PCT

ВСЕМИРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ
Международное бюро

ВОИС

МЕЖДУНАРОДНАЯ ЗАЯВКА, ОПУБЛИКОВАННАЯ В СООТВЕТСТВИИ
С ДОГОВОРОМ О ПАТЕНТНОЙ КООПЕРАЦИИ (PCT)

(51) Международная классификация изобретения [6]: A61K 38/14, A23L 1/30	A1	(11) Номер международной публикации: **WO 98/46251** (43) Дата международной публикации: 22 октября 1998 (22.10.98)

(21) Номер международной заявки: PCT/RU98/00102

(22) Дата международной подачи: 9 апреля 1998 (09.04.98)

(30) Данные о приоритете:

97105213	11 апреля 1997 (11.04.97)	RU
97106270	11 апреля 1997 (11.04.97)	RU

(71)(72) Заявители и изобретатели: КАЛЮЖИН Олег Витальевич [RU/RU]; 117418 Москва, ул. Цурюпы, д. 3, НИИ морфологии человека Российской Академии медицинских наук (RU) [KALJUZHIN, Oleg Vitalievich, Moscow (RU)]. ШКАЛЕВ Михаил Владимирович [RU/RU]; 117418 Москва, ул. Цурюпы, д. 3, НИИ морфологии человека Российской Академии медицинских наук (RU) [SHKALEV, Mikhail Vladimirovich, Moscow (RU)].

(74) Агент: МИНАЕВ Алексей Алексеевич; 117218 Москва, ул. Кржижановского, д. 20/30, корп. 5, офис 115, Центр «ЮНТЕКС» (RU) [MINAEV, Alexei Alexeevich, Tsentr «JUNTEX», Moscow (RU)].

(81) Указанные государства: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, евразийский патент (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), европейский патент (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), патент ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), патент OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Опубликована

С отчетом о международном поиске.

С изменённой формулой изобретения.

(54) Title: IMMUNOMODULATOR AND PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS WITH ANTITUMOR PROPERTIES, AND A FOOD ADDITIVE

(54) Название изобретения: ИММУНОМОДУЛЯТОР И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ, ОБЛАДАЮЩАЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТЬЮ, И ПИЩЕВАЯ ДОБАВКА

(57) Abstract

The invention proposes the use of α and/or β-glycosides N-acetylmuramil-L-alanyl-D-isoglutamine /CH_3-/CH_2/$_n$-muramildipeptide (MDP) as an immunomodulator, as well as pharmaceutical compositions with antitumor properties that include an effective quantity of α and/or β-glycosides muramildipeptide (MDP) and physiologically acceptable carriers. The dosage of the active ingredient in the form of a drug is of 0.0001-100 mg/kg in weight when administered perorally, of 0.00001-30 mg/kg in weight when administered intravenously, and of 0.00001-10 mg/kg in weight in the case of a lyposomal administration. This invention also relates to a preparation formulated on the basis of α and/or β-glycosides MDP/CH_3-/CH_2/$_n$-MDP/ which activates the main immunity bonds. The invention further proposes the use of α and/or β-glycosides N-acetylmuramil-L-alanyl-D-isoglutamine as a food additive.

(57) Реферат

Предложено применение α и/или β -гликозидов N -ацетил-мурамил -L -аланил -D -изоглутамин /CH_3-/CH_2/n -МДП/ в качестве иммуномодулятора и фармацевтическая композиция, обладающая противоопухолевой активностью, содержащая эффективное количество α и/или β-гликозидов МДП и физиологически приемлемые наполнители. Доза активного вещества в лекарственной форме для перорального введения 0,0001-100 мг/кг веса, для внутривенного введения 0,00001-30 мг/кг веса и липосомальной форме 0,00001-10 мг/кг веса.

Препарат на основе α и/или β -гликозидов МДП /CH_3-/CH_2/n -МДП/ активирует основные звенья иммунитета.

Предложено применение α и/или β-гликозидов N -ацетил-мурамил -L -аланил -D- изоглутамина в качестве пищевой добавки.

ИСКЛЮЧИТЕЛЬНО ДЛЯ ЦЕЛЕЙ ИНФОРМАЦИИ

Коды, используемые для обозначения стран-членов РСТ на титульных листах брошюр, в которых публикуются международные заявки в соответствии с РСТ.

AT	**Австрия**	**FI**	**Финляндия**	**MR**	**Мавритания**
AU	**Австралия**	**FR**	**Франция**	**MW**	**Малави**
BB	**Барбадос**	**GA**	**Габон**	**NE**	**Нигер**
BE	**Бельгия**	**GB**	**Великобритания**	**NL**	**Нидерланды**
BF	**Буркина Фасо**	**GN**	**Гвинея**	**NO**	**Норвегия**
BG	**Болгария**	**GR**	**Греция**	**NZ**	**Новая Зеландия**
BJ	**Бенин**	**HU**	**Венгрия**	**PL**	**Польша**
BR	**Бразилия**	**IE**	**Ирландия**	**PT**	**Португалия**
CA	**Канада**	**IT**	**Италия**	**RO**	**Румыния**
CF	**Центральноафриканская Республика**	**JP**	**Япония**	**RU**	**Российская Федерация**
		KP	**Корейская Народно-Демократическая Республика**	**SD**	**Судан**
BY	**Беларусь**			**SE**	**Швеция**
CG	**Конго**	**KR**	**Корейская Республика**	**SI**	**Словения**
CH	**Швейцария**	**KZ**	**Казахстан**	**SK**	**Словакия**
CI	**Кот д'Ивуар**	**LI**	**Лихтенштейн**	**SN**	**Сенегал**
CM	**Камерун**	**LK**	**Шри Ланка**	**TD**	**Чад**
CN	**Китай**	**LU**	**Люксембург**	**TG**	**Того**
CS	**Чехословакия**	**LV**	**Латвия**	**UA**	**Украина**
CZ	**Чешская Республика**	**MC**	**Монако**	**US**	**Соединенные Штаты Америки**
DE	**Германия**	**MG**	**Мадагаскар**		
DK	**Дания**	**ML**	**Мали**	**UZ**	**Узбекистан**
ES	**Испания**	**MN**	**Монголия**	**VN**	**Вьетнам**

ИММУНОМОДУЛЯТОР И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ, ОБЛАДАЮЩАЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТЬЮ И ПИЩЕВАЯ ДОБАВКА.

