



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2004124389/15, 10.01.2003

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
10.01.2003

(30) Конвенционный приоритет:
10.01.2002 DE 10200717.9

(43) Дата публикации заявки: 10.05.2005

(45) Опубликовано: 27.08.2008 Бюл. № 24

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: US 6306835 B1, 23.10.2001. JP 04-
057969 (INITIKA LTD), 25.02.1992 (реферат)
[on line] [найдено 09.11.2006] Найдено из
базы данных Esp@cenet. RU 2098114 C1,
10.12.1997. EP 948960 A2, 13.10.1999. JP 04-
029905, 31.01.1992 (реферат) [on line]
[найдено 09.11.2006] Найдено из базы данных
Esp@cenet. Дж.Сэнфорд и др. Антимикробная
терапия. Карманный справочник. - М.:
Практика, 1996, с.104-111, 125-141.

(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу:
10.08.2004

(86) Заявка РСТ:
DE 03/00095 (10.01.2003)

(87) Публикация РСТ:
WO 03/057227 (17.07.2003)

Адрес для переписки:
103064, Москва, ул. Казакова, 16, НИИР
Канцелярия "Патентные поверенные Квашнин,
Сапельников и партнеры", В.П. Квашнину

(72) Автор(ы):

ХААК Вера (DE),
ХАЙНЦЕ Томас (DE),
ШМИДТКЕ Михаела (DE),
МЕЛЛЬМАНН Уте (DE),
ДАСЕ Ханс-Мартин (DE),
ХЕРТЛЬ Альберт (DE)

(73) Патентообладатель(и):

Вольфф Целлулосикс ГмбХ унд Ко. КГ (DE)

(54) ПРИМЕНЕНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ В КАЧЕСТВЕ
ПРОТИВОИНФЕКЦИОННЫХ ВЕЩЕСТВ

(57) Реферат:

Предложено применение крахмалов,
замещенных присоединенными посредством
линкера четвертичными аммониевыми группами со
степенью замещения от 0,4 до 3,0, для лечения
инфекционных заболеваний. Показано подавление
репликации вируса простого герпеса типа 1
заявленными крахмалами при отсутствии

противовирусного действия немодифицированных
крахмалов. Минимальная ингибирующая
концентрация для стафилококков и микобактерий
составляла 5-60 г/л. Предполагается
эффективность этих крахмалов для лечения
инфекционных заболеваний, вызванных вирусом
или бактериями. 4 з.п. ф-лы, 7 табл.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(19) **RU** (11) **2 332 221** (13) **C2**

(51) Int. Cl.

A61K 31/718 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: **2004124389/15, 10.01.2003**

(24) Effective date for property rights: **10.01.2003**

(30) Priority:
10.01.2002 DE 10200717.9

(43) Application published: **10.05.2005**

(45) Date of publication: **27.08.2008 Bull. 24**

(85) Commencement of national phase: **10.08.2004**

(86) PCT application:
DE 03/00095 (10.01.2003)

(87) PCT publication:
WO 03/057227 (17.07.2003)

Mail address:
**103064, Moskva, ul. Kazakova, 16, NIIR
Kantsel'arija "Patentnye poverennye Kvashnin,
Sapel'nikov i partnery", V.P. Kvashninu**

(72) Inventor(s):

**KhAAK Vera (DE),
KhAJNTsE Tomas (DE),
ShMIDTKE Mikhaela (DE),
MELL'MANN Ute (DE),
DASE Khans-Martin (DE),
KhERTL' Al'bert (DE)**

(73) Proprietor(s):

Vol'ff Tsellulosiks GmbKh und Ko. KG (DE)

(54) APPLICATION OF POLYSACCHARIDE DERIVATIVES AS ANTI-INFECTION SUBSTANCE

(57) Abstract:

FIELD: medicine; pharmacology.

SUBSTANCE: invention claims application of starches substituted by quarterly ammonium groups with substitution degree of 0.4 to 3.0 with the help of a linker, in infection diseases treatment. Suppression of 1 type herpes virus replication by the claimed starches is

demonstrated, in comparison to zero antivirus effect of non-modified starches. Minimal inhibiting concentration for staphylococci and mycobacteria is 5-60 g/l.

EFFECT: efficient infection disease treatment by the claimed starches.

5 cl, 7 tbl

Изобретение относится к применению веществ на основе олиго- и полисахаридов в качестве противои инфекционного средства, такого как антибактериальное и противовирусное средство. Это противои инфекционное средство может быть применено, например, в косметических и фармацевтических рецептурах в качестве консервантов, в лекарственных

5 составах - в качестве биологически активного соединения, для биоцидной обработки поверхностей, тканей и упаковочных материалов, например, для пищевых продуктов или продуктов, используемых в медицине, биологии, фармации, и для защитного покрытия ран для использования в косметической и фармацевтической промышленности, в сельском

хозяйстве, в пищевой промышленности и в производстве комбикормов.

