

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **047197**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

- | | |
|---|---|
| <p>(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.06.20</p> <p>(21) Номер заявки
202192345</p> <p>(22) Дата подачи заявки
2019.02.25</p> | <p>(51) Int. Cl. A61K 31/7028 (2006.01)
A61P 7/00 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
A61P 39/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)</p> |
|---|---|

(54) СОЕДИНЕНИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ПРЕДОТВРАЩЕНИЯ ОСЛОЖНЕНИЙ, АССОЦИИРОВАННЫХ С NET

- | | |
|--|--|
| <p>(43) 2021.12.06</p> <p>(86) PCT/AU2019/050156</p> <p>(87) WO 2020/172698 2020.09.03</p> <p>(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ДЗЕ ОСТРЭЙЛИАН НЭШНЛ
ЮНИВЕРСИТИ; ГРИФФИТ
ЮНИВЕРСИТИ (AU)</p> <p>(72) Изобретатель:
Париш Кристофер, О'Мира Коннор,
Купланд Люси, Квах Бенджмин Джу
Чие, Кордбачен Фарзанех, Безос Анна,
Брауни Анна, Стефенс Росс, Тредвелл
Грегори Дэвид, Филип Ли Эндрю,
Нокс Карен, Вон Итзстейн Лоренс
Марк, Чан Чих-Вэй, Брустле Анне,
Дэвис Дэвид Анак Саймон (AU)</p> <p>(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)</p> | <p>(56) PROBST, K.C. et al. "Synthesis and Conformational Investigations of Sulfated Carbohydrates", Journal of Carbohydrate Chemistry, 2001, vol. 20, pages 549-560 Abstract; Table 1; Scheme 3; General Procedures at page 555; Compound 24; page 558, lines 8-20
WO-A1-2012071611
WO-A1-1994022885
EP-A1-0771815
WO-A1-2005085264
WO-A1-2005061523
SILK, E. et al. "The role of extracellular histone in organ injury", Cell Death and Disease, 2017, vol. 8,e2812, whole document, in particular, Abstract, Histone biology and function at pages 1-3; Conclusion at page 9</p> |
|--|--|

- (57) Изобретение относится к соединениям с высокой химической стабильностью и способам ингибирования патологической активности NET у объекта. В частности, изобретение относится к соединениям с высокой химической стабильностью, их применению и к способам ингибирования или улучшения опосредованных NET заболеваний (таких как, например, сепсис, синдром системного иммунного ответа (SIRS) и ишемическое реперфузионное повреждение (IRI)). Более конкретно, изобретение относится к способам и применениям полианионного сульфатированного целлобиозида, модифицированного небольшим незаряженным гликозидно-связанным заместителем на его восстанавливающем конце, где присутствие заместителя приводит к получению молекулы с высокой химической стабильностью, не влияя при этом на способность молекулы быть эффективной при терапии опосредованных NET заболеваний. Например, изобретение относится к способам и применениям β -О-метилцеллобиозид сульфата (mCBS) или его фармацевтически приемлемой соли (например, mCBS.Na) в терапии ряда опосредованных NET заболеваний у объектов.

047197
B1

047197
B1

Область техники

Изобретение относится к соединениям и способам ингибирования патологической активности внеклеточных ловушек нейтрофилов (NET) у объекта. В частности, изобретение относится к соединениям, применениям и способам ингибирования или улучшения состояния при опосредованных NET заболеваниях (таких как, например, сепсис, синдром системного иммунного ответа (SIRS) и ишемическое реперфузионное повреждение (IRI)). Более конкретно, изобретение относится к способам и применениям полианионного сульфатированного целлобиозида. Предпочтительно полианионный сульфатированный целлобиозид модифицирован небольшим незаряженным гликозидно-связанным заместителем на его восстанавливаемом конце, где присутствие заместителя приводит к получению молекулы с высокой химической стабильностью, не влияя на способность молекулы быть эффективной в терапии опосредованных NET заболеваний. Например, настоящее изобретение относится к способам и применениям сульфата целлобиозида (CBS), сульфата β -О-метилцеллобиозида (mCBS) или его фармацевтически приемлемой соли в терапии ряда опосредованных NET заболеваний.

Уровень техники

Нейтрофилы представляют собой гранулоциты врожденного иммунитета (самые распространенные лейкоциты), которые играют центральную роль в удалении патогенов, иммунной регуляции и патологии болезней. Они устраняют инфекционные агенты с помощью таких механизмов, как фагоцитоз, образование активных форм кислорода (ROS) и высвобождение микробицидных молекул из нейтрофильных гранул (дегрануляция).

Нейтрофилы также экструдируют сетку волокон хроматина, которые декорированы противомикробными пептидами и ферментами гранул, такими как эластаза нейтрофилов (NE), катепсин G и миелопероксидаза (MPO). Эти экструдированные структуры называются внеклеточными ловушками нейтрофилов (NET).

Целью NET является обезвреживание патогенов с помощью высокой локальной концентрации противомикробных компонентов. Таким образом, NET представляют собой важную стратегию иммобилизации и уничтожения вторгшихся организмов. Каркасы NET состоят из сетчатых волокон хроматина диаметром 15-17 нм; ДНК и гистоны представляют собой основные составляющие NET.

В дополнение к своим противомикробным свойствам, NET служат физическим барьером, который предотвращает распространение патогенов и потенциально вредных белков. Например, абсорбция гранулярных белков в NET может удерживать потенциально вредные белки, такие как протеазы, от диффузии вдали от повреждения, где они могут вызвать повреждение ткани, прилегающей к месту воспаления.

Считается, что формирование и высвобождение NET возникает в двух возможных ситуациях:

а. NETоз, особая форма активной гибели клеток, которая характеризуется высвобождением деконденсированного хроматина и гранулярного содержимого во внеклеточное пространство. Во время NETоза ядерные и гранулярные мембраны растворяются, а ядерное содержимое деконденсируется в цитоплазму. Это сопровождается разрывом плазматической мембраны и высвобождением хроматина, декорированного гранулированными белками, во внеклеточное пространство;

б. механизм экстрюзии ДНК/сериновой протеазы из интактных нейтрофилов, где высвобождение митохондриальной ДНК, по-видимому, не связано с гибелью клеток.

NETоз в значительной степени индуцируется в ответ на микробные сигналы и эндогенные сигналы опасности, включая провоспалительные цитокины (TNF- α , IL-8), тромбоциты, активированные эндотелиальные клетки (EC), оксид азота, кристаллы мононатрий урата и различные аутоантитела. Обычно этот процесс жестко регулируется, чтобы предотвратить чрезмерное повреждение тканей во время острого воспаления или хронического воспалительного и аутоиммунного заболевания.

Хотя образование NET является неотъемлемой частью врожденного иммунного ответа, обеспечивая полезную стратегию борьбы с заболеванием, NET также занимают видное место в центре различных инфекционных и неинфекционных патологических состояний, таких как гипоксия или стерильное воспаление. В этом отношении NET из-за своей конструкции и природы являются предполагаемыми источниками молекул с иммунными эффекторными и провоспалительными функциями, которые у восприимчивых индивидуумов могут способствовать развитию ряда инфекционных и неинфекционных заболеваний, воспалений, повреждений тканей и аутоиммунитета. Когда они образуются в чрезмерных количествах, NET могут повредить эндотелий и подлежащую ткань. Такое повреждение часто является результатом деградации NET как эндогенными нуклеазами, так и нуклеазами микробного происхождения. Когда NET разлагаются, они высвобождают гистоны, которые являются цитотоксичными не только для микробов, но также для эпителиальных и эндотелиальных клеток хозяина.

NET были непосредственно вовлечены в ряд заболеваний, включающих или ассоциированных, например, со следующими, и только в качестве иллюстрации: гиперовоспалительный ответ на инфекцию (в том числе бактериальную, вирусную и паразитарную), во время сепсиса, преэклампсии, слизистая оболочка толстой кишки пациентов с воспалительным заболеванием кишечника, язвенным колитом и ассоциированная с продуцированием IgG-антител против ядерной двухцепочечной ДНК у детей, инфицированных *P. falciparum* (малярия); фиброз, при котором функциональная ткань паренхиматозного органа

заменяется фиброзной тканью, что может серьезно снизить функцию органа, острое повреждение легких, связанное с переливанием крови, тромбоз глубоких вен и злокачественное новообразование.

Несмотря на клиническое использование современных антибиотиков, сохраняется значительный уровень заболеваемости и смертности из-за неэффективного лечения заболеваний, связанных с NET. Соответственно, существует острая потребность в лекарственных средствах, которые нейтрализуют повреждающее действие чрезмерного уровня NET, не препятствуя полезной функции нейтрофилов.

На сегодняшний день существует нехватка соединений, которые представляют лечение заболеваний, вызванных NET. Именно на этом фоне и растущем признании роли NET во многих заболеваниях было разработано настоящее изобретение.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение основывается на обнаружении того факта, что определенные полианионные соединения против NET, как описано в настоящем документе, электростатически взаимодействуют с NET в кровотоке животных, нейтрализуя цитопатические свойства NET. Комплексообразование таких полианионных молекул с NET в кровотоке у живого животного обеспечивает средства, по меньшей мере, для улучшения цитотоксической активности NET.

В частности, авторы изобретения выяснили, что определенные сульфатированные дисахариды эффективны при нейтрализации патологических эффектов NET. Например, полианионный сульфатированный целлобиозид, модифицированный небольшим незаряженным гликозидно-связанным заместителем на его восстанавливающем конце, обеспечивает химически стабильный полианион, который может обеспечить высокоэффективное лечение NET-ассоциированных осложнений (таких как, например, сепсис, SIRS и IRI, и, по меньшей мере, улучшить эти состояния у пациентов).

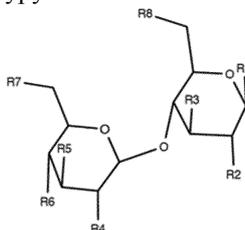
Использование сульфатированного целлобиозида, модифицированного небольшим незаряженным заместителем на его восстанавливающем конце, с результирующей химической стабильностью, представляет или обеспечивает новый общий принцип применения в области лечения пациентов, страдающих от NET-ассоциированных осложнений, и/или предотвращения возникновения NET-ассоциированных осложнений у пациентов из группы риска.

В первом аспекте изобретения предложено соединение для лечения или предотвращения по меньшей мере NET-ассоциированного осложнения у объекта, где соединение включает: полианионный сульфатированный целлобиозид или полианионный сульфатированный целлобиозид, модифицированный небольшим незаряженным гликозидно-связанным заместителем на его восстанавливающем конце или его фармацевтически приемлемую соль.

Предпочтительно, когда полианионный сульфатированный целлобиозид модифицирован, то он желателен имеет небольшой незаряженный гликозидно-связанный заместитель на восстанавливающем конце полианионного сульфатированного целлобиозида. Это предпочтительно улучшает химическую стабильность полианиона по сравнению с тем же полианионом, который сульфатирован на его восстанавливающем конце.

Соединения по настоящему изобретению, когда они присутствуют в терапевтически или фармацевтически эффективном количестве, обеспечивают средства для улучшения состояния, лечения или предотвращения NET-ассоциированных осложнений.

В одном из вариантов осуществления изобретения модифицированный полианионный сульфатированный целлобиозид имеет общую структуру:



где:

R1 представляет собой сульфатную группу или небольшой незаряженный гликозидно-связанный заместитель, например O или S-(C₁₋₆)алкил; и

каждый из R2-R8 выбран из: (i) небольшого незаряженного O-связанного заместителя или (ii) сульфатной группы.

Предпочтительно R1 представляет собой O или S-(C₁₋₆)алкил. Когда R1 представляет собой O или S-(C₁₋₆)алкил, заместитель предпочтительно улучшает химическую стабильность полианиона по сравнению с таким же полианионом с сульфатной группой у R1.

Предпочтительно каждый из R2-R8 выбран из: (a) немодифицированной гидроксильной группы; или (b) сульфатной группы.

Более предпочтительно, R1 представляет собой метоксигруппу или этоксигруппу, и каждый из R2-R8 представляет собой сульфатную группу.

Желательно, чтобы класс соединения имел высокий суммарный отрицательный заряд, то есть яв-

лялся полианионом.

Аномерная конфигурация небольшого незаряженного гликозидного заместителя (R1) может находиться в любом из α или β положения. Предпочтительно небольшой незаряженный заместитель находится в конфигурации p.

В наиболее предпочтительной форме изобретения соединение представляет собой CBS, mCBS или его фармацевтически приемлемую соль, причем когда соединение представляет собой mCBS, оно желательно представляет собой сульфатированный β -О-метилцеллобиозид дисахарид, когда соединение представляет собой CBS, то оно желательно представляет собой натриевую соль β -О-метилцеллобиозидсульфата, а именно β -О-метилцеллобиозидсульфат натрия (mCBS.Na).

mCBS является предпочтительным, поскольку он очень стабилен по сравнению с CBS и хорошо переносится при высоких концентрациях.

Во втором аспекте изобретения предложен способ лечения (терапевтического или профилактического) медицинского состояния, недомогания или заболевания, включающего NET, у объекта, причем указанный способ включает стадию: введения объекту терапевтически или фармацевтически эффективного количества полианионного сульфатированного целлобиозида или полианионного сульфатированного целлобиозида, модифицированного небольшим незаряженным гликозидно-связанным заместителем на его восстанавливающем конце, или его фармацевтически приемлемой соли.

В третьем аспекте изобретения предложен способ уменьшения накопления NET у объекта, причем указанный способ включает стадию: введения объекту терапевтически или фармацевтически эффективного количества полианионного сульфатированного целлобиозида или полианионного сульфатированного целлобиозида, модифицированного небольшим незаряженным гликозидно-связанным заместителем на его восстанавливающем конце или его фармацевтически приемлемой соли.

В варианте осуществления второго или третьего аспекта изобретения выбранное соединение предпочтительно представляет собой полианионный сульфатированный целлобиозид, модифицированный небольшим незаряженным гликозидно-связанным заместителем на восстанавливающем конце. Более предпочтительно, небольшой незаряженный гликозидно-связанный заместитель улучшает химическую стабильность полианиона по сравнению с тем же полианионом, который сульфатирован на его восстанавливающем конце. В частности, когда соединение представляет собой mCBS, то это сульфатированный β -О-метилцеллобиозид дисахарид или натриевая соль β -О-метилцеллобиозидсульфата, а именно mCBS.Na.

Например, в варианте осуществления второго или третьего аспекта изобретения способ используется для лечения или предотвращения состояния или недомогания, связанного с осложнением, ассоциированным с NET, таким как, например, сепсис, SIRS или IRI.

В некоторых примерах вариантов осуществления согласно второму или третьему аспектам изобретения идентифицированные способы могут дополнительно включать стадию: введения объекту вместе с модифицированным сульфатированным целлобиозидом или сопутствующим образом терапевтически или фармацевтически эффективного количества второго активного агента, соединения или композиции, выбранных из: одного или больше противовоспалительных средств, антибиотических средств, противовирусных средств, противогрибковых средств и/или любой другой формы фармацевтической композиции, которая подвергается лечению одно или более состояний, которыми страдает объект или риску которых он подвержен.

В соответствии с этим вариантом осуществления второй активный агент, соединение или композиция обеспечивает дополнительное лечение к лечению, направленному на осложнение, связанное с NET (такое как, например, сепсис, SIRS или IRI) и/или для медицинских состояний или заболеваний, связанных с такими осложнениями. Предпочтительно второй активный агент, соединение или композиция содержит один или больше противовоспалительных агентов.

Предпочтительно, второй активный агент представляет собой средство для медицинского вмешательства для заболевания, которым страдает пациент, которое связано с медицинским заболеванием, которое подвергается лечению соединениями по настоящему изобретению, или отличается от него, причем указанный второй активный агент обеспечивает дополнительное лечение пациента.

В четвертом аспекте изобретения предложен способ лечения или предотвращения медицинского состояния или заболевания, связанного с цитотоксичностью NET, у объекта, причем указанный способ включает стадию: введения объекту терапевтически или фармацевтически эффективного количества полианионного сульфатированного целлобиозида или полианионного сульфатированного целлобиозида, модифицированного небольшим незаряженным гликозидно-связанным заместителем на его восстанавливающем конце, или его фармацевтически приемлемой соли.

В варианте осуществления четвертого аспекта изобретения выбранное соединение предпочтительно представляет собой полианионный сульфатированный целлобиозид, модифицированный небольшим незаряженным гликозидно-связанным заместителем на восстанавливающем конце. Более предпочтительно, небольшой незаряженный гликозидно-связанный заместитель улучшает химическую стабильность полианиона по сравнению с тем же полианионом, который сульфатирован на его восстанавливаю-

щем конце. В частности, когда соединение представляет собой mCBS, то это сульфатированный β -О-метилцеллобиозид дисахарид или натриевая соль β -О-метилцеллобиозидсульфата, а именно mCBS.Na.

В одном предпочтительном примере четвертого аспекта изобретения способ используется для нейтрализации NET, которые (i) являются цитотоксичными по отношению к эндотелию у объекта и/или (ii) способствуют эндотелиальной дисфункции у объекта.

Кроме того, или в качестве альтернативы, способ используется для лечения септического состояния SIRS или IRI или заболевания, ассоциированного с сепсисом, SIRS или IRI, то есть вызванных или опосредованных высвобождением NET у объекта после инфекции, воспаления или гипоксии или любого другого заболевания, инфекционного, воспалительного или гипоксического ответа у объекта.

В пятом аспекте изобретения предложена терапевтическая или фармацевтическая композиция для применения при лечении NET-ассоциированного осложнения, содержащая: по меньшей мере, полианионный сульфатированный целлобиозид или полианионный сульфатированный целлобиозид, модифицированный небольшим незаряженным гликозидно-связанным заместителем на его восстанавливающем конце или его фармацевтически приемлемая соль.

В варианте осуществления пятого аспекта изобретения выбранное соединение предпочтительно представляет собой полианионный сульфатированный целлобиозид, модифицированный небольшим незаряженным гликозидно-связанным заместителем на восстанавливающем конце. Более предпочтительно, небольшой незаряженный гликозидно-связанный заместитель улучшает химическую стабильность полианиона по сравнению с тем же полианионом, который сульфатирован на его восстанавливающем конце. В частности, когда соединение представляет собой mCBS, то это сульфатированный β -О-метилцеллобиозид дисахарид или натриевая соль β -О-метилцеллобиозидсульфата, а именно mCBS.Na.

Предпочтительно соединение присутствует в терапевтически или фармацевтически эффективном количестве в терапевтической или фармацевтической композиции. Композиция также может включать терапевтически или фармацевтически приемлемый носитель, вспомогательное вещество и/или разбавитель. Соединение в терапевтическом или фармацевтическом средстве находится либо в форме нейтрального свободного основания, либо в форме соли. Предпочтительно полианионное сульфатированное целлобиозидное соединение представляет собой mCBS или, более конкретно, представляет собой натриевую соль β -О-метилцеллобиозидсульфата.

В некоторых примерах вариантов осуществления согласно пятому аспекту изобретения идентифицированная композиция также может содержать второй активный агент, соединение или композицию, выбранную из: одного или больше противовоспалительных агентов, антибиотических агентов, противовирусных агентов, противогрибковых агентов и/или любой другой формы терапевтического или фармацевтического соединения, которое подвергает лечению одно или более состояний, которыми страдает объект.

Согласно этому варианту осуществления второй активный агент, соединение или композиция, желательна, обеспечивает дополнительную терапию сепсиса, SIRS или IRI или медицинского состояния или заболевания, ассоциированного с сепсисом, SIRS или IRI. Предпочтительно второй активный агент, соединение или композиция содержит один или больше противовоспалительных агентов.

В шестом аспекте изобретения предложено использование терапевтически или фармацевтически эффективного количества полианионного сульфатированного целлобиозидного соединения или полианионного сульфатированного целлобиозидного соединения, модифицированного небольшим незаряженным гликозидно-связанным заместителем на его восстанавливающем конце, или его фармацевтически приемлемой соли при производстве лекарственного средства для лечения медицинского состояния, недомогания или заболевания, включающего NET.

В варианте осуществления шестого аспекта изобретения выбранное соединение предпочтительно представляет собой полианионный сульфатированный целлобиозид, модифицированный небольшим незаряженным гликозидно-связанным заместителем на восстанавливающем конце. Более предпочтительно, небольшой незаряженный гликозидно-связанный заместитель улучшает химическую стабильность полианиона по сравнению с тем же полианионом, который сульфатирован на его восстанавливающем конце. В частности, когда соединение представляет собой mCBS, то это сульфатированный β -О-метилцеллобиозид дисахарид или натриевая соль β -О-метилцеллобиозидсульфата, а именно mCBS.Na.

Например, в варианте осуществления шестого аспекта изобретения предложено применение терапевтически или фармацевтически эффективного количества полианионного сульфатированного целлобиозидного соединения или полианионного сульфатированного целлобиозидного соединения, модифицированного небольшим незаряженным гликозидно-связанным заместителем на его восстанавливающем конце, или его фармацевтически приемлемой соли при производстве лекарственного средства для лечения или предотвращения сепсиса, SIRS или IRI или медицинского состояния или заболевания, ассоциированного с сепсисом, SIRS или IRI у объекта. Предпочтительно модифицированный сульфатированный целлобиозид представляет собой mCBS или, более конкретно, его фармацевтически приемлемую соль, такую как mCBS.Na.

В одном варианте осуществления такого применения лекарственное средство предназначено для лечения сепсиса или SIRS или медицинского состояния или заболевания, ассоциированного с сепсисом

или SIRS, у объекта, где указанное лечение улучшает состояние или ингибирует указанный сепсис или SIRS или указанное состояние или заболевание, ассоциированное с указанным сепсисом или SIRS.

В другом варианте осуществления такого применения лекарственное средство предназначено для лечения IRI или медицинского состояния или заболевания, ассоциированного с IRI, у объекта, где указанное лечение улучшает состояние или ингибирует указанное IRI или указанное состояние или заболевание, ассоциированное с указанным повреждением.

Еще в одном варианте осуществления такого применения лекарственное средство используется для нейтрализации NET, которые (i) являются цитотоксичными по отношению к эндотелию у объекта, или (ii) способствуют эндотелиальной дисфункции у объекта, или (iii) инициируют коагуляцию путем активации тромбоцитов в организме объекта, или (iv) вызывают хрупкость эритроцитов и, как следствие, анемию объекта.

Еще в одном варианте осуществления производимое лекарственное средство может также включать терапевтически или фармацевтически эффективное количество второго активного агента, соединения или композиции. Согласно этому варианту осуществления второй активный агент, соединение или композиция обеспечивает дополнительную терапию для лечения медицинского состояния, недомогания или заболевания, включающего NET. Желательно, чтобы второй активный агент, соединение или композиция обеспечивали дополнительную терапию для лечения сепсиса, SIRS или IRI или медицинского состояния или заболевания, ассоциированного с сепсисом, SIRS или IRI. Предпочтительно, второй активный агент выбран из: одного или больше противовоспалительных агентов, антибиотических агентов, противовирусных агентов, противогрибковых агентов и/или любой другой формы терапевтического или фармацевтического соединения, которое подвергает лечению одно или больше состояний, которыми страдает объект. Более предпочтительно, чтобы второй активный агент, соединение или композиция содержали один или больше противовоспалительных агентов.

Когда модифицированное сульфатированное целлобиозидное соединение используется в любом из способов по настоящему изобретению, это соединение может быть введено или приготовлено для введения пациенту в виде однократной дозы состава. В некоторых альтернативных вариантах осуществления модифицированное сульфатированное целлобиозидное соединение вводят или готовят для введения пациенту в виде многодозового состава.

Дополнительные цели, преимущества и новые особенности будут изложены в описании, которое следует или станет очевидным для специалистов в данной области техники после изучения чертежей и последующего подробного описания нескольких неограничивающих вариантов осуществления, которое следует ниже.

Краткое описание чертежей

Описание предоставит подробности в следующем описании предпочтительных вариантов осуществления со ссылкой на следующие фигуры, на которых:

Фиг. 1 Химическая структура выбранных соединений.

Фиг. 2 Минимальные структурные требования к полианионам, чтобы они были столь же эффективны, как гепарин, в ингибировании гистон-опосредованных патологий. а, Кривые ингибирования, показывающие, что сульфатированный дисахарид, mCBS, и сульфатированный трисахарид, MTS, столь же эффективны, как и гепарин, в ингибировании гистон-опосредованной цитотоксичности для HMEC-1, в то время как сульфатированные моносахариды, пер-О-сульфат глюкозы и пер-О-сульфат метил-β-глюкозида, проявляют небольшую ингибирующую активность или не проявляют ее. б) Аналогичные результаты получены при изучении ингибирования гистон-индуцированной хрупкости эритроцитов. Данные представляют собой средние значения ± среднеквадратичное отклонение. (n=3 биологических повтора).

Фиг. 3 Гистоны способствуют агрегации эритроцитов и уменьшают деформируемость эритроцитов - процессы, которые полностью подавляются SPA. Человеческие эритроциты (RBC) инкубировали в течение 1 часа при 37°C отдельно ("физиологический раствор" контроль) или в присутствии гистонов (400 мкг/мл) вместе или без mCBS (200 мкг/мл). а, Процент агрегации эритроцитов, измеренный с помощью проточной цитометрии на основе параметров прямого (FSC) и бокового (SSC) рассеяния и соответствующей стратегии гейтирования, чтобы отличить агрегированные от нормальных (неагрегированных) RBC. б, Микрофотографии сканирующего электронного микроскопа, показывающие уровень агрегации эритроцитов при низком и большом увеличении после трех обработок, изображенных на (а). с, Зависимое от концентрации ингибирование гистон-опосредованной агрегации эритроцитов с помощью mCBS и MTS, в этом случае агрегация эритроцитов рассчитывается с помощью проточной цитометрии как кратное увеличение аутофлуоресценции эритроцитов по сравнению с эритроцитами в отсутствие гистонов. Значения кратного увеличения также позволяют оценить количество эритроцитов в каждом агрегате. д, Удержание эритроцитов в искусственной селезенке, которая измеряет деформируемость эритроцитов. Эритроциты инкубировали с возрастающими концентрациями гистонов в течение 1 ч и, при наивысшей использованной концентрации (400 мкг/мл), также инкубировали либо с mCBS, либо с MTS (100 и 200 мкг/мл) перед прохождением через искусственную селезенку. Данные представляют собой средние зна-

чения \pm среднеквадратичное отклонение. (n=3 биологических повтора). ***P <0,001, ****P <0,0001 (однофакторный ANOVA с тестом множественных сравнений Даннета).