Область техники.

Изобретение относится к медицине, в частности касается препаратов, которые позволяют производить коррекцию иммунитета живого организма и представляют собой высокоэффективные иммуномодуляторы, а также относится к области приготовления пищи, а конкретно - к пищевым добавкам, обладающим профилактическим и лечебным действи м.

Предшествующий уровень.

В настоящее время в комплексной терапии опухолевых заболеваний большое внимание уделяется реактивации защитных реакций организма. С этой целью используются препараты, способные усиливать противоопухолевый ответ-иммуномодуляторы. Среди большого числа эндогенных и экзогенных иммуномодуляторов особое место занимает *N*-ацетил-мурамил-*L*-аланил-*D*-изоглютамин /мурамилдипептид, МДП/.

Известно, что мурамилдипептид способен активировать основные звенья иммунитета, в частности, противоопухолевого ответа. Не обладая высокой гидрофильностью, он быстро выводится из организма, а также обладает довольно высокой пирогенностью. Дифильные производные МДП как правило эффективнее стимулируют туморостатическую и туморицидную активность макрофагов, длительнее задерживаются в организме и обладают меньшей пирогенностью.

Из научно-технической литературы известны и описаны химические соединения - гликозиды *N*-ацетилмурамил-*L*-аланил-*D*--изоглутамина /CH_3-/CH_2/$_n$-МДП/ /Земляков А.Е. и Чирво В.Л. XУ Украинская республиканская конференция по органической химии. Тезисы доклада, Ужгород, 1986, с.409/.

Известны пищевые добавки, вводимые в пищу и обеспечивающие лечебно-профилактическое воздействие на различные функции организма человека, в том числе применяются для этой цели и производные пептидов - β-лактоглобулин, прогламин, α-поли-*L*--лизин и пр./см. ЕР №0540462, кл.A23 *L* 1/305, 1990 и DE, заявка № 4040874, кл. A23 *L* 1/03, 1990/.

Раскрытие изобретения.

Изобретение решает задачу поиска веществ, эффективных для коррекции иммунитета в случаях серьёзных иммунодефицитов и представляющих собой иммуномодуляторы, а также создание новой добавки, которая, будучи введена в пищу, действует в организме как иммуномодулятор и противоопухолевое средство.

Поставленная задача решена тем, что предложена группа изобретений, объединенных общим изобретательским замыслом.

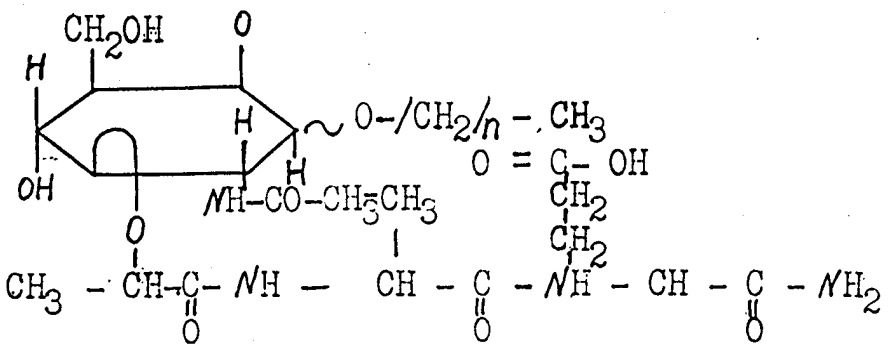
В качестве иммуномодулятора предлагается применение по новому назначению α и β-гликозидов МДП /CH_3-/CH_2/$_n$ -МДП/. На основе данного иммуномодулятора создана фармацевтическая композиция, обладающая противоопухолевой активностью, включающая эффективное количество активного соединения α и/или β-гликозидов МДП /CH_3-/CH_2/$_n$-МДП фармацевтически приемлемый наполнитель.

Фармацевтическая композиция предназначена для внутривенного, подкожного и внутримышечного введения и содержит активное соединение в дозе от 0,00001 до 30мг/кг веса. При этом композиция может быть в липосомальной форме при содержании активного соединения в дозе от 0,00001 до 10 мг/кг веса.

Фармацевтическая композиция может быть выполнена в форме для перорального введения и содержит активное соединение в дозе от 0,0001 до 100 мг/кг веса.

В качестве пищевой добавки применяют α и/или β-гликозиды *N*-ацетилмурамил - *L*-аланил - *D*-изоглутамин. Его сокращённое название: α и/или β-гликозиды-МДП или CH_3-/CH_2/$_n$МДП.