10 Известно, что глобально возросло инфицирование бактериальными возбудителями болезней, и при этом антибактериальная невосприимчивость является главной проблемой здравоохранения. Всемирное увеличение туберкулезных инфекций микобактериальными штаммами, приобретающими с течением времени устойчивость к обычным

15 терапевтическим средствам (смотри В.К.Bloom, J.L.Murray, Science 257, 1992, 1055), а также терапия инфекций полирезистентными стафилококками (M.Kresken, Bundesgesundheitsblatt 38, 1996, 170), требует разработки новых биологически активных веществ. Крайне необходимы альтернативные биологически активные вещества с новыми

20 механизмами действия, особенно в отношении невосприимчивости к антибиотикам и лечения бактериальных инфекций при непереносимости в отношении существующих биологически активных веществ.

С развитием высокоселективных нуклеозидных и нуклеотидных вирусостатиков, таких как, например, ацикловир, пенцикловир, ганцикловир, зоривидин и цидофовир, для вируса герпеса, хотя и был достигнут прогресс в борьбе с угрожающей жизни инфекцией, однако названные терапевтические средства имеют один и тот же принцип действия. Они

25 ингибируют вирусную ДНК-полимеразу. Другой недостаток этих соединений состоит в том, что они участвуют также в обмене веществ ДНК инфицированной клетки и поэтому таят в себе опасность вызвать мутагенное, тератогенное и онкогенное действие (Wutzler, P.Thust, R.Antiv. Res. 49, 2001, 55). Кроме того, при длительном применении нуклеозидных и нуклеотидных вирусостатиков как в инфицированных клеточных культурах,

30 так и у пациентов с пониженным иммунитетом доказано развитие невосприимчивости к этим медикаментам (Andreï, G. et al., Antimicrob. Agents Chemother., 1995, 39 1632; Pavic, J. et al., Antimicrob. Agents Chemother., 1997, 39 2686). Следовательно, должны быть дополнительно разработаны новые высокоактивные противовирусные профилактические и терапевтические средства с другим механизмом действия.

35 Большую группу биологически активных веществ составляют четвертичные аммониевые соединения. Они могут уничтожать микроорганизмы, такие как бактерии и грибковые микроорганизмы. Низкомолекулярные четвертичные аммониевые соединения используют в качестве дезинфицирующих средств или биоцидных материалов для покрытий (J.Controlled Release 50, 1998, 145). Типичной проблемой низкомолекулярных соединений является

40 недостаточное проявление биологической активности, например, в результате различных процессов миграции и расщепления. Полимерные четвертичные аминофункциональные вещества могут быть синтезированы из коммерческих четвертичных ионообменных смол графтполимеризацией полиуретанов с гидроксителухелатами полибутадиена или из полисилоксанов с первичными спиртовыми функциональными группами в боковой цепи.

45 Эти биоцидные полимеры имеют чаще всего высокую стоимость производства и часто токсичны, так как содержат остатки токсичных мономеров (Trends in Polymer Science 4, 1996, 364). Кроме того, может происходить нежелательное и опасное накопление полимеров в организме, так как они биологически не разлагаются. Помимо этого синтетические полимеры, содержащие катионные функциональные группы, используют в

50 виде дисперсий для защиты древесины (патент США US 5049383). Недостатком синтетических полимеров, содержащих катионные функциональные группы, является высокзатратное производство, токсичность (загрязнение остаточным содержанием мономеров) и устойчивость к биологическому расщеплению.