Фиг. 4 SPA ингибируют гистон-индуцированную агрегацию и дегрануляцию тромбоцитов. а, Гистон-индуцированная агрегация выделенных тромбоцитов. б, SPA-ингибирование гистон-индуцированной (HIS) (150 мкг/мл) агрегации тромбоцитов. с, Гистон-индуцированная дегрануляция тромбоцитов в цельной крови, измеренная по высвобождению АТФ. Пунктирная линия - высвобождение АТФ из тромбин-активированных тромбоцитов. d, Ингибирование SPA гистон-индуцированной дегрануляции тромбоцитов. Данные в (а, б) представляют собой среднее значение \pm s.e.m (n=3 биологических повтора). Данные в (с, d) представляют один из трех экспериментов.

Фиг. 5 Гистоны разрушают липидные бислои и вызывают клеточный поток Ca^{2+} , процессы, блокируемые SPA. а, Продолжительность жизни искусственных липидных бислоев, подвергнутых воздействию только гистонов (HIS) (1 мкм) (n=47) или в присутствии SPA CBS (n=52) или MTS (n=40) (10 мкМ). Контрольные бислои (n=125) содержали белок ионного канала $RyR1$ (n=биологические повторы). Данные представляют собой средние значения \pm среднеквадратичное отклонение, рассчитанные с использованием непараметрического критерия Краскала-Уоллиса. б, Репрезентативные графики проточной цитометрии с использованием Ca^{2+} -чувствительного красителя Indo-1, показывающие поток Ca^{2+} НМЕС-1 через 1 мин после добавления гистона (100 мкг/мл). с, Динамика эффекта CBS и MTS (100 мкг/мл) в отношении гистон-индуцированного потока Ca^{2+} с помощью НМЕС-1. Данные в (с) из одного из двух отдельных экспериментов и среднее значение двух биологических повторов.

Фиг. 6 In vivo SPA ингибируют гистон-индуцированное повреждение ткани, тромбоцитопению, анемию и DVT. а, Кровь мышей (n=5-28/группа), которым вводили i.p. дозы SPA (как указано) за 10 мин до i.v. инъекции гистонов (50 мг/кг), собирали через 4 часа после гистонов для оценки повреждения печени (аланинаминотрансфераза, ALT), почек (креатинин, Crea) и общих тканей (лактатдегидрогеназа, LDH). Данные объединены из 10 отдельных экспериментов с n=5-28 мышей/на обработку. б, У мышей (n=5/на группу), обработанных, как указано выше, но получивших одну дозу SPA (100 мг/кг), кровь и селезенки собирали через 10 мин после гистонов для оценки циркулирующих тромбоцитов, эритроцитов и гемоглобина селезенки (Hb). с, Влияние CBS и MTS на мышиную модель гистон-индуцированного DVT (n=7-10 мышей/на группу). Среднее значение \pm среднеквадратичное отклонение *P<0,05, **P <0,01, ***P <0,001, ****p <0,0001 (однофакторный ANOVA с тестом множественных сравнений Даннета).

Фиг. 7 SPA ингибируют ряд патологий, связанных с внеклеточными гистонами. а, Выживание крыс (n=8/группа), подвергнутых лигированию и пункции слепой кишки (CLP) и получавших физиологический раствор (контроль), CBS или MTS. Значения P получены с помощью логрангового критерия (Мантеля-Кокса). б, Повреждение почек и печени у крыс CLP, измеренное по уровням ALT и креатинина в крови, с, влияние CBS и MTS (n=6-12/группа) на сердечное IRI у крыс с измерением зоны ишемии (IZ) в левом желудочке (LV), обструкции микрососудов (MVO) и площади инфаркта, d, Эффект mCBS и MTS на модели IRI на кожном лоскуте у мышей (n=3-5/группа), показаны репрезентативные фотографии. Статистический анализ (b-d) как на фиг. 6.

Фиг. 8 Пролиферация НМЕС-1 представляет собой высокочувствительный анализ как для определения цитотоксичности гистонов, так и для обнаружения ингибиторов этой цитотоксичности. а, Субконфлюэнтные монослои НМЕС-1 подвергали воздействию возрастающих концентраций гистонов в течение 3 часов, а затем добавляли 3H -тимидин и измеряли пролиферацию НМЕС-1 по включению 3H -тимидина в течение следующих 24 часов, при этом пролиферация НМЕС-1 была ингибирована гистонами с сильной зависимостью от концентрации. б, SPA mCBS и MTS (100 мкг/мл) полностью нейтрализовали антипролиферативное воздействие гистонов (400 мкг/мл) на монослои НМЕС-1. Данные представляют собой средние значения \pm среднеквадратичное отклонение (n=3 биологических повтора). ****p <0,0001 (однофакторный ANOVA с тестом множественных сравнений Даннета).

Фиг. 9 Сыворотка пациентов с сепсисом токсична для эндотелиальных клеток, эффект нейтрализуется ДНКазой I, антигистоновыми антителами и SPA. а, Корреляция (значение r Спирмена) показателей АРАСНЕ II с антипролиферативным действием сывороток пациентов с сепсисом на НМЕС-1 (n=20 пациентов). б, Корреляция показателей АРАСНЕ II с содержанием внеклеточной ДНК в сыворотках пациентов с сепсисом. с, Влияние ДНКазы I или rAb против гистона 3 (α H3) и гистона 4 (α H4) (n=4 биологических повтора/обработка) на антипролиферативный эффект сыворотки от пациента 5 с сепсисом (красный кружок, панель а). d, Способность SPA mCBS и MTS для нейтрализации антипролиферативного действия сывороток пациентов с сепсисом (SS) (n=10 пациентов). Статистический анализ как на фиг. 6.

Подробное описание предпочтительных вариантов осуществления

Настоящее изобретение относится к применению модифицированных сульфатированных целлобиозидных соединений, которые обладают высокой химической стабильностью, в лечении или предотвращении опосредованных NET заболеваний (таких как, например, сепсис, SIRS или IRI) у объекта. Такие соединения могут улучшать, ингибировать или предотвращать цитотоксический эффект NET у объекта.

Для удобства в следующих разделах в общих чертах описаны различные значения используемых в настоящем описании терминов. После этого обсуждения раскрываются общие примеры вариантов осу-

ществления, иллюстрирующие изобретение, с последующими конкретными примерами, обеспечивающими более конкретную иллюстрацию свойств различных примеров вариантов осуществления изобретения.

Общие сведения:

Специалисты в данной области техники поймут, что описанное в настоящем документе изобретение допускает изменения и модификации, отличные от тех, которые конкретно описаны, без отклонения от сущности и объема изобретения, как описано в настоящем документе. Изобретение включает в себя все такие вариации и модификации. Изобретение также включает все стадии, признаки, композиции и компоненты, упомянутые или указанные в описании, индивидуально или вместе, и любые и все комбинации или любые два или более из указанных стадий или признаков. Функционально эквивалентные продукты, составы веществ и способы явно входят в объем изобретения, как описано в настоящем документе.

Все публикации, ссылки, документы, патенты и заявки на патенты, цитируемые в настоящем документе, выше или ниже, включены в настоящий документ в качестве ссылки в полном объеме, что означает, что эти публикации, ссылки, документы, патенты и заявки на патенты должны быть прочитаны и рассмотрены как часть этого текста. То, что любая публикация, ссылка, документ, патент или заявка на патент, цитируемые в этом тексте, не повторяются в этом тексте, просто для краткости. Однако упомянутые в настоящем документе публикации, ссылки, документы, патенты и заявки на патенты цитируются для описания и раскрытия протоколов, реагентов и продуктов, о которых сообщается в публикациях и которые могут быть использованы в связи с изобретением. Ничто в настоящем документе не должно толковаться как признание того, что изобретение не имеет права датировать такое описание задним числом на основании предшествующего изобретения или по любой другой причине. Все заявления относительно даты или представления относительно содержания этих документов основаны на информации, доступной для заявителей и не представляют собой какое-либо признание относительно правильности дат или содержания этих документов.

Любые инструкции производителя, описания, спецификации продуктов и списки продуктов для любых продуктов, упомянутых в настоящем документе или в любом документе, включенном в настоящий документ посредством ссылки, тем самым включены сюда посредством ссылки и могут быть использованы на практике изобретения.

Определения выбранных терминов, используемых в настоящем документе, можно найти в кратком изложении изобретения и подробном описании изобретения и применяются повсюду. Если не указано иное, все другие используемые в настоящем описании научные и технические термины имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в данной области техники, к которой принадлежит изобретение. Если есть очевидное несоответствие между использованием термина в данной области техники и его определением, приведенным в настоящем документе, определение, приведенное в спецификации, имеет преимущественную силу.

Определения

За исключением рабочих примеров или если указано иное, все числа, выражающие количества ингредиентов или условия реакции, используемые в настоящем описании, следует понимать как модифицированные во всех случаях термином "примерно". Например, термин "примерно", когда он используется в связи с процентами, может означать $\pm 10\%$.

Если контекст не требует иного или в спецификации специально не указано иное, целые числа, стадии или элементы изобретения, изложенные в настоящем документе как целые числа в единственном числе, стадии или элементы, явно охватывают как единственное, так и множественное число перечисленных целых чисел, стадий или элементов. В данном описании, если не указано иное или контекст не требует иного, ссылка на одну стадию, химическое соединение, группу стадий или группу химических соединений должна рассматриваться как охватывающая одну и множество (т. е. один или больше) тех стадий, химических соединений, групп стадий или групп композиций вещества. Соответственно, при использовании в настоящем документе и в прилагаемой формуле изобретения, формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если контекст явно не диктует иное. Таким образом, например, ссылка на "сульфатированный целлобиозид, модифицированный небольшим незаряженным заместителем на его восстанавливающем конце, или его фармацевтически приемлемую соль" включает множество таких модифицированных сульфатированных целлобиозидных соединений или множество их солей и так далее.

Во всей спецификации и формуле изобретения, если контекст не требует иного, слово "содержать" или варианты, такие как "содержит" или "содержащий", будет пониматься как подразумевающее включение указанной стадии или элемента, или целого числа, или группы стадий или элементов или целые числа, но не исключение любой другой стадии, элемента, целого числа или группы стадий, элементов или целых чисел.

Используемый в настоящем описании термин "включающий", а также варианты, такие как "включает" и "включенный", также следует понимать как не ограничивающие.

В настоящей заявке использование "или" означает "и/или", если не указано иное.

Описанное в настоящем документе изобретение может включать в себя один или больше диапазо-

нов значений (например, размер, замещение, напряженность поля и т. д.). Под диапазоном значений будут пониматься все значения в пределах диапазона, включая значения, определяющие диапазон, и значения, примыкающие к диапазону, которые приводят к тому же или по существу к тому же результату, что и значения, непосредственно смежные с тем значением, которое определяет границу к диапазону. Например, специалист в соответствующей области поймет, что 10%-отклонение верхнего или нижнего пределов диапазона может быть полностью подходящим и охватывается настоящим изобретением. Более конкретно, изменение верхнего или нижнего пределов диапазона будет составлять 5% или, как это обычно принято в данной области техники, в зависимости от того, какое из значений больше.

Используемый в настоящем описании термин "NET" относится к внеклеточным комплексам нуклеосом и белков, например белков, обладающих противомикробной активностью. Нуклеосомы могут происходить из нейтрофилов, тучных клеток, эозинофилов, моноцитов или лейкоцитов.

В данном контексте фраза "осложнение, связанное с NET" означает, без особого ограничения, связанные с NET:

a. системные воспалительные реакции на: инфекцию (включая бактерии, вирус, грибковые, паразитарные инфекции), сепсис (включая сепсис, индуцированный бактериями, вирусами, грибами, паразитами, прионами); или на неинфекционные индукторы, включая неинфекционные синдромы системного воспалительного ответа, хирургическое вмешательство, травму, кровотечение, ожоги, острый панкреатит, преэклампсию и острое повреждение почек;

b. гипоксию на локальном тканевом уровне, например после закупорки артерии из-за атеросклероза, спонтанный разрыв сосуда, травматическое повреждение сосуда, включая сердечное и трансплантационное IRI; или на уровне всего тела после прекращения дыхания, например вследствие утопления, воздействия газа или остановки сердца и дыхания и включает такие заболевания, как, например, острый респираторный дистресс-синдром, повреждение легких, связанное с ИВЛ, хроническое обструктивное заболевание легких и лекарственное поражение ткани;

c. гемостаз или обструкция сосудов, как например, сердечно-сосудистое заболевание или хроническое сердечно-сосудистое заболевание, такое как атеросклероз, коагуляция и тромбоз (например, тромбоз глубоких вен); острое повреждение легких, связанное с переливанием крови (TRALI);

d. фиброз, при котором функциональная ткань паренхиматозного органа заменяется фиброзной тканью, что может серьезно ухудшить функцию органа, такую как фиброз легких, идиопатический фиброз легких;

e. аутоиммунные болезненные состояния и воспалительные заболевания, такие как, например, рассеянный склероз, опухолеассоциированное воспаление, гиперовоспалительные болезненные состояния, системная красная волчанка, спондилоартропатия, анкилозирующий спондилит, псориатический артрит, реактивный артрит, энтеропатический артрит, воспалительное заболевание кишечника, (CF), астма, гломерулонефрит, хроническое заболевание легких, болезнь Крона, заболевание раздраженного кишечника, ревматоидный артрит, ювенильный ревматоидный артрит, васкулит (AAV), связанный с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами (AAV), такой как гранулематоз с полиангиитом и микроскопический полиангиит), характеризующийся деструкцией и воспалением мелких сосудов, семейная средиземноморская лихорадка, боковой амиотрофический склероз, злокачественное новообразование, синдром Шегрена, ранний артрит, вирусный артрит, псориаз, возрастной фиброз органов, идиопатический фиброз легких, ювенильный диабет (типа 1), сахарный диабет (типа 2), антифосфолипидный синдром,

f. различные заболевания центральной нервной системы, такие как болезнь Хантингтона,

g. деградация, индуцированная цитокинами и хемокинами, такая как подагра. Вышеупомянутые состояния связаны с увеличением NETоза, и, таким образом, NET могут быть мишенью при лечении этих расстройств.

Используемые в настоящем описании термины "недомогание", "состояние" или "заболевание" (взаимозаменяемые) означают медицинское осложнение, связанное с высвобождением NET.

В контексте настоящего описания термин "сепсис" включает в себя все стадии заболевания или состояния сепсиса, которые охарактеризованы в стандартных медицинских справочных текстах и/или известны специалисту в данной области. Например, сепсис включает тяжелый сепсис, острый и хронический сепсис и септический шок. Используемый в настоящем описании термин "сепсис" также включает эпизоды, связанные с инфекцией. Термин "SIRS" (синдром системного иммунного ответа), используемый в настоящем описании, включает эпизоды, не связанные с инфекцией, такие как, например, травмы, ожоги, панкреатит, трансплантация органов, хирургическое вмешательство, лизис опухоли после терапевтических схем лечения злокачественного новообразования, перинатальные осложнения и иммуносупрессивная профилактика для аллогенных трансплантатов.

В контексте настоящего описания термины "заболевание, ассоциированное с сепсисом или SIRS" или "заболевание, ассоциированное с сепсисом или SIRS", включают в своем значении все признаки и симптомы, прямо или косвенно связанные с сепсисом, происходящие из, вызванные или сопровождающие любую или все стадии сепсиса или SIRS, заболевания или состояния, описанные в стандартных медицинских справочных текстах и/или известные специалисту в данной области. Например, медицинские состояния

или заболевания, связанные с сепсисом или SIRS, включают один или больше из следующих признаков или симптомов, связанных с, происходящих из, вызванных или сопровождающих любую или все стадии сепсиса или заболеваний или состояний SIRS у объекта, которые могут проявляться у объекта с инфекцией или без нее: артериальная гипотензия, метаболический ацидоз, снижение системного сосудистого сопротивления, учащенное сердцебиение (тахикардия), учащенное дыхание (тахипноэ), общее или системное воспаление, повышенное или пониженное количество лейкоцитов (лейкоцитоз или лейкопения), повышенное количество NET в крови, дисфункция органов, такая как острая дисфункция органов, дисфункция системы кровообращения, синдром множественной органной дисфункции, диссеминированное внутрисосудистое свертывание (DIC), отложение фибрина в микрососудистом русле одного или больше органов, лихорадка, спутанность сознания, пневмония, кашель при пневмонии, почечная инфекция, болезненное мочеиспускание при почечной инфекции и/или септический шок.

Используемые в настоящем описании термины "уменьшение", "снижение" или "ингибирование" обычно используются для обозначения уменьшения на статистически значимую величину. Однако, во избежание сомнений, "уменьшенное", "уменьшение", или "снижение", или "ингибирование" означает уменьшение, по меньшей мере, на 10% по сравнению с контрольным уровнем, например, в отсутствие агента, например, уменьшение по меньшей мере примерно на 20%, или по меньшей мере примерно на 30%, или по меньшей мере примерно на 40%, или по меньшей мере примерно на 50%, или по меньшей мере примерно на 60%, или по меньшей мере примерно на 70%, или по меньшей мере примерно на 80%.

Используемые в настоящем описании термины "улучшить", "увеличенный", "увеличивать", "усиливать" или "активировать" используются для общего обозначения увеличения на статистически значимую величину; во избежание каких-либо сомнений термины "улучшить", "увеличенный", "увеличивать", или "усиливать" или "активировать" означают увеличение, по меньшей мере, на 10% по сравнению с контрольным уровнем, например, в отсутствие агента, например, увеличение, по меньшей мере, примерно на 20%, или по меньшей мере примерно на 30%, или по меньшей мере примерно на 40%, или по меньшей мере примерно на 50%, или по меньшей мере примерно на 60%, или по меньшей мере примерно на 70%, или по меньшей мере примерно на 80%, или по меньшей мере примерно 2-кратное, или, по меньшей мере, примерно 3-кратное, или, по меньшей мере, примерно 4-кратное, или, по меньшей мере, примерно 5-кратное, или, по меньшей мере, примерно 10-кратное увеличение, или любое увеличение между 2-кратным и 10-кратным или больше по сравнению с контрольным уровнем.

Используемые в настоящем описании термины "вводить", "вводимый" и "введение" относятся к введению композиции объекту с помощью метода или пути, который приводит по меньшей мере к частичной локализации композиции в желаемом месте, так что производится желаемый эффект. Соединение или композиция, описанные в настоящем документе, могут вводиться любым подходящим путем, известным в данной области, включая, помимо прочего, пероральный или парентеральный пути, включая внутривенное, внутримышечное, подкожное, трансдермальное, дыхательное (аэрозольное), легочное, назальное, ректальное и местное (включая буккальное и сублингвальное) введение. В некоторых вариантах осуществления соединения представляет собой полианионный сульфатированный целлобиозид, модифицированный небольшим незаряженным гликозидно-связанным заместителем на его восстанавливающем конце, или его фармацевтически приемлемую соль. Предпочтительно небольшой незаряженный гликозидно-связанный заместитель, который присутствует на восстанавливающем конце полианионного сульфатированного целлобиозида, улучшает химическую стабильность полианиона по сравнению с тем же полианионом, который сульфатирован на его восстанавливающем конце. Когда указанное выше соединение присутствует в композиции, такой как терапевтическая композиция, его можно приготовить для парентерального введения или другого метода, обеспечивающего доставку в целевой участок. Некоторые иллюстративные способы введения включают, но не ограничиваются ими, инъекцию, инфузию, инстилляцию, ингаляцию или прием внутрь.

В данном контексте термин "инъекция" включает, без ограничения, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, внутритекальную, внутрижелудочковую, внутрикапсульную, внутриглазничную, внутрисердечную, внутрикожную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, внутрибрюшинную, внутричерепноспинальную и надчрепную инъекцию и инфузию. В предпочтительных вариантах осуществления композиции вводят путем внутривенной инфузии или инъекции.

Используемые в настоящем описании термины "лечить", "лечение" и т. п. в контексте настоящего изобретения в той мере, в какой они относятся к любому из состояний или заболеваний, перечисленных в настоящем документе, означают облегчение, ослабление, улучшение, подавление, замедление, обращение вспять или остановку прогрессирования, обострения, ухудшения, прогрессирования, ожидаемого прогрессирования или тяжести по меньшей мере одного симптома или осложнения, связанного с таким состоянием или заболеванием. В одном варианте осуществления симптомы состояния или заболевания облегчаются по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40% или по меньшей мере на 50%.

Используемые в настоящем описании выражения "эффективное количество", "терапевтически эффективное количество" или "эффективная доза" (используемые в настоящем описании взаимозаменяемо)

включают в своем значении достаточное, но нетоксичное количество соединения или композиции по изобретению для обеспечения желаемого эффекта. Точное количество требуемого соединения или композиции будет варьироваться от объекта к объекту в зависимости от таких факторов, как желаемый эффект, вид, подвергаемый лечению, возраст и общее состояние объекта, тяжесть состояния, подлежащего лечению, вводимый агент, схема введения и т. д. Таким образом, невозможно указать точное "эффективное количество". Однако для любого конкретного случая подходящее эффективное количество (доза) может быть определено обычным специалистом в данной области, используя только рутинные эксперименты. Обычно терапевтически эффективное количество может варьироваться в зависимости от истории болезни объекта, возраста, состояния, пола, а также тяжести и типа медицинского состояния у объекта и введения других фармацевтически активных агентов.

Понятно, что в данном контексте ссылка на использование соединения или композиции в терапевтических или фармацевтических целях в равной степени применима как для человека, так и для других применений, таких как ветеринария. Следовательно, следует понимать, что, если не указано иное, ссылка на "пациент", "объект" или "индивидуум" (взаимозаменяемо используется в настоящем документе) означает человека или животное, отличное от человека, такое как индивидуум, представляющий любой вид социальной, экономической или исследовательской важности, включая, помимо прочего, млекопитающих, птиц, зайцеобразных, овец, крупный рогатый скот, лошадей, свиней, кошек, собак, приматов и грызунов. Более предпочтительно, пациентом, объектом или индивидуумом является животное, принадлежащее млекопитающим. Млекопитающим желательно является человек или примат, не являющийся человеком, или животное-компаньон, такое как домашняя собака, кошка, лошадь, обезьяна, мышь, крыса, кролик, овца, коза, корова или свинья. В одном особенно предпочтительном примере пациентом, объектом или индивидуумом является человек.

Используемый в настоящем описании термин "небольшой незаряженный гликозидно-связанный заместитель" относится к заместителю, выбранному из группы, состоящей из O-(C₁₋₆)алкила, S-(C₁₋₆)алкила или N-ди-(C₁₋₆)алкила, где каждый алкил может быть прямым, разветвленным или циклическим, может содержать одну или больше двойных или тройных связей и может быть замещен одним или больше атомами галогена, и где две алкильные группы на N-ди-(C₁₋₆)алкиле вместе могут образовывать кольцо.

Определения выбранных терминов, используемых в настоящем документе, можно найти в подробном описании изобретения и применять повсюду. Если не указано иное, все другие используемые в настоящем описании научные и технические термины имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в данной области техники, к которой принадлежит изобретение.

Иллюстративные варианты осуществления изобретения

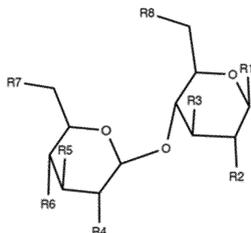
Последующее подробное описание этого изобретения включено исключительно в целях иллюстрации изобретения и никоим образом не должно пониматься как ограничение широкого описания изобретения, как изложено выше.

1. Соединения по изобретению

В первом аспекте изобретения предложено соединение для применения при лечении NET-опосредованного осложнения, где соединение включает: полианионный сульфатированный целлобиозид или полианионный сульфатированный целлобиозид, модифицированный небольшим незаряженным гликозидно-связанным заместителем на его восстанавливающем конце или его фармацевтически приемлемую соль. Заместитель, придающий молекуле высокую химическую стабильность по отношению к тому же полианиону, но который сульфатирован на его восстанавливающем конце. Предпочтительно этот класс соединений должен иметь высокий суммарный отрицательный заряд.

Соединения по настоящему изобретению могут облегчить NET-опосредованные осложнения (такие как сепсис или ишемические реперфузионные повреждения) как превентивно, то есть в качестве профилактического предварительного лечения до медицинской процедуры, так и терапевтически во время лечения после того, как возникли состояния или заболевание.

В одном из вариантов осуществления изобретения модифицированный полианионный сульфатированный целлобиозид имеет общую структуру:



где:

R1 представляет собой сульфатную группу или небольшой незаряженный гликозидно-связанный заместитель, например O или S-(C₁₋₆)алкил; и

каждый из R2-R8 выбран из: (i) небольшого незаряженного O-связанного заместителя или (ii) суль-

фатной группы.

Предпочтительно R1 представляет собой O или S-(C₁₋₆)алкил. Когда R1 представляет собой O или S-(C₁₋₆)алкил, выбранный заместитель предпочтительно улучшает химическую стабильность полианиона по сравнению с таким же полианионом с сульфатной группой у R1.

Предпочтительно каждый из R2-R8 выбран из: (а) немодифицированной гидроксильной группы; или (б) сульфатной группы.

Более предпочтительно, R1 представляет собой метоксигруппу или этоксигруппу, и каждый из R2-R8 представляет собой сульфатную группу.

Желательно, чтобы класс соединения имел высокий суммарный отрицательный заряд, то есть являлся полианионом.

Аномерная конфигурация небольшого незаряженного гликозидного заместителя (R1) может находиться в любом из α или β положения. Предпочтительно небольшой незаряженный заместитель находится в конфигурации β .

В наиболее предпочтительной форме изобретения соединение представляет собой сульфат β -О-метилцеллобиозида или его фармацевтически приемлемую соль, которая представляет собой дисахарид сульфатированного β -О-метилцеллобиозида. В качестве иллюстрации соединение представляет собой натриевую соль сульфата β -О-метилцеллобиозида.

mCBS очень стабилен по сравнению с CBS и хорошо переносится в высоких дозах.

Небольшой незаряженный гликозидно-связанный заместитель, который присутствует на восстанавливаемом конце полианионного сульфатированного целлобиозида, улучшает химическую стабильность полианиона по сравнению с тем же полианионом, который сульфатирован на его восстанавливаемом конце.

