, отмывали от ростовой среды и вносили вещества в двукратной концентрации в 100 мкл среды MEM. Инфицирование вирусом в рабочей дозе 100-1000 ТЦИД₅₀ проводили в двух режимах: через 2 часа после внесения веществ и одномоментно. Планшеты инкубировали в термостате с CO₂ в течение 24 часов при 37°C. После инкубации среду удаляли и клетки фиксировали 80% ацетоном в PBS в течение 15 минут, хорошо высушивали и осуществляли постановку ИФА, проводя последовательно адсорбцию специфических реагентов – моноклональных антител, конъюгата и субстрата (ортофенилендиамин). Реакцию учитывали по оптической плотности при 492 нМ на спектрофотометре фирмы «Биоком». Каждое разведения вируса исследовали в 3-х повторях, для которых вычисляли среднее значение оптической плотности (ОП). Процент ингибирования определяли, как отношение между разницей ОП опыта и ОП клеточного контроля, разделенное на разницу ОП вирусного контроля и ОП клеточного контроля, умноженное на 100%. На основании полученных данных определены значения минимальной концентрации вещества, вызывающей 50,0% ингибирование вирусной репродукции (МИК₅₀).

Оценку подавления репродукции вируса гриппа А(Н1N1) проводили в 3-х опытах при разной множественности заражения. Результаты представлены в табл. 3 (протоколы 3-х опытов) и табл. 4 (средние значения полученных результатов 3-х опытов).

Как видно из таблицы 4, наибольшую активность по снижению репродукции вируса гриппа в культуре клеток MDCK проявила серия препарата 1. Четко прослеживается зависимость степени репродукции и концентрации препарата: с повышением концентрации – снижается репродукция вируса. Кроме того, значительных отличий в показателях при разных режимах инфицирования (через 2 часа после внесения препарата или одномоментно) не отмечено. При этом показатели минимальной ингибирующей репродукцию вируса в 2 раза концентрации (MIK_{50}), составили: в режиме внесения препарата за 2 часа – 9,5 мкг/мл и при одномоментном внесении – 12,5 мкг/мл. Расчет проведен при графическом построении полученных данных.

Таким образом, полученные результаты изучения активности разных серий препарата № 1 в отношении вируса гриппа A/HIV-Moscow/01/2009 (H1N1)_{sw1} выявили высокую активность подавления его репродукции в культуре клеток MDCK серией 1, при средней активности – серии 2. При этом режимы внесения препаратов за 2 часа до инфицирования или одновременно с инфицированием не влияли на их активность в культуре клеток MDCK.

Пример 6. Изучение противовирусной активности фуллерен-трис-аминокапроновой кислоты на модели гриппозной пневмонии мышей.

Исследования выполнялись в центре химии лекарственных средств (ЦХЛС - ВНИХФИ), г. Москва.

В работе использовали препарат № 1 в виде темно-коричневого порошка. Для перорального применения готовили необходимые дозы препарата, растворяя навески в 1% растворе крахмала, сваренного на воде. Для внутрибрюшинного и внутримышеч-

ного применения навески препарата № 1 растворяли в 1,5% растворе диметилсульфоксида.

В работе был использован вирус гриппа А/Аичи/2/69 (H3N2), адаптированный к мышам. Данный вирус широко используется для
5 определения эффективности противовирусных препаратов на модели гриппозной пневмонии мышей и был получен из музея вирусных штаммов и клеточных культур ГУ НИИ вирусологии РАМН. Для подготовки инфицирующего материала мышей заражали интраназально аллантоисным вирусом, после проявления признаков болез-
10 ни их забивали и в стерильных условиях получали гомогенат легочной ткани. Далее этот гомогенат использовали для заражения 10-дневных куриных эмбрионов, из которых получали аллантоисный вирус и после титрования на его мышах использовали для инфицирования животных.

15 Белых беспородных мышей (самки) массой 12-14 г получали из питомника «Андреевка» (Московская обл.) и содержали на стандартном рационе в регламентированных условиях вивария.

Предварительно взвешенные мыши (самки нелинейные, средний вес 12-14 г) инфицировались интраназально под легким эфир-
20 ным наркозом вирусом гриппа А/Аичи/2/69 (H3N2) (10ЛД₅₀ в 100 мкл). В предварительном опыте было проведено определение ЛД₅₀ путем титрования аллантоисного вируса на таких же мышах, которые затем использовались в основном опыте. Была использована следующая схема лечения исследуемым препаратом: за 24 часа до
25 инфицирования, за 1 час до инфицирования, через 24 часа и далее 1 раз в день через 24 часа в течение 5 дней. Для перорального введения использовали одноразовый инсулиновый шприц со специальной иглой (лаваж), каждую дозу вводили в объеме 100 мкл. Для

внутрибрюшинного и внутримышечного лечения также каждую дозу вводили в объеме 100 мкл. Группа вирусного контроля представляла собой 10 мышей, инфицированных вирусом, но не леченных препаратами. Также в опыте было две группы по 10 неинфицированных мышей, которым вводили внутрибрюшинно и внутримышечно по 100 мкл 1,5% DMSO, который использовался в качестве растворителя препаратов. В остальных группах также изначально было по 10 животных. За лечеными и контрольными животными велось ежедневное наблюдение, в первые 5 дней после инфицирования мыши взвешивались каждый день, далее – через день. Химиотерапевтическую активность препарата № 1 на модели гриппозной пневмонии мышей оценивали по трем критериям: показатель защиты от смертельной вирусной инфекции, увеличение средней продолжительности жизни и уменьшение снижения веса в группах животных, леченных препаратом по сравнению с контрольной группой.

Лечение препаратом № 1 было эффективно, уменьшая смертность мышей от гриппозной пневмонии и потерю их веса, и увеличивая среднюю продолжительность жизни по сравнению с вирусным контролем. Эффективность данного лечения зависела от дозы препарата и способа лечения. Эффективность перорального лечения фуллерен-трис-аминокапроновой кислотой гидрат увеличивалась с увеличением дозы препарата. Пероральное лечение препаратом № 1 было эффективно, увеличивая среднюю продолжительность жизни в 1,6 – 1,7 раз. Наиболее эффективным по всем трем параметрам (показатель защиты от смертности, средняя продолжительность жизни и потеря веса) было лечение фуллерен-трис-аминокапроновой кислотой гидрат внутримышечно, которое в до-

зах 100 и 200 мг/кг/день предотвращало гибель 70-80% зараженных животных и потерю их веса, а также увеличивало продолжительность их жизни почти в 2 раза.

Внутрибрюшинное лечение фуллерен-трис-аминокапроновой кислотой было эффективно только в дозах 50 и 100 мг/кг/день. Гибель животных, значительное снижение средней продолжительности жизни и веса мышей при внутрибрюшинном лечении их препаратом № 1 в дозе 200 мг/кг/день дают основание полагать, что данная доза при этом способе введения является токсичной для инфицированных мышей. Результаты представлены в таблицах 5 - 6.

Пример №7. Изучение протективной активности фуллерен-трис-аминокапроновой кислоты при экспериментальной летальной гриппозной инфекции у белых мышей, вызванной вирусами различного происхождения.

Исследования выполнялись в научно-исследовательском институте гриппа, г. Санкт-Петербург.

В работе использовали препарат № 1 в виде черного мелкодисперсного порошка. Навески препарата были растворены в среде для клеточных культур Игла MEM (БиолоТ, Санкт-Петербург, кат. № 1.3.3). Из полученного раствора были приготовлены серии разведений на среде MEM для определения противовирусной активности образцов в опытах на животных.

В качестве референс - препаратов использовали Ремантадин (1-(1-адамантил)-аминоэтил гидрохлорид, Aldrich Chem. Co., Milw., WI, cat. № 39.059-3) и Тамифлю (Этил(3R,4R,5S)-4-ацетамидо-5-амино-3-(1-этилпропокси)-1-циклогексен-1-карбоксилат фосфат, Hoffmann LaRoche, Швейцария).

Вирусы. В работе были использованы адаптированные к мышам вирусы гриппа следующих штаммов:

- A/Swine/1976/31 (H1N1) – свиного происхождения;
- A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) – человеческого происхождения
- 5 (ремантадин- устойчивый);
- A/Владивосток/2/09 (H1N1) - человеческого происхождения (Тамифлю- устойчивый). Вирусы пассировали в аллантоисной полости 10-12 дневных куриных эмбрионов в течение 48 часов при 36°C. Штамм A/Владивосток/2/09 (H1N1) предварительно адапти-
- 10 ровали к мышам путем трех пар чередующихся пассажей на животных и в куриных эмбрионах.

Для заражения животных была использована вируссодержащая аллантоисная жидкость куриных эмбрионов. Из нее готовили серию 10-кратных разведений на физиологическом растворе, после

15 чего инфекционная активность вируса в заражающем материале была определена в отдельном эксперименте при помощи титрования по летальности на животных. Титр вируса рассчитывали по методу Рида и Менча (Am.J.Hyg.,1938,27:493-497).

Белых беспородных мышей (самки) массой 14-16 г получали

20 из питомника «Рапполово» (Ленинградская обл.) и содержали на стандартном рационе в регламентированных условиях вивария НИИ гриппа РАМН. Подбор животных в группы опыта проводили методом случайной выборки. До начала испытаний животные находились под наблюдением 2 недели.

25 Исследуемые препараты вводили животным внутрибрюшинно в объеме 0,2 мл в следующих дозах: Препарат №1 – 300, 100 и 30 мг/кг, Ремантадин – 50 мг/кг, Тамифлю – 20 мг/кг веса животных. Препараты вводили по лечебно - профилактической схеме: за 24 ча-

са и 1 час до заражения и через 24, 48 и 72 часа после заражения. В качестве плацебо контрольной группе животных вводили физиологический фосфатный буфер. В качестве отрицательного контроля использовали интактных животных, которые содержались в тех же условиях, что и опытные группы.

Вирусы вводили животным интраназально под легким эфирным наркозом в дозе 1 и 10 LD₅₀. В каждую группу наблюдения брали по 25 мышей. На 3 день после заражения 10 животных из каждой группы умерщвляли, вскрывали и изолировали легкие. Из этих 10 легких 5 использовали для выделения вируса (замораживали и хранили при – 20 °С до постановки соответствующих экспериментов), оставшиеся 5 фиксировали 10% формалином и использовали для гистологического анализа (см. ниже).

Наблюдение за оставшимися животными осуществляли в течение 14 дней, т.е. срока, в течение которого при экспериментальном гриппе отмечается смертность животных. Ежедневно фиксировали смертность животных в контрольных и опытных группах. На основании полученных показателей смертности в каждой группе рассчитывали процент смертности (М, отношение числа павших за 14 дней животных к общему числу зараженных животных в группе), индекс защиты (IP, отношение разницы процентов смертности в контрольной и опытной группах к проценту смертности в контрольной группе) и среднюю продолжительность жизни животных (DL) из расчета 14 дней наблюдения.

Животных, выживших к 15 суткам после инфицирования, вскрывали и визуально оценивали обширность очагов постгриппозной пневмонии в легких. Размер очагов выражали в процентах от общей поверхности легких.

Клинические признаки заболевания были типичными для гриппозной инфекции и включали затрудненное дыхание, атаксию, тремор, а также снижение потребления корма и воды и как следствие, веса животных.