Производные полисахаридов с четвертичными аммониевыми функциональными группами известны и до сих пор используются прежде всего в качестве добавок для улучшения свойств поверхности в бумажной и текстильной промышленности, а также в косметике в качестве регулятора консистенции, причем они имеют лишь низкую степень замещения (DS), менее 0,2. Об их биологической активности до сих пор ничего не известно. С другой стороны, описывается противомикробное действие, особенно антибактериальное действие, простых эфиров крахмала, которые содержат длинные алкильные цепочки с 8-22 атомами углерода и соединены с крахмалом через силильные простые эфирные группы (заявка на патент Японии JP 05295002). Низкая химическая стабильность алкилсилильного простого эфира полисахаридов приводит к неконтролируемому высвобождению функциональных групп даже уже при воздействии влаги воздуха и в результате к снижению или потере биологической активности (D.Klemm et al., *Comprehensive Cellulose Chemistry*, Wiley-VCH, 1998). Кроме того, низкомолекулярные силильные соединения токсичны. Помимо этого ссылаются на публикации об антибактериальных целлюлозных волокнах и производных хитозана (W.H.Daly, M.M.Guerrini, *Polym. Mat. Sci. Eng.* 79, 1998, 220). Хитозан чаще всего описывается как природный катионный полисахарид и используется в качестве фунгицидного средства в косметике (T.Tashiro, *Macromol. Mater. Eng.* 286, 2001, 63, K.C.Gupta, M.N.V.R. Kumar, *J.M.S.-Rev. Macromol. Chem. Phys.* C40, 2000, 273). Недостатками этого полисахарида являются частое загрязнение другими биогенными веществами, высокая стоимость вследствие затратных методов выделения и очистки и природная структура, локализирующая аммониевые группы исключительно на основной цепи полимера. Кроме того, их распределение является нерегулируемым, а содержание ограничено степенью замещения 1. Описан также суперабсорбер из катионно модифицированных и сшитых полисахаридов, таких как целлюлоза (европейская заявка на патент EP 0582624 B1).

В литературе имеются данные, что биологическая активность определяется наличием четвертичных аммониевых групп, причем, с другой стороны, описывается, что типичные соединения с катионными четвертичными алкилзамещенными аминогруппами, такие как Поликватерниум 10, как доказано, не обладают биоактивностью (W.A.Daly, M.M.Guerrini, D.Culberson, J.Macossay, *Science and Technology of Polymers and Advanced Materials*, Plenum Press, 1998, 493). Из имеющихся литературных сведений никоим образом нельзя прийти к выводу, являются ли и такие структуры на самом деле биологически активными.

В основу изобретения положена задача найти полимеры с новым видом противомикробного действия, причем вещества должны обладать эффективным противомикробным действием широкого спектра, позволять эффективную борьбу с невосприимчивостью к антибиотикам при бактериальных инфекциях, предоставлять новые возможности для терапии вирусных инфекций, а также являться хорошо переносимыми, биологически разлагаемыми, нетоксичными и получаемыми простым способом.

Согласно изобретению задача решается получением производных полисахаридов, у которых посредством реакции этерификации с образованием простых эфиров введены катионные функциональные группы со степенью замещения (DS) в пределах от 0,4 до 3,0, в особенности алкиламмониевые группы со степенью замещения в пределах от 0,6 до 1,8 через спейсерные группы. Полисахариды особенно пригодны благодаря их биологической разлагаемости и нетоксичности.

В соответствии с этим изобретение относится к применению полисахаридов, замещенных на связанные посредством линкера четвертичные аммониевые группы со степенью замещения от 0,4 до 3,0, в качестве противомикробного средства или для лечения инфекционных заболеваний.

Используемые согласно изобретению соединения обладают высокой биологической активностью и неожиданным образом ингибируют рост патогенных бактерий, таких, например, как стафилококки и микобактерии, при минимальной ингибирующей концентрации в пределах 5-60 мг/л, а также ингибируют размножение вирусов герпеса и

гриппа при концентрации в пределах 3-50 мг/л. Благодаря своим свойствам соединения могут использоваться для изготовления лекарственных средств, предназначенных для предотвращения и лечения бактериальных и вирусных инфекций. Они могут применяться как самостоятельно, так и в комбинации с известными терапевтическими средствами или физиологически совместимыми вспомогательными веществами и веществами-носителями.

Противоинфекционные соединения могут приготавливаться для использования в качестве раствора или суспензии в фармацевтически приемлемых средах для локального или парентерального нанесения посредством внутривенной, подкожной или внутримышечной инъекций, для внутриназального нанесения; в качестве таблеток, капсул или суппозиториев. Соединения могут использоваться в дозах 0,1-1000 мг/кг массы тела.

Для получения биологически активных соединений по изобретению используют полисахариды, предпочтительно полиглюканы, такие как целлюлоза, лихенин, пуллулан, декстран и, особенно предпочтительно крахмалы, такие как природные крахмалы различного происхождения, например картофельный, пшеничный, маисовый и рисовый крахмал, и химически или энзиматически частично гидролизованные крахмалы, такие как солабил (Solamy), амилоза, амилопектин и крахмал восковидной кукурузы, а также крахмалы, получаемые из генетически измененных растений, такие как крахмал марки Nylon. Содержание амилозы, так же как и амилопектина, в крахмале составляет соответственно от 0 до 100%, предпочтительно 30-70%. Молекулярная масса пригодных полисахаридов находится в пределах 10^3 - 10^7 г/моль (смотри Таблицу 1).