Используемый в настоящем описании термин химическая стабильность представляет собой тенденцию соединения по настоящему изобретению противостоять изменениям (в частности, разложению в его естественной окружающей среде или при воздействии воздуха, тепла, света, давления или других естественных условий, либо из-за внутренней реакции).

Соединение по изобретению является "стабильным", если оно не разлагается в значительной степени по сравнению с тем же полианионом, который сульфатирован на его восстанавливаемом конце, после по меньшей мере одного месяца хранения в условиях предполагаемого использования или нормальных условиях окружающей среды.

Соединение по настоящему изобретению будет значительно разлагаться, если оно потеряет 3 или более сульфатных групп после по меньшей мере одного месяца хранения в условиях предполагаемого использования или нормальных условиях окружающей среды. Предпочтительно соединение по настоящему изобретению будет значительно разлагаться, если оно потеряло 2 сульфатные группы после по меньшей мере одного месяца хранения в условиях предполагаемого использования или нормальных условиях окружающей среды. Наиболее предпочтительно, чтобы соединение по изобретению значительно разложилось, если оно потеряло 1 сульфатную группу после по меньшей мере одного месяца хранения в условиях предполагаемого использования или нормальных условиях окружающей среды.

Предпочтительно соединение по настоящему изобретению является химически стабильным по меньшей мере в течение 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 месяцев при хранении в составе фосфатного буфера при pH 7,5 и при 2-8°C. Более предпочтительно, стабильность измеряют в течение периода от 6 месяцев до 2 лет, когда соединение хранят в составе фосфатного буфера при pH 7,5 и хранят при температуре примерно 2-8°C.

Используемое в настоящем описании выражение "фармацевтически приемлемая соль (соли)" включает те соли, которые в рамках медицинского заключения подходят для использования в контакте с тканями людей и низших животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции и т. п., и соизмеримы с разумным соотношением польза/риск.

Фармацевтически приемлемые соли хорошо известны в данной области. Они включают, например, кислотно-аддитивные соли (образованные со свободными аминогруппами белка), полученные из неорганических кислот (например, соляной или фосфорной кислот, или из органических кислот (например, лимонной, уксусной, шавелевой, винной, миндальной и подобных). Соли, образованные свободными карбоксильными группами белка, также могут быть получены из неорганических оснований (например, гидроксидов натрия, калия, аммония, кальция или железа) или из органических оснований (например, изопропиламина, триметиламина, гистидина, прокаина и т.п.).

В предпочтительной форме изобретения модифицированный сульфатированный целлобиозид по изобретению присутствует в виде фармацевтически приемлемой соли. В качестве иллюстрации соединение представляет собой натриевую соль β -О-метилцеллобиозидсульфата, а именно β -О-метилцеллобиозидсульфат натрия (mCBS.Na).

Модифицированные сульфатированные целлобиозидные соединения или их фармацевтически приемлемые соли, используемые в способах или композициях по настоящему изобретению, могут быть получены способами, известными специалистам в данной области. Например, способы получения сульфа-

тированных соединений, модифицированных незаряженным заместителем на его восстанавливающих концах, в целом описаны в Katrin C Probst и Hans Peter Wessel, 2001, J. Carbohydrate Chemistry, 20 (7 и 8): 549-560, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

2. Способы лечения

Поскольку соединения по настоящему изобретению и терапевтические или фармацевтические композиции, включающие указанные соединения, могут улучшать или предотвращать патологическую активность NET, в настоящем изобретении в качестве второго аспекта изобретения предложен способ лечения или предотвращения NET-ассоциированных осложнений, причем указанный способ включает стадию: введения объекту терапевтически или фармацевтически эффективного количества полианионного сульфатированного целлобиозида или полианионного сульфатированного целлобиозида, модифицированного небольшим незаряженным гликозидно-связанным заместителем на его восстанавливающем конце, или его фармацевтически приемлемой соли.

Кроме того, в третьем аспекте изобретения предложен способ улучшения накопления NET у объекта, причем указанный способ включает стадию: введения объекту терапевтически или фармацевтически эффективного количества полианионного сульфатированного целлобиозида или полианионного сульфатированного целлобиозида, модифицированного небольшим незаряженным гликозидно-связанным заместителем на его восстанавливающем конце, или его фармацевтически приемлемой соли.

В варианте осуществления второго и третьего аспектов изобретения выбранное соединение предпочтительно представляет собой полианионный сульфатированный целлобиозид, модифицированный небольшим незаряженным гликозидно-связанным заместителем на восстанавливающем конце. Более предпочтительно, небольшой незаряженный гликозидно-связанный заместитель улучшает химическую стабильность полианиона по сравнению с тем же полианионом, который сульфатирован на его восстанавливающем конце. В частности, когда соединение представляет собой mCBS, то это сульфатированный β -О-метилцеллобиозид дисахарид или натриевая соль β -О-метилцеллобиозидсульфата, а именно mCBS.Na.

Настоящее изобретение, описанное вторым и третьим аспектами изобретения, предполагает лечение, улучшающее или предотвращающее множество различных недомоганий NET, которые вызваны образованием NET и связанной с ним токсичностью. Согласно этим аспектам изобретения соответствующие способы могут использоваться для лечения или предотвращения NET-ассоциированных осложнений у объекта.

Обычно NET-ассоциированные состояния связаны с повышенным NETозом, и, таким образом, NET могут быть мишенью при лечении этих расстройств путем изменения (предпочтительно снижения) уровня или активности NET до базовой концентрации или количества, которое согласуется с их нормальными патофизиологическим уровнем у объекта.

Самая большая группа активаторов NET представляет собой патогенные грамположительные и грамотрицательные бактерии, липотейхоевую кислоту и LPS, а также продукты распада прокариотических белков. Некоторые примеры бактерий, которые индуцируют NET, включают, в качестве иллюстрации: *S. aureus*, *Streptococcus* sp., *P. aeruginosa*, *Bordetella pertussis*, *Mannheimia haemolytica*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Yersinia enterocoli*, *H. influenzae*, *K. pneumoniae*, *L. monocytogenes*, *M. tuberculosis* и *S. flexneri*). Активация NET также возникает в результате: грибковой инфекции (примеры включают, в качестве иллюстрации: (*Aspergillus* spp. например, *A. nidulans*, *A. fumigatus* и *Candida* spp., такие как *C. albicans*); инфекцию простейшими паразитами (примеры включают, в качестве иллюстрации: *L. amazonensis* или его поверхностный липофосфогликан, *Strongyloides stercoralis*, *Eimeria bovis*, виды *Leishmania*, *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium falciparum*); или вирусную инфекцию (примеры включают в качестве иллюстрации: ВИЧ/SIV, респираторно-синцитиальный вирус Хантаан (RSV), вирус гриппа). Эти патогенные активаторы представлены только в качестве примера и не составляют определенный список организмов, которые представляют собой активаторы NET. Специалистам в данной области будет известна способность организма к активации NET.

Ответ, вызванный инфекцией организмами, такими как перечисленные выше, обычно является воспалительным ответом, вызывающим активацию путей воспаления, однако другие ответы, такие как аутоиммунные ответы, заболевания легких, тромбоз или другая микробная активность, также могут присутствовать в результате активации NET. Активация NET также возникает из-за неинфекционных индукторов, включая неинфекционный синдром системной воспалительной реакции, хирургическое вмешательство, травму, кровотечение, ожоги и повреждение почек; гипоксию на локализованном тканевом уровне или на уровне всего тела; гемостаз или обструкцию сосудов; фиброз, при котором функциональная ткань паренхиматозного органа заменяется фиброзной тканью; аутоиммунные болезненные состояния и воспалительные заболевания, различные заболевания центральной нервной системы, а также дегенерацию, вызванную цитокинами и хемокинами.

В варианте осуществления второго или третьего аспектов изобретения соответствующие способы могут дополнительно включать одновременное или сопутствующее введение объекту вместе с соединением по изобретению второго терапевтического агента (такого как противовоспалительные агенты, антибиотические агенты, противовирусные агенты, противогрибковые агенты или другие формы медицин-

ского вмешательства), которое отличается от соединения по изобретению, которое обеспечивает дополнительное лечение медицинского состояния, которым страдает или может страдать объект.

Предпочтительно, в качестве примера этих аспектов изобретения, соответствующие способы обеспечивают средства лечения или предотвращения сепсиса или SIRS, или медицинского состояния или заболевания, ассоциированного с сепсисом или SIRS у объекта.

В качестве другого примера этих аспектов изобретения соответствующие способы обеспечивают средства лечения или предотвращения IRI или медицинского состояния или заболевания, связанного с IRI у объекта.

Предпочтительно способ улучшает состояние или болезненное состояние в достаточной степени, чтобы позволить врачу вводить другие лекарственные средства для лечения вторичных состояний. Таким образом, изобретение также включает введение терапевтически эффективного количества полианионного сульфатированного целлобиозида, модифицированного небольшим незаряженным гликозидно-связанным заместителем на его восстанавливающем конце, или его фармацевтически приемлемой соли объекту с целью улучшения у пациента NET-ассоциированных осложнений.

В некоторых примерных вариантах осуществления согласно второму или третьему аспектам изобретения идентифицированные способы могут дополнительно включать стадию: одновременного или сопутствующего введения объекту с модифицированным сульфатированным целлобиозидом терапевтически или фармацевтически эффективного количества второго активного агента, соединения или композиции, выбранных из: одного или больше из противовоспалительных средств, антибиотических средств, противовирусных средств, противогрибковых средств и/или любой другой формы фармацевтической композиции, которая подвергается лечению одно или больше состояний, которыми страдает объект или риску которых подвержен.

Согласно этому варианту осуществления второй активный агент, соединение или композиция обеспечивает дополнительное лечение к лечению, направленному на осложнение, ассоциированное с NET (такое как, например, сепсис, SIRS или IRI) и/или для медицинских состояний или заболеваний, ассоциированных с такими осложнениями. Предпочтительно второй активный агент, соединение или композиция содержит один или больше противовоспалительных агентов.

Предпочтительно, второй активный агент представляет собой средство для медицинского вмешательства для заболевания, которым страдает пациент, которое связано с медицинским заболеванием, которое подвергается лечению соединениями по настоящему изобретению, или отличается от него, причем указанный второй активный агент обеспечивает дополнительное лечение пациента.

Раскрытые в настоящем документе терапевтические средства и/или фармацевтические композиции по изобретению можно вводить терапевтически или профилактически. При терапевтическом применении соединения и композиции вводят пациенту, уже страдающему от осложнений, ассоциированных с NET, или заболевания, связанного с осложнениями, ассоциированными с NET, в количестве, достаточном для излечения или, по меньшей мере, частичного купирования его симптомов. Соединение или композиция должны быть представлены в количестве активного соединения, достаточном для эффективного лечения пациента либо в виде однократной дозы, либо как часть схемы лечения, например схемы лечения с многократными дозами. В профилактическом применении соединения и композиции по изобретению вводят объекту с риском развития заболевания, ассоциированного с осложнениями, ассоциированными с NET, в количестве, достаточном, по меньшей мере, для частичного купирования симптомов и/или осложнений заболевания.

В четвертом аспекте изобретения предложен способ лечения или предотвращения медицинского состояния, недомогания или заболевания, ассоциированного с опосредованной NET патологией у объекта, где способ включает стадию: введения объекту терапевтически или фармацевтически эффективного количества: полианионного сульфатированного целлобиозида или полианионного сульфатированного целлобиозида, модифицированного небольшим незаряженным гликозидно-связанным заместителем на его восстанавливающем конце, или его фармацевтически приемлемой соли.

В варианте осуществления четвертого аспекта изобретения выбранное соединение предпочтительно представляет собой полианионный сульфатированный целлобиозид, модифицированный небольшим незаряженным гликозидно-связанным заместителем на восстанавливающем конце. Более предпочтительно, небольшой незаряженный гликозидно-связанный заместитель улучшает химическую стабильность полианиона по сравнению с тем же полианионом, который сульфатирован на его восстанавливающем конце. В частности, когда соединение представляет собой mCBS, то это сульфатированный β -О-метилцеллобиозид дисахарид или натриевая соль β -О-метилцеллобиозидсульфата, а именно mCBS.Na.

В одном предпочтительном примере способ используется для лечения NET, которые (i) являются цитотоксичными по отношению к эндотелию у объекта, или (ii) способствуют эндотелиальной дисфункции у объекта, или (iii) инициируют коагуляцию путем активации тромбоцитов у объекта, или (iv) вызывают хрупкость эритроцитов и, как следствие, анемию у объекта.

Пациенты, страдающие инфекцией, вызванной одним или больше из указанных выше организмов, имеют повышенные уровни NET в крови.

В варианте осуществления второго, третьего или четвертого аспектов изобретения предложен способ лечения (профилактического или терапевтического) сепсиса, ассоциированного с NET, у объекта путем ингибирования цитотоксической активности NET, причем указанный способ включает стадию: введения объекту терапевтически или фармацевтически эффективное количество полианионного сульфатированного целлобиозида, модифицированного небольшим незаряженным гликозидно-связанным заместителем на его восстанавливающем конце, или его фармацевтически приемлемой соли. Предпочтительно небольшой незаряженный гликозидно-связанный заместитель, который присутствует на восстанавливающем конце полианионного сульфатированного целлобиозида, улучшает химическую стабильность полианиона по отношению к тому же полианиону, который сульфатирован на его восстанавливающем конце. Более предпочтительно модифицированный сульфатированный целлобиозид представляет собой mCBS или, более конкретно, его фармацевтически приемлемую соль, такую как mCBS.Na.

Как показано в настоящем документе, соединения по изобретению, в частности mCBS, блокируют токсические эффекты NET и, таким образом, полезны в качестве лечения сепсиса.

Таким образом, соединения по изобретению и терапевтические композиции, включающие указанные соединения, обеспечивают средства для улучшения цитотоксической активности белков NET при сепсисе, включая как предварительное лечение (в случае медицинской процедуры), так и лечение после того, как сепсис развился.

В наиболее предпочтительной иллюстративной форме изобретения, согласно любому аспекту, варианту осуществления или примеру, описанным в настоящем документе, соединение по изобретению используется для лечения или предотвращения одного или больше из следующих обсуждаемых заболеваний или состояний.

Сепсис

Сепсис (включая септический шок) представляет собой системную реакцию на инфекцию, характеризующуюся артериальной гипотензией, метаболическим ацидозом, снижением системного сосудистого сопротивления, тахипноэ и дисфункцией органов. Сепсис (включая септический шок) также представляет собой системную воспалительную реакцию на инфекцию, связанную с активацией ряда защитных механизмов хозяина, включая сеть цитокинов, лейкоциты, а также системы комплемента и коагуляции фибринолиза. Диссеминированная внутрисосудистая коагуляция (DIC) с обширным отложением фибрина в микрососудистых сетях различных органов может быть ранним проявлением сепсиса. DIC представляет собой важный медиатор в развитии синдрома полиорганной недостаточности и способствует плохому прогнозу пациентов с септическим шоком.

Иммунологический ответ, вызывающий сепсис, представляет собой системный воспалительный ответ, вызывающий широкую активацию воспаления и путей коагуляции. Это может прогрессировать до дисфункции системы кровообращения и, даже при оптимальном лечении, может привести к синдрому полиорганной дисфункции и, в конечном итоге, к смерти.

Симптомы сепсиса часто связаны с основным инфекционным процессом и, если их не лечить, могут проявляться как тяжелый сепсис (сепсис с острой дисфункцией органов) или септический шок (сепсис с рефрактерной артериальной гипотензией). Когда два или больше критерия синдрома системной воспалительной реакции (например, общее воспаление, лихорадка, повышенное количество лейкоцитов (лейкоцитоз) и повышенная частота сердечных сокращений (тахикардия) и частота дыхания (тахипноэ)) выполняются без признаков инфекции, пациентам может быть поставлен диагноз просто "SIRS", который представляет собой септическое воспалительное состояние, поражающее все тело.

У многих пациентов с сепсисом наблюдается быстрое ухудшение в течение 24-48 часов. Для эффективного лечения сепсиса необходимо быстрое лечение. К сожалению, для диагностики типа инфекции требуется микробиологический анализ для определения патогена, который может занять несколько дней. Следовательно, терапия для устранения патогена (например, терапия антибиотиками) должна быть начата без знания типа и вида патогена и без знания степени инфекции. Настоящее изобретение обеспечивает такой способ.

У пациентов, страдающих сепсисом, в крови повышен уровень NET. NET вовлечены как важные медиаторы патологии сепсиса.

В варианте осуществления второго, третьего или четвертого аспектов изобретения предложен способ лечения (профилактического или терапевтического) сепсиса, ассоциированного с NET, у объекта путем ингибирования цитотоксической активности NET, причем указанный способ включает стадию: введения объекту терапевтически или фармацевтически эффективного количества полианионного сульфатированного целлобиозида или полианионного сульфатированного целлобиозида, модифицированного небольшим незаряженным гликозидно-связанным заместителем на его восстанавливающем конце, или его фармацевтически приемлемой соли.

Согласно этому варианту осуществления выбранное соединение предпочтительно представляет собой полианионный сульфатированный целлобиозид, модифицированный небольшим незаряженным гликозидно-связанным заместителем на восстанавливающем конце. Более предпочтительно, небольшой незаряженный гликозидно-связанный заместитель улучшает химическую стабильность полианиона по сравнению с тем же полианионом, который сульфатирован на его восстанавливающем конце. В частно-

сти, когда соединение представляет собой mCBS, то это сульфатированный β -О-метилцеллобиозид дисахарид или натриевая соль β -О-метилцеллобиозидсульфата, а именно mCBS.Na.

Как показано в настоящем документе, соединения по изобретению, в частности mCBS, блокируют токсические эффекты NET и, таким образом, полезны в качестве лечения сепсиса.

Таким образом, соединения по изобретению и терапевтические или фармацевтические композиции, включающие указанные соединения, обеспечивают средства для улучшения цитотоксической активности NET при сепсисе, включая как предварительное лечение (в случае медицинской процедуры), так и лечение после проявлений сепсиса.

В. Неинфекционный SIRS

Синдром неинфекционного системного воспалительного ответа (SIRS) представляет собой воспалительное состояние, поражающее все тело. Это реакция организма на неинфекционное поражение. Хотя определение SIRS относится к нему как к "воспалительной" реакции, на самом деле оно имеет провоспалительные и противовоспалительные компоненты.

SIRS представляет собой серьезное заболевание, связанное с системным воспалением, дисфункцией органов и недостаточностью органов. Это субпопуляция цитокинового шторма, при котором наблюдается аномальная регуляция различных цитокинов. SIRS также тесно связан с сепсисом, при котором пациенты удовлетворяют критериям SIRS и имеют предположительную или доказанную инфекцию. Причины неинфекционного SIRS включают, например, травму в результате операции, травматическое кровотечение, ожоги и острый панкреатит.

В варианте осуществления второго, третьего или четвертого аспектов изобретения предложен способ лечения (профилактического или терапевтического) неинфекционного SIRS, ассоциированного с NET, у объекта путем ингибирования цитотоксической активности NET, причем указанный способ включает стадию: введения объекту терапевтически или фармацевтически эффективного количества полианионного сульфатированного целлобиозидов, модифицированного небольшим незаряженным гликозидно-связанным заместителем на его восстанавливающем конце, или его фармацевтически приемлемой соли.

Согласно этому варианту осуществления выбранное соединение предпочтительно представляет собой полианионный сульфатированный целлобиозид, модифицированный небольшим незаряженным гликозидно-связанным заместителем на восстанавливающем конце. Более предпочтительно, небольшой незаряженный гликозидно-связанный заместитель улучшает химическую стабильность полианиона по сравнению с тем же полианионом, который сульфатирован на его восстанавливающем конце. В частности, когда соединение представляет собой mCBS, то это сульфатированный β -О-метилцеллобиозид дисахарид или натриевая соль β -О-метилцеллобиозидсульфата, а именно mCBS.Na.

Как показано в настоящем документе, соединения по изобретению, в частности, mCBS, блокируют токсические эффекты NET и, таким образом, полезны в качестве лечения неинфекционного SIRS.

Таким образом, соединения по настоящему изобретению и терапевтические или фармацевтические композиции, включающие указанные соединения, обеспечивают средства для улучшения цитотоксической активности NET при неинфекционном SIRS, включая как предварительное лечение (в случае медицинской процедуры), так и лечение после появления неинфекционного SIRS.

В.1 Травма

Физическая травма представляет собой серьезное физическое повреждение, изменяющее тело, например раздавливание или ампутацию конечности.

Травма тупым предметом, тип физической травмы, вызванной ударом или другой силой, приложенной к тупому предмету, или с помощью тупого предмета, тогда как проникающая травма - это тип физической травмы, при которой кожа или ткани пронизаны предметом. Травму также можно охарактеризовать как незапланированную, например, несчастный случай, или как запланированную в случае операции. Они обе могут характеризоваться легким или тяжелым повреждением тканей, кровопотерей и/или шоком, и обе могут привести к SIRS, но также значительно увеличивается риск последующей инфекции и сепсиса.

NET высвобождаются после травмы или тяжелого клеточного стресса при отсутствии инфекции. Пациенты, страдающие травмой, могут иметь повышенный уровень NET в крови. NET считаются важными медиаторами патологии травм.

В варианте осуществления второго, третьего или четвертого аспектов изобретения предложен способ лечения (профилактического или терапевтического) травмы, ассоциированной с NET, у объекта путем ингибирования цитотоксической активности NET, причем указанный способ включает стадию: введения объекту терапевтически или фармацевтически эффективное количество полианионного сульфатированного целлобиозидов или полианионного сульфатированного целлобиозидов, модифицированного небольшим незаряженным гликозидно-связанным заместителем на его восстанавливающем конце, или его фармацевтически приемлемой соли.

Согласно этому варианту осуществления выбранное соединение предпочтительно представляет собой полианионный сульфатированный целлобиозид, модифицированный небольшим незаряженным гли-

козидно-связанным заместителем на восстанавливающем конце. Более предпочтительно, небольшой незаряженный гликозидно-связанный заместитель улучшает химическую стабильность полианиона по сравнению с тем же полианионом, который сульфатирован на его восстанавливающем конце. В частности, когда соединение представляет собой mCBS, то это сульфатированный β -О-метилцеллобиозид дисахарид или натриевая соль β -О-метилцеллобиозидсульфата, а именно mCBS.Na.

Такие соединения, как mCBS, могут блокировать токсические эффекты NET и, таким образом, полезны для лечения пациентов с травмами.

Таким образом, соединения по настоящему изобретению и терапевтические или фармацевтические композиции, включающие указанные соединения, обеспечивают средства для улучшения цитотоксической активности NET при травме, включая как предварительное лечение (в случае медицинской процедуры), так и лечение после того, как травма произошла.

В.2. Хирургическая операция

В хирургии используются операционные ручные и инструментальные методы в отношении пациента для исследования и/или лечения патологического состояния, такого как болезнь или травма, для улучшения функций или внешнего вида организма, а иногда и по какой-либо другой причине. Настоящее изобретение может касаться травм, возникших в результате хирургических операций, как дополнительно определено ниже.

В варианте осуществления второго, третьего или четвертого аспектов изобретения предложен способ лечения (профилактического или терапевтического) хирургической травмы, ассоциированной с NET, у объекта путем ингибирования цитотоксической активности NET, причем указанный способ включает стадию: введения объекту терапевтически или фармацевтически эффективного количества полианионного сульфатированного целлобиозидов или полианионного сульфатированного целлобиозидов, модифицированного небольшим незаряженным гликозидно-связанным заместителем на его восстанавливающем конце, или его фармацевтически приемлемой соли.

Согласно этому варианту осуществления выбранное соединение предпочтительно представляет собой полианионный сульфатированный целлобиозид, модифицированный небольшим незаряженным гликозидно-связанным заместителем на восстанавливающем конце. Более предпочтительно, небольшой незаряженный гликозидно-связанный заместитель улучшает химическую стабильность полианиона по сравнению с тем же полианионом, который сульфатирован на его восстанавливающем конце. В частности, когда соединение представляет собой mCBS, то это сульфатированный β -О-метилцеллобиозид дисахарид или натриевая соль β -О-метилцеллобиозидсульфата, а именно mCBS.Na.

Как правило, процедура считается хирургической операцией, если она включает разрезание тканей пациента или закрытие ранее перенесенной раны. Другие процедуры, которые не обязательно подпадают под это определение, такие как ангиопластика или эндоскопия, могут считаться хирургическими операциями, если они включают обычные хирургические процедуры или настройки, такие как использование стерильной среды, анестезия, антисептические условия, типичные хирургические инструменты и наложение швов или скрепление. Все формы хирургической операции считаются инвазивными процедурами; так называемая неинвазивная хирургия обычно относится к иссечению, которое не проникает в рассматриваемую структуру (например, лазерная абляция рогаковицы), или к радиохирургической процедуре (например, облучению опухоли).

Поскольку соединения по изобретению и терапевтические или фармацевтические композиции, включающие указанные соединения, могут улучшать цитотоксическую активность NET, в настоящем изобретении предложено лечение для использования при хирургической травме, включая как предварительное лечение (в случае медицинской процедуры), так и лечение после хирургической травмы.

В.3. Травматическое кровотечение

Травматическое кровотечение в значительной степени является причиной широкомасштабных международных последствий травм, вызывая значительную долю смертей и вызывая высокую заболеваемость раненых. Несмотря на различия в догоспитальной помощи, неотложная помощь при травматическом кровотечении во всем мире схожа и соответствует общепринятым опубликованным руководствам. Уход за тяжелораненым пациентом осуществляется в виде четырех, часто перекрывающихся, стадий: реанимационная, оперативная и фаза интенсивной терапии. Диагностика и контроль кровотечения должны быть первоочередными задачами на всех фазах оказания помощи при травмах и особенно важны для пациента, находящегося в геморрагическом шоке. Ранние попытки остановить кровотечение включают прямой контроль видимых источников сильного кровотечения с помощью прямого давления, давящих повязок или жгутов; стабилизация переломов длинных костей и таза; и поддержание пациента в тепле. Во время реанимационной фазы проводится внутривенное введение подогретых жидкостей, гипотензивная реанимация перед хирургическим контролем кровотечения и соответствующее переливание крови и продуктов крови. На операционной фазе обеспечивается хирургический контроль кровотечения и любой другой травмы, а также дополнительное переливание крови. Наконец, фаза интенсивной терапии обеспечивает послеоперационную поддержку и перфузию тканей).