5 Данные по динамике смертности животных в контрольных и опытных группах суммированы в табл. 7 - 9.

Как видно из представленных результатов, вирус гриппа вызывал летальную инфекцию у белых мышей, сопровождающуюся гибелью животных начиная с 3-4 суток после инфицирования в за-
10 висимости от дозы вируса. Такой показатель, как продолжительность жизни животных, был связан с использованной дозой вируса обратной зависимостью. Ремантадин, использованный в опыте как референс - препарат, оказывал при этой инфекции весьма умеренное протективное действие, что проявлялось некоторым снижением
15 смертности в опытных группах по сравнению с контролем (индекс защиты 13-29 %) и незначительным увеличением продолжительности жизни (на 1,1 – 1,6 суток в зависимости от дозы вируса). Полученные данные, таким образом, согласуются с ранее полученными результатами экспериментов *in vitro* и *in vivo*, свидетельствующих о
20 нечувствительности использованного штамма вируса к ремантадину. Некоторый протективный эффект в этом случае можно объяснить антитоксическим действием препарата.

В то же время препарат сравнения Тамифлю проявлял выраженный защитный эффект, как снижая смертность в группах мы-
25 шей, получавших лечение (приблизительно на 70% по сравнению с контролем), так и увеличивая средний срок жизни животных (на 2-6 суток). Таким образом, использованный вирус оказался устойчив к ремантадину, однако чувствителен к Тамифлю.

При анализе полученных данных было обнаружено, что исследованный образец препарата по своим протективным свойствам приближался к препарату сравнения – Тамифлю (таблица 7).

Полученные результаты были подтверждены при использовании модели гриппозной пневмонии, вызванной двумя другими штаммами вируса гриппа. Данные этих опытов суммированы в таблицах 8 - 9.

Как видно из приведенных данных, активность химиопрепаратов в отношении использованных вирусов существенно различалась. Так, в отношении штамма гриппа А/Владивосток/2/09 этиотропный препарат Тамифлю оказался неактивен. Таким образом, ранее полученные данные об устойчивости этого изолята к Тамифлю были подтверждены в опытах на животных. В то же время активность исследуемого препарата против этого штамма оказалась весьма высокой, что, несомненно, следует рассматривать как преимущество препарата.

Показатель активности исследуемого препарата (индекс защиты – продление срока жизни) составил – 21-72 % и 0,8 – 4,4 сут., в зависимости от использованного штамма, инфицирующей дозы вируса и дозы препарата.

Для исследования влияния препарата № 1 на репликативную активность вирусов гриппа в ткани легких инфицированных животных на 3 сутки после заражения из легких животных были приготовлены гомогенаты, в которых затем определяли инфекционный титр вируса в культуре клеток. Данные об уровне репликации модельных вирусов гриппа в организме животных приведены в табл. 10.

Как можно заключить из представленных результатов, все три использованные вируса были способны эффективно реплицироваться в легочной ткани мышей, достигая к 3 суткам титров 3,4 – 6,4 $\log_{10} \text{EID}_{50}/20$ мг в зависимости от использованного штамма и инфицирующей дозы вируса. Применение химиопрепаратов – исследуемого препарата и препаратов сравнения – ограничивало размножение вируса в различной степени. Так, ремантадин не существенно (на 2-3 порядка) снижал инфекционную активность чувствительных вирусов A/Swine/1976/31 и A/Владивосток/2/09, однако не проявлял достоверной ингибирующей активности в отношении ремантадин- устойчивого штамма A/Puerto Rico/8/34. Тамифлю оказался активен против вирусов A/Swine/1976/31 и A/Puerto Rico/8/34. В то же время при тестировании его на модели устойчивого штамма A/Владивосток/2/09 было обнаружено некоторое снижение инфекционных титров вируса, однако отличия от контроля были недостоверными.

Препарат исследования проявлял существенную ингибирующую активность против всех исследованных вирусов. Уровень ее не превышал, однако оказался сопоставим с активностью препаратов сравнения – Ремантадина и Тамифлю. При использовании вирусов, устойчивых к химиопрепаратам, активность исследуемого препарата была значительно выше, чем активность Тамифлю против озельтамивир- устойчивого штамма A/Владивосток/2/09, и чем активность ремантадина против ремантадин-устойчивого штамма A/PR/8/34.

При изучении особенностей морфогенеза экспериментальной гриппозной инфекции при лечебно-профилактическом введении препарата № 1 в дозе 300 мг/кг было отмечено, что морфогенез ин-

фекционного процесса в легких животных, получавших препарат, во многом отличался от морфологических изменений в легких контрольных животных. Основное отличие на 3 сутки после инфицирования касалось характера воспалительного экссудата, а именно то, что при одинаковой его интенсивности в нем практически не отмечалось клеток в стадии распада, характерных для острой стадии гриппозной пневмонии. Клеточный компонент экссудата был представлен исключительно интактными нейтрофилами, лимфоцитами и макрофагами. Кроме того, серозный и геморрагический компоненты экссудата были также выражены слабее. Клетки бронхального эпителия выглядели более сохранными, чем у контрольных животных. Сами очаги воспаления занимали меньшую по сравнению с контролем площадь.

Те же тенденции отмечались и на стадии постгриппозной пневмонии. Очаги поражения легких были существенно ограничены в размерах, при морфологическом исследовании выявлялась умеренная метаплазия эпителия и инфильтрация интерстиция интактными нейтрофилами и круглоклеточными элементами. Следует отметить, что эффект препарата наблюдался при заражении животных любым из трех исследованных вирусов независимо от их чувствительности или устойчивости к препаратам сравнения.

Дополнительным критерием протективного действия препарата № 1 служила оценка размеров очагов хронических поражений легких у животных. Результаты этого теста приведены в табл. 11.

Как видно из приведенных результатов, все три вируса индуцировали формирование в легких стойких очагов хронических поражений, обнаруживаемых визуально у выживших животных на 15 суток после инфицирования. Препараты сравнения ремантадин и

Тамифлю – достоверно снижали протяженность очагов постгриппозной пневмонии, вызванной чувствительными к ним вирусами, и были неактивны в случае устойчивых штаммов. В то же время препарат № 1 достоверно снижал этот показатель независимо от использованного вируса.

Таким образом, показано, что при изученных концентрациях (300-30 мг/кг) препарат № 1 проявляет дозозависимую протективную активность на использованных моделях. Эта активность проявлялась в следующих показателях:

- 6 - 200-кратное снижение инфекционных титров вируса в ткани легких инфицированных животных;
- продление срока жизни зараженных животных (на 0,1 – 4,4 суток в зависимости от использованного штамма, дозы вируса, партии синтеза и дозы препарата);
- снижение специфической смертности в группах опыта на 7 – 72 % в зависимости от использованного штамма, дозы вируса, партии синтеза и дозы препарата;
- снижение в 2 - 4 раза средней протяженности очагов хронической постгриппозной пневмонии.

По совокупности показателей протективная активность препарата № 1 при некоторых дозах оказалась сопоставима с активностью препарата сравнения – ремантадина.

Полученные данные свидетельствуют о наличии у препарата № 1 высокой противогриппозной активности, в том числе в отношении штаммов свиного происхождения, а также в отношении вирусов, устойчивых к применяемым в клинике противогриппозным препаратам Ремантадину и Тамифлю.

Пример 8. Исследование противоопухолевой активности препарата фуллерен-трис-аминокапроновой кислоты на моделях солидной и асцитной форм карциномы Эрлиха у белых мышей.

Задачами настоящего исследования являлись:

- 5 - исследование эффекта препарата № 1 на динамику роста асцитной опухоли при внутрибрюшинном введении раковых клеток;
- исследование действия препарата № 1 на динамику роста солидной опухоли, исследование влияния препаратов на морфологию и морфометрические показатели солидной формы карциномы
- 10 Эрлиха;
- исследование действия препарата № 1 на апоптотическую активность клеток асцитной формы карциномы Эрлиха.

В работе использовали водный раствор препарата № 1 в двух дозах - в концентрациях 30 и 10 мг/кг. Животным вводили подкожно 0,2 мл раствора каждой из концентраций за 24 часа до инокуля-

15 ции и далее ежедневно в течение всего срока эксперимента. Конечные концентрации препарата составили 300 и 100 мг/кг веса.

В качестве препарата сравнения использовали Цисплатин – противоопухолевый препарат, применяемый в практике онкологической терапии человека. Цисплатин вводили однократно на 2 су-

20 тки после перевивки опухоли, учитывая его высокую токсичность. Конечная концентрация Цисплатина составила 5 мг/кг веса.

Эксперименты проводились на белых беспородных мышах средним весом 20 ± 3 г (животноводческая ферма Рапполово, Лен.

25 область).

Клетки карциномы Эрлиха были получены из музея клеточных линий НИИ онкологии и культивированы в брюшной полости белых мышей. Для этого 0,2 мл клеточной суспензии вводили жи-

вотным внутрибрюшинно. Через 7-10 дней после инокуляции животных умерщвляли, асцитную жидкость собирали через прокол брюшины, разводили физиологическим раствором в 10 раз и помещали на лед.

5 С целью моделирования солидной формы карциномы Эрлиха животным вводили подкожно в область правого бедра 0,2 мл клеточной суспензии в течение 40 минут после сбора асцитной жидкости, помещенной на лед. В ходе опыта в течение 28 дней, дважды в неделю начиная с 8 суток после инокуляции, проводили измерение
10 опухолевых узелков при помощи микрометра. Размер опухоли вычисляли умножением половины длины узелка на квадрат ширины и выражали в мм³. Фиксировали также смертность животных в контрольных и опытных группах. На 29 день после перевивки животных умерщвляли.

15 Для изучения влияния препаратов на асцитную форму опухоли животным вводили внутрибрюшинно 0,2 мл клеточной суспензии в течение не более чем 40 минут после сбора исходной асцитной жидкости. В ходе опыта проводили контроль веса мышей как показателя накопления асцитной жидкости в брюшной полости.
20 Наблюдение за животными осуществляли в течение 16 дней. На 17 день после перевивки животных умерщвляли.

Данные по динамике роста опухоли и смертности животных с асцитной формой карциномы в контрольной и опытных группах представлены в таблице 12.

25 Как видно из приведенных результатов, инокуляция опухолевых клеток в брюшную полость животных вызывала быстрое накопление в полости асцитной жидкости. Использование лечебных

препаратов имело выраженный терапевтический эффект и приводило к торможению накопления асцита.

Лечение животных предлагаемым препаратом и препаратом сравнения – Цисплатином – приводило к существенному торможению динамики увеличения веса животных. На поздних стадиях развития процесса эти различия достигали статистически значимых величин.

Влияние препарата на процессы апоптоза в клетках среднего размера и гранулярности асцитной формы карциномы Эрлиха у белых мышей приведены в таблицах 13 - 14.

Как следует из представленных результатов, лишь небольшая часть клеток в обеих опухолевых субпопуляциях находилась в стадии обратимого или необратимого апоптоза у контрольных животных. Применение цисплатина приводило к резкому возрастанию доли клеток в ранней стадии апоптоза среди иммунных клеток (табл. 13) и позднего апоптоза и некроза – среди опухолевых клеток (табл. 14).