Структурная формула вещества:



Экспериментальные исследования показали, что амфильный препарат β-гептилгликозид -МДП/C_7H_{15} МДП/ активирует основные звенья иммунитета эффективнее МДП и ряда производных, в том числе липофильного гомолога β-гексадецилгликозид-МДП /$C_{16}H_{33}$МДП/. Это обусловлено преимуществами амфильного препарата в проникновении через биологические мембраны и особенностями внутриклеточного движения. Положительные результаты исследований активности C_7H_{15}МДП как стимулятора противоопухолевого ответа на мышиных моделях меланомы и лимфона, а также его низкая токсичность свидетельствует о целесообразности использования этого производного МДП в клинике. Амфильность является важным качеством производного МДП, позволяющим ему активно проникать через биологические мембраны и влиять на цитоплазматические события, ведущие к активации лимфоцита и макрофага. Амфильные препараты имеют преимущества над известными за рубежом липофильными дериватами, такими как мурамилтрипептил-фосфатидилэтанолами /МТП-ФЭ/, МДП-глицеролдипальмитат /МДП-ГДП/, МТП-холестерол /МТП-Хол/, В-30-МДП, тем, что он лучше растворим в водных растворах, что расширяет формы его применения. При этом, обладая определенной липофильностью, они могут быть эффективно включены в такие носители, как липосомы, распределяясь и в водной, и в липофидной фазе, а при применении в чистом виде они не будут выводиться быстро из организма, как немодифицированный МДП и его гидрофильные аналоги.

Результаты исследования биологической активности гликозидов МДП.

I. Иммуномодулирующая активность производных МДП.

Во всех тест-системах действие амфильного препарата C_7H_{15} МДП сравнивалось с активностью липофильного гомолога $C_{16}H_{33}$ МДП и немодифицированного МДП в эквимолярных концентрациях.

Таблица I. Действие производных МДП на пролиферацию лимфоцитов в смешанной культуре лимфоцитов /СКЛ/.

	концентрации МДП и его производных		
	20 мкМ	10 мкМ	5 мкМ
контроль	11.9 + 0.9		
МДП	14.6 + 1.0	14.1 + 0.8	12.7 + 1.2
C_7H_{15}МДП	15.9 + 1.4	16.4 + 0.6	14.5 + 0.9
$C_{16}H_{33}$МДП	5.9 + 0.8	7.7 + 0.4	9.5 + 1.2

Цифры в таблице представляют собой индексы пролиферации лимфоцитов в СКЛ /среднее арифметическое - стандартное отклонение/.

Как показали исследования, амфильный препарат β -гептилгликозид-мурамилдепиптид обладает более значительным, чем немодифицированный МДП и липофильный аналог β -гексадецилгликозид--МДП, стимулирующим действием на основе популяции клеток - - эффекторов противоопухолевого ответа. C_7H_{15}МДП стимулирует пролиферацию лимфоцитов /СКЛ/, усиливает цитотоксичность естественных киллеров /ЕК/, активирует генерацию цитотоксических Т-лимфоцитов /ЦТЛ/ и продукцию интерлейкина /ИЛ-I/ и фактора некроза опухолей /ФНО/ макрофагами.

2.Взаимодействие производных мурамилдепиптида с модельными мембранами и включение в клетки.

Для того, чтобы объяснить отличия в иммуномодулирующей активности амфильного и липофильного гомологов, было изучено взаимодействие этих мурамилпептидов с некоторыми модельными мембранами.

На взаимодействие гомологичных производных МДП с клеточными мембранами и проникновение внутрь клетки существенное влияние может оказать их гидролипофильный баланс. Он же значительно определяет и внутриклеточное движение препаратов. Разница в гидро-липофильном балансе двух гомологов может быть продемонстрирована с использованием простейшей модельной "мембраны": вода/хлороформ.

Обнаружены существенные отличия в распределении препаратов, меченных ^{14}C, между фазами этой модельной "мембраны". 64% C_7H_{15}МДП распределялось в водной фазе, а 36% препарата попадало в органический растворитель. Что касается более липофильного гомолога, то водная фаза включала лишь 28% препарата, а

органический растворитель - 72%.

Затем проведено исследование с использованием другой модели, позволяющей в динамике наблюдать за движением иммуномодулятора через мембрану из одной водной фазы в другую и определялось количество препарата, задержавшегося в самой модельной мембране.

Использована модельная липидная мембрана, изготовленная из фильтровального диска, пропитанного эквимолярной смесью холестирина и фосфолипидов.

Препарат $C_{16}H_{33}$МДП в следовом количестве появлялся по другую сторону модельной мембраны уже через I час от начала эксперимента, а через 6 часов его содержание в другой водной фазе было уже значительным. Но дальнейшее проникновение липофильного препарата через липидный барьер проходило значительно медленнее по сравнению с C_7H_{15}МДП. Последний появлялся во второй водной фазе только через 24 часа, однако, затем скорость его поступления увеличивалась и через 72 часа C_7H_{15}МДП первым достигал состояния в концентрации препарата в двух водных фазах.

Таблица 2. Действие производных МДП на липополисахарид-индуцированную пролиферацию мышиных спленоцитов.

концентрации МДП и его производных			
	20 мкМ	10 мкМ	5 мкМ
контроль	3.4 + 0.2		
МДП	4.1 + 0.5	4.4 + 0.1	4.1 + 0.4
C_7H_{15}МДП	4.4 + 0.3	4.6 + 0.3	4.4 + 0.3
$C_{16}H_{33}$МДП	3.0 + 1.0	2.6 + 0.3	3.0 + 0.1

Цифры в таблице представляют собой индексы пролиферации лимфоцитов в ответ на стимуляцию I мкг/мл липополисахарида под воздействием производных МДП /среднее арифметическое + + стандартное отклонение/.

Таблица 3. Влияние производных МДП на генерацию аллоспецифических цитотоксических Т-лимфоцитов в смешанной культуре лимфоцитов.