Поскольку соединения по изобретению и терапевтические или фармацевтические композиции,

включающие указанные соединения, могут улучшать цитотоксическую активность NET, настоящее изобретение обеспечивает лечение для применения при травматическом кровотечении, включая как предварительное лечение (в случае медицинской процедуры), так и лечение после травматического кровотечения.

В.4. Ожоги

Ожог может быть травмой, вызванной жарой, холодом, электричеством, химическими веществами, трением или радиацией. Ожоги первой степени обычно ограничиваются покраснением (эритемой), белым налетом и незначительной болью в месте травмы. Эти ожоги обычно распространяются только на эпидермис. Ожоги второй степени дополнительно заполняются прозрачной жидкостью, имеют поверхностные пузыри на коже и могут сопровождаться большей или меньшей болью в зависимости от степени поражения нервов. Ожоги второй степени затрагивают поверхностный (сосочковый) слой дермы, а также могут поражать глубокий (ретикулярный) слой дермы. При ожогах третьей степени кожа дополнительно обугливается и образуется твердый, похожий на кожу струп. Струп представляет собой корку, отделившуюся от неповрежденной части тела. Часто бывает также пурпурная жидкость. Такие ожоги часто безболезненны, потому что в обожженных местах разрушены нервные окончания. Серьезные ожоги, особенно если они охватывают большие участки тела, могут стать причиной смерти; любой намек на ожог легких (например, от вдыхания дыма) требует неотложной медицинской помощи.

Ожоги, повреждающие ткани, лежащие под кожей, такие как мышцы или кости, иногда классифицируются как ожоги четвертой степени. Эти ожоги делятся на три дополнительные степени: ожоги четвертой степени приводят к безвозвратной потере кожи, ожоги пятой степени приводят к безвозвратной потере мышц, а ожоги шестой степени приводят к обугливание костей.

Различные ожоги приводят к увеличению уровней NET, которые, в свою очередь, связаны с токсичностью. В той степени, в которой присутствует токсичность NET, настоящее изобретение направлено на снижение этой токсичности с использованием фармацевтических композиций по настоящему изобретению, тем самым уменьшая или облегчая дискомфорт со стороны пациента, а также позволяя более высокие дозы терапии.

Пациенты, страдающие ожогами, могут иметь повышенный уровень NET в крови. NET считаются важными медиаторами ожоговой патологии.

В варианте осуществления второго или третьего аспекта изобретения предложен способ улучшения цитотоксичности, индуцированной NET, вызванной ожогами у объекта, причем указанный способ включает стадию: введения объекту терапевтически или фармацевтически эффективного количества полианионного сульфатированного целлобиозида или полианионного сульфатированного целлобиозида, модифицированного небольшим незаряженным гликозидно-связанным заместителем на его восстанавливаемом конце, или его фармацевтически приемлемой соли.

Согласно этому варианту осуществления выбранное соединение предпочтительно представляет собой полианионный сульфатированный целлобиозид, модифицированный небольшим незаряженным гликозидно-связанным заместителем на восстанавливаемом конце. Более предпочтительно, небольшой незаряженный гликозидно-связанный заместитель улучшает химическую стабильность полианиона по сравнению с тем же полианионом, который сульфатирован на его восстанавливаемом конце. В частности, когда соединение представляет собой mCBS, то это сульфатированный β -О-метилцеллобиозид дисахарид или натриевая соль β -О-метилцеллобиозидсульфата, а именно mCBS.Na.

Такие соединения, как mCBS, могут блокировать токсические эффекты NET и, таким образом, полезны для лечения ожоговых пациентов.

Таким образом, соединения по изобретению и терапевтические или фармацевтические композиции, включающие указанные соединения, обеспечивают средства для улучшения цитотоксической активности NET при ожоге у объекта.

В.5. Острый панкреатит

Острый панкреатит характеризуется как быстро развивающееся воспаление поджелудочной железы в результате стерильного воспаления и гибели ацинарных клеток, включая некроз и апоптоз.

В зависимости от степени тяжести острый панкреатит может иметь серьезные осложнения и высокую смертность, несмотря на лечение. В то время как легкие случаи часто успешно лечат консервативными методами или лапароскопией, тяжелые случаи требуют инвазивной хирургии (часто более одного вмешательства) для сдерживания процесса болезни.

У пациентов, страдающих острым панкреатитом, в крови может быть повышенный уровень NET. NET считаются важными медиаторами патологии острого панкреатита.

В варианте осуществления второго, третьего или четвертого аспектов изобретения предложен способ лечения (профилактического или терапевтического) острого панкреатита, ассоциированного с NET, у объекта путем ингибирования цитотоксической активности NET, причем указанный способ включает стадию: введения объекту терапевтически или фармацевтически эффективного количества полианионного сульфатированного целлобиозида или полианионного сульфатированного целлобиозида, модифицированного небольшим незаряженным гликозидно-связанным заместителем на его восстанавливаемом

конце, или его фармацевтически приемлемой соли.

Согласно этому варианту осуществления выбранное соединение предпочтительно представляет собой полианионный сульфатированный целлобиозид, модифицированный небольшим незаряженным гликозидно-связанным заместителем на восстанавливающем конце. Более предпочтительно, небольшой незаряженный гликозидно-связанный заместитель улучшает химическую стабильность полианиона по сравнению с тем же полианионом, который сульфатирован на его восстанавливающем конце. В частности, когда соединение представляет собой mCBS, то это сульфатированный β -О-метилцеллобиозид дисахарид или натриевая соль β -О-метилцеллобиозидсульфата, а именно mCBS.Na.

Соединения, такие как mCBS, могут блокировать токсические эффекты NET и, таким образом, полезны для лечения пациентов с острым панкреатитом.

Таким образом, соединения по изобретению и терапевтические или фармацевтические композиции, включающие указанные соединения, обеспечивают средства для улучшения цитотоксической активности NET при остром панкреатите, включая как предварительное лечение (в случае медицинской процедуры), так и лечение после проявлений острого панкреатита.

С. Ишемически-реперфузионное повреждение

Ишемические реперфузионные повреждения (включая реперфузионные повреждения, связанные с трансплантацией) и медикаментозное повреждение тканей приводят к стерильному воспалению, процессу, происходящему в отсутствие микроорганизмов.

Ишемия представляет собой ограничение кровоснабжения тканей, вызывающее нехватку кислорода, необходимого для клеточного метаболизма. При длительной ишемии (60 минут и более) образуется гипоксантин как продукт распада метаболизма АТФ. Фермент ксантиндегидрогеназа превращается в ксантиноксидазу в результате большей доступности кислорода. Это окисление приводит к превращению молекулярного кислорода в высокореакционные супероксидные и гидроксильные радикалы. Ксантиноксидаза также продуцирует мочевую кислоту, которая может действовать как прооксидант, так и как поглотитель реактивных частиц, таких как пероксинитрит. Избыточный оксид азота, образующийся во время реперфузии, реагирует с супероксидом с образованием мощного реактивного вещества пероксинитрита. Такие радикалы и активные формы кислорода атакуют липиды, белки и гликозаминогликаны клеточной мембраны, вызывая дальнейшее повреждение. Они также могут инициировать определенные биологические процессы посредством передачи сигналов окислительно-восстановительного потенциала.

Реперфузионное повреждение относится к повреждению, частично вызванному воспалительной реакцией поврежденных тканей. Лейкоциты, переносимые вновь возвращающейся кровью, высвобождают множество воспалительных факторов, таких как интерлейкины, а также свободные радикалы в ответ на повреждение тканей. Восстановленный кровоток повторно вводит кислород в клетки, который повреждает клеточные белки, ДНК и плазматическую мембрану. Повреждение клеточной мембраны, в свою очередь, может вызвать высвобождение большего количества свободных радикалов. Такие реактивные частицы косвенно действуют в окислительно-восстановительной передаче сигналов, чтобы включить апоптоз. Лейкоциты также накапливаются в мелких капиллярах, закупоривая их и приводя к еще большей ишемии.

Реперфузионное повреждение также играет роль в ишемическом каскаде головного мозга, который участвует в инсульте и травме головного мозга. Повторные приступы ишемии и реперфузионного повреждения также считаются фактором, ведущим к образованию и невозможности заживления хронических ран, таких как пролежни и язвы диабетической стопы. Постоянное давление ограничивает кровоснабжение и вызывает ишемию, а во время реперфузии возникает воспаление. Поскольку этот процесс повторяется, он в конечном итоге повреждает ткани настолько, что вызывает рану.

Уровни NET повышены в моделях реперфузии ишемии животных с повреждениями печени, почек, легких и головного мозга, что свидетельствует о важной роли NET в регуляции стерильного воспаления.

NET опосредуют не только повреждение печени, но и острое повреждение почек или ишемический инсульт за счет прямой токсичности или провоспалительных эффектов. Ингибирование формирования и активности NET представляет собой терапевтическую стратегию повреждения тканей.

Пациенты, страдающие ишемическими реперфузионными повреждениями (включая реперфузионные повреждения, связанные с трансплантацией) и лекарственными средствами, имеют повышенные уровни NET в крови. NET считаются важными медиаторами ишемии/реперфузии и патологии тканевого повреждения, опосредованной лекарственными средствами.

В варианте осуществления второго, третьего или четвертого аспектов изобретения предложен способ лечения (профилактического или терапевтического) NET-ассоциированного IRI и/или медикаментозного повреждения ткани у объекта путем ингибирования цитотоксической активности NET, причем указанный способ включает стадию: введения объекту терапевтически или фармацевтически эффективного количества полианионного сульфатированного целлобиозиды или полианионного сульфатированного целлобиозиды, модифицированного небольшим незаряженным гликозидно-связанным заместителем на его восстанавливающем конце, или его фармацевтически приемлемой соли.

Согласно этому варианту осуществления выбранное соединение предпочтительно представляет со-

бой полианионный сульфатированный целлобиозид, модифицированный небольшим незаряженным гликозидно-связанным заместителем на восстанавливающем конце. Более предпочтительно, небольшой незаряженный гликозидно-связанный заместитель улучшает химическую стабильность полианиона по сравнению с тем же полианионом, который сульфатирован на его восстанавливающем конце. В частности, когда соединение представляет собой mCBS, то это сульфатированный β -О-метилцеллобиозид дисахарид или натриевая соль β -О-метилцеллобиозидсульфата, а именно mCBS.Na.

Соединения, такие как mCBS, могут блокировать токсические эффекты NET и, таким образом, полезны в качестве лечения пациентов с ишемией/реперфузией и повреждением тканей, опосредованным лекарственными средствами.

Таким образом, соединения по настоящему изобретению и терапевтические или фармацевтические композиции, включающие указанные соединения, обеспечивают средства для улучшения цитотоксической активности NET при ишемии/реперфузии и повреждении тканей, опосредованном лекарственными средствами, включая как предварительное лечение (в случае медицинской процедуры), так и лечение после ишемии/реперфузии и повреждения тканей, опосредованного лекарственными средствами.

D. Коагуляция и тромбоз

Коагуляция представляет собой биологический процесс, при котором в крови образуются сгустки. Точный механизм регуляции предотвращает aberrantную коагуляцию, которая приводит к повышенному риску кровотечения (геморрагии) или обструктивного свертывания крови (тромбоз).

Пациенты, страдающие коагуляцией или тромбозом, могут иметь повышенные уровни NET в крови. NET считаются важными медиаторами патологии коагуляции и/или тромбоза.

В варианте осуществления второго или третьего аспекта изобретения предложен способ лечения коагуляции и/или тромбоза у объекта путем ингибирования цитотоксической активности NET, причем указанный способ включает стадию: введения объекту терапевтически или фармацевтически эффективного количества полианионного сульфатированного целлобиозиды или полианионного сульфатированного целлобиозиды, модифицированного небольшим незаряженным гликозидно-связанным заместителем на его восстанавливающем конце, или его фармацевтически приемлемой соли.

Согласно этому варианту осуществления выбранное соединение предпочтительно представляет собой полианионный сульфатированный целлобиозид, модифицированный небольшим незаряженным гликозидно-связанным заместителем на восстанавливающем конце. Более предпочтительно, небольшой незаряженный гликозидно-связанный заместитель улучшает химическую стабильность полианиона по сравнению с тем же полианионом, который сульфатирован на его восстанавливающем конце. В частности, когда соединение представляет собой mCBS, то это сульфатированный β -О-метилцеллобиозид дисахарид или натриевая соль β -О-метилцеллобиозидсульфата, а именно mCBS.Na.

Соединения, такие как mCBS, могут блокировать токсические эффекты NET и, таким образом, полезны для лечения пациентов с коагуляцией и/или тромбозом.

Таким образом, соединения по изобретению и терапевтические или фармацевтические композиции, включающие указанные соединения, обеспечивают средства для улучшения цитотоксической активности NET при коагуляции и/или тромбозе, включая как предварительное лечение (в случае медицинской процедуры), так и лечение после проявлений коагуляции или тромбоза.

E. Аутоиммунное/воспалительное заболевание

В настоящем изобретении предложено лечение различных аутоиммунных и/или воспалительных болезненных состояний, таких как рассеянный склероз, спондилоартропатия, анкилозирующий спондилит, псориатический артрит, реактивный артрит, энтеропатический артрит, язвенный колит, болезнь Крона, заболевание раздраженного кишечника, ревматоидный артрит, ювенильный ревматоидный артрит, семейная средиземноморская лихорадка, боковой амиотрофический склероз, синдром Шегрена, ранний артрит, вирусный артрит или псориаз. Диагностика и лечение этих заболеваний подробно описаны в литературе.

Пациенты, страдающие аутоиммунным и/или воспалительным заболеванием, имеют повышенные уровни NET в крови. NET считаются важными медиаторами аутоиммунной и/или воспалительной патологии.

В варианте осуществления второго или третьего аспекта изобретения предложен способ лечения аутоиммунного и/или воспалительного заболевания у объекта путем ингибирования цитотоксической активности NET, причем указанный способ включает стадию: введения объекту терапевтического или фармацевтически эффективного количества полианионного сульфатированного целлобиозиды или полианионного сульфатированного целлобиозиды, модифицированного небольшим незаряженным гликозидно-связанным заместителем на его восстанавливающем конце, или его фармацевтически приемлемой соли.

Согласно этому варианту осуществления выбранное соединение предпочтительно представляет собой полианионный сульфатированный целлобиозид, модифицированный небольшим незаряженным гликозидно-связанным заместителем на восстанавливающем конце. Более предпочтительно, небольшой незаряженный гликозидно-связанный заместитель улучшает химическую стабильность полианиона по

сравнению с тем же полианионом, который сульфатирован на его восстанавливаемом конце. В частности, когда соединение представляет собой mCBS, то это сульфатированный β -О-метилцеллобиозид дисульфид или натриевая соль β -О-метилцеллобиозидсульфата, а именно mCBS.Na.

Соединения, такие как mCBS, могут блокировать токсические эффекты NET и, таким образом, полезны для лечения пациентов с аутоиммунными и/или воспалительными заболеваниями.

Таким образом, соединения по изобретению и терапевтические или фармацевтические композиции, включающие указанные соединения, обеспечивают средства для улучшения цитотоксической активности NET при аутоиммунном и/или воспалительном заболевании, включая как предварительное лечение (в случае медицинской процедуры), так и лечение после проявлений аутоиммунного и/или воспалительного заболевания.

F. Острый респираторный дистресс-синдром

Острый респираторный дистресс-синдром (ARDS), также известный как респираторный дистресс-синдром (RDS) или респираторный дистресс-синдром взрослых (в отличие от IRDS), является серьезной реакцией на различные формы повреждений легких. Это наиболее важное нарушение, приводящее к отеку легких с повышенной проницаемостью.

ARDS вызывается различными прямыми и косвенными поражениями. Он характеризуется воспалением паренхимы легких, приводящим к нарушению газообмена с сопутствующим системным высвобождением медиаторов воспаления, вызывающих воспаление, гипоксемию и часто приводящих к полиорганной недостаточности. Это состояние опасно для жизни и часто приводит к летальному исходу, обычно требуя искусственной вентиляции легких и помещения в отделение интенсивной терапии. Менее тяжелая форма называется острым повреждением легких (ALI), включая острое повреждение легких, связанное с переливанием крови (TRALI).

ARDS может возникнуть в течение 24-48 часов после повреждения или приступа острого заболевания. В таком случае у пациента обычно появляются одышка, тахипноэ и симптомы, связанные с основной причиной, то есть шоком. Его также могут спровоцировать длительные заболевания, например, малярия. ARDS может возникнуть через некоторое время после начала особенно острого случая инфекции.

Пациенты, страдающие ARDS, могут иметь повышенные уровни NET, присутствующих в их крови. NET считаются важными медиаторами патологии ARDS.

В варианте осуществления второго, третьего или четвертого аспектов изобретения предложен способ лечения (профилактического или терапевтического) ассоциированного с NET острого респираторного дистресс-синдрома у объекта путем ингибирования цитотоксической активности NET, причем указанный способ включает стадию: введения объекту терапевтически или фармацевтически эффективного количества полианионного сульфатированного целлобиозида или полианионного сульфатированного целлобиозида, модифицированного небольшим незаряженным гликозидно-связанным заместителем на его восстанавливаемом конце, или его фармацевтически приемлемой соли.

Согласно этому варианту осуществления выбранное соединение предпочтительно представляет собой полианионный сульфатированный целлобиозид, модифицированный небольшим незаряженным гликозидно-связанным заместителем на восстанавливаемом конце. Более предпочтительно, небольшой незаряженный гликозидно-связанный заместитель улучшает химическую стабильность полианиона по сравнению с тем же полианионом, который сульфатирован на его восстанавливаемом конце. В частности, когда соединение представляет собой mCBS, то это сульфатированный β -О-метилцеллобиозид дисульфид или натриевая соль β -О-метилцеллобиозидсульфата, а именно mCBS.Na.

Такие соединения, как mCBS, могут блокировать токсические эффекты NET и, таким образом, полезны для лечения пациентов с ARDS.

Таким образом, соединения по настоящему изобретению и терапевтические или фармацевтические композиции, включающие указанные соединения, обеспечивают средства для улучшения цитотоксической активности NET при ARDS, включая как предварительное лечение (в случае медицинской процедуры), так и лечение после проявлений ARDS.

G. Сердечно-сосудистое заболевание

Сердечно-сосудистые заболевания относятся к классу заболеваний, поражающих сердце или кровеносные сосуды (артерии и вены). Хотя термин технически относится к любому заболеванию, которое влияет на сердечно-сосудистую систему, он обычно используется для обозначения заболеваний, связанных с атеросклерозом (заболеванием артерий). У этих состояний схожие причины, механизмы и методы лечения.

Лечение сердечно-сосудистых заболеваний зависит от конкретной формы заболевания у каждого пациента, но эффективное лечение всегда включает профилактические изменения образа жизни, о которых говорилось выше. Могут быть полезны лекарственные средства, такие как лекарства, снижающие артериальное давление, аспирин и статины, снижающие уровень холестерина. В некоторых случаях может потребоваться операция или ангиопластика для повторного открытия, восстановления или замены поврежденных кровеносных сосудов.

Различные формы сердечно-сосудистых заболеваний включают аневризмы, стенокардию, аритмию,

атеросклероз, кардиомиопатию, цереброваскулярные заболевания, врожденные пороки сердца, застойную сердечную недостаточность, миокардит, клапанные заболевания, ишемическую болезнь сердца, дилатационную кардиомиопатию, диастолическую дисфункцию, эндокардит, высокое кровяное давление (гипертензия), гипертрофическую кардиомиопатию, пролапс митрального клапана, инфаркт миокарда и венозную тромбоземболию.

Пациенты, страдающие сердечно-сосудистыми заболеваниями, ассоциированными с NET, имеют повышенные уровни NET, присутствующих в крови, которые считаются важными медиаторами патологии сердечно-сосудистых заболеваний, связанных с NET.

В варианте осуществления второго, третьего или четвертого аспектов изобретения предложен способ лечения (профилактического или терапевтического) сердечно-сосудистого заболевания, ассоциированного с NET, у объекта путем ингибирования цитотоксической активности NET, причем указанный способ включает стадию: введения объекту терапевтически или фармацевтически эффективного количества полианионного сульфатированного целлобиозида или полианионного сульфатированного целлобиозида, модифицированного небольшим незаряженным гликозидно-связанным заместителем на его восстанавливающем конце, или его фармацевтически приемлемой соли.

Согласно этому варианту осуществления выбранное соединение предпочтительно представляет собой полианионный сульфатированный целлобиозид, модифицированный небольшим незаряженным гликозидно-связанным заместителем на восстанавливающем конце. Более предпочтительно, небольшой незаряженный гликозидно-связанный заместитель улучшает химическую стабильность полианиона по сравнению с тем же полианионом, который сульфатирован на его восстанавливающем конце. В частности, когда соединение представляет собой mCBS, то это сульфатированный β -О-метилцеллобиозид дисахарид или натриевая соль β -О-метилцеллобиозидсульфата, а именно mCBS.Na.

Соединения, такие как mCBS, могут блокировать токсические эффекты NET и, таким образом, полезны для лечения пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями, ассоциированными с NET.

Таким образом, соединения по настоящему изобретению и терапевтические или фармацевтические композиции, включающие указанные соединения, обеспечивают средства для улучшения цитотоксической активности белков NET при сердечнососудистых заболеваниях, ассоциированных с NET, включая как предварительное лечение (в случае медицинской процедуры), так и лечение после проявлений сердечно-сосудистого заболевания.

Н. Фиброз

Пациенты, страдающие фиброзом, имеют повышенные уровни NET, присутствующих в их крови. NET считаются важными медиаторами патологии фиброза.

В варианте осуществления второго или третьего аспекта изобретения предложен способ ослабления NET-индуцированной цитотоксичности, вызванной фиброзом у объекта, указанный способ включает стадию: введения объекту терапевтически или фармацевтически эффективного количества полианионного сульфатированного целлобиозида или полианионного сульфатированного целлобиозида, модифицированного небольшим незаряженным гликозидно-связанным заместителем на его восстанавливающем конце, или его фармацевтически приемлемой соли.

Согласно этому варианту осуществления выбранное соединение предпочтительно представляет собой полианионный сульфатированный целлобиозид, модифицированный небольшим незаряженным гликозидно-связанным заместителем на восстанавливающем конце. Более предпочтительно, небольшой незаряженный гликозидно-связанный заместитель улучшает химическую стабильность полианиона по сравнению с тем же полианионом, который сульфатирован на его восстанавливающем конце. В частности, когда соединение представляет собой mCBS, то это сульфатированный β -О-метилцеллобиозид дисахарид или натриевая соль β -О-метилцеллобиозидсульфата, а именно mCBS.Na.

Соединения, такие как mCBS, могут блокировать токсические эффекты NET и, таким образом, полезны для лечения пациентов с фиброзом.

Таким образом, соединения по настоящему изобретению и терапевтические или фармацевтические композиции, включающие указанные соединения, обеспечивают средства для улучшения цитотоксической активности NET при фиброзе у объекта, включая как предварительное лечение (в случае медицинской процедуры), так и лечение после проявлений фиброза.

Сахарный диабет

Пациенты, страдающие диабетом, могут иметь повышенный уровень NET в крови. NET считаются важными медиаторами патологии диабета.

В изобретении предложены способы лечения NET-ассоциированных осложнений, при диабете (например, воспаления и замедленного заживления ран). Способы включают введение терапевтически эффективного количества по меньшей мере одного соединения по настоящему изобретению объекту, у которого диагностирован диабет типа 1, типа 1,5 или типа 2.

В варианте осуществления второго или третьего аспекта изобретения предложен способ облегчения диабета у объекта, причем указанный способ включает стадию: введения объекту терапевтически или фармацевтически эффективного количества полианионного сульфатированного целлобиозида или поли-

анионного сульфатированного целлобиозид, модифицированный небольшим незаряженным гликозидно-связанным заместителем на его восстанавливающем конце, или его фармацевтически приемлемой соли.

Согласно этому варианту осуществления выбранное соединение предпочтительно представляет собой полианионный сульфатированный целлобиозид, модифицированный небольшим незаряженным гликозидно-связанным заместителем на восстанавливающем конце. Более предпочтительно, небольшой незаряженный гликозидно-связанный заместитель улучшает химическую стабильность полианиона по сравнению с тем же полианионом, который сульфатирован на его восстанавливающем конце. В частности, когда соединение представляет собой mCBS, то это сульфатированный β -О-метилцеллобиозид дисахарид или натриевая соль β -О-метилцеллобиозидсульфата, а именно mCBS.Na.

Такие соединения, как mCBS, могут блокировать токсические эффекты NET и, таким образом, полезны для лечения пациентов с диабетом.

В некоторых вариантах осуществления симптом диабета с вовлечением NET представляет собой воспаление. Уменьшение воспаления можно контролировать с помощью физического осмотра, а также путем уменьшения наличия воспалительных маркеров.

В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения диабета, который включает введение терапевтически эффективного количества агента, используемого для лечения диабета, и по меньшей мере одного соединения по настоящему изобретению. Агент, используемый для лечения диабета, может представлять собой инсулин или другие агенты, выбранные из следующих: Бигуанидов, Метформина (Glucophage), жидкого метформина (Riomet), метформина с пролонгированным высвобождением (Glucophage XR, Fortamet, Glumetza), Сульфонилмочевины, Глимепирида (Amaryl), Глибурида (Diabeta, Micronase), Глипизид (Glucotrol, Glucotrol XL), Микронизированного глибурида (Glynase), Меглитинидов, Репаглинида (Prandin), Производных D-фенилаланина, Натеглинида (Starlix), Тиазолидиндионов, Пиоглитазона (TZDs), Пиоглитазона, (Actos), DPP-4 Ингибитора, Ситаглиптина (Januvia), Саксаглиптина (Onglyza), Линаглиптина (Tadjenta), Альфа-глюкозидазы, Акарбозы (Precose), Миглитола (Glyset), Секвестрантов желчных кислот, Колезевелама (Welchol), Пиоглитазона и метформина (Actoplus Met), Глибурида и метформина (Glucovance), Глипизид и Метформина (Metaglip), Ситаглиптина и Метформина (Janumet), Саксаглиптина и Метформина (kombiglyze), Репаглинида и Метформина (Prandimet) и Пиоглитазона и Глимепирида (Duetact).

Таким образом, соединения по изобретению и терапевтические или фармацевтические композиции, включающие указанные соединения, обеспечивают средства для улучшения цитотоксической активности NET при диабете у объекта. Таким образом, настоящее изобретение обеспечивает лечение диабета у объекта, включая как предварительное лечение (в случае медицинской процедуры), так и лечение после проявлений диабета.