Препарат № 1 действовал на уровне Цисплатина: подобно препарату сравнения, он стимулировал ранний апоптоз в иммунных клетках и поздний апоптоз – в субпопуляции опухолевых клеток. Живых (AnV⁺7AAD⁻) клеток опухоли при воздействии препарата практически не оставалось. По уровню индукции некроза в клетках опухоли он даже превосходил Цисплатин (30,2 % против 26,6 % для Цисплатина). Механизм противоопухолевого действия препарата № 1, как и действия Цисплатина, заключался в индуцировании апоптотических процессов в опухолевых и иммунных клетках, составляющих асцит. Процесс апоптоза шел избирательно и досто-

верно быстрее в клетках опухоли, чем в нейтрофилах и лимфоцитах, находящихся в асцитной жидкости.

Результаты цитофлюорометрического анализа позволяют говорить об избирательности действия препарата сравнения – Цис-
5 платина – на клетки опухоли по сравнению с нормальными лейкоцитами, также присутствующими в составе асцитной жидкости. На одном и том же сроке после введения препарата нормальные клетки, составляющие фракцию среднего размера и гранулярности – нейтрофилы, макрофаги, лимфоциты и др. – находились в стадии
10 раннего апоптоза, а опухолевые клетки – позднего (необратимого) апоптоза или некроза.

Данные по динамике развития солидной опухоли под действием исследуемого препарата и препарата Цисплатин в сравнении с контрольной группой животных представлены в таблице 15.

15 Как видно из представленных результатов, все использованные препараты в той или иной степени тормозили рост опухоли на протяжении всего опыта. В целом, наиболее выраженным противоопухолевым действием обладал Цисплатин. Достоверное ингибирование роста опухоли отмечалось при его применении вплоть до 17
20 суток после перевивки.

В то же время обе серии препарата также проявляли дозозависимый антитуморогенный эффект. Достоверное снижение размеров опухоли и торможение ее роста отмечалось до 8 суток эксперимента. В дальнейшем препараты также сдерживали рост опухоли на
25 всех сроках исследования, хотя различия с контролем и не достигали статистической достоверности. В целом следует отметить препарат № 1 в дозе 100 мг/кг веса как наиболее близкий по эффективности к Цисплатину практически на всех сроках эксперимента.

Полученные результаты не позволяют рассматривать препарат № 1 как ведущий препарат для направленной терапии онкологической патологии. Однако на основании этих данных можно говорить о нем как о перспективном для дальнейшей разработки
5 средстве комплексной терапии для совместного применения с другими противоопухолевыми препаратами, в особенности при асцитных формах опухолей.

Фармацевтические готовые формы предлагаемого препарата могут применяться орально, парентерально (включая подкожные
10 инъекции, внутривенные, внутримышечные, внутриягодичные инъекции или вливания), путем ингаляционного распыления или ректально для терапии или профилактики вирусных инфекций таких, как ВИЧ, герпес, грипп различного происхождения, а также в качестве противоопухолевых препаратов для проведения комплексной
15 терапии.

Соединения смешивают с обычными фармацевтическими носителями и эксципиентами и используют в форме таблеток, капсул, свечей, мазей, эмульсий, растворов, спреев. Следует отметить, что для приготовления растворов, спреев, а также мягких лекарственных
20 форм (мазей, свечей) соединения предварительно разводят в смеси ДМСО с водой.

Лечение инфекционных заболеваний путем воздействия фармацевтически приемлемых доз соединениями по формуле II осуществляется одновременно на несколько вирусов (в случае микст-
25 инфекций) и затрагивает различные стадии репликации вируса. Показано, что лечение сопровождается снижением стрессового эффекта на введение препарата, усилением антиоксидантной защиты организма от инфекций, выведением из организма токсинов. Инток-

сикация организма характерна для течения ряда вирусных инфекций и обуславливает тяжесть заболевания.

Возможны сочетания соединений формулы II с другими анти-
 вирусными агентами, иммуномодуляторами, противоинфекцион-
 5 ными агентами или вакцинами в различных комбинациях с любыми
 фармацевтическими составами, предназначенными для лечения.

Таблица 1

Исследование цитотоксичности предлагаемого препарата на модели
 лимфобластоидных клеток человека

Условия опыта, концентрация, мкг/мл		Жизнеспособность клеток, %	Количество кле- ток $\times 10^3/\text{мл}$
Контроль клеток		96	833
Препарат № 1	0,5	95	633
	1,0	94	599
	5,0	96	530
	10,0	92	500
	100	70	433

10

Таблица 2

Исследование противовирусной активности препарата № 1 на мо-
 дели клеток человека, инфицированных ВИЧ-1

Условия опыта	Концен- трация, мкг/мл	Жизнеспо- собность клеток, %	Количество клеток $\times 10^3/\text{мл}$	ЦПЭ/син- цитии (+)
Контроль клеток	0	96	833	0
Контроль вируса	0	20	83,5	4,0
Препарат № 1	0,5	27	133,2	4,0
	1,0	75	320,4	2,0
	5,0	92	480,0	0
	10	95	529,3	0

Таблица 3

Результаты изучения активности препарата № 1 в отношении вируса гриппа A/IIV-Moscow/01/2009 (H1N1)swl

Концентрации препаратов (мкг/мл)	Внесение препарата	Снижение (%) репродукции вируса гриппа в культуре клеток MDCK по отношению к контролю в присутствии серий предлагаемого препарата
6,25	за 2 часа до инфицирования	24,0 - 80,0 - 0
	одномоментно с инфицированием	54,0 - 21,0
12,5	за 2 часа до инфицирования	45,0 - 100 - 6,0
	одномоментно с инфицированием	78,0 - 37,0
25,0	за 2 часа до инфицирования	40,0 - 100 - 43,0
	одномоментно с инфицированием	88,0 - 35,0
50,0	за 2 часа до инфицирования	47,0 - 77,0 - 69,0
	одномоментно с инфицированием	96,0 - 43,0
100,0	за 2 часа до инфицирования	72,0 - 88,0 - 66,0
	одномоментно с инфицированием	69,0 - 76,0

Таблица 4

Результаты изучения активности препарата № 1 в отношении вируса гриппа A/HIV-Moscow/01/2009 (H1N1)sw1, средние показатели

Концентрации препаратов (мкг/мл)	Внесение препарата	Снижение (%) репродукции вируса гриппа в культуре клеток MDCK по отношению к контролю в присутствии серий предлагаемого препарата
6,25	за 2 часа до инфицирования	35,0
	одномоментно с инфицированием	38,0
12,5	за 2 часа до инфицирования	50,0
	одномоментно с инфицированием	58,0
25,0	за 2 часа до инфицирования	61,0
	одномоментно с инфицированием	62,0
50,0	за 2 часа до инфицирования	64,0
	одномоментно с инфицированием	70,0
100,0	за 2 часа до инфицирования	75,0
	одномоментно с инфицированием	73

Таблица 5

Эффективность фуллерен-трис-аминокапроновой кислоты гидрат на модели гриппозной инфекции у мышей

Доза препарата	Данные на 16 день наблюдения			Средняя продолжительность жизни (дни)**
	Выживаемость абсолютная (выжившие/общее)	Смертность (%)	Показатель защиты от смертности (%)	
Фуллерен-трис-аминокапроновой кислоты гидрат перорально				
100 мг/кг/день	5/10	50	40	10,4 (2-7 д., 1-9 д., 1-10д.)
200 мг/кг/день	7/10	30	60	13,0 (1-7д., 1-10д., 1-11д.)
Фуллерен-трис-аминокапроновой кислоты гидрат внутримышечно				
50 мг/кг/день	6/10	40	50	12,4 (1-7д., 1-9д., 2-11д.)
100 мг/кг/день	8/10	20	70	13,5 (1-8д., 1-9д.)
200 мг/кг/день	9/10	10	80	14,4 (1-10д.)
1,5% раствор DMSO	10/10	0		>16
Фуллерен-трис-аминокапроновой кислоты гидрат внутривенно				
50 мг/кг/день	5/10	50	40	11,5 (1-5д.,1-7д., 3-11д.)
100 мг/кг/день	5/10	50	40	11,0 (3-7д.,1-8 д., 1-11 д.)
1,5% раствор DMSO	10/10	0		>16
Вирусный контроль (10 LD ₅₀)	1/10	90		7,3 (5-7д., 4-8 д.)

Примечание: * - схема лечения: за 24 и 1 часа до заражения, далее через 24, 48, 72 и 96 часов после заражения

** Среднюю продолжительность жизни определяли по формуле $\sum f(d-1)/n$, где f-количество мышей умерших на день d (выжившие мыши включены в f и в этом случае равно 16), n-количество мышей в группе

Таблица 6

Изменение веса животных, зараженных вирусом гриппа А/Аичи/2/69 и леченных препаратом № 1

Доза препара- та	Изменение веса в % по дням после инфицирования									
	1 день	2 день	3 день	4 день	5 день	7 день	9 день	11 день	13 день	
Фуллерен-трис-аминокапроновая кислота перорально										
100 мг/кг/день	+12	+17	+23	+25	+24	+21	+23	+34	+44	
200 мг/кг/день	+15	+20	+23	+25	+24	+22	+25	+45	+57	
Фуллерен-трис-аминокапроновая кислота внутримышечно										
50 мг/кг/день	+9	+14	+21	+26	+30	+27	+38	+64	+74	
100 мг/кг/день	+13	+17	+23	+28	+31	+39	+65	+71	+82	
200 мг/кг/день	+11	+20	+26	+35	+39	+43	+51	+62	+70	
Фуллерен-трис-аминокапроновая кислота внутривбрюшинно										
50 мг/кг/день	+11	+17	+22	+25	+28	+35	+41	+67	+77	
100 мг/кг/день	+9	+15	+19	+21	+21	+27	+37	+50	+82	
Вирусный контроль	+18	+16	+9	+1	-8	+3	+56	+72	+74	

Таблица 7

Протективная активность фуллерен-трис-аминокапроновой кислоты на модели экспериментальной летальной гриппозной пневмонии, вызванной ремантадин- устойчивым вирусом гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1).

Препарат, доза	Доза виру- са, LD ₅₀	Кол-во животных в группе	Кол-во остав- шихся в жи- вых	Средняя про- должительность жизни (СПЖ), сут.	Смерт- ность, %	Индекс защиты, %	Увеличе- ние СПЖ, сут.
1	2	3	4	5	6	7	8
Препарат	10	14	8	11,3	42,9	49,4	3,2
№ 1,	1	15	12	13,7	20,0	57,1	1,3
300 мг/кг	Сумма доз	29	20	12,5	31,0	51,7	2,2
Препарат	10	15	6	11,3	60,0	29,1	3,2
№ 1,	1	15	12	13,9	20,0	57,1	1,6
100 мг/кг	Сумма доз	30	18	12,6	40,0	37,8	2,2
Препарат	10	15	4	10,4	73,3	13,3	2,3
№ 1,	1	14	9	13,3	35,7	23,5	1,0
30 мг/кг	Сумма доз	29	13	11,8	55,2	14,2	1,4

Продолжение табл. 7

1	2	3	4	5	6	7	8
Реманта- дин	10	15	4	9,7	73,3	13,3	1,6
	1	15	10	13,5	33,3	28,6	1,1
	Сумма доз	30	14	11,6	53,3	17,0	1,2
Тамифлю	10	15	11	13,5	26,7	68,5	5,5
	1	13	11	14,4	15,4	67,0	2,1
	Сумма доз	28	22	13,9	21,4	66,7	3,6
Контроль вируса	10	13	2	8,1	84,6	---	0,0
	1	15	8	12,3	46,7	---	0,0
	Сумма доз	28	10	10,4	64,3	---	0,0

Таблица 8

Протективная активность фуллерен-трис-аминокапроновой кислоты на модели экспериментальной летальной гриппозной пневмонии, вызванной вирусом гриппа A/swine/1976/31 (H1N1).