концентрации МДП и его производных		Отношение клеток эффекторов к клеткам-мишеням		
	контроль	71 + 5	51 + 3	22 + 4
20 мкМ	МДП	82 + 3	60 + 2	31 + 3
	C_7H_{15}МДП	94 + 4	73 + 4	46 + 6
	$C_{16}H_{33}$МДП	35 + 17	23 + 6	9 + 3
10 мкМ	МДП	81 + 2	64 + 5	30 + 6
	C_7H_{15}МДП	87 + 6	75 + 4	36 + 6
	$C_{16}H_{33}$МДП	52 + 13	27 + 6	11 + 9
5 мкМ	МДП	77 + 7	58 + 7	27 + 3
	C_7H_{15}МДП	83 + 5	62 + 4	35 + 7
	$C_{16}H_{33}$МДП	69 + 10	42 + 7	19 + 1

Исследование содержания препарата в самой модельной мембране по окончании эксперимента выявило, что значительная часть препарата $C_{16}H_{33}$МДП была связана с липидной мембраной, в то время как C_7H_{15}МДП в четыре раза меньшем количестве был ассоциирован с мембраной.

Для уточнения характера взаимодействия иммуномодуляторов-производных МДП с биологическими мембранами и динамики проникновения этих препаратов внутрь клетки, было изучено включение иммуномодуляторов /C_7H_{15}МДП и $C_{16}H_{33}$МДП/, меченных ^{14}C, в клетки эритролейкемии человека линии К562.

Хотя включение в клетку иммуномодуляторов зависит, помимо их физико-химических свойств, от эндо- и экзоцитоза, структуры плазмалеммы и других факторов, результаты этой серии экспериментов в целом коррелировали с результатами, полученными при исследовании взаимодействия производных МДП с модельной холестерин-фосфолипидной мембраной.

При культивировании клеток в среде, лишенной глутамина

/для угнетения клеточного деления/ и содержащей меченные препараты, в течение I часа липофильный $C_{16}H_{33}$МДП связывался с клетками на 50% активнее, чем его амфифильный гомолог /P<0,05/. Однако, дальнейшее включение препарата в клетки замедлялось и после двух часов инкубации ассоциирования с клетками радиактивность практически выходила на "плато". Амфифильный препарат C_7H_{15}МДП через 2-4 часа начинал включаться в клетки в большем количестве, не входя к этому времени в фазу равновесия входа и выхода из клеток. Через 24 часа включение этого препарата в клетки превышало на 25% включение более липофильного гомолога /p<0,05/.

Таким образом, значительная часть липофильного производного МДП оставалась с плазмалеммой. Конечно, в результате эндоцитоза препарат, ассоциированный с плазматической мембраной, начинает проникать внутрь клетки, но, по видимому, вскоре этот процесс в значительной степени уравновешивается экзоцитозом. Амфифильный препарат, несколько медленнее связывающийся с плазмалеммой из окружающей среды, легче выходит внутрь клетки из клеточной мембраны.

Как показали исследования, амфифильный C_7H_{15}МДП эффективнее проникает через модельную холестерин-фосфолипидную мембрану и включается в клетки эритролейкемии человека К562, чем его липофильный гомолог $C_{16}H_{33}$МДП. Амфифильность препарата C_7H_{15}МДП является принципиально важным качеством, позволяющим ему эффективнее проникать через биомембраны, что коррелирует с выраженной активацией основные клетки-эффекторы противоопухолевого ответа.

Цифры в таблице 4 представляют собой цитотоксичности Т-лимфоцитов по отношению к аллогенным опухолевым клеткам Р8I5 /среднее арифметическое + стандартное отклонение/.

Таблица 4.Влияние производных МДП на продукцию ИЛ-I и ФНО мышиными перитонеальными макрофагами.

	концентрации МДП и его производных		
	20 мкМ	10 мкМ	5 мкМ
а. Пролиферация тимоцитов на образцы ИЛ-1 (индекс пролиферации)			
контроль	1.3 + 4		
МДП	3.9 + 0.3	3.8 + 0.3	3.4 + 0.2
C_7H_{15}МДП	4.8 + 0.2	3.9 + 0.2	3.8 + 0.2
$C_{16}H_{33}$МДП	3.9 + 0.1	3.9 + 0.4	3.8 + 0.1
б. Лизис ФНО-чувствительных клеток L-929 образцами ФНО (%)			
контроль	7 + 6		
МДП	45 + 4	45 + 3	41 + 3
C_7H_{15}МДП	62 + 5	57 + 8	41 + 2
$C_{16}H_{33}$МДП	47 + 10	40 + 16	36 + 15

Табл. 5. Влияние производных МДП (10мкМ) на цитотоксическую активность естественных киллеров по отношению к ЕК-чувствительным клеткам УАС-1. Отношение клеток-эффекторов к клеткам-мишеням - 25:1.

Производные МДП	Цитотоксичность (%)
контроль	24 + 2
МДП	28 + 2
C_7H_{15}МДП	31 + 2
$C_{16}H_{33}$МДП	21 + 3

Цифры в таблице представляют собой индексы цитотоксичности естественных киллеров по отношению к опухолевым клеткам УАС-1 (среднее арифметическое + стандартное отклонение).

3.Противоопухолевая активность C_7H_{15}МДП на мышиных моделях лимфомы и меланомы.