J. Токсичность химиотерапии, лучевой терапии и цитокинотерапии

Различные формы лечения злокачественного новообразования, включая химиотерапию, облучение и цитокины, связаны с токсичностью, иногда тяжелой, у онкологического пациента. В той степени, в которой токсичность вызвана, по меньшей мере частично, действием NET, настоящее изобретение направлено на снижение этой токсичности с использованием фармацевтических композиций по настоящему изобретению, тем самым уменьшая или облегчая дискомфорт со стороны пациента, а также позволяя более высокие дозы терапии.

Пациенты, страдающие от побочных эффектов различных форм лечения злокачественных новообразований, включая химиотерапию, лучевую терапию и цитокиновую терапию, могут иметь повышенные уровни NET в крови. NET считаются важными медиаторами этих побочных эффектов.

В варианте осуществления второго или третьего аспекта изобретения предложен способ улучшения побочных эффектов различных форм терапии злокачественных новообразований, включая химиотерапию, лучевую терапию и цитокиновую терапию у объекта, путем ингибирования цитотоксической активности NET, причем указанный способ, включает стадию: введения объекту терапевтически или фармацевтически эффективного количества полианионного сульфатированного целлобиозид или полианионного сульфатированного целлобиозид, модифицированного небольшим незаряженным гликозидно-связанным заместителем на его восстанавливающем конце, или его фармацевтически приемлемой соли.

Согласно этому варианту осуществления выбранное соединение предпочтительно представляет собой полианионный сульфатированный целлобиозид, модифицированный небольшим незаряженным гликозидно-связанным заместителем на восстанавливающем конце. Более предпочтительно, небольшой незаряженный гликозидно-связанный заместитель улучшает химическую стабильность полианиона по сравнению с тем же полианионом, который сульфатирован на его восстанавливающем конце. В частности, когда соединение представляет собой mCBS, то это сульфатированный β -О-метилцеллобиозид дисахарид или натриевая соль β -О-метилцеллобиозидсульфата, а именно mCBS.Na.

Соединения, такие как mCBS, могут блокировать токсические эффекты NET и, таким образом, полезны в качестве лечения побочных эффектов различных форм терапии злокачественного новообразования, включая химиотерапию, лучевую терапию и цитокиновую терапию.

В наиболее предпочтительной форме изобретения соединение, используемое для лечения побочных

эффектов различных форм лечения злокачественного новообразования, включая химиотерапию, лучевую терапию и цитокиновую терапию у пациентов, проходящих такую терапию, представляет собой соединение β -О-метилцеллобиозид сульфата или его фармацевтически его приемлемую соль. Например, соединение, используемое в способе, представляет собой β -О-метилцеллобиозидсульфат натрия.

Таким образом, соединения по настоящему изобретению и терапевтические или фармацевтические композиции, содержащие указанные соединения, обеспечивают средства для улучшения цитотоксической активности NET при побочных эффектах различных форм терапии злокачественного новообразования, включая химиотерапию, лучевую терапию и цитокиновую терапию, включая как предварительное лечение (в случае медицинской процедуры) и лечения после этих терапий.

К. Заживление раны

Также представлены методы для использования при заживлении ран. Используемый в настоящем описании термин "заживление ран" относится к сложному процессу, при котором кожа (или другой орган-ткань) восстанавливается после травмы. Классическая модель заживления ран делится на три или четыре последовательных, но частично перекрывающихся стадий: (1) гемостаз, когда сгусток останавливает кровотечение, (2) воспаление, (3) пролиферация и (4) ремоделирование. При повреждении кожи в тщательно организованном каскаде происходит комплекс сложных биохимических событий, направленных на устранение повреждений. Во время фазы воспаления бактерии и клеточные остатки фагоцитируются и удаляются из раны лейкоцитами. Факторы роста тромбоцитов (хранящиеся в альфа-гранулах тромбоцитов) высвобождаются в рану, что вызывает миграцию и деление клеток во время фазы пролиферации. Фаза пролиферации характеризуется ангиогенезом, отложением коллагена, образованием грануляционной ткани, эпителизацией и сокращением раны. Формируются новые кровеносные сосуды, растут фибробласты и формируется новый временный внеклеточный матрикс (ECM), выделяя коллаген и фибронектин. Одновременно происходит реэпителизация эпидермиса, при которой эпителиальные клетки пролиферируют и "ползут" по ложу раны, обеспечивая прикрытие для новой ткани.

Пациенты, страдающие от проблем с заживлением ран, могут иметь повышенные уровни NET в крови. NET считаются важными медиаторами патологии заживления ран.

В варианте осуществления второго или третьего аспекта изобретения предложен способ уменьшения цитотоксичности, индуцированной NET, вызванной во время заживления ран у объекта, причем указанный способ включает стадию: введения объекту терапевтически или фармацевтически эффективного количества полианионный сульфатированный целлобиозид или полианионный сульфатированный целлобиозид, модифицированный небольшим незаряженным гликозидно-связанным заместителем на его восстанавливающем конце, или его фармацевтически приемлемой соли.

Согласно этому варианту осуществления выбранное соединение предпочтительно представляет собой полианионный сульфатированный целлобиозид, модифицированный небольшим незаряженным гликозидно-связанным заместителем на восстанавливающем конце. Более предпочтительно, небольшой незаряженный гликозидно-связанный заместитель улучшает химическую стабильность полианиона по сравнению с тем же полианионом, который сульфатирован на его восстанавливающем конце. В частности, когда соединение представляет собой mCBS, то это сульфатированный β -О-метилцеллобиозид дисульфид или натриевая соль β -О-метилцеллобиозидсульфата, а именно mCBS.Na.

Такие соединения, как mCBS, могут блокировать токсические эффекты NET и, таким образом, полезны в качестве лечения пациентов, страдающих от трудностей заживления ран.

Таким образом, соединения по изобретению и терапевтические или фармацевтические композиции, включающие указанные соединения, обеспечивают средства для улучшения цитотоксической активности NET при лечении ран у объекта.

L. Заболевания центральной нервной системы

У пациентов, страдающих заболеванием центральной нервной системы, в крови может быть повышенный уровень NET. NET считаются важными медиаторами патологии заболеваний центральной нервной системы. Например, болезнь Хантингтона представляет собой аутосомно-доминантное нейродегенеративное заболевание, вызванное экспансией полиглутаминового повтора, что приводит к расширению полиглутаминового трека в белке хантингтона.

В варианте осуществления второго или третьего аспекта изобретения предложен способ улучшения заболевания центральной нервной системы, вызванного NET у объекта, причем указанный способ включает стадию: введения объекту терапевтически или фармацевтически эффективного количества полианионного сульфатированного целлобиозид или полианионного сульфатированного целлобиозид, модифицированного небольшим незаряженным гликозидно-связанным заместителем на его восстанавливающем конце, или его фармацевтически приемлемой соли.

Согласно этому варианту осуществления выбранное соединение предпочтительно представляет собой полианионный сульфатированный целлобиозид, модифицированный небольшим незаряженным гликозидно-связанным заместителем на восстанавливающем конце. Более предпочтительно, небольшой незаряженный гликозидно-связанный заместитель улучшает химическую стабильность полианиона по сравнению с тем же полианионом, который сульфатирован на его восстанавливающем конце. В частно-

сти, когда соединение представляет собой mCBS, то это сульфатированный β -О-метилцеллобиозид дисахарид или натриевая соль β -О-метилцеллобиозидсульфата, а именно mCBS.Na.

Соединения, такие как mCBS, могут блокировать токсические эффекты NET и, таким образом, полезны для лечения заболеваний центральной нервной системы.

Таким образом, соединения по изобретению и терапевтические или фармацевтические композиции, включающие указанные соединения, обеспечивают средства для улучшения цитотоксической активности NET при заболевании центральной нервной системы у объекта, включая как предварительное лечение (в случае медицинской процедуры), так и лечение после проявлений заболевания центральной нервной системы.

3. Терапевтические и фармацевтические формы

В пятом аспекте изобретения предложена терапевтическая или фармацевтическая композиция для применения при лечении NET-ассоциированного осложнения, содержащая: по меньшей мере, полианионный сульфатированный целлобиозид, модифицированный небольшим незаряженным гликозидно-связанным заместителем на его восстанавливающем конце, или его терапевтически или фармацевтически приемлемую соль. Предпочтительно композиция включает терапевтически или фармацевтически приемлемый носитель, вспомогательное вещество и/или разбавитель. Соединение в терапевтическом или фармацевтическом средстве может быть в форме нейтрального свободного основания или в форме соли. Предпочтительно соединение представляет собой натриевую соль β -О-метилцеллобиозидсульфата.

Используемые в настоящем описании термины "фармацевтически приемлемый" или "терапевтически эффективный" относятся к тем соединениям, материалам, композициям и/или лекарственным формам, которые по результатам тщательной медицинской оценки подходят для использования в контакте с тканями человека и животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или других проблем или осложнений, соизмеримых с разумным соотношением польза/риск.

Способы приготовления композиций для введения очевидны специалистам в данной области и более подробно описаны, например, в Remington's Pharmaceutical Science, 15th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Используемый в настоящем описании термин "фармацевтически приемлемый носитель" или "фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество", или "фармацевтически приемлемый разбавитель", "терапевтически приемлемый носитель", или "терапевтически приемлемое вспомогательное вещество", или "терапевтически приемлемый разбавитель" означает материал, композицию или носитель, такой как жидкий или твердый наполнитель, разбавитель, вспомогательное вещество, технологическая добавка (например, смазка, тальк, магний, стеарат кальция или цинка или стеариновая кислота) или инкапсулирующий материал растворителя, участвующий в переносе или транспортировке рассматриваемого соединения из одного органа или части тела в другой орган или часть тела. Каждый носитель, разбавитель и вспомогательное вещество должны быть "приемлемыми" в том смысле, что они совместимы с другими ингредиентами состава и не причиняют вреда пациенту. Это материал, который не является нежелательным с биологической или иной точки зрения, т. е. материал можно применять у человека вместе с активным агентом, не вызывая неприемлемых биологических эффектов или не взаимодействуя пагубным образом с одним или больше компонентами композиции, в которой они содержатся. Некоторые примеры материалов, которые могут служить фармацевтически приемлемыми носителями, разбавителями и вспомогательными веществами, включают, но не ограничиваются ими: (1) сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; (2) крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; (3) целлюлоза и ее производные, такие как карбоксиметилцеллюлоза натрия, метилцеллюлоза, этилцеллюлоза, микрокристаллическая целлюлоза и ацетат целлюлозы; (4) порошкообразный трагакант; (5) солод; (6) желатин; (7) смазывающие агенты, такие как стеарат магния, лаурилсульфат натрия и тальк; (8) вспомогательные вещества, такие как масло какао и воски для суппозитория; (9) масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, сафлоровое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло; (10) гликоли, такие как пропиленгликоль; (11) полиолы, такие как глицерин, сорбит, маннит и полиэтиленгликоль (ПЭГ); (12) сложные эфиры, такие как этилолеат и этиллаурат; (13) агар; (14) буферные агенты, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; (15) альгиновая кислота; (16) апиригенная вода; (17) изотонический физиологический раствор; (18) раствор Рингера; (19) этиловый спирт; (20) pH-буферные растворы; (21) сложные полиэфиры, поликарбонаты и/или полиангидриды; (22) наполнители, такие как полипептиды и аминокислоты; (23) компонент сыворотки, такой как сывороточный альбумин, HDL и LDL; (22) C2-C12 спирты, такие как этанол; и (23) другие нетоксичные совместимые вещества, используемые в фармацевтических составах. В составе также могут присутствовать смазывающие агенты, связующие агенты, наполнители, смазки, красители, дезинтегранты, высвобождающие агенты, покрывающие агенты, подсластители, ароматизаторы, отдушки, консервант, вода, солевые растворы, спирты, антиоксиданты, полиэтиленгликоли, желатин, лактоза, амилоза, стеарат магния, тальк, кремниевая кислота, вязкий парафин, гидроксиметилцеллюлоза, поливинилпирролидон и т. п. Такие термины, как "вспомогательное вещество", "носитель", "разбавитель" и "фармацевтически приемлемый носитель" или подобные используются в настоящем документе взаимозаменяемо.

Примерами терапевтически или фармацевтически приемлемых носителей, вспомогательных веществ или разбавителей являются деминерализованная или дистиллированная вода; физиологический раствор; масла на растительной основе, такие как арахисовое масло, сафлоровое масло, оливковое масло, хлопковое масло, кукурузное масло, кунжутное масло, такое как арахисовое масло, сафлоровое масло, оливковое масло, хлопковое масло, кукурузное масло, кунжутное масло, арахисовое масло или кокосовое масло; силиконовые масла, включая полисилоксаны, такие как метилполисилоксан, фенилполисилоксан и метилфенилполисилоксан; летучие силиконы; минеральные масла, такие как жидкий парафин, мягкий парафин или сквалан; производные целлюлозы, такие как метилцеллюлоза, этилцеллюлоза, карбоксиметилцеллюлоза, карбоксиметилцеллюлоза натрия или гидроксипропилметилцеллюлоза; низшие алканоли, например этанол или изопропанол; низшие аралканоли; низшие полиалкиленгликоли или низшие алкиленгликоли, например полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль, этиленгликоль, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль или глицерин; сложные эфиры жирных кислот, такие как изопропилпальмитат, изопропилмиристант или этилолеат; поливинилпирридон; агар; каррагинан; камедь трагаканта или гуммиарабик и вазелин. Обычно носитель или носители составляют от 10% до 99,9% по массе композиции.

Композиции, описанные в настоящем документе, могут дополнительно содержать другие вспомогательные компоненты, обычно присутствующие в фармацевтических композициях, в установленных в данной области уровнях использования. Таким образом, например, композиции могут содержать дополнительные совместимые фармацевтически активные вещества, такие как, например, противозудные, вяжущие средства, местные анестетики или противовоспалительные агенты. Однако такие материалы при добавлении не должны чрезмерно влиять на биологическую активность компонентов описанных в настоящем документе композиций.

Как подробно описано ниже, терапевтически или фармацевтически приемлемые композиции, описанные в настоящем документе, могут быть специально приготовлены для введения в твердой или жидкой форме, включая те, которые адаптированы для следующего: (1) пероральное введение, например, вливания (водные или неводные растворы или суспензии), таблетки, драже, капсулы, пилюли, таблетки (например, предназначенные для буккального, сублингвального и системного всасывания), болюсы, порошки, гранулы, пасты для перорального применения; (2) парентеральное введение, например, путем подкожной, внутримышечной, внутривенной или эпидуральной инъекции в виде, например, стерильного раствора или суспензии, или состава с замедленным высвобождением; (3) инъекция непосредственно в орган, нуждающийся в лечении, например, внутрипаренхимальным (в мозг), внутритекальным, внутрижелудочковым или внутripеченочным введением; (4) местное применение, например, в виде крема, лосьона, геля, мази или пластыря или спрея с контролируемым высвобождением, для нанесения на кожу; (5) в форме аэрозоля, подходящего для введения путем ингаляции, такой как внутриназальная ингаляция или пероральная ингаляция, (6) внутривагинально или внутривректально, например, в виде пессария, крема, суппозитория или пенки; (7) сублингвально; (8) окулярно в виде глазных капель; (9) трансдермально; (10) трансмукозально; или (11) назально.

В одном варианте осуществления композицию по изобретению вводят путем инъекции, например парентеральной инъекции (например, подкожной, внутримышечной или внутривенной инъекции), или локально в ткани и органы, например, путем внутрипаренхимального (в мозг), внутритекального, внутривректального или внутripеченочного введения.

Фармацевтические композиции, подходящие для инъекций, включают стерильные водные растворы (если они водорастворимы) или дисперсии и стерильные порошки для немедленного приготовления стерильных растворов или дисперсий для инъекций. В идеале композиция стабильна в условиях производства и хранения и может включать консервант для стабилизации композиции против контаминирующего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы.

Стерильные растворы для инъекций могут быть приготовлены путем включения фармацевтической композиции по изобретению в необходимом количестве в соответствующий растворитель с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, при необходимости, с последующей стерилизацией фильтрованием. В качестве иллюстрации, разовая доза может быть растворена в 1 мл изотонического раствора NaCl и либо добавлена к 1000 мл жидкости, либо введена в предполагаемое место инфузии (см., например, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15-е издание, страницы 1035-1038 и 1570-1580).

В случае инъекционных растворов носитель может быть растворителем или дисперсионной средой, содержащей, например, воду, раствор Рингера, изотонический физиологический раствор, фосфатно-солевой буфер, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль (например, 1,2-пропиленгликоль) и жидкий полиэтиленгликоль и т. п.), их подходящие смеси и растительные масла.

Надлежащая текучесть может поддерживаться, например, путем использования покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и путем использования поверхностно-активных веществ. Предотвращение действия микроорганизмов может быть достигнуто путем включения различных противобактериальных и/или противогрибковых агентов. Подходящие агенты хорошо известны специалистам в данной области и включают, например, хлорбутанол, фенол, бензиловый спирт, аскорбиновую кислоту, тиомерсал и тому подобное. Во многих случаях может быть предпочтительным включение в композицию изотонических агентов, например Сахаров, много-

атомных спиртов, таких как маннит, сорбит, хлорид натрия. Пролонгированная абсорбция композиций для инъекций может быть достигнуто путем включения в композицию агента, замедляющего абсорбцию, например моностеарата алюминия и желатина.

Во втором варианте осуществления композицию по изобретению вводят перорально, например, с инертным разбавителем или ассимилируемым съедобным носителем. Для перорального терапевтического введения фармацевтическая композиция может быть включена с вспомогательными веществами и использоваться в форме таблеток для приема внутрь, буккальных таблеток, пастилок, капсул, эликсиров, суспензий, сиропов, лепешек и т. п.

Некоторые примеры подходящих носителей, разбавителей, вспомогательных веществ и адъювантов для перорального применения включают арахисовое масло, жидкий парафин, карбоксиметилцеллюлозу натрия, метилцеллюлозу, альгинат натрия, гуммиарабик, трагакантовую камедь, декстрозу, сахарозу, сорбит, маннит, желатин и лецитин. Кроме того, эти пероральные составы могут содержать подходящие ароматизаторы и красители.

При использовании в форме капсул они могут быть покрыты соединениями, такими как моностеарат глицерина или дистеарат глицерина, которые замедляют дезинтеграцию. Таблетки, пастилки, пилюли, капсулы и т. п. также могут содержать следующее: связующее, такое как трагакантовая камедь, гуммиарабик, кукурузный крахмал или желатин; вспомогательные вещества, такие как дикальцийфосфат; дополнительный дезинтегрирующий агент, такой как кукурузный крахмал, картофельный крахмал, альгиновая кислота и тому подобное; скользящее вещество, такое как стеарат магния; и подсластитель, такой как сахароза, лактоза или сахарин, или ароматизатор, такой как перечная мята, масло грушанки или вишневый ароматизатор.

Когда стандартная лекарственная форма представляет собой капсулу, она может содержать, помимо материалов вышеуказанного типа, жидкий носитель. Различные другие материалы могут присутствовать в качестве покрытий или иным образом модифицировать физическую форму дозированной единицы. Например, таблетки, пилюли или капсулы могут быть покрыты шеллаком, сахаром или обоими.

Жидкие формы для перорального введения (такие как сироп или эликсир) могут содержать, помимо вышеуказанных агентов, жидкий носитель, подсластитель (например, сахарозу), консервант (например, метил- и пропилпарабены), краситель и ароматизатор, такой как вишневый или апельсиновый ароматизатор. Подходящие жидкие носители включают воду, масла, такие как оливковое масло, арахисовое масло, кунжутное масло, подсолнечное масло, сафлоровое масло, арахисовое масло, кокосовое масло, жидкий парафин, этиленгликоль, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, этанол, пропанол, изопропанол, глицерин, жирные спирты, триглицериды или их смеси.

Суспензии для перорального введения могут дополнительно содержать диспергирующие агенты и/или суспендирующие агенты. Подходящие суспендирующие агенты включают карбоксиметилцеллюлозу натрия, метилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, поливинилпирролидон, альгинат натрия или ацетиловый спирт. Подходящие диспергирующие агенты включают лецитин, сложные эфиры полиоксиэтилена и жирных кислот, такие как стеариновая кислота, моно- или диолеат полиоксиэтиленсорбита, -стеарат или -лаурат, моно- или диолеат полиоксиэтиленсорбитана, -стеарат или -лаурат и т. п. Эмульсии для перорального введения могут дополнительно содержать один или больше эмульгирующих агентов. Подходящие эмульгирующие агенты включают диспергирующие агенты, примеры которых приведены выше, или натуральные камеди, такие как гуаровая камедь, гуммиарабик или трагакантовая камедь.

В третьем примере варианта осуществления композицию по настоящему изобретению вводят непосредственно в дыхательные пути объекта в форме аэрозоля или путем распыления. Для использования в виде аэрозолей раствор или суспензия фармацевтически приемлемых композиций по изобретению может быть упакована в аэрозольный контейнер под давлением вместе с подходящими пропеллентами, например углеводородными пропеллентами, такими как пропан, бутан или изобутан, с обычными адъювантами. Такие композиции также можно вводить без давления, например в небулайзере или атомайзере.

Аэрозоли для доставки в дыхательные пути известны в данной области: см., например, Adjei, A. and Garren, J. *Pharm. Res.*, 1: 565-569 (1990); Zanen, P. and Lamm, J - W. *J. Int. J. Pharm.*, 114: 111-115 (1995); Gonda, I. "Aerosols for delivery of therapeutic and diagnostic agents to the respiratory tract," in *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 6:273-313 (1990); Anderson et al., *Am. Rev. Respir. Dis.*, 140: 1317-1324 (1989)).

В четвертом примере варианта осуществления композиция может вводиться в форме липосом. Липосомы обычно получают из фосфолипидов или других липидных веществ и образованы моно- или многослойными гидратированными жидкими кристаллами, которые диспергированы в водной среде. Можно использовать любой нетоксичный, физиологически приемлемый и метаболизируемый липид, способный образовывать липосомы. Композиции в липосомной форме могут содержать стабилизаторы, консерванты, вспомогательные вещества и тому подобное. Предпочтительными липидами являются фосфолипиды и фосфатидилхолины (лецитины), как природные, так и синтетические. Способы образования липосом известны в данной области, и в связи с этим делается конкретная ссылка на: Prescott, Ed., *Methods in Cell Biology*, Volume XIV, Academic Press, New York, N.Y. (1976), p. 33 et seq., содержание которой включено

в настоящее описание в качестве ссылки.

Кроме того, терапевтически или фармацевтически приемлемая композиция по изобретению в соответствии с любым аспектом, вариантом осуществления или примером, описанным в настоящем документе, может быть включена в препараты и составы с замедленным высвобождением. Такие терапевтические или фармацевтические композиции могут дополнительно включать подходящий буфер для минимизации кислотного гидролиза. Подходящие буферные агенты хорошо известны специалистам в данной области и включают, но не ограничиваются ими, фосфаты, цитраты, карбонаты и их смеси.

Соединения по изобретению также можно вводить в форме "пролекарства". Пролекарство представляет собой неактивную форму соединения, которое *in vivo* превращается в активную форму. Подходящие пролекарства включают сложные эфиры, сложные эфиры фосфоновой кислоты и т. д. активной формы соединения.

Кроме того, композиции по изобретению можно имплантировать пациенту или вводить инъекцией с использованием системы доставки лекарств. Также могут быть полезны устройства для доставки с покрытием. См., например, Urquhart, et al. (1984), *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 24: 199-236; Lewis, ed. "Controlled Release of Pesticides and Pharmaceuticals" (Plenum Press, New York, 1981); Пат. США № 3773919; Пат. США № 6747014; и Пат. США № 35 3270960.

В некоторых вариантах осуществления композиции доставляются с использованием устройства или повязки, используемых, например, в процессе лечения раны.

Терапевтически эффективное количество описанных в настоящем документе фармацевтических композиций для любого конкретного объекта будет зависеть от множества факторов, включая токсичность и терапевтическую эффективность фармацевтической композиции; тяжесть недуга; возраст, масса тела, общее состояние здоровья, пол и диета пациента; время приема; способ введения; скорость секвестрации композиций; продолжительность лечения; препараты, применяемые в комбинации или одновременно с лечением, вместе с другими родственными факторами, хорошо известными в медицине.

Токсичность и терапевтическая эффективность могут быть определены стандартными фармацевтическими процедурами на культурах клеток или экспериментальных животных, например, для определения LD50 (смертельная доза для 50% популяции) и ED50 (терапевтически эффективная доза для 50% популяции). Соотношение доз между токсическим и терапевтическим эффектами является терапевтическим индексом и может быть выражено как отношение LD50/ED50. Композиции, демонстрирующие большие терапевтические индексы, являются предпочтительными.

Данные, полученные из анализов клеточных культур и животных моделей, описанных в настоящем документе, можно использовать для определения диапазона терапевтически эффективных доз для применения у человека. Дозировка таких соединений предпочтительно находится в диапазоне циркулирующих концентраций, который включает ED50 с небольшой токсичностью или без нее. Дозировка может варьироваться в этом диапазоне в зависимости от применяемой лекарственной формы и используемого пути введения.

Количество соединения по изобретению, описанного в настоящем документе, которое может быть объединено с материалом носителя для получения лекарственной формы, обычно будет таким количеством соединения, которое оказывает терапевтический эффект. Обычно из ста процентов это количество будет находиться в диапазоне от примерно 0,1% до 99% соединения, предпочтительно от примерно 5% до примерно 70%, наиболее предпочтительно от 10% до примерно 30%.