Препарат, доза	Доза вируса, LD ₅₀	Кол-во животных в группе	Кол-во оставшихся в живых	Средняя продолжительность жизни (СПЖ), сут.	Смертность, %	Индекс защиты, %	Увеличение СПЖ, сут.
1	2	3	4	5	6	7	8
Препарат № 1, 300 мг/кг	10	14	8	11,0	42,9	53,8	4,4
	1	14	11	13,6	21,4	59,8	3,0
	Сумма доз	28	19	12,3	32,1	55,6	3,7
Препарат № 1, 100 мг/кг	10	13	6	10,3	53,8	42,0	3,7
	1	15	11	13,1	26,7	50,0	2,5
	Сумма доз	28	17	11,8	39,3	45,7	3,1
Препарат № 1, 30 мг/кг	10	15	4	8,9	73,3	21,0	2,4
	1	15	9	12,3	40,0	25,0	1,7
	Сумма доз	30	13	10,6	56,7	21,7	1,9

Продолжение табл. 8

1	2	3	4	5	6	7	8
Ремантадин	10	15	9	11,8	40,0	56,9	5,2
	1	15	13	14,3	13,3	75,0	3,7
	Сумма доз	30	22	13,1	26,7	63,2	4,4
Тамифлю	10	13	8	11,0	38,5	58,6	4,4
	1	13	11	13,5	15,4	71,2	2,9
	Сумма доз	26	19	12,2	26,9	62,8	3,6
Контроль ви- руса	10	14	1	6,6	92,9	---	0,0
	1	15	7	10,6	53,3	---	0,0
	Сумма доз	29	8	8,7	72,4	---	0,0

Таблица 9

Протективная активность фуллерен-трис-аминокапроновой кислоты на модели экспериментальной летальной гриппозной пневмонии, вызванной озельтамивир устойчивым вирусом гриппа А/Владивосток/02/09 (H1N1).

Препарат, доза	Доза вируса, LD ₅₀	Кол-во животных в группе	Кол-во оставшихся в живых	Средняя продолжительность жизни (СПЖ), сут.	Смертность, %	Индекс защиты, %	Увеличение СПЖ, сут.
1	2	3	4	5	6	7	8
Препарат № 1, 300 мг/кг	2	13	10	13,8	23,1	61,5	2,4
	0,4	13	12	14,5	7,7	71,8	1,4
	Сумма доз	26	22	14,2	15,4	64,1	1,8
	2	12	8	13,3	33,3	44,4	1,9
Препарат № 1, 100 мг/кг	0,4	10	8	14,0	20,0	26,7	0,8
	Сумма доз	22	16	13,6	27,3	36,4	1,3
	2	12	7	13,2	41,7	30,6	1,8
Препарат № 1, 30 мг/кг	0,4	13	11	14,2	15,4	43,6	1,0
	Сумма доз	25	18	13,7	28,0	34,7	1,4

Продолжение табл. 9

1	2	3	4	5	6	7	8
Тамифлю	2	10	5	11,7	50,0	16,7	0,3
	0,4	9	7	13,4	22,2	18,5	0,3
	Сумма доз	19	12	12,5	36,8	14,0	0,2
Ремантадин	2	13	12	14,6	7,7	87,2	3,2
	0,4	13	13	15,0	0,0	100,0	1,8
	Сумма доз	26	25	14,8	3,8	91,0	2,5
Контроль вируса	2	10	4	11,4	60,0	---	0,0
	0,4	11	8	13,2	27,3	---	0,0
	Сумма доз	21	12	12,3	42,9	---	0,0

Таблица 10

Инфекционная активность вирусов гриппа в ткани легких белых мышей в условиях применения химиопрепаратов.

Препарат, доза	Инфекционный титр вируса ($\log_{10}EID_{50}/20$ мг ткани) при дозе вируса (LD_{50})					
	A/Swine/1976/31 (H1N1)		A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)		A/Владивосток/ 2/09 (H1N1)	
	1	5	1	5	0,4	2
Препарат № 1, 300 мг/кг	3,7±0,3	4,1±0,2	3,2±0,3	4,1±0,2	1,8±0,2	2,9±0,2
Реманта- дин	2,9±0,2	3,4±0,3	4,5±0,2	5,1±0,3	1,2±0,2	2,0±0,3
Тамифлю	3,1±0,1	3,8±0,3	2,2±0,4	2,4±0,3	2,5±0,2	3,1±0,3
Контроль вируса	6,0±0,0	6,4±0,2	4,9±0,3	5,5±0,2	3,4±0,4	4,0±0,3

Примечание: * - отличия от контроля достоверны при $p < 0,05$

Таблица 11

Инфекционная активность вирусов гриппа в ткани легких белых мышей в условиях применения химиопрепаратов

Препарат	Размер очагов хронической постгриппозной пневмонии (% от общей площади легких) при заражении вирусом (меньшая из использованных доз)		
	A/Swine/1976/31 (H1N1)	A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)	A/Владивосток/2/09 (H1N1)
Препарат № 1, 300 мг/кг	25±7	13±3	7±2
Ремантадин	16±5	32±7	10±2
Тамифлю	20±5	15±4	15±5
Контроль вируса	54±7	41±6	27±8

Примечание: * - отличия от контроля достоверны при $p < 0,05$

5

Таблица 12

Динамика веса животных с асцитной формой карциномы Эрлиха при лечении препаратами.

Срок после перевивки опухоли, сут.	Вес животных (г)		
	Используемый препарат		
	Препарат № 1	Цисплатин	Контроль без препаратов
1	18,6±2,3	19,1±2,5	19,2±2,7
3	18,8±2,2	19,3±2,7	19,3±2,7
5	18,8±1,9	19,4±2,5	19,5±2,8
8	19,4±1,7	19,8±2,2	20,0±2,7
10	19,9±1,7	20,7±2,4	20,8±2,7
13	20,4±1,5	21,4±1,5	21,9±2,6
15	20,4±1,4*	21,8±1,6	23,8±2,2

Примечание: * - отличия от контроля без препарата на соответствующем сроке достоверны при $p < 0,05$

Таблица 13

Препарат	Процент клеток с фенотипом					
	AnV ⁺ 7AAD ⁻ (живые клетки)	p	AnV ⁺ 7AAD ⁻ (ранний апоптоз)	p	AnV ⁺ 7AAD ⁺ (поздний апоптоз)	p
Препарат № 1	6,1±6,2	0,00	31,1±10,4	0,02	4,2±2,4	0,17
Цисплатин	55,2±11,0	0,00	41,1±11,3	0,00	3,5±2,4	0,07
Контроль без препаратов	82,6±7,7	-	9,7±6,3	-	6,6±2,9	-
						1,0±0,8
						0,11
						0,03
						-

Таблица 14

Влияние препаратов на процессы апоптоза в клетках крупного размера и гранулярности асцитной формы карциномы Эрлиха у белых мышей.

Препарат	Процент клеток с фенотипом					
	AnV ⁺ 7AAD ⁻ (живые клетки)	p	AnV ⁺ 7AAD ⁻ (ранний апоптоз)	p	AnV ⁺ 7AAD ⁺ (поздний апоптоз)	p
Препарат № 1	0,3±0,1	0,00	0,1±0,1	0,02	69,5±5,8	0,00
Цисплатин	0,4±0,2	0,00	0,3±0,3	0,02	72,8±10,9	0,00
Контроль без препаратов	89,6±7,3	-	3,6±2,8	-	6,7±4,8	-
						0,2±0,2
						0,01
						-

Таблица 15

Динамика размера солидной опухоли карциномы Эрлиха у белых мышей при лечении исследуемыми препаратами.

Препарат, доза (мг/кг веса)	Размер опухоли (мм ³), сутки после перевивки					
	8	13	17	21	24	28
Контроль	156,6	711,7	1250,3	1902,1	2296,5	2888,2
Препарат № 1, 300	72,7	416,3	1224,6	1703,4	2048,5	2525,7
Препарат № 1, 100	72,5	544,3	693,6	1250,8	1654,3	2239,8
Цисплатин	56,5	249,2	464,3	1071,9	1743,3	1269,4

Примечание: * - отличия от контроля без препарата достоверны при $p < 0,05$

- 5 Пример 9. Исследование хронической токсичности фуллерен-
(трис-аминокапроновой кислоты) гидрат на крысах при внутримы-
шечном введении в течении 30 дней.

Эксперимент проводился в ФГУН «Научно-
исследовательском центре токсикологии и гигиенической регла-
10 ментации биопрепаратов» (ФГУН НИЦ ТБП ФМБА России), г.
Серпухов.

Целью исследования явилась экспериментальная оценка
уровня и характера возможного повреждающего действия фулле-
рен-(трис-аминокапроновой кислота) гидрат на организм крыс при
15 внутримышечном введении в течении 30 дней.

Опыты проводили на крысах линии Вистар, приобретенных в
питомнике ГУ НЦБТ РАМН (филиал «Столбовая»). Содержание
животных соответствовало санитарным правилам, утвержденным
МЗ СССР 06.07.73 г., по устройству, оборудованию содержанию

экспериментально-биологических клиник (вивариев). Кормили животных натуральными и брикетированными кормами в соответствии с нормами, утвержденными приказом МЗ СССР № 755 от 12.08.77 г. Животные прошли карантин и акклиматизацию в условиях вивария в течение 5 дней.

Экспериментальные группы животных формировали методом случайной выборки с учетом массы тела в качестве ведущего показателя.

Исследуемую субстанцию вводили крысам внутримышечно ежедневно в течение 30 дней в дозах 3, 9 или 20 мг/кг в виде растворов различных концентраций в 20 % растворе диметилсульфоксида (ДМСО). Животным контрольных групп вводили 20 % раствор ДМСО. Рабочие растворы субстанции и ДМСО готовили ежедневно непосредственно перед применением. Вводимые объемы доз корректировали с учетом индивидуальной массы тела животного после каждого взвешивания. Каждая доза испытана на 20 животных (10 самок и 10 самцов).

Для оценки токсического действия фуллерен-(трис-аминокапроновая кислота) гидрата, через 24 часа после окончания курса введения субстанции, половину животных из каждой группы вывели из эксперимента для проведения гематологических, биохимических и патоморфологических исследований. Вторую половину опытных животных вывели из эксперимента после периода отмены введения субстанции и провели аналогичные исследования.

В период введения субстанции и в течение 14 дней после ее отмены ежедневно оценивали общее состояние и клинические симптомы интоксикации животных. Общее состояние животных оце-

нивали по их двигательной активности, потреблению корма и воды, состоянию шерсти и видимых слизистых оболочек, массе тела.

Гематологический анализ проводили с помощью полуавтоматического двухканального кондуктометрического счетчика клеток
5 Нема-screen 13 (Hospitex Diagnostics, Италия), а также с помощью световой микроскопии.

Биохимические показатели сыворотки крови определяли с помощью полуавтоматического анализатора «Stat Fax 3300».