Методика исследования /кратко/: Мышам С56В /6 подкожно в пятку прививали 1×10^6 клеток лимфомы EL-4 или мелономы В16. Затем мыши проходили курс лечения C_7H_{15}МДП. Препарат вводили в/в или per os в PBS /phosphate buffer saline/. Разовая доза при пероральном применении составляла 1 мг/кг веса, при в/в введении 0,5 мг/кг веса. Препарат вводили дважды в неделю в течение трёх недель, начиная лечение сразу после имплантации опухолевых клеток. Кроме того, проводили иммунотерапию препаратом, включённым в липосомы, состоящие из смеси фосфатидилхолины и фосфатидилсерина /7:3/.

Липосомальный C_7H_{15}МДП вводился в/в по той же схеме, что и чистое вещество, и разовая доза при этом составляла 0,25 мг/кг веса. В контроле мыши получали PBS без вещества. Противоопухолевый эффект оценивали по двум критериям: 1. увеличение продолжительности жизни мышей-опухоленосителей, 2. угнетение опухолевого роста.

Таблица 6. Влияние C_7H_{15}МДП на продолжительность жизни мышей-опухоленосителей.

Опухоль	лечение	Средняя продолжительность жизни (СПЖ) (дни)	Увеличение СПЖ (%)
Меланома В16			
	контроль (PBS р.о.)	30 + 4	-
	контроль (PBS в/в)	36 + 3	-
	C_7H_{15}МДП per os	51 + 5	70
	C_7H_{15}МДП в/в	74 + 9	101
Лимфома EL-4			
	контроль (PBS р.о.)	42 + 6	-
	контроль (PBS в/в)	39 + 4	-
	C_7H_{15}МДП per os	50 + 7	19
	C_7H_{15}МДП в/в	63 + 5	62

Таблица 7. Угнетение роста опухолевого узла под влиянием C_7H_{15}МДП.

Опухоль	Лечение	Объем опухолевого узла ($мм^3$) на 21 день после имплантации опухоли	Угнетение роста опухоли (%)
Меланома B16			
	контроль (PBS р.о.)	765 + 69	-
	контроль (PBS в/в)	736 + 51	-
	C_7H_{15}МДП per os	571 + 65	25
	C_7H_{15}МДП в/в	494 + 49	33
Лимфома EL-4			
	контрол (PBS р.о.)	842 + 78	-
	контроль (PBS р.о.)	789 + 64	-
	C_7H_{15}МДП per os	650 + 73	23
	C_7H_{15}МДП в/в	463 + 52	41

Таким образом, препарат обладает значительной противоопухолевой активностью, что проявляется в увеличении продолжительности жизни мышей-носителей меланомы и лимфомы /табл.6/ и угнетении роста этих опухолей /табл.7/. Испытания препарата показали, что если лечение препаратом начинать за неделю до имплантации опухоли, то можно получить еще больший противоопухолевый эффект, а в единичных случаях достичь и полного излечения мышей-опухоленосителей. Терапия с в/в ведением иммуномодулятора, включенного в липосомы, давала несколько больший лечебный эффект в сравнении с препаратом, используемым в чистом виде. Представляется рациональным все три использованных метода введения C_7H_{15}МДП /пероральный, в/в в чистом виде в/в в липосомах/. Путь введения должен выбираться индивидуально в зависимости от вида и локализации опухоли.

Широкие экспериментальные исследования β-гептилгликозид-МДП /C_7H_{15}МДП/ в качестве иммуномодулятора позволили перейти к его клиническим испытаниям, для чего были созданы фармацевтическая композиция для перорального и внутривенного введения, в том числе в липосомальной форме.

Фармацевтическая композиция для перорального введения представляет собой твердую лекарственную форму, содержащую активное соединение в дозе от 0,0001 до 100 мг/кг веса. В качестве целевой добавки используются общепринятые физиологически приемлемые наполнители.

Фармацевтическая компания для внутривенного введения, в том числе в липосомальной форме содержит активное соединение в дозе от 0,00001 до 30 мг/кг веса и 0,00001-10 мг/кг веса соответственно.

Лечебно-профилактическое действие пищевой добавки заключается в том, что это вещество стимулирует основные звенья иммунитета, в том числе противоопухолевого ответа - хелперные и цитотоксические Т-лимфоциты, макрофаги, естественные киллеры, β-лимфоциты. Активация вышеперечисленных клеточных популяций и является механизмом, посредством которого C_7H_{15} МДП оказывает биологическое /в том числе противоопухолевое/ действие в организме человека.

Впервые установлена возможность и целесообразность применения C_7H_{15}МДП в качестве пищевой добавки, вводимой в готовую для употребления пищу, преимущественно в жидкую. Положительные стороны такого применения будут рассмотрены ниже.

Природный немодифицированный мурамилпептид /N-ацетилмурамил-L-аланин -D-изоглутамин, сокращённо - МДП/ является структурным компонентом пептидогликана клеточной стенки ряда бактерий / *Mycobacterium bovis, Streptococcus pyogenes, Corynebacterium parvum* и др./ При распаде клеточных стенок этих бактерий образуются гликопротеиды, имеющие в своём составе мурамилпептидную часть.

Мурамилпептиды постоянно присутствуют в организме животных и человека в низких концентрациях, являясь факторами сна, витаминами и иммуномодуляторами. При попытке использовать немодифицированный МДП для стимуляции иммунных реакций "*in vivo*" исследователи столкнулись с рядом серьёзных препятствий: вследствие высокой гидрофильности при системном введении МДП быстро выводился из организма, не успевая значительно активизировать клетки иммунной системы, а также обладал довольно высокой пирогенностью.

Предлагаемый в качестве пищевой добавки новый перспективный иммуномодулятор - амфифильный CH_3-/C_2H/$_n$ МДП не является компонентом клеточной стенки бактерий. Он представляет собой производное от природного бактериального мурамилпептида и синтезирован химическим путём.