Дозировка может быть определена врачом и при необходимости скорректирована в соответствии с наблюдаемыми эффектами лечения. Только в качестве иллюстрации композиции могут вводиться таким образом, чтобы фармацевтически приемлемые композиции вводились в дозе от 1 мкг/кг до 150 мг/кг, от 1 мкг/кг до 100 мг/кг, от 1 мкг/кг до 50 мг/кг, от 1 мкг/кг до 20 мг/кг, от 1 мкг/кг до 10 мг/кг, от 1 мкг/кг до 1 мг/кг, от 100 мкг/кг до 100 мг/кг, от 100 мкг/кг до 50 мг/кг, от 100 мкг/кг до 20 мг/кг, от 100 мкг/кг до 10 мг/кг, от 100 мкг/кг до 1 мг/кг, от 1 мг/кг до 100 мг/кг, от 1 мг/кг до 50 мг/кг, от 1 мг/кг до 20 мг/кг, от 1 мг/кг до 10 мг/кг, от 10 мг/кг до 100 мг/кг, от 10 мг/кг до 50 мг/кг или от 10 мг/кг до 20 мг/кг. Следует понимать, что приведенные в настоящем документе диапазоны включают все промежуточные диапазоны, например, диапазон от 1 мг/кг до 10 мг/кг включает от 1 мг/кг до 2 мг/кг, от 1 мг/кг до 3 мг/кг, от 1 мг/кг до 4 мг/кг, от 1 мг/кг до 5 мг/кг, от 1 мг/кг до 6 мг/кг, от 1 мг/кг до 7 мг/кг, от 1 мг/кг до 8 мг/кг, от 1 мг/кг до 9 мг/кг, от 2 мг/кг до 10 мг/кг, от 3 мг/кг до 10 мг/кг, от 4 мг/кг до 10 мг/кг, от 5 мг/кг до 10 мг/кг, от 6 мг/кг до 10 мг/кг, от 7 мг/кг до 10 мг/кг, от 8 мг/кг до 10 мг/кг, от 9 мг/кг до 10 мг/кг и т. д. Кроме того, следует понимать, что диапазоны, промежуточные по сравнению с данными выше, также входят в объем способов и композиций, описанных в настоящем документе, например, в диапазоне от 1 мг/кг до 10 мг/кг, диапазоны доз, такие как от 2 мг/кг до 8 мг/кг, от 3 мг/кг до 7 мг/кг, от 4 мг/кг до 6 мг/кг и т. д.

Если соединение по изобретению представляет собой CBS, mCBS или mCBS.Na, дозировка может составлять от 10 до 800 мкг/мл. Предпочтительно она находится в диапазоне от 50 до 500 мкг/мл. Более предпочтительно дозировка составляет 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600,

610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790 или 800 мкг/мл при введении человеку.

В некоторых примерах изобретения эффективное количество модифицированного сульфатированного целлюбиозидного соединения вводится в виде однократной дозы. В некоторых примерах доза вводится повторно. То есть схемы лечения будут варьироваться в зависимости от тяжести и типа заболевания, общего состояния здоровья и возраста пациента, а также различных других состояний, которые должен учитывать лечащий врач. Что касается продолжительности и частоты лечения, для опытных клиницистов типично наблюдение за объектами, чтобы определить, дает ли лечение терапевтический эффект, и определить, следует ли увеличивать или уменьшать дозировку, увеличивать или уменьшать частоту введения, прекращать лечение, возобновлять лечение или внести другие изменения в схему лечения.

Терапевтические или фармацевтически приемлемые композиции по изобретению согласно любому аспекту, варианту осуществления или примеру, описанным в настоящем документе, могут быть представлены в виде однократного болюсного введения или в виде нескольких доз или курсов лечения, а также могут применяться посредством "непрерывной" терапии, когда небольшое количество терапевтической композиции предоставляется постоянно в течение длительного периода времени.

Если в лечении используется многократное дозирование (включая непрерывную терапию), терапевтические средства или фармацевтическая композиция будут вводиться по схеме дозирования, которая может варьироваться от одного раза в неделю до ежедневного в зависимости от нескольких клинических факторов, таких как чувствительность объекта к модифицированному сульфатированному соединению целлюбиозида, используемому в терапевтической или фармацевтической композиции. Желаемая доза для введения в такой схеме может быть доставлена в виде однократной дозы за один раз или разделена на субдозы, например, 2-4 субдозы, и введена в течение периода времени, например, с соответствующими интервалами в течение дня или с использованием другой подходящей схемы. Такие субдозы можно вводить в виде стандартных лекарственных форм.

В некоторых вариантах осуществления введение является длительным, например, одна или больше доз ежедневно в течение недель или месяцев. Примерами схем дозирования являются введение ежедневно, два раза в день, три раза в день или четыре или больше раз в день в течение 1 недели, 2 недель, 3 недель, 4 недель, 1 месяца, 2 месяцев, 3 месяцев, 4 месяцев, 5 месяцев, или 6 месяцев или больше.

Желаемую дозу можно вводить с помощью непрерывной инфузии или доставки с помощью композиции с контролируемым высвобождением. В этом случае фармацевтическая композиция, содержащаяся в каждой субдозе, должна быть соответственно меньше для достижения общей суточной дозы.

Дозированная единица также может быть приготовлена для доставки в течение нескольких дней, например, с использованием обычного состава с замедленным высвобождением, который обеспечивает замедленное высвобождение фармацевтической композиции в течение периода нескольких дней. Составы с замедленным высвобождением хорошо известны в данной области и особенно полезны для доставки агентов в место, такое, которое может быть использовано с агентами, описанными в настоящем документе. В этом варианте осуществления дозированная единица содержит соответствующее кратное суточной дозы.

4. Комбинированные режимы

В некоторых примерах вариантов осуществления согласно пятому аспекту изобретения идентифицированная композиция может также содержать второй активный агент, соединение или композицию, выбранную из: одного или больше противовоспалительных агентов, антибиотических агентов, противовирусных агентов, противогрибковых агентов и/или любой другой формы терапевтического или фармацевтического соединения, которое подвергает лечению одно или больше состояний, которыми страдает объект. Согласно этому варианту осуществления второй активный агент, соединение или композиция, желательно, обеспечивает дополнительную терапию сепсиса, SIRS и IRI или медицинского состояния или заболевания, ассоциированного с сепсисом, SIRS и IRI. Предпочтительно второй активный агент, соединение или композиция содержит один или больше противовоспалительных агентов.

Терапевтические преимущества могут быть реализованы с помощью комбинированных схем. В некоторых вариантах осуществления изобретения описанные способы могут дополнительно включать стадию: одновременного или сопутствующего введения объекту вместе с лечением по изобретению второго активного агента, который является дополнительным лечением сепсиса, SIRS и IRI или медицинского состояния или заболевания, ассоциированного с сепсисом, SIRS и IRI, которое имеет пациент или страдает от него или находится в группе риска при профилактической доставке.

Второй активный агент может включать, без ограничения, противовоспалительные агенты, антибиотические агенты, противовирусные агенты, противогрибковые агенты или другие формы медицинского вмешательства, отличные от соединения по изобретению.

В качестве иллюстрации, когда способ или лечение направлено на лечение или улучшение состояния септического или несептического заболевания, включающего опосредованную NET патологию у объекта, способ может также включать одновременное или сопутствующее введение объекту второго противовоспалительного агента, антибиотического агента, противовирусного агента, противогрибкового агента или другие формы медицинского вмешательства, которые отличаются от соединения по изобре-

тению, которое обеспечивает дополнительное лечение медицинского состояния, включающего патологию, опосредованную NET.

В одном примере второй активный агент обеспечивает дополнительное лечение или предотвращение сепсиса, SIRS или IRI или медицинского состояния или заболевания, ассоциированного с сепсисом, SIRS или IRI, например сепсиса, SIRS или IRI, или медицинского состояния или заболевания, ассоциированного с сепсисом, SIRS или IRI, включающего опосредованную NET патологию у объекта.

В другом примере второй активный агент обеспечивает дополнительное лечение или предотвращение медицинского состояния, включающего цитотоксичность NET.

В качестве иллюстрации, когда способ лечения направлен на лечение или улучшение септического или несептического болезненного состояния, связанного с сепсисом, SIRS или IRI, включающего опосредованную NET патологию у объекта, способ может также включать одновременное или сопутствующее введение объекту второго противовоспалительного агента, антибиотического агента, противовирусного агента, противогрибкового агента или другой формы медицинского вмешательства, которая отличается от соединения по изобретению, которое обеспечивает дополнительное лечение медицинского состояния, включающего патологию, опосредованную NET.

В некоторых примерах вводимый дополнительный агент представляет собой противовоспалительный агент, такой как стероид, кортикостероиды, ингибитор COX-2, нестероидный противовоспалительный агент (NSAID), аспирин или любую их комбинацию. Более конкретно, вводимый дополнительный агент может быть противовоспалительным агентом, выбранным из группы, состоящей из Алклофенака; Алклометазона дипропионата; Альгестона ацетонида; Альфа-амилазы; Амцинафала; Амцинафида; Амфенака натрия; Амиприлозы гидрохлорида; Анакинры; Аниролака; Анитразафена; Апазона; Динатрий-бальсалазида; Бендазака; Бенксапрофена; Бензидамина гидрохлорида; Бромелайнса; Броперамолы; Будесонида; Карпрофена; Циклопрофена; Цинтазона; Клипрофена; Клобетазола пропионата; Клобетазона бутирата; Клопипрака; Клотиказона пропионата; Корметазона ацетата; Кортодоксона; Дефлазакорта; Дезонида; Дезоксиметазона; Дексаметазона дипропионата; Диклофенака Калия; Диклофенака натрия; Дифлоразона диацетата; Дифлумидона натрия; Дифлунисала; Дифлупредната; Дифталона, диметилсульфоксида; Дроцинонида; Эндризона; Энлимомаба; Эноликама натрия; Эпиризола; Этодолака; Этофенамата; Фельбинака; Фенамола; Фенбуфена; Фенклофенака; Фенклорака; Фендосала; Фенипалона; Фентиазака; Флазалона; Флузаакорта; Флуфенамовой кислоты; Флумизола; Флунизотида ацетата; Флуниксина; Флуниксина меглумина; Флуокортина бутила; Фторметолона ацетата; Флуквазона; Флурбипрофена; Флуретофена; Флутиказона пропионата; Фурапрофена; Фурубифена; Галцинонида; Галобетазола пропионата; Галопредона ацетата; Ибуфенака; Ибупрофена; Ибупрофена Алюминия; Ибупрофена Пиконола; Илонидапа; Индометацина; Индометацина натрия; Индопрофена; Индоксола; Интразола; Изофлупредона ацетата; Изоксепака; Изоксикама; Кетопрофена; Лофемизола гидрохлорида; Ломоксикама; Лотепреднола Этабоната; Меклофенамата натрия; Меклофенамовой кислоты; Меклоризона дибутирата; Мефенамовой кислоты; Месаламина; Мезеклазона; Метилпреднизолона сулептаната; Морнифлюмата; Набуметона; Напроксена; Напроксена натрия; Напроксолола; Нимазона; Олсазина натрия; Орготеина; Орпаноксина; Оксапрозина; Оксифенбутазона; Паранилина гидрохлорида; Пентозана полисульфата натрия; Фенбутазона натрия глицерат; Пирфенидона; Пироксикама; Пироксикама циннамата; Пироксикама оламина; Пирпрофена; Предназата; Прифелона; Продолиновой кислоты; Проквазона; Проксазола; Проксазола цитрата; Римексолон; Ромазарита; Салколекса; Салнаседина; Сальсалата; Салицилатов; Сангвинария хлорида; Секлазона; Серметацина; Судоксикама; Сулиндака; Супрофена; Талметацина; Талнифлюмата; Талосалата; Тебуфелона; Тенидапа; Тенидапа натрия; Теноксикама; Тезикама; Тезимида; Тетридамина; Тиопинака; Тиксокортола пивалата; Толметина; Толметина натрия; Триклонида; Трифлумидата; Зидометацина; Глюкокортикоидов; Зомепаирака натрия и их комбинации.

В некоторых примерах вводимый дополнительный агент представляет собой антибиотический агент, такой как канамицин, актиномицин D, доксорубин, блеомицин, митрамицин, аминогликозиды, ансамицины, карбацефемы, карбапенемы, цефалоспорины, гликопептиды, линкозамиды, макролиды, монобактамы, пенициллины, полипептиды, хинолоны, сульфамиды и/или тетрациклины.

В некоторых примерах вводимый дополнительный агент представляет собой противовирусный агент, такой как нуклеозидный ингибитор обратной транскриптазы, нуклеозидный ингибитор обратной транскриптазы (например, аналоги нуклеозидов), ингибитор протеазы и/или нуклеотидный аналог ингибитора обратной транскриптазы.

В некоторых примерах вводимый дополнительный агент представляет собой противогрибковое средство, такое как имидазол, триазол, тиазол, аллиламин и/или соединение эхинокандина.

В некоторых примерах вводимый дополнительный агент представляет собой средство для лечения диабета. Такие агенты включают агенты, известные в данной области для лечения диабета и/или обладающие антигипергликемической активностью, например, ингибиторы дипептидилпептидазы 4 (DPP-4) (например, Алоглиптин, Линаглиптин, Саксаглиптин, Ситаглиптин, Вилдаглиптин и Берберин), бигуаниды (например, Метформин, Буформин и Фенформин), модуляторы рецепторов, активируемых пролифератором пероксисом (PPAR), такие как тиазолидиндионы (TZD) (например, Пиоглитазон, Ривоглитазон, Розиглитазон и Троглитазон), двойные агонисты PPAR (например, Алеглитазар, Мураглитазар и

Тесаглитазар), сульфанилмочевины (например, Ацетогексамид, Карбутамид, Хлорпропамид, Гликлазид, Толбутамид, Толазамид, Глибенкламид (Глибурид), Глипизид, Гликидон, Гликлопирамид, и Глимепирид), меглитиниды ("глиниды") (например, Натеглинид, Репаглинид и Миьиглинид), глюкагоноподобный пептид-1 (GLP-1) и его аналоги (например, Эксендин-4, Эксенатид, Лираглутид, Альбиглутид), инсулин и аналоги инсулина (например, инсулин лиспро, инсулин аспарт, инсулин глулизин, инсулин гларгин, инсулин детемир, Эксубера и инсулин NPH), ингибиторы альфа-глюкозидазы (например, Акарбоза, Миглитол и Voglibоза), аналоги амилина (например, Прамлинтид), натрийзависимые ингибиторы ко-транспортера глюкозы T2 (SGLT T2) (например, Даглифлозин, Ремоглифлозин и Серглифлозин) и другие (например, Бенфлуорекс и Толрестарт).

Специалисты в данной области поймут, что композиции в соответствии с любым аспектом, вариантом осуществления или примером, описанными в настоящем документе, могут вводиться как часть подхода комбинированной терапии к лечению сепсиса, SIRS или IRI или заболевания или состояния, ассоциированного с сепсисом, SIRS или IRI. В комбинированной терапии соответствующие агенты можно вводить одновременно или последовательно в любом порядке. При последовательном введении может быть предпочтительным, чтобы компоненты вводились одним и тем же путем.

В некоторых примерах, где два агента применяются по отдельности, обычно можно гарантировать, что значительный период времени не истечет между временем каждой доставки, так что оба агента все еще будут способны оказывать преимущественно комбинированный эффект. В таких случаях предполагается, что обычно вводят обе модальности в пределах примерно 12-24 часов друг от друга и, более предпочтительно, в пределах примерно 6-12 часов друг от друга, причем наиболее предпочтительным является время задержки только примерно 12 часов, однако в некоторых ситуациях может быть желательно значительно продлить время лечения, от нескольких дней (2, 3, 4, 5, 6 или 7) до нескольких недель (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8) между соответствующими введениями. Также возможно, что потребуется больше чем одно введение лекарственного средства.

Когда композиции по изобретению и второй активный агент вводят в разных композициях, пути введения могут быть разными. Например, композицию по изобретению вводят любым подходящим путем, известным в данной области, включая, помимо прочего, пероральный или парентеральный пути, включая внутривенное, внутримышечное, подкожное, трансдермальное, дыхательное (аэрозольное), легочное, назальное, ректальное и местное (включая буккальное и сублингвальное) введение, а второй фармацевтически активный агент вводят другим путем, например путем, обычно используемым в данной области для введения указанного фармацевтически активного агента. В неограничивающем примере композиции по настоящему изобретению можно вводить путем инъекции, в то время как второй активный агент можно вводить перорально.

5. Производство лекарственного средства

В шестом аспекте изобретения предложено использование терапевтически или фармацевтически эффективного количества полианионного сульфатированного целлобиозида или полианионного сульфатированного целлобиозида, модифицированного небольшим незаряженным гликозидно-связанным заместителем на его восстанавливаемом конце, или его фармацевтически приемлемой соли при производстве лекарственного средства для лечения медицинского состояния, недомогания или заболевания, включающего NET.

Предпочтительно в этом аспекте изобретения выбранное соединение представляет собой полианионный сульфатированный целлобиозид, модифицированный небольшим незаряженным гликозидно-связанным заместителем на восстанавливаемом конце. Более предпочтительно, небольшой незаряженный гликозидно-связанный заместитель улучшает химическую стабильность полианиона по сравнению с тем же полианионом, который сульфатирован на его восстанавливаемом конце. В частности, когда соединение представляет собой mCBS, то это сульфатированный β -О-метилцеллобиозид дисахарид или натриевая соль β -О-метилцеллобиозидсульфата, а именно mCBS.Na.

Например, в варианте реализации шестого аспекта изобретения обеспечивается использование терапевтически или фармацевтически эффективного количества полианионного сульфатированного целлобиозида или полианионного сульфатированного целлобиозида, модифицированного небольшим незаряженным гликозидно-связанным заместителем на его восстанавливаемом конце или его фармацевтически приемлемой соли при производстве лекарственного средства для лечения или предотвращения сепсиса или IRI, или медицинского состояния или заболевания, ассоциированного с сепсисом, SIRS или IRI у объекта. Предпочтительно модифицированный сульфатированный целлобиозид представляет собой mCBS или, более конкретно, его фармацевтически приемлемую соль, такую как mCBS.Na.

В одном варианте осуществления такого применения лекарственное средство предназначено для лечения сепсиса или SIRS, или медицинского состояния или заболевания, ассоциированного с сепсисом или SIRS, у объекта, где указанное лечение улучшает или ингибирует указанный сепсис или SIRS, или указанное состояние или заболевание, ассоциированное с указанным сепсисом или SIRS.

В другом варианте осуществления такого применения лекарственное средство предназначено для лечения IRI или медицинского состояния или заболевания, ассоциированного с IRI, у объекта, где ука-

занное лечение улучшает или ингибирует указанный IRI или указанное состояние или заболевание, ассоциированное с указанным повреждением.

Еще в одном варианте осуществления такого применения лекарственное средство используется для нейтрализации NET, которые (i) являются цитотоксичными по отношению к эндотелию у объекта, или (ii) способствуют эндотелиальной дисфункции у объекта, или (iii) инициируют коагуляцию путем активации тромбоцитов в организме объекта, или (iv) вызывают хрупкость эритроцитов и, как следствие, анемию объекта.

Еще в одном варианте осуществления производимое лекарственное средство может также включать терапевтически или фармацевтически эффективное количество второго активного агента, соединения или композиции. Согласно этому варианту осуществления второй активный агент, соединение или композиция обеспечивает дополнительную терапию для лечения медицинского состояния, недомогания или заболевания, включающего NET. Желательно, чтобы второй активный агент, соединение или композиция обеспечивали дополнительную терапию для лечения сепсиса, SIRS или IRI или медицинского состояния или заболевания, ассоциированного с сепсисом, SIRS или IRI. Предпочтительно, второй активный агент выбран из: одного или больше противовоспалительных агентов, антибиотических агентов, противовирусных агентов, противогрибковых агентов и/или любой другой формы терапевтического или фармацевтического соединения, которое подвергает лечению одно или больше состояний, которыми страдает объект. Более предпочтительно, чтобы второй активный агент, соединение или композиция содержали один или больше противовоспалительных агентов.

Когда модифицированное сульфатированное целлобиозидное соединение используется в любом из способов по настоящему изобретению, это соединение может быть введено или приготовлено для введения пациенту в виде однократной дозы состава. В некоторых альтернативных вариантах осуществления модифицированное сульфатированное целлобиозидное соединение вводят или готовят для введения пациенту в виде многодозового состава.

Предпочтительно для введения объекту терапевтическая или фармацевтическая композиция предоставляется в виде фармацевтически приемлемой композиции. Находясь в этой форме, (1) композиция будет фармацевтически приготовлена вместе с одним или больше фармацевтически приемлемыми носителями (добавками), и/или разбавителями, и/или вспомогательными веществами, и (2) модифицированное сульфатированное целлобиозидное соединение в композиции может быть приготовлено в нейтральной форме или в форме соли.

Примеры

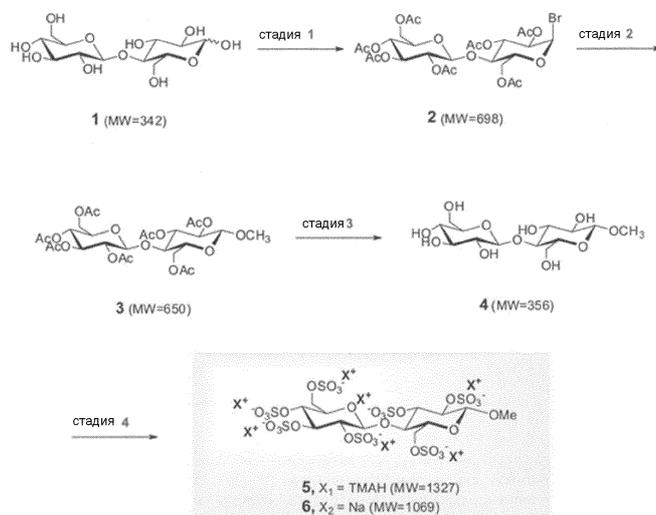
Настоящее изобретение далее описывается в следующем неограничивающем примере, который представлен только в качестве иллюстрации, и его не следует рассматривать как ограничение общности раскрытия описания во всей этой спецификации.

Пример 1. Способ приготовления mCBS-Na

β -О-метилцеллобиозид получают, как описано Jon K Fairweather et al., 2004, Aust. J. Chem., 57: 197-205.

Соединения β -О-метилцеллобиозидсульфата (mCBS) и β -О-метилцеллобиозид сульфата натрия (mCBS.Na) получали, как описано Katrin C Probst и Hans Peter Wessel, 2001, J. Carbohydrate Chemistry, 20 (7 и 8): 549-560, описание которой включено в настоящий документ в качестве ссылки в полном объеме.

β -О-метилцеллобиозидсульфат (mCBS) получали согласно следующей схеме:



Стадия 1. К смеси α -D-целлобиозы 1 (116 г, 338 ммоль) и ледяной уксусной кислоты (1,6 л) добавляли ацетилбромид (300 мл, 500,0 г, 4065 ммоль, 12,0 эквив.) при комнатной температуре. Полученную кремообразную смесь нагревали при 60°C в течение 45-55 минут, пока реакционная смесь не преврати-

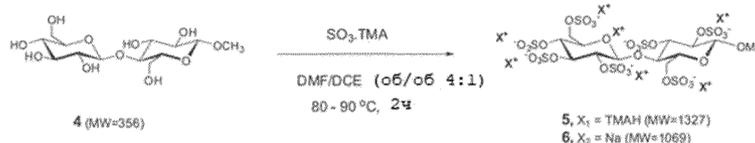
лась в прозрачный раствор, что указывает на завершение реакции.

Осторожно выливали горячий раствор в стакан (10 л) с дробленным льдом (4 кг). Смесь перемешивали до выпадения белого твердого вещества (~ 10 мин). Добавляли еще одну порцию холодной воды (1 л) и продолжали перемешивать 10 мин.

Фильтровали с помощью фильтровальной воронки и промывали твердое вещество холодной водой (700мл×3). Полученное твердое вещество в воронке растворяли в DCM (1 л) и промывали воронку DCM (300мл ×2). Объединенный слой DCM промывали рассолом (1,5 л) и снова экстрагировали DCM (0,5 л). Конечный слой DCM сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении при <35°C в течение 2 часов с получением целевого бромида 2 (172,5 г, выход 74,3%), который непосредственно использовали для следующего гликозилирования.

Стадия 2: К смеси пер-О-ацетилизованного целлобиозилбромида 2 (171 г, 250 ммоль), безводного DCM (800 мл), безводного MeOH (800 мл), активированных молекулярных сит 3А (70 г) добавляли карбонат серебра (Ag₂CO₃, 75 г, 275 ммоль, 1,1 экв.). Полученную смесь перемешивали в отсутствие света в течение 16 часов. Смесь очищали через слой диоксида кремния и элюировали EtOAc. Собранные фракции концентрировали с получением сырого продукта в виде коричневого твердого вещества, которое непосредственно использовали на следующей стадии. Rf соединения 3=0,28 (EtOAc-гексан, 1:1).

Стадия 3. К смеси сырого продукта, полученного на стадии 2, и безводного MeOH (1 л) добавляли небольшой кусочек Na (1,72 г, 0,3 экв., 75 ммоль) при комнатной температуре. Вскоре после этого из раствора начинало выпадать белое твердое вещество. Полученную смесь перемешивали в течение ночи, чтобы гарантировать завершение деацетилирования. Конечную суспензию фильтровали и промывали MeOH (300 мл ×2). Белое твердое вещество собирали и сушили в вакууме в течение ночи с получением конечного целлобиозида 4 (72,5 г, 81,4% за 2 стадии).



Процедура синтеза и очистки для стадии 4:

Стадия 4 Смесь соединения 4 (84,0 г, 236 ммоль), SO₃.TMA (367,4 г, 2,64 моль, 11,2 эквив.), безводного ДМФ (3140 мл) и безводного ДХЭ (767 мл) дегазировали в атмосфере аргона три раза и нагревали при 80-90°C в течение 2 ч. (Контроль реакции: после нагревания в течение 10 минут кремообразная смесь превратилась в прозрачный раствор. Через 30 мин раствор снова помутнел. Через 50 мин агрегированное твердое вещество наблюдали на поверхности колбы.) После охлаждения полученную смесь перемещали в холодную комнату (-5°C) и оставляли на ночь, что позволяет твердому веществу полностью объединиться с растворителем. Полное превращение соединения 4 в соединение 5 подтверждено 1 Н-ЯМР. Раствор декантировали. Неочищенное твердое вещество фильтровали и несколько раз промывали DCM. Полученное твердое вещество растворяли в деионизированной воде и непосредственно подвергали ионообменной колоночной хроматографии [Na-форма DOWEX 50Wx8: 3 кг смолы (H⁺-форма) предварительно помещали в стеклянную гравитационную колонку, регенерировали элюированием 1 М NaOH (-6 л) и нейтрализовали деионизированной водой (-12 л)]. Собранные фракции концентрировали с получением конечного сульфатированного целлобиозида 6 (232,1 г, 92,0%) в виде стекловидного твердого вещества.