Ангидроглюкозное звено - повторяемость звеньев (AGU) может быть схематически изображена через связи: $\alpha(1-4)$, $\alpha(1-6)$, $\alpha(1-3)$, $\beta(1-4)$ и $\beta(1-3)$ или также через их комбинацию, как, например, $\alpha(1-4)$ и $\alpha(1-6)$ (смотри структуру формулы (A)), либо $\alpha(1-6)$, $\alpha(1-3)$ и $\alpha(1-4)$ могут быть связаны друг с другом и содержать различной длины и связанные боковые звенья. Кроме того, могут содержаться также другие функциональные группы, такие как сложно эфирные фосфатные группы, например, у природного картофельного крахмала.

Структуры используемых полисахаридов могут быть представлены, например, формулой (A).

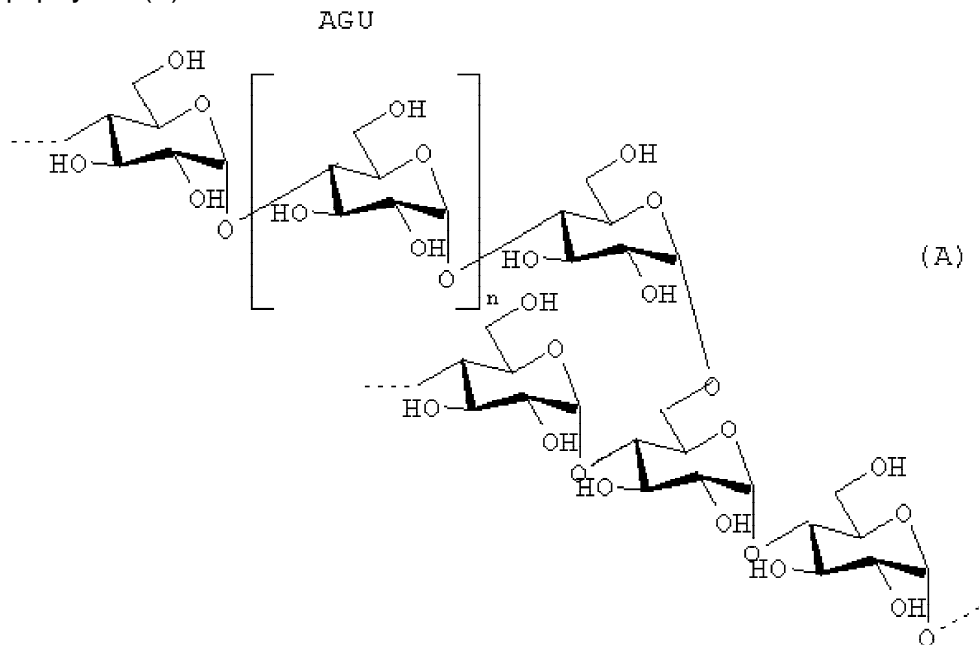
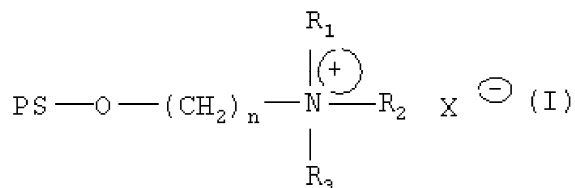


Таблица 1		
Крахмалы	Содержание амилозы, (%)	Молекулярная масса (ГПХ ¹), (г·моль ⁻¹)
Крахмал марки Nylon VII (H)	70	$9 \cdot 10^6$
Картофельный крахмал (P, Emsland)	28	$40 \cdot 10^6$
Маисовый крахмал (M)	28	$76 \cdot 10^6$
Пшеничный крахмал (W)	26	$65 \cdot 10^6$

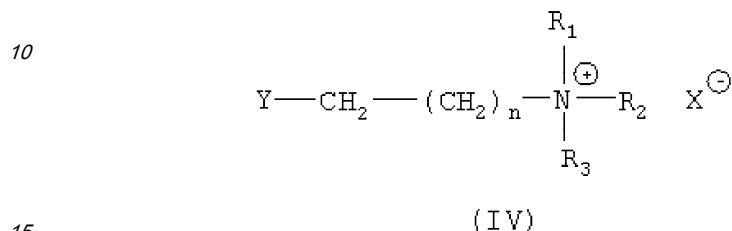
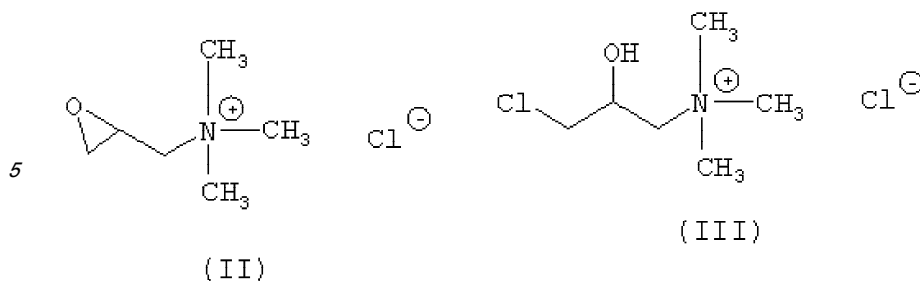
крахмал восковидной кукурузы (WM)	1	51.10 ⁶
Solamyl (S)	28	9700
ГПХ ¹ - гель-проникающая хроматография; определена в диметилсульфоксиде..		