Он активизирует основные звенья иммунитета эффективнее МДП и даже его более липофильных гомологов. Очевидно, это обусловлено преимуществами амфифильного вещества в проникновении через биологические мембраны и особенностями внутриклеточного движения. Положительные результаты исследований активности CH_3-/CH_2/$_n$ МДП "*in vivo*" как стимулятора противоопухолевого ответа, а также его низкая токсичность свидетельствуют о целесообразности его применения. Амфифильность является важным качеством производного МДП, позволяющим ему эффективно проникать через биологические мембраны и влиять на цитоплазматические события, ведущие к активации лимфоцита и макрофага. Амфифильное вещество имеет преимущество над активно исследуемым за рубежом липофильнымми дериватами, такими как мурамилтрипептид-фосфатидилэтаноламин, МДП-глицеролдипальмитат, МТП-холестерол, ещё и в том, что он лучше растворим в водных растворах, что расширяет область его использования.

CH_3-/CH_2/$_n$ МДП представляет собой порошок белого или светло-серого цвета, который растворяется в воде при комнатной температуре в течение 1 минуты при перемешивании. Благодаря этому его целесообразно вводить в жидкую пищу - соки, супы, компоты и т.д., либо использовать в желатиновых капсулах с наполнителем в виде пищевого крахмала мальтадекстрина, либо другого приемлемого наполнителя, в виде порошка или водного раствора. Вещество достаточно хорошо растворяется и не влияет на вкусовые свойства пищи, её химические и физические свойства. Оно не вступает в химические реакции с компонентами пищи. Взаимодействие этого вещества с компонентами пищи ограничивается гидрофильно-гидрофобными связями, которые легко распадаются в процессе пищеварения и всасывания.

Доза добавки на один приём пищи составляет от 0,0001 до 100 мг/кг веса человека.

ПРИМЕР.

Человек весом 70 кг принимает в супе от 0,007 до 7000 мг.

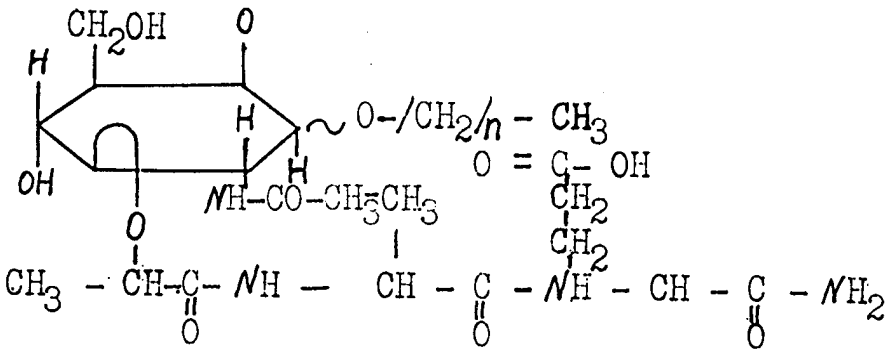
Основным преимуществом применения $CH_3-/CH_2/_n$ МДП в виде пищевой добавки является снижение его токсичности и пирогенности для организма - побочных эффектов, возникающих при использовании его в чистом виде, как лечебного препарата.

Снижение токсичности и пирогенности достигается за счёт замедления всасывания вещества в желудочно-кишечном тракте при поступлении его вместе с пищей. Вещество поступает в организм постепенно. При пероральном приёме его в чистом виде существует кратковременный период пиковой концентрации вещества в сыворотке крови и тканях с последующим спадом. Во время пика концентрации вещество сказывает избыточное стимулирующее действие на моноциты, макрофаги, что вызывает резкий выброс факторов некроза опухолей, интерлейкина-I и некоторых других биологически активных веществ, проявляющийся в токсичном и пирогенном эффектах. При приёме в виде добавки к пище такого резкого повышения концентрации вещества в тканях нет. Более того, замедленное всасывание ведёт к более длительному поступлению вещества в организм. В результате получается достаточно длительный период оптимальной для стимуляции иммуноцитов концентрации вещества в тканях без резких пиков.

Таким образом, выявлено новое применение известного вещества - в качестве пищевой добавки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ.

I. Применение α и β -гликозидов N-ацетилмурамил -L-аланил--D-изоглутамина общей формулы:



в качестве иммуномодулятора.

2. Фармацевтическая композиция, обладающая противоопухолевой активностью, включающая активное соединение мурамилдипептид и фармацевтически приемлемый наполнитель, отличающаяся тем, что в качестве активного наполнителя она содержит α и/или β гликозиды МДП-/CH_3-/CH_2/$_n$МДП/ в эффективном количестве.

3. Фармацевтическая композиция по п.2, отличающаяся тем, что она предназначена для внутривенного, подкожного и внутримышечного введения и содержит активное соединение в дозе 0,00001-30 мг/кг веса.

4. Фармацевтическая композиция по п.п.2 или 3, отличающаяся тем, что она выполнена в липосомальной форме и содержит активное соединение в дозе 0,00001-10 мг/кг веса.