Примеры 2-6: Сравнение CBS, mCBS и MTS

В следующих исследованиях авторы изобретения исследовали 3 SPA, а именно пер-О-сульфат целлобиозы (CBS), пер-О-сульфат метил-β-целлобиозида (mCBS) и пер-О-сульфат мальтотриозы (MTS) (структуры на фиг. 1). Методологии, использованные в Примерах 2-6, изложены ниже.

Материалы и методы для следующих примеров (2-6)

Гепарин (слизистая оболочка свиньи - PM) был приобретен у Sigma-Aldrich.

Испытуемый объект - человек. Все исследования, связанные с человеком, были одобрены Комитетом по этике исследований человека АСТ Health. Здоровых взрослых доноров использовали в качестве источника эритроцитов и тромбоцитов для исследований *in vitro*. Давшие согласие пациенты, госпитализированные в отделение интенсивной терапии больницы Канберры, с показателем смертности по шкале APACHE II ≥12 (Knaus, W. A., Draper, E. A., Wagner, D. P., Zimmerman, J. E. APACHE II: система классификации тяжести заболевания. *Crit care med*13, 818-829 (1985)) по прибытии в отделение интенсивной терапии, и у которых был диагностирован сепсис, были включены в наше исследование.

Сепсис был диагностирован на основании следующих критериев (Mayr, F. B., Yende, S. & Angus, D. C. *Epidemiology of severe sepsis. Virulence*5, 4-11 (2014); and Bone, R. C et al. *Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. Chest*101, 1644-1655 (1992)):

а. По меньшей мере, два из следующих:

- i. Тахипноэ > 24 ударов в минуту или PCO_2 в газах крови <32 мм рт.ст.
 - ii. Количество лейкоцитов (WCC) <4000 клеток/ mm^3 или >12000 клеток/ mm^3
 - iii. Частота сердечных сокращений (ЧСС) > 100 ударов в минуту
 - iv. Температура (лихорадка) > 38,0°C или (переохлаждение) <36,0°C.
- b. Альтернативной причины синдрома системного воспалительного ответа (SIRS) не выявлено.
- c. Доказательства сепсиса, включая положительный посев крови, признаки пневмонии на рентгенограмме грудной клетки или других изображениях.
- d. Доказательства дисфункции органов-мишеней: почечная недостаточность, дисфункция печени, изменения в шкале комы Глазго (не связанные с другими причинами) или повышенный уровень лактата в сыворотке.
- e. Рефрактерная гипотензия, требующая инотропной поддержки.

Животные. Все эксперименты на животных были одобрены Комитетом по этике экспериментов на животных Австралийского национального университета. Свободных от патогенов самцов и самок мышей C57BL/6 (в возрасте 6-8 недель), самок мышей BALB/c (в возрасте 5-6 недель) и самцов крыс Wistar (весом от 250 до 350 г) получали из австралийского центра феномики в Австралийском национальном университете.

Клеточная линия и условия культивирования клеток. Эндотелиальные клетки микрососудов человека-1 (HMEC-1), несущие группу крови типа O и, следовательно, не реагирующие с антителами против групп крови в сыворотке человека, поставлялись ATCC и культивировались в среде MCDB 131c добавлением 10% инактивированной нагреванием фетальной телячьей сыворотки (FCS), 2 мМ L-глутамин, 100 МЕ/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 10 нг/мл EGF и 1 мкг/мл гидрокортизона. Клетки инкубировали в 5% CO_2 и окружающем O_2 при 37°C и повторно тестировали на микоплазму с использованием набора MycoAlert Assay (Lonza).

Анализ цитотоксичности, опосредованной гистонами. Для определения цитотоксичности гистонов тимуса теленка (Sigma-Aldrich) к суспензиям HMEC-1 или HUVEC (1×10^6 мл⁻¹) в 96-луночных планшетах добавляли различные концентрации гистонов (100-800 мкг/мл) инкубировали 1 ч при 37°C. Затем клетки инкубировали в течение 5 минут при 37°C с йодидом пропидия (PI; 2,5 мкг/мл) (ThermoFisher Scientific) для обнаружения мертвых клеток и кальцеином-AM (0,04 мкМ) (ThermoFisher Scientific) для обнаружения жизнеспособных клеток, помещали на лед, и процент мертвых и жизнеспособных клеток определяли с помощью проточной цитометрии с использованием стратегии гейтирования. В анализах ингибирования HMEC-1 инкубировали с гистонами (400 мкг/мл) в течение 1 часа при 37°C в присутствии различных концентраций соединений (12,5-400 мкг/мл) перед добавлением PI и кальцеина-AM. Затем определяли цитотоксичность HMEC-1 при каждой концентрации соединения по формуле:

Цитотоксичность (%) = [(Мертвые (соединения и гистоны) - Мертвые (только клетки)) / (Мертвые (только гистоны) - Мертвые (только клетки))] × 100,

и значение IC50 для каждого полианиона затем определяли на основе линии наилучшего соответствия (нелинейный регрессионный анализ) с использованием программного обеспечения Prism (программное обеспечение Graphpad). Во все анализы MTS (IC50 30 мкг/мл) был включен в качестве стандарта для компенсации экспериментальных вариаций, при этом в каждом анализе данные корректировались до MTS, имеющей IC50 30 мкг/мл.

Анализ липидных бислоев. Искусственные липидные бислои, полученные, как описано ранее (Rebeck, R. T. et al. The beta(1a) subunit of the skeletal DHPR binds to skeletal RyR1 and activates the channel via its 35-residue C-terminal tail. *Biophys J* 100, 922-930 (2011).), разделяли на симметричные растворы 150 мМ или 250 мМ KCl (pH ~ 5,5). Гистоны (1 мкМ, 15,2 мкг/мл) добавляли к бислоям отдельно или после 0,5-3 ч инкубации с 10 мкМ CBS (3,5 мкг/мл) или 10 мкМ MTS (5,1 мкг/мл) при ~ 20°C. Ток регистрировали непрерывно после добавления гистона до тех пор, пока бислои не разрывались или эксперимент не был завершен.

Изучение потока кальция в эндотелиальных клетках. HMEC-1 (2×10^7 мл⁻¹) в среде RPMI-1640 инкубировали с Indo-1 AM (5 мкМ) (ThermoFisher) (Tellam, R. L. & Parish, C. R. The effect of sulfated polysaccharides on the free intracellular calcium ion concentration of lymphocytes. *Biochim Biophys Acta* 930, 55-64 (1987); and Weston, S. A., Tellam, R. L. & Parish, C. R. Dextran sulfate induces changes in the free intracellular calcium ion concentration of a subpopulation of immature thymocytes. *Immunol Cell Biol* 169, 369-376 (1991)) при 37°C в течение 60 мин. После 3 промываний средой RPMI-1640 с добавлением 5% FCS клетки ресуспендировали при 4×10^6 мл⁻¹ в охлажденном льдом солевом растворе с HEPES-буфером (NaCl 8 г/л, KCl 0,4 г/л, CaCl₂ 0,2 г/л, MgCl₂·6H₂O 0,2 г/л, D-глюкоза 1,8 г/л, pH 7,4) с добавлением 10 мМ HEPES. Суспензию клеток хранили на льду и использовали в течение 3 ч. Внутриклеточный поток Ca²⁺ контролировали с помощью проточной цитометрии. Клетки предварительно уравнивали и поддерживали при 37°C во время анализа с использованием внешней оболочки, соединенной с нагретой водяной баней. После исключения клеточного дэбриса и слипшихся клеток (на основе светорассеяния FSC/SSC) базальный уровень Ca²⁺ контролировали в течение 2 минут перед добавлением гистонов в присутствии/отсутствии новых соединений. Уровни Ca²⁺ измеряли через 1, 3 и 9 мин после добавления гис-

тона с постоянной скоростью потока (~ 300 событий/с). Поток Ca^{2+} определяли как увеличение отношения средней геометрической интенсивности флуоресценции (GMFI) Ca^{2+} -связанного по сравнению с Ca^{2+} -несвязанным Indo-1.

Микроскопия эритроцитов *in vitro*, анализы агрегации, хрупкости и деформируемости. Опосредованная гистонном агрегация эритроцитов человека и ее ингибирование различными соединениями была обнаружена проточной цитометрией на основе параметров прямого и бокового рассеяния или аутофлуоресценции эритроцитов, как сообщалось ранее авторами изобретения (Kordbacheh, F., O'Meara, CH, Coupland, LA, Lelliott, PM & Parish, CR. Extracellular histones induce erythrocyte fragility and anemia. *Blood* 130, 2884-2888 (2017), и сканирующей электронной микроскопии, как описано ранее (Yabas, M. et al. Mice deficient in the putative phospholipid flippase ATP11C exhibit altered erythrocyte shape, anemia, and reduced erythrocyte life span. *J Biol Chem* 289, 19531-19537 (2014)). Точно так же хрупкость эритроцитов, вызванная гистонами, в присутствии или в отсутствие ингибиторов, была количественно оценена с помощью анализа полного стресса, который был недавно нами разработан (Kordbacheh, F., O'Meara, CH, Coupland, LA, Lelliott, PM & Parish, C. R. Extracellular histones induce erythrocyte fragility and anemia. *Blood* 130, 2884-2888 (2017)). Наконец, снижение деформируемости эритроцитов в присутствии гистонов и влияние ингибиторов на этот процесс оценивали путем измерения прохождения эритроцитов через искусственную селезенку человека (Kordbacheh, F., O'Meara, CH, Coupland, LA, Lelliott, PM & Parish, CR. Extracellular histones induce erythrocyte fragility and anemia. *Blood* 130, 2884-2888 (2017); и Deplaine, G. et al. The sensing of poorly deformable red blood cells by the human spleen can be mimicked *in vitro*. *Blood* 17, e88-95 (2011)).

Анализ агрегации и дегрануляции тромбоцитов *in vitro*. Для исследований агрегации тромбоциты выделяли из цельной крови человека, собранной в вакутейнеры с цитратом натрия, посредством двухстадийного центрифугирования при комнатной температуре (200xg в течение 20 минут, затем обогащенная тромбоцитами плазма 800xg в течение 15 минут), осадок тромбоцитов ресуспендировали в сбалансированном солевом растворе Хэнка, содержащем кальций и магний и гистоны, добавленные и инкубированные в присутствии/отсутствии соединений в указанных концентрациях каждого из них. Образцы оценивали на степень агрегации тромбоцитов после 15-минутного воздействия гистонов с помощью проточной цитометрии с использованием характеристики $\log \text{FSC}$ по сравнению с $\log \text{SSC}$ идентификации тромбоцитов, с увеличением среднего геометрического $\log \text{FSC}$, указывающим на агрегацию тромбоцитов.

Для анализа активации тромбоцитов цельную кровь, собранную в вакутейнерах с цитратом натрия, контролировали на предмет дегрануляции тромбоцитов с использованием режима люминесценции на Chrono-Log Model 700 с реагентом Chrono-Lume (Chrono-Log Corp). Физиологический раствор (300 мкл) добавляли к предварительно нагретой крови (420 мкл) с помощью мешалки *in-situ*. Затем добавляли реагент Chrono-Lume (100 мкл) и инкубировали в течение 2 минут перед добавлением гистонов±соединения, разведенные в воде, в общем объеме 180 мкл в указанных концентрациях. Результаты выражены как высвобождение АТФ, рассчитанное как процент от контроля гистон+физиологический раствор.

Анализ токсичности гистонов *in vivo*. Самкам мышей BALB/c (возраст 5-6 недель), которые более склонны к гистон-индуцированной анемии и им легче вводить *i.v.* в этом молодом возрасте, чем мышам C57BL/6, вводили *i.p.* тестируемые соединения в указанных концентрациях за 10 мин до *i.v.* инъекции гистонов (50 мг/кг) с фосфатом солевом буферном растворе. Ретроорбитальные кровотоечения выполняли стеклянными пипетками Пастера через 10 минут после инъекции гистона и собранную кровь добавляли к кислой цитрат-декстрозе (ACD), 10-минутный образец крови подвергали гематологическому анализу на содержание тромбоцитов и эритроцитов с использованием гематологического анализатора ADVIA 2120i. Селезенки также собирали через 10 мин после инъекции гистона и количественно определяли содержание гемоглобина в селезенке с использованием набора для анализа гемоглобина (Sigma-Aldrich). В случае 4-часовых образцов крови самцам мышей C57/BL/6 (в возрасте 6-8 недель) вводили тестируемые соединения и гистоны, как указано выше, и плазму выделяли и хранили замороженной для последующего биохимического тестирования с маркерами для печени (аланин аминотрансферазы, ALT), почек (креатинин, Сrea) и общих тканей (лактатдегидрогеназа, LDH), определяемых отделением патологии больницы Канберры.

Модель тромбоза глубоких вен (ТГВ) у мышей. Используемая процедура в основном аналогична описанной ранее (Brill, A. et al. Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice. *J Thromb Haemost* 10, 136-144 (2012)). Вкратце, самцов мышей C57BL/6 в возрасте 8 недель подвергали анестезии, делали лапаротомный разрез, выводили кишечник наружу, а затем, после аккуратного отделения от брюшной аорты, нижнюю полую вену (НПВ) непосредственно под почечными венами лигировали до ~ 10% проходимости, и все связанные притоки НПВ были лигированы. Брюшину и кожу закрывали, после чего всем мышам вводили *i.v.* инъекцию гистонов через хвостовую вену (10 мг/кг) или эквивалентный объем физиологического раствора с последующей *i.v.* инъекцией через 5 мин. тестируемых соединений (50 мг/кг) или физиологического раствора. За мышами наблюдали в течение 48 часов, после чего их повторно анестезировали, повторно вскрывали и любые тромбы, которые развились дистальнее стеноза НПВ, удаляли для анализа. Имитационно прооперированным контрольным животным была выполнена

лапаротомия и 90% лигирование НПВ, однако перевязка была удалена сразу после окклюзии НПВ.

Анализ лигирования слепой кишки и пункции (CLP) крыс на сепсис. Анализ CLP проводили на самцах крыс Wistar, как описано ранее (Hubbard, W. J. et al. Cecal ligation and puncture. Shock24 Suppl 1, 52-57 (2005)). Тестируемые соединения (50 мг/кг), растворенные только в физиологическом растворе или эквивалентный объем физиологического раствора (контрольная группа), вводили i.p. за 5 минут до CLP и через 5, 10 и 15 часов после операции до прекращения эксперимента через 20 часов. Крысы Sham-CLP подверглись той же процедуре, однако слепая кишка не была перевязана или пунктирована, и эти крысы получали физиологический раствор в те же сроки, что и выше. По завершении экспериментального периода времени (20 часов) или когда заболеваемость требовала этической эвтаназии, крыс анестезировали и собирали кровь с помощью сердечной пункции в EDTA для последующего анализа функции печени (ALT) и почек (креатинин) Департаментом Патология, Больница Канберры. Склонность к образованию сгустков в образцах крови контрольных животных CLP, обработанных физиологическим раствором (несмотря на присутствие EDTA), препятствовала успешному анализу образцов плазмы от всех животных.

Модель реперфузионного повреждения ишемии сердца крысы. Используемый метод основан на комбинации ранее опубликованных процедур (Takada, Y., Hashimoto, M., Kasahara, J., Aihara, K. & Fukunaga, K. Cytoprotective effect of sodium orthovanadate on ischemia/reperfusion-induced injury in the rat heart involves Akt activation and inhibition of fodrin breakdown and apoptosis. J Pharmacol Exp Ther 311, 1249-1255 (2004); и Hale, S. L., Dae, M. W. & Kloner, R. A. Hypothermia during reperfusion limits 'no-reflow' injury in a rabbit model of acute myocardial infarction. Cardiovasc Res 59, 715-722 (2003)). Самцов крыс Wistar анестезировали изофлуораном, интубировали через трахеостомию и вентилировали дыхательным объемом 1 мл 150 г^{-1} и частотой дыхания 65 вдохов/мин. Дополнительный кислород подавали при $\text{FiO}_2 \sim 30\%$. Для визуализации левого желудочка была выполнена левосторонняя гемиторакотомия. Левое коронарное артериальное сплетение (LCA) было закрыто атрауматической петлей в течение 30 минут до реперфузии в течение 30 минут. Ишемию подтверждали гиперемией миокарда. Тестируемые соединения (30 мг/кг) или эквивалентный объем (200 мкл) физиологического раствора вводили в просвет левого желудочка (подтверждено аспирацией) за 5 минут до освобождения петли для фазы реперфузии.

По завершении реперфузии (30 мин) тиофлавин S (1 мл 200 г^{-1} массы тела) медленно вводили в просвет левого желудочка, чтобы определить территорию микрососудистой непроходимости (MVO) в зоне ишемии (IZ). Территория IZ была определена путем повторной окклюзии атрауматической ловушки и инфузии синих микросфер в левый желудочек (Unisperse Blue, BASF), распределенных в растворах посредством ультразвуковой обработки с использованием ультразвукового устройства CD-6800 (Unisonics). Затем сердце иссекали из грудной клетки, промывали изотоническим физиологическим раствором и вырезали 2-миллиметровые срезы дистальнее атрауматической ловушки под прямым углом к межжелудочковой линии. Этим методом были получены 4 среза миокарда, которые были взвешены и сфотографированы (Sony Handycam, Zeiss с 60-кратным оптическим увеличением) в ультрафиолетовом свете (область MVO) и ярком свете (область IZ) перед инкубацией в хлориде тетразолия (TTC) для определения области некротического миокарда. Планиметрию (Image J, Freeware) использовали для количественной оценки областей IZ, MVO и некроза.

Модель лоскута реперфузионной ткани ишемии крысы. Используемая процедура в значительной степени основана на ранее описанном методе (Bone, R.C. et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. Chest 101, 1644-1655 (1992)). Вкратце, самцов крыс Wistar анестезировали, локально депилировали и вырезали кожно-фасциальный лоскут размером 3 на 6 см, оставляя сосудистую ножку нетронутой. Нижнюю надчревную артерию зажимали, под лоскут помещали тонкий резиновый лист, предотвращающий диффузию кислорода из тканей ниже, и лоскут снова зашивали. Зажим удаляли через 10 часов после наложения, позволяя крови вернуться к лоскуту. Тестируемые соединения (50 мг/кг) или физиологический раствор вводили i.p. за 5 мин до наложения зажима и через 5 мин после его снятия. За крысами наблюдали в течение всего экспериментального периода 72 ч, в течение которого крысы получали дополнительное соединение или физиологический раствор i.p. через 24 и 48 часов после операции. Крысам "Control No Clamp" иссекали тканевой лоскут и помещали под ним резину перед повторным наложением швов, однако сосуд не зажимали, и они получали физиологический раствор в те же моменты времени, что и другие крысы. В конце экспериментального периода жизнеспособность лоскутов определялась процентным соотношением черных некротических или покрасневших участков по сравнению с розовыми жизнеспособными участками. Несмотря на применение елизаветинских воротников и использование анальгезии в качестве успокоительного агента, небольшое количество крыс пришлось преждевременно усыпить, когда они неоднократно самостоятельно снимали свои лоскуты.

Количественное определение ДНК в сыворотках пациентов. Кровь от давших согласие пациентов с оценкой APACHE II > 12 по прибытии в отделение интенсивной терапии собирали из венозной катетеризации в пробирку для отделения сыворотки, пробирки центрифугировали при 2300g в течение 10 минут, а сыворотку собирали и хранили при -80°C . Для количественного определения содержания ДНК сыво-

ротку пациентов с сепсисом (5 мкл) инкубировали с 95 мкл 5 мкМ Sytox Green при 37°C в течение 10 мин в 96-луночном планшете с плоским дном для культивирования. Затем измеряли интенсивность флуоресценции на флуоресцентном планшет-ридере (Tecan Infinite M200 Pro) с возбуждением, установленным на 504 нм, и испусканием на 523 нм.

Детектирование и анализ цитотоксичности сывороток больных сепсисом на эндотелиальные клетки. Чтобы измерить цитотоксическую активность сывороток пациентов с сепсисом в отношении эндотелиальных клеток *in vitro*, НМЕС-1 высевали в 96-луночные планшеты при $2,5 \times 10^4$ на лунку в среде и выращивали при 37°C в 5% CO₂ в течение 48 часов до добавления 50 мкл сыворотки пациента в присутствии/отсутствии ДНКазы I (10 мкг/мл), кроличьих рAb против гистона 3 и гистона 4 (200 мкг/мл) (BioVision) или тестируемых соединений (200 мкг/мл) и инкубировали в течение 3 часов. Затем в каждую лунку с культурой в 20 мкл среды НМЕС-1 добавляли ³H-тимидин (0,5 мКи, MP Biomedical) и инкубировали еще 24 часа. По завершении периода инкубации планшеты подвергали 3 циклам замораживания/оттаивания (-70°C в течение 30 минут, затем 37±0,5°C в течение 30 минут) перед сбором и измерением включения ³H-тимидина. Используя коллектор Filtermate 196 (Packard Bioscience), культуры клеток собирали на фильтры из стекловолокна (EasyTab™-C Self Aligning Filters; Packard Bioscience). Фильтры сушили при 80°C и помещали в планшеты Omnifilter (Perkin Elmer), затем в каждую лунку добавляли 20 мкл сцинтилляционной жидкости Microscint-O (Perkin Elmer) и планшеты закрывали липкой пленкой TopSeal-A (Perkin Elmer). Включение ³H-тимидина измеряли с помощью счетчика сцинтилляции и люминесценции для микропланшетов TopCount NXT™ (Packard Bioscience). Результаты выражены в процентах от пролиферации НМЕС-1, не подвергавшейся воздействию сывороток пациентов.

Статистический анализ Программное обеспечение Prism (Graphpad Software) использовали для выполнения статистических тестов и построения графиков, при этом детали использованного теста были включены в подписи к чертежам.

Доказательства биологических эффектов mCBS *in vitro*

Следующие ниже примеры 2-6 предоставляют доказательства *in vitro* биологического действия mCBS по нейтрализации свободных гистонов и NET.

Пример 2: mCBS защищает эндотелиальные клетки от токсичности гистонов, а эритроциты - от гистон-индуцированной хрупкости и агрегации.

Каждый из CBS, mCBS и MTS (вместе называемых малыми полианионами или SPA) обладают гистон-ингибирующей активностью, аналогичной гепарину, в отличие от сульфатированных моносахаридов, которые намного менее активны согласно измерению гистоновой цитотоксичности для эндотелиальных клеток (фиг. 2a) или индукции хрупкости эритроцитов (RBC) (фиг. 2b).

В этом примере исследовали, способствуют ли mCBS и MTS агрегации эритроцитов и уменьшают ли их деформируемость. По данным проточной цитометрии FSC и SSC, гистоны очень эффективно агрегируют эритроциты, причем mCBS полностью ингибирует этот эффект (фиг. 3a), результат подтвержден сканирующей ЭМ (фиг. 3б). Авторы изобретения также использовали автофлуоресценцию эритроцитов для количественного определения количества эритроцитов, присутствующих в гистон-индуцированных агрегатах. При высоких концентрациях гистонов (400 мкг/мл) было ~ 35 эритроцитов/агрегат, но mCBS и MTS предотвращали агрегацию в зависимости от концентрации, причем MTS был примерно в 2 раза более эффективным, чем mCBS (фиг. 3в). Наконец, эритроциты, экспонированные воздействию гистонов в концентрациях, которые не вызывают агрегацию эритроцитов (<50 мкг/мл) (фиг. 3d), показали значительно меньшее прохождение через искусственную селезенку, этот анализ измерял деформируемость/ригидность эритроцитов (Deplaine, G. et al. The sensing of poorly deformable red blood cells by the human spleen can be mimicked *in vitro*. Blood 117, e88-95 (2011)). Однако добавление mCBS и MTS полностью восстановило способность эритроцитов проходить через искусственную селезенку (фиг. 3d), что указывает на то, что SPA, а также защита эритроцитов от гистон-опосредованной агрегации и хрупкости предотвращают гистон-индуцированную ригидность.

Пример 3: SPA подавляют активацию тромбоцитов гистонами.

Известно, что гистоны вызывают активацию тромбоцитов, поэтому для исследования способности SPA ингибировать этот процесс выделенные, промытые человеческие тромбоциты инкубировали с гистонами, и агрегацию тромбоцитов измеряли с помощью проточной цитометрии. Кроме того, высвобождение АТФ из-за дегрануляции тромбоцитов измеряли после воздействия гистонов на цельную кровь. И агрегация тромбоцитов, и дегрануляция зависели от концентрации гистонов (фиг. 4a, c), различие в чувствительности тромбоцитов к гистонам между двумя анализами объясняется присутствием белков плазмы и эритроцитов в анализе высвобождения АТФ, которые также связывают гистоны. Индуцированная гистоном агрегация тромбоцитов полностью ингибировалась CBS, mCBS и MTS, причем MTS был наиболее активным (фиг. 4б). Несульфатированный СВ, включенный в качестве отрицательного контроля, не обладал ингибирующим действием (фиг. 4б). Аналогичные результаты были получены с гистон-индуцированным высвобождением АТФ (фиг. 4г). Таким образом, CBS, mCBS и MTS эффективны в ингибировании активирующих тромбоцитов свойств гистонов.

Пример 4: SPA предотвращают разрушение липидного бислоя

Затем исследовали, как гистоны опосредуют свою цитотоксичность и, следовательно, как SPA защищают клетки от повреждений, опосредованных гистонами. Известно, что гистоны взаимодействуют с липидными бислоями и повреждают их (Kleine, T.J., Lewis, P.N. & Lewis, S.A. Histone-induced damage of a mammalian epithelium: the role of protein and membrane structure. *Am J Physiol* 273, C1925-1936 (1997)) и действуют как проникающие в клетки белки (Rosenbluh, J. et al. Translocation of histone proteins across lipid bilayers and Mycoplasma membranes. *J Mol Biol* 345, 387-400 (2005)). Таким образом, мы исследовали, опосредуют ли гистоны их цитотоксичность, напрямую разрушая липидные бислои. Чтобы изучить эту возможность, были приготовлены искусственные липидные бислои, и их предрасположенность к разрыву гистонов была определена по изменениям тока через бислои. Липидные бислои имеют ограниченное время жизни, обычно от ~ 30 до 120 минут (Rebbeck, R.T. et al. The beta(1a) subunit of the skeletal DHPR binds to skeletal RyR1 and activates the channel via its 35-residue C-terminal tail. *Biophys J* 100, 922-930 (2011)). В экспериментах авторов изобретения контрольные липидные бислои, содержащие белок ионного канала рианодинового рецептора 1 (RyR1), имели среднее время жизни 46 ± 4 мин, добавление гистонов (1 мкМ) заметно сокращало время жизни до $5,7 \pm 1,2$ мин (фиг. 3а). Фактически, 13/47 бислоев (28%) разорвались в течение 0,3-0,5 мин после добавления гистона, тогда как только 2/125 контрольных бислоев (1,6%) разорвались за тот же период времени, причем более высокие концентрации гистонов (≥ 50 мкМ) приводили к быстрому разрыву большинства бислоев (не показано). Бислои были менее склонны к разрыву гистонами, когда присутствовали CBS или MTS, среднее время жизни бислоя значительно увеличивалось до 18 ± 4 мин и 36 ± 5 мин для CBS и MTS, соответственно (фиг. 5а). Кроме того, время жизни бислоя с MTS существенно не отличалось от контрольного времени жизни. Сходным образом, по сравнению с одними гистонами (28%), частота быстрого разрыва бислоя снизилась до 3/52 бислоя (5,8%) для CBS и 1/40 бислоя (2,5%) для MTS.