Степень взаимодействия гидроксильных групп характеризуется средней степенью замещения (DS). Этот средний показатель определяет без какого-либо дифференцирования число функциональных гидроксильных групп и, следовательно, он находится у названных полисахаридов согласно определению в пределах от 0 до 3. Степень замещения (DS) катионными группами производных полисахаридов с противомикробной активностью по изобретению находится в пределах между 0,4 и 3,0, предпочтительно между 0,6 и 1,8. В случае введения в процессе получения производных функциональных групп, которые сами содержат реакционноспособные группы, например, гидроксильных групп в результате образования простых эфиров полисахаридов с эпоксидами, такие группы могут также реагировать с образованием более длинных боковых цепей.

Используемые по изобретению производные полисахаридов известны или могут быть получены известным способом, в особенности посредством образования простых эфиров полисахаридов с реакционноспособными соединениями, в результате чего либо образуются непосредственно четвертичные аммониевые соединения общей формулы (I) (PS: радикал полисахарида, обнаружен лишь один заместитель), либо кватернизацию осуществляют непосредственно после реакции образования простого эфира. В формуле (I) R₁, R₂ и R₃ независимо друг от друга могут являться предпочтительно алкилом с 1-4 атомами углерода или бензилом либо замещенным бензилом (заместители, например, могут присутствовать в количестве от 1 до 3-х и представляют собой алкил, галоген, алкокси, карбамоил, алкоксикарбонил, циано, диалкиламино). R₁ может быть также водородом, а X является анионом (например, галогенидом, гидроксильной группой, сульфатом, гидросульфатом и другим анионом минеральных карбоновых кислот), n может означать 2-4.



Предпочтительно используемыми реагентами, приводящими к образованию четвертичных катионных групп, являются 2,3-эпоксипропилтриметиламмонийхлорид (QUAB[®] 151, Degussa AG, формула II) или 3-хлор-2-гидроксипропилтриметиламмонийхлорид (QUAB[®] 188, Degussa AG, формула III). Для образования простых эфиров полисахаридов можно использовать также реагенты общей формулы IV, где Y означает хлор, бром и n равно 1-3.



15 В соответствии с этим речь идет о линкере, посредством которого четвертичные аммониевые группы связываются с полисахаридом, о при необходимости замещенных гидроксилем алкиленах с 2-4 атомами углерода.

20 Образование простых эфиров для получения биологически активных производных полисахаридов может проводиться различным образом и осуществляться известным способом, причем достигается высокое содержание катионных групп. Пригодны как суспензии полимеров в спирте и едком натрии и воде (гетерогенный способ), причем в качестве реакционной среды пригодны спирты, такие как метанол, изопропанол и предпочтительно этанол, или водные щелочные растворы, предпочтительно едкий

25 натрий/вода с переходом от гомогенной системы к гетерогенной, так и гомогенные растворы полимеров в биполярных апротонных растворителях, таких как диметилсульфоксид или диметилацетамид, в присутствии хлорида лития или другие растворители. Время взаимодействия с катионизирующим реагентом находится в пределах между 1 и 48 часами, предпочтительно от 3 до 24 часов, а температура - между 30 и

30 130°C, предпочтительно от 40 до 80°C. Посредством использования молярного эквивалента агента, используемого для образования простого эфира, можно дополнительно регулировать степень замещения продукта и варьировать ее в широких пределах. Для получения производных полисахаридов пригодны, кроме того, многоступенчатые реакции, когда уже канонизированный аминифункционализированный

35 продукт снова подвергают взаимодействию в вышеназванных условиях. Обработку продукта реакции осуществляют обычным способом химии полимеров, причем низкомолекулярные побочные продукты и остатки реагентов отделяют диализом или промывкой или переосаждением из воды в органический растворитель.

40 Степень замещения рассчитывают посредством найденного элементарным анализом среднего азотного показателя по следующей формуле:

$$DS_N = \frac{162,15 \cdot \%N}{1401 - 151,64 \cdot \%N}$$

Кроме того, для определения степени замещения (DS) пригодны содержащиеся в соединениях противоионы, такие как хлорид, и ЯМР-спектры.