Биохимические показатели мочи определяли с помощью полуавтоматического анализатора «Urisys 1100».
10

Морфологическое состояние внутренних органов животных определяли визуально при патологоанатомическом вскрытии и микроскопическим изучением гистологических препаратов (парафиновые срезы 4-5 мкм, окрашенные гематоксилином и эозином).

15 Статистическую обработку полученных результатов исследований проводили методами вариационной статистики по критерию Стьюдента.

1. Результаты исследований.

1.1. Результаты клинического наблюдения.

20 Крысам ежедневно в течение месяца внутримышечно вводили фуллерен-(трис-аминокапроновая кислота) гидрат в дозах 3, 9 или 20 мг/кг. На всех дозах клинические симптомы отравления отсутствовали, общее состояние животных опытных и контрольных групп не различалось. Прирост массы тела крыс в течение всего опыта в
25 экспериментальных группах достоверно не отличался от контроля (табл. 16).

Таблица 16

Масса тела крыс в период введения и отмены фуллерен-(трис-аминокапроновая кислота) гидрата

Дни наблю- дения	Контроль ДМСО	фуллерен-(трис-аминокапроновой ки- слота) гидрат, мг/кг		
		3	9	20
		Самцы (M ± m)		
0	196,6±3,3	193,6±3,4	196,6±4,2	193,4±4,1
7	231,8±4,4	224,6±5,2	233,6±7,4	227,0±5,0
14	271,4±5,3	255,6±6,9	270,4±10,6	266,6±5,7
21	291,0±5,3	273,6±7,6	290,0±14,4	288,2±6,8
28	314,4±5,9	291,2±9,5	307,6±15,9	306,6±8,1
35	336,0±10,2	307,2±14,9	346,4±13,7	333,6±8,7
42	342,8±13,2	315,6±16,8	360,4±12,1	349,6±9,5
		Самцы (M ± m)		
0	176,0±3,2	179,6±3,6	180,4±3,4	175,4±4,0
7	192,4±4,9	192,6±4,5	197,0±4,9	192,8±4,0
14	212,4±6,0	210,8±4,9	215,2±6,0	213,0±3,7
21	222,4±6,7	223,8±5,1	227,4±5,7	221,6±3,8
28	237,6±6,6	234,4±4,0	240,2±6,1	234,4±4,4
35	250,0±12,7	251,6±6,0	254,4±12,7	246,8±7,2
42	252,8±13,3	258,8±5,1	260,4±12,3	253,6±5,6

5 1.2. Результаты биохимического анализа сыворотки крови

По окончании введения фуллерен-(трис-аминокапроновая кислота) гидрата у самцов крыс показано достоверное снижение уровня мочевины на максимальной испытанной дозе (табл. 17). Показанные изменения концентрации холестерина на минимальной и средней дозе не связаны с действием исследуемой субстанции и не выходят за пределы физиологической нормы. У самок крыс показано незначительное, но достоверное повышение активности аланинаминотрансферазы на максимальной испытанной дозе. Выявленные изменения уровня глюкозы на минимальной дозе, концентрации общего белка и холестерина на средней дозе субстанции не

имеют дозовой зависимости и не выходят за пределы физиологической нормы.

Таблица 17

Биохимические показатели сыворотки крови крыс по окончании введения фуллерен-(трис-аминокапроновой кислоты) гидрата

Параметр, ед. измерения	Контроль (ДМСО)	фуллерен-(трис-аминокапроновой ки- слота) гидрат, мг/кг		
		3	9	20
Самцы (M ± m)				
1	2	3	4	5
Общий белок, г/л	95,6±9,59	86,88±5,28	102,1±34,65	82,08±9,28
Глюкоза, ммоль/л	6,28±0,29	6,88±0,73	6,4±1,02	7,0±1,26
Мочевина, ммоль/л	12,94±1,77	10,66±2,89	11,36±2,71	9,22±1,56*
Холестерин, ммоль/л	5,42±0,71	4,17±0,68*	3,88±0,75*	4,96±1,03
Билирубин, мкмоль/л	8,96±2,84	9,98±1,67	9,16±1,4	8,76±1,54
Креатинин, мкмоль/л	75,36±8,81	85,58±17,46	82,06±21,99	75,6±15,51
АлАТ, Е/л	15,52±3,17	17,12±1,2	14,62±4,22	14,04±3,01
АсАТ, Е/л	28,56±5,94	25,18±3,95	29,34±3,8	24,44±5,48
Щелочная фосфатаза, Е/л	343±89	333±48	300±56	283±67
Самки (M ± m)				
Общий белок, г/л	79,0±7,18	81,64±11,03	68,94±2,97*	83,16±11,75
Глюкоза, ммоль/л	5,64±0,72	7,64±1,56*	6,36±0,67	6,46±0,51
Мочевина, ммоль/л	9,88±1,8	8,0±4,04	10,02±1,46	9,48±1,86
Холестерин, ммоль/л	3,66±0,34	4,11±0,45	4,42±0,56*	4,16±0,88
Билирубин, мкмоль/л	7,52±2,86	10,96±2,14	9,46±2,26	7,18±0,95

Продолжение табл. 17

1	2	3	4	5
Креатинин, мкмоль/л	70,1±16,19	56,44±3,3	52,46±5,77	53,78±8,31
АлАТ, Е/л	10,52±1,01	10,7±1,57	12,52±2,11	13,52±1,4*
АсАТ, Е/л	22,75±1,37	27,51±5,11	24,02±2,64	21,47±3,09
Щелочная фосфатаза, Е/л	227±191	143±47	159±28	248±107

Примечание: «*» - статистически достоверно по t-критерию Стьюдента

Достоверное снижение концентрации креатинина на максимальной испытанной дозе показано по окончании периода отмены фуллерен-(трис-аминокапроновая кислота) гидрата у самцов и самок крыс. На этой же дозе показано изменение активности аспаратаминотрансферазы и у самцов и у самок крыс, однако, в случае самцов – это снижение активности, а у самок – повышение активности (табл. 18).

10

Таблица 18

Биохимические показатели сыворотки крови крыс после отмены введения фуллерен-(трис-аминокапроновая кислота) гидрата

Параметр, ед. измерения	Контроль (ДМСО)	фуллерен-(трис-аминокапроновой кислоты) гидрат, мг/кг		
		3	9	20
		Самцы (M ± m)		
1	2	3	4	5
Общий белок, г/л	70,08±7,11	67,20±7,60	68,06±7,27	66,58±2,67
Глюкоза, ммоль/л	6,04±0,56	6,54±1,03	7,18±0,80*	6,40±0,93
Мочевина, ммоль/л	7,52±0,74	7,96±1,05	7,14±1,59	8,52±0,99
Холестерин, ммоль/л	4,70±0,88	4,06±0,25	4,25±0,72	4,57±0,54
Билирубин, мкмоль/л	15,72±7,74	20,32±5,19	16,06±2,72	17,30±2,11

Продолжение табл. 18

1	2	3	4	5
Креатинин, мкмоль/л	57,46±12,35	51,10±7,11	48,12±10,16	41,86±4,09*
АлАТ, Е/л	22,44±2,31	21,18±5,54	21,52±2,68	24,38±2,22
АсАТ, Е/л	19,53±2,04	18,18±1,39	18,08±2,64	16,18±1,83*
Щелочная фосфатаза, Е/л	258±46	263±71	255±48	238±61
Самки (M ± m)				
Общий бе- лок, г/л	70,92±10,67	71,12±6,66	78,48±8,94	72,76±8,11
Глюкоза, ммоль/л	6,82±1,32	7,62±0,69	6,78±0,97	6,90±1,23
Мочевина, ммоль/л	8,46±1,15	7,20±2,43	7,94±1,25	9,4±2,93
Холестерин, ммоль/л	4,49±0,95	4,26±1,04	5,02±1,7	5,67±1,2
Билирубин, мкмоль/л	11,9±5,65	13,0±3,07	11,8±1,18	11,28±1,91
Креатинин, мкмоль/л	74,14±18,21	63,76±16,67	55,84±9,94	50,26±5,04
АлАТ, Е/л	16,52±3,23	14,36±5,02	14,44±2,86	17,82±3,11
АсАТ, Е/л	14,29±2,5	16,84±1,27	17,68±2,87	18,41±2,85*
Щелочная фосфатаза, Е/л	219±58	168±54	218±44	221±36

Примечание: «*» - статистически достоверно по t-критерию Стьюдента

Оценивая результаты анализа биохимических показателей сыворотки крови крыс, в период введения субстанции и после периода отмены введения, следует отметить, что величины вышеописанных изменений показателей сыворотки крови у самок и самцов крыс не выходят за пределы физиологического диапазона для вида животных.

1.3. Результаты гематологического анализа крови

По окончании введения фуллерен-(трис-аминокапроновая кислота) гидрата не выявлены изменения гематологических показате-

лей, связанные с исследуемой субстанцией. Так у самок крыс установлено незначительное снижение среднего объема эритроцита на средней дозе и некоторое увеличение доли ретикулоцитов на минимальной дозе (табл. 19). Данные изменения не выходят за границы физиологической нормы и не имеют дозовой зависимости.

Таблица 19

Гематологические показатели крови крыс по окончании введения фуллерен-(трис-аминокапроновой кислота) гидрата

Параметр, ед. измерения	Контроль (ДМСО)	фуллерен-(трис-аминокапроновой кислота) гидрат, мг/кг		
		3	9	20
	Самцы (M ± m)			
1	2	3	4	5
Гемоглобин, моль/дм ³	8,4±0,8	7,8±0,3	8,1±1,6	8,0±1,0
Эритроциты, млн/мм ³	5,7±1,0	6,0±0,6	6,0±0,9	6,3±0,7
Гематокрит, %	32,3±7,1	35,4±3,4	35,0±5,3	35,3±4,3
Ср. объем эритро., мкм ³	57,0±5,1	59,0±2,7	58,2±4,5	55,6±1,5
Ретикулоциты, %	3,8±0,8	4,0±0,6	3,8±0,9	4,4±0,8
Тромбоциты, тыс.	692,6±93,7	692,6±98, 2	699,8±181, 2	766,2±85, 1
Лейкоциты, тыс./мм ³ , в т.ч.:	22,9±4,1	22,8±1,5	24,6±5,2	23,3±3,8
Базофилы, %	0	0	0	0
Эозинофилы, %	0,8±1,1	0,8±1,1	1,0±1,2	0,8±1,1
Юные, %	0	0	0	0
Палочкоядерные, %	1,6±1,7	1,6±0,9	1,0±1,2	1,2±1,1
Сегментоядер- ные, %	24,4±3,6	28,4±7,8	21,5±4,4	24,4±3,8
Лимфоциты, %	67,6±5,0	64,8±5,8	71,0±2,6	68,0±5,1
Моноциты, %	5,6±2,2	4,8±2,3	5,5±1,9	5,6±0,9
	Самки (M ± m)			
Гемоглобин, моль/дм ³	8,0±0,2	7,7±0,6	7,8±0,9	8,1±1,0

Продолжение табл. 19

1	2	3	4	5
Эритроциты, млн/мм ³	5,4±0,6	6,0±0,8	6,3±0,7	6,3±0,8
Гематокрит, %	32,0±2,3	32,8±5,2	34,4±3,2	35,7±4,0
Ср. объем эритроц., мкм ³	59,6±3,1	57,8±5,0	55,0±1,9*	57,4±3,6
Ретикулоциты, %	5,1±0,5	6,6±0,5*	4,9±0,3	4,8±0,3
Тромбоциты, тыс.	538,4±126,8	439,0±104,0	505,0±75,7	542,4±91,2
Лейкоциты, тыс./мм ³ , в т.ч.:	21,7±8,4	21,4±4,7	20,4±8,8	19,7±3,2
Базофилы, %	0	0	0	0
Эозинофилы, %	1,6±1,7	2,0±2,0	2,0±2,4	1,2±1,1
Юные, %	0	0	0	0
Палочкоядерные, %	2,0±1,4	1,2±1,1	0,8±1,1	1,6±0,9
Сегментоядерные, %	21,2±5,0	20,8±5,4	18,8±5,0	18,4±3,6
Лимфоциты, %	69,8±3,3	70,4±4,6	72,4±5,2	73,2±4,1
Моноциты, %	5,4±0,9	5,6±1,7	6,0±1,4	5,6±0,9

Примечание: «*» - статистически достоверно по t-критерию Стьюдента

Изучение гематологических показателей крыс по окончании периода отмены фуллерен-(трис-аминокапроновая кислота) гидрата не выявило достоверных отличий между контрольными и опытными животными (табл. 20).