Более ранние исследования показали, что гистоны могут индуцировать неселективные Ca^{2+} каналы в клетках и деполяризацию плазматической мембраны. Эти данные дополнительно подтверждают концепцию, что гистоны напрямую взаимодействуют с фосфолипидами клеточной поверхности и нарушают целостность мембран. Чтобы исследовать, защищают ли CBS, mCBS и MTS клетки от индуцированного гистонами потока Ca^{2+} , НМЕС-1 загружали чувствительным к Ca^{2+} красителем, Indo-1, стимулировали гистонами в присутствии или в отсутствие CBS или MTS, и поглощение Ca^{2+} измеряли с помощью проточной цитометрии (фиг. 5b). Гистоны индуцировали более чем 8-кратное увеличение популяции клеток, демонстрирующих высокие уровни внутриклеточного Ca^{2+} , этот ответ достигал плато через 1-3 мин после добавления гистона. Присутствие MTS полностью подавляло ответ Ca^{2+} , а CBS существенно ингибировал ответ (фиг. 5c). Суммарно результаты авторов изобретения показывают, что гистоны повреждают клеточные мембраны, непосредственно разрушая липидный бислои клеток, при этом CBS, mCBS и MTS SPA нейтрализуют это нежелательное свойство гистонов.

Пример 5: Эффект CBS, mCBS и MTS на *in vivo* патологиях, ассоциированных с гистонами

Затем авторы изобретения оценивали способность CBS, mCBS и MTS ингибировать гистон-опосредованные патологии *in vivo*. Внутривенное введение гистонов мышам приводит к сепсисоподобному синдрому, включающему повреждение печени, генерализованное повреждение тканей и почечную недостаточность, что измеряется по уровням циркулирующих ALT, LDH и креатинина. Введение CBS, mCBS и MTS защищало животных от каждой из этих тканеспецифических патологий в зависимости от концентрации, причем MTS был наиболее эффективным, CBS и mCBS были одинаково активны, а несulfатированные СВ неактивны (фиг. 6а). Системные гистоны также вызывают тромбоцитопению и анемию, которые можно предотвратить с помощью лечения mCBS и MTS (рис. 6b). Чтобы изучить, влияют ли CBS, mCBS и MTS на локализованные сосудистые эффекты гистонов, была создана гистон-опосредованная модель DVT (Brill, A. et al. von Willebrand factor-mediated platelet adhesion is critical for deep vein thrombosis in mouse models. *Blood* 117, 1400-1407 (2011)), которая показала, что это почти полностью ингибируется как CBS, так и MTS (фиг. 6c), что соответствует как системным, так и локализованным патологиям, опосредованным свободными гистонами, которые поддаются ингибированию CBS, mCBS и MTS.

Затем авторы изобретения исследовали эффективность CBS, mCBS и MTS в модели сепсиса с пункцией слепой кишки крысы (CLP). Смертности в группе лечения CBS не было, эффект был высоко значимым по сравнению с контрольной группой PBS, и только одна смерть произошла в группе MTS, которая приблизилась к статистической значимости (фиг. 7а). Важно отметить, что высокие уровни ALT и креатинина, обнаруженные в группе, не получавшей обработки, что свидетельствовало об обширном поражении печени и почек, не наблюдались у животных, получавших CBS, но были только частично снижены в группе, получавшей MTS (фиг. 7b). Это открытие несколько парадоксально, поскольку *in vitro* и *in vivo* MTS всегда был более мощным нейтрализатором внеклеточных гистонов, свободных от ДНК, чем mCBS/CBS.

Для дальнейшего изучения этого парадокса CBS и MTS были протестированы на их эффективность на модели реперфузионного повреждения сердца при ишемии сердца (IRI) крыс, причем предыдущие исследования продемонстрировали, что сердечная IRI сильно зависит от NET (Savchenko, A. S. et al.

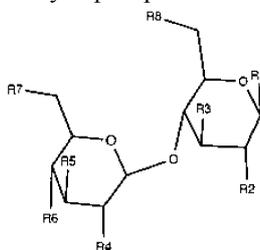
VWF-mediated leukocyte recruitment with chromatin decondensation by PALM increases myocardial ischemia/reperfusion injury in mice. Blood 123, 141-148, (2014); и Ge, L. et al. Neutrophil extracellular traps in ischemia-reperfusion injury-induced myocardial no-reflow: therapeutic potential of DNase-based reperfusion strategy. Am J Physiol Heart Circ Physiol 308, H500-509, (2015)). Примечательно, что в этой модели MTS оказался совершенно неэффективным, тогда как обработка CBS значительно уменьшала площадь микрососудистой непроходимости и некроза миокарда в ишемической зоне на 50% (фиг. 7с). Это неожиданное открытие было в значительной степени подтверждено на модели IRI кожного лоскута крысы, где mCBS последовательно и значительно увеличивали жизнеспособную площадь кожного лоскута, тогда как результаты обработки MTS сильно варьировались (фиг. 7d).

Пример 6: Сравнение способности CBS, mCBS и MTS ингибировать NET в сыворотках пациентов с сепсисом

Основываясь на данных об эффективности *in vivo*, обсужденных выше, мы предположили, что mCBS/CBS ингибируют патологии, опосредованные как гистонами, не содержащими ДНК, так и ассоциированными с NET гистонами, тогда как MTS предпочтительно ингибирует повреждающие эффекты гистонов, свободных от ДНК. Подтверждение этой интерпретации было получено с использованием сывороток пациентов с сепсисом, которые, как мы обнаружили, ингибировали пролиферацию HMEC-1, измеренную по включению ^3H -тимидина (фиг. 8а, b) на уровне, который сильно коррелировал с их оценками АРАСНЕ II (фиг. 9а). Эта корреляция была сильнее, чем наблюдаемая между оценками АРАСНЕ II и уровнями циркулирующей ДНК (фиг. 9b). Дальнейший анализ сыворотки с высоким уровнем ингибирования от пациента 5 показал, что эта цитотоксическая активность была чувствительной к ДНКазе I, а также полностью ингибировалась поликлональными антителами, специфичными для гистонов 3 и 4 (фиг. 9с). Такие данные согласуются с NET, опосредующими антипролиферативные эффекты сывороток пациентов с сепсисом. Наконец, изобретатели обнаружили, что CBS значительно превосходил антипролиферативную активность 10 наиболее ингибирующих сепсис сывороток пациентов, в то время как MTS - нет (фиг. 9d). Таким образом, эти результаты полностью согласуются с тем, что MTS является ингибитором свободных гистонов, а патологии, ингибирующие mCBS/CBS, опосредованы как гистонами, не содержащими ДНК, так и ассоциированными с NET гистонами.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение соединения при лечении или предотвращении опосредованного NET заболевания, где соединение представляет собой полианионный сульфатированный целлобиозид или его фармацевтически приемлемую соль, где полианионный сульфатированный целлобиозид имеет общую структуру:



где R1 представляет собой O- или S-(C₁₋₆)алкил, или R1 представляет собой метоксигруппу или этоксигруппу; и

каждый из R2-R8 представляет собой сульфатную группу;

где опосредованное NET заболевание выбрано из группы, содержащей системный воспалительный ответ, сепсис, острое повреждение почек, острое повреждение печени, острый респираторный дистресс-синдром и ишемически-реперфузионное повреждение (IRI).

2. Применение по п.1, где системный воспалительный ответ представляет собой системный воспалительный ответ на инфекцию или на неинфекционные индукторы; и

где инфекция включает индуцированные бактериями, вирусами, грибами или паразитами инфекции; или

где неинфекционные индукторы включают хирургическое вмешательство, травму, кровотечение, ожоги, острый панкреатит, преэклампсию или острое повреждение почек.

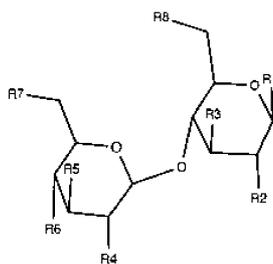
3. Применение по п.1, где сепсис включает септический шок.

4. Применение по п.1, где опосредованное NET заболевание представляет собой сепсис, синдром системного иммунного ответа (SIRS) или IRI.

5. Применение по п.1, где соединение представляет собой сульфатированный β -O-метилцеллобиозид дисахарид или β -O-метилцеллобиозид сульфат натрия.

6. Способ лечения или предотвращения опосредованного NET заболевания, где указанный способ включает введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества соединения, представляющего собой полианионный сульфатированный целлобиозид, или его фармацевтически приемлемой соли, где

соединение, представляющее собой полианионный сульфатированный целлобиозид, имеет общую структуру:



где R1 представляет собой O- или S-(C₁₋₆)алкил, или R1 представляет собой метоксигруппу или этоксигруппу; и

каждый из R2-R8 представляет собой сульфатную группу; и

где опосредованное NET заболевание выбрано из группы, содержащей системный воспалительный ответ, сепсис, острое повреждение почек, острое повреждение печени, острый респираторный дистресс-синдром и ишемически-реперфузионное повреждение (IRI).

7. Способ по п.6, где системный воспалительный ответ представляет собой системный воспалительный ответ на инфекцию или на неинфекционные индукторы; и

где инфекция включает индуцированные бактериями, вирусами, грибами или паразитами инфекции; или

где неинфекционные индукторы включают хирургическое вмешательство, травму, кровотечение, ожоги, острый панкреатит, преэклампсию или острое повреждение почек.

8. Способ по п.6, где сепсис включает септический шок.

9. Способ по п.6, где опосредованное NET заболевание представляет собой сепсис, синдром системного иммунного ответа (SIRS) или IRI.

10. Способ по п.6, где соединение, представляющее собой полианионный сульфатированный целлобиозид представляет собой сульфатированный β-O-метилцеллобиозид дисахарид или β-O-метилцеллобиозид сульфат натрия.

11. Способ по п.6, включающий:

а) введение однократной дозы терапевтически эффективного количества соединения, представляющего собой полианионный сульфатированный целлобиозид, или его фармацевтически приемлемой соли; или

б) введение многократных доз терапевтически эффективного количества соединения, представляющего собой полианионный сульфатированный целлобиозид, или его фармацевтически приемлемой соли; или

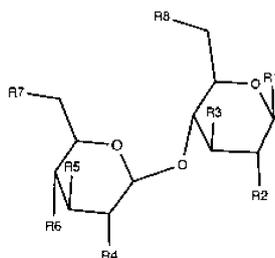
с) одновременное или сопутствующее введение объекту второго активного агента, выбранного из группы, состоящей из: противовоспалительного агента, антибиотического агента, противовирусного агента, противогрибкового агента или другой формы медицинского вмешательства в качестве дополнительного лечения для медицинского состояния или заболевания, которое подвергают лечению; и/или

где второй активный агент включает один или больше противовоспалительных агентов.

12. Применение фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере соединение, представляющее собой полианионный сульфатированный целлобиозид, или его фармацевтически приемлемую соль, и фармацевтически приемлемый носитель, вспомогательное вещество и/или разбавитель;

в лечении или предотвращении опосредованного NET заболевания,

где соединение, представляющее собой полианионный сульфатированный целлобиозид, имеет общую структуру:



где R1 представляет собой O- или S-(C₁₋₆)алкил, или R1 представляет собой метоксигруппу или этоксигруппу; и

каждый из R2-R8 представляет собой сульфатную группу; и

где опосредованное NET заболевание выбрано из группы, содержащей системный воспалительный ответ, сепсис, острое повреждение почек, острое повреждение печени, острый респираторный дистресс-синдром и ишемически-реперфузионное повреждение (IRI).

13. Применение по п.12, где соединение, представляющее собой полианионный сульфатированный целлобиозид, представляет собой сульфатированный β -О-метилцеллобиозид дисахарид или β -О-метилцеллобиозид сульфат натрия.

14. Применение по п.12, где фармацевтическая композиция содержит буфер.

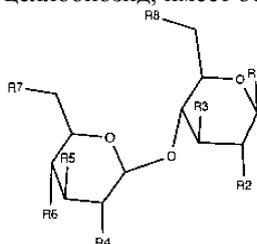
15. Применение по п.14, где буферная система выбрана из группы, состоящей из фосфатной буферной системы, цитратной буферной системы и карбонатной буферной системы.

16. Применение по п.12, где соединение, представляющее собой полианионный сульфатированный целлобиозид, хранится в фосфатном составе, забуференном до pH 7,5.

17. Применение по п.12, где фармацевтическая композиция составлена для однократного или многократного введения субъекту, нуждающемуся в этом.

18. Применение по п.12, где фармацевтическая композиция предоставляется непрерывно в течение длительного периода времени.

19. Фармацевтическая композиция, содержащая по меньшей мере соединение, представляющее собой полианионный сульфатированный целлобиозид, или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемый носитель, эксципиент и/или разбавитель; где соединение, представляющее собой полианионный сульфатированный целлобиозид, имеет общую структуру:



где R1 представляет собой O- или S-(C₁₋₆)алкил, или R1 представляет собой метоксигруппу или этоксигруппу; и

каждый из R2-R8 представляет собой сульфатную группу.

20. Фармацевтическая композиция по п.19, где соединение, представляющее собой полианионный сульфатированный целлобиозид, представляет собой сульфатированный β -О-метилцеллобиозид дисахарид или β -О-метилцеллобиозид сульфат натрия.

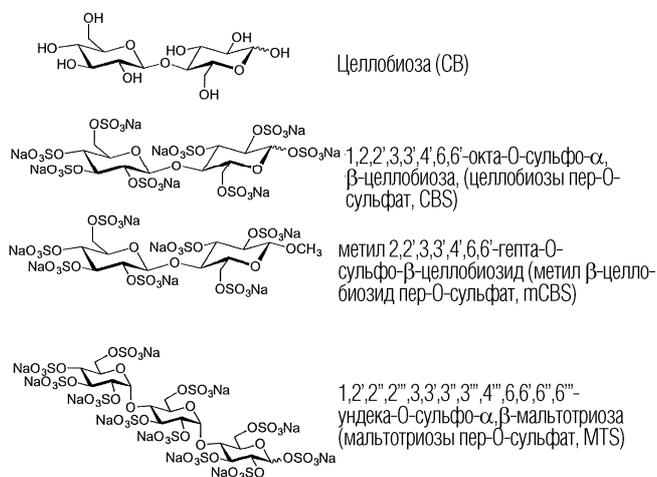
21. Фармацевтическая композиция по п.19, где фармацевтическая композиция содержит буфер.

22. Фармацевтическая композиция по п.21, в которой буферная система выбрана из группы, состоящей из фосфатной буферной системы, цитратной буферной системы и карбонатной буферной системы.

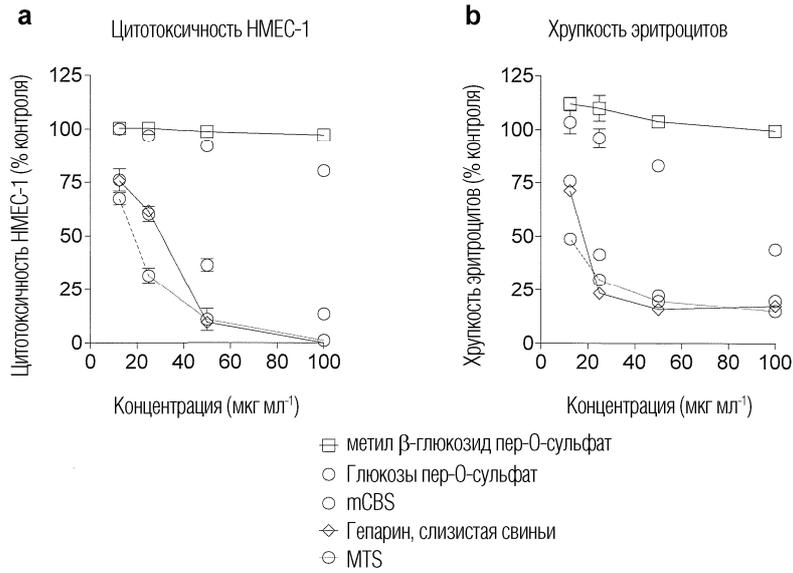
23. Фармацевтическая композиция по п.19, в которой соединение, представляющее собой полианионный сульфатированный целлобиозид, хранится в фосфатном составе, забуференном до pH 7,5.

24. Фармацевтическая композиция по п.19, где фармацевтическая композиция составлена для однократного или многократного введения субъекту, нуждающемуся в этом.

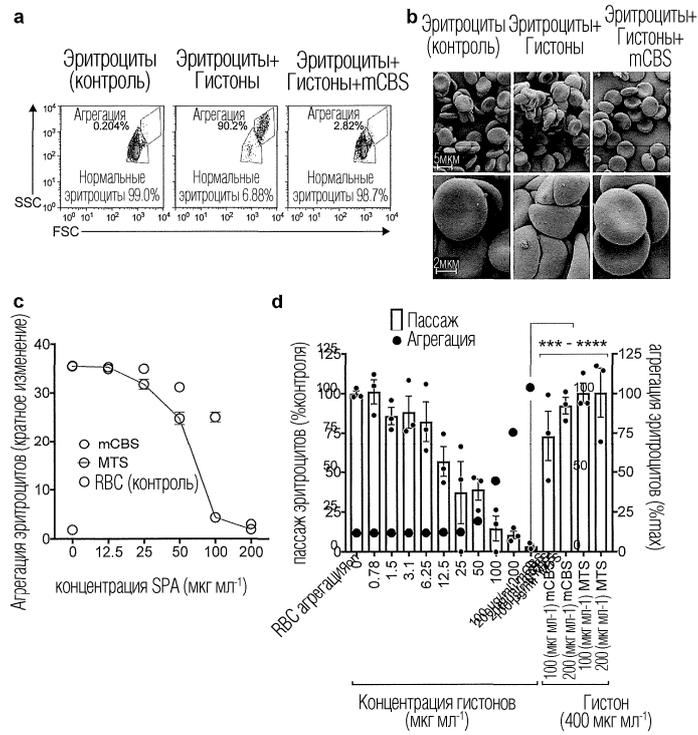
25. Фармацевтическая композиция по п.19, отличающаяся тем, что фармацевтическая композиция составлена таким образом, чтобы обеспечивать ее предоставление непрерывно в течение продолжительного периода времени.



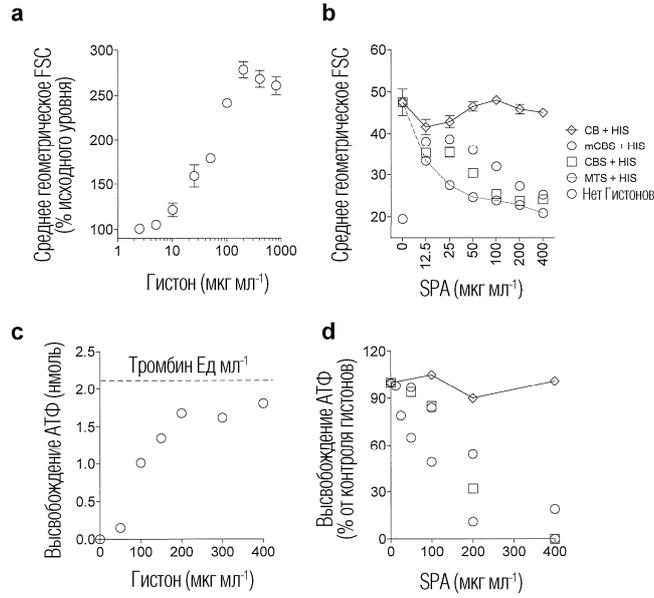
Фиг. 1



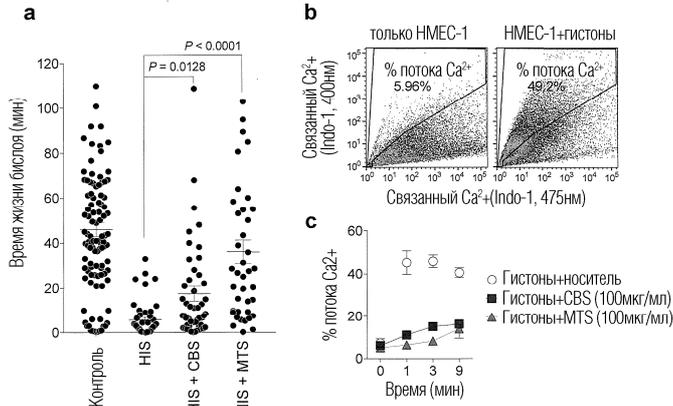
Фиг. 2



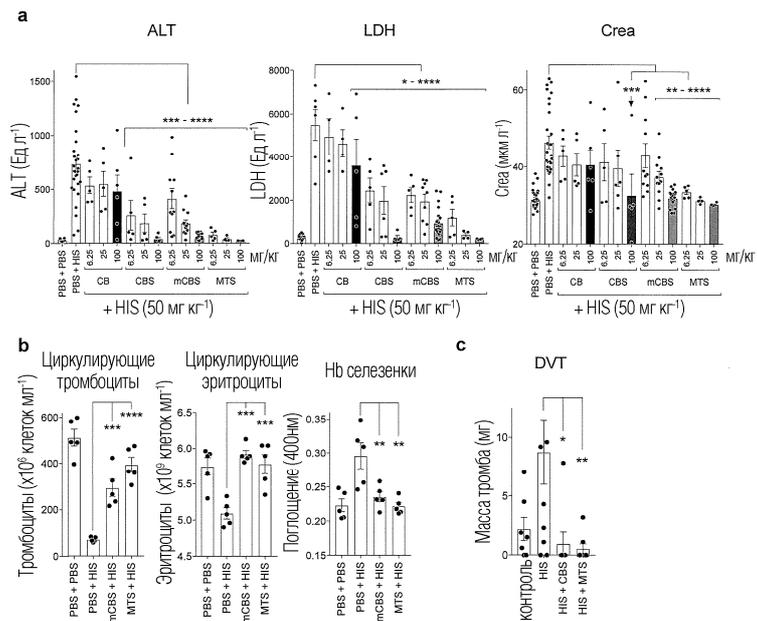
Фиг. 3



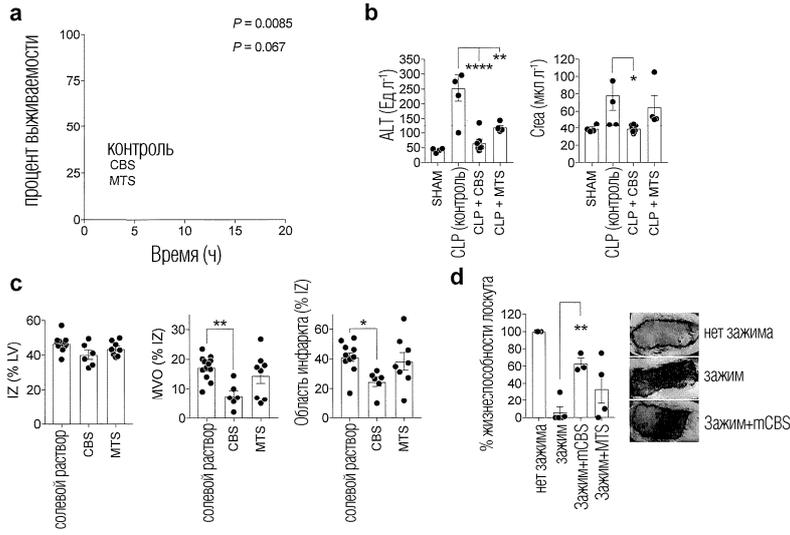
Фиг. 4



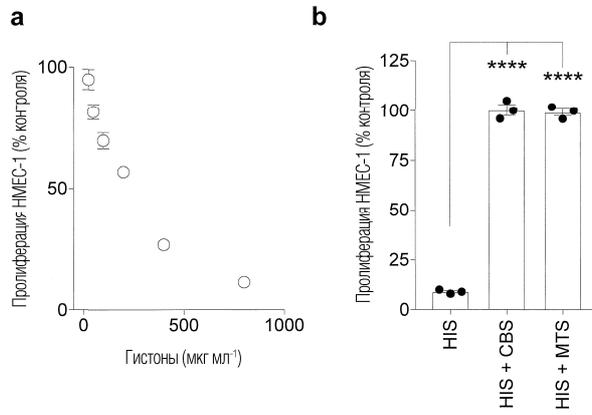
Фиг. 5



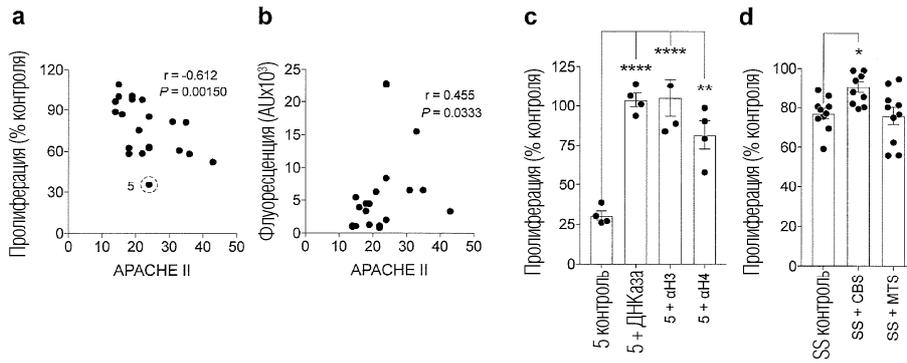
Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9