45 Нижеследующие примеры осуществления служат более подробному пояснению изобретения, однако они не должны ограничивать изобретение.

Примеры осуществления изобретения

1. Получение соединений по гетерогенной реакции в среде этанол/едкий натр/вода

20 г полисахарида (вид полисахарида смотри в нижеследующей Таблице 2)

50 суспендируют в 80 мл этанола. К этой суспензии по каплям прибавляют раствор 10,85 г едкого натрия в 28 мл воды и 80 мл этанола, а также раствор 0,246 моль QUAB® 188 (69%-ный водный раствор). Реакционную смесь перемешивают при 60°C в течение 6 часов. Продукт нейтрализуют 0,1 н. HCl, подвергают диализу и сушат вымораживанием.

Выход продукта составил 95% (на достигнутую степень замещения).

Элементный анализ: N % 3,51.

Средняя степень замещения (DS_N)=0,66

5

10

15

Таблица 2 Гетерогенное катионизирование				
Реагенты				Степень замещения
Полисахарид	Тип	Молярное соотношение AGU:реагент	Продукт	
Hylon	QUAB® 188	1:3	H1(466)	0,50
Hylon	QUAB® 188	1:2	H2 (KS005)	0,66
Амиока	QUAB® 188	1:3	WM1 (505)	0,14
Картофельный крахмал	QUAB® 188	1:3	P1 ¹ (491)	0,34
Картофельный крахмал	QUAB® 188	1:3	P2 ¹ (469)	0,58
Пшеничный крахмал	QUAB® 188	1:3,25	W1(527)	0,99
Пшеничный крахмал	QUAB® 188	1:2	W3(571)	0,61
Пшеничный крахмал	2	1:5	W4	0,72
Пшеничный крахмал	2	1:10	W5	0,81
¹ различная концентрация едкого натрия				
² реагент: Cl-CH ₂ -CH ₂ -N(C ₂ H ₅)H ₂ Cl				

20

2. Взаимодействие полисахаридов в водном растворе едкого натрия

20 г полисахарида (вид полисахарида смотри в нижеследующей Таблице 3)

суспандируют в растворе едкого натрия (0,5 г едкого натрия в 100 мл воды). Смесь

перемешивают при 60°C. При этой температуре по каплям прибавляют 0,123 моль QUAB®

151 или в случае расщепленного крахмала Solamyl прикапывают QUAB® 188. Реакционную

25 смесь перемешивают при 60°C в течение 6 часов. После охлаждения до комнатной

температуры смесь нейтрализуют 0,1 н. HCl; затем подвергают диализу и сушат

вымораживанием.

Выход продукта составил 98% (на достигнутую степень замещения).

Элементный анализ: N % 3,34.

30

Средняя степень замещения (DS_N)=0,60.

35

40

45

Таблица 3 Гетеро-гомогенное катионизирование				
Реагенты				Степень замещения
Полисахарид	Тип	Молярное соотношение AGU: реагент	Продукт	
Hylon	QUAB® 151	1:1	H3(477)	0,40
Hylon	QUAB® 151	1:2	H4(KS006)	0,92
Амиока	QUAB® 151	1:0,5	WM2(503)	0,38
Амиока	QUAB® 151	1:1	WM3(501)	0,60
Амиока	QUAB® 151	1:2	WM4(502)	0,92
Маисовый крахмал	QUAB® 151	1:0,5	M1(517)	0,35
Маисовый крахмал	QUAB® 151	1:1	M2 ¹ (516)	0,55
Маисовый крахмал	QUAB® 151	1:1	M3 ¹ (519)	0,72
Маисовый крахмал	QUAB® 151	1:2	M4(515)	1,03
Картофельный крахмал	QUAB® 151	1:3	P3(KS016)	0,69
Картофельный крахмал	QUAB® 151	1:2	P4(KS013)	1,05
Пшеничный крахмал	QUAB® 151	1:0,5	W4 (520)	0,39
Solamyl	QUAB® 188	1:2	S1 ¹ (554)	0,68
Solamyl	QUAB® 188	1:3	S2(555)	0,76
Solamyl	QUAB® 188	1:2	S3 ¹ (568)	0,80
¹ различная концентрация едкого натрия				

50

3. Гомогенная реакция в диметилсульфоксиде (ДМСО)

15 г полисахарида (вид полисахарида смотри в нижеследующей Таблице 4)

суспандируют в диметилсульфоксиде (ДМСО) при комнатной температуре и нагревают до

80°C, при этом полисахарид растворяется. Раствор охлаждают до комнатной температуры

и прибавляют 0,5 г едкого натрия, растворенного в 20 мл воды. Затем при перемешивании прикапывают 0,0925 моль QUAB® 151. Реакционную смесь перемешивают при 60°C в течение 24 часов. После охлаждения до комнатной температуры смесь нейтрализуют 0,1 н. HCl, а затем подвергают диализу и сушат вымораживанием.