Таблица 20

Гематологические показатели крови крыс после отмены введения фуллерен-(трис-аминокапроновой кислота) гидрата

Параметр, ед. измерения	Контроль (ДМСО)	фуллерен-(трис-аминокапроновой кислота) гидрат, мг/кг		
		3	9	20
		Самцы (M ± m)		
1	2	3	4	5
Гемоглобин, моль/дм ³	7,9±0,7	8,3±3,7	7,9±0,3	7,4±0,8
Эритроциты, млн/мм ³	6,3±0,6	6,5±1,2	6,4±0,5	6,3±0,8
Гематокрит, %	33,0±2,6	33,7±1,7	34,1±2,1	31,2±3,5
Ср. объем эритроц., мкм ³	52,8±2,5	52,0±1,6	53,4±4,6	50,4±1,5
Ретикулоциты, %	4,0±0,6	4,3±1,1	4,0±0,3	4,2±0,5
Тромбоциты, тыс.	496,6±48,9	445,6±55,8	479,8±43,8	447,0±86,9
Лейкоциты, тыс./мм ³ , в т.ч.:	22,5±3,6	22,0±6,8	19,6±2,5	24,8±6,2
Базофилы, %	0	0	0	0
Эозинофилы, %	0,8±1,1	0,8±1,1	0,8±1,1	0,8±1,1
Юные, %	0	0	0	0
Палочкоядерные, %	1,6±1,7	1,6±0,9	1,6±1,7	1,2±1,1
Сегментоядерные, %	24,4±3,6	28,4±7,8	21,6±3,8	24,4±3,8
Лимфоциты, %	67,6±5,0	64,8±5,8	71,0±2,2	68,0±5,1
Моноциты, %	5,6±2,2	4,8±2,3	5,0±2,0	5,6±0,9
	Самки (M ± m)			
Гемоглобин, моль/дм ³	8,1±0,6	7,7±0,7	8,2±0,3	8,5±0,6
Эритроциты, млн/мм ³	5,9±0,7	5,8±0,3	6,3±0,5	6,4±0,6
Гематокрит, %	31,7±3,8	32,3±3,2	32,9±2,0	32,9±2,2
Ср. объем эритроц., мкм ³	54,4±1,7	55,2±4,6	52,4±1,5	52,2±3,4
Ретикулоциты, %	4,6±0,6	4,4±0,5	4,3±0,5	4,5±0,4
Тромбоциты, тыс.	459,8±86,0	462,4±95,1	453,0±67,3	470,8±34,8

Продолжение табл. 20

1	2	3	4	5
Лейкоциты, тыс./мм ³ , в т.ч.:	21,6±2,6	17,8±4,0	20,1±3,5	18,1±2,5
Базофилы, %	0	0	0	0
Эозинофилы, %	2,0±1,4	1,8±1,8	1,8±1,8	2,0±1,4
Юные, %	0	0	0	0
Палочкоядерные, %	1,4±1,3	1,6±1,7	1,2±1,1	1,4±1,3
Сегментоядерные, %	20,8±3,3	22,0±2,4	22,0±3,2	22,8±3,8
Лимфоциты, %	70,6±3,7	69,2±3,6	69,4±4,4	68,4±4,1
Моноциты, %	5,2±1,3	5,4±0,9	5,6±1,1	5,4±0,9

1.4. Результаты анализа мочи

По окончании периода введения фуллерен-(трис-аминокапроновая кислота) гидрата выявлено повышение рН мочи в 5 группе самцов на дозе 9 мг/кг (табл. 21). Уровень изменившегося показателя не выходит за рамки физиологической нормы, дозовая зависимость отсутствует.

После периода отмены введения фуллерен-(трис-аминокапроновая кислота) гидрата в группе самок на дозе 20,0 10 мг/кг отмечено понижение относительной плотности мочи в сравнении с контрольной группой животных. В группах самцов в этот же период наблюдаются статистически достоверные изменения в сравнении с контрольной группой: при дозе 3,0 мг/кг - повышение показателя рН, при дозе 9,0 мг/кг – повышение относительной 15 плотности мочи. Оба показателя не выходят за границы физиологической нормы и не имеют дозовой зависимости (табл. 22).

Таблица 21

Показатели мочи крыс по окончании введения фуллерен-(трис-аминокапроновая кислота) гидрата

Доза (мг/кг)	Относи- тельная плотность	рН	Количество животных с показателем, выходящим за пределы нормы							
			Лейко- циты кл./мкл	Нитриты мкмоль/л	Белок г/л	Глюкоза ммоль/л	Кетоно- вые тела ммоль/л	Уробили- ноген мкмоль/л	Билирубин мкмоль/л	Эритроци- ты кл./мкл
Самцы										
0	1,023±0,005	6,3±0,4	2	1	4	0	4	2	1	5
3,0	1,024±0,005	6,3±0,7	3	3	5	0	4	4	1	5
9,0	1,016±0,006	6,9±0,2*	4	1	3	1	2	0	0	5
20,0	1,023±0,004	6,3±0,7	5	1	4	0	2	2	0	5
Самки										
0	1,019±0,006	6,6±0,2	3	2	2	0	0	0	0	4
3,0	1,020±0,003	6,6±0,2	3	1	1	0	1	1	0	4
9,0	1,017±0,007	6,8±0,2	2	3	3	0	0	1	1	4
20,0	1,016±0,008	6,4±0,5	2	1	1	0	1	0	0	5

Примечание: «*» - статистически достоверно по t-критерию Стьюдента

Таблица 22

Показатели мочи крыс после отмены введения фуллерен-(трис-аминокапроновая кислота) гидрата

Доза (мг/кг)	Относительная плотность	pH	Количество животных с показателем, выходящим за пределы нормы							
			Лейкоциты кл./мкл	Нитриты мкмоль/л	Белок г/л	Глюкоза ммоль/л	Кетоновые тела ммоль/л	Уробилиноген мкмоль/л	Билирубин мкмоль/л	Эритроциты кл./мкл
Самцы										
0	1,019±0,005	6,0±0,0	1	0	2	0	0	0	0	4
3,0	1,001±0,005	6,6±0,4*	3	0	2	0	0	0	0	5
9,0	1,025±0,001*	5,6±0,5	4	0	5	0	4	4	0	5
20,0	1,027±0,014	6,0±0,6	4	0	3	0	2	2	0	5
Самки										
0	1,020±0,007	6,2±1,3	1	0	3	0	0	0	0	1
3,0	1,011±0,005	7,2±0,4	2	0	1	0	0	0	0	3
9,0	1,019±0,008	6,1±1,0	2	0	1	0	2	0	0	2
20,0	1,008±0,002*	7,0±0,0	1	0	0	0	0	0	0	4

Примечание: «*» - статистически достоверно по t-критерию Стьюдента

1.5. Результаты патоморфологического исследования

При патологоанатомическом вскрытии, проведенном после окончания периода внутримышечного введения фуллерен-(трис-аминокапроновая кислота) гидрата при внешнем осмотре и исследовании не было установлено различий между крысами подопытных и контрольных групп: шерстяной покров был гладкий, блестящий, кожа эластичная, подвижная, подкожная клетчатка умеренно выражена, видимые слизистые оболочки бледные, чистые, без изъязвлений и посторонних наложений, патологические выделения из естественных отверстий тела отсутствовали. При вскрытии грудной и брюшной полостей отмечалось анатомически правильное расположение внутренних органов. Макроскопически различимых признаков патологии внутренних органов не установлено. При рассечении скелетных мышц заднебедренной группы (место введения) у животных, получавших фуллерен-(трис-аминокапроновая кислота) гидрат во всех испытанных дозах, отмечали коричневатую окраску мышечной ткани, фасций и жировых прослоек. У животных контрольной группы такой окраски указанных тканей не было обнаружено.

При анализе массовых коэффициентов внутренних органов животных после периода внутримышечного введения фуллерен-(трис-аминокапроновая кислота) гидрата не было установлено различий между крысами подопытных и контрольной групп (табл. 23).

Таблица 23

Массовые коэффициенты внутренних органов крыс после периода внутримышечного введения фуллерен-(трис-аминокапроновая кислота) гидрата

До- за, мг/к г	Массовые коэффициенты органов, г/кг массы тела животного						
	сердце	легкие	печень	селезен- ка	почки	тимус	семен- ники
Самцы							
0	4,3±0,4	8,9±1,3	36,5±3,3	6,1±1,6	7,1±0,2	1,8±0,2	11,1±1,0
3,0	4,0±0,7	8,3±1,7	35,8±1,8	6,0±0,7	7,1±0,7	1,6±0,4	10,4±1,3
9,0	3,8±0,6	8,3±1,4	36,6±4,8	6,3±0,7	7,2±0,3	1,3±0,5	9,7±1,1
20,0	4,3±0,3	8,6±0,3	39,8±4,4	5,8±1,8	7,6±0,4	1,4±0,4	11,1±0,9
Самки							
0	3,8±0,5	9,3±1,0	39,9±2,1	6,3±1,8	7,3±0,5	2,2±0,6	-
3,0	3,9±0,7	9,4±1,0	37,9±2,5	6,7±1,0	7,8±0,5	1,9±0,3	-
9,0	3,8±0,6	9,9±0,7	39,8±2,9	6,6±0,8	7,8±0,5	1,6±0,5	-
20,0	3,8±0,6	10,1±1,5	43,0±4,1	6,6±1,3	8,6±0,8	1,6±0,7	-

- 5 При микроскопическом исследовании проводили сравнительную оценку гистопатологической картины органов и тканей животных, получавших фуллерен-(трис-аминокапроновая кислота) гидрат в максимальной дозе, и крыс контрольной группы. При анализе в
- 10 обеих группах были выявлены отдельные патологические изменения, которые обнаруживали в основном в легких, печени и почках (табл. 24). Степень обнаруженных изменений незначительно варьировала внутри групп, но в основном соответствовала слабой либо умеренной. Учитывая отсутствие какой-либо альтернативной или
- 15 пролиферативной реакции в участках обнаруженных изменений в органах, а также большое количество случаев острого полнокровия кровеносных сосудов в них, наиболее вероятной причиной их появ-

ления является индивидуальная реакция животных на общую анестезию и ингаляцию углекислого газа при эвтаназии. Основываясь на примерно одинаковой частоте встречаемости установленных патологических изменений в подопытной и контрольной группах, можно сделать вывод об отсутствии их индуцирования исследуемой субстанцией. В связи с этим, указанные изменения рассматривались нами как фоновые.