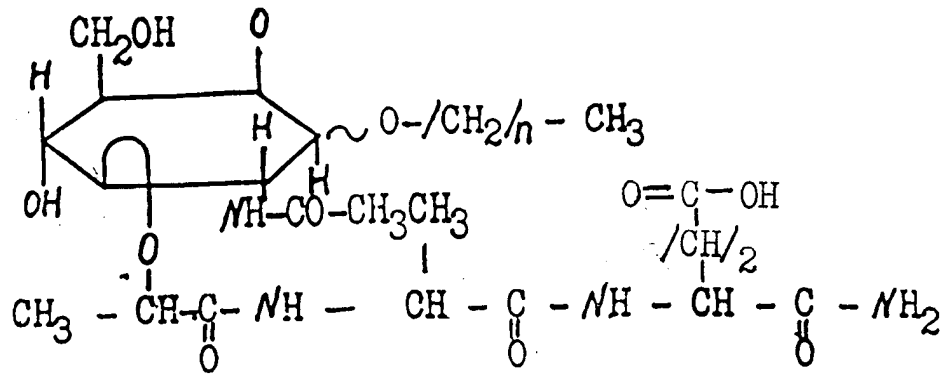
5. Фармацевтическая композиция по п.2, отличающаяся тем, что она предназначена для перорального введения и содержит активное соединение в дозе 0,001-100 мг/кг веса.

6. Применение α и/или β -гликозидов N -ацетилмурамил - L-аланил -D- изоглутамина в качестве пищевой добавки.

ИЗМЕНЁННАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

[получена Международным бюро 15 сентября 1998 (15.09.98)
первоначально заявленный пункт 1 формулы изобретения изменён;
остальные пункты оставлены без изменений (1 страница)]

1. Применение α и β -гликозидов N-ацетилмурамил -L-аланил-D-изоглутамина общей формулы:



в качестве иммуномодулятора.

2. Фармацевтическая композиция, обладающая противоопухолевой активностью, включающая активное соединение мурамилдипептид и фармацевтически приемлемый наполнитель, отличающаяся тем, что в качестве активного наполнителя она содержит α и/или β-гликозиды МДП-/CH_3-/CH_2/n МДП в эффективном количестве.

3. Фармацевтическая композиция по п.2, отличающаяся тем, что она предназначена для внутривенного, подкожного и внутримышечного введения и содержит активное соединение в дозе 0,00001-30 мг/кг веса.

4. Фармацевтическая композиция по п.п.2 или 3, отличающаяся тем, что она выполнена в липосомальной форме и содержит активное соединение в дозе 0,00001-10 мг/кг веса.

5. Фармацевтическая композиция по п.2, отличающаяся тем, что она предназначена для перорального введения и содержит активное соединение в дозе 0,0001-100 мг/кг веса.

6. Применение α и/или β -гликозидов N-ацетилмурамил - L-аланил -D- изоглутамина в качестве пищевой добавки.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/RU 98/00102

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC[6] A61K 38/14, A23L 1/30

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC[6] A23L 1/29,1/30,1/305,A61K 37/02,38/14, C07K 9/00

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)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0135788 A1 (HAMAOKA, TOSHIYUKI et al.) 03 April 1985 (03.04.85) claim no. 10	2
A		3-5
Y	Rakhmilevich A.L. et al. "Immunostimulirujuschee deistvie muramildipeptida, gljukozaminilmuramildipeptida i ikh sinteticheskikh proizvodnykh v sisteme IN VITRO", Antibiotiki i khimioterapya, M."Meditsina",1989, volume 34,No.8, pages 586-588	2
Y	Rakhmilevich A.L. et al. "Immunostimulirujuschee svoistva sinteticheskikh proizvodnykh muramildipeptida i gljukozaminilmuramildipeptida IN VITRO", Antibiotiki i khimioterapya, M. "Meditsina",1989, volume 34,No.11 pages 836-839	2
Y	Valyakina T.I. et al. "Muramilpeptidy modulirujut ekspressiju opukholeassotsiirovannykh antigenov", Immunologya, M.,"Meditsina",1993, No.4, July-August, 32-36.	2

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [ ] See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document 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	Date of mailing of the international search report
17 June 1998 (17.06.98)	15 July 1998 (15.07.98)
Name and mailing address of the ISA/ RU	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/RU 98/00102

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 96/01645 A1 (PEPTECH (UK) LIMITED) 25 January 1996 (25.01.96) the claims 1-4,11	2
A		3-5
Y	Spravochnik "Protivoopukholevaya terapya", under editorship Perevodchikovoi N.I., M., "Meditsina", 1993, page 19	2
A	WO 85/04808 A1 (RIJKSUNIVERSITEIT UTRECHT) 07 November 1985 (07.11.85)	2-5
A	DE 2537618 B2 (FA.CARL FREUDENBERG) 08 May 1980 (08.05.80)	6
A	GB 1493317 A (SYNTEX INC.) 30 November 1977 (30.11.77)	6
A	US 4565701 A (DIET CENTER,INC.) 21 January 1986 (21.01.86)	6
A	SU 1353410 A1 (MOSKOVSKY TEKHNOLOGICHESKY INSTITUT MYASNOI I MOLOCHNOI PROMYSHLENNOSTI) 23 November 1987 (23.11.87)	6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/RU 98/000102

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

The structural formula provided in the application material (p. 3 of the description and p. 1 of the claims) contains the following mistakes: "the oxygen linked to the carbon in the ring has a valency of 1; in the chain -NH-CO-CH_3-CH_3-, the carbon has in two cases a valency of 5", which is impossible. These mistakes do not allow for the identification of any substance corresponding to the given structural formula.