Выход продукта составил 99% (на достигнутую степень замещения).

Элементный анализ: N % 3,22.

Средняя степень замещения (DS_N)=0,57

Таблица 4 Гомогенное катионизирование				
Реагенты				Степень замещения
Полисахарид	Тип	Молярное соотношение AGU:реагент	Продукт	
Hylon	QUAB® 151	1:3	H(436)	0,55
Картофельный крахмал	QUAB® 151	1:1	P5(KS9)	0,42
Амиока	QUAB® 151	1:1	WM5(504)	0,57
Пшеничный крахмал	QUAB® 151	1:1	W5(531)	0,41
Маисовый крахмал	QUAB® 151	1:1	M5(532)	0,40
Solamyl	QUAB® 151	1:1	S4(588)	0,60

4. Катионизирование в несколько стадий

5 г катионизированного полисахарида (вид полисахарида смотри в нижеследующей Таблице 5) суспендируют в растворе едкого натрия (0,5 г едкого натрия в 100 мл воды). Смесь перемешивают при 60°C в течение одного часа. При этой температуре прикапывают 0,2 моль QUAB® 151. Реакционную смесь перемешивают при 60°C в течение 6 часов. После охлаждения до комнатной температуры смесь нейтрализуют 0,1 н. HCl, а затем подвергают диализу и сушат вымораживанием.

Выход продукта составил 95% (на достигнутую степень замещения).

Элементный анализ: N % 5,11.

Средняя степень замещения (DS_N)=1,32

Таблица 5 Катионизирование в несколько стадий					
Катионизированный крахмал	Реагент				Степень замещения DS_N
Полисахарид	Исходная DS	Тип	Молярное соотношение AGU:реагент	Продукт	
Hylon	0,40	QUAB® 151	1:2	H6(479)	0,90
Hylon	0,80	QUAB® 151	1:1,5	H7(498)	1,10
Картофельный крахмал	0,77	QUAB® 151	1:2	P6(506)	1,18
Картофельный крахмал	0,42	QUAB® 151	1:10	P7(597)	1,32
Амиока	0,60	QUAB® 151	1:10	WM6(598)	1,25
Пшеничный крахмал	0,41	QUAB® 151	1:10	W6(603)	1,16
Пшеничный крахмал	0,88	QUAB® 151	1:10	W7(602)	1,41
Маисовый крахмал	0,55	QUAB® 151	1:10	M6(600)	1,13
Картофельный крахмал	1,32	QUAB® 151	1:15	P8	1,80
Маисовый крахмал	1,13	QUAB® 151	1:10	M7	1,65
Solamyl	0,80	QUAB® 151	1:2	S5(610)	0,91

5. Определение антибактериальной/антимикробной активности соединений в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий и дрожжей

Антибактериальная активность соединений в отношении *Staphylococcus aureus* SG 511, *S.aureus* 134/93 (полиустойчивые) и *Mycobacterium vaccae* IMET 10670 испытывали посредством определения минимальных ингибирующих концентраций (МИК) в испытании с разведением в микробульоне Мюллера-Хинтона (DIFCO) в соответствии с рекомендациями NCCLS [National Committee for Clinical Laboratory Standards: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; 4th Ed.; Villanova, Ed.; Approved standard Document M7-A4. NCCLS, (1997)]. Результаты представлены в Таблице 6.

Таблица 6
Антибактериальная активность

Образец	Степень замещения DS _N	МИК, [мг/л]		
		Staphylococcus aureus		Mycobacterium vaccae IMET 10670
		SG511	134/93	
H4 KS006	0,92	15,6	15,6	7,8
H7 498	1,10	15,6	15,6	7,8
WM 4 502	0,92	31,25	62,5	15,6
M3 519	0,72	15,6	62,5	7,8
M4 515	1,03	31,25	62,5	15,6
P3 016	0,69	31,25	62,5	7,8
P4 013	1,05	15,6	125	3,9
W2 567	0,57	62,5	62,5	15,6
W3 571	0,61	31,25	31,25	7,8
W1 527	0,99	31,25	31,25	15,6
S1 554	0,68	31,25	62,6	15,6
S2 555	0,76	15,6	31,25	7,8
S3 568	0,80	15,6	15,6	7,8

6. Определение противовирусного действия в отношении вируса простого герпеса типа 1 (ВПГ-1)