В месте введения фуллерен-(трис-аминокапроновая кислота) гидрата – скелетной мышце – были обнаружены изменения как воспалительного характера (небольшие очаги кровоизлияний, очаги сдавленных и отечных мышечных волокон, инфильтрация лимфоидными клетками пространства между отдельными мышечными волокнами и пучками волокон), так и регенеративного (участки рыхлой или плотной соединительной ткани с вновь образованными сосудами). Данные изменения оказались присущи и контрольной группе крыс. Описанная картина характерна для многократной повторяющейся травмы в результате внутримышечных инъекций, в данном исследовании – не зависимо от введенного вещества.

Таблица 24
 Результаты микроскопического анализа морфологических изменений в органах и тканях крыс после 30 дней внутримышечного введения фуллерен-(трис-аминокапроновая кислота) гидрат

Вещество	растворитель				фуллерен-(трис-аминокапроновая кислота) гидрат			
Доза (мг/кг)	0				20			
Пол	Самцы	Самки	Самцы	Самки	Самцы	Самки	Самцы	Самки
Количество животных в группе	5	5	5	5	5	5	5	5
Количество выживших	5	5	5	5	5	5	5	5
Орган/ ткань	Животные с изменениями							
	Инд. №	Кол- во	Инд. №	Кол- во	Инд. №	Кол- во	Инд. №	Кол- во
легкое	11,12	2	2,5	2	-	-	-	-
	14,15	2	4	1	72,74	2	61,62	2
	11	1	-	-	72	1	61,62	2
	11,12,13,14,15	5	2,4,5	3	74	1	-	-
	12,13,14,15	4	1	-	72,73,74,75	4	62,64,65	3
печень	12,13,14,15	4	-	-	74,75	2	61	1
	11,13	2	2	1	71	1	63,64,65	3
	11,12,13,14,15	5	2,3,4,5	4	71,72,73,74,75	5	61,63,64,65	4
почка	11,12,13,14,15	5	2,3,4,5	4	71,72,73,74,75	5	61,63,64,65	4
	-	-	-	-	-	-	-	-
легкое	12	1	1,2	2	-	-	61	1
	11,12,13	3	3,5	2	71,72,73	3	65	1

При патологоанатомическом вскрытии после периода отмены введения фуллерен-(трис-аминокапроновая кислота) гидрата при внешнем осмотре и исследовании не было выявлено различий между крысами подопытных и контрольных групп. Коричневого окрашивания тканей в месте предыдущих инъекций фуллерен-(трис-аминокапроновая кислота) гидрата не обнаружено. При статистическом анализе массовых коэффициентов органов не было установлено значимых различий между подопытными и контрольными животными (табл. 25).

10

Таблица 25

Массовые коэффициенты внутренних органов крыс после периода отмены введения фуллерен-(трис-аминокапроновая кислота) гидрата

Доза, мг/кг	Массовые коэффициенты органов, г/кг массы тела животного						
	сердце	легкие	печень	селезенка	почки	тимус	семенники
Самцы							
0	3,9±0,4	7,5±1,9	38,5±3,8	4,8±0,6	6,5±0,5	1,7±0,3	9,5±1,0
3,0	4,1±0,4	7,1±0,5	32,2±1,8	5,2±0,7	6,5±0,4	1,2±0,4	9,7±1,2
9,0	4,0±0,6	7,0±0,5	38,6±4,0	5,3±1,1	7,1±0,4	1,6±0,5	9,8±1,0
20,0	3,3±0,4	7,8±0,6	37,6±1,4	5,1±0,6	7,0±0,6	1,3±0,5	10,5±1,5
Самки							
0	3,7±0,4	8,7±1,8	35,0±4,2	5,5±1,6	6,7±0,7	1,7±0,4	-
3,0	3,5±0,7	8,7±0,7	33,9±3,9	4,7±0,5	7,2±0,5	1,7±0,3	-
9,0	4,1±0,3	8,6±0,7	36,9±2,0	5,7±1,4	8,0±1,1	1,4±0,4	-
20,0	3,8±0,9	8,1±0,9	38,2±3,8	5,6±0,4	6,8±0,2	1,3±0,3	-

При микроскопическом исследовании гистологических препаратов органов обнаруженные изменения по характеру и степени выраженности в основном соответствовали описанным после курса введения фуллерен-(трис-аминокапроновая кислота) гидрата, и также, примерно в одинаковой степени, были присущи животным

15

подопытных и контрольной групп (табл. 26). Поэтому и в данном случае был сделан вывод об отсутствии индуцирования выявленных изменений исследуемой субстанцией.

В месте введения исследуемого и контрольного веществ –
5 скелетной мышце - установлены однотипные для подопытных и контрольных животных изменения: немногочисленные тонкие вытянутые участки полностью сформированной плотной волокнистой соединительной ткани, расположенные либо вдоль мышечных волокон, либо – под острым углом к ним. Такая морфологическая картина свидетельствует об отсутствии различий в скорости и характере процесса заживления в местах инъекций растворителя и фуллерен-(трис-аминокапроновая кислота) гидрата.
10

Таким образом, в результате проведенного патологоанатомического исследования морфологических признаков, связанных с
15 воздействием или отменой фуллерен-(трис-аминокапроновая кислота) гидрата, не установлено.

Таблица 26

Результаты микроскопического анализа морфологических изменений в органах и тканях крыс после периода отмены введения фуллерен-(трис-аминокапроновая кислота) гидрата

Вещество	растворитель				фуллерен-(трис-аминокапроновая кислота) гидрат			
Доза (мг/кг)	0				20			
Пол	Самцы	Самки	Самцы	Самки	Самцы	Самки	Самцы	Самки
Количество животных в группе	5	5	5	5	5	5	5	5
Количество выживших	5	5	5	5	5	5	5	5
Орган/ ткань	Животные с изменениями							
Морфологические изменения	Инд. №	Кол- во	Инд. №	Кол- во	Инд. №	Кол- во	Инд. №	Кол- во
легкое	Утолщение межальвеолярных перегородок (тотальное)	17,18,20	3	-	79	1	-	-
	Утолщение межальвеолярных перегородок (очаги)	19	1	9	76,77,78,80	4	66	1
	Полнокровие сосудов	16,18,19	3	6,7,8,9,10	76,77,78	3	66,67,68,69,70	5
	Полнокровие альвеолярных капилляров	18,19	2	7,8,9	-	-	66,70	2
	Сужение просвета бронхов	17,18,19,20	4	-	78,79,80	3	-	-
	Участки эмфизематозного расширения альвеол	17,20	2	-	-	-	-	-
печень	Перисосудистая лимфоидная инфильтрация	-	-	8	-	-	69	1
	Полнокровие синусоидных капилляров	16,17,18,19,20	5	6,7,8,9,10	76,77,78,79,80	5	66,67,68,69,70	5
	Полнокровие венозных сосудов	16,17,18,19,20	5	6,7,8,9,10	76,77,78,79,80	5	66,67,68,69,70	5
почка	Мелкие очаги межканальцевой лимфоидной инфильтрации	16,17,18,19	4	7,9,10	76,77,79,80	4	70	1

Закключение. На протяжении всего периода введения фуллерен-(трис-аминокапроновая кислота) гидрата крысам и периода отмены введения субстанции не было отмечено признаков изменения клинического состояния животных. Введение фуллерен-(трис-аминокапроновая кислота) гидрата не сказывалось на поведении, состоянии шерстяного покрова, видимых слизистых оболочек и приросте массы тела подопытных животных.

Длительное в течение 1 месяца внутримышечное введение фуллерен-(трис-аминокапроновая кислота) гидрата крысам не оказывало влияния на показатели периферической крови. Отмена введения исследуемой субстанции также не вызывала изменений показателей крови.

По окончании введения фуллерен-(трис-аминокапроновая кислота) гидрата у самцов крыс показано достоверное в пределах физиологической нормы снижение уровня мочевины на максимальной испытанной дозе (20 мг/кг), а у самок крыс показано незначительное, но достоверное повышение активности аланинаминотрансферазы. Снижение концентрации креатинина на максимальной испытанной дозе показано по окончании периода отмены исследуемой субстанции у самцов и самок крыс.

При анализе результатов исследования мочи крыс после периода отмены введения фуллерен-(трис-аминокапроновая кислота) гидрата в группе самок на дозе 20 мг/кг отмечено понижение относительной плотности мочи в сравнении с контрольной группой животных.

В результате проведенного патологоанатомического исследования не установлено признаков повреждающего действия фуллерен-(трис-аминокапроновая кислота) гидрата на организм крыс по

сле одного месяца внутримышечного введения в дозах 20 мг/кг массы тела.

Таким образом, в результате проведенного исследования не установлено существенных признаков повреждающего действия
фуллерен-(трис-аминокапроновая кислота) гидрата на организм
крыс как после 30 дней внутримышечного введения в дозах до 20
мг/кг тела, так и по окончании периода отмены.

Пример 10. Исследование острой токсичности фуллерен-
(трис-аминокапроновой кислоты) гидрат на лабораторных живот-
ных при однократном внутримышечном введении.

Эксперимент проводился в ФГУН «Научно-
исследовательском центре токсикологии и гигиенической регла-
ментации биопрепаратов» (ФГУН НИЦ ТБП ФМБА России),
г. Серпухов.

В задачи исследования входило определение переносимых и
токсических доз, а также изучение характера возможного повреж-
дающего действия на организм лабораторных животных субстан-
ции при однократном внутримышечном введении.

Опыты проводили на белых беспородных мышах и крысах
линии Вистар из питомника ГУ НЦБМТ РАМН. Содержание жи-
вотных соответствовало санитарным правилам, утвержденным МЗ
СССР 06.07.73 г., по устройству, оборудованию и содержанию экс-
периментально-биологических клиник (вивариев). Кормили живот-
ных ad libitum экструдированным комбикормом ПК-120-1, приго-
товленным по ГОСТ Р 50258-92. Животные прошли карантин и
акклиматизацию в условиях вивария в течение не менее 10 дней.

Экспериментальные группы животных формировали методом случайной выборки с учетом массы тела в качестве ведущего показателя.

5 Растворы тестируемого вещества в 20 % водном растворе ДМСО для введения животным готовили в асептических условиях *tempora*. Растворы фасовали в соответствующие промаркированные флаконы и до введения хранили при температуре 2-6 °C не более 2 часов.

10 Субстанцию вводили мышам и крысам внутримышечно в дозах 5, 50 и 500 мг/кг. Максимальные испытанные дозы лимитированы максимально допустимыми объемами внутримышечного введения для мышей и крыс. Животным контрольных групп вводили 20 % водный раствор в таком же объеме, как и максимальные дозы субстанции.

15 Вводимые объемы корректировали с учетом индивидуальной массы тела животного.

В период наблюдения (в течение 14 дней после введения) оценивали общее состояние животных по их двигательной активности, потреблению корма и воды, состоянию шерсти и слизистых
20 оболочек, массе тела.