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ

Международная заявка № PCT/RU 98/00102

A. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

A61K 38/14, A23L 1/30

Согласно международной патентной классификации (МПК-6)

B. ОБЛАСТИ ПОИСКА:

Проверенный минимум документации (система классификации и индексы) МПК-6:

A23L 1/29,1/30,1/305, A61K 37/02,38/14, C07K 9/00

Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в поисковые подборки:

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если возможно, поисковые термины):

C. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
Y	EP 0135788 A1(HAMAOKA, TOSHIYUKI et al.) 03.04.85, п.10 формулы	2
A		3-5
Y	Рахмилевич А.Л. и др."Иммуностимулирующее действие мурамилдипептида, глюкозаминилмурамилдипептида и их синтетических производных в системе IN VITRO",Антибиотики и химиотерапия, М."Медицина",1989, т.34, №8, с.586-588	2
Y	Рахмилевич А.Л. и др. "Иммуностимулирующие свойства синетических производных мурамилдипептида и глюкозаминилмурамилдипептида IN VITRO", Антибиотики и химиотерапия, М. "Медицина", 1989, т.34, №11, с.836-839	2
Y	Валякина Т.И. и др."Мурамилпептиды модулируют экспрессию опухолеассоциированных антигенов", Иммунология, М.,"Медицина",1993, №4,июль-август, 32-36,	2
Y	WO 96/01645 A1(PEPTECH (UK) LIMITED) 25 January 1996 (25.01.96), п.п.1-4,11 формулы	2
A		3-5

[X] последующие документы указаны в продолжении графы C. [ ] данные о патентах-аналогах указаны в приложении

* Особые категории ссылочных документов:

"A" документ, определяющий общий уровень техники

"E" более ранний документ, но опубликованный на дату международной подачи или после нее

"O" документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"P" документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета

"T" более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания иззобретения

"X" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну и изобретательский уровень

"Y" документ, порочащий изобретательский уровень в сочетании с одним или несколькими документами той же категории

"&" документ, являющийся патентом-аналогом

Дата действительного завершения международного поиска: 17 июня 1998 (17.06.98)

Дата отправки настоящего отчета о международном поиске: 15 июля 1998 (15.07.98)

Наименование и адрес Международного поискового органа:

Федеральный институт промышленной собственности

Россия, 121858, Москва, Бережковская наб., 30-1

Факс: 243-3337, телетайп: 114818 ПОДАЧА

Уполномоченное лицо:

И.Агапитова

И.Питренас

Телефон №: (095)240-5888

Форма PCT/ISA/210 (второй лист) (июль 1992)

ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ

Международная заявка № PCT/RU 98/00102

С. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
Y	Справочник "Противоопухолевая терапия", под редакцией Переводчиковой Н.И., М.,"Медицина", 1993, с.19	2
A	WO 85/04808 A1 (RIJKSUNIVERSITEIT UTRECHT) 7 November 1985 (07.11.85)	2-5
A	DE 2537618 B2 (FA.CARL FREUDENBERG) 8. 5. 80	6
A	GB 1493317 A (SYNTEX INC.) 30 Nov. 1977	6
A	US 4565701 A (DIET CENTER, INC.) Jan. 21,1986	6
A	SU 1353410 A1 (МОСКОВСКИЙ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ МЯСНОЙ И МОЛОЧНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ) 23.11.87	6

ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ

Международная заявка №
PCT/RU 98/00102

Графа I. ЗАМЕЧАНИЯ ДЛЯ СЛУЧАЯ. КОГДА НЕКОТОРЫЕ ПУНТЫ ФОРМУЛЫ НЕ ПОДЛЕЖАТ ПОИКУ (продолжение пункта 1 первого листа)

Настоящий отчет о международном поиске не охватывает некоторых пунктов формулы в соответствии со статьей 17 (2) (а) по следующим причинам:

1. ☐ Пункты №:
т.к. они относятся к объектам, по которым настоящий Международный поисковый орган не проводит поиск, а именно:

2. ☒ Пункты №: 1
т.к. он относится к частям международной заявки, настолько не соответствующим предписанным требованиям, что по ним нельзя провести полноценный поиск, а именно:
приведенная в материалах заявки (с. 3 описания и п.1 формулы) структурная формула имеет ошибки - кислород, присоединенный к углероду в кольце, имеет валентность, равную 1; в цепи -NH-CO-CH_3-CH_3- углерод в двух случаях имеет валентность, равную 5, что невозможно. Указанные ошибки не позволяют идентифицировать какое-либо вещество, соответствующее данной структурной формуле.

3. ☐ Пункты №:
т.к. они являются зависимыми пунктами и не составлены в соответсвии со вторым и третьим предложениями правила 6.4 (а).

Графа II.ЗАМЕЧАНИЯ ДЛЯ СЛУЧАЯ НЕСОБЛЮДЕНИЯ ЕДИНСТВА ИЗОБРЕТЕНИЯ (продолжение пункта 2 первого листа)

В настоящей международной заявке Международный поисковый орган выявил несколько изобретений, а именно:

1. ☐ Т.к. все необходимые дополнительные пошлины (тарифы) были уплачены своевременно, настоящий отчет о международном поиске охватывает все пункты формулы изобретения, по которым можно провести поиск.

2. ☐ Т.к. все пункты формулы, по которым можно провести поиск, могут быть рассмотрены без затрат, оправдывающих дополнительную пошлину, Международный поисковый орган не требовал оплаты никакой дополнительной пошлины.

3. ☐ Т.к. только некотрые из требуемых дополнительных пошлин (тарифов) были уплачены своевременно, настоящий отчет о международном поиске охватывает лишь те пункты формулы изобретения, за котрые была произведена оплата, конкретно за пункты №:

4. ☐ Необходимые дополнительные пошлины (тарифы) своевременно не были уплачены заявителем. Следовательно, настоящий отчет о международном поиске ограничивается изобретением, упомянутым первым в формуле изобретения; к нему относятся пункты №:

Замечания по возражению

☐ Уплата дополнительных пошлин (тарифов) за поиск сопровождалась возражением заявителя

☐ Уплата дополнительных пошлин (тарифов) за поиск не сопровождалась возражением заявителя