Перед испытанием противовирусной активности определяли 50%-ную цитотоксичную концентрацию (CC₅₀) в клетках почки зеленой обезьяны (ЗОП) для того, чтобы можно было исключить неспецифичные действия вещества. Для этого клетки ЗОП засевают в микротитерные пластины с серией разбавленного вещества (фактор 2) (Schmidtke et al.; J.Virol Meth. 95, 2001, 133). После 72 часов инкубации осуществляли окрашивание клеток раствором красителя кристаллический фиолетовый в метаноле. После выделения из раствора красителя измеряют оптическую плотность отдельных углублений в пластинчатом фотометре фирмы Dynatech (550/630 нм) и сравнивают со средним показателем шести необработанных контрольных образцов клеток, который принимают за 100%. CC₅₀ представляет собой концентрацию вещества в точке пересечения кривой экстинкции серии разбавлений с 50%-ной линией среднего показателя контроля. Противовирусное действие соединений в отношении ВПГ-1 испытывали в тесте на цитопатический эффект ингибирования (zpE-Hemmtest) в клетках почки зеленой обезьяны и определяли 50%-ную дозу ингибирования (IC₅₀) (Schmidtke et al.; J.Virol Meth. 95, 2001, 133). Рассчитывали индекс селективности как частное от CC₅₀ и IC₅₀ (Таблица 7). Исходные соединения (QUAB-реагенты или немодифицированные крахмалы) не показали никакого противовирусного действия (результаты не представлены).

Таблица 7 Противовирусная активность				
Образец	Степень замещения DS _N	CC ₅₀ (мкг/мл) в ЗОП-клетках	IC ₅₀ (мкг/мл) в отношении ВПГ-1	Индекс селективности (CC ₅₀ /IC ₅₀)
H3 477	0,40	больше 200	8,54	больше 23,42
H1 466	0,50	больше 200	5,11	больше 39,14
H2 005	0,66	больше 200	7,07	больше 28,29
WM 2 503	0,38	больше 200	7,05	больше 28,37
M1 517	0,35	больше 200	7,84	больше 25,51
P1 491	0,34	больше 200	10,15	больше 19,70
W4 520	0,39	больше 200	10,55	больше 18,96
S1 554	0,68	141,54	3,59	39,43

7. Определение механизма действия в модифицированном тесте для определения уменьшения пятен (plaque reduction test)

Исследование механизма действия вещества проводили с чувствительным к ацикловиру и фосфономуравьиной кислоте ВПГ-1 штаммом Курка в модифицированном тесте для определения уменьшения пятен, например, с соединением М 1 (Schmidtke et al.; J.Virol Meth. 95, 2001, 133). При этом осуществляли добавление вещества в различных концентрациях:

1. только к не содержащему клеток вирусу (10⁶ pfu/ml), который затем инкубировали с соединением при температуре 37°C в течение 6 часов и использовали после разведения вещества в тесте для определения уменьшения пятен: отсутствие уменьшения

тромбоцитов в области доз 6,25-25 мкг/мл (результаты не представлены);

2. только в агар: отсутствие уменьшения тромбоцитов в области доз 6,25-25 мкг/мл (результаты не представлены);

3. только во время одночасовой адсорбции при 4°C в течение 2 часов (3,12-12,5

5 мкг/мл) и

4. 1,2 и 4 часа перед добавлением вируса (3,12-12,5 мкг/мл).

Результаты исследований механизма действия показывают, что соединения по изобретению не действуют на вирус, так как инаktivирование не содержащего клеток вируса не могло быть установлено. Условием для ингибирования репликации

10 (воспроизведения) вируса герпеса является, скорее, присутствие вещества перед или во время адсорбции вируса на испытуемых клетках.

Формула изобретения

1. Применение крахмалов, замещенных присоединенными посредством линкера
15 четвертичными аммониевыми группами со степенью замещения от 0,4 до 3,0, для лечения инфекционных заболеваний.

2. Применение крахмалов по п.1, причем степень замещения составляет от 0,6 до 1,8.

3. Применение крахмалов по п.1, причем представляют собой вещества, такие как
20 картофельный, пшеничный, маисовый и рисовый крахмалы, химически или энзиматически частично гидролизированный крахмал или крахмал, полученный из генетически измененных растений.

4. Применение крахмалов по п.1, причем линкерами, посредством которых четвертичные аммониевые группы связаны с полисахаридом, являются, при необходимости, замещенные
гидроксильной группой алкиленовые группы с 2-4 атомами углерода.

25 5. Применение крахмалов по п.1 для лечения вирусных и бактериальных инфекционных заболеваний.

30

35

40

45

50