После окончания периода наблюдения проводили патолого-анатомическое вскрытие мышей и крыс, получавших субстанцию в дозе 500 мг/кг и контрольное вещество (растворитель). Умерщвление животных производили ингаляцией углекислого газа. Патолого-
25 гоанатомическое исследование осуществляли в течение 1 часа после эвтаназии животных. Морфологическое состояние внутренних органов животных определяли визуально при вскрытии.

Статистическую обработку полученных результатов исследований проводили методами вариационной статистики по критерию Стьюдента.

Результаты исследований. На всех испытанных дозах клинические симптомы отравления животных отсутствовали. В период наблюдения гибели не было, общее состояние животных опытных и контрольных групп не различалось. Животные охотно поедали корм, равномерно прибавляли в весе; статистически достоверных различий среднегрупповых значений массы тела животных подопытных групп относительно контрольных групп не выявлено (табл. 27, 28).

Таблица 27

Масса тела мышей

Доза субстанции, мг/кг	Масса тела животных, г ($M \pm SD$)		
	0 день	7 день	14 день
самцы			
0 (растворитель)	22,7 \pm 1,4	24,3 \pm 1,5	25,9 \pm 1,7
5	23,0 \pm 2,9	24,1 \pm 2,9	25,4 \pm 2,5
50	22,4 \pm 2,1	23,7 \pm 2,4	25,4 \pm 2,5
500	22,6 \pm 2,2	24,2 \pm 1,8	26,2 \pm 1,8
самки			
0 (растворитель)	19,1 \pm 1,5	20,8 \pm 1,3	23,3 \pm 1,3
5	19,1 \pm 2,0	20,6 \pm 2,0	22,8 \pm 2,0
50	18,6 \pm 1,5	19,9 \pm 1,7	21,9 \pm 1,8
500	18,9 \pm 1,0	20,7 \pm 0,7	22,8 \pm 1,1

Установлено, что ЛД₅₀ субстанции при внутримышечном введении для мышей и крыс обоего пола превышает максимальную испытанную дозу – 500 мг/кг.

Таблица 28

Масса тела крыс

Доза субстанции, мг/кг	Масса тела животных, г ($M \pm SD$)		
	0 день	7 день	14 день
самцы			
0 (растворитель)	187±21,4	232±30,5	283±33,5
5	188±12,5	228±18,1	276±17,8
50	190±14,3	228±17,0	279±18,3
500	189±14,1	207±19,3	258±24,1
самки			
0 (растворитель)	162±15,3	185±17,4	212±20,6
5	163±15,5	183±15,0	206±17,0
50	165±17,5	177±17,5	201±15,8
500	160±8,1	169±8,0	198±10,3

Патологоанатомическое вскрытие мышей и крыс проводили
 5 через 14 дней после однократного внутримышечного введения суб-
 станции. Поскольку ни в одной из групп животных, независимо от
 введенной дозы вещества, за период наблюдения гибели не было,
 некропии подвергали только мышей и крыс, получивших субстан-
 цию в максимальной дозе 500 мг/кг, а также животных контроль-
 10 ных групп. Умерщвление животных производили ингаляцией угле-
 кислого газа.

При внешнем осмотре мышей и крыс в подопытных и кон-
 трольных группах отмечали общую картину: шерстяной покров был
 гладкий, блестящий; кожа эластичная, подвижная, подкожная клет-
 15 чатка умеренно выражена, видимые слизистые оболочки бледные,
 без изъязвлений и посторонних наложений, патологические выде-
 ления из естественных отверстий тела отсутствовали.

При патологоанатомическом вскрытии также не установлено
 различий между мышами и крысами всех подопытных и контроль-
 20 ных групп. Органы грудной и брюшной полостей имели анатомиче-

ски правильное расположение и нормальную макроструктуру; каких-либо патологических изменений обнаружено не было. В месте введения субстанции – мышца бедра - признаков повреждения не обнаружено.

- 5 Таким образом, в результате проведенного патоморфологического исследования не установлено признаков повреждающего действия субстанции при однократном внутримышечном введении мышам и крысам в дозах до 500 мг/кг.

 Заключение. Установлено, что все испытанные дозы субстанции не вызывали интоксикации и гибели подопытных животных. Значения ЛД₅₀ фуллерен-(трис-аминокапроновая кислота) гидрата для мышей и крыс превышают максимальную испытанную дозу – 500 мг/кг и, таким образом, превышают максимальную разовую терапевтическую для человека дозу (2,9 мг/кг) более чем в 170 раз.

15 Различий видовой и половой чувствительности к субстанции в дозах до 170-кратных эквитерапевтических не установлено. Субстанция не обладает местным раздражающим действием при однократном внутримышечном введении.

 Таким образом, фуллерен-(трис-аминокапроновая кислота) гидрат имеет высокий терапевтический индекс и не может вызывать острые отравления при случайной передозировке.

20

Формула изобретения

1. Гидратированные N-фуллерен-аминокислоты общей формулы
 $C_{60}(H)_3\{NH(CH_2)_nCOOH\}_3 \cdot xH_2O$, где C_{60} – фуллерен, $n = 5, 6, 7$,
5 $x = 8 - 10$.
2. Способ получения соединения по п. 1 характеризующийся тем,
что фуллерен подвергают взаимодействию с 15-кратным моль-
ным избытком безводных калиевых солей аминокислот общей
формулы $NH_2(CH_2)_nCOOH$, где $n = 5, 6, 7$ в среде ароматическо-
10 го растворителя при медленном добавлении к полученной суспензии межфазного катализатора, при перемешивании и нагревании до температуры не выше $60-80^0C$ до полного обесцвечивания раствора и формирования твердого осадка, представляющего собой калиевые соли полученных фуллереновых производных аминокислот, с его последующим выделением, раство-
15 рением в воде для получения 0,8 М водного раствора, который обрабатывают 0,1Н раствором органической или минеральной кислоты с последующим центрифугированием, промывкой и высушиванием осадка.
- 20 3. Способ по п. 2, отличающийся тем, что безводные калиевые соли аминокислот используют в мелкодисперсном состоянии, а выделение твердого осадка калиевых солей фуллереновых производных аминокислот осуществляют фильтрованием, промывкой этиловым спиртом и высушиванием.
- 25 4. Способ по любому из пп. 2, 3, отличающийся тем, что в качестве межфазного катализатора используют метиловый эфир полиэтиленгликоля молекулярной массой 400 или 500.

5. Фармацевтическая композиция, обладающая активностью против вируса герпеса, вирусов гриппа различной природы, ВИЧ, а также противоопухолевой и противопсориатической активностью, содержащая в качестве активного вещества соединение по п. 1 в эффективном количестве.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/RU 2012/000063

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <div style="text-align: center; font-weight: bold;">see supplemental sheet</div> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>				
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07C 229/50, 227/14, A61K 31/197, A61P 31/16, 31/18, 31/22, 35/00, 17/06				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) STN, PatSearch, RUPAT, EARUPATIS, Esp@cenet, PAJ, USPTO, CIPO, DEPATIS, PCT Online				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
A	RU 2236852 C1 (ZAKRYTOE AKTSIONERNOE OBSHESTVO "DESKO") 27.09.2004 [on-line] Found from the Internet, the claim, the abstract, p. 5, left col., lines 48-62, p. 5, right col., lines 51-55	1-5		
A	RU 2316320 C1 (RASNETSOV LEV DAVIDOVICH) 10.02.2008 [on-line] Found from the Internet, p. 3, lines 43-49, the claims, the abstract	1-5		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.				
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top; border: none;"> * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top; border: none;"> "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family </td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search 25 April 2012 (25.04.2012)		Date of mailing of the international search report 11 May 2012 (11.05.2012)		
Name and mailing address of the ISA/ Facsimile No.		Authorized officer Telephone No.		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/RU 2012/000063

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07C 229/50 (2006.01)

C07C 227/14 (2006.01)

A61K 31/197 (2006.01)

A61P 31/16 (2006.01)

A61P 31/18 (2006.01)

A61P 31/22 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 17/06 (2006.01)

ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ

Номер международной заявки

PCT/RU 2012/000063

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ <i>C07C 229/50 (2006.01)</i> <i>C07C 227/14 (2006.01)</i> <i>A61K 31/197 (2006.01)</i> <i>A61P 31/16 (2006.01)</i> <i>A61P 31/18 (2006.01)</i> <i>A61P 31/22 (2006.01)</i> <i>A61P 35/00 (2006.01)</i> <i>A61P 17/06 (2006.01)</i>			
Согласно Международной патентной классификации МПК			
В. ОБЛАСТЬ ПОИСКА Проверенный минимум документации (система классификации с индексами классификации) C07C 229/50, 227/14, A61K 31/197, A61P 31/16, 31/18, 31/22, 35/00, 17/06			
Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в поисковые подборки			
Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины) STN, PatSearch, RUPAT, EARUPATIS, Esp@cenet, PAJ, USPTO, CIPO, DEPATIS, PCT Online			
С. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ:			
Категория*	Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей Относится к пункту №		
A	RU 2236852 C1 (ЗАКРЫТОЕ АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО "ДЕСКО") 27.09.2004 [он-лайн] Найдено из esp@cenet, формула, реферат, с. 5, левая кол., строки 48-62, с. 5, правая кол., строки 51-55 1-5		
A	RU 2316320 C1 (РАСНЕЦОВ ЛЕВ ДАВИДОВИЧ) 10.02.2008 [он-лайн] Найдено из esp@cenet, с. 3, строки 43-49, формула, реферат 1-5		
<input type="checkbox"/> последующие документы указаны в продолжении графы С. <input type="checkbox"/> данные о патентах-аналогах указаны в приложении			
<table border="0"> <tr> <td> * Особые категории ссылочных документов: "А" документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным "Е" более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее "L" документ, подвергающий сомнению притязание(я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано) "O" документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию и т.д. "P" документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета </td> <td> "T" более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение "X" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности "Y" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда документ взят в сочетании с одним или несколькими документами той же категории, такая комбинация документов очевидна для специалиста "&" документ, являющийся патентом-аналогом </td> </tr> </table>		* Особые категории ссылочных документов: "А" документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным "Е" более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее "L" документ, подвергающий сомнению притязание(я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано) "O" документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию и т.д. "P" документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета	"T" более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение "X" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности "Y" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда документ взят в сочетании с одним или несколькими документами той же категории, такая комбинация документов очевидна для специалиста "&" документ, являющийся патентом-аналогом
* Особые категории ссылочных документов: "А" документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным "Е" более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее "L" документ, подвергающий сомнению притязание(я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано) "O" документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию и т.д. "P" документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета	"T" более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение "X" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности "Y" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда документ взят в сочетании с одним или несколькими документами той же категории, такая комбинация документов очевидна для специалиста "&" документ, являющийся патентом-аналогом		
Дата действительного завершения международного поиска 25 апреля 2012 (25.04.2012)	Дата отправки настоящего отчета о международном поиске 11 мая 2012 (11.05.2012)		
Наименование и адрес ISA/RU: ФИПС, РФ, 123995, Москва, Г-59, ГСП-5, Бережковская наб., 30-1 Факс: (499) 243-33-37	Уполномоченное лицо: О. Заварзина Телефон № (495) 531-64-81		